



Pontificia Universidad  
**JAVERIANA**  
Bogotá

**Evaluación del desempeño pronóstico de los parámetros hematológicos en la predicción de la severidad de la enfermedad COVID-19, en pacientes hospitalizados en la unidad de aislamiento respiratorio.**

**Marian Torcoroma Jaime Chiquillo**

**TESIS DE GRADO**

**Presentada como requisito para optar el título de  
Magister en ciencias del Laboratorio Clínico**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
MAESTRÍA EN CIENCIAS DEL LABORATORIO CLÍNICO  
BOGOTÁ, COLOMBIA  
2022**



Pontificia Universidad  
**JAVERIANA**  
Bogotá

**Evaluación del desempeño pronóstico de los parámetros hematológicos en la predicción de la severidad de la enfermedad COVID-19, en pacientes hospitalizados en la unidad de aislamiento respiratorio.**

**Marian Torcoroma Jaime Chiquillo**

**Martha Fabiola Rodríguez. MSc**  
**Directora**

**Claudia Marcela Parra. PhD**  
**Co-Directora**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS DEL LABORATORIO CLÍNICO**  
**BOGOTÁ, COLOMBIA**  
**2022**

Artículo 23 de la resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vean en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”



Pontificia Universidad  
**JAVERIANA**  
Bogotá

**Evaluación del desempeño pronóstico de los parámetros hematológicos en  
la predicción de la severidad de la enfermedad COVID-19, en pacientes  
hospitalizados en la unidad de aislamiento respiratorio.**

**Marian Torcoroma Jaime Chiquillo**

**APROBADO**

**Martha Fabiola Rodríguez. MSc**

**Directora**

**Claudia Marcela Parra. PhD**

**Co-Directora**

---

**Myriam Stella Silva. MSc**

**Jurado**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
MAESTRÍA EN CIENCIAS DEL LABORATORIO CLÍNICO  
BOGOTÁ, COLOMBIA**

**2022**



Pontificia Universidad  
**JAVERIANA**  
Bogotá

Evaluación del desempeño pronóstico de los parámetros hematológicos en la predicción de la severidad de la enfermedad COVID-19, en pacientes hospitalizados en la unidad de aislamiento respiratorio.

Marian Torcoroma Jaime Chiquillo

APROBADO

---

**JHON JAIRO SUTACHAN. PhD**

Director de Posgrados  
Facultad de Ciencias

---

**ALBA ALICIA TRESPALACIOS. PhD**

Decana  
Facultad de Ciencias

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
MAESTRÍA EN CIENCIAS DEL LABORATORIO CLÍNICO  
BOGOTÁ, COLOMBIA

2022

## TABLA DE CONTENIDO

<b>Resumen</b> .....	11
<b>Pregunta de investigación:</b> .....	12
<b>Objetivo general:</b> .....	12
<b>Objetivos específicos</b> .....	12
<b>Problema de Investigación</b> .....	13
<b>Justificación</b> .....	14
<b>Estado del Arte</b> .....	15
<b>Marco Teórico</b> .....	21
<b>Agente Etiológico</b> .....	21
<b>Proteínas Estructurales</b> .....	21
<input type="checkbox"/> <i>Proteína de Espiga (S)</i> .....	21
<input type="checkbox"/> <i>Proteínas de la envoltura (E)</i> .....	22
<input type="checkbox"/> <i>Proteína M</i> .....	23
<input type="checkbox"/> <i>Proteína N</i> .....	23
<b>Proteínas no estructurales (NSP)</b> .....	24
<b>Factores Accesorios</b> .....	26
<input type="checkbox"/> <i>ORF3a</i> .....	26
<input type="checkbox"/> <i>ORF6</i> .....	26
<input type="checkbox"/> <i>ORF7a/b</i> .....	27
<input type="checkbox"/> <i>ORF8</i> .....	27
<input type="checkbox"/> <i>ORF9b</i> .....	27
<input type="checkbox"/> <i>ORF14</i> .....	28
<b>Huésped Animal</b> .....	28
<b>Ciclo Viral</b> .....	29
<b>Patogenia</b> .....	31
<input type="checkbox"/> <i>Tormenta de citoquinas en COVID19</i> .....	32
<input type="checkbox"/> <i>Lesión pulmonar</i> .....	33
<input type="checkbox"/> <i>Lesión cardíaca</i> .....	34
<input type="checkbox"/> <i>Lesión renal:</i> .....	34
<input type="checkbox"/> <i>Disfunción Gastrointestinal</i> .....	34
<input type="checkbox"/> <i>Disfunción del sistema reproductor</i> .....	35

□ <b>Lesión Pancreática</b> .....	35
<b>Vías de transmisión</b> .....	35
<b>Períodos de incubación y de contagio</b> .....	36
<b>Respuesta Inmunitaria</b> .....	36
<b>Diagnóstico</b> .....	45
<b>Metodología</b> .....	47
<i>Tipo de estudio: Cuantitativo.</i> ....	47
<i>Esquema del diseño de cohorte prospectiva dinámica</i> .....	47
<b>Participantes en el estudio</b> .....	48
<b>Muestra y Muestreo</b> .....	48
<b>Criterios de inclusión</b> .....	48
<b>Criterios de exclusión</b> .....	48
<b>Aspectos éticos:</b> .....	48
<b>Técnicas de recolección de datos y procedimiento</b> .....	49
<i>RT-PCR para SARS-CoV-2 cuantitativa</i> .....	49
<i>Evaluación clínica del grado severidad</i> .....	51
<i>Hemograma automatizado</i> .....	51
<i>Análisis citológico de las muestras respiratorias</i> .....	52
<i>Cuantificación de citoquinas y quimioquinas</i> .....	53
<b>Definición y operacionalización de variables</b> .....	54
<b>Análisis estadístico</b> .....	55
<b>Definiciones operativas:</b> .....	55
<b>Resultados esperados</b> .....	56
<b>Cronograma</b> .....	57
<b>Presupuesto</b> .....	58
<b>Clasificación en investigación traslacional</b> .....	59
<b>Bibliografía</b> .....	60
<b>Anexos</b> .....	66

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla1: Funciones de las proteínas no estructurales (NSP).....	24
Tabla 2: Valores hemograma BC6800 Mindray.....	52

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura molecular del SARS-CoV-2.....	24
<b>Figura 2.</b> Ciclo de vida del SARS-CoV-2.....	31
<b>Figura 3.</b> Esquema del diseño de cohorte prospectiva dinámica.....	47

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1:</b> Consentimiento informado para investigación.....	66
--	----

## Resumen

En diciembre de 2019 se describió una neumonía de origen desconocido causada por un nuevo coronavirus que se denominó Coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo 2 (SARS-CoV-2). La infección COVID-19 se ha asociado significativamente a síntomas y signos multisistémicos, así como a numerosas anomalías de los parámetros hematológicos incluidos el conteo de células blancas, principalmente linfocitos, monocitos, eosinófilos y el recuento plaquetario cuando se compara con individuos sanos. Por lo cual los parámetros sanguíneos podrían considerarse marcadores valiosos para el seguimiento y pronóstico sobre la gravedad de la infección.

**Objetivo:** Evaluar el desempeño pronóstico del hemograma automatizado y su asociación con marcadores de metabólica para predecir el grado de severidad clínica en pacientes con COVID-19 admitidos en la unidad de aislamiento respiratorio en el Hospital Universitario de La Samaritana.

**Metodología:** Estudio de cohorte prospectivo, dinámico, de pruebas diagnósticas en pacientes con COVID-19, positivos para SARS-CoV-2.

**Resultados Esperados:** Pacientes con COVID-19 severo con una asociación de la alteración de los parámetros hematológicos y alteraciones metabólicas en neumonía severa que podrían ser clave para la clasificación de pacientes durante las fases iniciales de la enfermedad.

**Palabras clave:** COVID-19, SARS-CoV-2, hemograma, pronóstico y parámetros hematológicos.

**Pregunta de investigación:**

¿Cuál es el desempeño pronóstico de los parámetros del hemograma automatizado en la predicción de la severidad de la enfermedad en pacientes con COVID-19 hospitalizados en la unidad de aislamiento respiratorio del hospital universitario de la Samaritana?

**Objetivo general:**

Evaluar el desempeño pronóstico del hemograma automatizado, para predecir el grado de severidad clínica en pacientes con COVID-19 admitidos en la unidad de aislamiento respiratorio en el Hospital Universitario de La Samaritana.

**Objetivos específicos**

1. Correlacionar las alteraciones de los parámetros hematológicos en pacientes con COVID-19, con el grado de severidad, durante las primeras semanas de hospitalización, en la unidad de aislamiento respiratorio.
2. Determinar la asociación entre el infiltrado leucocitario y las proteínas de fase aguda en el lavado broncoalveolar de los pacientes con COVID-19 con los parámetros hematológicos y el grado de severidad de los pacientes.
3. Determinar la capacidad predictiva y discriminativa de los parámetros hematológicos sobre el grado de severidad de pacientes con COVID-19 admitidos en la unidad de aislamiento respiratorio, en las primeras semanas de seguimiento.

## **Problema de Investigación**

Al ser el COVID-19 una enfermedad nueva, con evolución atípica, desconocida hasta el momento por la humanidad, ha generado la necesidad de establecer mecanismos de diagnóstico rápido, que permita establecer el estado del paciente y su posible desenlace. El hemograma o biometría hemática, es una de las principales herramientas del laboratorio, como indicación de primera línea en la evaluación clínica de todo tipo de pacientes, en especial los pacientes con infección por COVID-19, es hoy día una de las pruebas más accesibles y solicitadas al laboratorio clínico. Existen reportes en la literatura sobre las alteraciones hematológicas presentes en el marco de infección por COVID-19, encontrando que la linfopenia moderada a severa y la trombocitopenia estaban asociadas a mayor riesgo de desarrollar formas graves de la enfermedad (1,2). Se han descrito otras asociaciones, en especial, del recuento de eosinófilos en la evolución de la enfermedad, mostrando resultados contradictorios, siendo en algunos estudios asociación posible (3,4); sin ninguna relación (5) y relacionado, como factor pronóstico (6–8).

Por medio de este estudio se establecerá el desempeño pronóstico del hemograma automatizado, haciendo énfasis en el comportamiento de los parámetros hematológicos, para predecir el grado de severidad clínica en pacientes con COVID-19 admitidos en la unidad de aislamiento respiratorio en el Hospital Universitario de La Samaritana.

## **Justificación**

Existen algunos estudios al respecto del comportamiento del hemograma en pacientes con infección COVID-19 (1,2,7) y la asociación entre los parámetros hematológicos y severidad en pacientes con infección COVID-19 (3,5,6,8,9). Debido a la ausencia de evidencia local y consistente a nivel internacional, consideramos importante poder establecer el comportamiento de las células hemáticas en nuestros pacientes colombianos con el fin de generar evidencia para mejorar la toma de decisiones y favorecer el planteamiento de estudios posteriores. El hemograma automatizado es una herramienta disponible en casi todas las instituciones del país; permite de forma rápida y precisa obtener gran información sobre el estado hematológico de un paciente (10). Los eosinófilos son células sanguíneas que hacen parte de la línea granulocítica, tienen potentes efectos proinflamatorios y se ha demostrado que participan en la inflamación, inmunorregulación y defensa del huésped contra muchas enfermedades, incluidas las infecciones virales (4). Se ha observado eosinopenia durante la infección por COVID-19, y se ha logrado determinar el valor de los eosinófilos como predictor (6–8); el estudio más relevante fue realizado en España, donde se analizaron casos de pacientes con infección COVID-19, encontrando que la recuperación de eosinófilos en pacientes con COVID-19 que requirieron hospitalización tuvo un valor pronóstico independiente para la mortalidad por todas las causas y un curso más leve (7). Mediante este estudio evaluaremos el comportamiento del hemograma automatizado en pacientes con infección por COVID-19 admitidos en la unidad de aislamiento respiratorio en el Hospital Universitario de La Samaritana, haciendo énfasis en los eosinófilos, como una herramienta que nos permita predecir el grado de severidad clínica en pacientes con COVID-19, y una vez identificados estos pacientes con COVID-19 severo, poder determinar el infiltrado leucocitario y las proteínas de fase aguda en el lavado broncoalveolar, mediante análisis citológico y metabólico, y su correlación los parámetros hematológicos.

## **Estado del Arte**

En diciembre de 2019 se describió una neumonía de origen desconocido en la ciudad de Wuhan, capital de la provincia china de Hubei, causada por un nuevo coronavirus que posteriormente se denominó Coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo 2 (SARS-CoV-2). En febrero, la infección recibió el nombre de COVID-19 (enfermedad por coronavirus 2019), y posteriormente como consecuencia de su propagación mundial fue calificada de pandemia, desbordando a casi todos los sistemas sanitarios, la COVID-19 se ha convertido en la mayor emergencia sanitaria de este siglo (7,8).

Desde la confirmación de los primeros casos de COVID-19 hasta el 21 de julio de 2021, en el mundo han sido notificados 191.281.182 casos confirmados de COVID-19, incluidas 4.112.538 defunciones (11).

Hasta el 19 de julio de 2021, los 56 países y territorios de la Región de las Américas han notificado 70.103.320 casos confirmados acumulados de COVID-19, incluidas 1.842.522 defunciones desde la detección de los primeros casos en la región en enero del 2020. En junio de 2021, la subregión de América del Sur siguió registrando las proporciones más altas de casos (84%) y defunciones (81%) mensuales en la Región de las Américas, con 4.076.310 casos y 108.331 defunciones notificadas. La mayoría de los casos y defunciones fueron notificados por Brasil (2 millones de casos y 54.054 defunciones), Colombia (829.795 casos y 17.652 defunciones) y Argentina (694.092 casos y 16.212 defunciones) (11).

La infección COVID-19 se ha asociado significativamente ( $p=0,000$ ) a síntomas y signos multisistémicos, así como a numerosas anomalías de los parámetros hematológicos incluidos hemoglobina, el conteo de células blancas, principalmente linfocitos, monocitos y eosinófilos, y el recuento de plaquetas cuando se compara con individuos sanos. Por lo cual los parámetros sanguíneos podrían considerarse marcadores valiosos para el seguimiento y pronóstico sobre la gravedad de la infección, así como sospecha diagnóstica cuando la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) es negativa en pacientes sintomáticos (12).

Los hallazgos hematológicos más comunes incluyen linfopenia, neutrofilia, eosinopenia, trombocitopenia leve y, con menor frecuencia, trombocitosis (4,10,13). El recuento de leucocitos puede estar normal, disminuidos o aumentados. Se ha evidenciado que la leucocitosis, la linfopenia y la trombocitopenia se asocian a una mayor gravedad e incluso la mortalidad en los casos de COVID-19 (2).

Los leucocitos pueden estar disminuidos con valores totales en casos severos menores de  $< 2 \times 10^9 /L$ . La linfopenia se presenta de forma moderada o severa con valores absolutos de  $0,5-1 \times 10^9/L$  y  $< 0,5 \times 10^9/L$ , respectivamente, y se asocia con un riesgo mayor de desarrollar síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) al igual que una probabilidad mayor de gravedad e ingreso a unidad de cuidados intensivos. Además de estas alteraciones se han reportado casos en donde se presenta eosinopenia de  $< 0.02 \times 10^9/L$  (1,6).

