







**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
**ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**  
**TESIS DOCTORAL**

Papel de las células Natural Killer en la susceptibilidad y el pronóstico  
de la COVID-19

Autor: **D<sup>a</sup>. Marta Moreno Hernández**

Director/es: D. Enrique Bernal Morell, y  
Alfredo Minguela Puras







**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD**

**DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

*Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022*

Dña. Marta Moreno Hernández, doctorando del Programa de Doctorado en

Ciencias de la Salud

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

Papel de las células Natural Killer en la susceptibilidad y el pronóstico de la COVID-19

y dirigida por,

D. Enrique Bernal Morell

D. Alfredo Minguela Puras

**DECLARO QUE:**

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

*Si la tesis hubiera sido autorizada como tesis por compendio de publicaciones o incluyese 1 o 2 publicaciones (como prevé el artículo 29.8 del reglamento), declarar que cuenta con:*

- *La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- *En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*



Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 19 de Mayo de 2023

Fdo.:

*Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.*

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados	
Responsable:	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación:	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad:	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios:	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos:	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia



UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

D. ENRIQUE BERNAL MORELL, Profesor Titular de Universidad del Área de Medicina en el Departamento de Medicina, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Papel de las células Natural Killer en la susceptibilidad y el pronóstico de la COVID-19", realizada por D<sup>a</sup>. Marta Moreno Hernández, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 02 de Mayo de 2023

ENRIQUE|  
BERNAL|  
MORELL|

Firmado digitalmente  
por ENRIQUE|  
BERNAL|MORELL  
Fecha: 2023.05.02  
20:34:58 +02'00'

Mod:T-20







UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

D. ALFREDO MINGUELA PURAS, Doctor de Universidad del Área de INMUNOLOGÍA en el Departamento de SERVICIO DE INMUNOLOGÍA DE HCUVA, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "PAPEL DE LAS CÉLULAS NATURAL KILLER EN LA SUSCEPTIBILIDAD Y EL PRONÓSTICO DE LA COVID-19 ", realizada por D<sup>a</sup>. MARTA MORENO HERNÁNDEZ, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 02 de Mayo de 2023

Firmado por MINGUELA PURAS,  
ALFREDO (FIRMA) el día 02/05/2023  
con un certificado emitido por AC DNIE  
006

Mod:T-20





## RESUMEN

### INTRODUCCIÓN

Los mecanismos inmunológicos y los factores implicados en la etiopatogenia y el pronóstico de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) continúan en gran medida por dilucidar. En este estudio, investigamos el papel de las interacciones entre el receptor similar a la inmunoglobulina de células asesinas (KIR, del inglés Killer-cell immunoglobuline-like receptor) y el antígeno leucocitario humano de clase I (HLA-I) en la susceptibilidad y la gravedad de la COVID-19, así como el valor pronóstico de factores demográficos, analíticos y clínicos asociados a la COVID-19 grave.

### METODOLOGÍA

Se trata de un estudio transversal y retrospectivo con componentes analíticos en el que se incluyeron 201 pacientes con infección por SARS-CoV2, de los que 100 habían presentado una sintomatología leve y/o moderada (1 a 4) y el resto grave (5 o 6) según la clasificación modificada de la OMS. Además, se compararon con 210 controles sanos. Realizamos el genotipado KIR y HLA-I y el inmunofenotipado de los receptores de células NK. Se realizó un análisis descriptivo y posteriormente una regresión logística binaria de las variables asociadas con la gravedad. Se utilizó el programa estadístico SPSS v22 y el software libre “r”. Se consideró significativo si la “p” < 0,05.

### RESULTADOS

Las células NK con un inmunofenotipo distintivo, que sugiere una activación reciente (KIR2DS4<sup>débil</sup> CD16<sup>débil</sup> CD226<sup>débil</sup> CD56<sup>fuerte</sup> TIGIT<sup>fuerte</sup> NKG2A<sup>fuerte</sup>), se expandieron en pacientes con COVID-19 grave. Esto se asoció con una mayor frecuencia del



receptor activador funcional A-telomérico KIR2DS4 en los pacientes graves frente a los leves y/o moderados y los controles (83,7%, 55,7% y 36,2%,  $p < 7,7 \times 10^{-9}$ ). En los pacientes con infección leve y/o moderada, HLA-B\*15:01 se asoció con frecuencias más altas del receptor activador B telomérico KIR3DS1 en comparación con los pacientes con otros subtipos de HLA-B\*15 y los controles no infectados (90,9%, 42,9% y 47,3%;  $p < .002$ ;  $P_c = 0,022$ ). Esto sugiere que HLA-B\*15:01 mediante la presentación específica de péptidos del SARS-CoV2, podría formar un neoligando que interactúa con KIR3DS1. Asimismo, un neoligando putativo para KIR2DS4 podría surgir de otras moléculas de HLA-I que presenten péptidos de SARS-CoV2 expresadas en células pulmonares presentadoras de antígeno infectadas y/o activadas.

## CONCLUSIONES

Nuestros resultados confirman la existencia de factores demográficos, clínicos y analíticos que tienen valor pronóstico en la COVID-19 grave, y apoyan un papel crucial de las células NK en la variabilidad clínica de la COVID-19 con interacciones específicas de KIR/ligando asociadas con la gravedad de la enfermedad. En concreto, el receptor KIR2DS4 se asoció de forma estadísticamente significativa con un curso clínico más grave de la enfermedad tras la infección por SARS-CoV2.

**Palabras clave:** receptores KIR activadores, gravedad de COVID-19, HLA clase-I, células NK, SARS-CoV-2

## SUMMARY

### INTRODUCTION

The immunological mechanisms involved in the etiopathogenesis and prognostic associated factors of coronavirus disease 2019 (COVID-19) remain to be elucidated. In this study, we investigated the role of killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) and human leukocyte antigen class-I (HLA-I) interactions in the susceptibility and severity of COVID-19; as well as we analyze the prognostic value of demographic, analytical and clinical factors associated with the severity of COVID-19

### METHODOLOGY

This was a cross-sectional, retrospective study with analytical components in which 201 patients with SARS-CoV2 infection were included, of whom 100 had presented with mild and/or moderate symptomatology (1 to 4) and the rest severe (5 or 6) according to the modified WHO classification. In addition, they were compared with 610 healthy controls. We performed KIR and HLA-I genotyping and natural killer cell receptor immunophenotyping. A descriptive analysis was performed followed by binary logistic regression of the variables associated with severity. The SPSS v22 statistical program and the free software "r" were used. It was considered significant if the "p" was less than 0.05.

### RESULTS

NK cells with a distinctive immunophenotype, suggesting recent activation (KIR2DS4<sup>low</sup> CD16<sup>low</sup> CD226<sup>low</sup> CD56<sup>high</sup> TIGIT<sup>high</sup> NKG2A<sup>high</sup>), were expanded in patients with severe COVID-19. This was associated with a higher frequency of the A-



telomeric functional activating receptor KIR2DS4 in severe versus mild and/or moderate patients and controls (83.7%, 55.7% and 36.2%,  $p < 7.7 \times 10^{-9}$ ). In patients with mild and/or moderate infection, HLA-B\*15:01 was associated with higher frequencies of B-telomeric activating receptor KIR3DS1 compared with patients with other HLA-B\*15 subtypes and uninfected controls (90.9%, 42.9% and 47.3%;  $p < .002$ ;  $P_c = 0.022$ ). This strongly suggests that HLA-B\*15:01 by specific presentation of peptides from the SARS-CoV2, could form a neoligand that interacts with KIR3DS1. Likewise, a putative neoligand for KIR2DS4 could arise from other HLA-I molecules presenting SARS-CoV2 peptide expressed on infected and/or activated antigen-presenting lung cells.

## CONCLUSIONS

Our results confirm the existence of demographic, clinical and analytical factors that have prognostic value for severe COVID-19, and support a crucial role of NK cells in the clinical variability of COVID-19 with specific KIR/ligand interactions associated with disease severity. Specifically, KIR2DS4 receptor was statistically significantly associated with a more severe clinical course of disease following SARS-CoV2 infection.

**Keywords:** activating KIR receptor, COVID-19 severity, HLA class-I, NK cells, SARS-CoV-2.

## **AGRADECIMIENTOS**





## AGRADECIMIENTOS

*A todos los que me han ayudado en mayor o menor medida con este proyecto.*

*Mención especial a mis directores de tesis, el Dr. Enrique Bernal y el Dr. Alfredo Minguela. Gracias por darme la oportunidad de realizar este trabajo, por el tiempo y dedicación brindados, así como por el rigor exigido a este proyecto. Gracias por su inestimable ayuda al haberme guiado durante su realización.*

*Al Instituto Carlos III, por la financiación de este proyecto de investigación, elaborado por parte del Servicio de Infecciosas del Hospital General Universitario Reina Sofía, en colaboración con el Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria.*

*Al trabajo de todo el equipo investigador, conformado por investigadores clínicos del Servicio de Medicina Interna del Hospital Morales Meseguer y del Hospital General Universitario Reina Sofía de Murcia e investigadores básicos del Servicio de Inmunología del Hospital Clínico Universitario de la Arrixaca e Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria, que ha participado en distintas tareas del mismo a lo largo de su elaboración.*

*Gracias a todos los compañeros, adjuntos y residentes que colaboraron de forma activa, en la recogida de datos y muestras de los pacientes incluidos en el estudio, procedentes de 10 hospitales españoles, como son: los Hospitales Reina Sofía, Morales Meseguer y Virgen de la Arrixaca de Murcia, el Hospital Rafael Mendez de Lorca, el Hospital Santa Lucía de Cartagena, el Hospital de Los Arcos de San Javier, el Hospital Universitario HM Sanchinarro de Madrid, el Hospital Perpetuo Socorro de Almería y el Hospital General Universitario de Albacete.*

*Gracias a la Unidad de Citometría e Inmunología Tumoral del Servicio de Inmunología de HCUVA por su importante labor en el análisis del genotipado de HLA-I y de KIR, y de la expresión de los receptores KIR en células NK a partir de las muestras de sangre*



*periféricas de los pacientes incluidos en el estudio. Sin estos análisis, este trabajo no hubiera sido posible.*

*Gracias a la colaboración de los departamentos de Ingeniería Electrónica e Informática e Ingeniería Química y Biológica, de la Universidad de Ciencia y Tecnología de Hong Kong, China, para la realización de los estudios de modelado de la afinidad KIR frente a HLA-I/péptido viral, junto con la Unidad de Citometría e Inmunología Tumoral del Servicio de Inmunología del HCUVA.*

*Al Servicio de Medicina Interna del Hospital Morales Meseguer, por su colaboración y apoyo, especialmente durante las fases iniciales del estudio, con participación en la captación de pacientes.*

*A todo el personal que ha colaborado en el estudio: auxiliares, técnicos de laboratorio, enfermeros y compañeros médicos, sin cuya participación el trabajo habría resultado imposible.*

*Y por supuesto, a todos esos pacientes y familiares que aceptaron colaborar en la realización de este trabajo, porque gracias a ellos la investigación en el ámbito de la salud es posible.*

*A mi familia, en especial a mis padres y hermanos, por su amor incondicional, y a mi pareja, Alejandro, por su apoyo, su paciencia y por estar siempre ahí cuando lo necesito.*

*Y por último, quiero dedicar esta tesis a mi tito Fran, a quien la COVID-19 le arrebató tanto, tan injusta y tan rápidamente, con tan sólo 52 años y sin ninguna otra enfermedad conocida, dejando un vacío difícil de superar.*

## **ABREVIATURAS**





## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

aa: aminoácidos

AA-Cent: región centromérica AA del gen KIR

AA: genotipo AA

AA-Tel: región telomérica AA del gen KIR

Ac: anticuerpos

ACE2: enzima convertidora de angiotensina 2

ADCC: *antibody dependent cell cytotoxicity*

ADN: ácido desoxirribonucleico

AEMPS: Agencia Española del Medicamentos y Productos Sanitarios

aKIR: receptores activadores similares a las inmunoglobulinas

ALT: alanina transaminasa

ANOVA: análisis de varianza

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

Asn: asparagina

AST: aspartato transaminasa

BAT3: *Tim-3 adaptor protein*

BD: Beckon Dickinson

BUN: nitrógeno ureico en sangre

Bx-Cent: región centromérica Bx del gen KIR

Bx-Tel: región telomérica Bx del gen KIR

Bx: genotipo Bx

CCL19: *Chemokine (C-C motif) ligand 19*

CCL21: *Chemokine (C-C motif) ligand 21*

CD: antígeno de diferenciación

CEACAM1: *CEA Cell Adhesion Molecule 1*



Cen: centromérica

CK: Creatín quinasa

CL-SF: superfamilia de lectinas tipo c

CMV: citomegalovirus

CMVH: citomegalovirus humano

COVID-19: *coronavirus disease 2019*

CPK-MB: creatín fosfoquinasa miocárdica

CSG: *coronaviridae study group*

*CX3CL1: C-X3-C Motif Chemokine Ligand 1 (fractalcina)*

*CXCR3: C-X-C Motif Chemokine Receptor 3*

*CXCL9-11: Motif Chemokine Ligands 9 to 11 (*

C3: componente 3 del complemento

C4: componente 4 del complemento

DAP10: *DNAX activating protein of 10 kDa*

DAP 12: *DNAX activating protein of 12 kDa or KARAP*

DD: dímero D

DE: desviación estándar

dL: decilitro

DNAM-1: *DNAX Accessory Molecule-1 or CD226*

Dx: dominio número x

ECMO: oxigenación por membrana extracorpórea

EDTA: ácido etilendiaminotetracético

EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica

FA: fibrilación auricular

Fc: fracción constante de los anticuerpos

FcRIIIa/ CD16: receptor fc activador or CD16

FcRy: receptores Fcy

FIS: fecha de inicio de síntomas

fKIR2DS4: funcional-KIR2DS4

GGT: gamma-glutamil transferasa

GISAID: *Global Initiative on Sharing All Influenza Data*

GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

Gripe H1N1: *Influenza A virus subtype H1N1 (hemagglutinin 1 and neuraminidase 1)*

HCoV: coronavirus humanos

HDL: *high-density lipoprotein*

HLA: *human leucocyte antigen*

HLA-A: *human leucocyte antigen, class I, A*

HLA-B: *human leucocyte antigen, class I, B*

HLA-C: *human leucocyte antigen, class I, C*

HLA-E: *human leucocyte antigen, class I, E*

HLA-SSO: *Sequence-Specific Oligonucleotides kits allow the identification of Human Leukocyte Antigen*

HUVA: Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca

IC: intervalo de confianza

ICTV: Comité Internacional de Taxonomía de Virus

IECAs: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina

IFM: intensidad de fluorescencia media

IFN- $\gamma$ : interferón gamma

Ig A, G, M: inmunoglobulina A, G, M

Ig-SF: superfamilia de las inmunoglobulinas

iKIR: receptores inhibidores similares a las inmunoglobulinas

IL2: interleuquina 2

IL6: interleuquina 6

IL7: interleuquina 7

IL8: interleuquina 8

IL10: interleuquina 10

IL 12: interleuquina 12

IL15: interleuquina 15



IL17 interleuquina 17

IL18: interleuquina 18

IMC: Índice de Masa Corporal

IMIB: Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria

iNKR: *inhibitory NK cell receptors*

IOT: intubación orotraqueal

IRA: insuficiencia renal aguda

IRC: Insuficiencia renal crónica

ITAM: motivo de activación del inmunoreceptor basado en tirosina

ITIM: motivo de inhibición del inmunoreceptor basado en tirosina

ITSM: motivo de cambio del inmunoreceptor basado en tirosina

IQR: rango intercuartílico

KDa: kilodalton

KIR: *killer-cell immunoglobulin-like receptors*

KIR-SSO: *Sequence-Specific Oligonucleotides kits allow the identification of Killer Immunoglobulin-like Receptor*

KIR2DL4: *killer cell immunoglobulin like receptor, two Ig domains and long cytoplasmic tail 4*

KIR2DL5A: *killer cell immunoglobulin like receptor, two Ig domains and long cytoplasmic tail 5A*

KIR2DL5B: *killer cell immunoglobulin like receptor, two Ig domains and long cytoplasmic tail 5B*

KIR3DL1: *killer cell immunoglobulin like receptor, three Ig domains and long cytoplasmic tail 1*

KIR2DL1/5: *killer cell immunoglobulin like receptor, two Ig domains and long cytoplasmic tail 1/5*

KIR3DL1/2: *killer cell immunoglobulin like receptor, three Ig domains and long cytoplasmic tail 1/2*

KIR2DS1/5: *killer cell immunoglobulin like receptor, two Ig domains and short cytoplasmic tail 1/5*

KIR3DS1: *killer cell immunoglobulin like receptor, three Ig domains and short cytoplasmic tail 1*

KIR2DS4: *killer cell immunoglobulin like receptor, two Ig domains and short cytoplasmic tail 4*

**KIR3DS1:** *killer cell immunoglobulin like receptor, three Ig domains and short cytoplasmic tail 1*

**KIR B-teloméricos:** genes región telomérica B de KIR

**KLR:** *Killer cell lectin-like receptor*

**KLRG-1/MAFA:** *Killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1*

**L:** *long*

**LAIR:** *Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor*

**LAIR-1:** *Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 1*

**LDH:** lactato deshidrogenasa

**LILR/LIR:** *Leukocyte immunoglobulin-like receptor*

**LILRB1/ILT2/LIR1:** *Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member 1*

**Linfocitos T CD8+:** linfocitos T citotóxicos

**Linfocitos T CD4+:** linfocitos T colaboradores

**Lys:** lisina

**LRC:** *leucoyte receptor complex*

**MALT:** tejido linfoide asociada a mucosas

**Mb:** megabases

**MERS-CoV:** coronavirus del síndrome respiratorio de oriente medio

**Mg:** miligramos

**MHC:** *mayor histocompatibility complex*

**MICA:** *MHC class I chain related sequence A*

**MICB:** *MHC class I chain related sequence B*

**mL** mililitro

**mmHg:** milímetros de mercurio

**NAAT:** *Nucleic Acid Amplification Tests*

**NAbs:** *neutralizing antibody*s

**N-CAM1/CD56:** *Neural Cell Adhesion Molecule 1*

**NCBI:** Centro Nacional de Información Biotecnológica

**NCR:** receptores citotóxicos naturales



ng nanogramos

NK: *natural killer*

NKcs: *natural killer cells*

NKG2A: *natural killer group 2a*

NKG2B: *natural killer group 2b*

NKG2C: *natural killer group 2c*

NKG2D: *natural killer group 2d*

NKG2E: *natural killer group 2e*

NKp30: *natural killer protein 30*

NKp44: *natural killer protein 44*

NKp46: *natural killer protein 46*

NKp65: *natural killer protein 65*

NKp80: *natural killer protein 80*

NKR: *natural killer receptor*

NKR-P1: *natural killer cell receptor protein 1*

NS: no significativo

Nt-proBNP: *N-terminal pro-brain natriuretic peptide*

OAF: oxígeno a alto flujo

OMS: Organización Mundial de la Salud

OR: odd ratio

O<sub>2</sub>: oxígeno

PAFI: presión arterial de oxígeno/fracción inspirada de oxígeno (PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>)

Pb: pares de bases

Pc: método de corrección conservador de Bonferroni

PCR: proteína c reactiva

PCR-SSO: reacción en cadena de la polimerasa - secuencia específica de oligonucleótidos

PCR-SSOP: reacción en cadena de la polimerasa- sondas de oligonucleótidos de secuencia específica

PDB: banco de datos de proteínas

PE: ficoeritrina

PLC: complejo de carga de péptidos

Pp1a: poliproteína replicasa 1a

Pp1b: poliproteína replicasa 1b

Proteína E: proteína de envoltura

Proteína M: proteína de membrana

Proteína N: proteína de la nucleocápside

Proteína S: proteína spike

QIAGEN: QIAamp-DNA-Blood-Mini-kit

RADT: *rapid antigens diagnostic test*

RBD: *receptor binding domain*

RE: retículo endoplásmico

RPM: respiraciones por minutos

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

S: short

SAFI: saturación arterial de oxígeno/fracción inspirada de oxígeno (SO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>)

SAP: proteína asociada a SLAM

SARS-CoV1: coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo 1

SARS-CoV2: coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo 2

SDRA: síndrome de distress respiratorio agudo

SG: supervivencia global

SHP-1,2: *Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1, 2*

SHIP: *Src homology 2-containing inositol phosphatase*

SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida

Siglec 7: *Sialic acid-binding Ig-like lectin 7*

SLAM: *Signaling lymphocytic activation molecule*

SLP: Supervivencia Libre de Progresión

SOFA: escala de evaluación secuencial de insuficiencia orgánica



SOFA (Sequential Organ Failure Assessment score o score para Evaluación de Fallo Orgánico Secuencial).

TAG: triacilglicéridos

TCR: *T-cell receptor*

Tel: telomérica

TH1: *Type 1 T helper*

TIGIT: *T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*

TMPRSS2: *transmembrane protease, serine 2*

TNF alfa: factor de necrosis tumoral alfa

TP: tiempo de protrombina

trNK: *Tissue-Resident Natural Killer Cells*

UCI: unidad de cuidados intensivos

ULBP: *UL16 binding protein 1*

VEB: virus epstein-bar

VHB: virus hepatitis B

VHC: virus hepatitis c

VHS: virus herpes simple

VIH: virus de inmunodeficiencia humano

VMI: ventilación mecánica invasiva

VMNI: ventilación mecánica no invasiva

VOC: *Variants of Concern*

VOI: *Variants of Interest*

VSG: velocidad de sedimentación globular

VVZ: virus varicela zoster

2B4: *also known as SLAMF4 or signaling lymphocyte-activation molecule family member 4*

2D: dos dominios

3D: tres dominios

2019n-Cov: *coronavirus 2019*

μL: microlitro

## ÍNDICE





# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>17</b>
<b>GLOSARIO DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>21</b>
<b>ÍNDICE.....</b>	<b>31</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>37</b>
1. Historia del nuevo coronavirus .....	37
2. Familia Coronaviridae: coronavirus antes del SARS-CoV2 .....	38
A. <i>Taxonomía de los coronavirus: la familia Coronaviridae</i> .....	38
B. <i>Epidemiología de los coronavirus</i> .....	40
C. <i>Antecedentes históricos de coronavirus patógenos humanos</i> .....	41
3. Nuevo coronavirus: SARS-CoV2 .....	43
A. <i>Virología del SARS-CoV2</i> .....	43
B. <i>Epidemiología del SARS-CoV2</i> .....	43
C. <i>Variantes del nuevo coronavirus</i> .....	45
D. <i>Receptor principal en la célula huésped del SARS-CoV2</i> .....	47
E. <i>Manifestaciones clínicas del SARS-CoV2</i> .....	48
F. <i>Efectividad de la respuesta inmunitaria frente al SARS-CoV2</i> .....	52
G. <i>Diagnóstico de infección activa del SARS-CoV2</i> .....	55
H. <i>Tratamiento del SARS-CoV2</i> .....	56
I. <i>Factores de riesgo de enfermedad grave en la COVID-19</i> .....	58
J. <i>Características inmunológicas asociadas a COVID-19 grave</i> .....	62
4. Las células Natural Killer (NK).....	64
A. <i>Introducción</i> .....	64



B.	<i>Biología de las células NK: conceptos básicos</i> .....	65
C.	<i>Receptores de células NK (NKR)</i> .....	73
5.	Los receptores KIR .....	79
A.	<i>Definición</i> .....	79
B.	<i>Nomenclatura, estructura y función de los receptores KIR</i> .....	80
C.	<i>Repertorio KIR: factores de variabilidad asociados a su expresión</i> ...	82
6.	Moléculas HLA.....	92
A.	<i>Definición</i> .....	92
B.	<i>Genes MHC</i> .....	92
C.	<i>Moléculas HLA de clase I: ligando KIR de células NK</i> .....	94
7.	Tipos de receptores KIR y especificidad de ligando HLA-I.....	98
8.	KIR/HLA I e infección viral .....	100
	<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>105</b>
	<b>HIPÓTESIS DE TRABAJO</b> .....	<b>111</b>
	<b>OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN</b> .....	<b>115</b>
1.	Objetivo principal .....	115
2.	Objetivos específicos .....	115
	<b>METODOLOGÍA UTILIZADA</b> .....	<b>119</b>
1.	Diseño del estudio y pacientes .....	119
2.	Análisis de datos .....	128
	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>133</b>
1.	Características demográficas, clínicas y analíticas del total de pacientes....	133
2.	Características demográficas, clínicas y analíticas de los pacientes con COVID-19 leve-moderado vs grave .....	137
3.	Papel de la interacción KIR/HLA en la gravedad de la COVID-19 .....	158
4.	Características demográficas, clínicas y analíticas de los pacientes en función de la presencia de fKIR2DS4.....	164

5.	Las células NK KIR2DS4+ con un inmunofenotipo distintivo se expandieron en la enfermedad por coronavirus 2019.....	169
6.	Los receptores KIR activadores B-teloméricos están asociados con la COVID-19 más leve en pacientes con HLA-B*15:01.....	173
<b>DISCUSIÓN.....</b>		<b>181</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>		<b>203</b>
<b>APÉNDICE .....</b>		<b>207</b>
1.	Anexo 1. Hoja de información al paciente.....	207
2.	Anexo 2. Consentimiento informado .....	211
3.	Anexo 3. Volante de extracción/petición de muestra de sangre periférica para el análisis de NK en la Unidad de Citometría e Inmunología Tumoral.....	213
4.	Anexo 4. Hoja de recogida de datos del paciente .....	215
5.	Anexo 5. Dictamen del Comité de Ética de la Investigación del Hospital General Universitario Reina Sofía .....	221
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>		<b>225</b>





## **INTRODUCCIÓN**





# INTRODUCCIÓN

## 1. HISTORIA DEL NUEVO CORONAVIRUS

El síndrome agudo respiratorio severo causado por el nuevo virus de la familia de los coronavirus SARS-CoV2 asociado con la enfermedad del coronavirus 2019 (COVID-19) surgió en Wuhan, una ciudad de la provincia china de Hubei, extendiéndose tras su aparición de forma rápida por todo el mundo, provocando una pandemia mundial, seguida de una crisis sanitaria y económica histórica (1).

En diciembre de 2019, un grupo de pacientes con neumonía de causa desconocida se vinculó a un mercado mayorista de productos del mar en Wuhan, China. En las muestras de estos pacientes con neumonía se descubrió un beta coronavirus de ARN envuelto, previamente desconocido, al que se llamó inicialmente 2019-nCov (2).

El análisis genómico reveló que el SARS-CoV2 está relacionado filogenéticamente con los virus de los murciélagos similares al síndrome respiratorio agudo severo (SARS), lo que sugiere que los murciélagos podrían ser el posible reservorio primario. No obstante, se desconoce si el virus se transmite directamente de los murciélagos o mediante algún otro mecanismo (por ejemplo, a través de un huésped intermedio) (3)

El 11 de febrero de 2020, la Organización Mundial de la Salud (OMS) denominó a la enfermedad producida por este agente etiológico como COVID-19 (Coronavirus Disease, 2019). Posteriormente, y a pesar de las extensas medidas de contención, la enfermedad continuó avanzando y fue declarada como pandemia por la OMS el 11 de marzo de ese mismo año.



## **2. FAMILIA CORONAVIRIDAE: CORONAVIRUS ANTES DEL SARS-COV2**

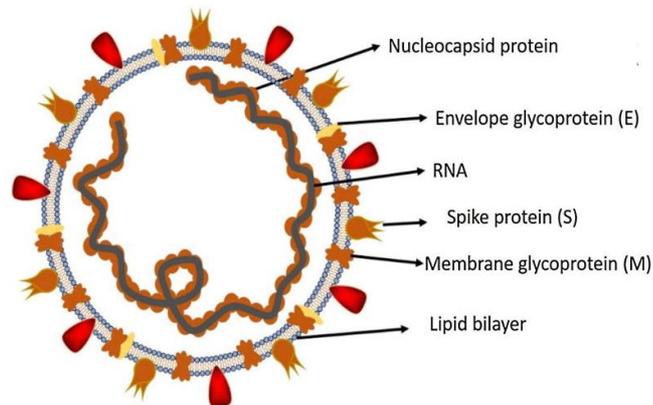
### **A. TAXONOMÍA DE LOS CORONAVIRUS: LA FAMILIA CORONAVIRIDAE**

Descubiertos por primera vez en 1960, los miembros de la familia Coronaviridae, un grupo monofilético del orden Nidovirales, son virus envueltos de ARN que afectan a tres clases de vertebrados: mamíferos (coronavirus y torovirus), aves (coronavirus) y peces (bafinivirus). La clasificación actual de los coronavirus reconoce 39 especies en 27 subgéneros, cuatro géneros (alfa, beta, gamma y delta) y dos subfamilias: Letovirinae y Orthocoronavirinae, perteneciendo a ésta última los coronavirus relacionados con el síndrome respiratorio agudo severo humano (4).

En términos de tamaño del genoma y complejidad genética, los Coronaviridae son los virus de ARN más grandes identificados hasta ahora, con hasta 160 nm de diámetro. Su nombre deriva de su forma esférica, decorada en su superficie por proyecciones grandes, en forma de pico, que en micrografías electrónicas dan una apariencia característica de corona solar (3). Esta membrana exterior deriva del huésped y rodea el genoma, que está encerrado, a su vez, en una nucleocápside que es helicoidal en su forma relajada pero asume una forma aproximadamente esférica en la partícula del virus. A través de estos picos, los viriones se unen a los receptores de la célula huésped y liberan su genoma en el citoplasma de la célula diana mediante la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática. Se inicia así el ciclo de replicación viral con el ensamblaje y maduración del virus, que culmina en su nueva liberación.

La composición virológica de los coronavirus se caracteriza por compartir dos proteínas no estructurales (poliproteínas replicasas pp1a y pp1ab, subdivididas en 16 proteínas,

incluida la ARN polimerasa dependiente de ARN), y cuatro proteínas estructurales esenciales (**Figura 1**) que pueden interferir con la respuesta inmunitaria del huésped (5).



**Figura 1** (3): Estructura del coronavirus humano causante de la COVID-19.

- La proteína Spike (S) es una glicoproteína de membrana homotrimérica grande (1128-1472 aa), que se proyecta a través de la envoltura viral y forma los picos característicos en la "corona" del coronavirus. Es una proteína de fusión que media la unión al receptor principal en la célula huésped (a través de su subunidad S1 N-terminal, que se divide, a su vez, en dominio N terminal y dominio de unión al receptor) y la fusión consiguiente con su membrana (a través de su subunidad S2 C-terminal). Como consecuencia de ello, esta proteína se ha convertido en el principal inductor de anticuerpos neutralizantes del virus, los cuales son provocados principalmente por epítomos en la mitad amino-terminal de la molécula.
- La proteína de membrana (M) juega un papel importante en el ensamblaje viral y además, su extremo N-terminal, expuesto a la superficie, induce anticuerpos que pueden neutralizar la infectividad del virus en presencia de complemento.

- La proteína de la nucleocápside (N) se asocia con el ARN viral para formar la nucleocápside. Entre sus funciones destaca la posibilidad de estar involucrada en la regulación de la síntesis de ARN viral, y de interactuar con la proteína M durante la gemación del virus. Por otra parte, es un antígeno dominante durante la infección natural siendo reconocida por los linfocitos T citotóxicos, pero se ha visto que los anticuerpos específicos de N pueden proporcionar poca protección inmunitaria, y son principalmente de relevancia sero-diagnóstica (6).
- La proteína de envoltura (E) es una proteína de membrana pentamérica pequeña (74-109 aa) con actividad de canal iónico y/o permeabilización de la membrana, cuya función precisa se desconoce, considerándose principalmente un componente estructural. No obstante, en el caso del SARS secundario a la infección por el nuevo coronavirus, esta proteína se ha identificado como un factor de virulencia, siendo necesaria, junto con las proteínas M y N, para el correcto ensamblaje y la liberación del virus.

## **B. EPIDEMIOLOGÍA DE LOS CORONAVIRUS**

Los coronavirus del resfriado común son ubicuos y las infecciones pueden ocurrir en cualquier época del año; no obstante, se observa cierta estacionalidad según el clima, aunque con resultados contradictorios al respecto. En regiones de clima templado suele haber picos de mayor incidencia en invierno y picos más pequeños en otoño y primavera, mientras que en regiones subtropicales los brotes se dan predominantemente en primavera y otoño (7).

Se propagan por distintas vías, predominando una u otra, según la especie: por vía aérea a través del contacto con secreciones infectadas o gotas grandes de aerosol, por fómites o bien, por vía fecal-oral (8).

La inmunidad se desarrolla poco después de la infección, pero disminuye gradualmente con el tiempo. La reinfección es común, presumiblemente debido a la disminución de la inmunidad, pero posiblemente debido a la variación antigénica dentro de las especies (9).

### C. ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE CORONAVIRUS PATÓGENOS HUMANOS

Según la especie de coronavirus, el hospedador es distinto. Hasta la fecha, se han identificado múltiples huéspedes animales, entre los que se incluyen: aves y varias especies de mamíferos, como camellos, murciélagos, civetas de palma enmascaradas, ratones, perros y gatos, entre otros; además del ser humano(10) :

Los coronavirus humanos (HCoV) pertenecen a dos de los cuatro géneros descritos dentro de la familia Coronaviridae (alfa y beta), y existen un total de siete especies patógenas para el ser humano: coronavirus alfa (HCoV-229E y HCoV-NL63) y coronavirus beta (HCoV-HKU1, HCoV-OC43, coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio [MERS-CoV], coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave [SARS-CoV]) y SARS-CoV-2) (11)

Hasta hace tan sólo dos décadas, los síntomas clínicos derivados de los coronavirus humanos patógenos (Betacoronavirus-1 subespecie HCoV-OC43 y AlphacoronavirusHCoV-229E) se asociaban, en su mayoría, a cuadros leves derivados de resfriados comunes o infecciones gastrointestinales, muy a menudo asintomáticas, que fueron considerados durante mucho tiempo de una importancia clínica modesta (12). No obstante, sí se habían producido casos graves o letales en animales, tales como: la infección neurológica grave asociada con hepatitis que acaba en desmielinización y parálisis, producida por el coronavirus murino (género



Betacoronavirus)(13); o distintas infecciones sistémicas inmunomediadas de evolución fatal, producidas por algunos miembros de la especie Alphacoronavirus 1 (coronavirus felino, canino y hurón).

En los últimos 20 años, sin embargo, han surgido dos nuevas especies de coronavirus que han ocasionado dos epidemias a gran escala, anteriores a la pandemia actual, acabando con este pensamiento previo:

1) El coronavirus responsable de la epidemia del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS-CoV1), un nuevo betacoronavirus que surgió en el sur de China (2002-2004) (14) y supuso el primer ejemplo del potencial devastador de los coronavirus humanos. Esta zoonosis, con su reservorio en los murciélagos, fue transmitida a los humanos por las civetas de las palmas, causando, tras ello, síntomas clínicos similares a los de la gripe, que en algunos casos se complicaba siendo potencialmente letales en forma de neumonía, linfopenia pronunciada, anomalías hepáticas y Síndrome de Distress Respiratorio Agudo (SDRA) (1).

2) El coronavirus responsable del brote del Síndrome Respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV), que se detectó por primera vez en Arabia Saudita en 2012 (15). Este virus, originado también en murciélagos, tiene como huésped intermedio el camello dromedario, y de forma similar al coronavirus del SARS, se manifiesta en forma de fiebre, disnea, dolor muscular y síntomas del tracto digestivo, que pueden progresar a una forma grave de la enfermedad, que afecta, con mayor probabilidad, a personas con comorbilidades.

Los análisis de secuenciación genética del nuevo SARS-CoV2 revelaron que este comparte un 79% de identidad de nucleótidos con el SARS-CoV-1 y un 51,8% de identidad con MERS-CoV(12). Así pues, a pesar de que los CoVH altamente patógenos

se han convertido en un problema de forma relativamente reciente, la pandemia actual de la COVID-19 no es la primera gran amenaza microbiológica para los humanos, ni tampoco será la última.

### **3. NUEVO CORONAVIRUS: SARS-COV2**

#### **A. VIROLOGÍA DEL SARS-COV2**

Ante el actual brote de la enfermedad respiratoria aguda asociada al coronavirus 2019 (COVID-19), el Coronaviridae Study Group (CSG) del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) evaluó la ubicación del patógeno humano, tentativamente denominado 2019-nCoV, dentro del Coronaviridae. Según la filogenia, la taxonomía y la práctica establecida, el CSG reconoce que este virus forma un clado hermano del prototipo del coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo humano y de murciélago (SARS-CoV), y lo designa como SARS-CoV2, ya que la secuenciación del genoma completo y el análisis filogenético indicó que es un betacoronavirus del mismo subgénero que el primero, pero en un clado diferente. El MERS, por su parte, parece tener una relación más lejana<sup>(4)</sup>.

#### **B. EPIDEMIOLOGÍA DEL SARS-COV2**

- **Vías de transmisión**

El principal medio de transmisión del SARS-CoV2 es la transmisión directa de persona a persona mediante la inhalación de las gotas y aerosoles respiratorios emitidos por un enfermo hasta las vías respiratorias superiores e inferiores de una persona susceptible (16,17). Otra posible vía de transmisión sin un papel primario, es la transmisión a través



de fómites mediante el contacto de las membranas mucosas de personas susceptibles con superficies contaminadas (18).

Por otra parte, aunque se ha detectado material genético de SARS-CoV2 en muestras no respiratorias, incluídas heces, sangre, secreciones oculares y semen, a día de hoy el papel de estos lugares como potenciales focos de transmisión sigue siendo incierto (51). Igualmente, no hay evidencia que sugiera que los animales sean una fuente importante de infección en los seres humanos, aunque no por ello hay que restarle importancia. Se han informado brotes en granjas de visones en Europa y en los Estados Unidos, y en este entorno, se han descrito casos sospechosos de transmisión de visones a humanos. El contacto del virus con otras especies animales puede introducir nuevas variantes en los humanos que resulten en modificaciones de transmisibilidad o virulencia y en una disminución de la eficacia del tratamiento y de la vacuna (52).

Respecto al posible riesgo de transmisión vertical del SARS-CoV2, aun no está claro, evidenciándose hasta la fecha unos pocos casos bien documentados de infecciones placentarias en recién nacidos que sugieren una probable transmisión en el útero, aunque poco común (21). Respecto a la transmisión a través de la leche materna, sólo se ha podido detectar RNA en la leche, no virus viables y en los casos detectados no se ha podido descartar la transmisión por contacto (22).

- **Periodo de transmisión o infectividad**

Se estima que el potencial de transmisión de SARS-CoV2 al inicio de la pandemia comenzaba hasta dos días antes del desarrollo de los síntomas, con poca probabilidad de contagio a partir de los 7-10 días, sobre todo en pacientes inmunocompetentes con infección no grave; mientras que en los casos más graves y de mayor edad el periodo de contagio era mayor, observándose una duración más intensa y duradera de la

eliminación del ARN viral. No obstante, durante la evolución de la pandemia han aparecido nuevas variantes, como la omicron, con más de 30 mutaciones en la proteína Spike, que se han asociado con cambios en su periodo de infectividad (23), y con un aumento de su transmisión en el periodo presintomático, hasta 12 veces mayor respecto a las primeras variantes, que justifica la disminución de la eficacia de las medidas preventivas de control iniciadas ante la aparición de síntomas (24).

- **Riesgo de exposición**

El tipo de exposición que entraña mayor riesgo de contagio frente al SARS-CoV2, es un contacto directo y prolongado, en ambientes cerrados como el hogar o en entornos colectivos, que se hace mayor cuanto más cercano y duradero sea (23). En cuanto al riesgo dependiente de la presencia de ARN viral en las secreciones respiratorias de la persona infectada, se ha observado que los infectados presentan en su mayoría una alta carga viral antes del inicio de los síntomas y en los primeros días de la aparición de la clínica, con un tiempo de desaparición posterior dependiente de la gravedad del curso clínico. Mientras que en los pacientes con una infección leve prácticamente desaparece antes del día 10 (25), en personas graves, con valores hasta 60 veces superior de carga viral, el tiempo hasta su desaparición puede ser más duradero (26).

### C. VARIANTES DEL NUEVO CORONAVIRUS

Una variante es un genoma viral que puede contener una o más mutaciones. La tasa estimada de mutación del SARS-CoV2 es similar a la de otros virus del orden de los Nidovirales, aunque evoluciona más lentamente que otros virus ARN conocidos, como el de la gripe o el VIH, situándose su tasa de evolución aproximada en dos cambios de nucleótidos al mes. Así, el SARS-CoV2 ha cambiado desde su aparición de forma



constante, acumulando mutaciones en su código genético cada vez que se replica en su transmisión persona-persona, lo que ha dado lugar a la aparición continua de nuevas variantes desde el inicio de la pandemia.

El peligro de esto, es que aunque la mayoría de las mutaciones en las nuevas variantes no afectan a la función viral, algunos cambios, sin embargo, como aquellos que se dan en la secuencia de la proteína Spike, sí pueden afectar a las propiedades del virus, tales como: la facilidad con la que se propaga, la gravedad de la enfermedad asociada o el rendimiento de las vacunas, los tratamientos farmacológicos, las herramientas diagnósticas u otras medidas sociales y de salud pública (27).

Ante este posible riesgo, se promovió la creación de distintas iniciativas a nivel nacional e internacional para la detección de las distintas variantes de COVID-19 (28), y se impulsó la caracterización de lo que hoy en día se conoce como Variantes de Interés y Variantes de Preocupación, o también denominadas por sus siglas en inglés como VOI (Variants of Interest) o VOC (Variants of Concern), respectivamente. Consideramos VOC a aquellas variantes que pueden tener un impacto significativo en la situación epidemiológica de nuestro país y para las que existen evidencias de un posible incremento en la transmisibilidad, la gravedad de la enfermedad y/o el escape a la respuesta inmunitaria. Consideramos VOI a aquellas que, con una probabilidad menor, podrían también tener un impacto en la situación epidemiológica en España o para las que existen indicios de un incremento en la transmisibilidad, la gravedad y/o el escape a la respuesta inmunitaria con un grado menor de certeza (29).

Respecto a la nomenclatura de estas variantes, en la actualidad el Grupo de trabajo de la OMS ha recomendado el uso de letras del alfabeto griego, es decir, Alpha, Beta,

Gamma, Delta, Omicron, etc. que serán más fáciles y prácticas para ser discutidas por audiencias no científicas (29).

Así mismo, cada variante del SARS-CoV2 tiene, a su vez, distintos linajes, causantes todos ellos de la COVID-19. Un linaje es un grupo de virus estrechamente relacionados con un ancestro común. Para entenderlo, debemos imaginar el árbol filogenético del SARS-CoV2 como un árbol genealógico en donde se expresan todos los parientes que se desprenden del virus, de forma tal, que cada una de las ramas que surgen directamente de él son denominados linajes (designados para identificarlos con una serie de números y una letra del abecedario, considerando su orden de aparición y su composición genética). Así, por ejemplo, la variante Omicron, dominante en España en el momento de la elaboración de este manuscrito, comprende cinco linajes (BA.1, BA.2, BA.3, BA.4 y BA.5). Las mutaciones que definen estos linajes se han relacionado con el grado de evasión a la respuesta inmunitaria y por el momento no existen indicios de que ninguno de estos linajes se relacione con una mayor gravedad (30).

