



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

LUGAR Y PERIODO DE REALIZACIÓN:

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) Ismael Cosío

Villegas, del 01 de Abril del 2022 al 01 de Octubre del 2022

PROYECTO

“Impacto de la inserción/delección de *ACE1* (rs1799752) en el requerimiento de ventilación mecánica invasiva en pacientes con COVID-19 severa”

Proyecto genérico correspondiente:

Aspectos socio-sanitarios, políticos y legales de la práctica profesional del Q.F.B.

Etapas:

Estudios poblacionales, efectividad y seguridad de medicamentos

Por:

Ponce Aguilar Daniel Israel, 2172033404

Vo. Bo. de las asesoras respecto a los contenidos académicos

Asesora interna

Dra. María Angélica Gutiérrez Nava

No. económico: 34568

Asesora externa

Dra. Ingrid Fricke Galindo

No. de cédula profesional:

11705932

Contenido

Contenido	2
1. Introducción	3
1.1 Mecanismo de acción del SARS-CoV-2	4
1.2 Grados de severidad del SARS-CoV-2	5
1.3 Influencia de <i>ACE1</i> (rs1799752) en la severidad de COVID-19	5
2. Objetivo general	6
2.1 Objetivo específico	6
3. Material y métodos	6
3.1 Cuantificación de las muestras	7
3.2 Genotipificación	7
4. Análisis estadístico	8
5. Actividades realizadas	9
6. Objetivos y metas alcanzadas	9
7. Resultados	10
8. Conclusiones	11
9. Recomendaciones	12
10. Bibliografía	13

1. Introducción

En diciembre de 2019 se informó a la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre un brote de neumonía en Wuhan, provincia de Hubei, China, y no se identificó la etiología. Posteriormente, el 30 de enero de 2020, la OMS declaró que la epidemia por el síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-CoV-2) era una emergencia de salud pública de interés internacional (ESPII). El 11 de febrero de 2020, la OMS nombró oficialmente el brote actual de enfermedad por coronavirus como Enfermedad por Coronavirus-2019 (COVID-19) y el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) nombró al virus como SARS-CoV-2 (Wang, 2020).

El SARS-CoV-2 es un virus que pertenece a la familia *Coronaviridae*, subfamilia *Coronavirinae* que, de acuerdo con el ICTV, pertenecen al orden Nidovirales (Arandia y Antezana, 2020). El componente del ácido nucleico del SARS-CoV-2 está compuesto por casi 30,000 nucleótidos que forman un ARN

monocatenario de sentido positivo (Qasem, 2021). Además, tiene cuatro proteínas estructurales: la proteína Spike (S), la proteína de Envoltura (E), la proteína de Membrana (M) y la proteína de Nucleocápside (N) (Figura 1).