Durante los primeros días de la enfermedad, cuando los pacientes manifiestan síntomas inespecíficos, el recuento de leucocitos y el valor absoluto de los linfocitos son normales o están ligeramente reducidos. Posteriormente, alrededor del séptimo al catorceavo día de la infección, la enfermedad comienza a afectar los órganos con mayor expresión de ACE2 tales como pulmones (14); Corazón (15); páncreas (15,16); cerebro, Hígado, riñones, sistema gastrointestinal (15); las células de la cavidad oral (17); glándula tiroides y sistema reproductor femenino y masculino (18). En esta fase de la enfermedad, se destacan los cambios hematológicos mencionados previamente (19); en particular, una reducción significativa del número de linfocitos. Este hallazgo es más evidente en los que sufrieron la muerte en comparación con los que sobrevivieron (19). Estos últimos mostraron linfopenia hacia el séptimo día de los síntomas, con una posterior recuperación. La linfopenia se ha destacado como la más frecuente alteración desde el ingreso hasta la muerte (2,20).

Algunas de las posibles explicaciones de la significativa reducción del recuento de linfocitos incluyen: (a) la infección directa en estas células, causando su lisis por el SARS-CoV-2, ya que los linfocitos tienen receptores ACE2 (b) posible apoptosis de linfocitos causada por proceso inflamatorio sistémico con la producción de grandes cantidades de citoquinas (c) atrofia de los órganos linfoides, como el bazo, que

afecta la renovación de los linfocitos y (d) acidosis láctica que inhibe la proliferación de los linfocitos, lo que es más evidente en los pacientes con cáncer, un grupo de riesgo para las complicaciones de la COVID-19 (19).

Las células asesinas naturales (NK) y los linfocitos T citotóxicos (CTL) tienen la capacidad de eliminar las células infectadas por el virus, mientras que los linfocitos T ayudadores ajustan la respuesta inmunitaria adaptativa total. Los anticuerpos tienen una función protectora para limitar la infección y prohibir la siguiente reinfección. Los linfocitos T ayudadores circulantes y los linfocitos T CD8+ activados aumentan gradualmente en la sangre durante la primera semana. Las células T CD8+ liberan la perforina y las granzimas A y B que inducen la apoptosis en las células infectadas por el virus. Sin embargo, la situación inflamatoria crónica y la estimulación continua de las células T dan lugar a un fenómeno, denominado agotamiento de las células T. Las funciones de las células agotadas se verán perjudicadas, por lo que los estados inflamatorios se extenderán sin una limitación efectiva de la infección. se confirmó la acción sinérgica de la mayoría de las citoquinas inflamatorias, como la IL-1, el IFN- $\gamma$  y la IL-6, para la inhibición de la proliferación de las células T (21). En cuanto al aspecto morfológico de los linfocitos en la mayoría de los pacientes con bajo recuento de linfocitos, éstos se mostraron reactivos con características linfoplasmocitarias (19). Además de las anomalías morfológicas de los linfocitos, también se han observado marcadas anomalías morfológicas del linaje de los neutrófilos. Estos cambios han incluido la presencia de numerosas granulaciones oscuras y aglomeradas similares a las granulaciones tóxicas y áreas periféricas basófilas y agranulares en el citoplasma, y cromatina groseramente agrupada en el núcleo; neutrófilos pseudo-Pelger-Huet segmentados o no; neutrófilos apoptóticos; granulocitos inmaduros y displásicos, especialmente pequeños mielocitos y metamielocitos, así como Promielocitos (19,20,22,23).

Otros de los parámetros alterados que se consideran de importancia hematológica en la infección por COVID-19 es la disminución de los eosinófilos (24). Los eosinófilos son células sanguíneas que hacen parte de la línea granulocítica, tienen potentes efectos proinflamatorios y se ha demostrado que participan en la inflamación, inmunorregulación y defensa del huésped contra muchas

enfermedades, incluidas las infecciones virales (4). Se ha observado eosinopenia durante la infección COVID-19, y se ha logrado determinar el valor de los eosinófilos  $< 0.02 \times 10^9/L$  (1,6) como predictor (6–8); el estudio más relevante fue realizado en España, donde se analizaron casos de pacientes con infección COVID-19, encontrando que la recuperación del número de eosinófilos en la sangre de pacientes con COVID-19 que requirieron hospitalización en Unidad de cuidados intensivos (UCI) tuvo un valor pronóstico independiente para la mortalidad por todas las causas y un curso más leve (7).

Esto indica que la eosinopenia puede ser un buen marcador de diagnóstico precoz de COVID-19. Sin embargo, cabe destacar que el análisis de eosinófilos no se incluyó específicamente en algunos de los primeros informes centrados en las características clínicas de los pacientes con COVID-19 confirmada. Algunos estudios que analizaron los eosinófilos mostraron que la eosinopenia se producía en el 52% al 53% de los pacientes con COVID-19 confirmada. Otro estudio reportó la presencia de eosinopenia en el 79,25% de los pacientes con COVID 19 confirmada (12). Este rango relativamente estable de la presentación de eosinopenia en los casos confirmados de COVID-19 puede servir para justificar aún más su utilidad para predecir el comportamiento de la COVID-19 (3). Se ha sugerido que la eosinopenia persistente tras el ingreso se correlaciona con bajas tasas de recuperación, mientras que la resolución de la eosinopenia puede ser un indicador de mejora del estado clínico (6,11,12). Si la recuperación de eosinófilos se confirma como un marcador de buen pronóstico, podría utilizarse para guiar las decisiones relativas al alta en pacientes que, por lo demás, están estables (6). En el contexto de una pandemia, esto podría ayudar a aliviar la tensión en los sistemas de salud mediante la identificación de posibles candidatos para el alta temprana. Si bien, se necesitan más estudios para responder si la eosinopenia puede estar asociada o no con la gravedad o el pronóstico de la COVID-19 (3,12).

La eosinopenia en la primera semana de evolución de los pacientes con COVID-19 hospitalizados se ha correlacionado significativa y positivamente con la severidad y mortalidad de la enfermedad (6,25), con los niveles de plaquetas y dímero D (fragmentos de degradación de la fibrina). A su vez, se ha correlacionado

significativa y negativamente con los niveles séricos de urea, creatinina, aspartato aminotransferasa, lactato deshidrogenasa y creatina quinasa (25). Por el contrario, el aumento en el recuento de eosinófilos, al séptimo día de hospitalización, se ha asociado con un mejor pronóstico, incluyendo tasas de mortalidad más bajas (5,2% vs. 22,6% en no recuperadores, OR 0,234; IC del 95%, 0,154 a 0,354) y menores tasas de complicaciones, especialmente con respecto al desarrollo del síndrome de dificultad respiratoria aguda (8% frente a 20,1%,  $p = 0,000$ ) e Ingreso en UCI (5,4% vs 10,8%,  $p = 0,000$ ) (7).

Un reporte de casos, sobre la cinética de la respuesta inflamatoria en lavado broncoalveolar y tejido pulmonar de pacientes confirmados con COVID-19, reportó que en los casos críticos ( $n=5$ ) se encontró un incremento en los Linfocitos T ayudadores (LTh) tipo 2 y su respectivo patrón de citoquinas: IL-4, IL-5, IL-13, TGF-beta, etc. En estos pacientes con neumonía severa por COVID-19, el principal infiltrado celular fue de eosinófilos, los cuales son los mayores responsables de la inflamación y daño celular en la respuesta inmune mediada por los LTh tipo 2 (26). Además, el incremento de los eosinófilos en el pulmón podría explicar la eosinopenia reportada en los estudios mencionados anteriormente.

El último parámetro en el que se observan alteraciones en cuanto al sistema hematológico se refiere son las plaquetas. La morfología plaquetaria también mostró anomalías peculiares y frecuentes, consistentes principalmente en la presencia de plaquetas gigantes, generalmente hipercromáticas, vacuolizadas, algunas mostrando pseudópodos, no sólo en pacientes con trombocitosis, sino también en aquellos con trombocitopenia (1,2).

Se ha sugerido que la mayoría de estas alteraciones hematológicas pueden indicar un desorden transitorio y reversible de la mielopoyesis, especialmente en la aceleración de la granulopoyesis. Este trastorno puede estar relacionado con la "tormenta" de citoquinas y la hiperinflamación, que aparecen en la progresión de la neumonía por COVID-19, posiblemente como linfocitosis hemofagocítica secundaria, que conduce a un fallo orgánico. En comparación con los pacientes no ingresados en la UCI, los ingresados en la UCI tenían niveles plasmáticos más altos de interleucina (IL) 2, IL-7, IL-10, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), factor

estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), proteína 10 inducida por interferón gamma (IP-10), proteína quimioatrayente de monocitos tipo 1(MCP-1) y la proteína inflamatoria de macrófagos-1 alfa (MIP-1 $\alpha$ ) (25).

El SARS-CoV-2 puede infectar directamente las células hematopoyéticas y estromales de la médula ósea, induciendo la inhibición del crecimiento celular y la apoptosis; además de estimular un estado de coagulación intravascular diseminada (CID) de bajo grado, como lo demuestran los tiempos de coagulación prolongados y el aumento de los niveles de Dímero-D. Estos hallazgos explican la trombocitopenia posiblemente agravada por el consumo, y pueden causar daño inmunológico a las células sanguíneas, induciendo la síntesis de complejos inmunes y autoanticuerpos. La Trombopoyesis puede producirse en los pulmones, donde las plaquetas se liberan de los megacariocitos maduros, por esta razón se cree que en el tejido pulmonar dañado se produce un aumento del consumo de plaquetas debido a la agregación o formación de trombos y una reducción de la trombopoyesis (27,28).

Por medio de este estudio pretendemos analizar las alteraciones hematológicas en pacientes con infección por SARS-CoV-2 y establecer su asociación con la severidad de la presentación clínica en pacientes colombianos y su correlación con el infiltrado leucocitario y las proteínas de fase aguda en el lavado broncoalveolar de los pacientes con COVID-19 severo, mediante análisis citológico y metabólico.

## **Marco Teórico**

Tras la declaración de pandemia por la OMS el 11 de marzo de 2020 (11), se ha generado una explosión de investigaciones sobre la COVID-19 que ha permitido conocer la enfermedad, sus características y herramientas de diagnóstico y tratamiento. En febrero de 2022, más de 41000 artículos han sido referenciados en PUBMED.

## **Agente Etiológico**

El SARS-CoV-2 pertenece al género *Betacoronavirus* de la familia *Coronaviridae* y orden *Nidovirales*. Es un virus envuelto, esférico a pleomórfico con un diámetro que varía de 60 a 140 nm. El genoma del virus es ARN monocatenario de sentido positivo de aproximadamente 29,9 kb de nucleótidos. La secuencia del genoma del SARS-CoV-2 y el análisis filogenético revelaron que está más estrechamente relacionado con los coronavirus similares al SARS (CoV) de los murciélagos que con el SARS-CoV y el coronavirus respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV). El SARS-CoV-2 comparte una identidad de nucleótidos del 96,2 % con el betacoronavirus, mientras que el SARS-CoV tiene una identidad del 79,5 % con el SARS-CoV-2 (29). Este hallazgo sugiere que el SARS-CoV-2 podría haberse originado en los murciélagos. Debido a la característica inherente de las ARN polimerasas virales propensas a errores, por lo que los virus acumulan mutaciones durante cada ciclo de replicación, lo que conduce a una población diversa de virus en un solo huésped infectado. Este proceso conlleva a la evolución de los virus, contribuyendo al “salto de especies”. La COVID-19 es la tercera epidemia por coronavirus que se originó en los murciélagos en los últimos años, precedida por el SARS en 2002 y el MERS en 2012 (30). Sin embargo, aún no se ha determinado el modo de transmisión de murciélago a humano, aunque la transmisión de SARS-CoV-2 de humano a humano ocurre principalmente a través de gotículas y aerosoles generados durante el estornudo y la tos de pacientes con COVID-19 (1,28).

## **Proteínas Estructurales**

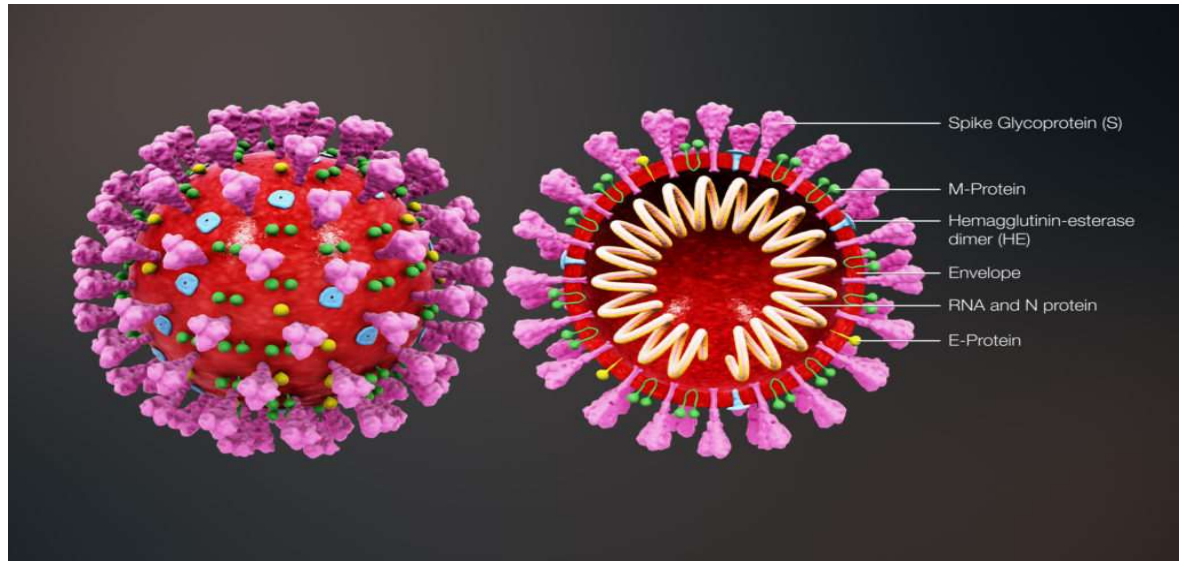
- **Proteína de Espiga (S):** La proteína S del virión es una proteína transmembrana ligada a la N (150-200 kDa) que consta de 1.273

aminoácidos y presenta un grado variable de conservación en toda la familia *Coronaviridae*. Cada proteína S monomérica consta de las subunidades S1 y S2, que juntas poseen múltiples dominios funcionales, desde el N hasta el C-terminal, como se indica a continuación: Dominio N-terminal (NTD), motivo de unión al receptor (RBM) que contiene el dominio de unión al receptor (RBD), sitio de escisión de furina (S1/S2, que probablemente sea escindido por la proteasa TMPRSS2), péptido de fusión (FP), hélice central (CH), dominio de conexión (CD), dominio de repetición de heptadas (HR1/2), dominio transmembrana (TM) y cola citoplasmática (CT). Además, cada proteína S monomérica se pliega en una estructura tridimensional con tres dominios topológicos distintos, es decir, cabeza, tallo y cola citoplasmática (figura1) (31). La proteína S del SARS-CoV-2 permite la entrada del virus a la célula huésped. la proteína S se une al heparán sulfato (HS) humano y a la ACE2 a través de su dominio de unión a receptores (RBD) y es activada por proteasas humanas, la entrada celular del SARS-CoV-2 es menos dependiente de las proteasas del huésped, ya que es preactivada por la proproteína convertasa furina. A diferencia de muchas de sus otras proteínas, la proteína S del SARS-CoV-2 amplifica la activación del IFN- $\beta$ . Esta interacción estimula el eje MAPK-NF- $\kappa$ B y da lugar a la liberación de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  y CCL2. MyD88 y TRIF son moléculas adaptadoras fundamentales para el funcionamiento de esta vía de señalización. La inducción de citoquinas inflamatorias por la proteína S puede contribuir a la tormenta de citoquinas y al daño epitelial asociado y a las lesiones de órganos observadas en los pacientes de COVID-19 (32).