De esta manera, se espera que sigan surgiendo nuevas variantes de SARS-CoV2, algunas de las cuales surgirán y desaparecerán, mientras que otras surgirán y continuarán extendiéndose, pudiendo reemplazar a las variantes anteriores. La introducción de la vacuna ha generado otras posibilidades, como la producción de mutaciones de escape o que el virus pueda llegar a desaparecer por la presión de la vacuna (30).

#### **D. RECEPTOR PRINCIPAL EN LA CÉLULA HUÉSPED DEL SARS-COV2**

Entendiendo la similitud filogenética mencionada del SARS-CoV2 con el SARS-CoV, podemos entender que el receptor del huésped para la entrada en las células de ambos



virus sea el mismo. Se trata de la enzima convertidora de angiotensina 2 o ACE2, la cual, se expresa principalmente en las células epiteliales de las vías respiratorias y en las células endoteliales vasculares, aunque también se encuentra en varios tejidos asociados como el tracto gastrointestinal (GI), el sistema cardiovascular y el cerebro. De esta manera, el SARS-CoV-2, a través del dominio de unión al receptor de su proteína Spike (S), se une a ACE2 como receptor de la célula diana del huésped, en sinergia con la enzima serina proteasa 2 transmembrana (TMPRSS2), y se inicia, con ello, el ciclo de replicación viral en la célula diana. Esta unión justifica la afinidad del virus principalmente por las células epiteliales de los tejidos mencionados y, consiguientemente, su expresión clínica habitual en forma de infecciones gastrointestinales y respiratorias, que pueden ser agudas, o crónicas con la diseminación prolongada del virus. No obstante, la expresión de este receptor no es homogénea. La mayor concentración de receptores ACE2 y TMPRSS2 se encuentra en las células ciliadas de la mucosa nasal, mientras que ésta es un 80% inferior en la tráquea, los bronquios y el tejido pulmonar; lo que se ha correlacionado de forma directa, a su vez, con la capacidad del SARS-CoV-2 de infectar las células a lo largo del tracto respiratorio (31).

#### **E. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DEL SARS-COV2**

El espectro clínico de la COVID-19 varía, según los estudios y el momento de la pandemia considerado, desde formas asintomáticas, documentadas en un 33-50% de los infectados (32), hasta formas sintomáticas con desarrollo de neumonía como manifestación grave más frecuente, en el 3,9-14% de los casos, o de enfermedad crítica (con insuficiencia respiratoria, shock o disfunción multi-orgánica) en el 0,4-5% (33).

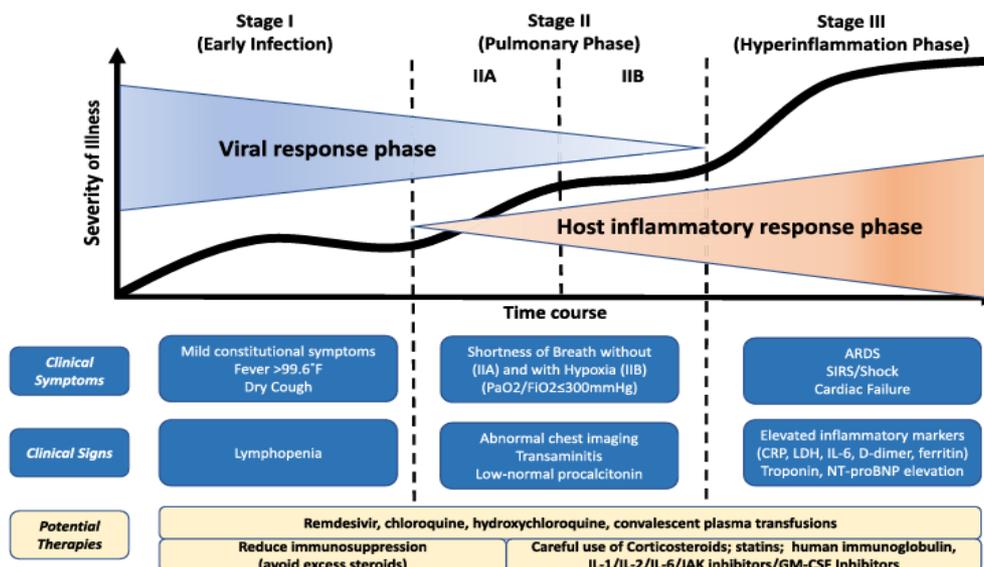
Entre los pacientes con COVID-19 sintomático, la tos, las mialgias y el dolor de cabeza son los síntomas más frecuentemente descritos al inicio, seguido de la diarrea, el dolor de garganta y las anomalías en el olfato o el gusto; pudiendo afectar además, a otra gran cantidad de órganos y sistemas con síntomas variados neurológicos, cardiológicos, oftalmológicos, otorrinolaringológicos, dermatológicos y hematológicos, con un aumento de los fenómenos trombóticos asociados. Los estudios de autopsia han observado ARN del SARS-CoV-2 detectable en los riñones, el hígado, el corazón, el cerebro y la sangre, además de muestras del tracto respiratorio, lo que sugiere que el virus se disemina sistémicamente en algunos casos (34).

Una vez el paciente desarrolla síntomas, el curso evolutivo de la enfermedad podría dividirse en tres fases según el espectro de gravedad que alcance el paciente (**Figura 2**):

(I) Fase de infección inicial: implica el periodo de replicación viral que va desde la incubación y los primeros días de inicio de los síntomas. Suele haber una sintomatología leve, y a menudo no específica, como malestar general, cefalea, mialgias y tos seca. Durante este periodo, el SARS-CoV2 se multiplica principalmente en el sistema respiratorio, aunque puede afectar a múltiples órganos como el endotelio, riñón, tracto digestivo, etc; (II) Fase pulmonar: en la que la multiplicación viral y la inflamación localizada en el pulmón es la norma, desarrollando los pacientes una neumonía viral con tos, fiebre y, posiblemente hipoxia (definida como una  $PaO_2/FiO_2$  de  $<300$  mmHg), con imágenes en la radiografía de tórax que revelan infiltrados bilaterales u opacidades en vidrio esmerilado; (III) Fase grave o de hiperinflamación: a la que pasará una minoría de pacientes con COVID-19, y que se manifiesta como un síndrome de hiperinflamación sistémica extrapulmonar. En esta etapa, los marcadores de inflamación sistémica están marcadamente elevados (particularmente, la interleucina



(IL)-2, IL-6, IL-7, factor estimulante de colonias de granulocitos, la proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa, el factor de necrosis tumoral-alfa, la proteína C reactiva, la ferritina y el dímero D), así como también se encuentran niveles elevados de LDH, transaminasas hepáticas, troponinas y péptido natriurético de tipo NT-proBNP; con disminución asociada de la albúmina, las plaquetas, así como de los recuentos de células T colaboradoras, supresoras y reguladoras que se refleja en una linfopenia marcada. La linfopenia es un hallazgo que se observa hasta en el 90% de las series de pacientes hospitalizados por COVID-19 (35). También se ha descrito un síndrome inflamatorio multisistémico con características similares a la enfermedad de Kawasaki y al síndrome de shock tóxico en niños con COVID-19. En los casos raros en los que se ha informado en adultos, este síndrome se ha caracterizado por marcadores inflamatorios marcadamente elevados y disfunción multiorgánica (en particular, disfunción cardíaca) (36).



**Figura 2 (35):** Clasificación de los estadios patológicos de la COVID-19.

En cuanto al tiempo de recuperación de la COVID-19, es muy variable y depende de la edad, las comorbilidades preexistentes, así como de la gravedad de la enfermedad. Se espera que las personas con infección leve se recuperen con relativa rapidez (en torno a dos semanas de media), mientras que aquellas personas con una forma grave de la enfermedad tardan más en recuperarse (en torno a dos o tres meses de media) (37).

Sin embargo, los datos sugieren que incluso los pacientes con enfermedad menos grave que nunca fueron hospitalizados, a menudo han informado síntomas prolongados y persistentes, pasadas 4 e incluso 12 semanas tras el primer episodio de COVID-19, independientemente de la gravedad de éste. La OMS ha definido por consenso esta entidad como condición post COVID-19, también conocido como COVID persistente. Los síntomas y signos referidos por las personas que padecen la condición post COVID-19 son extremadamente numerosos y variados, lo que añade complejidad al síndrome en cuanto a su diagnóstico y su requerimiento de atención sanitaria de carácter multidisciplinar. Los síntomas descritos más frecuente por aparatos y sistemas, se describen en la **Tabla 1** (38). En esta definición no se contempla que los casos tengan un periodo libre de enfermedad, aunque de forma característica la clínica es fluctuante.

Igualmente se han descrito múltiples secuelas derivadas de la COVID-19 con evidencia de daño órgano-específico más allá de las 12 semanas tras el inicio del cuadro de COVID agudo (entre las que se incluyen secuelas pulmonares, neuropsiquiátricas, cardiovasculares, hematológicas, renales y endocrinas, entre otras), aunque continúa sin quedar clara en muchas definiciones a nivel internacional la diferencia con la condición post COVID-19, por lo que frecuentemente los estudios superponen unas entidades con otras (39).



<b>Aparato/Sistema</b>	<b>Síntomas</b>
<b>Sistémicos</b>	Cansancio, fiebre vs febrícula*, debilidad, sofocos, sudoración, exacerbación tras el esfuerzo*, pérdida ponderal
<b>Neurológicos</b>	Deterioro cognitivo*, mareo*, pérdida de memoria, “niebla mental”*, alteraciones del lenguaje, alteraciones de la sensibilidad (parestias*), trastornos del sueño*, cefaleas*, alteraciones del gusto o/y olfato*, alucinaciones, visión borrosa*, cuadros confusionales, parálisis facial, disautonomía
<b>Psiquiátricos</b>	Ansiedad*, bajo estado de ánimo, depresión*, trastorno de estrés post-traumático
<b>Cardiovasculares</b>	Ritmo cardiaco sobre todo taquicardias*, presión arterial elevada, varices, trombos, dolor torácico* tipo angor
<b>Dermatológicos</b>	Picores, urticaria, exantemas, cambios en la piel y uñas, alopecia, pernio, nuevas alergias*
<b>Gastrointestinales</b>	Dolor abdominal*, molestias/dispepsia, reflujo*, intestino irritable, anorexia, diarrea*, estreñimiento*, disfagia
<b>Pulmonar</b>	Disnea*, tos* seca, estornudos, alteración de la saturación de oxígeno
<b>Otorrinolaringo- y oftalmológicos</b>	Parálisis facial, ojos secos, visión borrosa, dolor de garganta, disfonía, acúfenos*, vértigo
<b>Genitourinarios y endocrinos</b>	Alteraciones menstruación*, relaciones sexuales, función urinaria-vejiga hiperactiva, debut diabético y alteraciones en tiroides
<b>Inmunológicos y autoinmunes</b>	Aparición de nuevas respuestas inmunes o aumento de las existentes, nuevas alergias/intolerancias a alimentos o fármacos
<b>Musculo- esqueléticos</b>	Dolores osteomusculares y articulares*, espasmos musculares*, presión torácica, debilidad muscular, sarcopenia

**Tabla 1 (40):** Clasificación de síntomas de COVID persistente por aparatos y sistemas.

*\*Síntomas incluidos en el anexo 2 de la definición de consenso de la OMS*

## **F. EFECTIVIDAD DE LA RESPUESTA INMUNITARIA FRENTE AL SARS-COV2**

Los principales pilares que determinan la efectividad de la respuesta inmunitaria antiviral frente a SARS-CoV2 son: (1) los anticuerpos neutralizantes (NAbs), que evitan que el virus infecte las células, (2) los linfocitos T citotóxicos y las células NK, que pueden eliminar selectivamente las células infectadas y (3) los linfocitos T colaboradores CD4+ foliculares específicos frente al virus, que tienen un papel

coordinador y son necesarias para generar la reacción de centro germinal específica que produce células B memoria y células plasmáticas productoras de anticuerpos (41).

Así pues, mientras que el componente celular aporta una respuesta inmunitaria efectiva una vez el paciente se infecta del virus, especialmente frente a la enfermedad grave; el componente humoral, representado principalmente por los NAbs, entre los que destacan los anticuerpos que se dirigen a la región de la proteína S que se une a las células humanas (RBD, por sus siglas en inglés de Receptor Binding Domain) (42), impide que el virus pueda infectar las células.

Según los estudios realizados hasta la fecha, entre el 90-99% de las personas infectadas por SARS-CoV2 desarrollan anticuerpos neutralizantes en las 2-4 semanas siguientes a la infección, mientras que una pequeña proporción de individuos no desarrolla Nab por razones desconocidas (43). No obstante, el factor que, en fecha actual, más se relaciona con una protección efectiva y duradera es la inducción de una respuesta inmunitaria celular de memoria, mientras que los títulos bajos o negativos de anticuerpos no son indicativos de agotamiento de la respuesta humoral. Esto es debido a la larga vida de las células B memoria y de las células plasmáticas que se generan en la primoinfección, que volverán a producir anticuerpos de forma rápida (en menos de 48 horas) tras una reinfección. De hecho, para muchos autores, la presencia en la médula ósea de células plasmáticas de larga duración que secretan anticuerpos constituiría el mejor predictor disponible de inmunidad de larga duración (44).

- **Riesgo de reinfección frente a SARS-CoV2**

El riesgo de reinfección frente a SARS-CoV2 cambia según el tipo de variante considerada y según el estado de vacunación de la persona afectada.



En personas no vacunadas al inicio, antes de la aparición de la variante Omicron, se estimó que el riesgo de reinfección a corto plazo era bajo; con hasta un 90% de protección frente a reinfección a los 7 meses, que disminuía al 50% en personas mayores de 65 años (45). No obstante, tras la aparición de Omicron el riesgo de reinfección aumentó (46). Respecto a la protección frente a gravedad de las reinfecciones en no vacunados, algunos estudios sugieren que estas son más leves que las infecciones iniciales, sin constar casos de enfermedad crítica o muerte en el grupo de reinfección (47). Sin embargo, no todas las reinfecciones han sido menos graves que la primoinfección, y se han notificado casos más graves que la infección inicial, así como reinfecciones fatales (48).

Por su parte, con la introducción de la vacuna, el riesgo de reinfección frente a SARS-CoV2 disminuyó y la protección frente a gravedad fue mayor, aunque los datos de efectividad vacunal divergen según hablemos de vacunas de ARNm o vacunas vehiculizadas por adenovirus. En cuanto a la protección del riesgo frente a infección, sería del 90-93% en el primer grupo vs 77-92% para el segundo grupo a los 7-14 días; mientras que ambos tipos de vacunas tienen valores similares de protección frente a hospitalización (77-92% pasados los 4 meses en el primer grupo, vs 81-94% pasado el mes en el segundo grupo). No obstante, se ha visto que en estudios realizados a más largo plazo, de 4 a 9 meses después de la vacunación, la efectividad vacunal inicial frente a infección disminuye progresivamente para todos los tipos vacunales a valores que oscilan entre el 54-65%, lo que se relaciona, a su vez, con la aparición y posterior circulación predominante o casi exclusiva de nuevas variantes como la Omicron, con sus distintas cepas o linajes. Sin embargo, se mantiene hasta el momento un grado de protección similar a largo plazo frente a hospitalización en población no vulnerable (del 90,7%), aunque éste también se reduce principalmente en la población con

inmunosupresión asociada (con valores de reducción de hasta el 53,1% según patología de base y periodo de tiempo estudiado) (49)(50).

En consecuencia, debido a que ninguna de las vacunas actuales tiene una efectividad vacunal frente a la infección por SARS-CoV2 del 100% (51), ninguna ha logrado lo que se denomina inmunidad estéril (ausencia de replicación del virus en la mucosa de las vías respiratorias superiores del sujeto) (52). Por tanto, continúan existiendo personas vacunadas infectadas que transmiten la infección, y mientras continúe el contagio sigue habiendo riesgo de aparición de nuevas variantes de importancia para la salud pública en la que las vacunas existentes hasta la fecha podrían dejar de ser efectivas.

#### **G. DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN ACTIVA DEL SARS-COV2**

La detección de ARN viral del SARS-CoV-2 mediante RT-PCR (siglas de Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa) en exudado nasofaríngeo u orofaríngeo es la prueba inicial microbiológica de referencia en la que se ha basado el diagnóstico de infección activa, tanto en pacientes sintomáticos como asintomáticos; ya que es una prueba muy sensible y específica (53). Un inconveniente de esta prueba, no obstante, es que tiene un tiempo de espera de resultado en condiciones óptimas de 12 a 24 horas, que en los picos de demanda puede retrasar la aplicación de medidas de control. Al mismo tiempo, su sensibilidad depende de la carga viral de las vías respiratorias, que a su vez depende del tipo y la calidad de la muestra obtenida (54).

Otra de las pruebas utilizadas es la detección de antígenos en muestras del tracto respiratorio superior (Rapid Antigen Diagnostic Test, RADT). Una técnica capaz de detectar proteínas del virus a través de inmunocromatografía de difusión, en su mayoría,

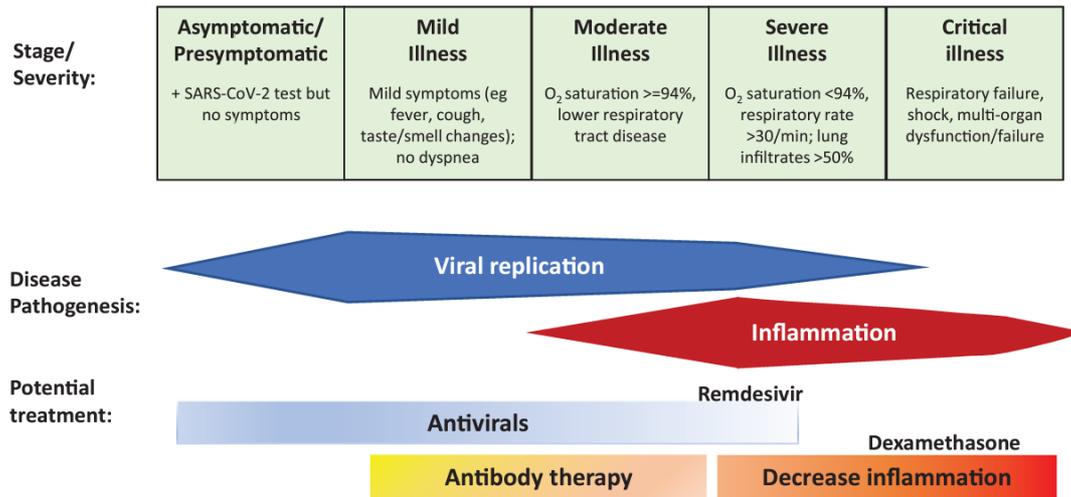


que conlleva como principal ventaja la de proporcionar un diagnóstico de infección activa rápido (15-20 minutos) en el lugar de atención sanitaria y mediante un procedimiento sencillo y de bajo coste, permitiendo con ello iniciar las acciones de control de forma inmediata. No obstante, su principal limitación es su menor sensibilidad respecto a la primera, que implica que un resultado negativo de la prueba requiera la confirmación con pruebas adicionales más sensibles.

Las nuevas variantes del SARS-CoV-2 identificadas a nivel mundial tienen mutaciones en la proteína Spike que afectan a la capacidad de las pruebas de amplificación del ácido nucleico (NAAT) del SARS-CoV-2 para detectar el gen S que codifica la proteína. No obstante, la mayoría de las NAAT seguirán detectando el ARN del SARS-CoV-2 porque han sido diseñadas para detectar más de un gen diana. En el caso de la prueba de detección de antígeno, estas mutaciones tienen todavía menos repercusión en su capacidad diagnóstica, ya que la mayoría de las pruebas de antígeno se dirigen a la proteína de la nucleocápside. No obstante, ante la aparición de la variante Omicron, que tiene significativamente más mutaciones que las variantes anteriores de SARS-CoV2, tanto en su gen S como en su gen N, los primeros datos sugieren que las pruebas de antígeno podrían tener una sensibilidad más reducida (55).

## **H. TRATAMIENTO DEL SARS-COV2**

El tratamiento de la COVID-19 depende de la gravedad de las manifestaciones clínicas del paciente. Así pues, según la patogenia de COVID-19, es más probable que los enfoques dirigidos al virus en (p. Ej., Antivirales, anticuerpos monoclonales) funcionen al principio del curso de la infección, mientras que los enfoques que modulan la respuesta inmunitaria, suprimiendo la inflamación generada, puedan tener más impacto en etapas posteriores de la enfermedad (**Figura 3**) (56).



**Figura 3** (57). Objetivos de los tratamientos de COVID-19 por etapa de infección.

- **Tratamiento en pacientes ambulatorios**

La elegibilidad del paciente para el tratamiento ambulatorio de la COVID-19 depende de la clínica y del riesgo de progresión a una enfermedad grave. Actualmente se están desarrollando modelos para predecir la probabilidad de enfermedad crítica en pacientes hospitalizados con COVID-19, pero ninguno ha sido validado para la evaluación y manejo de los pacientes ambulatorios (58).

En aquellos pacientes con COVID-19 sintomático temprano, especialmente en los que tengan mayor riesgo ( $>$ 65 años y con comorbilidades), se está intentando tratar de forma precoz con antivirales (remdesivir y paxlovid) y/o Ac monoclonales (debiendo valorarse su uso en cada momento, ya que se recomiendan sólo si son activos frente a las variantes circulantes) para evitar la progresión a enfermedad grave.

- **Tratamiento en pacientes hospitalizados**



Los datos de los ensayos sugieren un beneficio en la mortalidad con corticoides, así como con tocilizumab (bloqueador del receptor de IL-6), y un posible beneficio clínico con remdesivir (59). Respecto al posible beneficio clínico de otras terapias, parece que los anticuerpos monoclonales hasta el momento no demuestran un beneficio en los resultados de los ensayos disponibles en la mayoría de los pacientes hospitalizados. Sin embargo, los datos preliminares sugieren que podrían tener un papel en pacientes hospitalizados por COVID-19 grave o crítico, >12 años, inmunodeprimidos y seronegativos para SARS-CoV2 (indicación por la AEMPS).

#### **I. FACTORES DE RIESGO DE ENFERMEDAD GRAVE EN LA COVID-19**

La gravedad de una enfermedad depende de diferentes factores: por una parte, factores intrínsecos de la persona (vulnerabilidad) y del agente causal (virulencia) y, por otra, de otros factores extrínsecos que podrían modificar la historia natural, de forma especial la efectividad vacunal. Un fenómeno que ha generado gran confusión desde la aparición de este nuevo coronavirus, es por qué algunas personas padecen una enfermedad grave o incluso crítica, mientras que otras sólo muestran síntomas clínicos leves, siendo el pronóstico tan heterogéneo.

Respecto a los factores individuales que influyen en el curso evolutivo de la COVID-19 en base a una gran variedad de estudios, se ha visto que aquellos pacientes con sistemas inmunitarios competentes y sin factores de riesgo obvios, pueden generar respuestas inmunitarias efectivas y adecuadas para suprimir el virus en la primera o segunda fase, sin una reacción inmunológica excesiva. Mientras que, en contraste, los pacientes con edad avanzada y comorbilidades (**Tabla 2**) (60), entre otros, pueden tener un mayor riesgo de disfunción inmunitaria en la fase inicial y convertirse en el tipo grave o crítico y, por ende, cursar con mayor mortalidad; aunque aun queda mucho por investigar en

este campo para poder perfilar mejor a aquellos pacientes de riesgo de evolucionar a una forma grave de la enfermedad (61).

Nivel de evidencia	Afección médica subyacente
<b>Alto riesgo de asociación a COVID-19 grave</b>	Bronquiectasias
	EPOC
	Fibrosis quística
	Hipertensión pulmonar y embolia pulmonar
	Tuberculosis
	Enfermedad cerebrovascular
	Enfermedad cardiovascular
	Enfermedad renal crónica
	Enfermedad hepática crónica
	Cáncer
	Diabetes Mellitus
	Sd Down
	Virus de Inmunodeficiencia adquirida
	Inmunodeficiencias primarias
	Afecciones de salud mental
	Obesidad
	Embarazo actual y reciente
	Inactividad física
	Tabaquismo actual y previo
	Transplante de órgano sólido
Transplante células madre hematopoyéticas	
Tratamiento con corticoides/inmunosupresores	
<b>Sugestivas de alto riesgo de COVID-19 grave</b>	Talasemia
	Anemia drepanocítica
	Exceso de peso
	Trastorno por abuso de sustancias
	Niños con ciertas condiciones subyacentes
<b>Asociación no concluyente a COVID-19 grave</b>	Déficits de alfa 1 antitripsina
	Asma
	Displasia broncopulmonar
	Hepatitis B
	Hepatitis C
	Hipertensión arterial

**Tabla 2 (60):** Patologías subyacentes que aumentan el riesgo de COVID-19 grave.



Se han propuesto varias herramientas de predicción para identificar a los pacientes que tiene más probabilidades de tener una enfermedad grave según características epidemiológicas (como los antecedentes socioeconómicos, la etnia o el sexo), clínicas y de laboratorio (**Tabla 3**) (62); sin embargo, la mayoría de los estudios que evalúan estas herramientas están limitados por el riesgo de sesgo y no se han validado adecuadamente para su aplicación clínica (63–65).

<b>Parámetros de laboratorio en COVID-19 grave</b>
• Anemia
• Leucocitosis
• Neutrofilia
• Trombopenia
• Linfopenia
• ↑ Proteína C Reactiva (PCR)
• ↑ Velocidad de Sedimentación Globular (VSG)
• ↑ Interleuquina 6 (IL-6=
• ↑ ferritina sérica
• ↑procalcitonina
• ↑ Tiempo Protrombina (TP)
• ↑ Dímero D
• ↑ Troponina c
• ↑ Mioglobina
• ↑ Creatin fosfoquinasa miocárdica (CPK-MB)
• ↑ Creatin quinasa (CK)
• ↑ Lactato deshidrogenasa (LDH)
• ↑Creatinina
• ↑Nitrógeno ureico en sangre (BUN)
• ↑Bilirrubina total
• ↓ Albúmina
• ↓ Prealbúmina

**Tabla 3** (62): Parámetros analíticos de COVID-19 asociados a gravedad y/o mortalidad.

Respecto a los factores virales, en distintos estudios se ha visto que los pacientes con enfermedad grave tienen niveles más altos de ARN viral en sangre que aquellos con enfermedad más leve; así como niveles más altos de ARN viral en muestras respiratorias. Así, se ha identificado la carga viral del SARS-COV2 como un marcador pronóstico de mortalidad en distintos estudios (66–68) mientras que otros ofrecen resultados contradictorios al respecto (69).

Por último, la vacunación contra la COVID-19 reduce sustancialmente el riesgo de enfermedad grave, existiendo un punto claro de inflexión a partir de la vacunación, que ha reducido drásticamente las tasas de hospitalización e ingreso en UCI en los grupos etarios con altas coberturas vacunales (70).

La evidencia sobre estos factores de riesgo específicos proviene de una variedad de estudios, incluidos metanálisis, revisiones sistemáticas, estudios de cohortes observacionales individuales y series de casos, en los que los pacientes con estas afecciones subyacentes tenían tasas más altas de enfermedad grave y muerte (71). Sin embargo, es importante tener en cuenta que, aunque los pacientes de mayor edad, inmunodeprimidos, no vacunados o con afecciones médicas crónicas mal controladas tienen un mayor riesgo de hospitalización y muerte, la infección por SARS-CoV-2 puede causar una enfermedad catastrófica en cualquier paciente, incluso entre aquellos jóvenes sin factores de riesgo conocidos hasta la fecha. Por consiguiente, actualmente, la predicción del resultado en la COVID-19 sigue siendo un desafío y continúa la búsqueda de predictores más sólidos.

En este sentido, comprender cómo el sistema inmunológico orchestra sus respuestas en este espectro de gravedad de la enfermedad es una cuestión fundamental necesaria para



diseñar estrategias terapéuticas nuevas y optimizadas (72). Así, se convierte en un objetivo prioritario de las investigaciones en curso el estudio de las características inmunológicas asociadas con la gravedad de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) en estos pacientes.

#### **J. CARACTERÍSTICAS INMUNOLÓGICAS ASOCIADAS A LA COVID-19 GRAVE**

Se han realizado diversos estudios hasta la fecha que analizan perfiles inmunológicos asociados a pacientes graves o fallecidos por COVID-19, ya que el repentino deterioro clínico 7-8 días después del inicio de los síntomas iniciales, sugiere que la insuficiencia respiratoria grave en COVID-19 es impulsada por un patrón único de disfunción inmunológica.

El sistema inmunológico es fundamental para defender y eliminar el virus y las células infectadas, debiendo funcionar con precisión para permitir la eliminación del patógeno, al tiempo que protege a nuestro cuerpo del daño relacionado con su activación. Sin embargo, en muchos casos este “equilibrio perfecto” no se logra, tal como sucede en los casos graves de COVID-19. Existe una necesidad urgente de centrarse en la disregulación inmunitaria subyacente al COVID-19 (73).

En base a los conocimientos disponibles hasta el momento, parece claro que el sistema inmunológico innato del huésped juega un papel significativo en la inmunopatología de la COVID-19, asociándose la enfermedad grave a cambios en la actividad inmunitaria periférica que constituyen indicadores clínicos precoces de gravedad; tales como: (1) las concentraciones plasmáticas de citocinas inusualmente altas (TNF-alfa, IL6, IL8 e IL10), junto con (2) una marcada linfopenia precoz, de mayor magnitud en los casos de evolución más grave (74). No obstante, actualmente, todavía sabemos poco sobre cómo el SARS-CoV-2 precipita una linfopenia tan grave en un período de tiempo tan corto.

Los linfocitos son componentes centrales del sistema inmunológico para luchar contra la intrusión de virus, destacando el papel en especial, dentro de estos, de las células T CD8+ y las células NK, que desempeñan una función vital en la eliminación de los virus al mediar la inmunidad celular y la función citotóxica contra los mismos. Estudios emergentes sobre COVID-19 informan que la disminución progresiva de los linfocitos periféricos se produce principalmente a expensas de estos dos tipos celulares, siendo esto más evidente en los casos graves (UCI/ventilación no invasiva/ventilación mecánica). Por tanto, se cree que esta deficiencia celular podría retrasar la eliminación de la infección y contribuir significativamente a la patogénesis de la enfermedad (75,76).

Al comparar ambas poblaciones de linfocitos T CD8+ y NK en su capacidad predictora de evolución a la COVID-19 grave, se ha visto que las células NK tienen un mejor valor de sensibilidad (77,78%) y especificidad (100%) para ayudar en el diagnóstico de pacientes críticos con COVID-19 (75,76). Además, se observa una función citotóxica reducida de las NK en la COVID-19 grave, que se relaciona, a su vez, con la tormenta de citoquinas que caracteriza esta fase de la enfermedad, incluyendo un aumento marcado de la IL-6, que deriva en una mayor mortalidad y mayor riesgo de trombosis al perpetuar el “agotamiento funcional” de las células NK por agotamiento de su capacidad citolítica, conduciendo a la regulación defectuosa de su respuesta. Esta teoría se respalda en la restauración constatada del potencial citotóxico de las células NK tras la terapia biológica anti-IL6 (77). Así, las células NK, en combinación con los niveles de IL 6 y de neutrófilos, tienen la mayor precisión (con 75% de sensibilidad y 95% de especificidad), según distintos estudios, para predecir la progresión de la infección por SARS-CoV2 (78).



Basándonos en estos hallazgos, adquiere un gran interés: (1) estudiar la variación en el número y la función de las células NK durante la infección por SARS-CoV-2, correlacionándola con la gravedad de su presentación clínica y con su resultado evolutivo final (79), así como (2), dilucidar las implicaciones funcionales de esta observación.

#### **4. LAS CÉLULAS NATURAL KILLER (NK)**

##### **A. INTRODUCCIÓN**

Las células NK, descritas por primera vez en 1975, son linfocitos innatos que se denominan históricamente por su capacidad para matar células diana de forma “natural”, sin una sensibilización previa, proporcionando respuestas rápidas contra células infectadas por virus, parásitos y ciertos tipos de bacterias, así como contra células tumorales (80). Las células NK se caracterizan por mostrar capacidad citotóxica espontánea independiente de señales coestimuladoras y sin receptores que hayan sufrido reordenamientos génicos, lo que las diferencia de los linfocitos B y T.

Tradicionalmente, se han considerado células inmunitarias innatas que median en respuestas inmunitarias inespecíficas independiente de antígeno, y constituyen la primera línea de defensa contra las infecciones virales, con un papel vital en su control. Su capacidad antiviral se ha constatado en numerosos estudios que demuestran que las deficiencias de células NK se asocian con una mayor susceptibilidad a infecciones virales en los seres humanos, tales como infecciones por citomegalovirus (CMV), virus de herpes simple (VHS), virus de Epstein-Bar (VEB) y virus varicela zoster (VZV) (81). En los últimos años, sin embargo, ha quedado bien establecido que las células NK desempeñan también un papel fundamental en la colaboración entre las respuestas

innata y adaptativa, al haberse constatado que pueden provocar una respuesta inmunológica más fuerte en la segunda exposición a un virus, generando respuestas que se asemejan a las características de memoria de los linfocitos adaptativos (12). Además, en el contexto de infecciones virales como el VIH o el VHC, también se ha comprobado que las células NK parecen actuar como un reóstato al eliminar las células T CD4+ y CD8+ activadas, contribuyendo así mismo al control de la autoinmunidad mediada por células T (82).

A todo lo expuesto previamente, se une la gran heterogeneidad de las células NK, tanto a nivel de población como a nivel de individuo, que les confiere una capacidad de respuesta única a las variaciones de los factores genéticos y ambientales, que afectan consiguientemente a la respuesta inmunitaria del huésped en las infecciones virales (83).

## **B. BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS NK: CONCEPTOS BÁSICOS**

Las células NK son linfocitos grandes granulares que se desarrollan en la médula ósea, distribuyéndose tras ello por los tejidos linfoides y no linfoides. Después del desarrollo, la mayoría de las células NK se encuentran en la sangre periférica como la tercera población de linfocitos mononucleares más abundante, después de las células B y T, constituyendo un 10-15% del total. Aunque en algunos tejidos como el hígado y el útero gestante constituyen una mayor proporción de linfocitos, donde pueden tener funciones especializadas. Además, las células NK también se encuentran en tejidos como piel, intestino, pulmón, hígado, órganos linfoides (bazo, ganglios linfáticos y timo), decidua uterina y tracto reproductor femenino(84).

- **Educación de las células NK**



Durante su desarrollo, las células NK pasan por un proceso denominado “licenciamiento o educación”, que implica la interacción entre receptores inhibidores de células NK (iNKR) y las moléculas HLA de clase I propias. A través de dicho proceso sólo aquellas células que expresan al menos un receptor inhibidor que reconozca las moléculas HLA de clase I en células sanas lograrán la maduración completa, mientras que aquellas células que carezcan de tales receptores permanecerán en estado de reposo. Estas señales son necesarias para prevenir la autorreactividad mediada por célula NK, ya que su capacidad de ejercer una actividad citolítica normal contra las células infectadas por virus o tumores está relacionada con su capacidad de detectar la reducción/ausencia de moléculas HLA de clase I propias (o ausencia del reconocimiento del yo propio), que implica la existencia de señales de “encendido” responsables de la activación de las células NK con la destrucción de la célula diana y la producción de citocinas. Con ello, se previenen reacciones autoinmunes, especialmente en un contexto inflamatorio en el que la función de las células NK puede ser regulada positivamente por la presencia de citoquinas y/o ligandos de los receptores activadores en los tejidos (85).

- **Función de las células NK**

Las células NK destacan por su función crítica contra las infecciones virales, además de proteger también frente a otras bacterias intracelulares, células tumorales y células estresadas por el daño del ADN. Al mismo tiempo, también están involucradas en una variedad de trastornos autoinmunes como impulsores de la inflamación patológica, y la evidencia emergente también demuestra que pueden regular los programas antiinflamatorios, como la reparación de tejidos (86).

La rápida respuesta de las células NK a los patógenos en la fase inicial de las infecciones virales, antes del desarrollo de respuestas inmunitarias adaptativas, se relaciona con su corta vida media útil, de tan sólo dos semanas, y con su rápida regeneración. Estas células NK pueden reclutarse rápidamente a los sitios de infección desde la circulación y tejidos periféricos, donde facilitan y aceleran la eliminación viral, con fenotipos y funciones complejas y variadas según el tejido (87).

De esta forma, las células NK contribuyen a la eliminación de patógenos directamente, mediante sus dos principales funciones efectoras: (a) la citotoxicidad de células que han sufrido transformación maligna o que se han infectado con un virus u otro patógeno intracelular, y (b) la secreción de citocinas; e indirectamente, mediante el mantenimiento de la homeostasis por regulación inmunitaria de las células presentadoras de antígeno y de las respuestas adaptativas de las células T (88). Para ello, las células NK no se someten a selección clonal, sino que expresan varios receptores codificados en la línea germinal que regulan su actividad.

Entre las funciones reguladoras de las células NK, se incluye: 1) la producción de citocinas como el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) que puede aumentar la expresión de HLA de clase I en las células diana y/o de HLA de clase II en las células presentadoras de antígeno, consiguiendo la estimulación eficaz de la inmunidad mediada por células T (89); y 2) las interacciones celulares por contacto directo receptor-ligando con diversos tipos de células (células mieloides, monocitos y macrófagos, células linfoides y células B, entre otros), destacando la interacción NK/célula dendrítica a través de la que la célula NK ejerce un control de calidad (la llamada edición de células dendríticas) mediante la destrucción de aquellas células dendríticas inmaduras que expresen bajas cantidades de moléculas HLA de clase I, eliminado con ello las células no aptas para



presentación adecuada de antígenos y la inducción de respuestas Th1 útiles (90). Con todo ello, se espera que las funciones efectoras de las células NK durante la fase temprana dicten el umbral, la dirección y el resultado de la respuesta inmunitaria.

Recientemente, además, se ha caracterizado que las células NK pueden no solo actuar como efectores innatos primarios, sino también como células accesorias dentro de la respuesta inmune adaptativa, tal como lo demuestra su capacidad de adaptación y memoria específica de antígeno sobre todo frente a infecciones virales (91). En concreto, al estudiar del papel de NK en la infección por CMV, se ha detectado un fenotipo de célula NK memoria ( $CD57^+ NKG2C^{high}$ ) con capacidad de expansión y activación a largo plazo, generando mayor protección frente a las reinfecciones (92).

- **Fenotipo de las células NK**

Fenotípicamente las células NK maduras se caracterizan por expresar CD16 (receptor Fc activador o FcγRIII) y CD56 (molécula de adhesión de células neurales o N-CAM1), en ausencia de CD3 (93). De manera que, en función de la expresión de los principales antígenos de diferenciación (CD) que presenten existen dos subpoblaciones principales de células NK maduras en sangre periférica que poseen funciones complementarias:  $CD56^{bright} CD16^-$  y  $CD56^{dim} CD16^{+/-}$ . Diferentes evidencias experimentales han establecido que  $CD56^{bright}$  representa una etapa temprana de maduración de las células NK periféricas, progresando en etapas posteriores de diferenciación a células NK  $CD56^{dim}$ . Estos dos subtipos de células NK se diferencian por el patrón de expresión de otros varios receptores de superficie celular.

- Linfocitos NK efectores o  $CD56^{dim} CD16^{+/-}$  (una pequeña proporción son  $CD16^-$ , pero en su mayoría expresan  $CD16^+$  y receptores  $KIR^+$ ): constituyen el 90% de los linfocitos NK en sangre periférica y tienen un predominio de acción citotóxica,

siendo más granulares a causa de los gránulos de perforina y granzima en su interior con los que ejercen su potente acción citotóxica al contacto con la célula diana. Se ha postulado que representan un estadio más maduro que las CD56<sup>bright</sup> en el desarrollo de las células NK, con expresión de NKG2A o KIR o ambos, y con una alta expresión de la molécula CD16 que interviene en la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (antibody dependent cell cytotoxicity, ADCC) (85). Al mismo tiempo, pueden secretar citoquinas y quimioquinas en menor cantidad que las células CD56<sup>bright</sup> en respuesta a ligandos solubles, aunque en mayor cantidad tras el contacto con las células diana (94).

- Linfocitos NK reguladores menos avanzados en el desarrollo, o CD56<sup>bright</sup> (los cuales no expresan CD16 y tienen baja expresión de receptores KIR): constituyen el 10% restante de las células NK en sangre periférica, siendo una población mayoritaria en tejidos linfoides secundarios y en zonas de inflamación donde producen grandes cantidades de citoquinas para favorecer el desarrollo de la respuesta inmunitaria. Estas células expresan NKG2A y son negativas para la mayoría de las moléculas KIR. Presentan un perfil inmunorregulador, con una alta producción de quimioquinas y citoquinas como IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-10 y GM-CSF en respuesta a la estimulación con IL-2, IL-12, IL-15 y/o IL-18. Hasta hace poco, se creía que su función, era regular la respuesta inmunitaria y de memoria al ser superiores en la producción de citoquinas, mientras que las células NK CD56<sup>dim</sup> se describían como un subconjunto de perfil más citotóxico. Posteriormente, se ha visto que las células NK CD56<sup>bright</sup> responden mejor a los factores solubles, mientras las células CD56<sup>dim</sup> reponden mejor a los receptores que se unen a ligandos anclados en otras células. No obstante, hasta la fecha la razón por la cual las células NK y las



células inmunitarias expresan CD56 sigue sin respuesta, y lo que sí parece claro es que existe una clara relación con el grado de activación, pudiendo usarse como un marcador de activación fenotípica. La expresión de CD56 aumenta con la activación (95)(96).

Mientras que las diferencias funcionales entre los dos subtipos de NK están relacionadas, al menos en parte, con la expresión diferencial de los receptores de citocinas (receptores de IL-2, IL-15 e IL-7) y de los receptores de NK funcionales; a su vez, las diferencias en su distribución tisular y en su capacidad de localización en los distintos tejidos dependen de los receptores de quimiocinas expresados. Así, mientras que el subconjunto CD56<sup>dim</sup> responde a las quimiocinas, IL-8 y CX3CL1 (fractalcina), determinando su migración hacia tejidos periféricos inflamatorios; las células NK CD56<sup>bright</sup>, son atraídas por CCL19 y CCL21 producidos por células presentes en órganos linfoides secundarios (87).

Igualmente, la proporción relativa en los tejidos de ambos subconjuntos de células NK CD56<sup>bright</sup> y CD56<sup>dim</sup> es muy diferente a la que se observa en sangre periférica. En particular, en individuos sanos las células NK CD56<sup>dim</sup> normalmente predominan en tejidos como la médula ósea, pulmón, bazo, tejido adiposo subcutáneo y tejido mamario, mientras que las células NK CD56<sup>bright</sup> constituyen proporciones mucho más altas del linaje total de NK en las zonas MALT (p. Ej. mucosa), hígado, útero, tejido adiposo visceral, glándula suprarrenal y riñón (97).