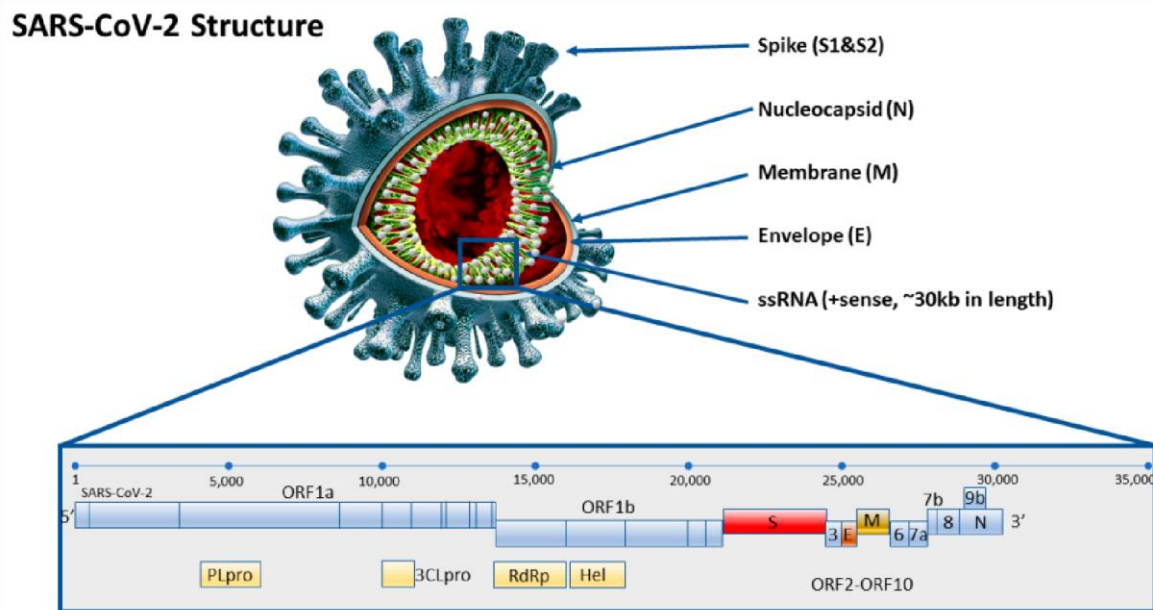


Figura 1. Esquema de la estructura del SARS-CoV-2 tomada de: Kubina, R. (2020, 26 junio). *Molecular and Serological Tests for COVID-19. A Comparative Review of SARS-CoV-2 Coronavirus Laboratory and Point-of-Care Diagnostics*. MDPI. Recuperado el 13 de febrero del 2022 de: <https://www.mdpi.com/2075-4418/10/6/434>

1.1 Mecanismo de acción del SARS-CoV-2

La secuencia del genoma del SARS-CoV-2 comparte el 80% de su identidad de secuencia con el SARS-CoV y el 50% con MERS-CoV. Su genoma comprende 14 marcos abiertos de lectura (ORF), dos tercios de los cuales codifican para 16 proteínas no estructurales (nsp116) que componen el complejo replicasa. El tercio restante codifica para nueve proteínas accesorias y cuatro proteínas estructurales, ya mencionadas, de las cuales la proteína spike (S) media la entrada del SARS-CoV-2 en las células huésped, además tiene un dominio de unión al receptor (RBD) que media el contacto directo con un receptor celular, la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2), y un sitio de escisión S1/S2 que es escindido proteolíticamente por la catepsina celular L y la serina proteasa transmembrana (TMPRSS2) (Figura 2). La TMPRSS2 facilita la entrada viral en la superficie de la membrana plasmática, mientras que la catepsina L activa el pico del SARS-CoV-2 en los endosomas y puede compensar la entrada en las células que carecen de TMPRSS2 (Figura 2). Una vez que el genoma del SARS-CoV-2 se libera en el citosol del huésped, ORF1a y ORF1b se traducen a proteínas replicasas virales, que se escinden en nsps individuales (a través de proteasas virales y proteasas del huésped) las cuales forman la ARN polimerasa dependiente de ARN (nsp12 derivada de ORF1b). Aquí los componentes de la replicasa reorganizan el retículo endoplasmático (RE) en vesículas de doble membrana que facilitan la replicación viral de ARNs genómicos y subgenómicos; estos últimos se traducen a proteínas estructurales accesorias y virales que facilitan la formación de partícula virales (Harrison, 2020).

La COVID-19 se produce por la infección del virus SARS-CoV-2. Los síntomas de esta enfermedad van desde formas leves: fiebre, escalofríos, tos seca y dolor de cabeza, hasta los más graves, sobre todo en el caso de personas con factores de riesgo identificados (p. ej., edad avanzada, género masculino,

y comorbilidades), en las cuales la COVID-19 puede causar graves problemas respiratorios, fallos orgánicos e incluso la muerte (Pérez-López y Mir. 2021). El virus puede transmitirse fácilmente desde individuos sintomáticos o asintomáticos a través de las gotículas respiratorias de la tos, los estornudos y también por contacto directo (Alpdagtas, 2020).