- **Proteínas de la envoltura (E):** Es la más pequeña entre todas las proteínas estructurales, alrededor de 8-12 kDa (31–33). Esta proteína transmembrana tiene un ectodominio N-terminal y un endodominio C-terminal con actividad de canal iónico. Durante el ciclo de replicación, E se expresa abundantemente en el interior de la célula infectada, pero sólo una pequeña

parte se incorpora a la envoltura del virus. Desempeña un papel importante en la patogénesis, el ensamblaje y la liberación del virus (31–33).

- **Proteína M:** ~25-30 kDa, con tres dominios transmembrana. Es la proteína estructural más abundante. Tiene un pequeño ectodominio glicosilado y un endodominio C-terminal que se extiende 6-8 nm en la partícula vírica. Define la forma de la envoltura viral. La proteína M existe como un dímero, y puede adoptar dos conformaciones diferentes que le permiten promover la curvatura de la membrana y la nucleocápside. La interacción de S con la proteína M es necesaria para la retención de S en el compartimento intermedio ER-Golgi (ERGIC) y su incorporación a nuevos viriones, pero no es necesaria para el proceso de ensamblaje. La unión de M a la proteína N estabiliza la nucleocápside (complejo proteína N-ARN), así como el núcleo interno de los viriones y, en última instancia ayuda a completar el ensamblaje viral. Las proteínas M y E conforman la envoltura viral y su interacción es suficiente para la producción y liberación de partículas similares al virus (31–33).
- **Proteína N:** Es el único complejo en la organización estructural de la nucleocápside. La proteína está compuesta por dos dominios separados, un dominio N-terminal (NTD) y un dominio C-terminal (CTD). Es la única que se une al genoma de ARN. Participa en el ensamblaje y la gemación del virus, lo que da lugar a la formación completa del virión (31).



**Figura 1.** Estructura molecular del SARS-CoV-2. Tomado del Blog Oficial del Colegio Oficial de Biólogos de la Comunidad de Madrid

**Proteínas no estructurales (NSP):**

SARS-CoV-2 codifica 16 Proteínas no estructurales. Se describe su función en la tabla 1 (31–33):

Tabla1: Funciones de las proteínas no estructurales (NSP)

<b>PROTEINA (NSP)</b>	<b>FUNCIÓN</b>
NSP1	Promueve la degradación del ARNm celular y bloquea la traducción de las células del huésped, lo que resulta en bloqueo de la respuesta inmunitaria innata
NSP 2	Se une a las proteínas prohibitoras
NSP 3	Interactúan con la proteína N, promueve la expresión de citoquinas, escinde la poliproteína viral y bloquea la respuesta inmunitaria innata del huésped.

NSP4	Complejo de replicación-transcripción viral y ayuda a modificar las membranas del retículo endoplasmático (RE).
NSP5	Escinde en múltiples sitios distintos para producir proteínas maduras e intermedias no estructurales.
NSP6	Induce la formación de autofagosomas derivados del RE, así como la formación de vesículas de doble membrana.
NSP7	Forma un complejo con NSP8 y NSP12 para producir la actividad ARN polimerasa de NSP8
NSP8	Forma un complejo hexadecamérico con NSP7, puede actuar como abrazadera de procesabilidad para la ARN polimerasa; puede actuar como primasa.
NSP9	Proteína de unión al ARN
NSP10	Cofactor de NSP16 y NSP14, forma heterodímero con ambos y estimula la actividad de ExoN y 2-O-MT
NSP11	No se ha descrito ninguna función independiente.
NSP12	Replicación y metilación.
NSP13	Un dominio del núcleo de la helicasa que se une al ATP. El dominio de unión al zinc participa en la replicación y la transcripción.
NSP14	Inhibe la producción y la señalización del IFN- $\beta$ al impedir la localización

	nuclear del IRF3. Actividad metiltransferasa.
NSP15	Endorribonucleasa viral
NSP16	Protege el ARN viral del reconocimiento de MDA5

ExoN: Endorribonucleasa Viral. 2-O-MT: Metiltransferasa. MDA5: Proteína asociada a la diferenciación del melanoma 5.

### Factores Accesorios

Hay nueve proteínas accesorias, ORF3a, 3d, 6, 7a, 7b, 8, 9b, 14 y 10- producidas de al menos cinco marcos de lectura abierta (ORF) que codifican genes accesorios (ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF7b y ORF8), Estas proteínas, junto con las NSP antes mencionadas, desempeñan un papel muy importante en la replicación viral (31).

- **ORF3a:** Es la mayor proteína accesoria del SARS-CoV2, que consta de 274 residuos de aminoácidos. El ORF3a forma un dímero y sus seis hélices transmembrana crean un canal iónico en la membrana de la célula huésped, que es muy propicio para los cationes  $Ca^{2+}/K^{+}$  en comparación con el  $Na^{+}$ . Está implicado en la liberación del virus, la apoptosis y la patogénesis. En el SARS-CoV2, se ha demostrado que ORF3a inhibe la señalización de  $IFN-\alpha$  al suprimir la fosforilación de STAT1. Recientemente, ORF3a ha sido implicado en la desacidificación lisosomal. El aumento del pH del lisosoma permite al virus utilizar los orgánulos lisosomales como vehículos para alcanzar la membrana plasmática y salir de la célula huésped (31,32).
- **ORF6:** Es una proteína de 61 aminoácidos asociada a la membrana. Estudios recientes han implicado al ORF6 del SARS-CoV-2 en la supresión de las respuestas  $IFN-\beta$  mediadas por el IFN. El ORF6 se une a la carioferina  $\alpha$ , un factor de importación nuclear, para impedir la translocación del IRF3 al núcleo, lo que detiene la posterior producción de  $IFN-\beta$ . Además, los aminoácidos 53-61 de la terminación C de ORF6 son suficientes para que

ORF6 bloquee la translocación nuclear de STAT1, reduciendo así la actividad de los promotores ISRE e ISG56 (32).

- **ORF7a/b:** Los ORF7a y 7b son proteínas accesorias del SARS-CoV2. La proteína ORF7a de 122 aa es una proteína transmembrana de tipo I que contiene una secuencia de péptido señal de 15 aa, un dominio luminal de 81 aa, un dominio transmembrana de 21 aa y un corto dominio C-terminal. La proteína ORF7b consta de 44 aminoácidos, y es una proteína integral de membrana, expresada en las células infectadas por el SARS-CoV-2, donde permanece localizada en el compartimento de Golgi. Tanto el ORF7a como el ORF7b inhiben la respuesta del IFN de tipo 1, pero lo hacen a través de mecanismos ligeramente diferentes. El ORF7a inhibe la fosforilación de STAT2, mientras que el ORF7b inhibe la fosforilación tanto de STAT1 como de STAT2. Los ORF7a y 7b del SARS-CoV-2 impiden la translocación de las proteínas STAT al núcleo y la posterior transcripción de las ISG. Dada la gran cantidad de proteínas del SARS-CoV-2 que inhiben la respuesta del IFN tipo 1, la adición exógena de ciertos IFN puede reprimir la producción viral (31,32).
- **ORF8:** Esta proteína consta de 121 residuos de aminoácidos. Los residuos 1-17 comprenden la secuencia N-terminal, requisito previo para el transporte al RE. Se ha descubierto que ORF8 interactúa con el complejo mayor de histocompatibilidad-I (MHC-I) y por lo tanto puede ayudar en la evasión inmunológica, además sirve como un importante inhibidor del sistema IFN tipo I (31,32).
- **ORF9b:** Consta de 97 residuos de aminoácidos. Tiende a asociarse con la proteína adaptadora, TOM70, y así suprimir la respuesta antiviral mediada por el IFN-I (31).

- **ORF14:** Compuesta por 73 residuos de aminoácidos. Cumple un papel crucial en la replicación del virus (31).

### **Huésped Animal**

Los murciélagos son importantes huéspedes naturales de *alfacoronavirus* y *betacoronavirus*. El pariente más cercano al SARS-CoV-2 conocido hasta la fecha es un coronavirus de murciélago detectado en *Rhinolophus affinis* de la provincia de Yunnan (China), denominado "RaTG13", cuya secuencia genómica completa es idéntica en un 96,2% a la del SARS-CoV-2. La gran similitud genética entre el SARS-CoV2 y el RaTG13 apoya la hipótesis de que SARS-CoV-2 probablemente se originó en los murciélagos. El descubrimiento de diversos coronavirus de murciélago estrechamente relacionados con el SARS-CoV-2 sugiere que los murciélagos son posibles reservorios del SARS-CoV-2. No obstante, sobre la base de los hallazgos actuales, la divergencia entre el SARS-CoV-2 y los coronavirus de murciélago relacionados probablemente representa más de 20 años de evolución de la secuencia, lo que sugiere que estos coronavirus de murciélago pueden considerarse sólo como el probable precursor evolutivo del SARS-CoV-2 pero no como el progenitor directo del SARS-CoV-2 (30,33).

Además de los murciélagos, los pangolines son otro huésped de la fauna silvestre probablemente relacionado con el SARS-CoV-2. La secuencia de unión al receptor (RBM; que forma parte del RBD) de estos virus sólo tiene una variación de aminoácidos con respecto al SARS-CoV-2, y es idéntico al del SARS-CoV-2 en los cinco residuos críticos para la unión al receptor. La aparición repetida de infecciones por coronavirus relacionadas con el SARS-CoV-2 en pangolines procedentes de diferentes eventos de contrabando sugiere que estos animales son posibles huéspedes de los virus. Sin embargo, a diferencia de los murciélagos, que son portadores sanos de los coronavirus, los pangolines infectados mostraron signos clínicos y cambios histopatológicos, como neumonía intersticial e infiltración de células inflamatorias en diversos órganos. Estas anomalías sugieren que es improbable que los pangolines sean el reservorio de estos coronavirus, sino que es

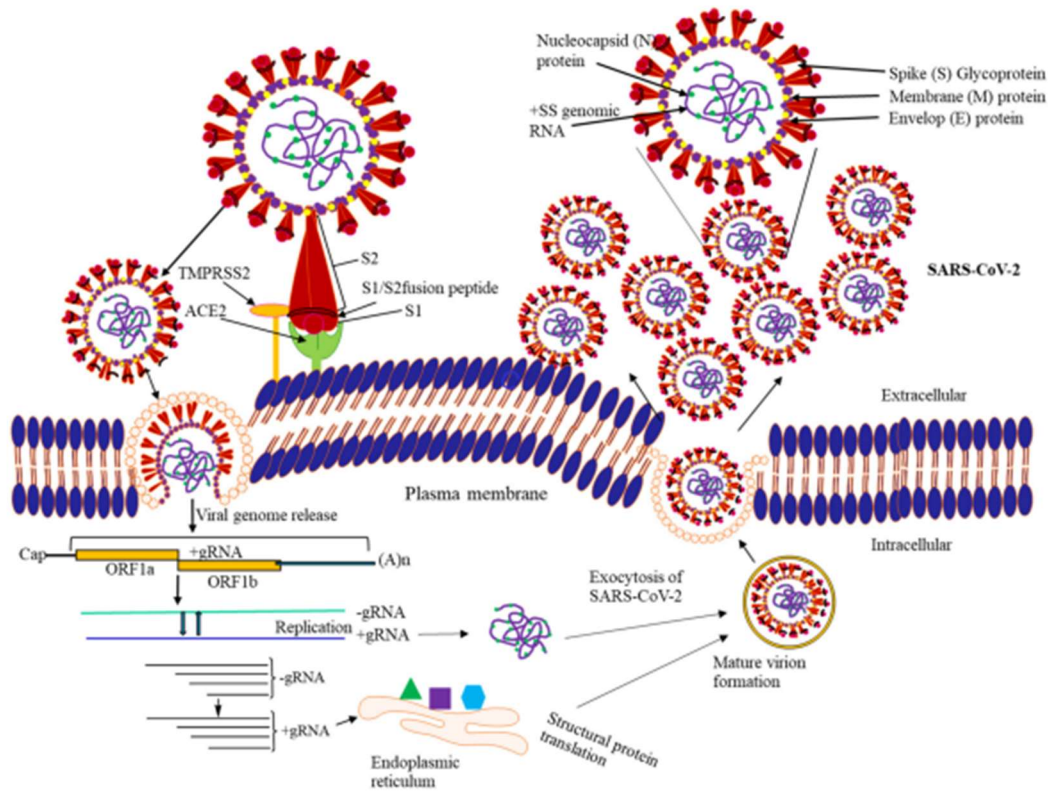
más probable que hayan adquirido los virus tras el contagio de los huéspedes naturales (30,33).