No obstante, es posible que las células NK CD56<sup>bright</sup> no sean el subconjunto de células NK más abundante en general, ya que numerosos informes recientes revelan una marcada heterogeneidad dentro de los tejidos debido a la presencia de células NK especializadas residentes en tejido (trNK) que comparten algunas características

inmunofenotípicas y funcionales con las células NK CD56<sup>bright</sup>, pero que por lo demás son diferentes (98). En base a dicha observación, se sugiere que estas células trNK comprenden colectivamente un subtipo genuino del linaje de células NK humanas que es distinto de los dos subtipos de células NK de sangre periférica, descritos originalmente.

Además, se ha descrito la presencia en sangre periférica de otras subpoblaciones de células NK, cuya relevancia funcional aún no está totalmente clara, destacando un nuevo grupo de células NK conocidas como las células NK “agotadas” CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> (que expresan en alta densidad el CD16) con propiedades disfuncionales debido a su baja función replicativa y su baja actividad citotóxica y de producción de citocinas, que aparecen expandidas en individuos ancianos sanos, pacientes infectados con el virus VIH-1 o el virus de la hepatitis C. Esta expansión se ha asociado con una infección crónica, altas cargas virales, altos niveles de receptores NK inhibitorios y bajos niveles de receptores NK activadores. Estudios en pacientes con VIH-1, han arrojado una mejora considerable en la citotoxicidad, la expresión de receptores NK, la secreción de citoquinas y en el restablecimiento de la expresión de CD56, cuando se disminuye la replicación del VIH-1 con una terapia antirretroviral efectiva (82).

- **Activación de las células NK**

A diferencia de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, las células NK no necesitan presentación antigénica para destruir las células diana, y desencadenan una respuesta espontánea desde el primer contacto con el antígeno sin necesidad de una sensibilización previa (99).



Su activación está regulada mediante la integración de señales de varios receptores inhibidores y activadores en su superficie, muchos de los cuales emplean proteínas HLA de clase I, o similares a HLA de clase I, como sus ligandos, junto con la presencia de ciertas citoquinas. Así, a través del equilibrio de las señales recibidas por la multitud de sus receptores activadores e inhibidores, se consigue que estas células proporcionen una destrucción eficaz de las células diana mientras se mantiene la auto-tolerancia. Los receptores activadores transmiten señales que indican peligro al detectar una célula tumoral o infectada por un virus; mientras que los receptores inhibidores identifican las células propias y transmiten señales que indican tolerancia evitando así la autorreactividad (100).

Este complejo sistema de receptores activadores e inhibidores, conforma el modelo de doble receptor, que se perfila como la hipótesis más probable de acción de las células NK, según el cual, la señal inhibidora es dominante sobre la activadora, por lo que el linfocito NK sólo matará a la célula diana si recibe una señal activadora en ausencia de señal inhibidora. Esto se consigue a través de la expresión de novo en la superficie celular de células patógenas (células estresadas, en particular, células infectadas por virus o células tumorales) de los ligandos para los receptores NK activadores; a la vez que se produce la regulación a la baja de los ligandos para los receptores inhibidores en su superficie, como son las moléculas HLA de clase I, en un intento de evadir la respuesta inmunitaria citotóxica de los linfocitos T CD8 (101).

Se trata de un mecanismo de control muy eficiente, basado en que las moléculas HLA de clase-I son reguladores clave de la actividad NK al expresarse de forma ubicua en las células sanas, proporcionando con ello a las células NK un medio para identificarse a sí mismas. La regulación a la baja de HLA de clase I o la pérdida de su expresión durante la infección viral o la carcinogénesis libera la señal inhibidora a las células NK y

permite su activación (“hipótesis del missing-self”) (102). De esta forma, se consigue que la señalización a través de receptores activadores pueda superar la señalización mediada por receptores inhibidores únicamente cuando se enfrentan a células enfermas (103).

### C. RECEPTORES DE CÉLULAS NK (NKR)

A diferencia de las células T y B, las células NK no expresan un receptor de antígeno reordenado, sino que expresan una amplia gama de receptores codificados en la línea germinal, a través de los cuales reconocen sus ligandos en las células diana. Aunque el término "receptor NK" se ha utilizado para describir moléculas que se descubrieron por primera vez en las células NK, la mayoría de estos receptores NK se expresan en al menos algún subtipo de linfocitos T, en particular en las células T CD8<sup>+</sup> activadas, así como en la superficie de otros tipos de células, por ejemplo, células dendríticas o monocitos u otras células mieloides (101).

Estos receptores se expresan clonalmente o se coexpresan en varios subconjuntos de células NK, creando así repertorios con diferentes características fenotípicas y funcionales que son capaces de responder a distintos tipos de células infectadas por virus o transformadas por tumores (104), influyendo así, en la aparición y desarrollo de enfermedades; por lo que es importante comprender el mecanismo de reconocimiento entre los receptores NK y sus ligandos, así como sus vías de señalización en condiciones patológicas (105).

Se distinguen varias familias de NKR, que pueden clasificarse de distintas formas:



- a) Según su estructura: Se clasifican en la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig-SF), que incluye receptores similares a las inmunoglobulina de células NK (KIR), receptores similares a las inmunoglobulinas leucocitarias (LILR/LIR) y receptores citotóxicos naturales (NCR); y en la superfamilia de lectinas tipo C (CL-SF), que incluye principalmente receptores similares a lectina de células NK (KLR) (105).
- b) Según su capacidad de reconocer moléculas HLA de clase I: El reconocimiento de las células diana por parte de las NK no se encuentra únicamente limitado a la detección de moléculas HLA en la superficie de la célula diana, sino que existen otros múltiples posibles ligandos, tales como la fracción constante de los anticuerpos (Fc), moléculas de carbohidratos, proteoglicanos, heparánulfato, hemaglutininas virales, u otras proteínas celulares tumorales como B7-H6, entre otros; permaneciendo desconocidos aún muchos de ellos (106).
- c) Según su función: Los receptores NK se pueden dividir en dos grandes grupos con función inhibidora o activadora (107), además de existir otras moléculas activadoras y co-estimuladoras que también participan en su actividad citotóxica.

Desarrollando esta última clasificación funcional, destacan tres familias principales de NKR: los receptores activadores de citotoxicidad natural o NCR (NKp30, NKp44, NKp46), los receptores activadores/inhibidores tipo lectina C (NKG2C, NKG2E, NKG2A derivados del heterodímero CD94-NKG2, y el homodímero NKG2D) y los receptores activadores/inhibidores KIR tipo inmunoglobulina (KIR2DL1/5, KIR3DL1/2, KIR2DS1/5, KIR3DS1) (84). No obstante, existen más receptores de las células NK, como son: el correceptor de activación DNAM-1, el receptor activador tipo lectina II NKp80 y receptores como LIR, KLRG-1 y 2B4, entre otros; conformando una gran lista que queda resumida en las **Tablas 4 y 5** (87).

La naturaleza y el número de ligandos expresados por las células diana para los receptores inhibidores y activadores de células NK es el factor principal que determina la susceptibilidad de dichas células diana a la lisis mediada por NK. Los ligandos para estos receptores incluyen moléculas HLA de clase I y proteínas relacionadas con el HLA de clase I, como MICA, MICB y ULBP, entre muchas otras. En general, tal diversidad receptor-ligando permite que las células NK respondan a múltiples estímulos, y esta diversidad se ve aumentada por la forma combinatoria en la que las células NK pueden integrar señales de estos múltiples receptores (108).

- **Receptores inhibidores**

	<b>Receptor</b>	<b>Ligando</b>
<b>Familia KIR</b>	2DL1	Grupo 2 HLA-C
	2DL2 / 3	Grupo 1 o 2 HLA-C HLA- B (motivo C1)
	2DL5	Desconocido
	3DL1	HLA-Bw4 HLA-A (motivo Bw4) HLA-F
	3DL2	HLA-A3 / A11 HLA-F
	3DL3	Desconocido
<b>Receptores tipo lectina tipo C</b>	CD94: NKG2A	HLA-E
	NKR-P1A	LLT1
<b>Familia LIR / ILT</b>	LILRB1 / ILT2 / LIR1	HLA-A, -B, -C
<b>Otros</b>	LAIR1	Colágeno
	Siglec-7	Ácido siálico
	KLRG-1 / MAFA	Cadherins
	CEACAM1	CEACAM1

**Tabla 4**(109). Receptores NK inhibidores y sus ligandos.



Los receptores inhibidores de células NK (**Tabla 4**), según reciban señales mediadas o no por moléculas HLA de clase I, se pueden clasificar en: 1) Receptores dependientes de HLA de clase I, dentro de los que se incluyen los receptores iKIR y el complejo del receptor NKG2A que forman un heterodímero con CD94 y reconocen como ligando a HLA-E (110) y 2) Receptores independientes de HLA de clase I, destacando el receptor tipo lectina de células asesinas G1 (KLRG1), la proteína receptora de células NK 1 (NKR-P1), y otros receptores inhibidores, incluidos LAIR-1, Siglec 7, CD244 (2B4), CEACAM1, CD300a y TIGIT, que pueden discriminar ligandos distintos de HLA-I, y que son importantes para mantener la homeostasis de las células NK (111).

Aunque los dominios extracelulares de los receptores inhibidores de células NK son diversos, los motivos de señalización intracitoplasmática de estos receptores transmembrana son notablemente similares. Las colas citoplasmáticas tienen una secuencia conservada de aminoácidos, conocidos como motivo inhibidor basado en tirosina o ITIM. La unión de ligandos a sus receptores inhibidores, activa quinasas de la familia Src que fosforilan residuos de tirosina, lo que lleva al reclutamiento de otras enzimas como las tirosina fosfatasas SHP-1 y SHP-2, o la inositol-fosfatasa SHIP, que son capaces de desfosforilar los sustratos proteicos de la tirosina quinasa vinculados a la activación de los NKR, terminando así las vías de señalización de activación (112). Otra hipótesis, es que el reclutamiento de SHP-1 bloquee la señalización en un paso proximal, evitando las señales descendentes que de otra forma producirían la fosforilación de los receptores activadores (94).

- **Receptores activadores**

Los receptores activadores de células NK (**Tabla 5**), según reciban señales mediadas o no por moléculas HLA de clase I o similares, se pueden clasificar en: 1) Receptores

dependientes de HLA de clase I como: NKG2C, NKG2D y NKG2E, y los KIR activadores; y 2) Receptores independientes de HLA de clase I, destacando: los receptores de citotoxicidad natural o NCR (113), los receptores de la familia SLAM (114) y el ya mencionado receptor CD16 (FcγRIIIa) (94). En último lugar, existen además moléculas co-estimuladoras, entre las que destacamos como más relevantes: la DNAX accessory molecule-1 (DNAM-1) o CD226 (31), u otras como NKp65 o NKp80 (115).

	Receptor	Ligando
<b>Receptores de citotoxicidad naturales</b>	NKp30	BAT-3
	NKp44	Hemaglutinina viral
	NKp46	Hemaglutinina viral
<b>Receptores tipo lectina tipo C</b>	CD94:NKG2C	HLA-E
	CD94:NKG2E	HLA-E
	NKG2D	MIC-A/B, ULBP
<b>Familia KIR</b>	2DS1	Grupo 2 HLA-C
	2DS2	Grupo 1 HLA-C HLA A*11:01
	3DS1	HLA-Bw4 HLA-F
	2DS3	Desconocido
	2DS4	Grupo 1 y 2 HLA-C HLA A*11:02
	2DS5	Grupo 2 HLA –C
	2DL4	HLA-G
<b>Otros</b>	CD244 (2B4)	CD48
	CD16	IgG
	CD226 (DNAM-1)	CD112, CD155
	CRACC	CRACC
	NTB-A	NTB-A

**Tabla 5** (109): Receptores NK activadores y sus ligandos.



La activación de las células NK no se debe a un receptor maestro, sino que, en la mayoría de los casos, es el resultado de la acción combinada de varios receptores y correceptores; de manera que la fuerza de activación de las células NK refleja el número de receptores desencadenantes implicados y su densidad en la superficie celular (85). Aunque algunos de estos receptores se expresan de forma más abundante que los inhibidores en las células NK, es necesario un mayor número de señales activadoras, al tener la señal inhibidora un papel predominante para evitar una respuesta citotóxica desmedida. Existen combinaciones particulares de receptores activadores que puede desencadenar la activación de las células NK de manera más eficiente que otras. Además, los receptores de activación NK pueden reconocer de manera diferente ligandos expresados en células diana en eventos cualitativamente distintos (86).

Aunque las células NK humanas expresan numerosos receptores activadores o coactivadores, muchos inducen vías de señalización comunes y, por lo tanto, se comportan de manera similar, si no idéntica; no obstante, aún falta por conocer las propiedades de señalización de muchos receptores. Así, se sabe que los receptores estimuladores se caracterizan por dominios citoplásmicos cortos que carecen de elementos transductores de señales. En cambio, se asocian y envían señales a través de moléculas adaptadoras, como DAP12, DNAX-12/KARAP, FcR $\gamma$  y CD3 $\zeta$ , que contienen el motivo de activación inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM) (84), la molécula adaptadora DAP10, que contiene el motivo YxxM (90), o la molécula adaptadora SAP (o proteína asociada a SLAM), que posee motivos activadores basados en tirosina denominados ITSM que transmiten la señal activadora (105,111).

En contraposición a la norma general de que los receptores activadores parece que no pueden activar las células NK por sí mismos, sino que es necesaria la acción sinérgica de varios de ellos para conseguirlo, hay un receptor activador que supone una excepción

a esta regla, el receptor CD16 (105). CD16 es suficiente para inducir exocitosis de gránulos y secreción de TNF $\alpha$  en células NK no estimuladas. No obstante, también se ha observado que células NK activadas por IL-2 pueden activarse mediante la estimulación aislada de NKp46, NKG2D, 2B4 o DNAM (84).

Respecto al tipo de ligando requerido para la activación de estos receptores, debemos saber que la mayoría aún no se han identificado. Dichos ligandos están ausentes o se expresan en pequeñas cantidades en células normales, mientras que se sobreexpresan o se expresan de novo en células sanas estresadas, y principalmente, en células con transformación tumoral o infección viral. No obstante, los tumores y ciertos virus pueden inducir la regulación a la baja de los ligandos activadores de NKR en las células diana, favoreciendo así el escape del control mediado por NK (85).

## **5. LOS RECEPTORES KIR**

### **A. DEFINICIÓN**

Los receptores KIR (Killer Immunoglobulin-like Receptors), son glicoproteínas transmembrana de tipo 1 que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas, constituyendo moléculas de la superficie celular que se expresan en las células NK y en un pequeño subconjunto de células T y transmiten señales inhibitoras. Posteriormente, se descubrió que algunos receptores KIR transducían señales activadoras, y se decidió conservar el acrónimo KIR cambiando el significado de “I” por “similar a inmunoglobulina”.

Los KIR se encuentran entre los receptores NK más polimórficos y complejos. En primer lugar, su expresión se activa de manera estocástica, de modo que cada célula NK



tiene su propio repertorio de receptores; y en segundo lugar, existe una diversidad genética muy alta en las familias de receptores KIR, de forma que los genes KIR varían en número, organización genómica y polimorfismo alélico entre los haplotipos individuales. Por tanto, la mayoría de las personas tienen un repertorio KIR único, que permite a las células NK dar una respuesta única contra un amplio espectro de patógenos (116,117).

Por otra parte, sus ligandos HLA se encuentran entre las moléculas más diversas de la naturaleza, con el mayor grado de polimorfismo genético conocido hoy en día, superior al de los genes KIR. Fenómeno que resultó de la presión selectiva para adaptarse a la rápida diversificación de patógenos. La rápida evolución conjunta de KIR y sus ligandos HLA, necesaria para mantener una relación funcional entre ambos, está sujeta a una selección equilibrada que favorece la preservación de la heterocigosidad en la población, lo que se correlaciona con una mayor diversidad y aptitud del hospedador (108).

De esta forma, las interacciones KIR/HLA, afectadas por estos altos niveles de polimorfismo, se convierten en uno de los principales factores determinantes en la protección vs. susceptibilidad a distintas enfermedades, entre las que se incluyen: las infecciones virales, los trastornos autoinmunes, los trastornos reproductivos y el cáncer (85); quedando una tarea formidable por delante para aquellos que quieren vincular la biología de la enfermedad con ciertas variantes de los genes HLA y KIR.

## **B. NOMENCLATURA, ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LOS RECEPTORES KIR**

La nomenclatura del complejo sistema KIR para los diferentes genes y alotipos, con el fin de distinguir los receptores por su estructura y potencial de señalización, ha sido dada por un subcomité del Comité de Nomenclatura de Factores del Sistema HLA de la

OMS (118). Así, la descripción de los genes KIR en la nomenclatura actual tiene en cuenta:

- 1) El número de dominios extracelulares tipo inmunoglobulina, correspondiente a los 2 primeros dígitos que siguen a KIR: '2D' para dos dominios o '3D' para tres dominios.
- 2) La longitud de la cola citoplasmática, corresponde al tercer dígito: 'S' Short o 'L' Long, y revela la función de la proteína, activadora o inhibidora, respectivamente. La mayoría de los receptores inhibidores tienen un fragmento citoplasmático largo que termina en un ITIM; mientras que, por el contrario, la mayoría de los receptores activadores tienen un fragmento citoplasmático corto que se asocia con moléculas adaptadoras que contienen el motivo ITAM, a través del que produce el reclutamiento de tirosina quinasas. La única excepción a esta regla de cola corta/larga es KIR2DL4, un KIR activador de cola larga único (119).
- 3) El número de orden de descripción del gen corresponde al dígito final. Además, cuando dos o más genes tienen estructuras y secuencias muy similares, se les puede asignar el mismo número, pero distinguirlos con una letra final, por ejemplo, genes KIR2DL5A y KIR2DL5B.

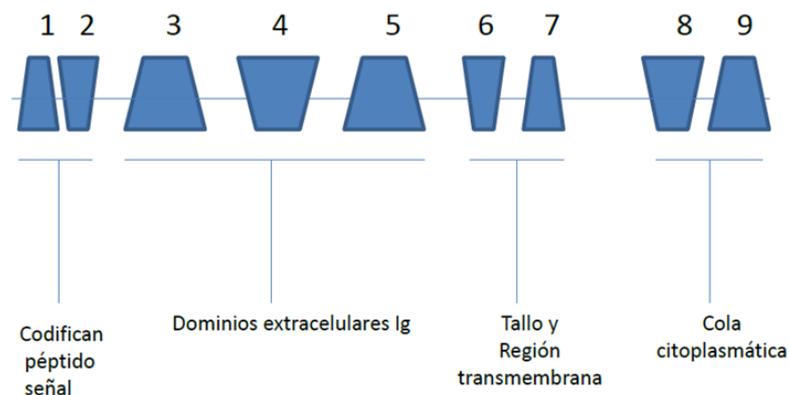
Al mismo tiempo, los genes KIR se caracterizan por un nivel extremadamente alto de polimorfismo puntual o de un solo nucleótido, lo que conlleva la existencia de muchos alelos distintos derivados de estas mutaciones puntuales que codifican variaciones menores de secuencias de uno o varios aminoácidos. Los alelos de un gen son idénticos en un 85 al 98%. El gen KIR más diverso es KIR3DL1 con más de 100 alelos conocidos.



### C. REPERTORIO KIR: FACTORES DE VARIABILIDAD ASOCIADOS A SU EXPRESIÓN

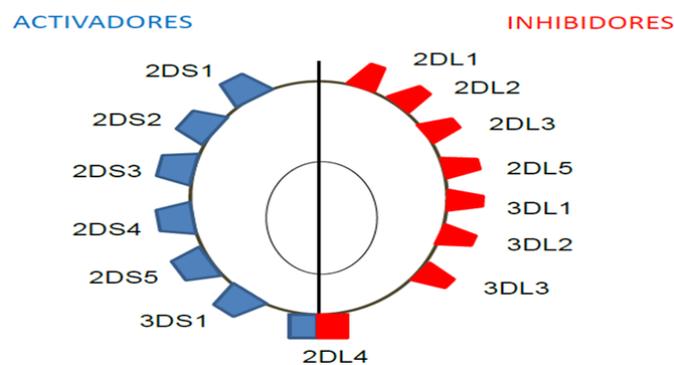
Los receptores KIR muestran una amplia diversidad genética, de expresión y funcional que puede afectar a las células NK a muchos niveles diferentes (84). Los genes KIR se codifican en el complejo del receptor de leucocitos (LRC o Leucocyte Receptor Complex) en el brazo corto del cromosoma 19q13.4, que comparte con otros inmunoreguladores estructuralmente similares (LILR y LAIR), y se segregan independientemente a los genes de sus ligandos, las moléculas clásicas HLA de clase I ubicadas en el cromosoma 6.

Los receptores KIR están codificados por nueve exones consecutivos dentro del cromosoma 19: los primeros dos exones codifican el péptido líder, seguidos de los exones que codifican dos o tres dominios (2D o 3D) extracelulares similares a Ig (exones 3–5), el tallo (exón 6), la región transmembrana (exón 7) y la cola citoplásmica (exones 8–9) (**Figura 4**) (120). Los dominios extracelulares son los encargados de reconocer los ligandos y el tallo transmite la señal que regula la actividad NK.



**Figura 4** (121): Distribución de dominios del genes que codifican los receptor KIR

Hasta la fecha, se han identificado 15 loci del gen KIR dentro de esta familia de receptores (KIR2DL1, KIR2DL2/L3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR3DL2, KIR3DL3, KIR2DS1, KIR3DL1/S1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5) y 2 pseudogenes (KIR2DP1 y KIR3DP1). Cada gen KIR codifica un KIR inhibidor o activador, excepto KIR3DL1/S1, que codifica uno u otro según el alelo presente, y KIR2DL4, que comparte características estructurales con los KIR inhibidores y activadores; mientras que los pseudogenes no se expresan como proteínas y no tienen clara su función (KIR2DP1 y KIR3DP1) (122) (**Figura 5**).



**Figura 5** (123). Esquema de receptores KIR activadores e inhibidores en NK

La plasticidad del gen KIR se refleja en su expresión clonal en células NK maduras de manera estocástica (al azar), de forma que cada clon de células NK dentro de un determinado individuo no expresa el conjunto completo de genes KIR presentes en el genoma de ese individuo, sino sólo una parte de los genes en una combinación aparentemente aleatoria. Esta diversidad combinatoria de la expresión KIR produce una amplia gama de clones de células NK funcionalmente distintos en un mismo individuo, que son críticos para una rápida detección de la expresión reducida de HLA clase I en

sus células diana, dando una rápida respuesta contra un amplio espectro de patógenos. Cada clon de células NK mantiene su repertorio de receptores KIR adquiridos a lo largo de las divisiones celulares posteriores, estimándose que se pueden detectar al menos 30.000 e incluso más fenotipos NK distintos en cada individuo (109).

Al mismo tiempo, se sabe que varios de estos subconjuntos celulares NK residen en tejido, de forma que conjuntos específicos de receptores KIR podrían ejecutar funciones especializadas en tejidos particulares. Así, por ejemplo, como hallazgos que apoyan esta hipótesis, se ha constatado que el perfil de expresión KIR de células NK de pulmón, hígado y útero difiere en el patrón de expresión observado en células NK de sangre periférica (124).

De forma global, podemos reconocer al menos seis factores que influyen en la variabilidad de la formación del complejo repertorio de receptores KIR:

### **1) Genotipo KIR: contenido de genes KIR y diversidad de haplotipos**

El genotipo se define como el repertorio de genes KIR presentes en un individuo. Esta familia de genes se caracterizan por una extraordinario alto grado de diversidad que surge de la variabilidad en: (1) el contenido específico de genes KIR en cada individuo, así como al polimorfismo de secuencia de nucleótido de cada gen KIR; y (2) en la diversidad de haplotipos (incluida la variación en el contenido de genes y en el número de copias de cada gen en cada haplotipo individual) (109).

#### **o Variabilidad según el contenido específico de genes KIR en un individuo**

Cada gen KIR suele estar presente entre cero y tres copias en un individuo, de forma que la frecuencia de células positivas para un KIR determinado está estrechamente relacionada con el número de copias, lo que sugiere que cada copia del gen KIR se

regula de forma independiente. Esto puede generar subconjuntos de células NK que transcriben dos o más copias alélicas de un determinado KIR (124).

Estudios recientes de la diversidad KIR sugieren que la variación en el contenido de genes podría afectar a la función de las células NK a nivel de su especificidad. La presencia o ausencia de genes KIR generalmente se asocia con la ganancia o pérdida de especificidad: la ausencia de KIR3DL1 en un genotipo dado, por ejemplo, conduciría a la falta de inhibición por parte de los alotipos HLA-Bw4 de todas las células NK en ese individuo. Esta carencia no puede ser compensada funcionalmente por ningún otro KIR. En otras palabras, las especificidades del KIR inhibidor principal no se superponen y, por lo tanto, causan "agujeros" funcionales en el repertorio (125).

○ **Variabilidad según el polimorfismo de secuencia de nucleótido alélico de KIR**

Dicho polimorfismo puede suceder por cambios relevantes en los aminoácidos de los exones que codifican distintas regiones del receptor (extracelular, transmembrana o citoplasmática), pudiendo, con ello, producir un cambio en la expresión o en la función de la proteína KIR, con importantes consecuencias biológicas (126).

Entre los posibles cambios de expresión o función del receptor KIR derivados del polimorfismo alélico, se encuentran:

- ✓ La mayor o menor expresión de KIR en la superficie de NK: entre los alotipos KIR3DL1, KIR2DL1 y KIR2DL2 se ha identificado la presencia de residuos de aminoácidos particulares que determinan el plegamiento incorrecto de la proteína y dan como resultado la falta de expresión del receptor de superficie. Además, se han informado alelos KIR caracterizados por un codón de terminación que provoca la



finalización prematura de la proteína (alelos nulos). Por otro lado, se han detectado diferentes clados de alelos de los genes KIR3DL1 y KIR2DL1 que conllevan una mayor/menor expresión de los receptores de superficie (109). En el caso del KIR3DL1, la consecuencia clínica derivada de estos diferentes niveles de expresión en la superficie celular, es la alteración de su potencial inhibitorio que se asocia diferencialmente con la protección en la infección por VIH-1 (109).

- ✓ La variabilidad en la afinidad del ligando: Están bien establecidas las diferencias en la afinidad receptor-ligando de diferentes alotipos de KIR2DL1 y KIR2DL2. Igualmente, el alto nivel de variación alélica del KIR3DL1 tiene impacto no sólo en su afinidad por los alotipos HLA de clase I Bw4 (109).
- ✓ La diversidad en la capacidad de transducción de señales: También se han informado diferentes variaciones de aminoácidos relevantes para la transducción de señales de KIR en los exones que codifican las regiones transmembrana y citoplasmática de los alelos de KIR2DSX y de KIR2DL1, entre otros (109).

Por lo tanto, la extraordinaria plasticidad de la familia de genes KIR y la variabilidad debida tanto al contenido del gen KIR como al polimorfismo alélico, los convierte en la familia humana más polimórfica de receptores de células NK y, al mismo tiempo, hace poco probable que individuos no relacionados compartan el mismo genotipo KIR (109).

#### ○ **Variabilidad del haplotipo KIR**

Los genes KIR se pueden heredar juntos en un orden dado y en múltiples combinaciones diferentes denominadas haplotipos. Por lo tanto, el “haplotipo KIR” es la disposición de los genes KIR en cada cromosoma 19 y una característica diferencial

de los haplotipos KIR es la variación en el contenido génico. En el ser humano se determinan dos haplotipos distintos, a saber “A” y “B”; los cuales se han detectado en todas las poblaciones humanas, aunque con diferentes frecuencias. En la mayoría de haplotipos el contenido de genes varía de un individuo a otro, oscilando de 4 a 20 en cada cromosoma y con distinto número de copias (126).

El haplotipo A se caracteriza por un contenido genético fijo de 7 genes (2DL1, 2DL2/3, 2DL4, 2DS4, 3DL1, 3DL2, 3DL3) y 2 pseudogenes (KIR2DP1, KIR3DP1); mientras que el haplotipo B incluye hasta 12 genes con cantidades variables de KIR inhibidores y activadores (con al menos uno de los siguientes genes: KIR2DL5, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS5 y 3DS1) (122).

Con pocas excepciones, los haplotipos KIR se pueden dividir en dos regiones con un número variable de genes, denominadas centroméricas (Cen) y teloméricas (Tel), por la presencia de un punto caliente de recombinación. Estas dos regiones se encuentran delimitadas por cuatro genes, denominados “framework genes” que marcan los extremos (KIR3DL3 y KIR3DL2) y la región central (KIR3DP1 y KIR2DL4) del complejo KIR y que están presentes en ~100% de los individuos. Estos framework genes están separados por distintas combinaciones de genes KIR que aparecen con frecuencia variable en cada población. Así, desde el extremo centromérico hasta el telomérico del complejo KIR, 3DL3 y 3DP1 delimitan el semihaplotipo centromérico, mientras que los extremos del semihaplotipo telomérico los conformarían 2DL4 y 3DL2. En individuos caucasoides se han definido tres semihaplotipos centroméricos (c-A1, c-B1, cB2) y tres teloméricos (t-A1, t-B1, t-B2) cuyas combinaciones explican la diversidad en la gran mayoría de los individuos (**Figura 6**); de manera que los haplotipos pueden estar formados por varias combinaciones de regiones Cen-A y Cen-



B, determinándose, por convención, que un haplotipo KIR A está siempre formado por el semihaplotipo centromérico c-A1 y el telomérico t-A1, y cualquier otra combinación de semihaplotipos centroméricos y teloméricos daría lugar a un haplotipo B (126).

Frame work gene	Centromeric					Frame work gene	a unique recombination site (RS)	Frame work gene	Telomeric				Frame work gene
3DL3	2DS2	2DL2	2DL3	2DP1	2DL1	3DP1		2DL4	3DL1	2DS4	3DS1	2DS1	3DL2

**Figura 6** (127). Organización de genes KIR

La composición y distribución de estos grupos en las poblaciones distinguen individuos y grupos étnicos. Así, se ha demostrado previamente que los haplotipos B son más frecuentes en poblaciones no caucásicas, como los aborígenes de Australia y los indios asiáticos, mientras que en las poblaciones caucásicas aproximadamente el 55% de la población tendrá haplotipos A y el 30% tendrá dos haplotipos B. El hecho de que todas las poblaciones humanas estudiadas hasta la fecha tengan una representación de los haplotipos KIR A y B se justifica por una forma de selección natural, llamada selección de equilibrio, que mantiene la variación genética de estos loci específicos en la población.

En general se ha hipotetizado que los haplotipos A son buenos para combatir infecciones y el cáncer, a la par que confieren susceptibilidad a los trastornos reproductivos; mientras que las poblaciones con frecuencias más altas de haplotipos B serán las que estarán bajo una fuerte presión de enfermedades infecciosas (128). Por tanto, las diferencias en las frecuencias poblacionales de estos haplotipos KIR hacen que la elección de los controles para los estudios de enfermedades sea muy importante para todas las poblaciones (118).

Al mismo tiempo, la peculiar estructura del locus KIR, incluida la presencia de varios genes que comparten la organización exón/intrón, con un alto grado de homología y con la misma orientación, facilita la recombinación no recíproca que promueve la eliminación o duplicación de los genes KIR, con formación de haplotipos truncados o extendidos que facilita la diversificación rápida del complejo génico KIR de forma añadida. Así, por ejemplo, un estudio reciente revela cómo un pseudogén KIR originalmente no funcional, KIR3DP1, vuelve a la vida en ciertos individuos a través de la recombinación no recíproca entre dos haplotipos KIR diferentes. Este hallazgo es una prueba de cómo la arquitectura única del locus KIR facilita la generación de nuevos haplotipos KIR con relevancia funcional (118).

Los genotipos KIR se agrupan en AA si contienen sólo genes del haplotipo A-canónico (KIR3DL3, 2DL3, 2DL1, 2DL4, 3DL1, 2DS4 y 3DL2) y en Bx si contienen genes KIR adicionales, con mayor número de KIRs activadores, donde X puede ser un haplotipo A o B. Esto se debe a la dificultad, sin estudios familiares, de distinguir en presencia de un haplotipo B si el otro haplotipo es A o B (129).

## **2) Regulación transcripcional y epigenética**

Aunque el repertorio KIR está determinado en gran medida por factores genéticos, cada vez, hay más pruebas de que los mecanismos epigenéticos modulan los patrones de expresión del receptor KIR a través de una activación transcripcional selectiva que genera los subconjuntos de células NK extremadamente variables intra e inter-individuos. Dicha activación transcripcional está regulada a través de la metilación estocástica de los genes KIR por las múltiples regiones promotoras en las secuencias



intergénicas (124). La metilación del ADN parece ser, por tanto, el regulador epigenético central de la transcripción KIR, ya que las modificaciones de histonas N-terminales son similares entre los genes KIR activos y reprimidos.

Por otra parte, también existen modificaciones postranscripcionales frecuentes, como el empalme alternativo de las transcripciones, que se observan en ~95% de los genes multi-exón humanos, y desempeña un papel crucial en la regulación de la diversidad de las proteínas y la expresión génica específica de tejido. Este proceso puede ser beneficioso, al originarse una amplia variedad de isoformas a partir de un solo gen, o perjudicial, ya que un solo gen a través de diferentes isoformas puede estar involucrado en el desarrollo de diversas enfermedades. A pesar de su relevancia clínica, en la actualidad sólo se ha descrito a fondo el patrón de corte y empalme de múltiples exones de unos pocos genes (120).

Para terminar, otros mecanismos postrasduccionales, tales como el plegamiento, la glicosilación o la fosforilación de las proteínas, pueden brindar oportunidades terapéuticas para modular la expresión KIR y, con ello, la función de las células NK (119).

### **3) Diferenciación celular**

La expresión de KIR es débil o ausente en las células NK inmaduras NKG2A<sup>+</sup> CD56<sup>bright</sup> y aumenta gradualmente con la maduración, alcanzando su nivel máximo en las células NK NKG2A<sup>-</sup> CD56<sup>dim</sup>.

### **4) Presencia del ligando**

La expresión de los receptores KIR también está influida por el ligando HLA. Así, se ha constatado que los individuos con KIR2DL1 o KIR3DL1 tienen un mayor número de

células NK que expresan estos genes si el grupo HLA-C2 o los ligandos HLA-Bw4 están presentes, respectivamente. Esto se debe a que sólo las células NK que expresan receptores inhibidores para HLA de clase I autoespecíficos durante su desarrollo se vuelven funcionales (130).

##### **5) Variabilidad por factores ambientales: infecciones virales**

Aunque la genética KIR/HLA tiene el mayor impacto en el repertorio de receptores de las células NK circulantes, también los factores ambientales pueden jugar un papel importante. En este sentido, ha sido particularmente relevante el análisis fenotípico de las células NK derivadas de gemelos genéticamente idénticos para los genes KIR y HLA. Así, se ha comprobado que las poblaciones de células NK de los gemelos son similares pero no idénticas entre sí, especialmente en la edad adulta. En este contexto, se ha visto que las infecciones virales pueden afectar el fenotipo de las células NK, modificando el repertorio de sus receptores expresados. Se ha constatado que distintas cepas de CMVH que codifican péptidos UL40 variables conducen a la diferenciación adaptativa de células NK a través de alteraciones epigenéticas, conduciendo a la expansión de un subconjunto de células NK caracterizado por la expresión de CD94/NKG2C, la co-expresión asociada principal de KIR2DL específico para los alotipos HLA-C propios y CD57, un marcador de la etapa de diferenciación terminal (109).

##### **6) Variabilidad de genes KIR a nivel de población**

Mientras que la frecuencia de los iKIR (KIR2DL1, KIR2DL2 / L3 y KIR3DL1) se mantiene alta en la mayoría de las poblaciones, las frecuencias de aKIR son más variables; observándose, por ejemplo, frecuencias altas de KIR2DS1, KIR2DS2 y



KIR3DS1 en Papúa Nueva Guinea y Australia (~70-90%) pero bajas en Africa y China (<20%). Por otro lado, también hay diferencias en el receptor predominante en una población concreta, como es el caso de KIR2DS1 en América Latina (~60-90%), de KIR2DS2 en la India (~75%) y de KIR3DS1 en Brasil (80%). Esta variabilidad en la expresión de KIR entre poblaciones sugiere diferentes presiones de selección impuestas por las enfermedades infecciosas dominantes (108).

## **6. MOLÉCULAS HLA**

### **A. DEFINICIÓN**

En la década de 1950, el profesor Jean Dausset descubre las moléculas HLA (Human Leukocyte Antigens) debido a su participación en el rechazo de tejidos y órganos transplantados, al detectar la presencia de anticuerpos en el suero de múltiparas y en pacientes politransfundidos dirigidos contra antígenos presentes en la membrana de los leucocitos humanos. Este sistema tiene como función principal la regulación y la vigilancia inmunitaria del organismo a través de la presentación de antígenos peptídicos propios o extraños a los receptores de los linfocitos T y NK, siendo vitales para mantener la homeostasis al discriminar entre lo propio y lo ajeno. De esta forma, el sistema HLA, además de participar en el rechazo de tejidos y órganos transplantados, está implicado en la inmunopatogénesis de muchas enfermedades, determinando el grado de susceptibilidad a diversas enfermedades tumorales, autoinmunes e infecciosas (131,132).

### **B. GENES MHC**

El Complejo Mayor de Histocompatibilidad (o MHC, derivado de sus siglas en inglés “Major Histocompatibility Complex”) en humanos se refiere a una región genética

localizada en el brazo corto de cromosoma 6 (6p21.3), que cubre un área de 7,6 Mb y contiene más de 250 genes con diferentes funciones, de los cuales hasta el 40% aproximadamente están asociados con el sistema inmunitario. Dentro de este 40% se incluyen los genes del antígeno leucocitario humano o HLA. Por lo tanto, el complejo del antígeno leucocitario humano (HLA) es sinónimo del MHC humano (133)(134)

La región genética codificante de HLA se subdivide en tres regiones principales, clase I (telomérica), clase II (centromérica) y clase III, con regiones extendidas de clase I y clase II a ambos lados, cada una de las cuales codifica moléculas diferentes tanto en la estructura como en la función que desempeñan en la respuesta inmunitaria. Cada región contiene numerosos loci de genes, incluidos genes expresados y pseudogenes. Algunos locus HLA son muy polimórficos (135,136).

Actualmente, se sabe que la región genética MHC tiene la mayor densidad de genes y la mayor cantidad de polimorfismo entre áreas cromosómicas humanas, lo que da lugar a un elevadísimo número de alelos. Al mismo tiempo, los alelos HLA se pueden heredar en múltiples combinaciones diferentes, denominadas haplotipos (los cuales divergen en el número y la posición de las copias de genes que contienen), constando cada célula con un haplotipo paterno y otro materno (133).

Otra característica de los genes del MHC es su herencia codominante de padres a hijos. Como existen tres genes clase-I clásicos (HLA-A, HLA-B y HLA-C) y cada persona hereda un juego de cada progenitor, cualquier célula de un individuo podrá expresar 6 tipos diferentes de moléculas HLA-I. En el locus de clase-II, cada individuo hereda un par de genes HLA-DP (DPA1 y DPA2, que codifican las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ ), un par de genes HLA-DQ (DQA1 y DQA2, para las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ ), un gen HLA-DR $\alpha$  (DRA1) y



uno o dos genes HLA-DR $\beta$  (DRB1 y DRB3, -4 o -5). De esta forma, un individuo heterocigótico puede expresar hasta 14 antígenos HLA diferentes principales.

### **C. MOLECÚLAS HLA DE CLASE I: LIGANDO KIR DE CÉLULAS NK**

Las moléculas HLA de clase I actúan como marcadores de lo propio, por eso se localizan en la superficie de la práctica totalidad de las células nucleadas (a excepción de los eritrocitos y los trofoblastos) (119,137). Estas se clasifican en moléculas HLA-I clásicas o clase IA (HLA-A, HLA-B, HLA-C) y no clásicas o clase IB (HLA-E, HLA-F, HLA-G, HLA-H).

Estructuralmente, las moléculas HLA de clase I, son glicoproteínas de membrana que poseen una cadena mayor denominada “cadena pesada alfa”, de peso molecular de 44-47 KDa, y donde radica la mayor variabilidad o polimorfismo; y una cadena más pequeña de 12 KDa “cadena ligera beta”, que corresponde a la subunidad  $\beta$ 2 microglobulina, codificada en el cromosoma 15 y es invariable. La parte extracelular de la cadena pesada posee tres dominios,  $\alpha$ -1,  $\alpha$ -2 y  $\alpha$ -3; los  $\alpha$ -1 y  $\alpha$ -2 conforman la hendidura o sitio de unión a los péptidos, con una composición muy variable en aminoácidos que determina la especificidad serológica al antígeno de superficie; siendo el dominio  $\alpha$ -3 muy constante (132,138). El HLA-I es inestable en ausencia de un ligando peptídico tras su montaje dentro del retículo endoplásmico (RE). Los péptidos antigénicos derivados intracelularmente que se originan a partir de proteínas propias o extrañas, con una extensión de 8 a 10 aminoácidos, se cargan en el surco de unión de HLA (139).

El polimorfismo HLA debe tenerse en cuenta para comprender verdaderamente los mecanismos involucrados en la formación del complejo HLA-péptido humano estable y

las interacciones con las moléculas KIR(139). Los loci más variables son HLA B y HLA C (140). El polimorfismo de HLA clase I afecta tanto a las características de la superficie que se expone a los receptores KIR, como a la naturaleza de la hendidura de unión a péptidos; no obstante, hay un predominio de sustituciones no sinónimas (es decir, que conllevan un cambio de proteína) en las regiones que influyen en el sitio de unión del péptido. Esto pueden alterar la profundidad, el tamaño o las propiedades electrostáticas e hidrofóbicas de la arquitectura de la bolsa HLA, lo que posteriormente afecta al repertorio de péptidos o a la conformación en la que se mantienen estos péptidos, que, a su vez, puede afectar a la capacidad de un alotipo HLA-I para interactuar con los KIR. De esta forma, la proteína HLA I experimenta, claramente, un proceso de selección positiva, donde la adquisición de nuevas variantes modula la función de presentación de antígenos mediante la modificación de las especificidades de reconocimiento de ligandos peptídicos. En otras palabras, las restricciones funcionales requieren que HLA mantenga un nivel muy alto de diversidad alélica. Esta diversidad alélica ayuda al sistema inmunológico a cubrir un gran número de péptidos y, por lo tanto, a luchar contra los patógenos de manera efectiva. De esta forma, los genes HLA están fuertemente vinculados a las enfermedades infecciosas y autoinmunes debido a los altos niveles de polimorfismo (140).