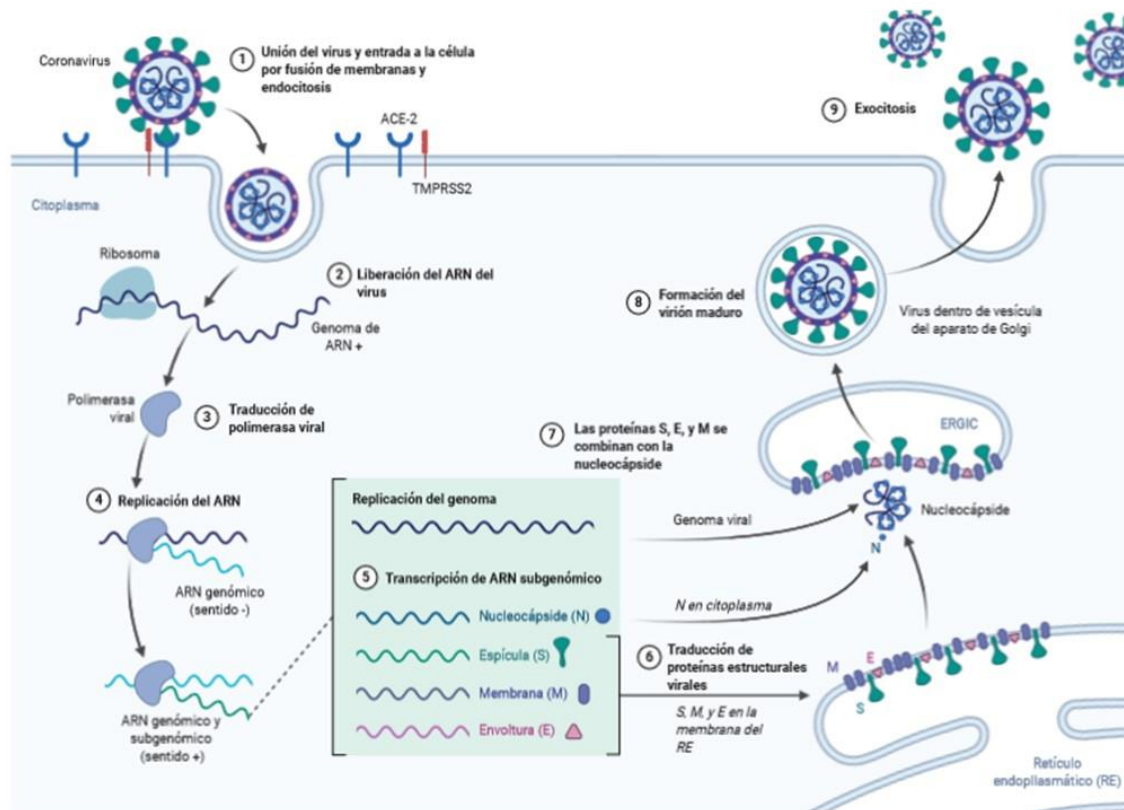


Figura 2. Mecanismo de infección del Coronavirus SARS-CoV-2. Imagen: Castellá, M. (2019). Tomada de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/>

1.2 Grados de severidad del SARS-CoV-2

Se ha reportado que alrededor del 80% de los casos positivos de la COVID-19 presentan un cuadro asintomático a moderado de la enfermedad, un 15% presenta una enfermedad grave que puede progresar a un cuadro severo pulmonar (entre 7 a 10 días), mientras que un 5% siguen deteriorándose en el tiempo ante una respuesta hiperinflamatoria o de tormenta de citocinas, que conlleva a complicaciones como el shock séptico, insuficiencia respiratoria, síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), tromboembolia y fallas de múltiples órganos, especialmente lesiones renales y cardíacas agudas (Meléndez, 2021).

Aunque el órgano diana sea el pulmón, se sabe que la COVID-19 es una enfermedad sistémica, por lo tanto, no suele sólo producir tos seca y disnea, sino también fiebre, malestar general, diarrea, anosmia, disgeusia, entre otros. Inicialmente, puede haber predominio de neutrófilos con linfopenia que va incrementándose, y en muchos pacientes, se evidencia un aumento de transaminasas, ferritina, troponina, dímero D e incluso pueden llegar a desarrollar fibrosis pulmonar reversible (Meléndez, 2021).

1.3 Influencia de *ACE1* (rs1799752) en la severidad de COVID19

La gravedad de los pacientes que presentan COVID-19 están relacionados con el mecanismo de internalización del virus en las células huésped, la edad avanzada, comorbilidades, el sexo y algunas variantes genéticas.

En este sentido, tanto los niveles de *ACE2* como la homeostasis del sistema de reninaangiotensina es otro factor de riesgo importante relacionado a la patogenia de la COVID-19 ya que la *ACE2* (enzima convertidora de angiotensina 2) es el receptor más importante por el cual el virus del SARS-CoV-2 puede realizar su entrada a la célula huésped e infectar a otras células. Existe una relación en la que una expresión alterada de *ACE1/ACE2* podría ser crucial para la gravedad de la enfermedad en casos de la COVID-19, al igual que en las enfermedades cardiovasculares. Incluso estudios sugieren que la tasa de casos de la COVID19 presenta una relación con los polimorfismos de *ACE1* y *ACE2*, debido a que los niveles de éstos están fuertemente regulados por variantes genéticas comunes entre estos genes, sin embargo, los estudios continúan siendo controversiales (Matínez-Gómez, L. 2022).