Actualmente, los conocimientos sobre el origen animal del SARS-CoV-2 siguen siendo incompletos en gran parte. No se ha demostrado claramente cuáles son los huéspedes reservorios del virus. Se desconoce si el SARS-CoV-2 se transmitió a los humanos a través de un huésped intermedio y qué animales pueden actuar como su huésped intermedio.(30,33)

### **Ciclo Viral**

El ciclo vital del SARS-CoV-2 comienza con el cebado de la proteína viral de la espiga (S) por las proteasas del huésped o la proteasa transmembrana serina 2 (TMPRSS2) para asegurar la fusión de la envoltura viral con la membrana de la célula huésped y la entrada del genoma viral en la célula. Alternativamente, los viriones del SARS-CoV-2 pueden ser endocitados por la célula tras unirse al receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2). Una vez internalizados, la enzima del huésped, la catepsina L, puede escindir la proteína S, lo que resulta en una liberación similar del genoma viral a la célula. Una vez dentro de la célula, el genoma de ARNs de sentido positivo se traduce utilizando los ribosomas del huésped. El gen viral primario ORF1ab codifica las poliproteínas pp1a y pp1ab, que autoclasifican la proteasa similar a la papaína (PLpro) y la proteasa similar a la 3C (3CL-pro) de sí misma. La PLpro procesa posteriormente la poliproteína viral y libera las proteínas no estructurales (NSPs) 1-3, mientras que la 3CL-pro libera las restantes NSPs 4-16. Algunas proteínas no estructurales del SARS-CoV-2 forman un complejo de replicación de ARN, como la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) NSP12 y la helicasa NSP13. Las NSPs 10, 13, 14 y 16 participan en el tapado del ARNm, y las NSPs 10, 14 y 15 corrigen el genoma naciente. Mientras el genoma se replica, múltiples proteínas víricas -como las NSP1, NSP3, NSPs 12-14, ORF3, ORF6 y ORF7a/b- antagonizan las respuestas inmunitarias del huésped dirigiéndose al sistema inmunitario innato, en particular a la vía del interferón (IFN) de tipo 1. Posteriormente, las proteínas estructurales virales y el genoma viral se ensamblan en el virión, que viaja a la superficie de la

célula huésped mediante vesículas y se libera a través de la exocitosis lisosomal dependiente de Arl8b. La chaperona del retículo endoplásmico (RE) del huésped, GRP78/BiP, es acompañada por el virión y liberada durante este proceso. Alternativamente, los viriones inmaduros utilizan la proteína de la nucleocápside (N) para localizarse en una proteína de la envoltura (E) glicosilada en la superficie celular. Esta interacción permite una reorientación del virión, seguida de la brotación de la célula huésped. Por último, la destrucción de los orgánulos del huésped puede conducir a la liberación del contenido lisosomal, lo que desencadena la muerte celular y la liberación de la progenie viral. Durante la infección, los virus tienden a explotar la maquinaria del huésped para crear un microambiente permisivo. Las quinasas activadas incluyen algunas de las implicadas en la señalización mediada por p38 y las proteínas quinasas dependientes de monofosfato de guanosa. Entre las quinasas desreguladas se encuentran las implicadas en el crecimiento celular, el ciclo celular y los reguladores del citoesqueleto. Además, la detención del ciclo celular en la transición S/G2 está altamente correlacionada con la infección productiva del SARS-CoV-2, mientras que la progresión de la fase M está correlacionada negativamente (Fig.2). La detención S/G2 durante la infección puede deberse a una desregulación de la actividad de la quinasa dependiente de ciclina 2 (CDK2) durante la infección viral (31–33).



**Figura 2.** Ciclo de vida del SARS-CoV-2: El SARS-CoV-2 comienza uniéndose a su proteína S (RBD/S1) en el receptor de la célula huésped, ACE2, impulsando un cambio conformacional en la subunidad S2 y facilitando así su fusión con la membrana plasmática. Inmediatamente después de la liberación del +ssRNA, la traducción conduce a la formación de las poliproteínas no estructurales pp1a y pp1ab, que se someten a un corte proteolítico. Finalmente, se ensamblan en una replicasa funcional. La replicasa conduce a la formación de un intermediario de sentido negativo, que se replica para formar múltiples copias de ARNg, así como un conjunto anidado de ARNsg por transcripción discontinua. Estos RNAsg se traducen en varias proteínas estructurales y accesorias, que se ensamblan como virión en el ERGIC y finalmente salen de la célula por exocitosis (31).

## Patogenia

Al entrar en la sangre periférica, el virus causa viremia en los humanos. En la segunda fase (fase pulmonar), con el inicio de la respuesta inflamatoria, se produce la apoptosis de las células alveolares, la permeabilidad endotelial y epitelial, el

edema, la acumulación de líquido, el trombo (adhesión, activación y agregación de las plaquetas). En consecuencia, mediante la liberación de moléculas proinflamatorias, la vasoconstricción, el reclutamiento de neutrófilos, las trampas extracelulares de neutrófilos (NETosis), la necrosis celular y el daño tisular, se producen los síntomas pulmonares que incluyen la alteración del intercambio de gases, la hipoxemia (saturación de oxígeno (SpO<sub>2</sub>) < 94%), la alteración de la excreción de dióxido de carbono, la insuficiencia respiratoria y el síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA). Por último, en la tercera fase (fase de hiperinflamación), los síntomas se agravan por la inflamación sistémica y el daño inducido por la inflamación en órganos distantes debido al aumento de las citoquinas proinflamatorias plasmáticas "Tormenta de citoquinas". Después, todos los órganos que expresan ACE-2 y TMPRSS2, incluyendo el tracto gastrointestinal, los riñones, el corazón y los pulmones, pueden ser el objetivo potencial del ataque del virus (34).

- **Tormenta de citoquinas en COVID19:** Los estudios clínicos indican que la gravedad de COVID-19 se correlaciona positivamente con los niveles de citocinas inflamatorias, incluidas IL-1b, TNF- $\alpha$ , proteína quimio-atrayente de monocitos1 (MCP-1) /CCL2, IL-2, sIL-2RA, IL -6, IL-7, IL-17, IL-18, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), IP10, factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), MIP-1a/CCL3, MCP-3 y citocinas antiinflamatorias como la IL -10 en el plasma/suero de los pacientes. Los síntomas clave de los casos de COVID-19, como la tormenta inflamatoria de citoquinas, la falla multiorgánica y el síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), siguen un curso patológico similar al de la linfocitosis hemofagocítica (HLH), que incluye fiebre alta, disnea, linfopenia y citocinas elevadas, incluidas IL-1b, TNF-a e IL-6, ferritina sérica, dímeros D y proteína C reactiva (PCR). La HLH es una condición de hiperinflamación potencialmente mortal (tormenta de citoquinas) mediada por la activación aberrante de células NK, células T y macrófagos; puede ser genético o adquirido. La HLH adquirida es común en adultos y es inducida por desencadenantes externos, incluidas infecciones virales (p. ej., virus de

Epstein-Barr o virus del herpes simple). Por lo tanto, es posible que la infección por SARS-CoV-2 pueda inducir HLH que progrese a falla multiorgánica y a síndrome de diestres respiratorio agudo (ARDS) en algunos pacientes. Este aumento agudo en varias citoquinas inflamatorias después de la infección por SARS-CoV-2 (tormenta de citoquinas /hipercitocinemia) es una de las características distintivas de COVID-19, que conduce a SDRA, coagulación intravascular diseminada y falla multiorgánica. Entre las citoquinas, los niveles de IP-10, MCP-3, IL-2, IL-7, IL-10, G-CSF, MCP-1, MIP-1a y TNF-a están significativamente elevados en casos graves de COVID-19 que requieren cuidados intensivos y ventilación para soporte de oxígeno (27,35–38).

- **Lesión pulmonar:** En los individuos con COVID-19 se ha observado un patrón de distribución clave de las opacidades en vidrio deslustrado y la consolidación es periférica y los patrones de afectación pulmonar atípicos pueden darse en los lóbulos pulmonares inferiores que se observan mediante tomografía computarizada (TC) de tórax. La afectación de los pulmones en la COVID-19 puede dar lugar a un SDRA, que requiere intubación e ingreso en la unidad de cuidados intensivos. Varias vías pueden estar relacionadas con la patogénesis de la afectación pulmonar, incluyendo el daño del parénquima pulmonar que podría ser causado por el virus, dando lugar a una neumonitis que provoca una inflamación pulmonar intersticial y/o alveolar. El virus también podría unirse directamente a los receptores de ACE-2, promoviendo la disfunción endotelial (14,38).
- **Lesión hepática:** La proteína ACE-2 se encuentra en las células de los conductos biliares. Esto significa que el SARS-Cov-2 podría infectar las células del conducto biliar y provocar pruebas irregulares de la función hepática. Sin embargo, no está claro si el daño hepático en pacientes con infección por COVID-19 se debe a la participación del hígado por el virus o se debe a un fallo multiorgánico (15,38).

- **Lesión cardíaca:** Las arritmias cardiovasculares o la insuficiencia cardíaca pueden empeorar durante COVID-19 y también puede potenciarse por el shock junto con o sin inestabilidad hemodinámica. Estas complicaciones cardiovasculares se consideran complicaciones retardadas en los individuos infectados, que pueden aparecer repentinamente durante la hospitalización o incluso después de restablecer su salud respiratoria. La aparición de lesiones cardiovasculares agudas causadas por COVID-19 se ha relacionado con un mal pronóstico (15).
- **Lesión renal:** La incidencia de la lesión renal aguda (LRA) en pacientes infectados causada por el SARS-CoV-2 varía entre las investigaciones publicadas, hallazgos recientes dilucidaron que las personas infectadas por el SARS-CoV-2 con antecedentes de enfermedades renales prolongadas e hipertensión corren un mayor riesgo de padecer LRA. la infección directa de podocitos y el epitelio tubular renal por el SARS-CoV-2 a través de la vía dependiente de la ACE2 se asoció con una glomerulopatía colapsante, disfunción mitocondrial, formación de vacuolas de reabsorción de proteínas, necrosis tubular aguda, y salida de proteínas hacia la cápsula de Bowman (15,38).
- **Disfunción Gastrointestinal:** Los casos de COVID-19 se han documentado cada vez más con manifestaciones gastrointestinales (GI) y pueden estar asociadas con peores resultados, esto puede deberse a la alta expresión de ACE2 y TMPRSS2 en los enterocitos del colon y el íleon. Los síntomas predominantes relacionados con el tracto GI en los pacientes con COVID-19 se describieron como náuseas, diarrea, vómitos y malestar abdominal (15,38).

- **Disfunción del sistema reproductor:** En las mujeres, se ha informado de la presentación del receptor ACE2 dependiente de la gonadotropina en los ovarios, se observó que el SARS-CoV-2 inflige efectos adversos en el sistema reproductor femenino tales como: daños en los ovarios, incluyendo reserva ovárica deteriorada y trastorno endocrino reproductivo. En los varones, la ACE2, se expresa en las células de Leydig, las células germinales y las células de Sertoli en los testículos, y puede ser infectado por el SARS-CoV-2, se encontraron pacientes con bajo recuento de espermatozoides junto con la reducción de la motilidad de los espermatozoides, lo que sugiere una alteración de la espermatogénesis como consecuencia de COVID-19 en pacientes masculinos (15,18).
- **Lesión Pancreática:** La lesión pancreática se presenta a menudo como pancreatitis aguda. En el SARS-CoV-2, la respuesta inflamatoria sistémica y la tormenta de citoquinas pueden ser la causa de la lesión pancreática como parte del fallo multiorgánico. La lesión inducida por el SARS-CoV-2 aumenta la liberación de lipasa pancreática causando lipólisis y la liberación de ácidos grasos insaturados que en última instancia desencadenan el daño mitocondrial pancreático y la sobreproducción de mediadores proinflamatorios similares a los de la tormenta de citoquinas. La interacción entre el SARS-CoV-2 y la ACE2 pancreática no sólo causa la lesión pancreática, sino que también puede extenderse para causar cambios inflamatorios sistémicos (15,16).

### **Vías de transmisión**

Se reconocen cuatro modos principales de transmisión (contacto directo, contacto indirecto/fómites, gotitas y aerosoles). sobre la transmisión aérea del SARS-CoV-2 se sugiere al referirse a los "aerosoles" como una suspensión estable de partículas sólidas y/o líquidas en el aire, con un corte de tamaño de partícula fijado en un orden de magnitud  $\sim 30-100 \mu\text{m}$ , y a las "gotas" como partículas líquidas más grandes que los aerosoles, además se describe el modelo de aire exhalado como una nube de

gas turbulenta multifásica ("puff") que consiste en grupos de partículas exhaladas mezcladas con el aire ambiente, donde las partículas tienen tamaños en una escala continua y son arrastradas por el impulso de las actividades espiratorias. Las gotitas respiratorias, formadas por secreciones respiratorias y saliva, se emiten al hablar, toser, estornudar e incluso respirar. El comportamiento de las partículas exhaladas se ve influenciado por las condiciones del aire ambiente y del aire exhalado, como la composición, la temperatura, la humedad y el flujo de aire, lo que pone de manifiesto la posibilidad de que las gotas más grandes sean impulsadas más lejos de lo que cabría esperar basándose únicamente en el tamaño de las partículas (39,40). La infección se adquiere al inhalar estando cerca de una persona infectada que exhala pequeñas gotitas y partículas respiratorias que contienen el virus, al hacer que estas pequeñas gotitas y partículas respiratorias que contienen el virus se depositen sobre los ojos, nariz o boca, especialmente a través de salpicaduras y aspersiones como las generadas al toser o estornudar, al tocarse los ojos, la nariz o la boca con las manos contaminadas con el virus (41).

### **Períodos de incubación y de contagio:**

El período de incubación suele ser de 2-14 días (5 días en promedio, >95 % de casos se desarrollan hasta el día 11). Las personas sintomáticas pueden transmitir el virus a los demás; Sin embargo, este período puede ser más largo en los pacientes que desarrollan infección grave. En la mayoría de los casos, la duración del período de contagio se estima en el máximo de 10 días desde el inicio de los síntomas, mientras que un número pequeño de pacientes con COVID-19 grave puede excretar el virus competente para la replicación hasta incluso 3 semanas (41).

### **Respuesta Inmunitaria**

La respuesta de la célula a la infección se inicia con los patrones moleculares asociados a patógenos o lesiones (PAMP) virales, que son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), seguidos de la activación de moléculas de señalización descendentes como las proteínas de señalización antiviral mitocondrial (MAVS) y MyD88, las quinasas TBK1, IKK, los factores de

transcripción IRF3, NF- $\kappa$ B, la proteína activadora 1 (AP-1) y otras, lo que da lugar a una elevada producción de IFN-I-III y a un estrés celular proinflamatorio en general. Esto se denomina producción primaria de IFN. La producción de IFN-I-III como la posterior transmisión de señales secundarias por parte de éstos para el desarrollo del estrés celular antiviral son fundamentales para controlar el desarrollo de la fase inicial de la infección por coronavirus. La superación de los procesos de inmunidad innata dependientes del IFN es una estrategia común de invasión viral, y COVID-19 no es una excepción. La inhibición de estos procesos, a su vez, es un requisito previo para la invasión viral. Los principales puntos de inhibición incluyen (34):

- (1). Inhibición de la formación y función de los PRR que reconocen el ARN del SARS-CoV-2.
- (2) Inhibición de la activación del IRF3 y de su translocación al núcleo celular o de su escisión, lo que inicia la producción de IFN-I-III.
- (3) Inhibición de la síntesis de IFNs en los ribosomas.
- (4) Inhibición del transporte transmembrana de IFNs (nsp8, nsp9).
- (5) Inhibición de la cadena IFNAR1-IFN-IR (orf3a), inhibición de la quinasa Tyk2 asociada al IFN-R (nsp1).
- (6) Inhibición directa de la expresión de ISG mediante el bloqueo de la activación y translocación al núcleo del complejo ISGF3, que inicia la transcripción de ISG.