La aloreactividad de las células NK y su inmunidad antiviral están reguladas principalmente por la interacción de los receptores KIR con las moléculas “clásicas” HLA de clase I, excepto KIR2DL4 que interactúan con HLA no clásico HLA-G, y KIR3DL2, que interactúa además de con ciertos alotipos HLA-A, con el HLA no clásico HLA-F (137). Los KIR, a diferencia de la especificidad única de péptido-HLA de los TCR, suelen reconocer múltiples alotipos de clase I que comparten motivos



estructurales. De esta forma, según el grado de homología de las moléculas HLA I, estas se pueden subclasificar en: 1) Categorías o grupos alotípicos de HLA clase I, que pueden diferir en 20 a 30 aminoácidos, pero comparten el epítipo o motivo estructural de unión a KIR; o 2) Alotipos de HLA estrechamente relacionados, que exhiben micropolimorfismos que los hacen diferir en tan sólo uno o dos aminoácidos unos de otros, que si bien con frecuencia se unen a conjuntos superpuestos de péptidos, estos polimorfismos sutiles, sin embargo, si pueden afectar profundamente al reconocimiento del receptor (140).

○ **Categorías o grupos alotípicos HLA-I según el epítipo de unión a KIR**

Las moléculas clásicas de HLA I se agrupan en cuatro categorías principales en función del epítipo o motivo estructural de unión a KIR que posean.

Todos los alelos HLA-C expresados pertenecen al grupo de ligandos C1 o C2 según el aminoácido presente en la posición 80 de la molécula, con aproximadamente el 50% de los alelos en cada grupo. El grupo 1 de HLA-C con asparagina en la posición 80 proporciona el ligando para KIR2DL2 y KIR2DL3, mientras que el grupo 2 de HLA-C con lisina en la posición 80 proporciona el ligando para KIR2DL1. Recientemente se ha demostrado que mientras que KIR2DL1 solo interactúa con el grupo HLA-C2, KIR2DL2 y, en menor medida, KIR2DL3, también se unen al grupo HLA-C2 (118). También se ha demostrado que KIR2DS1 interactúa con los alelos HLA-C2 (127).

La mayoría de los alelos HLA-B y algunos alelos HLA-A se pueden clasificar como Bw4 o Bw6: Las moléculas HLA-B se pueden dividir en dos especificidades supertípicas, Bw4 y Bw6, con diferencias de aminoácidos en las posiciones 77 y 80-83 de la proteína madura. Bw6 se define por la serina en el residuo 77 y la asparagina en el

residuo 80, mientras que Bw4 se caracteriza por al menos siete patrones diferentes de aminoácidos en las posiciones 77 y 80-83. El motivo Bw4 también está presente en varias moléculas HLA-A. Así por ejemplo, los alelos HLA-B y HLA-A (A\*23, \*24, \*32) que llevan los epítomos HLA-Bw4 son reconocidos por KIR3DL1. Por otra parte, el epítomo Bw6 no es un ligando para los KIR (137).

Se sabe que las frecuencias de los alelos KIR varían de una población a otra, pero la mayoría de las personas tienen KIR inhibitorios específicos para los alelos HLA-C1, -C2 o -Bw4. Por ejemplo, en ingleses y estadounidenses blancos, los inhibidores KIR2DL1 (95% a 100%), 2DL2 (43% a 53%) y 2DL3 (85% a 95%) están presentes en la mayoría de los individuos, mientras que los activadores KIR2DS1 (35% a 45%) y 2DS2 (45% a 55%) están presentes con menos frecuencia (127).

#### ○ **Alotipos HLA-I de unión a KIR estrechamente relacionados**

La avidéz por el ligando de los KIR inhibitorios es siempre mayor que la de los activadores. La importancia biológica de esta capacidad de KIR para discriminar entre alotipos HLA clase I estrechamente relacionados se destacó recientemente en un análisis de individuos infectados por VIH, donde el receptor KIR3DL1 se asoció con un mejor control de la replicación viral y números elevados de células T CD4 en individuos con la variante alotípica HLA-B\*57:01, pero no en aquellos con la variante HLA-B\*57:03. El distinto posicionamiento de los residuos polimórficos dentro de la hendidura de HLA-I de las dos variantes indicó un posible papel diferencial de la presentación de péptidos en su distinta asociación con el receptor KIR. Dado que las dos moléculas HLA de clase I comparten repertorios de péptidos superpuestos, se examinó la capacidad de KIR3DL1 para discriminar entre HLA-B\*57:01 y HLA-B\*57:03



cuando presentaban péptidos idénticos. Se encontró que la interacción era muy sensible al residuo PΩ-2 del péptido unido, y los análisis estructurales comparativos del potencial de los residuos de aminoácidos en ambas variantes, se posicionaron más favorablemente hacia la interacción con KIR3DL1 en el contexto de HLA-B\*57:01. En resumen, estos datos brindan una visión mecánica de cómo el micropolimorfismo dentro de HLA clase I puede afectar al reconocimiento de KIR para impulsar asociaciones con resultados diferenciales en la enfermedad (140).

## **7. TIPOS DE RECEPTORES KIR Y ESPECIFICIDAD DE LIGANDO HLA-I**

Las células NK se unen a las moléculas HLA de clase I a través de dos grupos distintos de receptores KIR: inhibidores (iKIR) y activadores (aKIR); los cuales, se representan en conjunto en la **Tabla 6**.

En la **Tabla 6** se resumen los ligandos HLA-I de los receptores KIR. En general, los receptores iKIR2D (KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3) son específicos de moléculas HLA-C, mientras que los receptores iKIR3D (KIR3DL1 y KIR3DL2) pueden combinarse con HLA-A o HLA-B. Por su parte, KIR2DL4, a diferencia de los otros iKIR, reconoce una molécula HLA I no clásica: HLA-G, tanto su forma soluble como su forma unida a membrana (112).

Así mismo, en la **Tabla 6** también se muestran los ligandos identificados hasta ahora para los receptores aKIR (109). Las isoformas de activación de la familia KIR parecen haber evolucionado más rápidamente que las KIR inhibitorias, quizás por selección impuesta por patógenos. Los estudios genéticos han revelado que ciertos KIR activadores, en combinación con ligandos específicos HLA de clase I, pueden brindar protección contra la progresión al SIDA en individuos infectados por el VIH y contra la preeclampsia en madres embarazadas, entre otras enfermedades. Una dificultad para

comprender la base del efecto protector es que no se han identificado ligandos para la mayoría de los KIR activadores (94).

<b>RECEPTORES KIR Y LIGANDOS HLA</b>		
<b>iKIR (KIR inhibidores)</b>		
<b>Receptor KIR</b>	<b>Ligando HLA</b>	<b>Referencias bibliográficas</b>
<b>KIR 2DL1</b>	HLA-C2 KIR2DL1*022-HLA-C1	(109,141)
<b>KIR 2DL2/2DL3</b>	HLA-C1 Algunos HLA-C2 (baja afinidad) HLA-B (epítipo C1) B*46:01 Y *73:01	(109)
<b>KIR2DL5 A/B</b>	Desconocido	(109,142)
<b>KIR 3DL1</b>	HLA-Bw4 HLA-A Bw4 (A*23/*24*25*32	(109,143)
<b>KIR 3DL2</b>	HLA-A (A*03,A*11) HLA-F	(109)
<b>KIR3DL3</b>	Desconocido	(144)
<b>aKIR (KIR activadores)</b>		
<b>Receptor KIR</b>	<b>Ligando HLA</b>	<b>Referencias bibliográficas</b>
<b>KIR2DL4</b>	HLA-G	(145)
<b>KIR2DS1</b>	HLA-C2	(109)
<b>KIR2DS2</b>	HLA-C1 HLA-A*11:01	(109)
<b>KIR2DS3</b>	Desconocido	(146)
<b>fKIR2DS4</b>	HLA-C1 y C2 HLA-A*11:02	(109,147,148)
<b>KIR2DS5</b>	HLA-C2	(109,146)
<b>KIR3DS1</b>	HLA-Bw4 (HLA B*51, B*27:05, B*57:00) HLA-F	(109,149)

**Tabla 6.** Productos del gen KIR y sus ligandos HLA (elaboración propia)



De hecho, aunque los dominios extracelulares de algunos aKIR muestran una alta homología de secuencia con los iKIR correspondientes (es decir, los pares KIR2DS1-KIR2DL1, KIR2DS2-KIR2DL2 y KIR3DS1-KIR3DL1; ya que KIR2DS3, KIR2DS4 y KIR2DS5 no tienen equivalentes inhibidores), la mayoría de los aKIR no tienen una especificidad de unión similar a su contraparte inhibidora. Es probable que tres características conservadas de su biología hayan obstaculizado el proceso de descubrimiento de ligandos; (1) su baja afinidad por HLA clase I, (2) su especificidad limitada y (3) alta selectividad peptídica. Otra posibilidad es que los aKIR reconozcan ligandos inducidos por virus o moléculas propias HLA clase I alteradas por la infección viral (109).

## **8. KIR/HLA-I E INFECCIÓN VIRAL**

Las células NK son capaces de detectar a través de sus receptores KIR, no solo la regulación a la baja de HLA clase I, sino también alteraciones en el peptidoma presentado por HLA que pueden ocurrir durante infecciones virales (109). Existen diferentes mecanismos por los cuales la infección viral puede afectar rápida y radicalmente al repertorio de péptidos HLA clase I. Algunos virus han evolucionado para evadir la inmunidad de las células NK a través de la selección de mutaciones en los péptidos presentados por HLA que mejoran la unión a los receptores inhibidores de las células NK, tal como es el caso de KIR2DL3. Por el contrario, los cambios inducidos por virus en el repertorio de péptidos pueden promover una acción beneficiosa a través de KIR al interrumpir el reconocimiento de HLA clase I por KIR inhibidor, liberando la restricción de las células NK para montar una respuesta de eliminación de las células infectadas (130).

Los estudios de asociación de enfermedades virales que se han realizado hasta la fecha han demostrado que las interacciones entre el ligando HLA-I y el receptor de KIR pueden influir en el resultado de múltiples infecciones virales; destacándose en especial, entre otras, la enfermedad del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), por haber sido particularmente bien estudiada. Así, se ha descubierto que diferentes genotipos KIR-HLA tienen un efecto protector frente al VIH, tales como KIR3DS1 y HLA-B Bw4 (150,151), KIR3DS1 y HLA-F (152), KIR3DL1 Y HLA-B Bw4 (HLA-B\* 57:01) (151), o el fenotipo KIR2DL5, KIR2DS1 y KIR2DS5 (153); mientras que otros genotipos KIR se asocian a mayor susceptibilidad a la infección VIH, tal como sucede con fKIR2DS4 o la interacción KIR2DL3 y HLA-C\*16:01 (154). Esto demuestra que hay muchas posibles interacciones KIR/HLA que ofrecen distintos grado de protección o resistencia al VIH, además de influir otros posibles mecanismos, como la variaciones estructurales sutiles en el receptor NK y su ligando HLA-I, que podrían favorecer la mayor discriminación por parte de las células NK de los cambios en la carga de péptidos, conllevando cambios derivados en las respuestas resultantes de las células NK durante la infección viral (151). También se ha visto en el VIH, que la magnitud de la educación NK es directamente proporcional al grado de control viral. Los estudios epidemiológicos y las investigaciones funcionales posteriores han revelado que las combinaciones de subtipos de alelos de KIR3DL1 y HLA-B que inducen una educación más sólida, como las combinaciones de KIR3DL1-h y Bw4-80I de alta afinidad, están asociadas con el mejor control del VIH en pacientes no tratados con agentes antirretrovirales. Por el contrario, los individuos Bw4 negativos, en los que las células NK KIR3DL1<sup>+</sup> no han sido educadas, exhiben una progresión más rápida al SIDA, al no poder ejercer su acción protectora contra el VIH. El hecho de que la educación en



NK pueda predecirse mediante interacciones receptor-ligando codificadas por alelos tiene importantes implicaciones pronósticas y de gestión para las poblaciones infectadas por el VIH, ya que puede identificar a los supercontroladores de los progresores solo por el genotipo (155).

De la misma forma, se sabe que la interacción KIR-HLA I influye en el resultado de otras muchas infecciones virales, tales como el virus de la hepatitis C (156) (108) (157) (158) (159), el virus de la hepatitis B (157) (160) (161) (162), el citomegalovirus (137,163) (164) (165) (166), el virus de la gripe (167), el virus del dengue (126), el virus del ébola (168), o el virus de Lassa (169), entre otras.

Algunos autores han sugerido que las células NK también pueden desempeñar un papel importante en la infección por SARS-CoV1. Descubrieron que el número total de células NK y el porcentaje de células NK CD158b+ (células NK KIR2DL2/3+ y/o KIR2DS2+) eran significativamente más bajos en pacientes con infección por SARS-CoV-1 que en sujetos sanos. Además, la expresión de células NK de CD158b+ se correlacionó con la gravedad de la enfermedad y la presencia de anticuerpos específicos contra el coronavirus del SARS.

## JUSTIFICACIÓN





## JUSTIFICACIÓN

El brote de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19), causado por el nuevo coronavirus de tipo 2 responsable del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2), se ha convertido en una crisis de salud global en evolución. Desde su aparición, con declaración formal de la pandemia en marzo de 2020 por la OMS, ha provocado una alta morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Hasta el 15 de febrero de 2023, el COVID-19 ha afectado a más de 756 millones de personas y provocado la muerte de más de 6 millones [ <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports> ].

En el momento en que se planteó este estudio, coincidiendo con las primeras olas de la pandemia y sin existencia aún de vacunas para poder combatir esta nueva infección viral, el riesgo de los infectados de evolución a una forma grave de la enfermedad con requerimiento de ingreso hospitalario era de hasta un 15-20%, con una tasa de mortalidad hospitalaria mayor que la del virus influenza que oscilaba entre el 7,1 y el 17,1% según las series y una tasa general de letalidad de la enfermedad del 2,3% (170).

No obstante, desde el inicio de la COVID-19, las estrategias de tratamiento y preventivas extremas, junto con la posterior disponibilidad de vacunas eficaces y la aparición de nuevas variantes del SARS-CoV2 asociadas a un curso evolutivo de la enfermedad más leve, como la Omicron, han logrado frenar la propagación del virus, y han reducido sustancialmente el riesgo de enfermedad grave, con una reducción de la tasa de letalidad global actual menor del 1%, similar a la de la gripe.



A pesar de los grandes avances conseguidos, desafortunadamente la COVID-19 sigue siendo una causa importante de muerte, particularmente en los no vacunados, aquellos con enfermedades comórbidas o adultos mayores. Actualmente, continúa existiendo un porcentaje de personas considerable (hasta un 5-10% de las infectadas por SARS-CoV2, según la edad y estado de vacunación) que evolucionan a una forma grave de la enfermedad con necesidad de hospitalización y soporte ventilatorio, y un porcentaje menor de los casos (de un 0,3-1% de las personas infectadas por SARS-CoV2) desarrollan síntomas críticos con complicaciones respiratorias que culminan en un síndrome de dificultad respiratoria aguda potencialmente mortal, que constituye el sello distintivo de la etapa final de la COVID-19 grave (171–173); y a ello, se añade, que en algunos países con menos disponibilidad de recursos pueden pasar meses o incluso años antes de que los efectos de la pandemia puedan mitigarse de manera eficiente.

En base a esto, desde la aparición de este nuevo coronavirus, se han investigado los factores asociados a un curso evolutivo grave tras la infección, entre los que se incluyen factores epidemiológicos, clínicos y de laboratorio, con la finalidad de crear herramientas de predicción que nos ayuden a identificar de forma precoz a aquellos pacientes más vulnerables que tienen más probabilidades de tener una forma grave de la enfermedad. La finalidad, es poder establecer la gravedad inmediata del paciente y su riesgo de progresión, para poder anticiparnos, mediante la administración de un tratamiento preventivo en una fase temprana de la enfermedad que evite la entrada en la fase inflamatoria; ya que una vez se entra en esta fase, se asocia al desarrollo de distres respiratorio, con una alta probabilidad de muerte del paciente pese a los esfuerzos terapéuticos y de soporte ventilatorio.

Aunque, la enfermedad grave ocurre predominantemente en varones de edad avanzada, no vacunados o con ciertas comorbilidades, también pueden ocurrir en personas sanas

de cualquier edad, en las que las variables clínicas y de laboratorio cobran protagonismo para ayudarnos a predecir su evolución; debiendo tener en cuenta, no obstante, su valor más limitado al tratarse de biomarcadores de gravedad de aparición tardía en pacientes que ya han adquirido la infección por SARS-CoV2, y que ofrecen, por tanto, un menor margen de tiempo al clínico para anticiparse y actuar, y, consiguientemente, un menor margen de beneficio al paciente para poder mejorar sin entrar en la fase inflamatoria de la enfermedad.

Al mismo tiempo, la mayoría de los estudios que evalúan tales herramientas predictivas de gravedad en base a las variables mencionadas están limitados por el riesgo de sesgo y no han sido validados adecuadamente para el manejo clínico. Es por ello, por lo que pese a los esfuerzos por identificar los factores asociados a la gravedad de la enfermedad, continúa sin estar resuelto saber el por qué algunas personas padecen una enfermedad grave o incluso crítica, mientras que otras sólo muestran síntomas clínicos leves, siendo el pronóstico de los pacientes tan heterogéneo.

En este sentido, sabemos, en base a observaciones previas durante las epidemias del SARS y del MERS, que el sistema inmunológico es fundamental para defender y eliminar las células infectadas por ambos coronavirus, pudiéndonos proporcionar una respuesta a esta cuestión sin resolver. Así, varios investigadores han profundizado en este campo, descubriendo que los casos graves de COVID19 se caracterizan por una respuesta disregulada del sistema inmunitario, en la que se pierde el equilibrio que lo caracteriza.

De esta forma, el estudio de las características inmunológicas asociadas a la gravedad de la COVID19 podría proporcionarnos una explicación a la respuesta clínica tan



heterogénea frente a la enfermedad, y de forma paralela podría ser útil para descubrir nuevos marcadores genéticos e inmunológicos, detectables con métodos diagnósticos rápidos, que fueran complementarios a las herramientas de predicción ya existentes actualmente, permitiendo mejorar la evaluación de la susceptibilidad a la infección y la predicción de la evolución a una forma grave de la enfermedad en etapas más precoces. Al mismo tiempo, estos nuevos marcadores podrían constituir nuevas dianas terapéuticas sobre las que actuar.

Los diversos estudios publicados al respecto han puesto en evidencia que a medida que avanza esta enfermedad la linfopenia que caracteriza a los pacientes con COVID-19 se produce a expensas de los linfocitos T CD8 y NK, y esto parece asociarse en algunos casos a un descenso de su funcionalidad que se relaciona con la disregulación inmunitaria propia de la fase inflamatoria de la enfermedad. Algunos estudios demuestran que las células NK tienen un mejor valor predictor de gravedad en pacientes críticos con COVID19. Las células NK son unas de las principales células efectoras de la respuesta innata frente a infecciones virales, con la peculiaridad de que su respuesta está regulada por un conjunto complejo de interacciones receptor/ligando que presentan el mayor grado de polimorfismo genético de la naturaleza. Las interacciones más importantes son las mediadas por los KIR y sus ligandos HLA-I. La alta diversidad de este sistema KIR-HLA-I podría proporcionar una susceptibilidad diferencial y única a cada uno de los seres humanos frente a las infecciones virales, estando ya demostrado en numerosos estudios su influencia en el resultado de una multitud de infecciones por virus. Sin embargo, su papel en la variable clínica COVID-19 a fecha de realización del presente estudio permanecía casi sin explorar.

## **HIPÓTESIS DE TRABAJO**





## HIPÓTESIS DE TRABAJO

La enfermedad producida por la infección por SARS-CoV2 continúa siendo una importante causa de morbimortalidad a nivel mundial a pesar de los avances conseguidos desde el inicio de la pandemia, con la vacunación y la aparición añadida de nuevas variantes de curso clínico más leve como la Omicron, que han provocado un descenso marcado en el porcentaje de casos que evolucionan a una forma grave de la enfermedad (desde un 15-20% inicial, hasta un 5-10% actual según la edad y el estado de vacunación) con un descenso asociado de su tasa de letalidad, que actualmente es similar a la del virus influenza con un porcentaje inferior al 1% (170).

Hasta la fecha, la mayoría de los estudios realizados que investigan las variables predictoras de gravedad de la COVID-19, están limitados por el riesgo de sesgos, no han sido validados adecuadamente para su manejo clínico, y se basan principalmente en características demográficas, clínicas y analíticas, permaneciendo casi sin explorar la contribución de factores inmunológicos o marcadores genéticos específicos, que podrían aumentar la capacidad predictiva en fases tempranas de la enfermedad y mejorar el manejo de los pacientes.

Conocer los factores determinantes de la gravedad de la enfermedad, responsable de la gran heterogeneidad en la respuesta clínica al SARS-CoV2, nos podría ayudar a identificar precozmente a los casos vulnerables de mayor riesgo y anticiparnos con estrategias terapéuticas con impacto pronóstico que reduzcan la evolución a una forma grave de la enfermedad, con la disminución asociada del número de ingresos en el hospital, el tiempo de estancia hospitalaria o la mortalidad; a la vez que nos permitiría descubrir nuevas dianas terapéuticas con posible valor patogénico sobre las que actuar.



Se sabe que el sistema inmunológico es fundamental para defender y eliminar el virus, y dentro del mismo, las células NK cobran un protagonismo especial al ser conocido su papel principal como efectoras en la respuesta innata contra las infecciones virales. La respuesta de las células NK está regulada principalmente por las interacciones mediadas por los receptores KIR y sus ligandos HLA-I, que, debido a su gran polimorfismo genético, son determinantes en la distinta susceptibilidad a las infecciones virales a nivel individual y poblacional.

En vista de estas consideraciones, es plausible plantear la hipótesis de que los receptores KIR, a través de las interacciones específicas con sus ligandos HLA-I, juegan una importante labor en la susceptibilidad y el pronóstico de la infección por SARS-CoV2 (COVID19).

## **OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN**





## OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN

### 1. OBJETIVO PRINCIPAL

- Evaluar el papel y el valor predictivo de las interacción de los receptores KIR con sus ligandos HLA de clase I, que regulan la educación y función de las células NK, en la susceptibilidad y el pronóstico de la enfermedad causada por SARS-CoV2 (COVID19); así como analizar el valor pronóstico de factores demográficos, analíticos y clínicos asociados a la COVID-19 grave.

### 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Análizar el valor pronóstico de las variables demográficas, clínicas y analíticas de los pacientes con infección por SARS-CoV2 incluidos en el estudio, comparando diferencialmente grupos de pacientes con formas leve y grave de la enfermedad.
2. Evaluar en pacientes con infección por SARS-CoV2 la prevalencia del genotipo KIR, así como el patrón de expresión de los receptores KIR en las células NK de sangre periférica (medido tanto en porcentaje de expresión, como en Intensidad de Fluorecencia Media) analizando si existen diferencias significativas entre pacientes con formas leves y graves de la enfermedad, y contrastándolas a su vez con las de grupo control.
3. Estimar el perfil de interacciones de receptores KIR con sus ligandos HLA de clase I en pacientes con infección leve y grave por SARS-CoV2 y controles sanos,



y el posible papel que péptidos derivados del virus SARS-CoV2 pueda tener en la afinidad de dichas interaccioness y en la severidad de la enfermedad.

## **METODOLOGÍA**





## METODOLOGÍA UTILIZADA

### 1. DISEÑO DEL ESTUDIO Y PACIENTES

Se trata de un estudio prospectivo, transversal, observacional y multicéntrico, que investiga el valor predictivo de la susceptibilidad y la severidad de la enfermedad por SARS-CoV2 (COVID19) a través del análisis comparativo de las interacciones de los receptores KIR de las células NK con sus ligandos específicos HLA de clase I en pacientes con enfermedad leve-moderada y grave, según la clasificación modificada de la OMS.

En este estudio se incluyeron a 201 pacientes sintomáticos con COVID-19 y 210 controles sanos emparejados por sexo, edad y etnia, procedentes de 10 hospitales españoles (4 comunidades autónomas). El grueso de los pacientes (~70%) pertenece a los tres principales hospitales del municipio de Murcia (Hospital General Universitario Reina Sofía, el Hospital Morales Meseguer y Hospital Univesitario Virgen de la Arrixaca), que cubren un área de población aproximada correspondiente a un tercio del total de la Región, y el ~30% restante de los pacientes incluidos en el estudio corresponden a otros hospitales de la Región de Murcia (Hospital Santa Lucía de Cartagena, con n=11, Hospital Rafael Mendez de Lorca con n= 13, Hospital Los Arcos de San Javier, con n=4), y a hospitales de las ciudades de Madrid (n= 3 pacientes: dos pacientes del centro de salud de La Chopera perteneciente al municipio de Alcobendas y un paciente del hospital Universitario HM Sanchinarro), Almería (n=3 pacientes del hospital Perpetuo Socorro) y Albacete (n=3 pacientes del Hospital General Universitario de Albacete). El Comité de Ética del Hospital General Universitario Reina-Sofía de Murcia aprobó el estudio.



En cuanto al cálculo del tamaño muestral del estudio, aceptando un riesgo alfa de 0,05 y un riesgo beta de 0,2 en un contraste bilateral, se precisan 100 sujetos en el primer grupo (enfermedad leve-moderada) y 100 en el segundo grupo (enfermedad grave) para detectar como estadísticamente significativa la diferencia entre dos proporciones, que para el grupo 1 se espera sea de 0,85 y para el grupo 2 de 0,68. Se ha estimado una tasa de pérdidas de seguimiento del 5%. Se ha utilizado la aproximación del ARCOSENO.

Para la inclusión de los pacientes se obtuvo el consentimiento por escrito de los casos y los controles. Se incluyeron de forma consecutiva, desde el 12 de Mayo al 15 de Octubre de 2020, a aquellos pacientes (mayores de 18 años) con infección confirmada por coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo mediante RT-PCR, y se siguieron hasta los 75 días de mediana tras el alta hospitalaria (rango intercuartílico [IQR], 61-92); sin seguimiento posterior de los mismos.

Para evaluar la gravedad de la enfermedad, se utilizó la clasificación modificada de la OMS, según la cual, atendiendo a los requerimientos de ingreso hospitalario, oxigenoterapia, y evolución clínica, establece hasta 6 grados de gravedad: **Grado 1** (no ingreso), **Grado 2** (ingreso con O<sub>2</sub> ambiente), **Grado 3** (oxígeno a bajo flujo), **Grado 4** (soporte respiratorio no invasivo u oxigenoterapia de alto flujo), **Grado 5** (soporte respiratorio invasivo) y **Grado 6** (muerte).

Otras escalas de gravedad de la COVID-19 complementarias usadas como guía fueron:

(1) Una escala de clasificación de la gravedad de los pacientes atendiendo a sus manifestaciones clínicas, según la cual se clasificaron en cuatro grupos: 1) **leve**, pacientes con infección respiratoria sin neumonía), 2) **moderada**, pacientes con infección respiratoria con neumonía no complicada, 3) **severa**, pacientes que cursan con disnea, taquipnea con >30 respiraciones por minuto, saturación de O<sub>2</sub> < 93%, PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>

ratio < 300 y/o infiltrados pulmonares en >50% del campo pulmonar en 24 a 48 horas y

4) **crítica** pacientes que cursan con fallo respiratorio, shock séptico, y/o fallo/disfunción multiorgánica.

(2) La escala de evaluación secuencial de insuficiencia orgánica (SOFA)(174), según la cual, la disfunción orgánica puede representarse mediante un aumento de 2 puntos o más en la evolución secuencial de insuficiencia orgánica, que se asocia con una mortalidad hospitalaria superior al 10%.

Para la estratificación de los casos de nuestro estudio en dos grupos de pacientes con distinta gravedad según la evolución de la COVID-19, inicialmente se consideró:

- Un primer grupo de casos con enfermedad leve-moderada, definido por los grado 1 a 3 de la clasificación modificada de la OMS, que incluyó desde pacientes que no ingresaron, hasta los que lo hicieron y llegaron a necesitar tratamiento con oxígeno a bajo flujo.
- Un segundo grupo de casos con enfermedad grave, definido por los grados 4 a 6 de la clasificación modificada de la OMS, que incluyó a pacientes que requirieron tratamiento con oxígeno a alto flujo, VMNI, IOT con VMI o pacientes fallecidos.

No obstante, tras un primer análisis en el que se comparó la distribución de KIR-HLA en los dos grupos considerados inicialmente de pacientes COVID-19 según su distinta gravedad, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos, por lo que se redefinieron los casos de nuestro trabajo en dos nuevos grupos con diferente evolución:



- Aquellos con un curso clínico leve-moderado, definidos por los grados 1 a 4 de la clasificación modificada de la OMS, incluyendo pacientes que llegaron a precisar como tratamiento oxígeno a alto flujo o VMNI, como terapia que marcaba el dintel de gravedad.
- Aquellos con un curso clínico grave, definidos por los grados 5 a 6 de la clasificación modificada de la OMS, que incluyó pacientes que requirieron VMI o que fallecieron.

Se recogieron variables demográficas, clínicas, analíticas y experimentales:

- **Demográficas:** edad, sexo, peso, talla y etnia.
- **Clínicas:** presencia de comorbilidad (hipertensión arterial, diabetes mellitus, dislipemia, enfermedad cardiovascular, enfermedad cerebrovascular, enfermedad pulmonar obstructiva crónica o EPOC, asma, hepatopatía, insuficiencia renal crónica, neoplasia, inmunosupresión), tratamiento crónico (IECAs, ibuprofeno), presencia de neumonía (si/no), duración de síntomas, tratamiento instaurado con fecha de inicio y fin (hidroxicloroquina, litonavir, azitromicina, corticoides, tocilizumab), escalas de gravedad (puntuación SOFA y CURB-65), coinfección bacteriana (si/no), requerimiento de oxigenoterapia (mayor valor de SAFI y PAFI durante el ingreso), requerimiento de soporte ventilatorio (oxigenoterapia de alto flujo o VMNI, VMI, ECMO) y evolución (hospitalización, ingreso en UCI, fallecimiento).
- **Analíticas:** Glucosa, Creatinina, Urea, Potasio, Sodio, Calcio, Fosforo, Colesterol, Trilgicéridos (TAG), lipoproteínas de alta densidad (HDL), Creatin fosfoquinasa (CPK), bilirrubina, ALT, AST, FA, GGT, LDH, hemograma, albúmina, proteínas, proteína C reactiva (PCR), dímero D (DD), ferritina, procalcitonina, interleuquina 6

(IL 6), velocidad sedimentación glomerular (VSG), ácido láctico, vitamina D, fibrinógeno, gamaglobulinas Ig A, Ig G e Ig M, grupo sanguíneo ABO, anticoagulante lúpico y anticuerpos antifosfolípido, grupo sanguíneo, serología de VIH, VHB y VHC.

- **Experimentales:** Genotipo HLA-I (ligandos KIR), genotipo KIR, expresión de receptores KIR en células NK e interacciones KIR/HLA-I

Para la obtención de las variables demográficas y clínicas de los pacientes incluidos en el estudio se realizó una entrevista clínica individual de cada uno de ellos a través de una consulta presencial hospitalaria, además de ayudarnos del análisis de la información contenida en sus historias clínicas para conseguir la totalidad de los datos requeridos en nuestro estudio.

La determinación de las variables analíticas, que incluyen las distintas variables bioquímicas, microbiológicas, hematológicas e inmunológicas previamente especificadas, se realizó a través de la obtención de muestras de suero y sangre con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) de todos los pacientes incluidos en el estudio (casos y controles).

### **Genotipaje HLA y KIR**

Estos estudios se realizaron en el la Unidad de Citometría e Inmunología Tumoral del Servicio de inmunología del HCUVA.

El genotipado de HLA-I (HLA-A, -B y -C) y de KIR se realizó en el Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (HUVA) en muestras de ácido desorribonucleico (ADN) extraídas con QIAamp-DNA-Blood-Mini-kit (QIAGEN



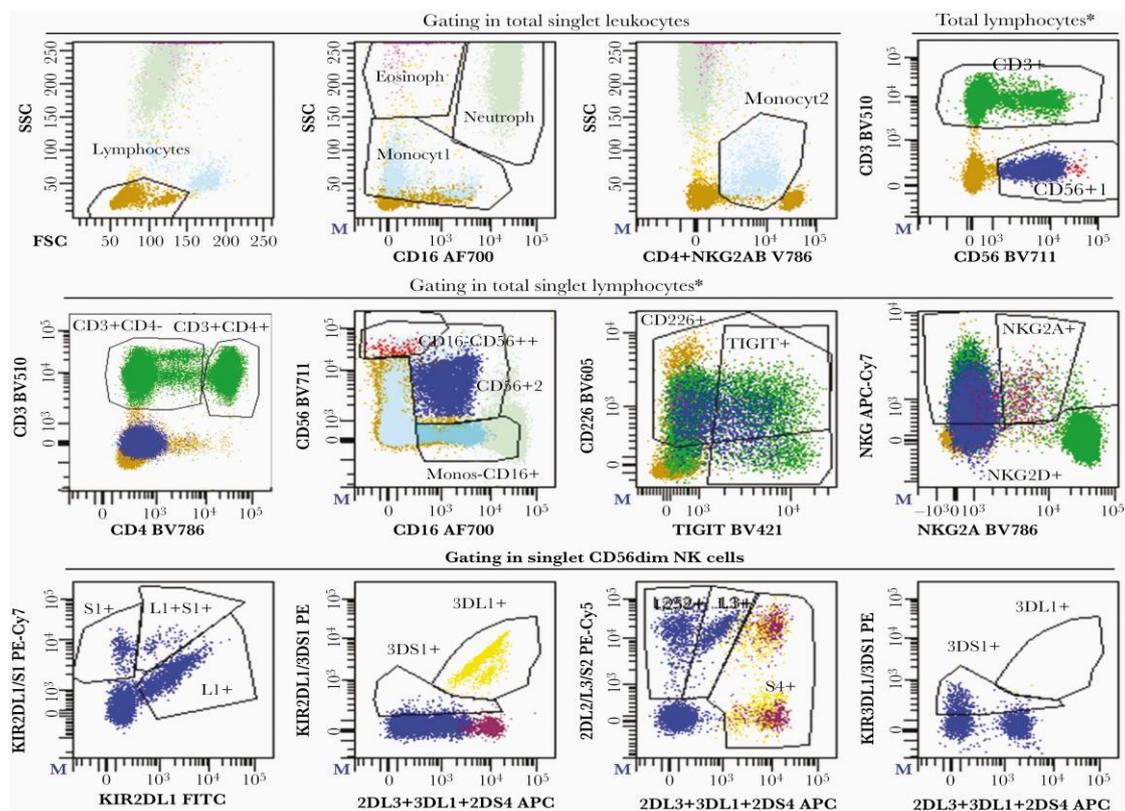
GmbH, Hilden, Alemania), a partir de muestras de sangre periféricas de los pacientes incluidos en el estudio, utilizando la técnica de biología molecular PCR-SSO y Luminex® Lifecodes HLA-SSO y KIR-SSO (Immucor Transplant Diagnostic). A través de esta técnica se procede a la amplificación de un segmento de ADN por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), seguida de la hibridación con sondas de oligonucleótidos de secuencia específica (PCR-SSOP); permitiendo a la tecnología Luminex analizar muchas muestras simultáneamente (múltiplex). El genotipado HLA permitió distinguir alelos HLA-C Asn80 (grupo C1) y HLA-C Lys80 (grupo C2), así como alelos Bw4 (175). El genotipado KIR identificó iKIRs (2DL1-L4 / 2DL5 y 3DL1-L3) y aKIRs (2DS1-S5 y 3DS1). Se detectaron diferentes alotipos de KIR2DS4, incluyendo el alotipo expresado (KIR2DS4full o fKIR2DS4) y el no expresado (KIR2DS4dell o dKIR2DS4). Los genotipos KIR se agruparon en AA si contienen solo genes del haplotipo-A canónico (KIR3DL3, 2DL3, 2DL1, 2DL4, 3DL1, 2DS4 y 3DL2) o en Bx si contienen cualquier otro (KIR2DL2, 2DS2, 3DS1, 2DS1, 2DS3 y/o 2DS5). Todos los haplotipos KIR contienen una combinación de cuatro motivos de contenido génico centroméricos (cA01, cB01, cB02, cB03) y dos teloméricos (tA01, tB01). Se identificaron las regiones centroméricas y teloméricas de los haplotipos AA/Bx (176).

### **Expresión de receptores NK en células de sangre periférica**

Estos estudios se realizaron en el la Unidad de Citometría e Inmunología Tumoral del Servicio de inmunología del HCUVA.

El análisis de la expresión de los receptores KIR activadores e inhibidores en células NK de sangre periférica se realizó en el Servicio de Inmunología de HUVA mediante citometría de flujo en Lyric de 12-fluorescencias y DIVA software 9.0 (Beckton

Dickinson, BD) en 100µl de sangre, marcando simultáneamente: CD3-PerCP (SK7, BD), CD8-APCCy7 (SK1, BD), CD16-BV510 (3G8, BD) y CD56-BV711 (NCAM16.2, BD) para diferenciar las subpoblaciones T (T CD8+ y CD3+CD8-) y NKs (CD16-CD56++ y CD16+CD56+). La expresión de receptores activadores e inhibidores en células NK CD3<sup>-</sup>CD16<sup>-/+</sup>CD56<sup>++</sup> (CD56<sup>bright</sup>) y CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> (CD56<sup>dim</sup>) y linfocitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup> se evaluó como porcentaje de células positivas y como intensidad de fluorescencia media (MFI) usando FACSLyric y DIVA-9.0 (Becton Dickinson) como se describe en la **Figura 7**.



**Figura 7:** Análisis de receptores activadores e inhibidores en células asesinas naturales (NK) y linfocitos T de sangre periférica. El protocolo de tinción incluía 15 anticuerpos monoclonales en 12 colores: CD3-BV510 (SK7; Becton Dickinson [BD]), CD4-BV786 (RPA-T4; BD), CD16-AF700 (3G8; BD), CD56-BV711 (NCAM16.2; BD), KIR2DL1/S1-PECy7 (EB6; BD), KIR2DL2/L3/ S2-PE-Cy5 (GL183; Beckman Coulter), KIR2DL1-FITC (143211; Sistemas de I+D), KIRDL3-APC (180701 [Sistemas de I+D], KIR2DL3), KIR3DL1-APC (DX9; Sistemas de I+D), KIR2DS4-APC (FES172; Beckman Coulter), CD226-PE (11A8; BioLegend), NKG2A-BV786



(131411; BD), NKG2D-APC-Cy7 (1D11; BioLegend) y TIGIT-BV421 (741182; BD). Los subconjuntos de células asesinas naturales y células T se identificaron siguiendo una estrategia de “gating” jerárquizada y lógica con el software Diva 9.0 (BD): las células se seleccionaron en un diagrama de puntos de dispersión frontal (FSC)-H/FSC-A (datos no mostrados), luego los linfocitos se seleccionaron en función de la baja dispersión para FSC y dispersión lateral (SSC), y todas las subpoblaciones de linfocitos dependían jerárquicamente en estas ventanas de selección. Los linfocitos CD3<sup>+</sup> se clasificaron como células CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-/+</sup>. Las subpoblaciones de células T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup> se establecieron dentro de los linfocitos CD3<sup>+</sup>. Las células NK totales se definieron combinando una ventana en CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> con otra CD56<sup>+/++</sup>CD16<sup>+/-</sup>. Para excluir los monocitos M2 en el subconjunto de células NK, se descartaron los eventos CD16<sup>++</sup>CD56<sup>-</sup>. La expresión de los receptores tipo inmunoglobulinas de células asesinas (KIR2DS1<sup>+</sup>, KIR2DL1<sup>+</sup>, KIR2DL1+S1<sup>+</sup>, KIR2DL2/S2<sup>+</sup>, KIR2DL3<sup>+</sup>, KIR3DL1<sup>+</sup>, KIR3DS1<sup>+</sup> y KIR2DS4<sup>+</sup>) se estimaron en las células NK total y en linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Las células KIR2DL3<sup>+</sup>, KIR3DL1<sup>+</sup> y KIR2DS4<sup>+</sup> (todas teñidas con anticuerpos monoclonales de alofococianina) se separaron lógicamente combinando con una selección de no-KIR2DL2/L3/S2 (en ficoeritrina [PE]-Cy5) y no-KIR3DL1/S1 (en PE), respectivamente. Se aplicó un análisis especial a pacientes con alelos KIR2DL3 que no eran reactivos con anticuerpo clonal anti-KIR2DL3 180701 (alelos KIR2DL3\*005 o \*015). Se aplicó una lógica de gating para estimar subconjuntos de células NK que expresan KIR único (por ejemplo, KIR2DS4 único: KIR2DS4<sup>+</sup>, KIR2DL1<sup>+</sup>, KIR2DS1<sup>+</sup>, KIR2DL2S2<sup>+</sup>, KIR2DL3<sup>+</sup>, KIR3DL1<sup>+</sup> y KIR3DS1<sup>+</sup>, etc.).

Como se muestra en la figura, se evaluó la expresión (porcentaje e intensidad media de fluorescencia) de diversos receptores asociadas a células NK: CD226, TIGIT, NKG2A, KIR2DS1, KIR2DL1, KIR2DL2/S2, KIR2DL3, KIR3DL1, KIR3DS1 y KIR2DS4.

### **Modelado de la afinidad KIR frente a HLA-I/péptido viral**

Estos estudios se realizaron en el la Unidad de Citometría e Inmunología Tumoral del Servicio de inmunología del HCUVA en colaboración con los departamentos de Ingeniería Electrónica e Informática e Ingeniería Química y Biológica, de la Universidad de Ciencia y Tecnología de Hong Kong, China.

El modelado de la afinidad receptor/ligando de los receptores KIR activadores B-teloméricos (KIR2DS1 y KIR3DS1) para los alotipos HLA-B\*15 (B\*15:01, B\*15:03, B\*15:04, B\*15:17, B\*15 :18 y B\*15:24) presentando péptidos del SARS-CoV2 se hizo

planteándolo como un problema de alineación de secuencias por pares (que tiene por objetivo determinar si una secuencia de nucleótidos o aminoácidos esta relacionada con otra) (177). Las puntuaciones de alineación de afinidad se calcularon utilizando la matriz de puntuación PAM250, indicando una puntuación alta una mayor probabilidad de unión (las puntuaciones de alineación más altas posibles reflejan los contactos intermoleculares más sólidos entre un péptido y un fragmento derivado del receptor). NetMHCpan-4.1(178) se usó con la secuencia de referencia del proteoma completo Wuhan-Hu-2019 (GISAID ID: EPI\_ISL\_402125) para predecir péptidos de 9 mer, de unión fuerte, presentados por cada alotipo HLA-B\*15 (rango percentil  $<0,05$  o puntuación  $> 0,8$ ).