Los polimorfismos de inserción/delección (I/D) en *ACE1* tienen gran relevancia en las enfermedades respiratorias y cardiovasculares; por ejemplo, el genotipo D/D se ha asociado con la progresión de la enfermedad del SARS-CoV (enfermedad causada por un tipo de coronavirus que ocasionó un brote en el año 2003 en Cantón, China) al síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), en el que se encuentran con mayor frecuencia individuos que presentan el genotipo D/D, los cuales se ha reportado que tienen una tasa de mortalidad mayor que aquellos individuos que contienen el genotipo I/I. Sorprendentemente cerca del 60% de los niveles de *ACE1* en la sangre parecen estar determinados por el polimorfismo de I/D .

Lo anterior ha generado diversas investigaciones tanto para el diagnóstico como para el tratamiento de la enfermedad. Dentro de estas investigaciones está presente la importancia de la variabilidad genética y cómo los genes y sus polimorfismos tienen un rol importante que puede favorecer o no al pronóstico de la enfermedad.

2. Objetivo general

Determinar si la variante *ACE1* (rs1799752) se relaciona con el requerimiento de ventilación mecánica invasiva en pacientes con COVID-19 severa hospitalizados en un centro de tercer nivel.

2.1 Objetivo específico

- Evaluar la asociación de factores no genéticos con el requerimiento de ventilación mecánica invasiva en pacientes con COVID-19 severa.

3. Material y métodos

Criterios de inclusión:

Se incluyeron 1,252 muestras de DNA de pacientes con COVID-19 severa hospitalizados en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) Ismael Cosío Villegas, mayores de 18 años, en los que se confirmó el diagnóstico por prueba de RT-PCR. Para autorizar su participación en el estudio, los participantes firmaron la carta de consentimiento informado correspondiente.

Criterios de exclusión:

Se excluyeron muestras de pacientes que resultaron insuficientes para el análisis.

El protocolo de estudio cuenta con la aprobación del Comité de Ética en Investigación del INER y se realizó de acuerdo a la declaración de Helsinki.

3.1 Cuantificación de las muestras

A partir de la base de datos de los pacientes positivos para la COVID-19 se seleccionaron las muestras que formaron parte del estudio.

Las muestras utilizadas para la preparación de las placas fueron cuantificadas en el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000, utilizando un volumen de 2 μL . La concentración deseable de las muestras fue de entre 200 ng/ μL a 600 ng/ μL . En los casos donde las muestras tuvieron una concentración mayor a lo considerado, se prepararon alícuotas y se ajustaron con solución buffer TE de acuerdo a lo correspondiente.

3.2 Genotipificación

Las muestras fueron centrifugadas a 3,500 rpm durante 5 minutos a 15 °C, siguiente a esto se tomó 1 μL de DNA de cada una de las muestras para añadirlo de manera individual en cada uno de los pozos de la placa. Para la preparación de la mezcla de reacción para una placa completa de 96 pozos se utilizaron 770 μL de agua desionizada, 220 μL de RealQ Plus 2x Master Mix Probe, High ROX, 6 μL de la sonda C_60538594A_10 y 6 μL de la sonda C_60538594B_20 para obtener un volumen final de 1002 μL .

Nota: Fue necesario realizar la preparación de las placas en frío para así mantener en las temperaturas óptimas el Master Mix, las sondas Taqman y el DNA, además de evitar la evaporación de los componentes de la reacción.

Una vez preparada la mezcla de reacción se añadieron 9 μL de ésta a cada uno de los pozos para tener un volumen final de 10 μL por pozo.

La placa preparada se agitó ligeramente en vortex y después se centrifugó a 4,000 rpm por 1 minuto. Una vez centrifugada la placa, se llevó a cabo la programación del equipo de PCR en tiempo real StepOne Plus que se dejó correr aproximadamente 95 minutos para la amplificación de las muestras.