Dentro de la respuesta inmunológica también es importante el IFN- $\gamma$ , secretado principalmente por las células T ayudadoras de tipo 1 (Th1), es un activador clave de los macrófagos proinflamatorios de tipo 1 (M1). La respuesta inmunitaria antiviral de estas células está relacionada con el riesgo de que las sustancias flogógenas dañen sus tejidos. Al mismo tiempo, el IFN-I-III es producido principalmente por las células infectadas por el virus, mientras que el IFN- es producido principalmente por los linfocitos activados por factores inmunitarios secundarios, pero no infectados por el virus. Por lo tanto, el desequilibrio entre los mecanismos de activación y limitación del estrés celular en los inmunocitos inducido por el SARS-CoV-2 contribuye a la interrupción de las respuestas antivirales innata y adaptativa. Las posibles variantes de la estrategia empleada por los virus para evadir los factores de la respuesta

inmunitaria son la búsqueda de estructuras antigénicas, la inducción de la activación policlonal de linfocitos, la inducción de la respuesta autoinmunitaria, el bloqueo de la interacción entre las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en las células presentadoras de antígenos (CPA) y el receptor de células T (RCT), la desregulación de la red de citoquinas, el desequilibrio entre los vectores individuales de la respuesta inmunitaria: i1(Th1, macrófagos-M1, células asesinas normales-NK, linfocitos T citotóxicos-CTL), i2 (Th2, M2a, eosinófilos, mastocitos), i3 (Th17, M2b, neutrófilos), i-reg (Treg, M2c)(34). La linfopenia, que está relacionada con la disminución de las cantidades de células T CD8+, así como de células Th y Treg CD4+ en la sangre, aunque en menor medida de disminución de células B y células NK, es otro signo de disfunción inmunológica en la COVID-19. Además, la gravedad del estado del paciente está relacionada con el grado de linfopenia. La aplicación de estas estrategias puede conducir no sólo a un aumento de la invasión viral, sino también al desarrollo de infecciones secundarias (bacterianas y fúngicas), daños locales y sistémicos en los tejidos por variantes de reacciones autoinflamatorias y autoinmunes (34,38).

Los siguientes son algunos de los mecanismos a través de los cuales el SARS-CoV-2 induce una disfunción inmunológica: Inhibición del CMH-I en las células infectadas, lo que dificulta su reconocimiento por parte de los LTC, la selección de los determinantes antigénicos de la proteína S mediante azúcares para impedir el reconocimiento de sus sitios antigénicos por parte de los anticuerpos; unión de orf8 al receptor de IL-17 y su activación en células inmunocompetentes, que puede contribuir a desequilibrios inmunológicos; posibles disfunciones de las CPA asociadas a la acción de la proteína S del SARS-CoV-2 sobre los PRR, y otros receptores de estas células; alteración en las células inmunocompetentes del equilibrio entre diversas vías de señalización y mecanismos de estrés celular por muchos factores de patogenicidad del SARS-CoV-2 (34,38).

En esta etapa también pueden verse involucrados los eosinófilos que son granulocitos que cumplen un papel importante en el sistema inmunitario innato, (24). La IL-3, la IL-5 y el GM-CSF son citocinas críticas que intervienen en el desarrollo y

la biología de los eosinófilos. Estas tres citocinas desencadenan señales intracelulares a través de un receptor común de cadena  $\beta$  ( $\beta c$ ) y, pueden afectar de forma diferente a las funciones de los eosinófilos. La IL-3, la IL-5 y el GM-CSF pueden participar en la proliferación y la diferenciación de los eosinófilos hasta alcanzar la fase madura no proliferativa. La IL-5 madura rápidamente los eosinófilos de la médula ósea, lo que sugiere que la IL-5 activa la diferenciación a partir de las células progenitoras de eosinófilos existentes, en lugar de a partir de las células madre. En general, se cree que la IL-3 y el GM-CSF son cruciales en la fase inicial de la diferenciación de los eosinófilos a partir de las células CD34+, mientras que la IL-5 es necesaria para su maduración final. La apoptosis y la necrosis retardadas son necesarias para la acumulación de eosinófilos en los tejidos y, por tanto, son factores importantes en la patogénesis de los eosinófilos. Las tres citocinas de la familia  $\beta c$  (IL-3, IL-5 y GM-CSF) atenúan la muerte de los eosinófilos, especialmente la apoptosis. Tras la diferenciación de los eosinófilos en la médula ósea, los eosinófilos maduros deben entrar en el torrente sanguíneo y migrar al tejido agredido. Tras la extravasación a través del endotelio vascular, el reclutamiento de los eosinófilos al lugar inflamado se dirige por quimiotaxis hacia un gradiente químico. El complemento C5a, el factor activador de las plaquetas (PAF), los eicosanoides (leucotrieno B4 (LTB4) y prostaglandina D2) y los ligandos del receptor de quimiocinas CC 3 (CCR3) (RANTES, MCP-4 y eotaxina 1-3) son los principales quimioatrayente de los eosinófilos (24,42).

Durante muchos años, se pensó que la función inmunitaria de los eosinófilos estaba únicamente asociada a la protección contra las infecciones producidas por parásitos helmínticos invasivos, pero hoy en día se conoce que tienen potentes efectos proinflamatorios y se ha demostrado que participan en la inflamación, la inmunorregulación y la defensa del huésped contra otros microorganismos, incluidos los virus (2,12). Varios informes de las últimas dos décadas han descrito un papel antiviral para los eosinófilos y sus proteínas granulares. Los eosinófilos expresan proteínas granulares altamente catiónicas, como la neurotoxina derivada de los eosinófilos (EDN), que tienen potentes actividades antivirales in vitro contra virus de ARN monocatenario, como el virus sincitial respiratorio (VRS) y el VIH (2).

Estas proteínas contribuyen a las funciones del eosinófilo en la inflamación de las vías respiratorias, el daño tisular y la remodelación en la diátesis asmática. Estas proteínas incluyen la proteína básica mayor-1 y -2 (MBP-1, MBP-2), la peroxidasa del eosinófilo (EPX), la proteína catiónica del eosinófilo (ECP) y la neurotoxina derivada del eosinófilo (EDN), la proteína cristalina de Charcot Leyden/Galectina-10 (CLC/Gal10), aunque no es catiónica, es una proteína hidrofóbica autocristalizante. EPX y MBP-2 son las únicas proteínas expresadas de forma exclusiva por los eosinófilos y no en otras células; las otras proteínas granulares derivadas de los eosinófilos se expresan en cantidades entre 10 y 100 veces menores en otros leucocitos sanguíneos, tejidos y células, incluidos los basófilos (43).

- *La Proteína básica mayor del eosinófilo-1*, La MBP-1 es una abundante proteína del gránulo localizada en el núcleo cristalino denso del gránulo secundario. La proteína se expresa inicialmente como un polipéptido de 25,2 kDa, que comprende un "dominio pro-dominio" altamente ácido y la proteína MBP-1 altamente básica. La MBP-1 es altamente tóxica para las células de mamíferos in vitro y puede dañar helmintos y bacterias. La MBP-1 daña las células al interrumpir la membrana de la bicapa lipídica o al alterar la actividad de las enzimas dentro de los tejidos. La MBP-1 estimula la liberación de mediadores (histamina) de los basófilos y los mastocitos, activa los neutrófilos y las plaquetas, y aumenta la generación de superóxido por los macrófagos alveolares. Los niveles de MBP-1 son elevados en fluidos biológicos (por ejemplo, esputos y fluidos de lavado broncoalveolar) de pacientes con asma y otras enfermedades asociadas a los eosinófilos. La MBP-1 ha sido implicada en el daño tisular asociado a la infiltración de eosinófilos, sobre todo en el epitelio respiratorio en el asma. La MBP-2 tiene un 66% de identidad de secuencia de aminoácidos con MBP-1, pero es significativamente menos básica. Las actividades in vitro de MBP-1 y MBP-2 parecen ser similares, por ejemplo, destrucción celular, inducción de anión superóxido, liberación de IL-8 de los neutrófilos e inducción de la liberación de histamina y leucotrieno C4 de los basófilos, pero la MBP-1 humana es más potente que la MBP-2. en estas actividades. La MBP-2, presente sólo

en los eosinófilos, puede ser un biomarcador útil para las enfermedades asociadas a los eosinófilos, pero su utilidad no ha sido evaluada (43).

- *La Neurotoxina derivada de los eosinófilos EDN* es una pequeña proteína básica que pertenece a la superfamilia de las ribonucleasas A (RNasa A). Se localiza en la matriz del gránulo secundario del eosinófilo y también se conoce como Nasa-2, RNasa no secretoria y RNasa-U<sub>s</sub>, esta última basada en su especificidad hacia la uridina. La EDN es una de las RNasas más abundantes en los seres humanos y se ha aislado de una gran variedad de fuentes, como los eosinófilos, la placenta, el hígado y la orina. Posee propiedades citotóxicas, neurotóxicas y antivirales. La EDN es una toxina catiónica pobre con una toxicidad limitada para los parásitos y células de mamíferos a altas concentraciones. Sin embargo, como ribonucleasa, es considerablemente más eficaz contra los virus de ARN monocatenario. La EDN activa las células dendríticas (CD) humanas, provocando su expresión de una variedad de quimiocinas inflamatorias, citocinas, factores de crecimiento y receptores solubles. La EDN también induce maduración fenotípica y funcional de las CD, actúa como una alarma que activa la vía de señalización TLR2-MyD88 en las CD, potenciando la respuesta inmune LTh2 (43).
- *La Proteína catiónica de los eosinófilos PCE* también pertenece a la superfamilia de las RNasas A y se conoce como RNasa-3. La PCE madura es un pequeño polipéptido catiónico de 133 residuos. Al igual que la EDN, se localiza en la matriz del gránulo específico del eosinófilo, pero en comparación con la EDN, la PCE es considerablemente más catiónico (43). Al igual que la EDN, la PCE induce el fenómeno neurotóxico de Gordon. La PCE tiene marcada toxicidad para una variedad de parásitos helmintos, hemoflagelados, bacterias, virus de ARN monocatenario y tejidos del huésped. Los niveles de PCE en suero pueden utilizarse como herramienta clínica para estimar la actividad inflamatoria de los eosinófilos en el asma y otras enfermedades alérgicas, y los niveles están relacionados con la gravedad de la enfermedad. La actividad antibacteriana y la toxicidad

parasitaria de la PCE son mayores que EDN. In vitro, la PCE puede funcionar como agente antiviral y puede participar en la defensa del huésped contra el virus respiratorio sincitial monocatenario. La toxicidad de la PCE para bacterias y helmintos no parece estar relacionada con su actividad de RNasa, mientras que la actividad de la RNasa es necesaria para sus actividades antivirales y neurotóxicas (1,36,43,44).

- *La Proteína de cristal de Charcot-Leyden CLC* forma cristales hexagonales bipiramidales característicos, que son el sello distintivo de la participación de los eosinófilos en las reacciones alérgicas e inflamatorias relacionadas. Estos cristales, que se encuentran en los lugares de infiltración de eosinófilos en los tejidos y en los fluidos y secreciones corporales fueron identificados hace más de 150 años. La CLC es un cristal pequeño, ligeramente ácido de 142 aminoácidos y 16,5 kDa. fue identificada inicialmente como una lisofosfolipasa de eosinófilos, pero desde entonces se ha asignado a la superfamilia de galectinas de animales de tipo S como el 10º miembro (Galectin10), basándose en la secuencia de aminoácidos, la estructura tridimensional (CLC/Gal-10) (36).

Se ha considerado que los eosinófilos proporcionan un efecto protector en las infecciones víricas y disminuyen la mortalidad (43). Los eosinófilos humanos expresan varios receptores like Toll endosomales (TLR), incluidos TLR3, TLR7 y TLR9, que detectan patrones moleculares asociados a virus. El TLR7 permite a los eosinófilos reconocer los virus de ARN monocatenario como el coronavirus, y la estimulación de este receptor en los eosinófilos humanos desencadena la producción de citoquinas, la degranulación, la generación de superóxido y óxido nítrico (NO) y la prolongación de la supervivencia celular. Tanto los eosinófilos humanos como los murinos producen NO a través de la NO sintasa inducible, que puede tener efectos antivirales directos sobre el virus de la parainfluenza y el virus sincitial respiratorio (VSR). Entre las citocinas producidas por los eosinófilos se encuentran los interferones de tipo I, la interleucina 12 y otras citoquinas que contribuyen a la aparición de un estado antiviral. Los eosinófilos murinos y

humanos activados también expresan moléculas MHC-II y moléculas coestimuladoras y pueden funcionar como células presentadoras de antígenos virales, lo que conduce a la activación de las células T y a la secreción de citoquinas (1,44).

Estudios recientes sugieren un nuevo concepto sobre dos subtipos diferentes de eosinófilos que pueden clasificarse por los marcadores de expresión de superficie mediante citometría de flujo: estos subtipos son los eosinófilos residentes (rEos) y los inducibles (iEos), que se localizan en los tejidos estables e inflamados, respectivamente. Así pues, es probable que la existencia de subpoblaciones fenotípicamente distintas de eosinófilos vaya acompañada de múltiples funciones biológicas en las que los eosinófilos se consideran diferenciados como células efectoras citotóxicas (45). Los rEos son células parenquimatosas independientes de la IL-5 con un núcleo en forma de anillo. Los iEos son células peri bronquiales dependientes de la IL-5 con un núcleo segmentado (45). Un gran número de eosinófilos reside en el tejido fuera de la vasculatura. Los eosinófilos residen en varios órganos como el timo, el tejido adiposo, los intestinos, las glándulas mamarias, el útero y los pulmones en condiciones homeostáticas. Los intestinos contienen el mayor número de rEos tisulares del cuerpo por superficie total (5 a 25% del total de leucocitos); el tejido adiposo y los pulmones contienen <4% de la fracción estromal/vascular y <1% del total de leucocitos (45).

La vida media de los eosinófilos en la sangre periférica es sólo de 3 a 18 horas, los eosinófilos tisulares de los intestinos, el útero y los pulmones existen durante más tiempo de 6 a 7 días; Por tanto, el tropismo tisular y el microambiente pueden prolongar la supervivencia de los eosinófilos y parecen determinar el comportamiento de los eosinófilos en el mantenimiento de la homeostasis (45). Los eosinófilos que se encuentran en el tejido desempeñan un papel importante en la homeostasis metabólica, las heridas, la remodelación epitelial en el tracto respiratorio, el mantenimiento de la homeostasis en el entorno intestinal, el mantenimiento de las células plasmáticas en la médula ósea, el desarrollo de las glándulas mamarias y la modulación del sistema genital femenino, también desempeñan un papel inmunomodulador en el timo (45).

Una función emergente de los eosinófilos es su contribución al metabolismo adiposo y la salud metabólica a través de los macrófagos (M2) que desempeñan un papel crucial en la homeostasis de la glucosa y el desarrollo de la grasa beige, que mejora la tolerancia a la glucosa, la reactividad a la insulina y protege contra la obesidad (45). Los eosinófilos además contribuyen al mantenimiento de la homeostasis inmunitaria pulmonar. También desempeñan funciones importantes en la coagulación y en la fibrinólisis, que es un proceso enzimático altamente regulado que evita la acumulación innecesaria de fibrina intravascular y permite la eliminación de trombos. Una respuesta excesiva de la interacción entre los eosinófilos y la coagulación desregulada está implicada en las enfermedades inflamatorias respiratorias de tipo 2, como el asma y la rinosinusitis crónica con pólipos nasales caracterizados por la deposición de fibrina(45,46).

Muchos eosinófilos también se encuentran en el tracto gastrointestinal y el ciego, residen principalmente en la lámina propia, pero no se encuentran en ubicaciones intraepiteliales dentro del tejido. Estos eosinófilos desempeñan un papel crítico en el mantenimiento de la homeostasis intestinal y la defensa biológica; pero los eosinófilos también contribuyen al desarrollo de enfermedades gastrointestinales incluyendo la esofagitis eosinofílica y la gastroenteritis, que suelen ser inducidas por una respuesta alérgica a los alimentos o a los alérgenos ambientales a través de mediadores derivados de los eosinófilos como la eotaxina-3, IL-5, IL-13, TGF- $\beta$  y periostina (42,45).