Debido a que no se han descrito los residuos de KIR3DS1 que interactúan con los péptidos que presentan HLA-B\*15, los residuos de interacción potencial se obtuvieron usando la estructura de su homólogo KIR3DL1 (con una similitud de aminoácidos del 97% de los dominios extracelulares) (179) afín a su ligando HLA-B\*57:01-presentador de péptido (identificación del banco de datos de proteínas [PDB ID] 5T70) y mediante la alineación de la secuencia de la proteína de KIR3DL1 con la de KIR3DS1 (Centro Nacional de Información Biotecnológica NCBI, número de acceso NP\_001077008.1). La puntuación de interacción entre los residuos del receptor y el péptido SARS-CoV-2 se obtuvo como una media de afinidad de alineación calculada a partir del número total de interacciones de los residuos. Se calculó la puntuación de interacción de KIR3DL1/KIR3DS1 con su ligando Bw4 (180) para determinar la afinidad de las interacciones KIR/ligando de origen natural. Para este análisis, se identificaron residuos KIR3DS1 potenciales que interactúan con el epítipo Bw4 (posiciones HLA-B77, 80,



81, 82 y 83 (181)) en función de la estructura de KIR3DL1 que forma un complejo con HLA-B\*57:01 (PDB ID: 3VH8).

Se utilizó un procedimiento similar para modelar las interacciones de 15 péptidos de KIR2DS1/HLAB\*. Los residuos que interactúan con KIR2DS1 se obtuvieron utilizando la estructura KIR2DL1 afín al ligando HLA-Cw4 presentador de péptido (PDB ID 1IM9) (182) y alineando la secuencia proteica de KIR2DL1 con la de KIR2DS1 (NCBI número de acceso XP\_011546300.1).

## **2. ANÁLISIS DE DATOS**

El análisis estadístico se realizó con apoyo de Bioinformática-IMIB usando SPSS, versión 24.0 (SPSS Inc, Chicago, IL) y R-MASS. Las variables cualitativas y cuantitativas se analizaron mediante métodos paramétricos y no paramétricos básicos.

Utilizamos porcentajes e intervalos de confianza del 95% (IC del 95%) para los datos categóricos. Se analizaron mediante tablas de frecuencia y pruebas exactas de Fisher de  $\chi^2$  o 2 colas de Pearson para calcular todos los valores de P y calcular las razones de probabilidad (OR) con un IC del 95% para los datos categóricos.

Se utilizaron la media y la desviación estándar para las variables continuas y las diferencias se estimaron con análisis de varianza (ANOVA), prueba t de Student o prueba U de Mann-Whitney en función de la presencia o ausencia de distribución normal.

Teniendo en cuenta el gran tamaño de los conjuntos de datos de genes KIR, ligandos HLA y condiciones clínicas utilizadas para el análisis de asociación, todos los valores de P significativos se ajustaron mediante el método de corrección conservador de Bonferroni ( $P_c$ ) para comparaciones múltiples. El ajuste de Bonferroni es una técnica

estadística que ajusta el nivel de significación en relación al número de pruebas estadísticas realizadas simultáneamente sobre un conjunto de datos. Suponiendo que mi análisis pos-hoc consiste en  $m$  pruebas separadas, la corrección de Bonferroni pretende asegurar que la probabilidad total de cometer algún error de tipo I sea como máximo alfa. Para ello, multiplica cada uno de los valores  $p$  brutos por  $m$ , obteniendo un valor  $p'$  corregido, cuyo valor debe ser inferior a alfa para rechazar la hipótesis nula. El nivel de significación para cada prueba se calcula dividiendo el error global de Tipo 1 entre el número de pruebas a realizar. Se utiliza cuando no son muchas las comparaciones a realizar y además, los grupos son homogéneos en varianzas.

La asociación entre variables se evaluó con un análisis de regresión logística binaria, ajustado por variables de confusión. Inicialmente se llevó a cabo un análisis de regresión logística univariante, seleccionándose posteriormente aquellas variables con  $P < 0.05$  para incluirse en el análisis multivariante.

Para el análisis de la Supervivencia Libre de Progresión (SLP) y la Supervivencia Global (SG) se utilizó el estimador Kaplan-Meier (para estimar la curva de supervivencia) y la prueba de rango logarítmico de Mantel-Haenszel (para comparar curvas de supervivencia). Se aplicó el modelo de regresión de Cox para estimar el efecto independiente de las variables de interés con la supervivencia.

El impacto de fKIR2DS4 en el tiempo medio hasta el ingreso en la unidad de cuidados intensivos (UCI) se evaluó mediante Kaplan-Meier y la prueba de rango logarítmico de Mantel-Haenszel. El tiempo fue censurado 30 días después del inicio de los síntomas. Solo los valores de  $P$  por debajo de 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.





## **RESULTADOS**





## RESULTADOS

### 1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS Y ANALÍTICAS

En este estudio se incluyeron a 201 pacientes sintomáticos con COVID-19, cuyas características demográficas, clínicas y analíticas se describen a continuación en la **Tabla 7**. Se incluyeron también 210 controles sanos emparejados por sexo, edad y etnia. Respecto al grupo control, el grupo de pacientes con COVID-19 estaba conformado por un porcentaje de hombres mayor (59,7% vs 45% en los controles), con una media de edad ligeramente superior ( $57,6 \pm 11,8$  vs  $53,0 \pm 12,1$  años en los controles) y un porcentaje de población caucásica ligeramente inferior (del 84% vs 89% en los controles).

**Tabla 7. Características demográficas, clínicas y analíticas de los casos COVID-19**

	COVID-19 n = 201
<b>Factores Demográficos</b>	
Edad, años (media $\pm$ DE)	57,6 $\pm$ 11,8
Sexo femenino (%)	81 (40,3%)
Etnia caucásica (%)	166 (84%)
Etnia latinoamericana (%)	30 (15,3%)
<b>Comorbilidad y severidad</b>	
Enfermedad cardiovascular (%)	33 (16,1%)
Tabaquismo (%)	56 (27,84%)
Consumo sustancias (%)	1 (0,5%)
Hipertensión (%)	78 (38,8%)
Diabetes Mellitus (%)	34 (17%)
Dislipemia (%)	64 (31,8%)
Enfermedad cerebrovascular (%)	9 (4,15%)
Bronquitis crónica (%)	12 (6,0%)
Asma (%)	19 (9,5%)
Hepatopatía (%)	1 (0,5%)
IRC (%)	12 (6,0%)
Cáncer (%)	19 (9,5%)
Inmunosupresión (%)	9 (4,5%)



IMC (media ± DE)	28,97 (6,59%)
Obesidad (%)	132 (65,67%)
Grado I	43 (32,6%)
Grado II	54 (40,9%)
Grado III	35(26,5%)
Puntuación de Charlson (media ± DE)	1,41 ± 1,84
SOFA (media ± DE)	2,41 ± 3,03
SOFA > 6 (%)	35 (17,9%)
CURB65 (media ± DE)	1,02 ± 1,21
CURB65 > 2 (%)	55 (28,2%)
Gravedad OMS (%)	
• Grado 1	54 (26,9%)
• Grado 2	48 (23,9%)
• Grado 4	56 (27,9%)
• Grado 5	36 (17,9%)
• Grado 6	7 (3,5%)
PaO <sub>2</sub> / FiO <sub>2</sub> peor (media ± DE)	131,04 ± 78,79
SAFI ingreso (media ± DE)	379,97 ± 104,4
SaO <sub>2</sub> / FiO <sub>2</sub> peor (media ± DE)	269,03 ± 156,05
<b>Análisis de sangre</b>	
Glucosa mg/dL (media ± DE)	109,91 ± 71,07
Creatinina mg/dL (media ± DE)	0,86 ± 0,53
Urea mg/dL (media ± DE)	37,86 ± 18,44
Potasio mEq/L (media ± DE)	10,50 ± 37,14
Sodio mEq/L (media ± DE)	138,80 ± 19,70
Calcio mg / dL (media ± DE)	9,26 ± 0,59
Fósforo mg/mL (media ± DE)	3,90 ± 1,95
Colesterol mg/dL (media ± DE)	190,25 ± 47,64
Triglicéridos mg/dL (media ± DE)	136,56 ± 82,47
HDL mg/dL (media ± DE)	53,63 ± 23,85
Bilirrubina mg/ml (media ± DE)	1,61 ± 7,47
ALT U / L (media ± DE)	51,25 ± 309,77
AST U/ L (media ± DE)	63,39 ± 508,60
GGT U/ L (media ± DE)	53,08 ± 86,26
FA U/L (media ± DE)	153,12 ± 105,09
LDH U / L (media ± DE)	384,47 ± 864,25
Creatinfosfoquinasa U/L (media ± DE)	81,80 ± 100,12
Ferritina ng / mL (media ± DE)	261,34 ± 483,8
Albúmina g / dL (media ± DE)	4,23 ± 0,67
Proteínas g/dL (media ± DE)	6,71 ± 0,77
Hemoglobina g / dL (media ± DE)	13,05 ± 2,10
Leucocitos /μL (media ± DE)	7897,19 ± 16056,87

Neutrófilos / $\mu$ L (media $\pm$ DE)	4333,47 $\pm$ 3750,59
Linfocitos / $\mu$ L(media $\pm$ DE)	1870,1 $\pm$ 685,1
Plaquetas / $\mu$ L (media $\pm$ DE)	254762,44 $\pm$ 156311,20
PCR ng / mL (media $\pm$ DE)	1,34 $\pm$ 4,01
IL 6 ng/L (media $\pm$ DE)	221,11 $\pm$ 1270,71
VSG mm/h (media $\pm$ DE)	16,71 $\pm$ 19,59
Vitamina D ng/mL (media $\pm$ DE)	21,78 $\pm$ 9,32
Dímero D ng / ml (media $\pm$ DE)	589,03 $\pm$ 719,3
Fibrinógeno mg/dL (media $\pm$ DE)	370,52 $\pm$ 116,34
Ig A sérica mg/dL(media $\pm$ DE)	241,73 $\pm$ 164,15
Ig G sérica mg/dL (media $\pm$ DE)	1001,19 $\pm$ 281,89
Ig M sérica mg/dL(media $\pm$ DE)	105,13 $\pm$ 100,85
Grupo sanguíneo ABO (%)	
• A	4 (2,8%)
• B	16 (11,1%)
• AB	61 (42,4%)
• 0	63 (43,8%)
Serología VIH negativa (%)	185 (100%)
Serología VHC negativa (%)	185 (100%)
Serología VHB positiva (%)	1 (0,5%)
<b>Tratamiento</b>	
Remdesivir (%)	15 (7,5%)
Tocilizumab (%)	44 (21,9%)
Anakinra (%)	5 (2,5%)
Esteroides (%)	71 (35,3%)
Lopinavir-ritonavir (%)	80 (39,8%)
Hidroxiclороquina (%)	114 (56,7%)
Azitromicina (%)	120 (59,7%)
Betaferon	8 (4,0%)
<b>Evolución clínica</b>	
Neumonía (%)	145 (72,1%)
Hospitalización (%)	150 (74,6%)
Inestabilidad hemodinámica (%)	39 (21,0%)
Insuficiencia renal aguda (%)	24 (13%)
ECMO (%)	6 (3,0%)
SDRA (%)	100 (49,8)
OAF (%)	57 (28,4%)
VMI (%)	44 (21,9%)
Ingreso a UCI (%)	85 (42,3)
Días hasta hospitalización (media $\pm$ DE)	8,14 $\pm$ 5,2
Días hasta la UCI (media $\pm$ DE)	8,78 $\pm$ 4,5
Días de estancia (media $\pm$ DE)	21,3 $\pm$ 10,84



Exitus (%)

8 (4%)

Abreviaturas: ALT, alanina transaminasa; AST, aspartato aminotransferasa; GGT, gammaglutamil transferasa; FA, fosfatasa alcalina; SDRA, síndrome de dificultad respiratoria aguda; CRP, proteína C reactiva; CURB-65, puntuación de gravedad de la neumonía adquirida en la comunidad; Unidad de cuidados intensivos; IMV, ventilación mecánica invasiva; LDH, lactato deshidrogenasa; HDL, lipoproteína de alta densidad; IL 6; interleuquina 6; VIH, virus de inmunodeficiencia humano; VHC, virus de hepatitis C; VHB, virus de hepatitis B; DE: desviación estándar; SOFA, evaluación de insuficiencia orgánica relacionada con la sepsis; IMC, índice de masa corporal; IRC, insuficiencia renal crónica; FIS, fecha de inicio de síntomas; VMI, ventilación mecánica invasiva; ECMO, oxigenación por membrana extracorpórea; OAF: oxígeno terapia de alto flujo

En cuanto al análisis de comorbilidades de los casos con COVID-19, encontramos un peso importante en nuestra muestra de los factores de riesgo cardiovascular, ya que aproximadamente 2 de cada 3 pacientes (65,67%) eran obesos, en torno a 1 de cada 3 eran hipertensos (38,8%), dislipémicos (31,8%) y/o tenían antecedentes de tabaquismo (27,84%), con un 17% de diabéticos y un 16,1% con historia de enfermedad cardiovascular. En contraposición a esto, hubo un bajo porcentaje, inferior al 10%, de pacientes con enfermedad pulmonar (9,5% con asma, y 6% con bronquitis crónica), cáncer o algún tipo de inmunosupresión (9,5% con cáncer y un 4,5% inmunodeprimidos). La puntuación media del índice de comorbilidad de Charlson del total de pacientes fue de  $1,41 \pm 1,84$  (comorbilidad media baja).

Al mismo tiempo, analizamos la gravedad de la COVID-19 de los pacientes incluidos en nuestro trabajo mediante el uso de diferentes escalas, como la escala SOFA (con una puntuación media de  $2,41 \pm 3,03$ ), y la escala CURB 65 (con una puntuación media de  $1,02 \pm 1,21$ ), donde los pacientes más graves, definidos como  $SOFA > 6$  o  $CURB 65 > 2$  conformaron el 17,9% y el 28,2% del total, respectivamente. Atendiendo a la clasificación de gravedad modificada de la OMS, un 50,75% tenían una sintomatología

leve-moderada (grado 1-3 OMS) y un 45,77% presentaron una COVID-19 grave (grado 4 y 5 de la OMS).

Como principales complicaciones en el curso clínico de la infección por SARS-CoV2, encontramos que un 76,4% requirió ingreso hospitalario y un 42,3% acabó ingresando en la UCI. Del total de pacientes, un 72,1% tuvo neumonía, un 49,8% desarrolló un SDRA (con una media del peor valor de  $\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2$  y  $\text{SaO}_2 / \text{FiO}_2$  durante el ingreso de  $131,04 \pm 78,79$  y de  $379,97 \pm 104,4$  respectivamente), requiriendo OAF un 28,4%, VMI un 21,9%, y ECMO un 3%. Respecto a las complicaciones no respiratorias, un 21% presentó inestabilidad hemodinámica y un 13% tuvo insuficiencia renal aguda (IRA). La tasa de mortalidad global de nuestra muestra fue del 4%.

Centrándonos en los tratamientos más utilizados en el total de casos: el primer lugar lo ocupó la azitromicina (59,7%), seguido de cerca por la hidroxiclороquina (56,7%), los esteroides y el lopinavir-ritonavir ocuparían un puesto intermedio (con un uso entre el 35,3% y el 39,8% de los pacientes respectivamente), y en último lugar, encontraríamos el tocilizumab (21,9%), el remdesivir (7,5%), el betaferon (4,0%) y el anakinra (2,5%).

## **2. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS Y ANALÍTICAS DE LOS PACIENTES CON COVID-19 LEVE-MODERADO VS GRAVE**

Se analizaron las características demográficas, clínicas y analíticas de los pacientes con COVID-19 estratificando en función de distintas variables asociadas a gravedad: ingreso en UCI (**Tabla 8**), requerimiento de IOT (**Tabla 9**), SOFA>6 (**Tabla 10**), y



clasificación de la OMS agrupada en 2 grupos según requerimiento de VMI (grupo 5 y 6 de la OMS) vs no requerimiento de VMI (grupo 1-4 de la OMS) (Tabla 11).

La Tabla 8 resume las características demográficas, clínicas y analíticas de los pacientes según la necesidad de ingreso en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI).

**Tabla 8: Características demográficas, clínicas y analíticas de los pacientes COVID-19 según ingreso en UCI**

	No UCI (n=116)	Si UCI (n=85)	P
<b>Factores Demográficos</b>			
Edad, años (media ± DE)	56,92±11,82	58,59±11,88	0,326
Sexo femenino (%)	58 (50%)	25 (29,4%)	<b>0,005</b>
IMC (media ± DE)	27,89±5,47	30,33±7,61	<b>0,034</b>
Obesidad (%)			<b>0,013</b>
• Grado I	20 (27%)	23 (39,7%)	
• Grado II	27 (36,5%)	27 (46,6%)	
• Grado III	27 (36,5%)	8 (13,8%)	
Etnia (%)			<b>0,028</b>
• Caucásica	101 (90,2%)	63 (75%)	
• Latinoamericana	11 (9,8%)	19 (22,6%)	
• Árabe	0 (0,0%)	1 (1,2%)	
• Subsahariana	0 (0,0%)	1 (1,2%)	
<b>Comorbilidad y severidad</b>			
Enfermedad cardiovascular (%)	11 (9,5%)	22 (25,9%)	<b>0,004</b>
Tabaquismo (%)	39 (33,6%)	17 (20,0%)	<b>0,024</b>
Consumo de sustancias (%)	0 (0,0%)	1 (1,2%)	0,876
Hipertensión (%)	37 (31,9%)	41 (48,2%)	<b>0,028</b>
Diabetes Mellitus (%)	15 (12,9%)	19 (22,4%)	0,093
Dislipemia (%)	29 (25,0%)	35 (41,2%)	<b>0,023</b>
Enfermedad cerebrovascular (%)	6 (5,2%)	3 (3,5%)	0,833
Bronquitis crónica (%)	7 (6,1%)	5 (5,9%)	0,678
Asma (%)	15 (12,9%)	4 (4,7%)	0,085
Hepatopatía (%)	0 (0,0%)	1 (1,2%)	0,876

IRC (%)	8 (7%)	4 (4,8%)	0,710
Cáncer (%)	14 (12,1%)	5 (5,9%)	0,216
Inmunosupresión (%)	4 (3,5%)	5 (5,9%)	0,708
Puntuación de Charlson (media ± DE)	1,27±1,97	1,61±1,66	0,192
SOFA (media ± DE)	0,42±1,11	5,29±2,60	<b>&lt;0,001</b>
SOFÁ > 6 (%)	1 (0,9%)	34 (42,5%)	<b>&lt;0,001</b>
CURB65 (media ± DE)	0,35±0,75	1,98±1,09	<b>&lt;0,001</b>
CURB65 > 2 (%)	8 (7,0%)	47 (58,8%)	<b>&lt;0,001</b>
Gravedad OMS (%)			<b>&lt;0,001</b>
• Grado 1	54 (46,6%)	0 (0,0%)	
• Grado 2	47 (40,5%)	1 (1,2%)	
• Grado 4	15 (12,9%)	41 (48,2%)	
• Grado 5	0 (0,0%)	36 (42,4%)	
• Grado 6	0 (0,0%)	7 (8,2%)	
PaO <sub>2</sub> / FiO <sub>2</sub> peor (media ± DE)	205,07±112,86	117,76±63,33	<b>&lt;0,001</b>
SAFI ingreso (media ± DE)	429,84±58,24	337,02±116,05	<b>&lt;0,001</b>
SaO <sub>2</sub> / FiO <sub>2</sub> peor (media ± DE)	398,22±120,84	163,86±95,78	<b>&lt;0,001</b>
<b>Análisis de sangre</b>			
Glucosa mg/dL (media ± DE)	108,92±88,90	111,33±31,87	0,818
Creatinina mg/dL (media ± DE)	0,88±0,64	0,84±0,31	0,580
Urea mg/dL (media ± DE)	37,64±12,53	38,16±24,65	0,847
Potasio mEq/L (media ± DE)	13,64±46,49	5,97±15,30	0,157
Sodio mEq/L (media ± DE)	137,09±25,29	141,32±3,40	0,142
Calcio mg / dL (media ± DE)	9,39±0,42	9,07±0,74	<b>&lt;0,001</b>



Fósforo mg/mL (media ± DE)	3,76±1,43	4,10±2,53	0,274
Colesterol mg/dL (media ± DE)	195,80±39,64	182,00±56,79	0,048
Triglicéridos mg/dL (media ± DE)	113,12±57,68	168,05±99,20	<b>&lt;0,001</b>
HDL mg/dL (media ± DE)	60,78±25,66	44,88±18,12	<b>&lt;0,001</b>
Bilirrubina mg/ml (media ± DE)	1,34±7,41	2,00±7,60	0,544
ALT U / L (media ± DE)	24,85±16,16	89,05±481,94	0,153
AST U/ L (media ± DE)	25,60±13,39	117,49±792,75	0,213
GGT U/ L (media ± DE)	32,70±45,30	77,80±113,96	0,002
FA U/L (media ± DE)	149,04±90,55	158,89±123,17	0,530
LDH U / L (media ± DE)	306,19±88,59	498,43±1347,04	0,128
Creatinfosfoquinasa U/L (media ± DE)	97,47±127,02	68,17±67,41	0,177
Ferritina ng / mL (media ± DE)	114,63±104,08	467,81±691,67	<b>&lt;0,001</b>
Fibrinógeno mg/dL(media ± DE)	341,04±87,08	415,12±139,33	<b>&lt;0,001</b>
Albúmina g / dL (media ± DE)	4,45±0,31	3,90±0,89	<b>&lt;0,001</b>
Proteínas g/dL (media ± DE)	6,88 ±0,57	6,45±0,96	<b>&lt;0,001</b>
Hemoglobina g / dL (media ± DE)	13,79 ±1,45	11,99±2,41	<b>&lt;0,001</b>
Leucocitos /μL (media ± DE)	6166,18± 1840,49	10376,17±24823,98	0,070
Neutrofilos /μL (media ± DE)	3576,98±1475,69	5416,83±5414,38	<b>&lt;0,001</b>
Linfocitos / μL(media ± DE)	1917,59±557,53	6087,77±38586,56	0,245
Plaquetas /μL (media ± DE)	230975,86± 62497,46	288827,16± 228585,26	0,010
Hierro mcg/dL (media ± DE)	88,16±30,44	71,96±36,23	<b>0,041</b>
PCR ng / mL (media ± DE)	0,50±0,93	2,52±5,94	<b>&lt;0,001</b>
IL 6 ng/L (media ± DE)	181,36±1374,21	255,41±1182,72	0,736
VSG mm/h (media ± DE)	12,01±11,61	24,89±26,88	<b>&lt;0,001</b>
C3 mg/dL (media ± DE)	113,56±19,63	149,14±124,60	0,008
C4 mg/dL (media ± DE)	25,07±5,57	29,28±11,95	0,005
Vitamina D ng/mL (media ± DE)	22,68±9,51	19,65±8,66	0,174
Dímero D ng / ml (media ± DE)	429,46±478,34	812,41±917,96	<b>&lt;0,001</b>

DE)			
Ig A sérica mg/dL(media ± DE)	264,29±186,58	194,59±86,97	<b>0,019</b>
Ig G sérica mg/dL (media ± DE)	1035,98±236,04	928,51±351,40	<b>0,035</b>
Ig M sérica mg/dL(media ± DE)	114,56±118,92	85,45±37,64	0,112
Grupo sanguíneo ABO (%)			0,101
• A	1 (1,1%)	3 (6,0%)	
• B	8 (8,5%)	8 (16,0%)	
• AB	39 (41,5%)	22 (44,0%)	
• 0	46 (48,9%)	17 (34,0%)	
Serología VIH negativa (%)	113 (100,0%)	72 (100,0%)	NA
Serología VHC negativa (%)	113 (100,0%)	72 (100,0%)	NA
Serología VHB positiva (%)	1 (0,9%)	0 (0,0%)	1,000
<b>Tratamiento</b>			
Remdesivir (%)	1 (0,9%)	14 (16,5%)	<b>&lt;0,001</b>
Tocilizumab (%)	5 (4,3%)	39 (46,4%)	<b>&lt;0,001</b>
Anakinra (%)	0 (0,0%)	5 (5,9%)	<b>0,029</b>
Esteroides (%)	16 (13,8%)	55 (64,7%)	<b>&lt;0,001</b>
Lopinavir-ritonavir (%)	41 (35,3%)	39 (45,9%)	0,173
Hidroxiclороquina (%)	60 (51,7%)	54 (63,5%)	0,127
Azitromicina (%)	63 (54,3%)	57 (67,1%)	0,094
Betaferon	1 (0,9%)	7 (8,2%)	<b>0,023</b>
<b>Evolución clínica</b>			
Neumonía (%)	62 (53,5%)	84 (98,8%)	<b>&lt;0,001</b>
Hospitalización (%)	65 (56,0%)	85 (100,0%)	<b>&lt;0,001</b>
Inestabilidad hemodinámica (%)	2 (1,8%)	37 (48,7%)	<b>&lt;0,001</b>
Insuficiencia renal aguda (%)	2 (1,8%)	22 (28,9%)	<b>&lt;0,001</b>
ECMO (%)	0 (0,0%)	6 (7,1%)	<b>0,012</b>
SDRA (%)	16 (13,8%)	84 (98,8%)	<b>&lt;0,001</b>
OAF (%)	6 (5,2%)	51 (60,0%)	<b>&lt;0,001</b>
VMI (%)	0 (0,0%)	36 (42,4%)	<b>&lt;0,001</b>
Ingreso a UCI (%)	0 (0,0%)	85 (100%)	<b>&lt;0,001</b>
Días hasta hospitalización (media ± DE)	9,67±6,01	6,99±4,17	<b>0,002</b>



Días hasta la UCI (media ±DE)	6,00±NA	8,81±4,52	NA
Días de estancia (media ± DE)	8,75±853	30,77±19,45	<b>&lt;0,001</b>
Exitus	0 (0,0%)	8 (9,8%)	<b>0,002</b>

Abreviaturas: ALT, alanina transaminasa; AST, aspartato aminotransferasa; GGT, gammaglutamil transferasa; FA, fosfatasa alcalina; SDR, síndrome de dificultad respiratoria aguda; CRP, proteína C reactiva; CURB-65, puntuación de gravedad de la neumonía adquirida en la comunidad; Unidad de cuidados intensivos; IMV, ventilación mecánica invasiva; LDH, lactato deshidrogenasa; HDL, lipoproteína de alta densidad; IL 6; interleuquina 6; VIH, virus de inmunodeficiencia humano; VHC, virus de hepatitis C; VHB, virus de hepatitis B; DE: desviación estándar; SOFA, evaluación de insuficiencia orgánica relacionada con la sepsis; IMC, índice de masa corporal; IRC, insuficiencia renal crónica; FIS, fecha de inicio de síntomas; VMI, ventilación mecánica invasiva; ECMO, oxigenación por membrana extracorpórea; OAF: oxígeno terapia de alto flujo; UCI, unidad de cuidados intensivos.

El grupo que requirió ingreso en UCI estaba conformado por un porcentaje inferior de mujeres (29,4% vs 50%; p=0,05), de etnia caucásica predominantemente (75% caucásicos, 22,6% latinoamericanos, 2,4% árabes y subsaharianos vs 90,2%, 9,8%, 0,0% y 0,0%; p= 0,028), con un índice de masa corporal (IMC) medio superior (30,33 ± 7,61 vs 27,89 ± 5,47) y sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas por edad respecto al grupo que no llegó a ingresar en UCI. Los primeros presentaron mayor porcentaje de enfermedad cardiovascular (25,9% vs 9,5%; p=0,004), hipertensión arterial (48,2% vs 31,9%; p= 0,028) y dislipemia (41,2% vs 25%; p=0,023), sin encontrar diferencias en porcentaje de tabaquismo, presencia de asma o bronquitis crónica. Respecto a la evolución clínica de la COVID-19, el grupo que necesitó ingreso en UCI presentó mayor gravedad (SOFA>6: 42,5% vs 0,9%, p<0,001; CURB65>2: 58,8% vs 7%, p<0,001), mayor elevación de marcadores analíticos de inflamación (ferritina µg/mL: 467,81±691,97 vs 114,63±104,68, p<0,001; PCR µg/mL 2,52±5,94 vs 0,50±0,93, p<0,001; VSG mm/h: 24,89±26,88 vs 12,01±11,61, p<0,001; Dímero D µg/mL: 812,41±917,96 vs 429,46±478,34, p<0,001; fibrinógeno mg/dL: 415,12±139,33

vs 341,04±87,08, p<0,001), tratamientos más intensos (esteroides: 67,4% vs 13,8%, p<0,001; tocilizumab: 46,4% vs 4,3%, p<0,001) y peor evolución clínica (media de días hasta hospitalización: 6,99±4,17 vs 9,67±6,01, p<0,001; SDRA: 98,8% vs 13,8%, p<0,001; peor PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ingreso: 117,76±63,33 vs 205,07±112,86, p<0,001; requerimiento de OAF: 60% vs 5,2%, p<0,001; requerimiento de VMI: 42,4% vs 0,0%, p<0,001; requerimiento de ECMO: 7,1% vs 0,0%, p>0,001; inestabilidad hemodinámica: 48,7% vs 1,8%, p<0,001; insuficiencia renal aguda: 28,9% vs 1,8%, p<0,001; días de estancia media: 30,77 ±19,45 vs 8,75±8,53, p<0,001).

La **Tabla 9** resume las características demográficas, clínicas y analíticas de los pacientes según el requerimiento de intubación orotraqueal (IOT).

**Tabla 9: Características demográficas, clínicas y analíticas de los pacientes COVID-19 según requerimiento de IOT**

	No IOT (n=157)	Si IOT (n=44)	P
<b>Factores Demográficos</b>			
Edad, años (media ± DE)	57,64±11,77	57,59±12,23	0,982
Sexo femenino (%)	68 (43,3%)	15 (34,1%)	0,355
IMC (media ± DE)	28,39±6,89	30,67±5,37	0,081
Obesidad (%)			<b>0,006</b>
• Grado I	28 (28,6%)	15 (44,1%)	
• Grado II	37 (37,8%)	17 (50,0%)	
• Grado III	33 (33,7%)	2 (5,9%)	
Etnia (%)			<b>0,003</b>
• Caucásica	134 (88,2%)	30 (68,2%)	
• Latinoamericana	18 (11,8%)	12 (27,3%)	
• Árabe	0 (0,0%)	1 (2,3%)	
• Subsahariana	0 (0,0%)	1 (2,3%)	
<b>Comorbilidad y severidad</b>			
Enfermedad cardiovascular (%)	22 (14,0%)	11 (25,0%)	0,131
Tabaquismo (%)	48 (30,6%)	8 (18,2%)	0,176
Consumo de sustancias (%)	1 (0,6%)	0 (0,0%)	1,000
Hipertensión (%)	56 (35,7%)	22 (50,0%)	0,121



Diabetes Mellitus (%)	24 (15,3%)	10 (18,2%)	0,176
Dislipemia (%)	46 (29,3%)	18 (40,9%)	0,201
Enfermedad cerebrovascular (%)	8 (5,1%)	1 (2,3%)	0,698
Bronquitis crónica (%)	8 (5,1%)	4 (9,1%)	0,436
Asma (%)	17 (10,8%)	2 (4,5%)	0,333
Hepatopatía (%)	0 (0,0%)	1 (2,3%)	0,496
IRC (%)	10 (6,4%)	2 (4,7%)	0,749
Cáncer (%)	16 (10,2%)	3 (6,8%)	0,701
Inmunosupresión (%)	6 (3,9%)	3 (6,8%)	0,306
Puntuación de Charlson (media ± DE)	1,32±1,85	1.73±1,80	0,202
SOFA (media ± DE)	1,19±1,77	6.86±2,50	<b>&lt;0,001</b>
SOFA > 6 (%)	5 (3,2%)	30 (71,4%)	<b>&lt;0,001</b>
CURB65 (media ± DE)	0,62 (0,91%)	2.45 (1,06%)	<b>&lt;0,001</b>
CURB65 > 2 (%)	20 (13,1%)	35 (83,3%)	<b>&lt;0,001</b>
Gravedad OMS (%)			<b>&lt;0,001</b>
• Grado 1	54 (34,4%)	0 (0,0%)	
• Grado 2	47 (29,9%)	1 (2,3%)	
• Grado 4	50 (31,8%)	6 (13,6%)	
• Grado 5	6 (3,8%)	30 (68,2%)	
• Grado 6	0 (0,0%)	7 (15,9%)	
PaO <sub>2</sub> / FiO <sub>2</sub> peor (media ± DE)	153,86±87,42	102,66±55,51	<b>0,002</b>
SAFI ingreso (media ± DE)	399,02±91,26	328,08±120,68	<b>&lt;0,001</b>
SaO <sub>2</sub> / FiO <sub>2</sub> peor (media ± DE)	308,99±149,30	137,74±94,26	<b>&lt;0,001</b>
<b>Análisis de sangre</b>			
Glucosa mg/dL (media ± DE)	108,45±77,92	115,47±34,47	0,579
Creatinina mg/dL (media ± DE)	0,88±0,57	0,82±0,33	0,533
Urea mg/dL (media ± DE)	36,88±12,15	41,48±32,48	0,152
Potasio mEq/L (media ± DE)	12,17±41,66	4,20±0,58	0,223
Sodio mEq/L (media ± DE)	138,30±22,08	140,68±3,68	0,493

Calcio mg / dL (media ± DE)	9,36±0,46	8,92±0,83	<b>&lt;0,001</b>
Fósforo mg/mL (media ± DE)	3,74±1,28	4,47±3,40	0,052
Colesterol mg/dL (media ± DE)	194,66±42,77	174,29±60,09	<b>0,014</b>
Triglicéridos mg/dL (media ± DE)	124,29±64,47	171,47±113,79	<b>0,002</b>
HDL mg/dL (media ± DE)	58,78±24,92	40,68±14,56	<b>&lt;0,001</b>
Bilirrubina mg/ml (media ± DE)	1,72±8,21	1,23±3,91	0,704
ALT U / L (media ± DE)	29,34±24,84	132,12±669,26	0,056
AST U/ L (media ± DE)	26,12±14,43	200,93±1100,53	<b>0,048</b>
GGT U/ L (media ± DE)	41,24±57,98	96,38±143,27	<b>0,002</b>
FA U/L (media ± DE)	151,01±101,06	160,34±118,91	0,614
LDH U / L (media ± DE)	308,82±94,16	666,78±1861,89	<b>0,018</b>
Creatinfosfoquinasa U/L (media ± DE)	83,88±108,36	77,00±79,60	0,772
Ferritina ng / mL (media ± DE)	176,13±362,09	571,74±703,95	<b>&lt;0,001</b>
Fibrinógeno mg/dL (media ± DE)	349,38±92,26	455,63±158,88	<b>&lt;0,001</b>
Albúmina g / dL (media ± DE)	4,40±0,40	3,59±1,02	<b>&lt;0,001</b>
Proteínas g/dL (media ± DE)	6,79±0,60	6,39±1,18	<b>0,004</b>
Hemoglobina g / dL (media ± DE)	13,57±1,69	11,20±2,37	<b>&lt;0,001</b>
Leucocitos /μL (media ± DE)	6459,20± 2098,03	13047,21± 33947,06	<b>0,017</b>
Neutrófilos /μL (media ± DE)	3759,44± 1712,81	6389,30± 7030,17	<b>&lt;0,001</b>
Linfocitos / μL(media ± DE)	1907,47±599,23	9809,28± 52965,68	0,064
Plaquetas /μL (media ± DE)	248670,13± 167767,08	276581,40± 104244,73	0,302
Hierro mcg/dL (media ± DE)	84,33±30,70	76,84±40,55	0,398
PCR ng / mL (media ± DE)	0,52±0,88	4,30±7,80	<b>&lt;0,001</b>
IL 6 ng/L (media ± DE)	128,57±1101,66	459,77±1621,28	0,174
VSG mm/h (media ± DE)	12,68±11,57	34,33±33,64	<b>&lt;0,001</b>
C3 mg/dL (media ± DE)	117,66±23,21	166,73±180,50	<b>0,005</b>
C4mg/dL (media ± DE)	25,66±6,25	30,76±15,29	<b>0,010</b>
Vitamina D ng/mL (media ± DE)	21,76±9,49	21,96±8,29	0,952
Dímero D ng / ml (media ± DE)	504,58±613,86	900,02±964,94	<b>0,002</b>
Ig A sérica mg/dL(media ± DE)	248,85±173,36	199,34±82,75	0,213
Ig G sérica mg/dL (media ± DE)	995,09±244,29	1037,45±452,66	0,536



Ig M sérica mg/dL(media ± DE)	109,24±107,73	80,70±32,42	0,243
Grupo sanguíneo ABO (%)			<b>0,034</b>
• A	2 (1,7%)	2 (8,0%)	
• B	2 (1,7%)	2 (8,0%)	
• AB	10 (8,4%)	6 (24,0%)	
• 0	53 (44,5%)	8 (32,0%)	
Serología VIH negativa (%)	151 (100,0%)	34 (100,0%)	NA
Serología VHC negativa (%)	151 (100,0%)	34 (100,0%)	NA
Serología VHB positiva (%)	1 (0,7%)	0 (0,0%)	1,000
<b>Tratamiento</b>			
Remdesivir (%)	8 (5,1%)	7 (15,9%)	<b>0,037</b>
Tocilizumab (%)	23 (14,6%)	21 (48,8%)	<b>&lt;0,001</b>
Anakinra (%)	3 (1,9%)	2 (4,5%)	0,657
Esteroides (%)	44 (28,0%)	27 (61,4%)	<b>&lt;0,001</b>
Lopinavir-ritonavir (%)	63 (40,1%)	17 (38,6%)	0,997
Hidroxiclороquina (%)	87 (55,4%)	27 (61,4%)	0,595
Azitromicina (%)	90 (57,3%)	30 (68,2%)	0,261
Betaferon (%)	3 (1,9%)	5 (11,4%)	<b>0,016</b>
<b>Evolución clínica</b>			
Neumonía (%)	102 (64,9%)	44 (100%)	<b>&lt;0,001</b>
Hospitalización (%)	106 (67,5%)	44 (100,0%)	<b>&lt;0,001</b>
Inestabilidad hemodinámica (%)	4 (2,8%)	35 (83,3%)	<b>&lt;0,001</b>
Insuficiencia renal aguda (%)	2 (1,4%)	22 (52,4%)	<b>&lt;0,001</b>
ECMO (%)	1 (0,6%)	5 (11,6%)	<b>&lt;0,001</b>
SDRA (%)	56 (35,7%)	44 (100,0%)	<b>&lt;0,001</b>
OAF (%)	34 (21,7%)	23 (52,3%)	<b>&lt;0,001</b>
VMI (%)	6 (3,8%)	30 (68,2%)	<b>&lt;0,001</b>
Ingreso a UCI (%)	41 (26,1%)	44 (100,0%)	<b>&lt;0,001</b>
Días hasta hospitalización (media ± DE)	8,84±5,38	6,48±4,36	<b>0,011</b>
Días hasta la UCI (media ±DE)	9,95±4,00	7,72±4,71	<b>0,024</b>
Días de estancia (media ± DE)	13,08±9,77	40,51±22,10	<b>&lt;0,001</b>
Exitus (%)	1 (0,6%)	7 (16,7%)	<b>&lt;0,001</b>

Abreviaturas: ALT, alanina transaminasa; AST, aspartato aminotransferasa; GGT, gammaglutamil transferasa; FA, fosfatasa alcalina; SDRA, síndrome de dificultad respiratoria aguda; CRP, proteína C reactiva; CURB-65, puntuación de gravedad de la neumonía adquirida en la comunidad; Unidad de cuidados intensivos; IMV, ventilación mecánica invasiva; LDH, lactato deshidrogenasa; HDL, lipoproteína de alta densidad;

IL 6; interleuquina 6; VIH, virus de inmunodeficiencia humana; VHC, virus de hepatitis C; VHB, virus de hepatitis B; DE: desviación estándar; SOFA, evaluación de insuficiencia orgánica relacionada con la sepsis; IMC, índice de masa corporal; IRC, insuficiencia renal crónica; FIS, fecha de inicio de síntomas; VMI, ventilación mecánica invasiva; ECMO, oxigenación por membrana extracorpórea; OAF: oxigenoterapia de alto flujo; UCI, unidad de cuidados intensivos; IOT, intubación orotraqueal.

Aunque no se encontraron diferencias por edad y sexo, el grupo que necesitó IOT tuvo un porcentaje de obesidad grado I y grado II superior (44,1% y 50% vs 28,6% y 37,8%;  $p=0,006$ ) y estaba conformado mayoritariamente por población caucásica (68,2% caucásicos, 27,3% latinos, 2,3% árabes y 2,3% subsaharianos vs 88,2%, 11,8%, 0,0% y 0,0%,  $p=0,003$ ) respecto al grupo que no requirió IOT. No se encontraron diferencias de comorbilidad entre ambos grupos, pero los primeros tuvieron un curso más grave (SOFA $>6$ : 71,4% vs 3,2%,  $p<0,001$ ; CURB65 $>2$ : 83,3% vs 13,1%,  $p<0,001$ ), con mayor elevación de marcadores analíticos de inflamación (LDH U/L:  $666,78\pm 1861,89$  vs  $308,82\pm 94,16$ ,  $p=0,018$ ), ferritina  $\mu\text{g/mL}$ :  $571,74\pm 703,95$  vs  $176,13\pm 362,09$ ,  $p<0,001$ ; PCR  $\mu\text{g/mL}$   $4,30\pm 7,80$  vs  $0,52\pm 0,88$ ,  $p<0,001$ ; VSG mm/h:  $34,33\pm 33,64$  vs  $12,68\pm 11,57$ ,  $p<0,01$ , Dímero D  $\mu\text{g/mL}$ :  $900,02\pm 964,94$  vs  $504,58\pm 900,02$ ,  $p=0,002$ ; fibrinógeno mg/dL:  $455,63\pm 158,88$  vs  $349,38\pm 92,26$ ,  $p<0,001$ ; C3:  $166,73\pm 180,50$  vs  $117,66\pm 23,21$ ,  $p=0,005$ ; C4:  $30,76\pm 15,29$  vs  $25,66\pm 6,25$ ,  $p=0,010$ ), tratamientos más intensos (esteroides: 61,4% vs 28,0%,  $p<0,001$ ; tocilizumab: 48,8% vs 14,6%,  $p<0,001$ ) y peor evolución clínica (media de días hasta hospitalización:  $6,48\pm 4,36$  vs  $8,84\pm 5,38$ ,  $p=0,011$ ; SDRA: 100% vs 35,7%,  $p<0,001$ ; peor PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ingreso:  $102,66\pm 55,51$  vs  $153,86\pm 87,42$ ,  $p=0,002$ ; inestabilidad hemodinámica: 83,3% vs 2,8%,  $p<0,001$ ; insuficiencia renal aguda: 52,4% vs 1,4%,  $p<0,001$ ; ingreso en UCI: 100% vs 26,1%,  $p<0,001$ ; media de días hasta ingreso en UCI:  $7,72\pm 4,71$  vs  $9,95\pm 4,0$ ,  $p=0,024$ ; requerimiento de OAF: 52,3% vs 21,7%,  $p<0,001$ ; requerimiento de VMI:



68,2% vs 3,8%,  $p < 0,001$ ; requerimiento de ECMO: 11,6% vs 0,6%,  $p < 0,001$ ; días de estancia media:  $40,51 \pm 22,10$  vs  $13,08 \pm 9,77$ ,  $p < 0,001$ ).