Para la lectura e interpretación de los gráficos obtenidos de la PCR en tiempo real StepOne Plus, se consideró la información proporcionada por las sondas Taqman, donde los fluoróforos de FAM y VIC emitían señales color azul y color verde respectivamente, de este modo la genotipificación fue la siguiente: Los sujetos homocigotos al genotipo de I/I se lograron identificar por la señal emitida del fluoróforo FAM, quien presentaba afinidad al alelo de la inserción, Figura 3.

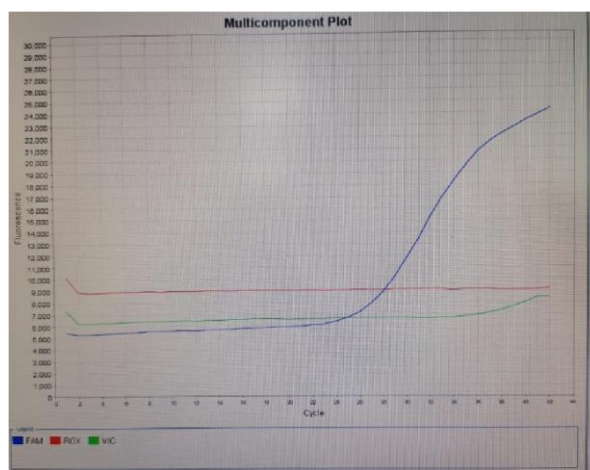


Figura 3. Ejemplo de gráfico representativo del genotipo I/I de *ACE1* rs1799752.

Asimismo, los sujetos que se consideraron heterocigotos al polimorfismo de I/D fueron identificados por las señales de ambos fluoróforos, FAM y VIC que se unieron al alelo de inserción y delección respectivamente y se muestran en la Figura 4.

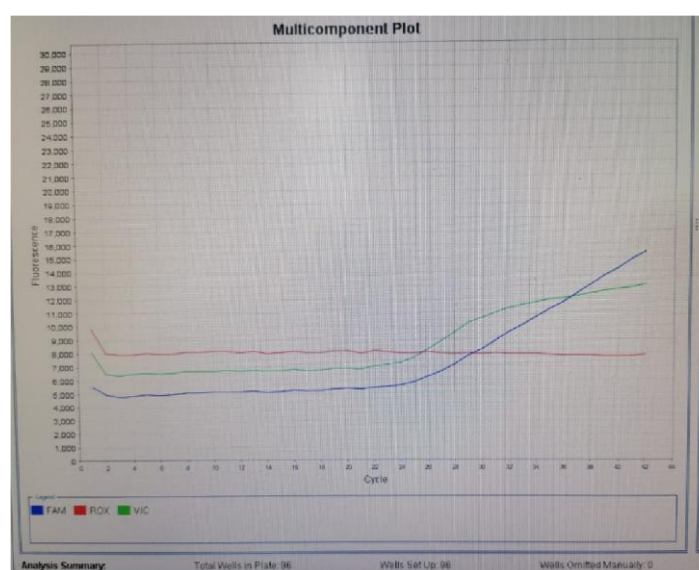


Figura 4. Ejemplo de gráfico representativo del genotipo I/D de *ACE1* rs1799752.

Por último, los sujetos que solo presentaron la señal del fluoróforo VIC, se consideraron homocigotos al alelo de la delección, Figura 5.

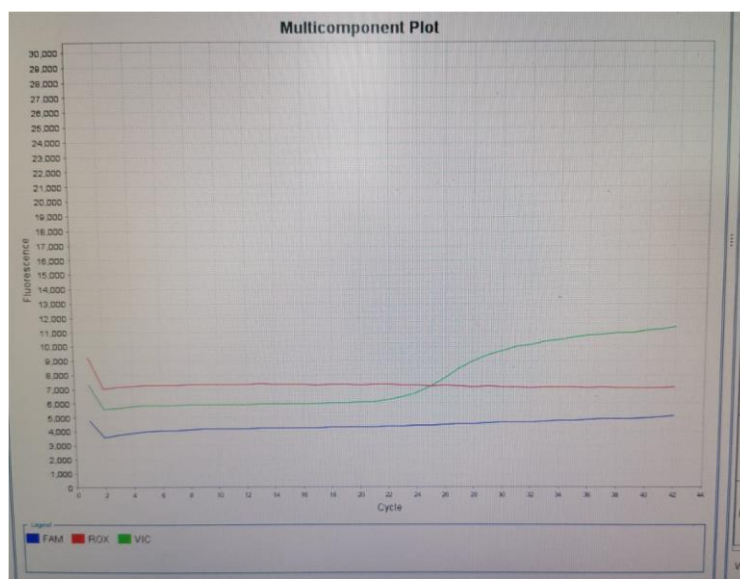


Figura 5. Ejemplo de gráfico representativo del genotipo D/D de *ACE1* rs1799752.