Los eosinófilos de la médula ósea son una fuente importante de factores de supervivencia de las células plasmáticas, incluyendo un ligando inductor de la proliferación (APRIL) y la IL-6, y participan en el mantenimiento de las células plasmáticas. En el torrente sanguíneo, los eosinófilos circulantes y otras células mieloides, incluidos los macrófagos y las células dendríticas, producen IL-17A, que es un importante mediador en la defensa del huésped contra la sepsis (45).

## **Diagnóstico**

Para el diagnóstico de laboratorio de la COVID-19, las pruebas utilizadas se basan en la RT-PCR en tiempo real; pruebas serológicas (Anti-SARS-CoV-2 IgA, IgM y/o IgG), utilizando ensayos de ELISA, quimioluminiscencia o inmunocromatografía; además de la prueba inmunocromatográfica del antígeno del SARS-CoV-2 en muestras del tracto respiratorio superior. La RT-PCR es el estándar de oro para la detección del SARS-CoV-2 y es la prueba de laboratorio de elección para el diagnóstico de pacientes sintomáticos en fase aguda. El diagnóstico realizado mediante RT-PCR en tiempo real utiliza el ARN extraído de muestras del tracto respiratorio, como hisopado nasofaríngeo/orofaríngeo, aspirado traqueal, esputo y lavado bronco alveolar. Es importante señalar que la fiabilidad de los resultados de pruebas de laboratorio depende, de que la recogida del material biológico se realice en una fase de la infección que permita la identificación del patógeno, ya que la carga viral suele ser mayor en la primera semana de la enfermedad, la RT-PCR debe realizarse, preferiblemente, entre el tercer y el quinto día de la aparición de los síntomas (13,22).

El método serológico se adopta principalmente para determinar contacto previo con el virus. Su sensibilidad es generalmente menor que la del método molecular. Las pruebas serológicas se basan en la detección del anticuerpo específico (IgA, IgM e IgG) producidos contra el SARS-CoV-2 o el antígeno del virus. La serología puede realizarse cuando la disponibilidad de pruebas moleculares es limitada o si han transcurrido al menos 14 días desde el inicio de los síntomas. Menos del 50% de los pacientes con COVID-19 tienen anticuerpos detectables en el suero antes de 7 a 10 días después del inicio de los síntomas (13).

También se pueden presentar falsos negativos, por lo tanto, se utilizan otros métodos de detección para superar este problema como la Tomografía Computarizada (TC) de tórax para identificar rápidamente a un paciente con COVID-19, mediante características típicas en la TC, incluyendo opacidades multilobulares bilaterales en vidrio deslustrado con una distribución periférica o posterior. Por lo tanto, se ha sugerido que la TC combinada con las pruebas de hisopo repetidas

deben utilizarse para los individuos con alta sospecha clínica de COVID-19 pero que dan resultado negativo en el cribado inicial de ácido nucleico (30).

Dado que la identificación de la infección por SARS-CoV-2 se ha convertido en un reto en la práctica clínica, por razones sociales, financieras, logísticas y analíticas, la búsqueda de anomalías en parámetros de laboratorio rutinarios, de bajo costo y sugestivos (o patognomónicos) es muy importante para ayudar a apoyar el diagnóstico de COVID-19 (13,23). Una de las pruebas utilizadas para el apoyo diagnóstico de la enfermedad es el hemograma (10).

**Hemograma tipo VI:** incluye la evaluación de los siguientes parámetros: hemoglobina, hematocrito, recuento de eritrocitos, índices eritrocitarios (volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media, concentración de la hemoglobina corpuscular media), ancho de distribución de los eritrocitos, recuento de reticulocitos, índices reticulocitarios, hemoglobina reticulocitaria, recuento total de leucocitos, recuento diferencial de leucocitos, recuento de plaquetas, índices plaquetarios (volumen medio plaquetario, ancho de distribución de las plaquetas, plaquetocrito), plaquetas reticuladas y morfología de sangre periférica por métodos electrónicos y manuales. No incluye sedimentación. El hemograma como prueba integral está compuesto por tres grupos de parámetros, a saber: El eritrograma, el leucograma y el trombograma (47). En este tipo de hemograma se realiza un diferencial de seis partes, que, a partir de la combinación de tamaño, la granularidad, las características inmunohistoquímicas y el patrón de fluorescencia de los glóbulos blancos, permiten discriminar las subpoblaciones leucocitarias con un alto grado de sensibilidad y especificidad. El recuento diferencial de leucocitos es un criterio indispensable para definir los conceptos hematológicos, tales como: Neutrofilia, neutropenia, eosinofilia, eosinopenia, basofilia, basopenia, aunque poco frecuente, linfocitosis, linfopenia, monocitosis, monocitopenia. El recuento de plaquetas corresponde a la cantidad de plaquetas en sangre periférica por unidad de volumen de sangre. El recuento automatizado característicamente tiene un coeficiente de variación inferior al 1% en los autoanalizadores de hematología de última generación. El recuento de plaquetas se realiza mediante impedancia

eléctrica y mediante enfoque hidrodinámico y dispersión óptica. El recuento de plaquetas es un criterio indispensable para definir los conceptos de trombocitopenia. El hemograma tipo VI, además de ofrecer resultados de gran precisión y exactitud, entrega nuevos parámetros que no están disponibles en sus predecesores, pero que son de gran aplicación clínica, no solo en el diagnóstico hematológico, sino en el pronóstico de pacientes con enfermedades infecciosas, cardiovasculares e inflamatorias, entre otras (47).

## Metodología

### *Tipo de estudio: Cuantitativo.*

Se realizará un estudio de cohorte prospectivo, dinámico, de pruebas diagnósticas.

### *Esquema del diseño de cohorte prospectiva dinámica:*



**Figura 3:** UCI: unidad de cuidados intensivos; HC: historias clínicas; H&E: hematoxilina y eosina; LBA: lavado bronquioalveolar; IL: interleuquina; TNF: factor de necrosis tumoral.

### **Participantes en el estudio**

Pacientes con COVID-19, positivos para SARS-CoV-2 mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa en tiempo real (RT-PCR), admitidos en la unidad de aislamiento respiratorio del Hospital Universitario de La Samaritana.

### **Muestra y Muestreo:**

Se realizará un muestreo consecutivo hasta alcanzar el tamaño de muestra 30 pacientes el cual se determinó con software Epidat, para su cálculo, con un nivel de confianza del 95%, error del 10%, utilizando la proporción de parámetros hematológicos alterados 60% reportada en los pacientes con COVID-19 hospitalizados en UCI (4,6,22).

### **Criterios de inclusión:**

- Pacientes mayores de 18 años con COVID-19 con SDRA, u otras condiciones clínicas que requieren un suministro de oxígeno de alto flujo y/o ventilación mecánica.

### **Criterios de exclusión:**

- Pacientes con infecciones concomitantes al COVID-19.
- Pacientes con enfermedades autoinmunes, con cáncer o inmunosupresión.
- Pacientes con tratamiento inmunosupresor o quimioterapia.

### **Aspectos éticos:**

Este proyecto será evaluado por el comité de Ética en Investigación del Hospital Universitario de la Samaritana. A todos los pacientes se les informará sobre el estudio, sus objetivos y pruebas a realizar, quienes deseen participar firmarán el consentimiento informado (anexo 1) acorde con la declaración de Helsinki, y a la ley

colombiana expresada en la resolución del Ministerio de Salud N° 8430 DE 1993 (4 de octubre de 1993) artículo 11 que la clasifica como investigación con riesgo mínimo.

### **Técnicas de recolección de datos y procedimiento**

A los pacientes con COVID-19 confirmado por RT-PCR, que presenten SDRA, u otras condiciones clínicas que requieren un suministro de oxígeno de alto flujo y/o ventilación mecánica, se les realizará un hemograma de VI generación al ingreso a la UCI junto con la valoración clínica y se les realizará seguimiento por medio del hemograma de VI generación y revisión de la historia clínica cada dos días para definir la severidad de la enfermedad. A los paciente con alteraciones en el hemograma se les realizará lavado bronco-alveolar (LBA). A continuación, se describen las pruebas que se realizarán en cada muestra:

### ***RT-PCR para SARS-CoV-2 cuantitativa***

La muestra para la realización de la RT-PCR para SARS-CoV-2 cuantitativa es el hisopado nasofaríngeo. La RT-PCR para SARS-CoV-2 se realizará a todos los pacientes que ingresen al Hospital Universitario de la Samaritana con sospecha de COVID-19. Para el desarrollo de la prueba se utilizará el equipo de extracción automatizada MAELSTROM 4800 y el termociclador CFX 96 DE BIORAD. Todas las muestras que ingresan al Laboratorio de Salud Pública de Cundinamarca (LSPC) deben tener su respectiva ficha epidemiológica, historia clínica y documento de identidad del paciente. La información del paciente debe ser ingresados a la base de datos de IRA VIRAL; posteriormente, se le asigna el código interno del LSPC. La asignación del código empieza con el prefijo AHC (Atención Humanos COVID), después, se le asigna el consecutivo numérico de la muestra y finaliza el sufijo del año en curso. A continuación, se debe verificar que las muestras tengan un volumen adecuado (cantidad mínima requerida 1 ml). Si la consistencia de la muestra es mucoide o muy densa, se recomienda agregar 300 µL de agua grado biología molecular y homogenizar en vortex por un (1) minuto. En caso de que la muestra continúe demasiado densa, adicionar otros 300 µL de agua grado biología

molecular y homogenizar nuevamente en vortex durante otro minuto. Si las muestras no se procesan inmediatamente, se deben almacenar a una temperatura de 2 a 8°C hasta por 8 horas, en caso de requerir una conservación prolongada, se deben almacenar a -80°C. Una vez las muestras son verificadas y organizadas en gradilla, se debe elaborar la respectiva hoja de trabajo y dejarlas a temperatura ambiente. las muestras deben ser homogenizadas con vortex a 3.000 RPM por 1 minuto cada una bajo cabina de bioseguridad. Después se realiza el proceso de extracción con el equipo Maelstrom 4800 que usa la tecnología de perlas magnéticas recubiertas con dióxido de silicón para la extracción de material genético conjugada con sales cao-trópicas y calor. Inicialmente, el equipo activa las perlas magnéticas y posteriormente las mezcla con las muestras de la columna 1 y 7, se genera la lisis o rompimiento de las células quedando libre el material genético, el ARN por electronegatividad (carga negativa), se adhiere a las perlas magnéticas. Posteriormente, las perlas son lavadas en los pozos de las columnas 2 a la 5 y, finalmente, con la ayuda de las barras magnéticas, deposita el material genético en los pozos de la columna 6 y 12. El siguiente paso en la realización de la RT-qPCR es la preparación de la "Máster Mix". Para la prueba se utiliza el kit **All Plex™ 2019-nCoV Assay**. El kit incluye todos los componentes para la PCR como buffer 5X (5X *Real-time One-step Buffer*), primers específicos para la amplificación de los genes E, N y RdRp de SARS-CoV-2 (2019-nCoV MOM), control positivo (*Internal Positive Control - IPC*), control interno (IC), la enzima retro transcriptasa (*Real-time One-step Enzyme*) y agua grado biología molecular libre de nucleasas. Para la realización de la PCR se utiliza el sistema de detección en tiempo real CFX-96, es una poderosa y precisa herramienta que combina temperatura y tecnología óptica para la detección de reacciones, en este caso, detecta la amplificación de secuencias víricas extraídas de muestras clínicas. El control de calidad analítico se realizó mediante la verificación secundaria de la extracción automatizada de ácidos nucleicos y la amplificación de secuencias virales se realizó bajo los lineamientos del proveedor comercial de la técnica (Annar importaciones). La técnica comercial **All Plex™ 2019-nCoV Assay** y el **Protocolo de Berlín**, que fueron validados previamente por el Instituto Nacional de Salud. En cuanto a los criterios de

aceptación o rechazo. El rango de aceptación o no de un resultado depende de su Ct (*cycle threshold*). El Ct se define como el número de ciclos requeridos para que la señal fluorescente cruce el límite y sea “detectado”. En este sentido, un Ct bajo (por ejemplo, Ct = 9), significa que hay una alta carga viral, puesto que la fluorescencia es detectada en un bajo número de ciclos; por otro lado,  $Ct \geq 38$ , se considerará con baja o nula carga viral, puesto que se requirieron casi la totalidad de los ciclos para emitir una señal detectable. No obstante, el analista debe revisar la amplificación de los tres genes para poder establecer un diagnóstico confiable (48).

### ***Evaluación clínica del grado severidad:***

Se realizará la evaluación del grado de severidad de los pacientes con COVID-19 mediante la verificación de las historias clínicas en donde el médico hará el registro de la evolución del paciente.

### ***Hemograma automatizado:***

Se recolectarán muestras de sangre venosa en tubos de 4ml con EDTA de Becton Dickinson (Colombia) y se procesarán en el equipo BC6800 de la casa comercial MINDRAY (China) el cual es un equipo completamente automatizado de VI generación que posee una Tecnología de análisis celular con óptica y fluorescencia SF Cube para leucocitos, diferencial de 6 partes, normoblastos (NRBC), reticulocitos (RET), plaquetas ópticas (PLT-O) y eritrocitos (RBC-O) e Impedancia de flujo enfocado-DC de PLT-O RBC-O para RBC y PLT. Medición de la hemoglobina libre de cianuro. Tiene una capacidad de procesamiento de 125 muestras hora. 37 parámetros reportables(sangre total): WBC, Lym%, Mon%, Neu%, Bas%, Eos%, IMG%, Lym#, Mon#, Neu#, Eos#, Bas#, IMG#; RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, RDW-CV, RDW-SD, RET%, RET#, IRF, LFR, MFR, HFR, NRBC#, NRBC%; PLT, MPV, PDW, PCT, P-LCR, P-LCC, IPF, RHE y 17 parámetros para investigación (sangre total): HFC#, HFC%, WBC-R, WBC-D, WBC-B, WBC-N, RBC-O, PLT-O, PLT-I, PDW-SD, InR#, InR‰, Micro%, Micro#, Macro%, Macro#, MRV. Se analizará para el número total de leucocitos, el valor absoluto de neutrófilos,

linfocitos, monocitos y eosinófilos y el número de plaquetas, de cada una de las muestras de los pacientes del estudio cada dos días durante 7 días (tabla 2) (49).