La **Tabla 10** resume las características demográficas, clínicas y analíticas de los pacientes según la puntuación en la escala SOFA, definiendo dos grupos de paciente de mayor (SOFA>6) o menor gravedad (SOFA≤6).

**Tabla 10: Características demográficas, clínicas y analíticas de los pacientes COVID-19 según puntuación en escala SOFA>6**

	SOFA≤6 (n=161)	SOFA>6 (n=35)	P
<b>Factores Demográficos</b>			
Edad, años (media ± DE)	57,02±11,42	59,89±14,04	0,199
Sexo femenino (%)	69 (42,9%)	12 (34,3%)	0,457
IMC (media ± DE)	28,77±7,05	29,74±5,26	0,506
Obesidad (%)			0,166
• Grado I	29 (29,0%)	12 (44,4%)	
• Grado II	40 (40,0%)	11 (40,7%)	
• Grado III	31 (31,0%)	4 (14,8%)	
Etnia (%)			NA
• Caucásica	135 (86,5%)	25 (71,4%)	
• Latinoamericana	21 (13,5%)	9 (25,7%)	
• Árabe	0 (0,0%)	1 (2,9%)	
• Subsahariana	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
<b>Comorbilidad y severidad</b>			
Enfermedad cardiovascular (%)	21 (13,0%)	9 (25,7%)	0,104
Tabaquismo (%)	48 (29,8%)	5 (14,3%)	0,086
Consumo de sustancias (%)	1 (0,6%)	0 (0,0%)	1,000
Hipertensión (%)	53 (32,9%)	21 (60,0%)	<b>0,005</b>
Diabetes Mellitus (%)	26 (16,2%)	6 (17,1%)	0,836
Dislipemia (%)	45 (28,0%)	17 (48,6%)	<b>0,029</b>
Enfermedad cerebrovascular (%)	7 (4,3%)	2 (5,7%)	1,000
Bronquitis crónica (%)	10 (6,2%)	2 (5,7%)	0,896
Asma (%)	19 (11,8%)	0 (0,0%)	0,068

Hepatopatía (%)	0 (0,0%)	1 (2,9%)	0,400
IRC (%)	9 (5,6%)	3 (8,8%)	0,465
Cáncer (%)	16 (9,9%)	3 (8,6%)	1,000
Inmunosupresión (%)	6 (3,7%)	3 (8,6%)	0,178
Puntuación de Charlson (media ± DE)	1,33±1,87	1,69±1,78	0,303
SOFA (media ± DE)	1,25±1,71	7,71±1,93	<b>&lt;0,001</b>
SOFÁ > 6 (%)	0 (0,0%)	35 (100,0%)	<b>&lt;0,001</b>
CURB65 (media ± DE)	0,62±0,79	2,83±1,12	<b>&lt;0,001</b>
CURB65 > 2 (%)	23 (14,4%)	32 (91,4%)	<b>&lt;0,001</b>
Gravedad OMS (%)			<b>&lt;0,001</b>
• Grado 1	54 (33,5%)	0 (0,0%)	
• Grado 2	48 (29,8%)	0 (0,0%)	
• Grado 4	48 (29,8%)	8 (22,9%)	
• Grado 5	10 (6,2%)	21 (60,0%)	
• Grado 6	1 (0,6%)	6 (17,1%)	
PaO <sub>2</sub> / FiO <sub>2</sub> peor (media ± DE)	150,61±85,15	101,48±56,98	<b>0,003</b>
SAFI ingreso (media ± DE)	393,47±99,61	335,78±110,87	<b>0,007</b>
SaO <sub>2</sub> / FiO <sub>2</sub> peor (media ± DE)	40,70±25,17	67,81±32,26	<b>&lt;0,001</b>
<b>Análisis de sangre</b>			
Glucosa mg/dL (media ± DE)	108,63±77,09	114,03±32,65	0,698
Creatinina mg/dL (media ± DE)	0,88±0,56	0,83±0,34	0,678
Urea mg/dL (media ± DE)	36,82±12,65	41,91±32,52	0,129
Potasio mEq/L (media ± DE)	11,95±41,15	4,28±0,58	0,287
Sodio mEq/L (media ± DE)	138,27±21,79	141,12±3,96	0,456
Calcio mg / dL (media ± DE)	9,35±0,52	8,99±0,72	<b>0,001</b>
Fósforo mg/mL (media ± DE)	3,73±1,28	4,66±3,64	<b>0,022</b>



DE)			
Colesterol mg/dL (media ± DE)	194,61±44,08	173,71±60,14	<b>0,021</b>
Triglicéridos mg/dL (media ± DE)	128,99±75,87	161,18±100,70	0,061
HDL mg/dL (media ± DE)	57,61±24,52	42,17±17,78	<b>0,006</b>
Bilirrubina mg/ml (media ± DE)	1,70±8,10	1,29±4,31	0,769
ALT U / L (media ± DE)	29,55±25,35	156,35±743,70	<b>0,032</b>
AST U/ L (media ± DE)	27,12±19,30	238,65±1223,24	<b>0,029</b>
GGT U/ L (media ± DE)	52,20±90,47	57,04±72,79	0,807
FA U/L (media ± DE)	150,05±102,23	162,10±116,75	0,547
LDH U / L (media ± DE)	319,48±159,38	722,19±2091,96	<b>0,017</b>
Creatinfosfoquinasa U/L (media ± DE)	80,76±102,98	84,12±93,66	0,903
Ferritina ng / mL (media ± DE)	194,12±383,77	564,71±748,88	<b>&lt;0,001</b>
Fibrinógeno mg/dL (media ± DE)	358,01±101,08	439,26±157,13	<b>&lt;0,001</b>
Albúmina g / dL (media ± DE)	4,35±0,49	3,75±1,05	<b>&lt;0,001</b>
Proteínas g/dL (media ± DE)	6,80±0,64	6,41±1,18	<b>0,009</b>
Hemoglobina g / dL (media ± DE)	13,39±1,90	11,73±2,33	<b>&lt;0,001</b>
Leucocitos /μL (media ± DE)	6467,64±2085,27	14458,00±37565,91	<b>0,008</b>
Neutrófilos /μL (media ± DE)	3943,44±2823,81	6028,29±6298,57	<b>0,003</b>
Linfocitos / μL(media ± DE)	1911,58±655,41	11685,97±58698,69	<b>0,036</b>
Plaquetas /μL (media ± DE)	251773,42±168908,50	263457,14±89946,17	0,692
Hierro mcg/dL (media ± DE)	82,53±31,29	88,43±41,70	0,554
PCR ng / mL (media ± DE)	0,74±2,14	3,94±7,90	<b>&lt;0,001</b>
IL 6 ng/L (media ± DE)	121,59±1079,71	588,11±1809,99	0,081
VSG mm/h (media ± DE)	15,28±17,62	22,28±25,78	0,149
C3 mg/dL (media ± DE)	124,20±80,66	132,56±18,52	0,646
C4mg/dL (media ± DE)	25,76±8,22	29,48±9,11	0,068
Vitamina D ng/mL (media ± DE)	21,85±9,20	19,24±7,74	0,375
Dímero D ng / ml (media ± DE)	531,15±704,10	806,88±723,39	<b>0,041</b>

Ig A sérica mg/dL(media ± DE)	248,22±176,39	209,20±83,68	0,323
Ig G sérica mg/dL (media ± DE)	998,53±258,64	1034,14±397,49	0,598
Ig M sérica mg/dL(media ± DE)	110,96±109,09	79,49±32,81	0,193
Grupo sanguíneo ABO (%)			0,109
• A	2 (1,7%)	2 (8,3%)	
• B	11 (9,5%)	5 (20,8%)	
• AB	51 (44,0%)	8 (33,3%)	
• 0	52 (44,8%)	9 (37,5%)	
Serología VIH negativa (%)	153 (100,0%)	28 (100,0%)	NA
Serología VHC negativa (%)	153 (100,0%)	28 (100,0%)	NA
Serología VHB positiva (%)	1 (0,7%)	0 (0,0%)	1,000
<b>Tratamiento</b>			
Remdesivir (%)	11 (6,8%)	4 (11,4%)	0,564
Tocilizumab (%)	27 (16,8%)	15 (42,9%)	<b>&lt;0,001</b>
Anakinra (%)	4 (2,5%)	1 (2,9%)	1,000
Esteroides (%)	47 (29,2%)	22 (62,9%)	<b>&lt;0,001</b>
Lopinavir-ritonavir (%)	62 (38,5%)	17 (48,6%)	0,363
Hidroxiclороquina (%)	88 (54,7%)	22 (62,9%)	0,485
Azitromicina (%)	96 (59,6%)	22 (62,9%)	0,870
Betaferon (%)	3 (1,9%)	4 (11,4%)	<b>0,024</b>
<b>Evolución clínica</b>			
Neumonía (%)	106 (65,8%)	35 (100%)	<b>&lt;0,001</b>
Hospitalización (%)	110 (68,3%)	35 (100,0%)	<b>&lt;0,001</b>
Inestabilidad hemodinámica (%)	7 (4,6%)	32 (91,4%)	<b>&lt;0,001</b>
Insuficiencia renal aguda (%)	3 (2,0%)	21 (60,0%)	<b>&lt;0,001</b>
ECMO (%)	3 (1,9%)	3 (8,6%)	0,122
SDRA (%)	60 (37,3%)	35 (100,0%)	<b>&lt;0,001</b>
OAF (%)	40 (24,8%)	16 (45,7%)	<b>0,023</b>
VMI (%)	10 (6,2%)	21 (60,0%)	<b>&lt;0,001</b>
Ingreso a UCI (%)	46 (28,6%)	34 (97,1%)	<b>&lt;0,001</b>
Días hasta hospitalización (media ± DE)	8.61±5,42	6,57±4,43	<b>0,046</b>
Días hasta la UCI (media	9.60±4,25	7,76± 4,70	0,071



±DE)			
Días de estancia (media ± DE)	16,36±15,94	34,44±20,69	<0,001
Exitus (%)	2 (1,2%)	6 (17,6%)	<0,001

Abreviaturas: ALT, alanina transaminasa; AST, aspartato aminotransferasa; GGT, gammaglutamil transferasa; FA, fosfatasa alcalina; SDRA, síndrome de dificultad respiratoria aguda; CRP, proteína C reactiva; CURB-65, puntuación de gravedad de la neumonía adquirida en la comunidad; Unidad de cuidados intensivos; IMV, ventilación mecánica invasiva; LDH, lactato deshidrogenasa; HDL, lipoproteína de alta densidad; IL 6; interleuquina 6; VIH, virus de inmunodeficiencia humano; VHC, virus de hepatitis C; VHB, virus de hepatitis B; DE: desviación estándar; SOFA, evaluación de insuficiencia orgánica relacionada con la sepsis; IMC, índice de masa corporal; IRC, insuficiencia renal crónica; FIS, fecha de inicio de síntomas; VMI, ventilación mecánica invasiva; ECMO, oxigenación por membrana extracorpórea; OAF: oxígeno terapia de alto flujo; UCI, unidad de cuidados intensivo; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment score o Score para evaluación de fallo orgánico secuencial.

Aunque no se encontraron diferencias por características demográficas, el grupo de mayor gravedad (SOFA>6) tuvo mayor porcentaje de personas con HTA (60% vs 32,9%; p=0,005) y dislipemia (48,6% vs 28,0%; p=0,029). Analíticamente el primer grupo (SOFA>6) tuvo mayor elevación de marcadores inflamatorios (LDH U/L: 722,19±2091,96 vs 319,48±159,38, p=0,017), ferritina µg/mL: 564,71±748,88 vs 80,76±102,98, p<0,001; PCR µg/mL: 3,94±7,90 vs 0,74±2,14, p<0,001; Dímero D µg/mL: 806,88±723,39 vs 531,15±704,10, p=0,041; fibrinógeno mg/dL: 439,26±157,13 vs 358,01±101,08, p<0,001), tratamientos más intensos (esteroides: 62,9% vs 29,2%, p<0,001; tocilizumab: 42,9% vs 16,8%, p<0,001) y mayor número de complicaciones clínicas (media de días hasta hospitalización: 6,57±4,43 vs 8,61±5,42, p=0,046; neumonía 100% vs 65,8%, p<0,01; SDRA: 100% vs 37,3%, p<0,001; peor PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ingreso: 101,48±56,98 vs 150,61±85,15, p=0,003; ingreso en UCI: 97,1% vs 28,6%, p<0,001; inestabilidad hemodinámica 91,4% vs 4,6%, p<0,001; insuficiencia renal aguda: 60% vs 2,0%, p<0,001; requerimiento de OAF: 45,7% vs 24,8%, p=0,023;

requerimiento de VMI: 60,0% vs 6,2%,  $p < 0,001$ ; días de estancia media:  $34,44 \pm 20,69$  vs  $16,36 \pm 15,94$ ,  $p < 0,001$ ).

La **tabla 11** resume las características demográficas, clínicas y analíticas de los pacientes según los requisitos de la Ventilación Mecánica Invasiva (VMI).

**Tabla 11. Características demográficas, clínicas y analíticas de los pacientes COVID-19 según la necesidad de VMI**

	Sin VMI grado 1-4 OMS n = 158	Con VMI grado 5-6 OMS n = 43	P
<b>Factores Demográficos</b>			
Edad, años (media $\pm$ DE)	57,50 $\pm$ 11,83	58,09 $\pm$ 12,01	0,772
Sexo femenino (%)	69 (43,7%)	14 (32,6%)	0,255
IMC (media $\pm$ DE)	28,51 $\pm$ 6,92)	30,33 $\pm$ 5,38	0,165
Obesidad (%)			<b>0,025</b>
• Grado I	29 (29,6%)	14 (41,2%)	
• Grado II	37 (37,8%)	17 (50,0%)	
• Grado III	32 (32,7%)	3 (8,8%)	
Etnia (%)			<b>&lt;0,001</b>
• Caucásica	135 (88,2%)	29 (67,4%)	
• Latinoamericana	18 (11,8%)	12 (27,9%)	
• Árabe	0 (0,0%)	1 (2,3%)	
• Subsahariana	0 (0,0%)	1 (2,3%)	
<b>Comorbilidad y severidad</b>			
Enfermedad cardiovascular (%)	19 (12,0%)	14 (32,6%)	<b>0,003</b>
Tabaquismo (%)	45 (28,5%)	11 (25,6%)	0,282
Consumo de sustancias (%)	0 (0%)	1 (0,6%)	1,000
Hipertensión (%)	56 (35,4%)	22 (51,2%)	0,089
Diabetes Mellitus (%)	25 (15,9%)	9 (21,0%)	0,610
Dislipemia (%)	46 (29,1%)	18 (41,9%)	0,160
Enfermedad cerebrovascular (%)	7 (4,4%)	2 (4,7%)	1,000
Bronquitis crónica (%)	8 (10,5%)	4 (9,3%)	0,411



Asma (%)	18 (11,4%)	1 (2,3%)	0,132
Hepatopatía (%)	0 (0,0%)	1 (2,3%)	0,484
IRC (%)	10 (10,8%)	4 (9,3%)	0,759
Cáncer (%)	15 (9,5%)	4 (9,3%)	1,000
Inmunosupresión (%)	5 (3,2%)	4 (9,3%)	0,051
Puntuación de Charlson (media±DE)	1,28±1,84	1,88±1,79	0,059
SOFA (media ± DE)	1,34±2,01	6,87±2,44	<b>&lt;0,001</b>
SOFÁ> 6 (%)	8 (5,1%)	27 (71,1%)	<b>&lt;0,001</b>
CURB65 (media ± DE)	0,64±0,89	2,58±1,08	<b>&lt;0,001</b>
CURB65> 2 (%)	22 (14,0%)	33 (86,8%)	<b>&lt;0,001</b>
Gravedad OMS (%)			<b>&lt;0,001</b>
• Grado 1	54 (34,2%)	0 (0,0%)	
• Grado 2	48 (30,4%)	0 (0,0%)	
• Grado 4	56 (35,4%)	0 (0,0%)	
• Grado 5	0 (0,0%)	36 (83,7%)	
• Grado 6	0 (0,0%)	7 (16,3%)	
PaO <sub>2</sub> / FiO <sub>2</sub> peor (media ± DE)	148,5±86,46	107,3 ±60,29	<b>0,012</b>
SAFI ingreso (media ± DE)	304,6±151,8	140,3±90,12	<b>0,001</b>
SaO <sub>2</sub> / FiO <sub>2</sub> peor (media ± DE)	304,64±151,87	140,30±90,12	<b>&lt;0,001</b>
<b>Análisis de sangre</b>			
Glucosa mg/dL (media ± DE)	108,94±77,93	113,60±34,68	0,713
Creatinina mg/dL (media ± DE)	0,88±0,57	0,82±0,33	0,518
Urea mg/dL (media ± DE)	37,02±11,99	40,95±32,76	0,221
Potasio mEq/L (media ± DE)	12,15±41,67	4,29±0,52	0,229
Sodio mEq/L (media ± DE)	138,39±22,09	140,34±3,66	0,575
Calcio mg / dL (media ± DE)	9,34±0,49	8,95 ± 0,81	<b>0,001</b>
Fósforo mg/mL (media ± DE)	3,83±1,71	4,12±2,63	0,450
Colesterol mg/dL (media ± DE)	193,89±42,96	176,68±60,81	<b>0,040</b>

Triglicéridos mg/dL (media ± DE)	123,95±62,42	172,42±116,65	<b>0,001</b>
HDL mg/dL (media ± DE)	57,90±23,98	43,38±20,46	<b>0,003</b>
Bilirrubina mg/ml (media ± DE)	1,69±8,18	1,31±3,94	0,768
ALT U / L (media ± DE)	29,42±24,73	134,32±677,42	0,053
AST U/ L (media ± DE)	26,21±14,33	204,83±1113,92	<b>0,045</b>
GGT U/ L (media ± DE)	43,10±59,17	88,03±142,13	<b>0,011</b>
FA U/L (media ± DE)	151,50±100,04	158,84±122,49	0,694
LDH U / L (media ± DE)	323,3±150,5	619,9±1880,4	0,053
Creatinfosfoquinasa U/L (media ± DE)	80,53±107,25	85,08±80,78	0,851
Ferritina ng / mL (media ± DE)	191,6±394,8	523,2±670,7	<b>&lt;0,001</b>
Fibrinógeno mg/dL (media ± DE)	355,62±94,93	430,50±166,93	<b>&lt;0,001</b>
Albúmina g / dL (media ± DE)	4,39±0,43	3,62±1,01	<b>&lt;0,001</b>
Proteínas g/dL (media ± DE)	6,80±0,64	6,32±1,11	<b>&lt;0,001</b>
Hemoglobina g / dL (media ± DE)	13,52±1,75	11,25±2,34	<b>&lt;0,001</b>
Leucocitos /μL (media ± DE)	6487,93± 2073,96	13259,27± 34777,13	<b>0,016</b>
Neutrofilos /μL (media ± DE)	1922,10±592,90	1667,70±947,00	<b>0,036</b>
Linfocitos / μL(media ± DE)	1922,05±592,97	10139,24± 54252,25	0,058
Plaquetas /μL (media ± DE)	248520,51± 166226,76	278512,20± 109183,82	0,275
Hierro mg/dL(media ± DE)	86,37±30,48	71,40±38,92	0,083
PCR ng / mL (media ± DE)	0,53±0,92	4,33±7,88	<b>&lt;0,001</b>
IL 6 ng/L (media ± DE)	198,62±1310,87	281,30±1171,41	0,737
VSG mm/h (media ± DE)	13,63±13,21	31,68±34,26	<b>&lt;0,001</b>
C3 mg/dL (media ± DE)	118,08±23,22	160,34±173,37	<b>0,012</b>
C4mg/dL (media ± DE)	25,48±6,33	31,26±14,22	<b>0,002</b>
Vitamina D ng/mL (media ± DE)	21,46±9,10	24,41±11,25	0,373
Dímero D ng / ml (media ± DE)	508,60±617,10	885,2 0± 963,20	<b>0,003</b>
Ig A sérica mg/dL(media ±	249,12±174,55	202,42±82,73	0,222



<b>DE)</b>			
Ig G sérica mg/dL (media ± DE)	998,04±239,30	1017,91±453,35	0,763
Ig M sérica mg/dL(media ± DE)	110,56±108,39	76,26±29,95	0,144
Grupo sanguíneo ABO (%)			<b>0,045</b>
• A	2 (1,7%)	2 (7,7%)	
• B	10 (8,5%)	6 (23,1%)	
• AB	53 (44,9%)	8 (30,8%)	
• 0	53 (44,9%)	10 (38,5%)	
Serología VIH negativa (%)	151 (100,0%)	34 (100,0%)	NA
Serología VHC negativa (%)	151 (100,0%)	34 (100,0%)	NA
Serología VHB positiva (%)	151 (100,0%)	34 (100,0%)	NA
<b>Tratamiento</b>			
Remdesivir (%)	7 (4,4%)	8 (18,6%)	<b>0,005</b>
Tocilizumab (%)	22 (13,9%)	22 (52,4%)	<b>&lt;0,001</b>
Anakinra (%)	3 (1,9%)	2 (4,7%)	0,635
Esteroides (%)	43 (27,2%)	28 (65,1%)	<b>&lt;0,001</b>
Lopinavir-ritonavir (%)	64 (40,5%)	16 (37,2%)	0,829
Hidroxiclороquina (%)	86 (54,4%)	28 (65,1%)	0,280
Azitromicina (%)	93 (58,9%)	27 (62,8%)	0,771
Betaferon (%)	3 (1,9%)	5 (11,6%)	0,014
<b>Evolución clínica</b>			
Neumonía (%)	103 (65,2%)	43 (100%)	<b>&lt;0,001</b>
Hospitalización (%)	107 (67,7%)	43 (100%)	<b>&lt;0,001</b>
Inestabilidad hemodinámica (%)	6 (4,0%)	33 (89,2%)	<b>&lt;0,001</b>
Insuficiencia renal aguda (%)	4 (2,7%)	20 (54,1%)	<b>&lt;0,001</b>
ECMO (%)	0 (0,0%)	6 (14,3%)	<b>&lt;0,001</b>
SDRA (%)	57 (36,1%)	43 (100,0%)	<b>&lt;0,001</b>
OAF (%)	37 (23,4%)	20 (46,5%)	<b>0,005</b>
VMI (%)	0 (0,0%)	36 (83,7%)	<b>&lt;0,001</b>
Ingreso a UCI (%)	42 (26,6%)	43 (100,0%)	<b>&lt;0,001</b>
Días hasta hospitalización (media ± DE)	8,60±5,38	7,00±4,57	0,088
Días hasta la UCI (media ±DE)	9,53±3,91	7,95±4,99	0,111

Días de estancia (media $\pm$ DE)	15,10 $\pm$ 13,59	37,76 $\pm$ 22,2	<b>&lt;0,001</b>
Exitus (%)	1 (0,6%)	7 (17,5%)	<b>&lt;0,001</b>

Abreviaturas: ALT, alanina transaminasa; AST, aspartato aminotransferasa; GGT, gammaglutamil transferasa; FA, fosfatasa alcalina; SDRA, síndrome de dificultad respiratoria aguda; CRP, proteína C reactiva; CURB-65, puntuación de gravedad de la neumonía adquirida en la comunidad; Unidad de cuidados intensivos; IMV, ventilación mecánica invasiva; LDH, lactato deshidrogenasa; HDL, lipoproteína de alta densidad; IL 6; interleuquina 6; VIH, virus de inmunodeficiencia humano; VHC, virus de hepatitis C; VHB, virus de hepatitis B; DE: desviación estándar; SOFA, evaluación de insuficiencia orgánica relacionada con la sepsis; IMC, índice de masa corporal; IRC, insuficiencia renal crónica; FIS, fecha de inicio de síntomas; VMI, ventilación mecánica invasiva; ECMO, oxigenación por membrana extracorpórea; OAF: oxígeno terapia de alto flujo

Aunque no se observaron diferencias significativas de edad o sexo entre los pacientes que requirieron o no VMI, los primeros presentaron peores puntuaciones de comorbilidad (1,88 $\pm$ 1,79 vs 1,28 $\pm$ 1,84, p= 0,059) con mayor porcentaje de enfermedad cardiovascular (32,6% vs 12%, p = 0,03), mayor gravedad (SOFA>6: 71,1% vs 5,11%, p= 0,001; CURB 65>2: 86,3% vs 14%), mayor elevación de marcadores analíticos de inflamación (ferritina  $\mu$ g/mL: 523,2 $\pm$ 670,7 vs 191,6 $\pm$ 394,8, p=0,001; PCR  $\mu$ g/mL 4,33 $\pm$ 7,88 vs 0,53 $\pm$ 0,92, p=0,001; VSG mm/h: 31,68  $\pm$ 34,26 vs 13,63  $\pm$ 13,21, p<0,001; Dímero D  $\mu$ g/mL: 885,2 $\pm$ 963,2 vs 508,6 $\pm$ 617,1, p=0,003; fibrinógeno mg/dL 430,50  $\pm$ 166,93 vs 355,62  $\pm$  94,93, p<0,001; C3 mg/dL: 160,34  $\pm$ 173,37, p<0,001; C4 mg/dL: 31,26  $\pm$ 14,22 vs 25,48  $\pm$ 6,33; p=0,002), tratamientos más intensos (esteroides: 65,1% vs 27,2%, p= 0,001; tocilizumab: 52,4% vs 13,9%, p= 0,001) y peor evolución clínica (Neumonía: 100% vs 65,2%, p<0,001; Hospitalización: 100% vs 67,7%, p<0,001; SDRA: 100% vs 36,1%, p=0,001; inestabilidad hemodinámica: 89,2% vs 4,0%, p<0,001; insuficiencia renal aguda: 54,1% vs 2,7%, p<0,001), ingreso en UCI: 100% vs 26,6%, p=0,001; media de días de estancia: 37,76  $\pm$  22,2 vs 15,10  $\pm$  13,59, p<0,001) ).



La mayor frecuencia de españoles (europeos) frente a latinoamericanos que requirió VMI probablemente es debido a su mayor edad ( $59 \pm 11$  años, frente a  $53 \pm 10$  años,  $p = 0,019$ ).

### 3. PAPEL DE LA INTERACCIÓN KIR/HLA EN LA GRAVEDAD DE LA COVID-19

En la **Tabla 12** estudiamos el papel del genotipo KIR-ligandos HLA clase I en el grupo de pacientes con la COVID -19, respecto al grupo control (análisis univariante).

**Tabla 12. Frecuencia de KIR y ligando KIR (HLA) en COVID-19 vs grupo control**

	Controles (n = 210)	COVID-19 (n = 201)
<b>Genes KIR</b>		
KIR2DL1	200 (95,2%)	194 (96,5%)
KIR2DL2	117 (55,7%)	102 (50,7%)
KIR2DL3	187 (89,0%)	181 (90,0%)
KIR2DL5	116 (55,2%)	114 (56,7%)
KIR3DL1	193 (91,9%)	184 (91,5%)
KIR2DS1	94 (44,8%)	87 (43,3%)
KIR2DS2	119 (56,7%)	101 (50,2%)
KIR2DS3	62 (29,5%)	60 (29,9%)
KIR2DS4	193 (91,9%)	183 (91,0%)
dKIR2DS4	166 (79,0%)	155 (77,1%)
<b>fKIR2DS4</b>	<b>76 (36,2%)</b>	<b>124(61,7%)<sup>a</sup></b>
KIR2DS5	180 (29,3%)	68 (33,8%)
KIR3DS1	253 (41,1%)	86 (42,8%)
<b>Genotipo centromérico</b>		
AA	93 (44,3%)	99 (49,3%)
Bx	117 (55,7%)	102 (50,7%)
<b>Genotipo telomérico</b>		
AA	118 (56,2%)	115 (57,2%)
Bx	92 (43,8%)	86 (42,8%)
<b>Ligando HLA-I KIR</b>		
C1	117 (85,5%)	168 (83,6%)
C2	135 (65,2%)	139 (69,2%)
Bw4	149 (75,3%)	145 (72,1%)
Ligandos KIR2DS4 <sup>b</sup>	129 (62,3%)	131 (65,2%)

Abreviaturas: COVID-19, enfermedad por coronavirus 2019; fKIR2DS4, funcional-KIR2DS4; HLA, antígeno leucocitario humano; IMV, ventilación mecánica invasiva; KIR, receptor de tipo inmunoglobulina de células asesinas; KIR2DS4, exón5 eliminado-KIR2DS4.

<sup>a</sup> Control frente a COVID-19,  $P < 6,8 \times 10^{-7}$  ( $P_c < 9,5 \times 10^{-6}$ ).

<sup>b</sup> Ligandos de KIR2DS4: HLA-A \* 11, C \* 2, C \* 4, C \* 5 y C \* 16(183).

NOTA: Valores de P estimados con la prueba  $\chi^2$ .  $P_c$  = Valor de P después de la corrección de Bonferroni (x14).

Tal como observamos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de distribución de los genotipos KIR AA y Bx centroméricos y teloméricos, ni de cada uno de los genes KIR inhibidores o activadores individualmente, ni de cada uno sus ligandos HLA (C1, C2, Bw4 o ligandos de KIR2DS4), excepto para fKIR2DS4, que mostró mayor frecuencia en los pacientes con COVID-19 que en los controles. (61,7% vs 36,2%,  $P_c < 9,5 \times 10^{-6}$ ). En consecuencia, fKIR2DS4 podría considerarse un factor de riesgo de COVID-19 sintomático.

Así mismo, se analizó mediante análisis univariante la distribución del genotipo KIR-ligando HLA clase I en los pacientes COVID-19 estratificados por gravedad, y se encontraron únicamente las diferencias buscadas al estratificar en dos grupos de riesgo según requiriesen VMI (grupo 5-6 de la OMS) o no (grupo 1-4 de la OMS). Atendiendo a dicho análisis, fKIR2DS4 se asoció con el grupo de pacientes con enfermedad grave por COVID-19 que requirieron VMI con frecuencias del 83,7% frente al 55,7% de los pacientes que no requirieron VMI ( $p < 0,001$ ) (**Tabla 13**).

Tras ello, se realizó el análisis de regresión logística multivariante, y se encontró que fKIR2DS4 fue una variable independiente de requerimiento de VMI, de ingreso en UCI,



o de evolución a una forma grave de la enfermedad con SOFA>6 puntos; junto con otras variables significativas asociadas (**Figura 8**).

**Tabla 13. Frecuencias de KIR y ligando KIR (HLA-I) en los grupos de estudio**

	Sin VMI (n = 158)	Con VMI (n = 43)
<b>Genes KIR</b>		
KIR2DL1	153 (96,8%)	41 (95,3%)
KIR2DL2	78 (49,4%)	24 (55,8%)
KIR2DL3	143 (90,5%)	38 (88,4%)
KIR2DL5	89 (56,3%)	25 (58,1%)
KIR3DL1	142 (89,9%)	42 (97,7%)
KIR2DS1	70 (44,3%)	17 (39,5%)
KIR2DS2	78 (49,4%)	23 (53,5%)
KIR2DS3	49 (31,0%)	11 (25,6%)
KIR2DS4	141 (89,2%)	42 (97,7%)
dKIR2DS4	124 (78,5%)	31 (72,1%)
<b>fKIR2DS4</b>	<b>88 (55,7%)</b>	<b>36 (83,7%)<sup>a</sup></b>
KIR2DS5	55 (34,8%)	13 (30,2%)
KIR3DS1	69 (43,7%)	17 (39,5%)
<b>Genotipo centromérico</b>		
AA	80 (50,6%)	78 (49,4%)
Bx	78 (49,4%)	21 (60,0%)
<b>Genotipo telomérico</b>		
AA	89 (56,3%)	26 (60,5%)
Bx	69 (43,7%)	17 (39,5%)
<b>Ligando HLA-I KIR</b>		
C1	130 (82,3%)	38 (88,4%)
C2	113 (71,5%)	26 (60,5%)
Bw4	115 (72,8%)	30 (69,8%)
Ligandos KIR2DS4 <sup>b</sup>	105 (66,5%)	26 (60,5%)

Abreviaturas: COVID-19, enfermedad por coronavirus 2019; fKIR2DS4, funcional-KIR2DS4; HLA, antígeno leucocitario humano; IMV, ventilación mecánica invasiva; KIR, receptor de tipo inmunoglobulina de células asesinas; KIR2DS4, exón5 eliminado-KIR2DS4.

<sup>a</sup> VMI versus no VMI,  $p < 0,001$ .

<sup>b</sup> Ligandos de KIR2DS4: HLA-A \* 11, C \* 2, C \* 4, C \* 5 y C \* 16(183).

NOTA: Valores de P estimados con la prueba  $\chi^2$ . Pc = Valor de P después de la corrección de Bonferroni (x14).

<b>Análisis de regresión logística multivariante de variables asociadas a la necesidad de VMI <sup>1</sup></b>			
Variable	OR	95% IC	p
KIR2DS4 funcional	4,74	1,76-12,79	0,002
E. Cardiovascular	4,23	1,65-10,85	0,003
Ferritina	1,001	1-1,002	0,005
Dímero D	1,001	1-1,002	0,008

<b>Análisis de regresión logística multivariante asociado a la necesidad de ingreso en UCI <sup>1</sup></b>			
Variable	OR	95% IC	p
KIR2DS4 funcional	2,51	1,087-5,82	0,031
E. Cardiovascular	3,94	1,31-11,86	0,014
Dímero D	1,001	1-1,002	0,005

<b>Análisis de regresión logística multivariante asociado a evolución grave de la COVID19 con SOFA&gt;6 <sup>2</sup></b>			
Variable	OR	95% IC	p
KIR2DS4 funcional	3,97	1,249-12,613	0,019
Hipertensión arterial	3,018	1,23-7,406	0,016

<sup>1</sup> Edad, sexo, hipertensión arterial y obesidad fueron también incluidas, sin resultados significativos

<sup>2</sup> Edad, sexo y obesidad fueron también incluidas, sin resultados significativos.

**Figura 8.** Análisis de regresión logística multivariante de la necesidad de VMI, de ingreso en UCI y de evolución grave de la COVID19 con SOFA>6 de pacientes con enfermedad por coronavirus 2019 en relación con la presencia de KIR2DS4f y otras variables significativamente asociadas: El KIR2SD4 funcional se asocia con la necesidad de ventilación mecánica invasiva (VMI), el ingreso en la unidad de cuidados intensivos (UCI) y una evolución grave de la COVID-19 con una puntuación en la escala SOFA>6.

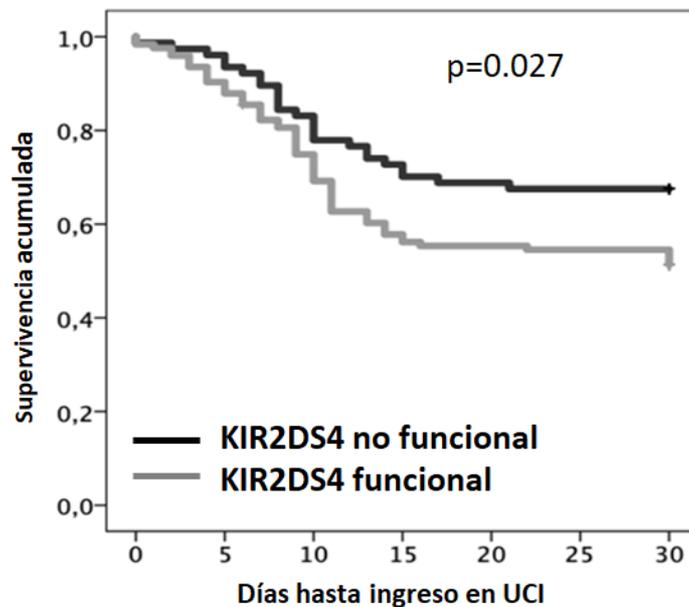
Concretamente, en esta **Figura 8** podemos observar como fKIR2DS4 fue una variable independiente capaz de predecir lo siguiente:

(1) La necesidad de VMI, (odds ratio [OR] = 4,74, p <0,002) junto con la presencia de enfermedad cardiovascular (OR = 4,23, p <0,003), el valor de ferritina en ng / mL (OR = 1, P <0,005) y el valor del dímero D en ng / mL (OR = 1, P <0,008).

(2) El requerimiento de ingreso en UCI (OR = 2,51, p <0,031), junto con la presencia de enfermedad cardiovascular (OR = 3,94, p <0,014) y el valor del dímero D en ng/mL (OR = 1, p <0,005).



(3) Una puntuación en escala SOFA >6 (OR= 3,97, p <0,019), junto con la presencia de hipertensión arterial (OR = 3,02, p <0,016) Además, se evaluó el impacto de fKIR2DS4 en el tiempo medio hasta ingreso en el hospital y hasta el ingreso en la unidad de cuidados intensivos (UCI) (**Figura 9**) mediante Kaplan-Meier y la prueba de rango logarítmico de Mantel-Haenszel, observándose que los pacientes con fKIR2DS4 tuvieron una mediana de tiempo más corta hasta el ingreso en el hospital (14,4; IC95% 12,2-16,7 frente a 16,05; IC95% 13,3-18,7 días, p=0,392) y hasta el ingreso en la UCI (20,5; IC95% 18-22 frente a 24,1; IC95% 21-25 días, p <0,027).



**Figura 9.** Pruebas de log-rank de Kaplan-Meier y Mantel-Haenszel para ingreso en UCI en relación a la presencia de KIR2DS4f.

Por otra parte, exploramos el papel de los alotipos HLA-I individuales en la susceptibilidad y gravedad de la infección por SARS-CoV-2. Al comparar controles y pacientes, observamos un papel protector para HLA-A\*26 (10,8% frente a 5,5%) y HLA-A\*33 (7,4% frente a 2,0%) y un papel de riesgo para HLA-A\*23 (4,4% frente a

11,4%), HLA-A\*24 (14,3% frente a 22,9%) y HLA-C\*01 (3,4% frente a 6,5%). Las diferencias significativas desaparecieron después de la corrección de Bonferroni (**Tabla 14**).

**Tabla 14. Frecuencias de alelos HLA de clase I en los grupos de estudio**

Alotipo HLA	Controles (n=210)	COVID-19 (n=201)	Sin VMI (n=146)	Con VMI (n=35)
HLA-A *01	46 (22,7%)	46 (22,9%)	35 (22,2%)	11 (25,6%)
*02	87 (42,9%)	86 (42,8%)	64 (40,5%)	22 (51,2%)
*03	43 (21,2%)	41 (20,4%)	35 (22,2%)	6 (14,0%)
*11	19 (9,4%)	17 (7,0%)	11 (7,0%)	3 (7,0%)
*23	<b>9 (4,4%)</b>	<b>23 (11,4%)<sup>p&lt;0.007</sup></b>	16 (10,1%)	7 (16,3%)
*24	<b>29 (14,3%)</b>	<b>46 (22,9%)<sup>p&lt;0.018</sup></b>	35 (22,2%)	11 (25,6%)
*25	9 (4,4%)	7 (3,5%)	7 (4,4%)	0 (0,0%)
*26	<b>22 (10,8%)</b>	<b>11 (5,5%)<sup>p&lt;0.036</sup></b>	9 (5,7%)	2 (4,7%)
*29	27 (13,3%)	34 (16,9%)	30 (19,0%)	4 (9,3%)
*30	25 (12,3%)	26 (12,9%)	22 (13,9%)	4 (9,3%)
*31	8 (3,9%)	13 (6,5%)	9 (5,7%)	4 (9,3%)
*32	10 (4,9%)	7 (3,5%)	7 (4,4%)	0 (0,0%)
*33	<b>15 (7,4%)</b>	<b>4 (2,0%)<sup>p&lt;0.009</sup></b>	2 (1,3%)	2 (4,7%)
*68	23 (11,3%)	16 (8,0%)	14 (8,9%)	2 (4,7%)
HLA-B *07	30 (14,7%)	30 (15,0%)	24 (15,3%)	6 (14,0%)
*08	23 (11,3%)	24 (12,0%)	17 (10,8%)	7 (16,3%)
*14	24 (11,8%)	26 (13,0%)	18 (11,5%)	8 (18,6%)
*15	22 (10,8%)	18 (9,0%)	13 (8,3%)	5 (11,6%)
*18	33 (16,2%)	35 (17,5%)	30 (19,1%)	5 (11,6%)
*27	7 (3,4%)	10 (5,0%)	7 (4,5%)	3 (7,0%)
*35	36 (17,6%)	47 (23,5%)	37 (23,6%)	10 (23,3%)
*38	17 (8,3%)	12 (6,0%)	9 (5,7%)	3 (7,0%)
*39	8 (3,9%)	9 (4,5%)	8 (5,1%)	1 (2,3%)
*40	16 (7,8%)	20 (10,0%)	15 (9,6%)	5 (11,6%)
*44	49 (24,0%)	51 (25,5%)	44 (28,0%)	7 (16,3%)
*49	21 (10,9%)	10 (5,0%)	9 (5,7%)	1 (2,3%)
*50	11 (5,4%)	12 (6,0%)	10 (6,4%)	2 (4,7%)
*51	33 (16,2%)	21 (10,5%)	15 (9,6%)	6 (14,0%)
*52	8 (3,9%)	4 (2,0%)	3 (1,9%)	1 (2,3%)
*53	5 (2,5%)	10 (5,0%)	9 (5,7%)	1 (2,3%)
*57	8 (3,9%)	6 (3,0%)	5 (3,2%)	1 (2,3%)
*58	4 (2,0%)	3 (1,5%)	1 (1,3%)	1 (2,3%)
HLA-C *01	<b>7 (3,4%)</b>	<b>13 (6,5%)<sup>p&lt;0.036</sup></b>	7 (4,4%)	6 (14,0%)



<b>*02</b>	16 (7,7%)	21 (10,4%)	16 (10,1%)	5 (11,6%)
<b>*03</b>	34 (16,4%)	33 (16,4%)	24 (15,2%)	9 (20,9%)
<b>*04</b>	44 (21,3%)	54 (26,9%)	43 (27,2%)	11 (25,6%)
<b>*05</b>	38 (18,4%)	33 (16,4%)	28 (17,7%)	5 (11,6%)
<b>*06</b>	31 (15,0%)	25 (12,4%)	21 (13,3%)	4 (9,3%)
<b>*07</b>	84 (40,6%)	79 (39,3%)	65 (41,1%)	14 (32,6%)
<b>*08</b>	26 (12,6%)	32 (15,9%)	24 (15,2%)	8 (18,6%)
<b>*12</b>	38 (18,4%)	36 (17,9%)	29 (18,4%)	7 (16,3%)
<b>*14</b>	10 (4,8%)	6 (3,0%)	5 (3,2%)	1 (2,3%)
<b>*15</b>	12 (5,8%)	14 (7,0%)	11 (7,0%)	3 (7,0%)
<b>*16</b>	35 (16,9%)	29 (14,4%)	23 (14,6%)	6 (14,0%)
<b>*17</b>	8 (3,9%)	8 (4,0%)	7 (4,4%)	1 (2,3%)

Abreviaturas: COVID-19: enfermedad por coronavirus 2019; VMI: ventilación mecánica invasiva; HLA: antígeno leucocitario humano. Valores de p estimados con Chi-Cuadrado. Todas las diferencias significativas desaparecieron después de la corrección de Bonferroni.