4. Análisis estadístico

Las variables categóricas de cada grupo se resumieron como valores absolutos y porcentajes, y las frecuencias entre grupos fueron comparadas con la prueba exacta de Fischer. Para las variables continuas se incluyeron la mediana y los valores intercuartiles, y estas fueron analizadas mediante la prueba de U de Mann Whitney. Para el análisis estadístico se utilizó el software Rstudio (versión 4.1.3). Todos los valores de p considerados estadísticamente significativos fueron <0.05 .

Las frecuencias de los alelos y genotipos para los modelos dominante, modelo recesivo y modelo sobre dominante, se compararon utilizando tablas de contingencia 2x2 así como tablas de 2xn mediante la prueba exacta de Fischer utilizando el software Epidat (versión 3.1). De igual manera los valores de p considerados estadísticamente significativos fueron <0.05 y se determinaron los OR con IC del 95% para describir los factores de protección o riesgo.

5. Actividades realizadas

- Manejo de muestras de ADN de pacientes con COVID-19.
- Uso de micropipetas para la preparación de placas.
- Cuantificación de muestras de ADN en el espectrofotómetro NanoDrop.
- Electroforesis en gel agarosa.
- Toma de muestras de sangre periférica a compañeros del laboratorio.
- Genotipificación en el termociclador PCR en tiempo real.
- Interpretación de resultados obtenidos de la PCR en tiempo real.
- Seminario semanal (todos los miércoles) en el cual tuve la oportunidad de exponer 2 ocasiones.
- Extracción de ADN.

- Campaña de difusión de información y toma de muestra en pacientes con enfermedades respiratorias no infecciosas.
- Asesor con estudiantes de estancia de verano de investigación en el laboratorio de HLA.
- Manejo de los programas Epidat y Rstudio para análisis estadístico.
- Prueba de ELISA para cuantificación de proteínas en plasmas.
- Tipificación de ABO y Rh

6. Objetivos y metas alcanzadas

Se genotipificaron un total de 1,252 muestras de ADN de pacientes con COVID-19, 852 muestras más de las que se tenía previsto al inicio del proyecto. Además, se analizaron e interpretaron los resultados obtenidos del análisis en la PCR tiempo real.

Por otro lado, el objetivo de este proyecto fue alcanzado al demostrarse que a partir de las genotipificaciones no existe asociación del alelo I/D con el riesgo de requerir VMI sino que el tener este alelo confiere protección ante este riesgo, asimismo, el alelo que demostró implicar un riesgo mayor para la VMI fue el genotipo D/D.

Otro de los objetivos alcanzados fue el desarrollo de habilidades y conocimientos con relación al manejo de los equipos e interpretación de los resultados, así como el buen manejo de los desechos provenientes de los trabajos llevados a cabo en el laboratorio en el día a día.

Una de las metas alcanzadas fue poder contribuir con el laboratorio de HLA en el aporte científico dentro del país en la generación de conocimiento enfocado a la susceptibilidad y severidad de la COVID-19.

Por último, pero no menos importante, el poder colaborar con el laboratorio del INER para asesorar a estudiantes de curso de verano a los que se les asignó proyectos de investigación con el objetivo de tener una mejor formación académica y personal con el fin de concientizar el gran esfuerzo científico por parte de este y todos los laboratorios que buscan ayudar las necesidades que surgen de la población mexicana.

7. Resultados

Los datos clínicos y demográficos de los pacientes incluidos en el estudio se muestran en la Tabla 1. Algunas variables estudiadas se encontraron asociadas con el requerimiento de VMI. Por ejemplo, respecto a la edad, se encontró que la mediana de edad fue mayor entre los pacientes que requirieron VMI (60 años), en comparación con los que no fueron intervenidos con este proceso (56 años). Asimismo, los días de estancia hospitalaria también fueron diferentes entre los grupos de comparación, ya que se observaron un mayor número de días de estancia hospitalaria en el grupo de pacientes con VMI. De igual manera, se observaron diferencias entre los niveles de PaO₂/FiO₂ que presentaron los pacientes al ser admitidos al hospital. Por su parte, el índice de masa corporal no fue diferente entre los grupos estudiados a pesar de que la mayoría de los pacientes tenían un IMC > 25.0 kg/m².