Tabla 2: VALORES DE REFERENCIA HEMOGRAMA BC6800 MINDRAY

<b>PARÁMETRO</b>	<b>VALOR DE REFERENCIA</b>	<b>Porcentaje %</b>
Número total de leucocitos	4.0-10.0 x10 <sup>9</sup> /L	-
Valor absoluto de neutrófilos	2.0-7.0 x10 <sup>9</sup> /L	50-70%
Valor absoluto de linfocitos	0.8-4.0 x10 <sup>9</sup> /L	20-40%
Valor absoluto de monocitos	0.12-1.20 x10 <sup>9</sup> /L	3-12%
Valor absoluto de eosinófilos	0.02-0.50 x10 <sup>9</sup> /L	0.5-5%
Número de plaquetas	100-300x10 <sup>9</sup> /L	-

### ***Análisis citológico de las muestras respiratorias***

Los LBA de los pacientes con COVID-19 severo se recolectarán en tubos de 5ml y se conservarán a 4°C hasta su procesamiento, en el laboratorio de patología antes de 24 horas. Los LBA se deben diluir de dos a cinco veces con PBS que contenga un cóctel de inhibidores de la proteasa, se pueden almacenar en congelación hasta su uso. se descongelarán rápidamente en un baño serológico a 37°C y se centrifugarán a 10.000 x g a 4°C durante 10 minutos, el pellet se utilizará para realizar dos frotis los cuales se fijarán a la lámina con etanol al 70% y se procederá a realizar coloración de Hematoxilina-Eosina (H&E). (MERCK, Colombia). La hematoxilina se utiliza para ilustrar los detalles nucleares en las células. La profundidad de la coloración está relacionada con la cantidad de ADN en los núcleos. La eosina es la contratinción más comúnmente utilizada que distingue entre el citoplasma y los núcleos de las células. Suele ser rosa, con diferentes tonos de rosa para diferentes tipos de fibras de tejido conjuntivo. Se le agregará a cada

uno de los frotis hematoxilina durante 3 minutos, se lavará con agua durante 1 minutos, agregar el diferenciador durante un minuto y lavar nuevamente durante 1 minuto, agregar azulado durante 1 minuto y lavar, agregar etanol al 100% durante 1 minuto, eosina durante 45 segundos, etanol al 95% 1 minuto. Los frotis se observarán a 10 y 100X con el microscopio óptico marca Olympus (Colombia) de forma independiente por dos patólogos experimentados y se llegará a un consenso de las proporciones de los distintos subconjuntos de leucocitos(26). Los valores de referencia para los leucocitos en el LBA es el siguiente: 80-90% son macrófagos, 5-15% son linfocitos, menos de 3% neutrófilos y menos de 1% eosinófilos y basófilos (50).

### ***Cuantificación de citoquinas y quimioquinas***

Los niveles de citoquinas y quimioquinas en muestras de LBA se medirán mediante un sistema de ensayo múltiple luminex (Luminex, Austin, TX, USA). El ensayo Luminex se llevará a cabo según las instrucciones del fabricante, utilizando un panel multiplex de citoquinas humanas personalizado (R&D Systems, Inc. USA). El panel incluirá: IL-1a/IL-1F1, IL-4, IL-6, IL-13 y TNF-a. Las placas de ensayo se medirán con un analizador Luminex 100/200TM (Luminex, EE. UU.). La curva estándar para cada citoquina/quimioquina se trazará utilizando el estándar de citoquina/quimioquina suministrado y se determinará con el algoritmo de mejor ajuste utilizando el software MasterPlex QT 2010 (MiraiBio, Hitachi, USA). Los LBA se deben diluir de dos a cinco veces con PBS un cóctel de inhibidores de la proteasa y luego almacenar en congelación criogénica hasta su uso. Para el análisis cuantitativo de las citoquinas, las muestras se descongelarán en un baño serológico a 37°C y se centrifugarán a 10.000 x g a 4°C durante 10 minutos. Los sobrenadantes se recogerán y se centrifugarán de nuevo a 10.000 x g durante 10 minutos, y este sobrenadante final se utilizará para el análisis (26).

## Definición y operacionalización de variables.

Nombre	Definición		Dimensión	Tipo	Escala de medición	Indicador	Fuente de verificación	Codificación
	Conceptual	Operacional						
Edad	Tiempo que ha vivido una persona, animal, o duración de una cosa	Años cumplidos al ingreso del estudio	N/A	Cuantitativa Independiente	De razón Discreta	Años cumplidos	Historia clínica	N/A
Sexo	Conjunto de peculiaridades que caracterizan los individuos de una especie, dividiéndolos en masculinos y femeninos	Género, según lo registrado en el documento de identificación	N/A	cualitativa, independiente	Nominal dicotómica	Femenino masculino	Historia clínica	Femenino (1) Masculino (2)
Lugar de procedencia	Sitio de residencia actual del paciente	Es la misma conceptual	N/A	Cualitativa independiente	Nominal dicotómica	Urbano rural	Historia clínica	Rural (1) Urbano (2)
Recuento de leucocitos	Numero de leucocitos totales reportados en el hemograma	Es la misma conceptual	N/A	Cuantitativa Independiente	De razón continua	Número total de leucocitos por mm <sup>3</sup>	Reporte de hemograma	N/A
Recuento de neutrófilos	Numero de neutrófilos totales reportados en el hemograma	Es la misma conceptual	N/A	Cuantitativa Independiente	De razón continua	Número total de neutrófilos por mm <sup>3</sup>	Reporte de hemograma	N/A
Recuento de linfocitos	Numero de linfocitos totales reportados en el hemograma	Es la misma conceptual	N/A	Cuantitativa Independiente	De razón continua	Número total de leucocitos por mm <sup>3</sup>	Reporte de hemograma	N/A
Recuento de eosinófilos	Numero de eosinófilos totales reportados en el hemograma	Es la misma conceptual	N/A	Cuantitativa Independiente	De razón continua	Número total de leucocitos por mm <sup>3</sup>	Reporte de hemograma	N/A
Días de estancia hospitalaria	Número total de días en que el paciente permaneció en la institución	Es la misma conceptual	N/A	Cuantitativa dependiente	De razón continua	Número total de días	Historia clínica	N/A
Estancia en UCI	Número total de días en el paciente permaneció hospitalizado en UCI	Es la misma conceptual	N/A	Cuantitativa dependiente	De razón continua	Número total de días	Historia clínica	N/A
Estado al egreso	Condición del paciente al ingresar al hospital	Es la misma conceptual	N/A	Cuantitativa dependiente	Nominal dicotómica	Vivo muerto	Historia clínica	Vivo (1) Muerto (2)

## **Análisis estadístico**

Para las variables cuantitativas inicialmente se evaluará la distribución de normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk. El análisis descriptivo de las variables cuantitativas se realizará mediante medidas de tendencia central y de dispersión y para las variables cualitativas mediante proporciones. En el análisis inferencial se va a establecer correlación entre los parámetros hematológicos y el grado de severidad mediante Spearman. Para establecer asociación entre los parámetros hematológicos y el estudio citológico y para las citoquinas del LBA se utilizará chi cuadrado. Para establecer la asociación entre todas las variables se utilizará análisis de regresión lineal múltiple. El desempeño de los parámetros hematológicos como prueba predictiva de severidad del paciente con COVID-19 con SDRA hospitalizado se analizará mediante la prueba de bondad de ajuste de Hosmer y Lemeshow, que comprueba si los datos propuestos explican los datos observados, a través de la evaluación de la distancia entre los datos observados en el estudio y lo esperado que es el valor teórico calculado mediante el modelo construido, se comparan observados y esperados. Además, Para evaluar la capacidad discriminativa se calculará el área bajo la curva ROC con el estadístico C, a través de la construcción de la curva ROC por medio de esta es posible determinar el poder predictivo y de discriminación de los parámetros hematológicos (51).

### **Definiciones operativas:**

- Se define eosinopenia como un valor de  $< 0.02 \times 10^9/L$ . (1,6)
- Definición de muerte por COVID-19: La muerte por COVID-19 se define, a efectos de la vigilancia, como un fallecimiento resultante de una enfermedad clínicamente compatible en un caso probable o confirmado de COVID-19, a menos que exista una clara causa alternativa de muerte que no pueda relacionarse con la COVID-19 (por ejemplo, un traumatismo). No debe haber un periodo de recuperación completa entre la enfermedad y la muerte.(52)

- Definición de COVID-19 severa: Disnea, frecuencia respiratoria  $\geq 30$  / min, saturación de oxígeno en sangre  $\leq 93\%$ , Índice de Kirby o  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$   $50\%$  en 24 a 48 horas o Pacientes mayores de 60 años o con Comorbilidades (EPOC, Hipertensión, cardiopatías, diabetes, inmunosupresión).
- Insuficiencia respiratoria, choque séptico y / o disfunción o falla de múltiples órganos.

### **Resultados esperados**

Al analizar el hemograma automatizado de VI generación en los pacientes críticos o severos con COVID-19 esperamos encontrar leucocitosis mayor a  $10 \times 10^9/\text{L}$ , número de neutrófilos mayor a  $7 \times 10^9/\text{L}$ , número de linfocitos menor a  $0.8 \times 10^9/\text{L}$ , número de eosinófilos igual o menor a  $0.02 \times 10^9/\text{L}$  y número de plaquetas menor a  $150 \times 10^9/\text{L}$ . En las muestras de LBA evaluadas mediante H&E se pretende observar principalmente células polimorfonucleares (PMN) tales como neutrófilos y eosinófilos, monocitos/macrófagos, y unos pocos linfocitos. En las mismas muestras de LBA después de ser analizadas mediante ELISA para las citocinas IL-1a, IL-6, el TNF-a, IL-4 y la IL-13 se espera que muestren una asociación significativa con la gravedad de la enfermedad encontrándose niveles aumentados de estas.

En conclusión, esperamos encontrar en nuestros análisis de muestras de pacientes con COVID-19 severo una asociación de la alteración de los parámetros hematológicos con la grave patogénesis neumónica.



Redacción del borrador del trabajo final									
Revisión y corrección del borrador de trabajo final por asesores.									
Consolidación y entrega del trabajo final									
Divulgación de resultados									
Preparación y entrega del artículo científico									

## Presupuesto

RUBROS		FUENTES		
		Institución financiadora	hospital de la Samaritana	TOTAL
TALENTO HUMANO			\$ 14.400.000,00	\$ 14.400.000,00
EQUIPOS	Uso	\$ 0,00	8.000.000,00	\$ 8.000.000,00
	Compra	0,00	\$ 3.800.000,00	\$ 3.800.000,00
SOFTWARE		\$ 0,00	\$ 0,00	\$ 0,00
SERVICIOS TÉCNICOS Exámenes de Laboratorio, lavado broncoalveolar, estudio patología		\$ 0,00	10.000,000,00	\$ 10.000.000,00
MATERIALES (kit de ELISA y material desechable de uso)		\$ 10.000.000,00	5.000,000,00	\$ 15.000.000,00
SALIDAS DE CAMPO		\$ 0,00	\$ 0,00	\$ 0,00
ADMINISTRATIVOS		\$ 10.000.000,00		\$ 10.000.000,00
PUBLICACIONES Y PATENTES		\$ 2.000.000,00	\$ 0,00	\$ 2.000.000,00
<b>TOTAL</b>		<b>\$22.000.000,00</b>	<b>\$ 41.200.000,00</b>	<b>\$ 63.200.000,00</b>

### **Clasificación en investigación traslacional**

Según la literatura el proyecto de investigación estaría clasificado como T4 ya que es un proyecto que tendrá un impacto sobre la población. Los resultados estarán orientados a cambios en las conductas tanto de la población de pacientes como de la comunidad médica y hospitalaria y realizar transferencia del conocimiento. Este proyecto fortalecerá conductas de autocuidado para la población y permitirá la realización de futuros proyectos (53).

## Bibliografía

1. Villa Palacio MI, López Henao E. Alteraciones hematológicas en COVID-19. *Nova*. 2020 Sep 25;18(35):75–9.
2. Terpos E, Ntanasis-Stathopoulos I, Elalamy I, Kastritis E, Sergentanis TN, Politou M, et al. Hematological findings and complications of COVID-19. Vol. 95, *American Journal of Hematology*. Wiley-Liss Inc.; 2020. p. 834–47.
3. Zhengyuan X. Eosinopenia as an early diagnostic marker of COVID-19 at the time of the epidemic. *EClinicalMedicine*. 2020 Jun 1;23.
4. Soni M. Evaluation of eosinopenia as a diagnostic and prognostic indicator in COVID-19 infection. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2020.
5. Lippi G, Henry BM. Eosinophil count in severe coronavirus disease 2019. Vol. 113, *QJM*. Oxford University Press; 2020. p. 511–2.
6. Tanni F, Akker E, Zaman MM, Figueroa N, Tharian B, Hupart KH. Eosinopenia and covid-19. *J Am Osteopath Assoc*. 2020 Aug 1;120(8):504–8.
7. Mateos M, Sierra E, Casado I, Arnalich F, Beato JL, Monge D, et al. The prognostic value of eosinophil recovery in COVID-19: A multicentre, retrospective cohort study on patients hospitalised in spanish hospitals. *J Clin Med*. 2021 Jan 2;10(2):1–23.
8. Zhao L, Zhang Y ping, Yang X, Liu X. Eosinopenia is associated with greater severity in patients with coronavirus disease 2019. Vol. 76, *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Blackwell Publishing Ltd; 2021. p. 562–4.
9. Tinoco-Sánchez M, Suárez-Cuenca JA, Rubio-Guerra AF. Utilidad de la eosinopenia como marcador pronóstico de severidad en sepsis. *Medicina Interna de México*. 2017 Sep 1;33(5):572–9.
10. Campuzano Maya G. Del hemograma manual al hemograma de cuarta generación. *Medicina & Laboratorio*. 2007; 13:511–50.
11. Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud Actualización Epidemiológica Enfermedad por coronavirus (COVID-19)

- [Internet]. 2021 [cited 2022 Feb 12]. Available from: <https://www.paho.org/es/file/92055/download?token=3nPUqnh4>
12. Ahmed SS, Mohammed DA, Mohammed AA. Hematological Parameters in Adult Patients with COVID-19; A Case-Control Study. *International Journal of Infection*. 2021 Jun 6;8(4).
  13. CDC. Cómo se propaga el coronavirus. 2021 [cited 2022 Feb 12]; Available from: <https://espanol.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/prevent-getting-sick/how-covid-spreads.html>
  14. Scappaticcio L, Pitoia F, Esposito K, Piccardo A, Trimboli P. Impact of COVID-19 on the thyroid gland: an update. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* [Internet]. 2021; 22:803–15. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11154-020-09615-z>
  15. Kirtipal N, Kumar S, Dubey SK, Dwivedi VD, Gireesh Babu K, Malý P, et al. Understanding on the possible routes for SARS CoV-2 invasion via ACE2 in the host linked with multiple organs damage. *Infection, Genetics and Evolution*. 2022 Apr; 99:105254.
  16. Al-kuraishy HM, Al-Gareeb AI, Alblihed M, Guerreiro SG, Cruz-Martins N, Batiha GES. COVID-19 in Relation to Hyperglycemia and Diabetes Mellitus. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2021 May 20;8.
  17. Brandini DA, Takamiya AS, Thakkar P, Schaller S, Rahat R, Naqvi AR. Covid-19 and oral diseases: Crosstalk, synergy or association? Vol. 31, *Reviews in Medical Virology*. John Wiley and Sons Ltd; 2021.
  18. Lee WY, Mok A, Chung JPW. Potential effects of covid-19 on reproductive systems and fertility; assisted reproductive technology guidelines and considerations: A review. *Hong Kong Medical Journal*. 2021 Apr 1;27(2):118–26.
  19. Letícia de Oliveira Toledo S, Sousa Nogueira L, das Graças Carvalho M, Romana Alves Rios D, de Barros Pinheiro M. COVID-19: Review and hematologic impact. *Clinica Chimica Acta*. 2020 Nov 1; 510:170–6.