#### 4. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS Y ANALÍTICAS DE LOS PACIENTES EN FUNCIÓN DE LA PRESENCIA DE FKIR2DS4

En la **Tabla 15** se resumen las características clínicas y la evolución de los pacientes en función de la presencia de fKIR2DS4. Aunque no se observaron diferencias en edad, sexo u origen étnico según la presencia de fKIR2DS4, aquellos pacientes con fKIR2DS4 presentaron mayor puntuación SOFA ( $2,88 \pm 3,4$  vs  $1,67 \pm 2,17$ ,  $p < 0,006$ ), mayor frecuencia de SOFA  $\geq 6$  (24,2% vs 7,9%,  $p < 0,007$ ), menor tiempo hasta el ingreso hospitalario ( $7,36 \pm 5,79$  vs  $9,4 \pm 4,66$  días,  $p < 0,019$ ), mayor frecuencia de ingreso en UCI (48,4% vs 32,5%,  $p < 0,038$ ), mayor frecuencia de insuficiencia renal (17,7% vs 5,6%,  $p < 0,03$ ), mayor frecuencia de inestabilidad hemodinámica (27,4% vs 11,0%,  $p = 0,012$ ), mayor requerimiento de VMI (27,4% vs 13%,  $p = 0,026$ ) y mayor tiempo de hospitalización en UCI ( $23,7 \pm 21,15$  vs  $16,6 \pm 14,04$  días,  $p < 0,031$ ). No se detectaron diferencias en comorbilidad ni en el tratamiento administrado a los pacientes con COVID-19 moderado o grave según la presencia de fKIR2DS4. A nivel analítico

únicamente se encontró un nivel inferior de colesterolemia ( $184,66 \pm 49,45$  vs  $199,12 \pm 43,47$ ,  $p=0,039$ ;  $p=0,039$ ) y de vitamina D ( $20,23 \pm 8,79$  vs  $24,72 \pm 9,74$ ;  $p=0,035$ ) en el grupo con fKIR2DS4 vs grupo sin fKIR2DS4.

**Tabla 15. Características clínicas y evolución de los pacientes COVID-19 según fKIR2DS4**

Características	Sin fKIR2DS4 n = 77 (38,3%)	fKIR2DS4 n = 124 (61,7%)	Valor p
<b>Factores Demográficos</b>			
Edad, años (media $\pm$ DE)	57,7 $\pm$ 10,8	57,8 $\pm$ 12,5	0,947
Sexo femenino (%)	36,4%	41,9%	0,263
IMC (media $\pm$ DE)	28,42 $\pm$ 5,33	29,26 $\pm$ 7,17	0,488
Obesidad (%)			0,852
Grado I	15 (33,3%)	28 (32,2%)	
Grado II	17 (37,8%)	37 (42,5%)	
Grado III	13 (28,9%)	22 (25,3%)	
Etnia caucásica (%)	87,0%	83,9%	0,347
<b>Comorbilidad y severidad</b>			
Enfermedad cardiovascular (%)	10 (13%)	23 (18,5%)	0,402
Tabaquismo (%)	22 (28,6%)	34 (27,4%)	0,374
Consumo de sustancias (%)	1 (13%)	0 (0,0%)	0,809
Hipertensión (%)	29 (37,7%)	49 (39,5%)	0,910
Diabetes Mellitus (%)	16 (20,8%)	18 (14,6%)	0,092
Dislipemia (%)	26 (33,8%)	38 (30,6%)	0,760
Enfermedad cerebrovascular (%)	4 (5,2%)	5 (4,0%)	0,971
Bronquitis crónica (%)	3 (3,9%)	9 (7,3%)	0,530
Asma (%)	12 (15,6%)	7 (5,6%)	0,036
Hepatopatía (%)	0 (0,0%)	1 (0,8%)	1,000
IRC (%)	4 (9,1%)	5 (4,1%)	0,147
Cáncer (%)	9 (11,7%)	10 (8,1%)	0,545



Inmunosupresión (%)	5 (6,5%)	4 (3,3%)	0,192
Puntuación de Charlson (media ± DE)	1,65±1,99	1,27±1,74	0,153
SOFA (media ± DE)	1,67±2,17	2,88±3,40	<b>0,006</b>
SOFÁ> 6 (%)	6 (7,9%)	29 (24,2%)	<b>0,007</b>
CURB65 (media ± DE)	0,84 ±1,09	1,12±1,27	0,109
CURB65> 2 (%)	14 (18,7%)	41 (34,2%)	<b>0,030</b>
Gravedad OMS (%)			<b>0,010</b>
• Grado 1	20 (26,0%)	34 (27,4%)	
• Grado 2	24 (31,2%)	24 (19,4%)	
• Grado 4	26 (33,8%)	30 (24,2%)	
• Grado 5	6 (7,8%)	30 (24,2%)	
• Grado 6	1 (1,3%)	6 (4,8%)	
PaO <sub>2</sub> / FiO <sub>2</sub> peor (media ± DE)	142±76,7	124,9±79,8	0,309
SAFI ingreso (media ± DE)	391,60±100,79	372,58±106,60	0,306
SaO <sub>2</sub> / FiO <sub>2</sub> peor (media ± DE)	287,93±159,03	256,86±153,97	0,289
<b>Análisis de sangre</b>			
Glucosa mg/dL (media ± DE)	103,54±24,02	114,09±89,23	0,316
Creatinina mg/dL (media ± DE)	0,87±0,30	0,86±0,63	0,928
Urea mg/dL (media ± DE)	38,19±14,12	37,64±20,80	0,839
Potasio mEq/L (media ± DE)	15,25±54,00	7,46±19,78	0,154
Sodio mEq/L (media ± DE)	137,89±22,37	139,37±17,92	0,613
Calcio mg / dL (media ± DE)	9,36±0,54	9,21±0,61	0,087
Fósforo mg/mL (media ± DE)	3,73±1,82	3,99±2,01	0,431
Colesterol mg/dL (media ± DE)	199,12±43,47	184,66±49,45	<b>0,039</b>
Triglicéridos mg/dL (media ± DE)	129,29±68,25	141,27±90,56	0,387

HDL mg/dL (media ± DE)	59,02±30,41	50,51±18,60	0,072
Bilirrubina mg/ml (media ± DE)	0,66±0,41	2,21±9,50	0,159
ALT U / L (media ± DE)	32,30±27,12	63,41±396,49	0,493
AST U/ L (media ± DE)	27,84±16,88	86,19±651,56	0,433
GGT U/ L (media ± DE)	51,08±65,72	54,22±96,37	0,840
FA U/L (media ± DE)	141,44±103,40	160,16±105,91	0,240
LDH U / L (media ± DE)	331,71±197,68	417,72±1092,83	0,501
Creatinfosfoquinasa U/L (media ± DE)	87,72±130,21	77,54±72,35	0,644
Ferritina ng / mL (media ± DE)	263,11±598,61	260,23±398,38	0,968
Albúmina g / dL (media ± DE)	4,28±0,57	4,19±0,73	0,365
Proteínas g/dL (media ± DE)	6,79±0,66	6,66±0,84	0,268
Hemoglobina g / dL (media ± DE)	13,39±1,85	12,83±2,22	0,068
Leucocitos /μL (media ± DE)	6628,42±2315,43	8694,11±20398,53	0,381
Neutrofilos /μL (media ± DE)	4131.36±3815,90	4460.41±3719.30	0,550
Linfocitos / μL(media ± DE)	1981.58±654,26	4669.00±31571,32	0,459
Plaquetas /μL (media ± DE)	243931,58±85924,86	261565,29±187542,42	0,442
PCR ng / mL (media ± DE)	0,69±1,34	1,75±4,97	0,072
IL 6 ng/L (media ± DE)	161,72±1017,96	256,74±1405,28	0,674
VSG mm/h (media ± DE)	16,68±18,15	16,72±20,47	0,991
Vitamina D ng/mL (media ± DE)	24,72±9,74	20,23±8,79	<b>0,035</b>
Dímero D ng / ml (media ± DE)	600,83±750,20	581,29±701,45	0,855
Fibrinógeno mg/dL (media ± DE)	376,32± 97,58	366,69±127,50	0,577



Ig A sérica mg/dL(media ± DE)	275,10± 246,28	223,56±90,11	0,077
Ig G sérica mg/dL (media ± DE)	996,90±270.18	1003,52±289,53	0,895
Ig M sérica mg/dL(media ± DE)	95,24±57,34	110,52±117,95	0,395
Grupo sanguíneo ABO (%)			0,922
• A	2,0±3,6	2,0±2,3	
• B	6,0±10,7	10,0±11,4	
• AB	25,0±44,6	36,0 ±40,9	
• 0	23,0±41,1	40,0±45,5	
Serología VIH negativa (%)	72 (100,0%)	0 (0,0%)	NA
Serología VHC negativa (%)	72 (100,0%)	113 (100,0%)	NA
Serología VHB positiva (%)	0 (0,0%)	1 (0,9%)	1,000
<b>Tratamiento</b>			
Remdesivir (%)	7 (9,1%)	8 (6,5%)	0,677
Tocilizumab (%)	15 (19,7%)	29 (23,4%)	0,668
Anakinra (%)	0 (0,0%)	5 (4,0%)	0,187
Esteroides (%)	23 (29,9%)	48 (38,7%)	0,262
Lopinavir-ritonavir (%)	28 (36,4%)	52 (41,9%)	0,525
Hidroxiclороquina (%)	44 (57,1%)	70 (56,5%)	1,000
Azitromicina (%)	48 (62,3%)	72 (58,1%)	0,651
Betaferon	1 (1,3%)	7 (5,6%)	0,246
<b>Evolución clínica</b>			
Neumonía (%)	55 (71,4%)	91 (73,2%)	0,706
Hospitalización (%)	57 (74,0%)	93 (75,0%)	1,000
Inestabilidad hemodinámica (%)	8 (11,0%)	31 (27,4%)	<b>0,012</b>
Insuficiencia renal	4 (5,6%)	20 (17,7%)	<b>0,030</b>

aguda (%)			
ECMO (%)	2 (2,6%)	4 (3,2%)	1,000
SDRA (%)	36 (46,8%)	64 (51,6%)	0,600
OAF (%)	19 (24,7%)	38 (30,6%)	0,452
VMI (%)	10 (13,0%)	34 (27,4%)	<b>0,026</b>
Ingreso a UCI (%)	25 (32,5%)	60 (48,4%)	<b>0,038</b>
Días hasta hospitalización (media $\pm$ DE)	9,40 $\pm$ 5,79	7,36 $\pm$ 4,66	<b>0,019</b>
Días hasta la UCI (media $\pm$ DE)	23,34 $\pm$ 10,04	20,10 $\pm$ 11,17	<b>0,040</b>
Días de estancia (media $\pm$ DE)	16,6 $\pm$ 14,04	23,7 $\pm$ 21,15	<b>0,031</b>
Exitus (%)	2 (2,6%)	6 (4,9%)	0,672

Abreviaturas: Abreviaturas: ALT, alanina transaminasa; AST, aspartato aminotransferasa; GGT, gammaglutamil transferasa; FA, fosfatasa alcalina; SDRA, síndrome de dificultad respiratoria aguda; CRP, proteína C reactiva; CURB-65, puntuación de gravedad de la neumonía adquirida en la comunidad; Unidad de cuidados intensivos; IMV, ventilación mecánica invasiva; LDH, lactato deshidrogenasa; HDL, lipoproteína de alta densidad; IL 6; interleuquina 6; VIH, virus de inmunodeficiencia humano; VHC, virus de hepatitis C; VHB, virus de hepatitis B; DE: desviación estándar; SOFA, evaluación de insuficiencia orgánica relacionada con la sepsis; IMC, índice de masa corporal; IRC, insuficiencia renal crónica; FIS, fecha de inicio de síntomas; VMI, ventilación mecánica invasiva; ECMO, oxigenación por membrana extracorpórea; OAF: oxígeno terapia de alto flujo; fKIR2DS4, funcional-KIR2DS4; NA: not applicable

## 5. LAS CÉLULAS NK KIR2DS4+ CON UN INMUNOFENOTIPO DISTINTIVO SE EXPANDIERON EN LA ENFERMEDAD POR CORONAVIRUS 2019

Para comprender la relación que pueden tener las células NK KIR2DS4+ con la gravedad de la enfermedad, se analizaron los subtipos de linfocitos y el repertorio de células NK KIR<sup>+</sup> en controles sanos y en pacientes sin y con VMI. Para evitar las secuelas de los tratamientos intensos aplicados a los pacientes con enfermedad grave, el estudio celular se realizó el día 75 (IQR, 61-92) tras el alta hospitalaria. Sin embargo, en comparación con los controles, los pacientes (sin y con VMI, respectivamente)



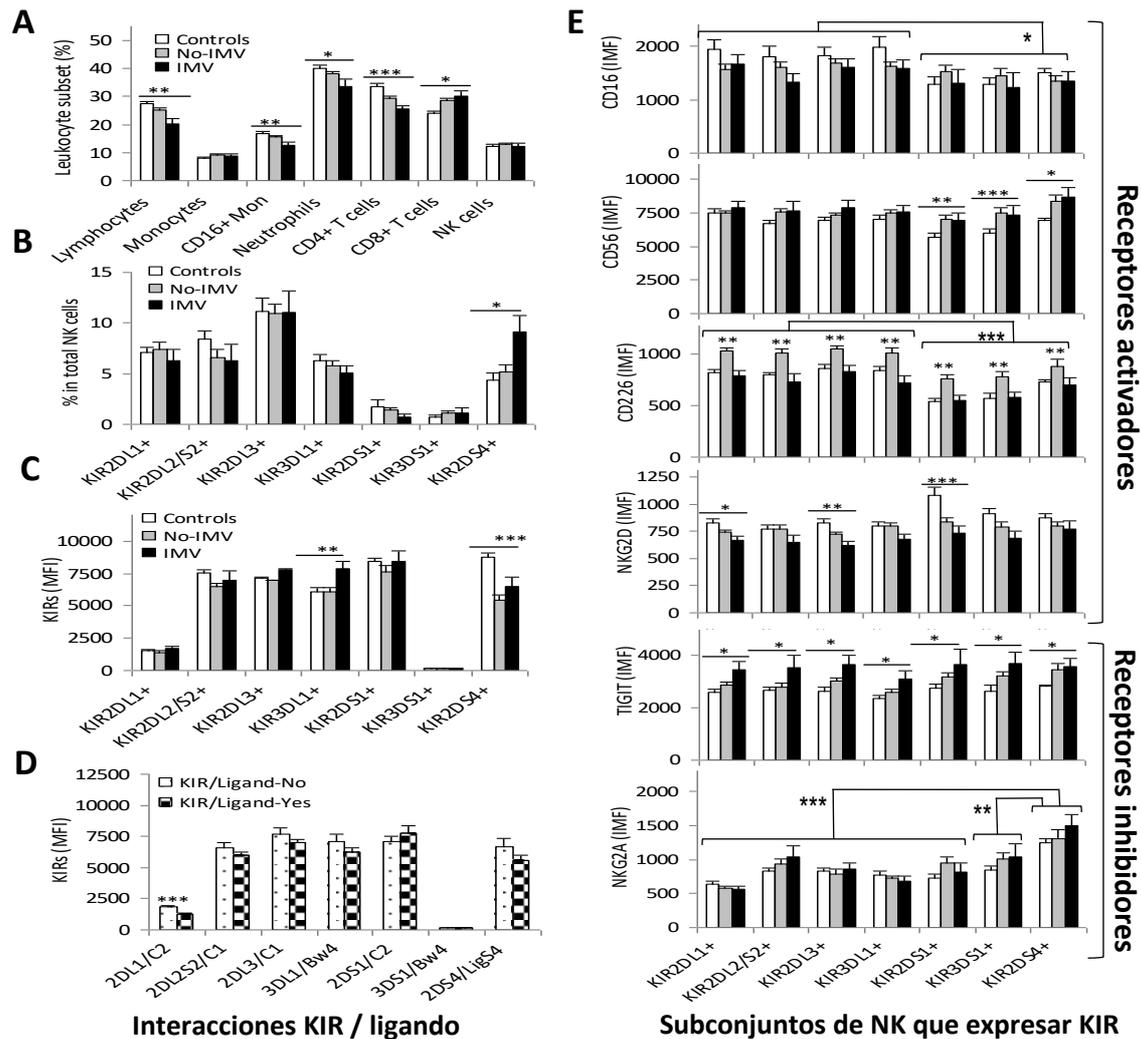
presentaron un número reducido de linfocitos (27,4%, 25,2% y 20,2%;  $p < 0,01$ ), monocitos no clásicos (16,7%, 15,7% y 12,6%;  $p < 0,01$ ), neutrófilos (40,3%, 38,1% y 33,7%;  $p < 0,05$ ) y linfocitos T CD4<sup>+</sup> (33,7%, 29,4% y 25,6%;  $p < 0,001$ ) y un mayor número de linfocitos T CD8<sup>+</sup> (23,9%, 28,5%, 30,0%;  $p < 0,05$ ). Estos valores se acentuaron en pacientes con VMI. Por su parte, no se encontraron diferencias en el número de células NK entre los diferentes grupos. (**Figura 10A**).

Aunque los números de células NK CD56<sup>bright</sup> y CD56<sup>dim</sup>, así como el repertorio de células NK KIR<sup>+</sup> no mostraron diferencias significativas entre controles y pacientes, las células NK que expresan KIR2DS4 como el único receptor KIR (KIR2DS4<sup>+</sup> único) mostraron una mayor frecuencia en pacientes que requerían VMI respecto a los pacientes sin VMI y controles (9,1%, 5,1% y 4,3%;  $p < 0,05$ ) (**Figura 10B**).

Cuando se estudió la expresión de cada KIR como Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) en células NK con KIR<sup>+</sup> únicos, no se encontraron diferencias entre los 3 grupos de estudio para KIR2DL1<sup>+</sup>, KIR2DL2/S2<sup>+</sup>, KIR2DL3<sup>+</sup>, KIR2DS1<sup>+</sup> o KIR3DS1<sup>+</sup> de células NK, mientras que se encontró un ligero aumento de KIR3DL1 en pacientes que requirieron VMI en comparación con los que no lo hicieron o con los controles (7869,5, 6076,1 y 6083,9, MFI;  $p < 0,01$ ). Sin embargo, la expresión de KIR2DS4 mostró una modulación a la baja prominente en ambos grupos de pacientes en comparación con los controles (5392,5, 6500 y 8721,6, MFI;  $P < 0,001$ ) (**Figura 10C**).

Debido a que la expresión de los receptores KIR se modula negativamente cuando interactúan con su ligando HLA-I específico (183), analizamos la expresión de los KIR en presencia de sus ligandos HLA en pacientes con COVID-19. Como ya está descrito, la presencia de ligando C2 indujo de manera muy significativa la modulación a la baja de KIR2DL1 (1847.5 vs 1296.8,  $P < 0,001$ ). Sin embargo, los ligandos C1, ligandos

Bw4 y HLA-A\*11/C\*2/C\*4/C\*5/C\*16 indujeron modulaciones descendentes leves no significativas de sus respectivos receptores KIR2DL2/S2-L3, KIR3DL1 y KIR2DS4 (Figura 10D). Por lo tanto, la fuerte modulación descendente observada para KIR2DS4 en pacientes con COVID-19 no pareció estar asociada con la presencia de sus ligandos HLA.



**Figura 10.** Subtipos de leucocitos y expresión de receptores activadores e inhibidores en células asesinas naturales (NKcs) de sangre periférica en pacientes y controles con enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19). (A) Porcentaje de linfocitos, monocitos y neutrófilos totales (% con respecto al leucocito total), monocitos no clásicos CD16<sup>+</sup> (% con respecto al monocito total) y linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> y NKcs CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> (% con respecto al total de linfocitos) en controles sanos



(blancos) y pacientes con COVID-19 que sí (gris) o no (negro) requirieron ventilación mecánica invasiva (VMI). (B) Porcentaje de subtipos de células NK positivas para el receptor KIR (% con respecto al total de células NK) en controles y pacientes. (C) Intensidad media de fluorescencia (IMF) de los receptores KIR inhibidores y activadores en células NK que expresan un KIR individual en controles y pacientes. (D) La IMF de los receptores KIR inhibidores y activadores en células NK que expresan cada KIR individual en presencia (barras punteadas) o ausencia (barras marcadas) de sus respectivos ligandos HLA, C1, C2, Bw4 y HLA-A\*11/C\*02/C\*04/C\*05/C\*16 (ligandos KIR2DS4). (E) La IMF de CD226, CD16, CD56, TIGIT, NKG2A y NKG2D en células NK que expresan KIR individuales para controles y pacientes. El análisis de varianza se utilizó para comparar controles con pacientes, o para comparar la expresión de un receptor particular entre diferentes subconjuntos de KIR<sup>+</sup> NKc. \*, P <0,05; \*\*, p <0,01; \*\*\*, P <0,001.

Las características inmunofenotípicas adicionales de las células NK KIR2DS4<sup>+</sup> se muestran en la **Figura 10E**. La expresión de CD16 no mostró diferencias entre pacientes y controles, pero, en general, las células NK que expresan KIR activadores (KIR2DS1, KIR3DS1 o KIR2DS4) mostraron niveles más bajos de CD16 que las células NK que expresan KIR inhibidores ([iKIRs] P <0,05). La expresión de CD56 fue mayor en los pacientes que en los controles, en las células NK que expresaban KIR2DS1 (P <0,01), KIR3DS1 (P <0,001) y KIR2DS4 (P <0,05) pero no en células NK que expresaban iKIR. La expresión de CD226 fue mayor en todos los subtipos de células NK en pacientes que no requirieron VMI (p <0,01, para todos los subconjuntos de KIR<sup>+</sup>) que en los controles y pacientes con VMI. CD226 mostró una expresión más baja en células NK que llevan aKIR que en aquellos que llevan iKIR (p <0,001). La expresión de NKG2D fue menor en los pacientes que en los controles para todos los subtipos de células NK, con reducciones estadísticamente significativas en los subtipos de KIR2DL1<sup>+</sup> (p <0,05), KIR2DL3<sup>+</sup> (p <0,01) o KIR2DS1<sup>+</sup> (p <0,001). Por el contrario, la expresión de TIGIT fue mayor en los pacientes (particularmente en pacientes con VMI) que en los controles (P <0,05, para todos los subtipos de células NK KIR<sup>+</sup>). Finalmente, aunque no se encontraron diferencias significativas entre

controles y pacientes en la expresión de NKG2A, en general, las células NK KIR2DS4<sup>+</sup> mostraron una mayor expresión de NKG2A que aquellas con KIR3DS1<sup>+</sup> ( $P < 0,01$ ) y los otros subtipos de células NK KIR<sup>+</sup> ( $P < 0,001$ ).

En conjunto, las células NK KIR2DS4<sup>+</sup> en COVID-19 severo mostraron un fenotipo distintivo diferente de otros subtipos de células NK que consistió en: KIR<sup>bajo</sup> CD16<sup>bajo</sup> CD226<sup>bajo</sup> CD56<sup>alto</sup> TIGIT<sup>alto</sup> NKG2A<sup>alto</sup>.

## **6. LOS RECEPTORES KIR ACTIVADORES B-TELOMÉRICOS ESTÁN ASOCIADOS CON LA COVID-19 MÁS LEVE EN PACIENTES CON HLA-B\*15:01.**

Debido a que la frecuencia de los ligandos de KIR2DS4 HLA-A\*11, C\*02, C\*04, C\*05 y C\*16 (184), en conjunto o individualmente, no mostraron diferencias entre controles y pacientes, estudiamos otros ligandos HLA putativos. La frecuencia de fKIR2DS4 permaneció dentro de los rangos descritos para el grupo global COVID-19 (61,7%) para todos los alotipos HLA-A, -B o -C, excepto para HLA-B\*15, donde la frecuencia de fKIR2DS4 fue menor en el grupo de pacientes que la observada en controles HLA-B\*15 (16,7% frente a 40,9%,  $p < 0,093$ ). Por el contrario, la frecuencia de fKIR2DS4 en pacientes y controles HLA-B\*15 negativos, permaneció inalterada (66,5% frente a 35,7%,  $P < 3,1 \times 10^{-9}$ ).

Para comprender por qué podría estar sucediendo, se evaluó la frecuencia de cada receptor KIR y del genotipo KIR en pacientes y controles HLA-B\*15 positivos y negativos, calculándose el valor de p estimado en la prueba  $\chi^2$  de Pearson y corregido



(Pc) por el número de comparaciones ( $\times 11$ ) (**Tabla 16**). Se observó mayor frecuencia de receptores KIR B-teloméricos KIR2DL5 (77,8% vs 45,5%,  $P < 0,039$ ,  $P_c = 0,429$ ), KIR2DS1 (72,2% vs 27,3%,  $P < 0,006$ ,  $P_c = 0,066$ ), KIR2DS5 (66,7% vs 23,8%,  $P < 0,006$ ,  $P_c = 0,066$ ), KIR3DS1 (72,2% vs 22,7%,  $P < 0,002$ ,  $P_c = 0,022$ ) y de genotipo telomérico Bx (72,2% vs 22,7%,  $P < 0,002$ ,  $P_c = 0,022$ ) en pacientes con HLA-B\*15 que en los controles. Sin embargo, la frecuencia de todos los receptores KIR permaneció inalterada en pacientes y controles negativos para HLA-B\*15. Por el contrario, la frecuencia de KIR3DL1 (A-telomérico) se redujo en pacientes con HLA-B\*15 en comparación con los controles (66,7% frente a 100%,  $P < 0,005$ ,  $P_c = 0,055$ ).

**Tabla 16. Total HLA-B\*15 and B\*15 subtipos en combinación con genotipo KIR**

KIR gen presente	HLA-B*15 (No)		HLA-B*15 (Yes)		B*15:01	Other B*15
	Control (n=182)	Covid-19 (n=179)	Control (n=22)	Covid-19 (n=18)	Covid-19 (n=11)	Covid-19 (n=7)
KIR2DL1	174 (95.6%)	175 (96.2%)	20 (90.9%)	18 (100%)	11 (100%)	7 (100%)
KIR2DL2	103 (56.6%)	91 (50.0%)	14 (63.6%)	11 (61.1%)	7 (63.6%)	4 (57.1)
KIR2DL3	164 (90.1%)	164 (90.1%)	17 (77.3%)	16 (88.6%)	10 (90.9%)	6 (85.7%)
KIR2DL5	<b>105</b> <b>(57.7%)</b>	<b>99</b> <b>(54.4%)</b>	<b>10</b> <b>(45.5%)</b>	<b>14</b> <b>(77.8%)<sup>a</sup></b>	10 (90.9%)	4 (57.1%)
KIR3DL1	<b>165</b> <b>(90.7%)</b>	<b>171</b> <b>(94.0%)</b>	<b>22</b> <b>(100%)</b>	<b>12</b> <b>(66.7%)<sup>b</sup></b>	7 (63.6%)	5 (71.4)
KIR2DS1	<b>87</b> <b>(47.8%)</b>	<b>73</b> <b>(40.1%)</b>	<b>6</b> <b>(27.3%)</b>	<b>13</b> <b>(72.2%)<sup>c</sup></b>	10 (90.9%)	3 (42.9%)
KIR2DS2	105 (57.7%)	90 (49.5%)	14 (63.6%)	11 (61.1%)	7 (63.6%)	4 (57.1%)
KIR2DS3	56 (30.8%)	56 (30.8%)	6 (27.3%)	4 (22.2%)	3 (27.3%)	1 (14.3%)
fKIR2DS4	65 (35.7%)	121 (66.5%) <sup>d</sup>	9 (40.9%)	3 (16.7%)	2 (18.2%)	1 (14.3%)
KIR2DS5	<b>63</b> <b>(34.6%)</b>	<b>55</b> <b>(30.2%)</b>	<b>5</b> <b>(23.8%)</b>	<b>12</b> <b>(66.7%)<sup>e</sup></b>	9 (81.8%)	3 (42.9%)
KIR3DS1	<b>86</b> <b>(47.3%)</b>	<b>72</b> <b>(39.6)</b>	<b>5</b> <b>(22.7%)</b>	<b>13</b> <b>(72.2%)<sup>f</sup></b>	9 (90.9%)	3 (42.9%)
AA-Cent	79	91	8	7	4	3

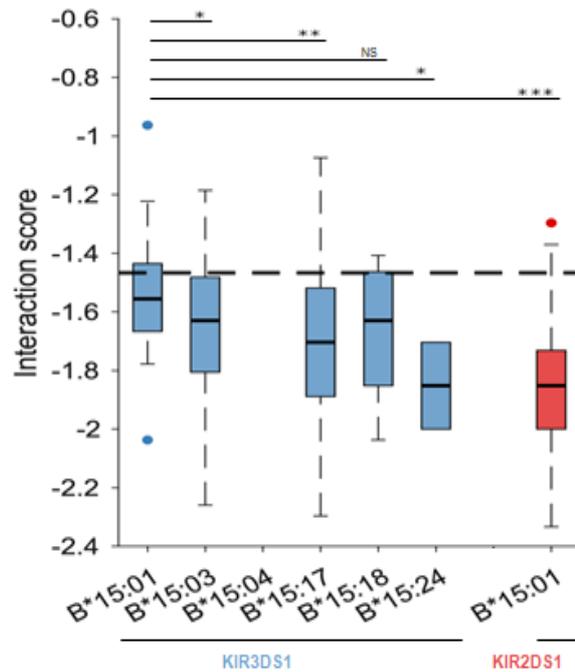
	(43.4%)	(50.0%)	(36.4%)	(38.9%)	(36.4%)	(42.9%)
<b>Bx-Cent</b>	103	91	14	11	7	4
	(56.6%)	(50.0%)	(63.6%)	(61.1%)	(63.6%)	(57.1%)
<b>AA-Tel</b>	96	110	17	5	1	4
	(52.7%)	(60.4%)	(77.3%)	(27.8%)	(9.1%)	(57.1%)
<b>Bx-Tel</b>	<b>86</b>	<b>72</b>	<b>5</b>	<b>13</b>	10	3
	<b>(47.3%)</b>	<b>(39.6%)</b>	<b>(22.7%)</b>	<b>(72.2%)<sup>g</sup></b>	(90.9%)	(42.9%)

Abreviaturas: HLA: antígeno leucocitario humano; KIR: receptor tipo inmunoglobulina de células asesinas. a  $p < 0,054$ ; b  $p < 0,005$ ; c  $p < 0,006$ ; d  $p < 3,1 \times 10^{-9}$ ; e  $p < 0,006$ ; f  $p < 0,002$ ; g  $p < 0,002$  comparando controles y pacientes dentro de grupos HLA-B\*15 negativos o positivos. Otros B\*15: HLA-B\*15:03, \*15:04, \*15:17, \*15:18 y \*15:24

En un análisis de mayor resolución, encontramos que en los pacientes con COVID-19 los aKIR B-teloméricos (KIR2DS1, KIR2DS5 y KIR3DS1) se asociaron específicamente con HLA-B\*15:01, pero no con otros subtipos de HLA-B\*15 (HLA-B\*15:03, -B\*15: 04, -B\*15:17, -B\*15: 18, -B\*15: 24). Así, en comparación con los controles sanos con HLA-B\*15:01, las frecuencias de KIR2DS1 (27,3% vs 90,9%,  $P < 0,001$ ,  $P_c = 0,011$ ), KIR2DS5 (22,7% vs 81,8%,  $P < 0,002$ ,  $P_c = 0,022$ ) y KIR3DS1 (22,7% vs 90,9%,  $P < 0,0003$ ,  $P_c = 0,0033$ ) fueron mucho mayores en pacientes con HLA-B\*15:01. No se encontraron diferencias significativas entre pacientes y controles con otros subtipos de HLA-B\*15.

Para determinar aún más las interacciones putativas aKIR B-teloméricos/HLA-B\*15, utilizamos un enfoque computacional (177) para modelar la afinidad (puntuaciones de interacción) para cada subtipo de HLA-B\*15 (**Figura 11**).





**Figura 11.** Predicción computacional de las puntuaciones de interacción KIR3DS1 (recuadros azules) y KIR2DS1 (recuadro rojo) con diferentes alotipos HLA-B\*15 que presentan péptidos del SARS-CoV-2. En cada diagrama de caja, las líneas negras sólidas del medio indican la mediana, los bordes indican el primer y tercer cuartiles, los bigotes indican un rango intercuartílico de 1,5 y los círculos indican valores atípicos de los valores de puntuación de interacción. La línea discontinua negra representa la puntuación predicha para la interacción KIR3DL1 / KIR3DS1 con el ligando Bw4. NetMHCpan-4.1 no predijo ningún péptido de SARS-CoV-2 de unión fuerte para el alotipo HLA-B\*15:04. \* P <0,05; \*\*, p <0,001; \*\*\*, P <0,0001; no significativo (NS) P > 0.05.

Los HLA-B\*15:01 que presentaban péptidos de SARS-CoV-2 tenían puntuaciones de interacción más altas y, por lo tanto, era más probable que interactuara con KIR3DS1 que con HLA-B\*15:03 (P <0,05), HLA-B\*15:04 (no se encontraron péptidos para este alotipo), HLA-B\*15:17 (P <0,001), HLA-B\*15:18 (P =0,1) y HLA-B\*15:24 (P < 0,05). Se encontró que las puntuaciones de interacción para KIR3DS1/ HLA-B\*15:01 estaban dentro del rango de su ligando Bw4 habitual (180). Además, las puntuaciones de interacción para KIR2DS1/HLA-B\*15:01 que presentan péptidos de SARS-CoV-2

fueron mucho más bajas que las de KIR3DS1 ( $P < 0,0001$ ), lo que apunta a que KIR3DS1 es el receptor más probable que interactúe con HLA-B\*15:01.

El genotipo telomérico Bx fue más frecuente en pacientes HLA-B\*15:01 que no requirieron VMI (84,6% vs 15,4%,  $p = 0,09$ ), por lo que se asoció con COVID-19 más leve, lo cual es razonable porque la frecuencia del fKIR2DS4 A-telomérico (asociado con enfermedad grave) disminuyó en estos pacientes.





## DISCUSIÓN





## DISCUSIÓN

En nuestro estudio, hemos averiguado que los receptores KIR activadores teloméricos, fKIR2DS4 por sí mismo y KIR3DS1 en presencia de HLA-B\*15:01, están asociados con la evolución a COVID-19 severo y leve/moderado respectivamente; lo cual apoya un papel decisivo de los receptores KIR de células NK en la patogénesis y la variabilidad clínica de la COVID-19.

A pesar de la multitud de investigaciones realizados desde el inicio de la pandemia que han estudiado los factores asociados a la gravedad de la COVID-19 (185), todavía a día de hoy la cuestión de por qué el pronóstico de los pacientes tras la infección por SARS-CoV2 es tan heterogéneo continúa sin estar resuelta.

Si recordamos la clasificación de los estadios patológicos de la COVID19 en 3 fases según la progresión de la enfermedad (35), se puede hacer una categorización clínica de severidad en la COVID-19 en tres estadios: 1) leve (sin disnea, frecuencia respiratoria normal  $< 22$  respiraciones por minuto y saturación de O<sub>2</sub> basal  $\geq 94\%$ ; con un aumento del riesgo atribuido por asociar una edad mayor o igual a 65 años o presencia de comorbilidades, 2) moderada (disnea de esfuerzo, frecuencia respiratoria  $\geq 22$  respiraciones por minuto y saturación basal 90-94%; con riesgo de progresión si tiene 7 días o más de evolución, si requiere oxigenoterapia y/o si tiene infiltrados pulmonares  $\geq 50\%$  en 24-48 horas) y 3) grave (disnea de reposo, saturación de O<sub>2</sub> basal  $< 90\%$ , frecuencia respiratoria 24-30 respiraciones por minuto, SAFI $<315$  o PAFI  $<300$ )(72,186).



En nuestro estudio, realizamos la estratificación de los pacientes en dos grupos, con evolución leve/moderado vs grave, en base a distintos criterios que marcaron el dintel de gravedad, como fueron: el criterio de ingreso en la unidad de cuidados intensivos (UCI), la necesidad de intubación orotraqueal (IOT), el requerimiento de soporte respiratorio con ventilación mecánica invasiva (VMI) o la obtención de una puntuación superior a 6 en la escala SOFA (Sequential Organ Failure Assessment score o score para Evaluación de Fallo Orgánico Secuencial). El SOFA es un sistema de medición diaria de fallo orgánico múltiple de seis disfunciones orgánicas ( $PaO_2/FiO_2$ , plaquetas  $10^3/mm^3$ , bilirrubina, hipotensión, Score Glasgow coma, creatinina), que constituye un buen indicador pronóstico durante los primeros días de ingreso, de modo que un aumento en la puntuación  $SOFA \geq 2$  se asocia con una mortalidad de  $\geq 10\%$  (174). Tras dicha estratificación por gravedad de los pacientes, estudiamos las diferencias de distribución de distintos factores pronósticos asociadas a la COVID-19 en ambos grupos.

Actualmente, en base a los trabajos publicados hasta el momento, sabemos que los principales factores de riesgo asociados a una forma grave de la enfermedad son: 1) la edad avanzada: con un aumento de la tasa de hospitalización y mortalidad, de hasta el 18% y 15%, respectivamente, para mayores de 80 años al inicio de la pandemia (63), 2) el no estar vacunado: existiendo un punto claro de inflexión a partir de la vacunación, que redujo drásticamente las tasas de hospitalización e ingreso en UCI en los grupos etarios con altas coberturas vacunales (70), y 3) la presencia de ciertas comorbilidades médicas subyacentes: ya que aunque la enfermedad grave puede ocurrir en cualquier individuo, la mayoría tienen al menos un factor de riesgo, con un número medio de comorbilidades preexistentes de 2,7 (187), siendo la enfermedad cardiovascular y la diabetes las más frecuentes según distintas series de casos hospitalizados publicadas; si

bien estas series incluyen casos de distinta gravedad y no son claramente interpretables (60):

En nuestro trabajo, aunque no hubo diferencias por edad según la gravedad de la COVID-19, sí se observó: 1) un índice de masa corporal (IMC) medio superior y un mayor porcentaje de obesidad grado I y II en aquellos pacientes que requirieron ingreso en UCI e IOT, respectivamente, 2) una mayor frecuencia de enfermedad cardiovascular en el grupo de pacientes de UCI y que necesitó VMI, y 3) una mayor proporción de hipertensos y dislipémicos en el grupo de pacientes con COVID-19 grave que ingresó en UCI y obtuvo puntuaciones en la escala SOFA >6. Por el contrario, no se encontraron diferencias según gravedad en el porcentaje de tabaquismo actual o previo, o en la presencia de otras comorbilidades, como fueron: la EPOC, la enfermedad cerebrovascular, la enfermedad renal crónica, la enfermedad hepática crónica o el cáncer; lo cual, podría explicarse, en parte, por la baja representación de estas comorbilidades en nuestra muestra global de pacientes COVID-19, con una prevalencia inferior al 10%. Así mismo, debemos tener en cuenta el momento de realización de nuestra investigación, en la etapa inicial de la pandemia, cuando aún no existían vacunas para combatir la infección, por lo que no se pudo evaluar el impacto pronóstico del estado de inmunización en nuestro estudio, y al mismo tiempo, este hecho podría justificar el no haber encontrado diferencias en la evolución de los pacientes según su edad, ya que la media de edad del total de casos con COVID-19 de nuestro trabajo fue de  $57,63 \pm 11,84$ , no incluyendo, por tanto, aquellos grupos etarios más avanzados (con edades >70-80 años) donde las diferencias de gravedad tras la infección por SARS-CoV2 se acentúan, al igual que lo hicieron en etapas posteriores de la pandemia tras la vacunación.



Otros factores conocidos y que se asocian a una peor evolución de la COVID-19, según los resultados de diferentes publicaciones realizadas desde la aparición del SARS-CoV2, son el sexo y la etnia. Los hombres y las personas de raza negra, hispanas y del sur de Asia han representado un número desproporcionalmente alto de casos críticos y muertes en múltiples cohortes en todo el mundo (188,189), aunque el origen afroamericano y la etnia hispana muestran resultados contradictorios según los estudios (190).

En nuestra investigación, no hubo diferencias por sexo según la gravedad de los pacientes, pero si por origen étnico, observándose una mayor frecuencia de caucásicos frente a latinoamericanos en aquellos pacientes con COVID-19 grave que requirieron ingreso en UCI, IOT o VMI, lo cual pensamos que puede ser debido a su mayor edad.

Por otra parte, existen en la literatura factores más discutidos que se han intentado relacionar con un curso clínico grave tras la infección por SARS-CoV2, como son: el déficit de vitamina D, con evidencia hasta la fecha de baja calidad procedente de estudios observacionales, donde es probable que múltiples factores de confusión afecten a las asociaciones observadas (191); o el grupo sanguíneo ABO, informándose inicialmente que la gravedad de la enfermedad y la probabilidad de infección con el virus SARS-CoV-2 varían con el tipo de sangre ABO, de forma que aquellos con grupo A y AB parecen estar en mayor riesgo y aquellos con grupo O en menor riesgo (192,193). Sin embargo, se cuestionó la elección de los grupos de control y la mortalidad no pareció variar según el grupo sanguíneo, requiriéndose más investigaciones para ayudar a dilucidar aún más las contribuciones de estos mecanismos a la patogenicidad del SARS-CoV2.

En nuestro trabajo, no hubo cambios en los niveles de vitamina D según la gravedad de los pacientes, y únicamente encontramos diferencias en el porcentaje de distribución del grupo sanguíneo ABO en los pacientes con COVID-19 grave en base a la necesidad de IOT (24% AB, 8% A o B en grupo con IOT vs 8,4% AB, 1,7% grupo A o B en grupo sin IOT;  $p=0,034$ ) y en base a la necesidad de VMI (23,1% B, 7,7% A en el grupo con VMI vs 8,5% B, 1,7% A en el grupo sin VMI), pero no según la necesidad de ingreso en UCI o puntuación en escala SOFA $>6$ .

Por otro lado, existen también variables analíticas, que podemos conocer tras la extracción de una muestra de sangre a los pacientes infectados por SARS-CoV2, que nos pueden ayudar a identificar a aquellos pacientes que evolucionarán a una fase grave de la enfermedad. Se ha constatado, en base a multitud de estudios llevados a cabo desde el inicio de la pandemia, que en los casos graves de SARS-CoV2, en comparación con otros virus respiratorios, se produce una respuesta anómala e inusual que conduce a una activación aberrante del sistema inmunitario innato caracterizada por la activación disregulada del inflamasoma y la piroptosis, la sobreactivación y deposición tisular del complemento, así como la generación, acumulación y sobreactivación de células NK no convencionales, macrófagos y monocitos no clásicos, neutrófilos con un fenotipo inmaduro y células T innatas (194). Como consecuencia de esto, se genera una tormenta de quimiocinas (CXCL) y citoquinas con una respuesta hiperinflamatoria que agrava el daño tisular en el sistema respiratorio de los pacientes con COVID-19 grave (195) y que comparte muchas características con el síndrome de activación de macrófagos que se observa en la linfocitosis hemofagocítica inducida por virus. Todo ello, conduce, por tanto, a anomalías en los hallazgos de laboratorio de los pacientes con COVID-19 grave que se han asociado con peores



resultados, tales como son: la linfopenia, las enzimas hepáticas elevadas, el aumento de marcadores y citocinas inflamatorias (lactato deshidrogenasa o LDH, proteína C reactiva o PCR, ferritina, interleuquina 6 y factor de necrosis tumoral o TNF-alfa), las troponinas elevadas, la creatinfosfoquinasa o CPK elevada, y la lesión renal aguda (62) (196,197).