Tabla 1. Datos clínicos y demográficos de pacientes con COVID-19

Variables	Todos n=1,252	VMI n=899	Non-VMI n=353	Valor de p	OR IC (95%)
Edad	59 (50.00-67.00)	60 (51-68)	56 (48-65)	<0.001	

Est. Hosp.	18 (12.00-29.00)	22 (16-33)	11 (8-15)	<0.001
IMC	29.34 (26.17-33.20)	29.39 (26.57-33.30)	28.89 (25.75-33.08)	
PaO ₂ /FiO ₂	147 (102.8-196.2)	135 (94.25-178)	200.5 (141-240)	
Género	844 M (67.41%) 408 F (32.59%)	638 M (70.97%) 261 F (29.03%)	206 M (58.36%) 147 F (41.64%)	0.03
Fumadores	363 (28.99%)	264 (29.37%)	99 (28.05%)	<0.001
Sobrevivientes	742 (59.27%)	441 (49.05%)	301 (85.27%)	1.74 (1.35-2.25)
DM2	340 (27.16%)	246 (27.36%)	94 (26.63%)	<0.001
				8.89 (5.41-14.63)
HAS	438 (34.98%)	318 (35.37%)	120 (33.99%)	
Enf. resp.	95 (7.58%)	68 (7.56%)	27 (7.65%)	
Enf. Card.	49 (3.91%)	38 (4.23%)	11 (3.12%)	
Indel ACE1	495 I/I (39.54%) 477 I/D (30.10%) 280 D/D (22.36%)	362 I/I (40.27%) 321 I/D (35.71%) 216 D/D (24.03%)	133 I/I (37.65%) 156 I/D (44.19%) 64 D/D (18.13%)	0.01
				0.76 (0.57-0.99) 1.24 (0.88-1.75)

Las variables continuas se presentan como mediana (rango intercuartílico). Las frecuencias de las variables categóricas en valores absolutos, números y porcentajes. El valor de p de la prueba U de Mann-Whitney y la prueba exacta de Fisher estadísticamente significativos son <0.05 se encuentran en los recuadros rojos con IC 95%. IMC (índice de masa corporal), VMI (ventilación mecánica invasiva), DM2 (diabetes mellitus tipo 2), HAS (hipertensión arterial).

Continuando con la Tabla 1 de los datos clínicos y demográficos, se hallaron diferencias significativas en la frecuencia de pacientes del género masculino entre los grupos de estudio, por lo que se observó que los hombres tienen un mayor riesgo de requerir VMI en comparación con el género femenino (OR 1.74, IC 95% 1.351-2.53).

De igual manera se encontró diferencia en la tasa de supervivencia de los pacientes, ya que sobrevivieron el 49.05% de los pacientes que requirieron de VMI, mientras que el 85.27% de los no ventilados sobrevivían (OR=8.89, IC 95% =5.41-14.63).

Las frecuencias de I/I, I/D y D/D también fueron distintas entre los grupos. Se observó que ser portador del alelo I/D confería protección entre los pacientes (OR=0.76, IC 95% 0.57-0.99).

La Tabla 2 muestra el estudio de asociación de los alelos y genotipos de la variante estudiada con el requerimiento de ventilación mecánica invasiva en pacientes con COVID-19 severa, en donde se muestra el riesgo que confiere el genotipo D/D a mayor severidad de la enfermedad.

Tabla 2. Estudio de asociación de los modelos de frecuencias genotípicas y alélicas de ACE1 rs1799752 con motivo de egreso respecto a la defunción o mejora de los pacientes.