20. Luo XH, Zhu Y, Mao J, Du RC. T cell immunobiology and cytokine storm of COVID-19. Vol. 93, *Scandinavian Journal of Immunology*. Blackwell Publishing Ltd; 2021.
21. Fathi N, Rezaei N. Lymphopenia in COVID-19: Therapeutic opportunities. *Cell Biol Int*. 2020; 44:1792–7.
22. Sánchez Valverde AJ, Miranda Temoche CE, Castillo Caicedo CR, Arellano Hernández NB, Tixe Padilla, Tania Magali. Covid-19: fisiopatología, historia natural y diagnóstico. *REVISTA EUGENIO ESPEJO* [Internet]. 2021 Jun 1 [cited 2022 Feb 12];15(2):98–114. Available from: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=572866949012>
23. Loeb M, Alhazzani W, Mertz D, Singhal N, Chagla Z, Pai M, et al. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *McMaster Textbook of Internal Medicine Kraków: Medycyna Praktyczna* [Internet]. 2022 [cited 2022 Feb 12]; Available from: <https://empendium.com/mcmtextbook/chapter/B31.II.18.1.12>
24. Wechsler ME, Munitz A, Ackerman SJ, Drake MG, Jackson DJ, Wardlaw AJ, et al. Eosinophils in Health and Disease: A State-of-the-Art Review. Vol. 96, *Mayo Clinic Proceedings*. Elsevier Ltd; 2021. p. 2694–707.
25. Yan B, Yang J, Xie Y, Tang X. Relationship between blood eosinophil levels and COVID-19 mortality. *World Allergy Organization Journal*. 2021 Mar 1;14(3).
26. Kim DM, Kim Y, Seo JW, Lee J, Park U, Ha NY, et al. Enhanced eosinophil-mediated inflammation associated with antibody and complement-dependent pneumonic insults in critical COVID-19. *Cell Reports*. 2021 Oct 5;37(1).
27. Sanaie S, Golipour E, Shamekh A, Sadaie MR, Mahmoodpoor A, Yousefi M. Immune response variables and viral mutations impact on COVID-19 reinfection and relapse. Vol. 100, *International Immunopharmacology*. Elsevier B.V.; 2021.
28. Ramasamy S, Subbian S. Critical determinants of cytokine storm and type I interferon response in COVID-19 pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2021 Jul 1;34(3).

29. Ju X, Zhu Y, Wang Y, Li J, Zhang J, Gong M, et al. A novel cell culture system modeling the SARS-CoV-2 life cycle. *PLoS Pathogens*. 2021 Mar 1;17(3).
30. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2021; 19:141–54. Available from: [www.nature.com/nrmicro](http://www.nature.com/nrmicro)
31. Yadav R, Chaudhary JK, Jain N, Chaudhary PK, Khanra S, Dhamija P, et al. Role of Structural and Non-Structural Proteins and Therapeutic Targets of SARS-CoV-2 for COVID-19. *Cells* [Internet]. 2021; 10:821. Available from: <https://doi.org/10.3390/cells>.<https://doi.org/10.3390/cells10040821><https://www.mdpi.com/journal/cells>
32. Suryawanshi RK, Koganti R, Agelidis A, Patil CD, Shukla D. Dysregulation of Cell Signaling by SARS-CoV-2. Vol. 29, *Trends in Microbiology*. Elsevier Ltd; 2021. p. 224–37.
33. Malik YA. Properties of Coronavirus and SARS-CoV-2. *Malaysian J Pathol* 2020. 2020;42(1):3–11.
34. Gusev E, Sarapultsev A, Solomatina L, Chereshnev V. Sars-Cov-2-Specific Immune Response and the Pathogenesis of COVID-19. Vol. 23, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2022.
35. Ramasamy S, Subbian S. Critical Determinants of Cytokine Storm and Type I Interferon Response in COVID-19 Pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2021;34(3):1–24. Available from: <https://journals.asm.org/journal/cmvr>
36. Lindsley AW, Schwartz JT, Rothenberg ME. Eosinophil responses during COVID-19 infections and coronavirus vaccination. Vol. 146, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Mosby Inc.; 2020. p. 1–7.
37. Jesenak M, Brndiarova M, Urbancikova I, Rennerova Z, Vojtkova J, Bobcakova A, et al. Immune Parameters and COVID-19 Infection – Associations with Clinical Severity and. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020.
38. WAQAR W, ISMAIL S, JAMIL Z, AL-SHEHHI A, IMRAN M, HETTA H, et al. SARS-CoV-2 associated pathogenesis, immune dysfunction, and involvement of host factors: a comprehensive review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2021; 25:7526–42.

39. Leung NHL. Transmissibility and transmission of respiratory viruses. Vol. 19, *Nature Reviews Microbiology*. Nature Research; 2021. p. 528–45.
40. Tang JW, Bahnfleth WP, Bluyssen PM, Buonanno G, Jimenez JL, Kurnitski J, et al. Dismantling myths on the airborne transmission of severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2). Vol. 110, *Journal of Hospital Infection*. W.B. Saunders Ltd; 2021. p. 89–96.
41. Saavedra Trujillo CH, Grupo ACIN- IETS de Consenso Colombiano para recomendaciones de atención COVID19. Consenso colombiano de atención, diagnóstico y manejo de la infección por SARS-CoV-2/COVID-19 en establecimientos de atención de la salud. *Infectio*, 24(3, Suppl 1), 262-292 [Internet]. 2020 [cited 2021 Nov 10]; Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0123-93922020000500262](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-93922020000500262)
42. Esnault S, Kelly EA. Essential mechanisms of differential activation of eosinophils by IL-3 compared to GM-CSF and IL-5. *Crit Rev Immunol*. 2016;36(5):429–44.
43. Acharya KR, Ackerman SJ. Eosinophil granule proteins: Form and function. Vol. 289, *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc.; 2014. p. 17406–15.
44. Eid R, Borish L. Eosinophils in antiviral immunity and (perhaps) a benefit of having asthma during the SARS-CoV2 pandemic. Vol. 127, *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*. American College of Allergy, Asthma, and Immunology; 2021. p. 3–4.
45. Kanda A, Yun Y, Bui D van, Nguyen LM, Kobayashi Y, Suzuki K, et al. The multiple functions and subpopulations of eosinophils in tissues under steady-state and pathological conditions. Vol. 70, *Allergology International*. Japanese Society of Allergology; 2021. p. 9–18.
46. Pozo del v. Eosinophil Response Against Classical and Emerging Respiratory Viruses: COVID-19. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2021;31(2):94–107.

47. Campuzano Maya G. Interpretación del hemograma automatizado: claves para una mejor utilización de la prueba. *Medicina & Laboratorio*. 2013; 19:11–68.
48. Gobernación de Cundinamarca. Manual de técnicas para el diagnóstico molecular de SARS-CoV-2. PROMOCIÓN DEL DESARROLLO DE SALUD GESTIÓN DE LA SALUD PÚBLICA. Bogotá; 2020.
49. Mindray. BC-6800 Analizador automático para hematología. Manual del operador. China: Mindray; 2013.
50. Castella J, Ancochea J, Llorente L, Puzo C, Sanchis J, Sueiro A, et al. Lavado broncoalveolar. *Arch Bronconeumol*. 1997;33(10):515–26.
51. Rojas Ingrid Tatiana, Méndez A, Rincón F José. Evaluación del desempeño pronóstico de dos puntajes de predicción de mortalidad a siete días en pacientes adultos oncológicos críticamente enfermos admitidos en una unidad de cuidados intensivos. *Acta Med Colomb*. 2018;43(2):81–9.
52. Definiciones de casos para la vigilancia COVID-19-16 de diciembre de 2020 1. Definiciones de casos [Internet]. 2020. Available from: <https://www.paho.org/es/temas/coronavirus/brote-enfermedad-por-coronavirus-covid-19/definiciones-casos-para-vigilancia>
53. Hernández-Carrillo F, Campillo Labrandero M, Sánchez-Mendiola M. Investigación traslacional en ciencias de la salud: implicaciones educativas y retos. *Inv Ed Med* [Internet]. 2018 Oct 30;7(28):85–97. Available from: <http://www.riem.facmed.unam.mx/index.php/riem/article/view/41>

## Anexos:

### Anexo 1:

## ESE HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LA SAMARITANA INVESTIGACIÓN CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA INVESTIGACIÓN



Fecha: DD / MM / AA

Este documento explica en qué consiste el proyecto de investigación. Lea cuidadosamente esta información y luego decida si desea participar o no como voluntario en el estudio:

“Título del estudio”

Evaluación del desempeño pronóstico de los parámetros hematológicos en la predicción de la severidad de la enfermedad COVID-19, en pacientes hospitalizados en la unidad de aislamiento respiratorio.

Información del Investigador

Investigador principal: Marian Jaime

Lugar de Desarrollo del Estudio: Hospital Universitario de La Samaritana Dirección del Sitio del Estudio: Carrera 8 No 0-31 sur- Bogotá Teléfonos: 4077075 Ext:

Celular:

Servicio: Laboratorio clínico

---

Código de l Sujeto:

INVITACIÓN A PARTICIPAR:

Estamos invitando a participar en el proyecto de investigación que tiene por título “Evaluación del desempeño pronóstico de los parámetros hematológicos en la predicción de la severidad de la enfermedad COVID-19, en pacientes hospitalizados en la unidad de aislamiento respiratorio.”, con el fin de determinar la asociación de alteraciones hematológica y metabólica en pacientes con infección por COVID severo que requieren de manejo en unidad de cuidados respiratorios.

El presente consentimiento informado le explicará el objetivo y los procedimientos del estudio. Es importante que usted se tome el tiempo necesario para participar o no en este proyecto, tenga en cuenta que su tratamiento médico no se verá afectado, simplemente usted está dando autorización al investigador principal y/o sus delegados, para incluir datos sobre su historia clínica en este estudio.

Este consentimiento informado está diseñado para **pacientes mayores de 18 años con infección por COVID 19 moderado y severo que requieran de aislamiento en unidad de cuidados respiratorios a quienes se está invitando a participar en el estudio.**

#### PROPÓSITO:

Establecer la asociación entre las alteraciones hematológicas en pacientes con infección por COVID 19 severo atendidos en la unidad de cuidados respiratorios del hospital de la Samaritana, con el fin a de ayudar a la selección de pacientes de forma temprana.

#### PROCEDIMIENTOS:

Se realizará toma rutinaria de hemograma, en pacientes con infección por COVID 19 severa que requieren de manejo con soporte ventilatorio invasivo, se hará toma de lavado bronquio alveolar con el fin de establecer la metabólica y posteriormente analizar su posible factor pronostico en COVID 19 severo.

POSIBLES RIESGOS, INCOMODIDADES O EFECTOS SECUNDARIOS: se considera una investigación con riesgo mínimo, en el cual se hará toma de estudios considerados de rutina en un paciente con tal condición clínica.

### BENEFICIOS:

Los beneficios pueden dividirse en beneficios para el individuo, para la comunidad en la cual el individuo reside, para el Hospital Universitario de La Samaritana y beneficios para la sociedad, pudiendo evidenciar alteraciones que permiten seleccionar pacientes para optimizar la atención de estos.

### FOTOS Y VIDEOS:

De igual forma, autorizo a la utilización de fotos y videos que tienen un propósito científico y docente, por lo que podrán ser divulgadas en publicaciones electrónicas e impresas o congresos científicos.

### ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS:

Usted puede decidir si quiere que su muestra pueda ser usada para investigaciones futuras. Usted puede cambiar su decisión en cualquier momento y notificar a los médicos del estudio o al profesional de la salud que registran los datos. Su decisión acerca del uso de su muestra no afectará su participación en otros estudios.

Por favor indique con la letra "X" su decisión acerca del permiso del uso futuro de sus muestras en investigación aquí abajo:

\_\_\_\_\_Acepto que mis muestras se almacenen por un periodo indefinido y se utilicen en futuras investigaciones.

\_\_\_\_\_No se pueden utilizar mis muestras en investigaciones futuras

Aun en el caso de aceptar el uso de su sangre para investigaciones futuras no relacionadas con este estudio, requerirá de la aprobación de un nuevo protocolo por parte del Comité de Ética HUS.

La muestra será destruida en el laboratorio, de acuerdo con los protocolos internos de la institución.

### CONFIDENCIALIDAD:

Se realizará todo esfuerzo para asegurar que los hallazgos de este estudio sean confidenciales y no se revelará su nombre o identidad en publicaciones o en reuniones académicas. Adicionalmente, como condición para la publicación de las imágenes y/o videos, se garantizará la absoluta reserva de la identidad como paciente, se respetará en todo momento la dignidad y se intentará en todo lo posible mantener el anonimato en el texto y en las imágenes. Se protegerán sus derechos y privacidad; no obstante, los investigadores asociados con esta investigación tendrán acceso a los documentos e información relacionados con este estudio. Los documentos del estudio serán conservados en el archivo del Centro de Investigación del Hospital Universitario de la Samaritana por un periodo mínimo de cinco años. Su expediente será completamente confidencial según lo indica la Ley. Este no será compartido con otras personas a menos que sea exigido por la Ley o de acuerdo con las especificaciones mencionadas anteriormente.

### PREGUNTAS:

Si tiene alguna pregunta sobre su participación en este estudio, o si en cualquier momento considera que ha experimentado algún problema en relación con el mismo, póngase en contacto con Marian Jaime Chiquillo. Teléfono 3165776765.

- Usted ha elegido participar en este proyecto de investigación libre y voluntariamente y en constancia firma el presente documento:

<b>Datos del Sujeto de Investigación</b>	
Nombres y apellidos completos:	<b>Firma o huella:</b>
Documento de Identidad:	
Dirección:	
Fecha: (día/mes/año)	

<b>Datos del testigo No. 1</b>	
Nombres y apellidos completos:	<b>Firma o huella:</b>
Documento de Identidad:	
Dirección:	
Fecha: (día/mes/año)	
Relación con el paciente:	

<b>Datos del testigo No. 2</b>	
Nombres y apellidos completos:	<b>Firma o huella:</b>
Documento de Identidad:	
Dirección:	
Fecha: (día/mes/año)	
Relación con el paciente:	

<b>Datos del Investigador Principal o designado (profesional de la salud)</b>	
Nombres y apellidos completos:	<b>Firma o huella:</b>
Documento de Identidad:	
Dirección:	
Fecha: (día/mes/año)	

- Usted ha decidido **NO** participar en este proyecto de investigación y en constancia firma:

<b>Datos del Sujeto de Investigación</b>	
Nombres y apellidos completos:	<b>Firma o huella:</b>
Documento de Identidad:	
Dirección:	
Fecha: (día/mes/año)	
Motivo de No participación:	

<b>Datos del testigo</b>	
Nombres y apellidos completos:	<b>Firma o huella:</b>
Documento de Identidad:	
Dirección:	
Fecha: (día/mes/año)	
Relación con el paciente:	

**NOTA:** El presente formato de consentimiento informado fue realizado con base en las especificaciones de la OMS 2016.  
 Link de consulta: <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Jh2957s/6.3.html>