Genotipo ACE1	Todos n= 1,129	Motivo de egreso		Valor de p
		Defunción n= 746	Mejora n= 383	
I/I	502 (39.5%)	287 (38.47%)	148 (38.64%)	

I/D	486 (38.24%)	297 (39.81%)	138 (36.03%)	0.305
D/D	283 (22.27%)	162 (21.72%)	97 (25.33%)	
Modelo dominante				
I/I	502 (39.5%)	287 (38.47%)	148 (38.64%)	1
I/D + D/D	769 (60.5%)	459 (61.53%)	235 (61.36%)	
Modelo recesivo				
D/D	283 (22.27%)	162 (21.72%)	97 (25.33%)	0.179
I/I + I/D	988 (77.73%)	584 (78.28%)	286 (74.67%)	
Modelo sobre dominante				
I/D	486 (61.76%)	297 (39.81%)	138 (36.03%)	0.221
I/I + D/D	785 (61.76%)	449 (60.19%)	245 (63.97%)	

Las frecuencias se presentan como números y porcentajes. Los valores de p estadísticamente significativos $p < 0.05$. I/I homocigoto de inserción, I/D heterocigoto de inserción/delección y D/D homocigoto de delección.

Se observó que el genotipo I/D confería una protección para el requerimiento de VMI por otro lado el alelo D/D confería un posible factor de riesgo al mostrar un OR de 1.24, no obstante, el IC de 0.880-1.747 incluía a la unidad por lo que no se podía asociar directamente, y se realizó un análisis de los datos por tres distintos modelos: el dominante, el recesivo y el sobre dominante.

En el modelo recesivo se agruparon los alelos más frecuentes I/I + I/D y D/D y se compararon las frecuencias entre los grupos VMI y no VMI, en donde se hallaron diferencias significativas indicando un mayor riesgo al requerimiento de VMI entre los pacientes con genotipo D/D. Por su parte en el modelo sobre dominante se encontraron resultados significativos en las frecuencias del alelo I/D con valor de $p=0.007$, OR de 0.701 e IC de 0.546-0.901 que confieren un riesgo menor (protección) a requerir VMI.

8. Conclusiones

Se observaron diferencias en las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo *ACE1* rs1799752 asociadas a la severidad y susceptibilidad de la enfermedad COVID-19 entre los grupos de VMI. El polimorfismo D/D confiere riesgo mientras que el polimorfismo I/D confiere protección, sin embargo, esto no quiere decir que el presentar este polimorfismo te garantice no poder ser infectado por el SARS-Cov-2, sino que solo existe un riesgo menor de requerir VMI en comparación con el polimorfismo D/D. Se requieren de más estudios para evaluar la actividad enzimática de *ACE1* así como sus variantes genéticas en diferentes poblaciones de América.

9. Recomendaciones

- Realizar estudios en *ACE2* para encontrar si existe alguna sinergia con *ACE1*
- Realizar pruebas enzimáticas para evaluar la actividad de *ACE1* en pacientes con COVID-19 en los distintos polimorfismos.
- Realizar pruebas enzimáticas para evaluar la actividad de *ACE1* en casos post COVID-19 en los distintos polimorfismos.

10. Bibliografía

Alpdagtas, S. (2020). *Evaluation of current diagnostic methods for COVID-19*. *APL Bioengineering*.

Conacyt. (2022, Marzo 14). *Covid-19 México*. Recuperado de <https://datos.covid-19.conacyt.mx/>

Harrison, A., Lin, T., Wang, P. (2020). *Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis*. *Trends in Immunology*, December 2020, Vol. 41, No. 12. pp 1100-1115.

Martínez-Gomez, L. (2022, Febrero 17). *ACE and ACE2 Gene Variants Are Associated With Severe Outcomes of Covid -19 in Men* [Archivo PDF]. Recuperado de: [file:///C:/Users/Dano/Downloads/Mart%C3%ADnezGomez2022ACE%20and%20ACE2%20gene%20variants%20are%20associated%20with%20severe%20outcomes%20of%20COVID19%20in%20Men%20\(3\).pdf](file:///C:/Users/Dano/Downloads/Mart%C3%ADnezGomez2022ACE%20and%20ACE2%20gene%20variants%20are%20associated%20with%20severe%20outcomes%20of%20COVID19%20in%20Men%20(3).pdf) .

Meléndez, A. (2020, Junio). *Características y evolución clínico-epidemiológica según su gravedad en pacientes ingresados con la COVID-19 confirmado* [Archivo PDF]. Recuperado de: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2021/07/1255119/02-melendez-a27-42.pdf> .

Organización Mundial de la Salud. (2022, Marzo). *Who Coronavirus (COVID-19) Dashboard*. Recuperado de: <https://covid19.who.int>

Wang, M. (2020). *SARSCoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development*. *Front. Cel. Infect Microbiology*.