Un metanálisis, que incluye el análisis de 21 estudios con un total de 2033 pacientes, encontró un patrón inmunológico típico en los casos graves de COVID-19, en comparación con aquellos con curso clínico leve, que se caracterizó por el aumento de marcadores inflamatorios (TNF-alfa, IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1, IP-10 y eotaxina), con una disminución de los marcadores de inmunidad del huésped, destacando la linfopenia precoz a expensas de linfocitos TCD3+, T CD4+, T CD8+, células B y NK (198). Otros estudios encuentran que la disminución de los linfocitos totales y de los niveles de CD3+, CD4+, CD8+ y NK, junto con una relación CD4/CD8 aumentada son útiles como biomarcadores de mortalidad en la COVID-19 grave (199) (200).

En nuestra investigación, encontramos igualmente un patrón característico a nivel analítico en el grupo de pacientes con COVID-19 grave según el criterio de ingreso en UCI, IOT, VMI o SOFA>6, que se caracterizó por una notoria elevación de marcadores analíticos de inflamación, que incluyen: LDH, ferritina, PCR, VSG, fibrinógeno, asociada a niveles inferiores de calcio sérico, HDL, albumina, proteínas totales y hemoglobina, junto con niveles ligeramente elevados de enzimas hepáticas (ALT,AST, GGT y FA) y de triacilglicéridos (TAG).

Así mismo, otro fenómeno descrito en multitud de publicaciones de la COVID-19, es la activación de la coagulación asociada a la enfermedad, que es mayor en los casos graves, igual que sucede en otras enfermedades infecciosas. En este proceso, la

trombina es una enzima que convierte el fibrinógeno en fibrina, la cual es degradada dando lugar a otro producto conocido como dímero D (DD), que se utiliza como marcador de la activación del sistema. La activación excesiva de la coagulación está asociada a fenómenos trombóticos, daño tisular y peor pronóstico de las personas con sepsis. En la COVID-19 el aumento del dímero D y, en menor medida, el aumento del tiempo de protrombina y la trombocitopenia, se han considerado marcadores pronósticos de gravedad y mortalidad (201).

En nuestro trabajo, encontramos también una elevación marcada del dímero D en la COVID-19 grave respecto al grupo de casos con evolución leve/moderada, aunque no observamos una disminución significativa en el número de plaquetas de los pacientes con peor evolución clínica. Por su parte, se desconoce las diferencias en el tiempo de protrombina, ya que no se incluyó dentro de las variables analíticas del estudio.

En resumen, y como conclusión tras lo expuesto hasta ahora, vemos que los datos obtenidos en nuestro análisis, concordantes con los resultados publicados en otras investigaciones de la COVID-19, apoyan la existencia de factores demográficos y clínicos con valor pronóstico, asociados a un perfil analítico característico de la COVID-19 grave secundario a una disregulación inmune que podría proporcionarnos una explicación a esta respuesta clínica tan heterogénea frente a la enfermedad. No obstante, esta respuesta anómala se caracteriza por una alteración del comportamiento de multitud de componentes moleculares y celulares del sistema inmunológico, por lo que podemos entender que la distinta evolución clínica de los pacientes no se puede adscribir a una sola célula o molécula.



Por consiguiente, en nuestra investigación, realizada en la fase inicial de la pandemia, en la que aún se había profundizado poco en este campo, nos centramos en el estudio de este sistema molecular inmunológico alterado propio de los casos graves de la COVID-19, con el objetivo de buscar nuevos marcadores biológicos, genéticos e inmunológicos con una doble función: por un lado, con valor pronóstico, para que, de forma individual o a través de una puntuación de riesgo múltiple, faciliten la identificación precoz de los pacientes de riesgo de gravedad, y poder anticiparnos, con ello, a la implementación de estrategias de tratamiento más tempranas que influyan en su evolución clínica y por otro lado, con valor terapéutico, para ayudar en el descubrimiento de nuevas dianas farmacológicas con posible valor patogénico sobre las que actuar.

En este sentido, en base a nuestro conocimiento de la base genética de la resistencia del huésped a las enfermedades virales, tal como lo es la COVID-19, sabemos que existen dos protagonistas principales que proporcionan una susceptibilidad diferencial y única a cada uno de los seres humanos frente a las mismas, con potencial considerable para afectar a los resultados de morbilidad y mortalidad, tales como son: los receptores KIR de células NK, y sus ligandos HLA clase I (151). Los KIR, expresados en células NK, y sus ligandos principales HLA de clase I, expresados en casi todas las células del organismo, son las moléculas más polimórficas en humanos. Se sabe que la diversidad combinatoria de los alelos KIR y HLA I afecta a la función de las células NK, dado que cualquier alotipo KIR tiene una reactividad diferencial con los alotipos de su ligando HLA de clase I afín. Por lo tanto, a través de la coevolución de múltiples mutaciones genéticas en el locus KIR y en el locus HLA I, la población humana probablemente genera y mantiene una diversidad considerable en la inmunidad a patógenos virales evolutivamente ágiles y diversos, como lo es el nuevo coronavirus SARS-CoV2; amplificándose aún más su diversidad combinatoria al albergarse los genes KIR y HLA

en cromosomas separados, con la posibilidad de haber millones de genotipos afines KIR/HLA clase I distintos (130).

Ya se ha demostrado previamente en numerosos estudios la influencia de este sistema KIR-HLA de clase I en una multitud de infecciones por virus; tales como: el VIH (150,151)(152), (153), donde puede brindar protección contra la progresión al SIDA en infectados, el virus SARS-CoV1, causante de la epidemia previa en el años 2001, el virus de la gripe H1N1(167), causante de la pandemia del 2009, u otros muchos virus que conforman una larga lista, entre los que se incluyen el VHC (156) (108) (157) (158) (159), el VHB (157) (160) (161)(162), el CMV (137,163) (164) (165) (166), el virus del dengue (126), el virus del ébola (168), o el virus de lasa (169). Sin embargo, su papel en la variabilidad clínica COVID-19 a fecha de realización del presente estudio permanecía casi sin explorar.

Así pues, en este estudio, realizado en pacientes con infección por SARS-CoV2, investigamos el papel de los receptores KIR reguladores de la función de las células NK, y de sus ligandos HLA de clase I, en la variabilidad clínica de la COVID-19, al constituir en conjunto dos de los sistemas moleculares más variables de la naturaleza (<http://www.allelefrequencies.net/>), pudiendo condicionar, con ellos, la distinta susceptibilidad o resistencia del huésped a las infecciones virales.

En base a estudios previos, se sabe que el número de las células NK en sangre periférica se reduce significativamente en la COVID-19, siendo más marcada en los pacientes graves y críticos respecto a leves-moderados (75,202,203). Además, se ha constatado una disminución sostenida en los subconjuntos de linfocitos, especialmente los linfocitos T CD4+ y NK, en los no supervivientes de la COVID-19 hasta su



fallecimiento (204) (205). Asimismo, existe una redistribución anómala, con una disminución drástica de las células NK de perfil citotóxico ( $CD56^+CD16^{+++}$ ), asociado a un aumento de las células NK reguladoras ( $CD56^{+++}CD16^-$ ) (206). En los casos de COVID-19 grave esta disminución en el número de células NK parece asociarse a un descenso de su función, que implicaría la incapacidad de eliminar las células infectadas por virus. Las investigaciones que demuestran esta disminución de su actividad, han constatado que en la fase aguda de la infección las células NK de sangre periférica aumentan la expresión de moléculas inhibitoras (NKG2A), reguladoras (TIM-3) y de agotamiento (PD-1 o TIGIT) y reducen la expresión de los receptores activadores (DNAM-1 y NKG2D) y la secreción de IFN- $\gamma$  (207). Por el contrario, se ha encontrado en pacientes moderados y graves que superan la enfermedad de la COVID-19 la presencia de un incremento de células NK que expresan NKG2C y CD57, indicadores de la expansión y la maduración de una subpoblación de células NK denominados «adaptativos o de memoria» con una mayor capacidad citotóxica dependiente de anticuerpo, ya previamente estudiados en infecciones respiratorias por citomegalovirus (CMV), que dirigen hacia una robusta defensa frente al SARS-CoV-2 (208). Por otro lado, el envejecimiento también afecta a las células NK, perdiendo parte de su funcionalidad, y podría explicar, en parte, la mayor susceptibilidad de las personas de edad avanzada al virus SARS-CoV-2 (209).

En nuestro trabajo, en el que se realizó el estudio celular dos a tres meses después de la infección (día 75 de mediana después del alta hospitalaria, con IQR= 61-92) para evitar las secuelas de los tratamientos intensos aplicados a los pacientes con enfermedad grave, todavía se observaron algunos de los efectos descritos previamente en los pacientes con COVID-19, en comparación con los controles, y particularmente en aquellos que requirieron VMI, quienes tenían: 1) un número reducido de linfocitos

totales, 2) un número reducido de monocitos no clásicos CD16+ (que son generalmente considerados células proinflamatorias tras su movilización en un entorno patogénico, productoras de citoquinas como TNF- $\alpha$ ), 3) un número reducido de neutrófilos, 4) un número reducido de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y 5) un aumento del número de linfocitos T CD8<sup>+</sup>.

Sin embargo, en contraposición a las investigaciones previas, en nuestra población el número de células NK totales, tanto CD56<sup>bright</sup> como CD56<sup>dim</sup>, no disminuyó significativamente en el grupo de pacientes con COVID-19 respecto al grupo control, lo cual podría justificarse, en parte, por el momento de realización de los análisis pasada la fase aguda. Sin embargo, se observó un aumento significativo de las células NK KIR2DS4<sup>+</sup> expresado como receptor único, especialmente en el grupo pacientes con infección por SARS-CoV2 que requirió VMI. Estas células NK con KIR2DS4<sup>+</sup> único mostraron un fenotipo distintivo en COVID19 severo, similar a otros subconjuntos de células NK con un solo KIR activador (KIR2DS1+ y KIR3DS1+), con una expresión reducida de moléculas activadoras CD16, CD226/DNAM-1 y NKG2D, y una alta expresión de TIGIT (marcador de agotamiento) y CD56 (propio de las células NK de perfil regulador y también de células NK activadas), que sugiere, en conjunto, que estas células habían estado involucradas recientemente en un evento de activación (96,210). A ello, se añade un aumento de la expresión de moléculas inhibitoras NKG2A en estas células NK con KIR2DS4<sup>+</sup> único, que se correlacionó con su agotamiento funcional en base a los resultados obtenidos en trabajos previos realizados en la fase aguda de la COVID-19, ya expuestos previamente, en los que su regulación al alza en células NK y linfocitos T CD8<sup>+</sup> se asoció con una reducción en la capacidad de ambos tipos celulares para producir IFN- $\gamma$ , IL-2, granzima B y TNF-alfa (211). Todo ello, apoyaría, por tanto,



un papel principal de las células NK KIR2DS4<sup>+</sup> en la respuesta de SARS-CoV-2 y en particular en el desarrollo de una enfermedad más severa.

El locus KIR2DS4 no es fijo, sino que tiene dos subvariantes o alelos principales que codifican, por un lado: 1) fKIR2DS4 (derivado de sus siglas en inglés full-KIR2DS4) es el receptor de longitud completa con potente función activadora, o por otro 2) dKIR2DS4 (derivado de sus siglas en inglés del-KIR2DS4), es una variante no funcional caracterizada por la delección de 22 pb en el exón 5 que conduce a un codón de parada temprano que conlleva la pérdida de su anclaje a la membrana, creándose una proteína soluble truncada sin unión a HLA-I que pierde el potencial de activación de las células NK (148,212). Su importancia radica en que existen variaciones considerables de ambas variantes entre las poblaciones con una asociación diferencial con diversas enfermedades.

Continuando con la investigación del papel de las células NK KIR2DS4<sup>+</sup> en la COVID-19 en nuestro trabajo, observamos que la frecuencia del gen fKIR2DS4 también aumentó significativamente en todos los pacientes con COVID-19, y particularmente en aquellos que requerían VMI (83,7% frente a 36,2% en los controles). Además, se estudió la expresión de KIR en las células NK medida como Intensidad de Fluorescencia Media (IFM) y observamos una marcada modulación a la baja de la expresión de KIR en las células NK con KIR2DS4<sup>+</sup> único (KIR<sup>bajo</sup>) en los pacientes con la COVID-19 (grupo con y sin VMI) en comparación con los controles sanos, que interpretamos que muy probablemente fuera debida a la interacción activa con sus ligandos específicos; ya que, los receptores KIR se modulan a la baja cuando interactúan con su ligando HLA específico (183).

Realizando una búsqueda bibliográfica acerca del posible papel de fKIR2DS4 en las enfermedades virales, encontramos que este ya se había explorado en algunas de ellas, tales como: (1) el VIH, donde ser portador del mismo se asoció con cargas virales más altas y con una progresión más rápida a SIDA (148),(213), (214),(215), (2) el VHB, en el que la presencia de fKIR2DS4 se relacionó con un mayor riesgo de VHB crónico (160), (3) el CMV, encontrándose en un estudio de receptores de tranplante de células hematopoyéticas una asociación para KIR2DS4 con un aumento de 7 veces el riesgo de reactivación de CMV (216), o (4) el VHC, donde una investigación reveló que los niveles de enzimas hepáticas antes de la terapia eran aproximadamente un 30% más altos en pacientes que poseían una variante del gen KIR2DS4 con la delección de 22 pares de bases (217). Sin embargo, el papel de este receptor KIR2DS4 en la COVID-19 sólo se había constatado en una única publicación previa, realizada en la primera fase de la pandemia. En esta, se correlacionó el patrón de distribución de fKIR2DS4 y la frecuencia alélica de su ligando HLA-C\*05, con la variabilidad de la mortalidad en diferentes poblaciones de COVID-19; de manera que las poblaciones con mortalidades más altas, portaron con alta frecuencia HLA-C\*05 y fKIR2DS4, mientras que aquellas con menor mortalidad tuvieron una frecuencia bajo-media de HLA-C\*05:01 y alta de fKIR2DS4. En base a esto, se asoció el par HLA-C\*05/fKIR2DS4 con una respuesta excesiva de citocinas característica de los pacientes con COVID-19 grave (218).

En nuestro estudio, por su parte, no se observaron diferencias entre pacientes y controles en la frecuencia de HLA-C\*05 o en la frecuencia de fKIR2DS4/HLA-C\*05. De hecho, la frecuencia de fKIR2DS4 no cambió en ambos grupos con ninguno de sus supuestos ligandos HLA-I clásicos conocidos hasta la fecha actual (HLA-



A\*11/C\*02/C\*04/C\*05/C\*16 (184)), lo que nos sugirió que nuevos ligandos podrían estar interactuando con KIR2DS4 en pacientes con COVID-19.

A día de hoy sólo se conocen una minoría de ligandos para fKIR2DS4, a saber los alotipos HLA-C\*02/C\*05/C\*16, así como HLA-A\*11:02 (184). Recientemente, también se ha informado de un reconocimiento de ligandos altamente dependiente de péptidos para KIR2DS4, demostrándose que este KIR activador reconoce HLA-C\*05:01 cuando presenta un péptido derivado de la recombinasa A bacteriana altamente conservado, lo que proporciona evidencia de que está involucrado también en la defensa contra infecciones bacterianas (109). No obstante, existe una clara necesidad de definir ligandos funcionales para KIR2DS4 para comprender completamente su papel en las enfermedades virales y en la regulación de las células NK en general (148).

Prosiguiendo con nuestra investigación, hubo otros hallazgos que sugirieron también la participación de posibles neoligandos HLA no conocidos de fKIR2DS4. Al analizar la expresión de los receptores KIR en las células NK de los pacientes con COVID-19, tanto en presencia como en ausencia de su ligando HLA específico, se vio que, aunque se produjo una modulación a la baja inducida por la interacción de KIR/ligando HLA para la mayoría de los subtipos de células NK con KIR<sup>+</sup> único, en el caso del subtipo celular NK con KIR2DS4<sup>+</sup> único la modulación a la baja inducida por la expresión constitutiva normal de cada uno de sus ligandos HLA-I conocidos (HLA-A\*11, -C\*02, -C\*04, -C\*05 y -C\*16 (184)), fue leve y no significativa. Por tanto, esta observación no justificaba la fuerte modulación a la baja de la expresión de KIR2DS4 producida en el grupo de pacientes con COVID-19 de nuestra muestra vs grupo control. En consecuencia, este descubrimiento parecía sugerir, nuevamente, que KIR2DS4 cuyos ligandos están pobremente definidos, podría interactuar con otros ligandos HLA no convencionales.

Para intentar averiguar cual podría ser este posible neoligando de KIR2DS4 en la COVID-19, recurrimos de nuevo a la literatura y revisamos todas las posibles publicaciones relacionadas. En 2013, Goodridge et al (219) sugirieron que el antígeno leucocitario humano F (HLA-F), que se regula al alza en los macrófagos locales durante las infecciones virales, podría ser un ligando en su conformación abierta (sin presentación peptídica) para KIR2DS4; sin embargo, resultados más recientes demuestran que la conformación abierta HLA-F es un ligando para KIR3DS1 y KIR3DL2 pero no para KIR2DS4 (147). No obstante, HLA-F tiene dos tipos de presentaciones que son diferenciadas por los receptores de células NK: la presentación libre de péptido (que es el conformero abierto de HLA-F, que se encuentra vacío) y la presentación unida a péptido (en la que puede presentar péptidos de longitud no convencional dictados por la mutación R62W que producen un surco abierto que acomoda péptidos largos (147). De esta manera, es posible que un péptido de SARS-CoV-2 presentado en HLA-F pueda formar un neoligando para KIR2DS4, de la misma manera que HLA-C\*05:01 presenta péptidos bacterianos de 9-mer que llevan un triptófano en la posición -8 para convertirse en un ligando de KIR2DS4 (148). Además, sabemos que HLA-F se expresa principalmente en linfocitos y monocitos activados (220) y, al mismo tiempo, se ha demostrado que los leucocitos predominantes en el pulmón de pacientes con COVID-19 son macrófagos alveolares que están fuertemente activados e incluyen partículas virales dentro de su citoplasma (221). Por lo tanto, podrían presentar péptidos de SARS-CoV-2 en moléculas HLA-F. Así mismo, hay evidencia de que el SARS-CoV-2 induce la expresión de ligandos del receptor de quimiocinas CXCR3 (CXCL9-11) en el tejido pulmonar (222) y en los macrófagos (223), lo que facilita el reclutamiento de células NK de la sangre periférica (202); ya



que el receptor de quimiocinas CXCR3 es expresado por un subconjunto de células NK efectoras, confiriéndoles la capacidad de migrar a los tejidos periféricos inflamados en respuesta a las quimiocinas CXCL9-11 (ligandos 9-11 con motivo CXC) (87,89). Por tanto, en base a lo expuesto hasta ahora, plateamos la hipótesis de que una vez en el pulmón, las células NK podrían interactuar a través de su receptor KIR2DS4 (fKIR2DS4) con neoligandos, como podría ser la molécula HLA F presentadora de péptidos de SARS-CoV2, expresados en macrófagos activados, como sugiere la modulación a la baja de su receptor KIR2DS4; y finalmente, la activación de este subgrupo de células NK KIR2DS4<sup>+</sup> polifuncionales podría promover un entorno proinflamatorio que perjudicara la resolución de la infección, como ya sabemos que ocurre en otras infecciones virales como el VIH, VHC y VHB (158,160,213).

Al continuar con la investigación de estos posibles neoligandos de KIR2DS4 en la COVID-19, se estudió el cambio de frecuencia de fKIR2DS4 al estratificar a los pacientes según la presencia o no de todos los alotipos HLA-A, -B o -C, a parte de con sus ligandos HLA conocidos hasta el momento, como vimos previamente. Tras ello, comprobamos que ningún alotipo alteró la frecuencia de fKIR2DS4 observada en el total de pacientes vs controles, a excepción de HLA-B\*15 (61,7% vs 36,2%,  $p_c < 9,5 \times 10^{-6}$ ). Sin embargo, de forma contraria a lo que esperábamos observar, lo que encontramos fue que la presencia del HLA-B\*15 no se asoció con una frecuencia alta de fKIR2DS4, sino baja, en los pacientes con COVID-19, inferior a la de los controles (16,7% frente a 40,9%,  $p < 0,093$ ), lo que nos llevó a investigar las posibles interacciones de HLA-B\*15 con otros KIR para comprender por qué podría estar sucediendo esto.

Para ello, se evaluó la frecuencia de cada gen KIR de forma individual, junto con la frecuencia de las regiones centroméricas (AA-Cent y Bx-Cent) y teloméricas (AA-Tel y Bx-Tel) de los genotipos AA y Bx en pacientes y controles HLA-B\*15 positivos y

negativos. Recordemos que los genotipos KIR se agrupaban en AA si contienen sólo genes del haplotipo-A canónico (KIR3DL3, 2DL3, 2DL1, 2DL4, 3DL1, 2DS4 y 3DL2) o en Bx si contienen cualquier otro; y que todos los haplotipos KIR contienen una región centromérica y otra telomérica (176). De esta forma, encontramos una asociación específica con frecuencias mucho más altas de KIR B-telomericos (KIR2DL5, KIR2DS5, KIR3DS1 y KIR2DS1) y del genotipo Bx telomérico en pacientes HLA-B\*15 positivos respecto a los controles HLA\*B15 positivos; la cual, no se observó, en pacientes y controles HLA-B\*15 negativos. Esta asociación específica se mantuvo, al profundizar en nuestro análisis, únicamente para el subtipo HLA-B\*15:01, pero no para otros subtipos HLA-B\*15 (HLA-B\*15:03, HLAB\*15:04, HLA-B\*15:17, HLA-B\*15:18, HLA-B\*15:24), el cual continuó asociándose significativamente respecto al grupo control con frecuencias más altas de los KIR B-telómericos activadores KIR2DS1 (90,9% vs 27,3%), KIR3DS1 (90,9% vs 22,7%) y KIR2DS5 (81,8% vs 22,7%). Por tanto, esto nos sugirió fuertemente la aparición de un segundo neoligando, en este caso HLA-B\*15:01, que al presentar un péptido SARS-CoV-2 podría ser reconocido por cualquiera de estos tres KIR activadores B-telomericos.

Para estimar cuál de los receptores KIR activadores B-telomericos más fuertemente asociados con el subtipo HLA-B\*15:01 en el análisis previo (KIR2DS1 y KIR3DS1) era el que tenía más probabilidades de interactuar realmente con este alotipo HLA en pacientes con COVID19, ampliamos nuestro análisis a través de un enfoque computacional. Se calculó una puntuación de afinidad para cada par HLA-KIR (planteándolo como un problema de alineación de secuencias por pares, que determina si una secuencia de nucleótidos o aminoácidos está relacionada con otra); teniendo en cuenta, a su vez, las variaciones de afinidad obtenidas al presentar cada par HLA-KIR



diferentes posibles péptidos de 9 unidades del SARS-CoV2 (ya que, si recordamos, la longitud de los péptidos que se unen a HLA de clase I oscila entre 8 y 11 aminoácidos, siendo preferentes los de 9 aminoácidos). Estos resultados se predijeron mediante el servidor NetMHCpan-4.1, usando la secuencia de referencia del proteoma completo Wuhan-Hu-2019 (GISAID ID: EPI\_ISL\_402125)] (rango percentil  $<0,05$  o puntuación  $>0,8$ ). De esta forma, se constató que el receptor KIR3DS1, obtuvo la puntuación más alta de interacción con HLA-B\*15:01 presentador de péptidos de SARS-CoV2 vs otros subtipo HLA-B\*15 ( $p<0,05$ ), encontrándose dicha puntuación, además, dentro del rango de la de su ligando habitual el epíto Bw4 de HLA de clase-I (180). En contraste con la puntuación de interacción mucho más baja obtenida por KIR2DS1 ( $p<0,0001$ ). Como conclusión, este descubrimiento apoyó la hipótesis de que KIR3DS1 es el receptor más probable de HLA-B\*15:01 en pacientes con COVID-19.

Al plantearnos la trascendencia clínica de este nuevo hallazgo, nos preguntamos la posible relación de la interacción KIR3DS1-HLA-B\*15:01 con el perfil de gravedad de los pacientes con la COVID-19. Así, en nuestro trabajo observamos que el genotipo telomérico Bx (que contiene el gen de KIR3DS1) fue más frecuente en aquellos pacientes HLA-B\*15:01 que no requirieron VMI (84,6% vs 15,4%,  $p=0,09$ ), por lo que se asoció con COVID-19 más leve (COVID moderado/leve); lo que, a su vez, es concordante con que la frecuencia de fKIR2DS4 A-telomérico (que ya hemos visto previamente, se asocia con enfermedad grave) disminuyera en estos pacientes. Además, este último hallazgo ayudaría a explicar los resultados de nuestro estudio, previamente mencionados, en los que observamos que los pacientes latinoamericanos presentaron un curso de la enfermedad COVID-19 más leve respecto a los caucásicos (13,3% vs 4,1%), ya que, además de su menor edad (52,9 vs 58,7 años), se observó una mayor frecuencia del alotipo HLA-B\*15:01 en este grupo étnico.

Como conclusión final, los resultados de nuestra investigación muestran que los receptores KIR activadores teloméricos se asocian a distintos perfiles de gravedad en la COVID-19. En concreto, encontramos que fKIR2DS4, por sí mismo, se asocia con la evolución a COVID-19 grave; mientras que, por su parte, KIR3DS1, en presencia de HLA-B\*15:01, se asocia con una forma clínica leve/moderada de la enfermedad.

Estos resultados apoyan, por tanto, un papel decisivo de las células NK en la patogénesis y la variabilidad clínica de la COVID-19, que podrían estar apuntando a dianas moleculares útiles para el desarrollo de tratamientos específicos contra la enfermedad. Al mismo tiempo, podrían ser valiosos para aumentar la capacidad predictiva de la evolución a la COVID-19 grave (con requerimiento de VMI) en fases tempranas de la enfermedad a través de la realización de métodos rápidos, tales como: la citometría de flujo, la cual ofrece resultados en menos de 30 minutos, o las pruebas de confirmación genética, que pueden realizarse en 3 horas.

Además, a largo plazo, nuestros hallazgos podrían ser útiles en la preparación de medicamentos y vacunas de amplio espectro frente a nuevas viriasis emergentes causantes de futuras epidemias o pandemias. En los últimos 14 años, antes de la pandemia por SARS-CoV2, han ocurrido 11 epidemias o pandemias de importancia, y con excepción de dos epidemias de cólera en Zimbabue y en Haití, todas las demás han sido causadas por virus. La COVID-19 es la sexta pandemia global desde la pandemia de la gripe en 1918, y pesar de que su efecto devastador nos pueda hacer pensar que es una tragedia aislada y única, la prevalencia de enfermedades infecciosas eleva el riesgo de que volvamos a enfrentarnos a un evento similar en el futuro próximo, para el cual debemos estar preparados.



Entre las principales limitaciones de nuestro estudio encontramos, en primer lugar, el número limitado de pacientes, que puede no garantizar la distribución representativa de la población y, por tanto, puede dificultar el encontrar relaciones significativas entre las variables. Por otro lado, la recopilación de los datos clínicos y analíticos de nuestra muestra a través de un estudio multicentrico con participación de pacientes de diferentes Comunidades Autónomas dificultó la disponibilidad de todas las variables requeridas, existiendo discordancia entre algunas de ellas. Así mismo, fue también una dificultad práctica añadida en nuestra investigación: 1) la necesidad de disponer de una muestra de pacientes con antecedente de infección aguda por SARS-CoV2 en un periodo de tiempo similar tras el alta de hospitalización, todo ello, con el fin de asegurar la homogeneidad de los análisis y poder comparar los resultados; así como 2) la premura requerida en la inclusión de los pacientes de nuestro trabajo, dada la acelerada evolución de la pandemia con aparición de nuevas variantes que podían afectar igualmente a la comparabilidad de los resultados analizados en caso de haberse demorado. Todo ello, limitó el tiempo disponible para explorar el tema de investigación y controlar los cambios producidos. Por su parte, desde el punto de vista inmunológico también debe tenerse en cuenta la ausencia de estudios funcionales como una posible limitación a la hora de darle validez a nuestros resultados. Por consiguiente, para superar todas estas limitaciones sería necesario realizar más investigaciones que confirmen de manera consistente la interacción de KIR2DS4/HLA-F y KIR3DS1/HLA-B\*15:01 presentando péptidos SARS-CoV-2.

## **CONCLUSIONES**





## CONCLUSIONES

1. Los análisis de nuestro estudio confirman la existencia de factores demográficos (etnia,  $IMC \geq 25$ ) y clínicos (hipertensión arterial, dislipemia y enfermedad cardiovascular) con valor pronóstico en la COVID-19 grave, que se asocian a un perfil analítico generado como consecuencia de la disregulación inmunitaria propia de esta etapa de la enfermedad, y que se caracteriza por una notoria elevación de marcadores inflamatorios, entre los que se incluyen: LDH, ferritina, dímero D, PCR, VSG o fibrinógeno, junto con valores ligeramente altos de enzimas hepáticas y de triacilglicéridos.
2. Igualmente, nuestros resultados sugieren que la variabilidad clínica de la enfermedad secundaria a la infección por SARS-CoV2 puede estar relacionada con los receptores activadores teloméricos KIR3DS1 y fKIR2DS4 de las células NK, de modo que al interactuar con sus correspondientes “neoligandos” específicos influyan de manera diferencial en el desarrollo de un curso evolutivo leve/moderado vs grave de la COVID-19, respectivamente.
3. En base a los datos de nuestro trabajo y de la literatura publicada hasta la fecha, se plantea como posibles neoligandos de estos KIR activadores teloméricos de las NK a las moléculas HLA de clase-I presentando péptidos de SARS-CoV2; sugiriendo como opciones más probables la molécula clásica HLA-B\*15:01 para KIR3DS1 y la molécula no clásica HLA-F expresada por células presentadoras de antígeno pulmonares infectadas o activadas para fKIR2DS4, lo que deberá confirmarse en futuros estudios de forma más consistente.



4. Como conclusión final, los hallazgos de nuestra investigación aportan una herramienta adicional con posible utilidad en el diagnóstico precoz de los casos de mayor riesgo de evolución a una forma grave de la COVID-19, para poder anticiparnos con tratamientos con impacto pronóstico en morbilidad y mortalidad. A largo plazo, además, nuestro descubrimiento podría ayudar en la preparación de medicamentos y vacunas de amplio espectro frente a las viriasis emergentes, que han sido y pueden ser el origen de futuras epidemias y pandemias.

## APÉNDICE





## APÉNDICE

### 1. ANEXO 1. HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

#### HOJA DE INFORMACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS DEL PACIENTE EN EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN DENOMINADO “PAPEL DE LAS CÉLULAS NK EN LA SUSCEPTIBILIDAD Y EL PRONÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR SARS-CoV2 (COVID19)”

En esta hoja se resume la información que Ud. debe conocer para decidir libremente su participación en este estudio clínico que tiene **como promotor al INSTITUTO MURCIANO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA (IMIB)**. Tómese el tiempo necesario para decidir, consulte a personas de su confianza, pregunte cuanto sea necesario. Los estudios clínicos son estudios científicos en los cuáles las personas ayudan a los médicos a encontrar maneras de mejorar la salud y la atención médica.

#### ¿Cuál es el objetivo del estudio?

Las células asesinas naturales (NK) juegan un papel crítico en la defensa del huésped contra las infecciones virales. Los factores genéticos del huésped como las moléculas de HLA y los receptores KIR de las células NK contribuyen de forma primordial a la variación interindividual observada en respuesta a la infección por diferentes virus y están vinculados a la resistencia a la infección. Creemos que el perfil genético del paciente, y en particular el de las interacciones KIR/HLA-I, puede condicionar la respuesta inmunitaria y con ello la susceptibilidad y la evolución de la infección por SARS-CoV2. Los resultados de este estudio contribuirían a optimizar los recursos sanitarios y evitar el colapso al facilitar: 1) acentuar los esfuerzos de protección en personas más susceptibles (profesionales sanitarios, fuerzas del orden, familiares de enfermos, etc); y 2) anticipar terapias anti-virales y anti-inflamatorias a la aparición de la sintomatología más grave en enfermos susceptibles.

Se solicita su participación en este Proyecto de Investigación, cuyo objetivo pretende evaluar el valor predictivo y el papel que juegan las células NK en la susceptibilidad y la severidad de la enfermedad por SARS-CoV2 (COVID19), mediante el análisis de las interacciones KIR/HLA-I que regulan la función de las células NK, en pacientes con grados leves y graves de la enfermedad y en controles sanos.

Sus muestras se utilizarán para realizar estudios para evaluar el empeoramiento clínico de esta enfermedad. Recogeremos además los datos sobre sus antecedentes clínicos, síntomas, tratamientos y evolución. Esta información se recogerá de su historia clínica.



Es posible que de su participación en este estudio no obtenga un beneficio directo. Sin embargo, la caracterización de los procesos y marcadores relacionados con esta enfermedad podrían beneficiar en un futuro a otros pacientes que la padecen y podría contribuir a un mejor conocimiento de esta enfermedad, fundamentalmente en cuanto a complicaciones respiratorias, y puede contribuir al diseño en un futuro de tratamientos individualizados en función del perfil de los enfermos.

Este estudio se realizará en la Sección de Enfermedades Infecciosas del Hospital General Universitario Reina Sofía, del Hospital Universitario Morales Meseguer y en el Servicio de Inmunología del Hospital Virgen de la Arrixaca.

### **¿Qué riesgos puedo correr?**

Los posibles inconvenientes vinculados con la donación y obtención de la muestra (solo si existe alguno, incluida la posibilidad de ser contactado con posterioridad con el fin de recabar nuevos datos u obtener otras muestras) son mínimos. En el momento de la extracción puede notar algo de dolor pero que después no le tiene que producir ninguna molestia. En la zona donde se le ha realizado la prueba, puede quedar una equimosis o moratón pasajero. En cualquier caso, intentaremos aprovechar el momento en que a usted le hagan otras extracciones sanguíneas dentro de la práctica clínica habitual, necesarias para el correcto tratamiento de la patología que padece. Adicionalmente, existe la posibilidad de que se le contacte con posterioridad, con el fin de recabar nuevos datos u obtener otras muestras.

### **Objetivos de la donación**

Para poder llevar a cabo este estudio se precisa recoger datos clínicos y muestras biológicas de los pacientes a fin de analizarlos y obtener conclusiones, estudiando determinadas variantes genéticas y características biológicas específicas. Por ello le solicitamos que, de forma totalmente altruista, acceda a la recogida de una muestra biológica en el manejo médico habitual de su enfermedad o específicamente para su participación en el Estudio que se especifica arriba, con el fin de ser utilizadas en estudios genéticos y de investigación.

Al tratarse de material genético, nos ajustaremos a lo requerido en la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica, así, aunque la prueba es específica, se pueden obtener datos relativos a su salud, derivados de los análisis que se realice. Es posible que como resultado de las investigaciones realizadas con las muestras almacenadas se obtenga información de especial relevancia para su salud. Usted tiene el derecho de conocer los resultados que se obtengan a partir de los análisis de las muestras donadas, en el momento en que lo solicite, incluso aunque no fueran relevantes para su salud o el tratamiento de su enfermedad. Usted tendrá la facultad de tomar una posición con relación a la comunicación de la información extraída de estos estudios, y derecho a conocer los resultados genéticos individuales confirmados que se obtengan a partir del

análisis de las muestras donadas y las repercusiones clínicas conocidas que ello conlleva.

Aunque la prueba es específica para el estudio de la condición antes mencionada, y el análisis por lo general dará una información precisa, varias fuentes de errores son posibles. Estas son, entre otras, diagnóstico clínico erróneo de la condición, identificación errónea de la muestra o contaminación de la muestra.

### **Autorización para guardar muestras biológicas**

En el protocolo se contempla el almacenamiento de la muestra en una colección de ADN/ARN y de suero, así como una muestra de suero y plasma, para futuros estudios en relación con su proceso. Si Ud. nos autoriza, los investigadores guardaremos parte de la muestra biológica para estudios futuros, por lo que se le solicita por tanto además consentimiento para dicho almacenamiento. Las muestras derivadas de este estudio se almacenarán en el Hospital General Universitario Reina Sofía de Murcia por un plazo máximo de 10 años. El acceso a las muestras solo podrá realizarse bajo la conformidad de los investigadores principales de este proyecto. Cualquier análisis o cesión de muestras a terceros se realizará bajo la aceptación, mediante documento escrito, del investigador responsable de custodiar las muestras, pudiéndose obtener toda la información del voluntario exceptuando cualquier dato que pudiera identificarlo. Si usted revoca su consentimiento al empleo de las muestras biológicas que de él se hayan derivado, éstas serán destruidas. En caso de realizarse futuros estudios, estos se presentarán al Comité de Ética e Investigación Clínica, para su valoración y aprobación si procede. Usted será informado de la realización de dichos estudios. La donación no impedirá que usted o sus familiares puedan usar las muestras cedidas cuando sea necesario por motivos de salud siempre y cuando estén disponibles.

### **Acceso a la información obtenida**

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes, se rige por lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal, el Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento de desarrollo de la citada Ley Orgánica 15/1999, y la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la Autonomía del Paciente y de Derechos y Obligaciones en materia de información y documentación clínica.

Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y sólo su médico del estudio o colaboradores del personal sanitario podrán relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna salvo excepciones, en caso de urgencia médica o requerimiento legal. En el caso de que se produzca cesión de algún dato, será para los mismos fines del



estudio descrito y garantizando la confidencialidad y, como mínimo, con el nivel de protección equivalente al que contempla la legislación vigente en nuestro país.

El acceso a su información personal quedará restringido al médico del estudio, colaboradores, autoridades sanitarias (Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios), al Comité Ético de Investigación Clínica y personal autorizado por el promotor, cuando lo precisen para comprobar los datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación referida anteriormente. El acceso a su historia clínica será sólo para los fines del estudio.

El Promotor del presente Ensayo/Estudio es el Instituto Murciano de Investigación Biomédica (IMIB). Usted puede ejercer el derecho de acceso, rectificación y cancelación como se establece en la Ley, dirigiéndose al investigador el cual se pondrá en contacto con el promotor, como responsable del fichero de datos y propietario de la base de datos. El IMIB como promotor de este proyecto, se compromete a publicar los resultados finales del estudio

### **¿Tengo que participar? ¿Qué ocurre si cambio de opinión a lo largo del estudio?**

Es usted libre para decidir si quiere participar o no en el estudio así como para dejar de hacerlo en cualquier momento. Si finalmente decide no participar o dejar de hacerlo, su decisión no le supondrá ningún perjuicio en sus cuidados médicos.

Tenga también en cuenta que no recibirá ninguna compensación económica por su participación en el estudio.

También debe saber que este estudio ha sido previamente aprobado por las autoridades sanitarias competentes así como por el Comité Ético de Investigación Clínica que evalúa los estudios clínicos en este centro sanitario.

Puede solicitar la revocación del consentimiento incluida la posibilidad de la destrucción de las muestras.

Una vez leída esta hoja, si decide participar en el estudio firme por favor la hoja de consentimiento informado escrito que su médico le entregará.

## 2. ANEXO 2. CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título de Estudio: **Papel de las células NK en la susceptibilidad y el pronóstico de la infección por SARS-CoV2 (COVID19).**

Código del Estudio: NK-Covid19

Nombre y apellidos del paciente:

Firma

D/Dña. ....

He leído la hoja de información que se me ha entregado

He podido hacer preguntas sobre el estudio

He recibido suficiente información sobre el estudio

He hablado con:

Dr. ....

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1. Cuando quiera
2. Sin tener que dar explicaciones
3. Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y doy mi consentimiento para el acceso y utilización de mis datos en las condiciones detalladas en la hoja de información.

Accedo a que las muestras biológicas obtenidas durante el estudio puedan ser utilizadas para investigación. Formarán parte de una colección de muestras biológicas, con N° de registro C.0001473 en el ISCIII (Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad), de la que es responsable el Dr. Alfredo Minguela, del Servicio de Inmunología.



SI

NO

Firma del testigo

Firma del Investigador

Nombre:.....

Nombre:.....

Fecha: ...../...../20.....

Fecha:...../...../20.....

**3. ANEXO 3. VOLANTE DE EXTRACCIÓN/PETICIÓN DE MUESTRA DE SANGRE PERIFÉRICA PARA EL ANÁLISIS DE NK EN LA UNIDAD DE CITOMETRÍA E INMUNOLOGÍA TUMORAL**

**VOLANTE DE PETICIÓN**

**Pacientes a incluir en el proyecto de investigación ISCiii-Covid19**  
**Papel de las células NK en la susceptibilidad y el pronóstico de la infección por SARS-CoV2 (COVID19).**

*Pegar etiqueta del paciente*

Fecha: \_\_\_ / \_\_\_ / 20 \_\_\_.

Procedencia: \_\_\_\_\_

Hosp: \_\_\_\_\_

**Muestras de sangre a extraer**



**1-tubo con 10ml tubo de serología (Seco, tapón rojo).**

**2-tubos 3ml tubo de hemograma (EDTA, tapón lila): agitar.**

**Remitir en un sobre cerrado, indicando en el exterior "Citometría – Dr. Minguela"**

Remitir los tubos directamente al:

**Servicio de Inmunología**

**Unidad de Citometría e Inmunología Tumoral**

**A la atención del Dr. Alfredo Minguela**





#### 4. ANEXO 4. HOJA DE RECOGIDA DE DATOS DEL PACIENTE

##### PEGATINA DEL PACIENTE: FILIACION

##### INFORMACION GENERAL

Nombre del Hospital	
Fecha recogida datos	
Numero de Historia Clínica (NHC)	
Fecha de nacimiento	
Sexo	<input type="checkbox"/> HOMBRE <input type="checkbox"/> MUJER
Ingreso en el Hospital	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO
Fecha ingreso hospital	

##### COMORBIDITY (PRESENT IN THE MEDICAL RECORD)

Fecha comienzo síntomas			
Fumador	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> N/A	Bebedor	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> N/A
Hipertensión	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> N/A	VIH	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> N/A
Enfermedad coronaria	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> N/A	Asma	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> N/A
Insuficiencia cardiaca	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> N/A	Cancer sólido	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> N/A
Enf cerebrovascular	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> N/A	Cancer hematológico	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> N/A
Diabetes	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> N/A	Insuf Renal Crónica (GFR<60)	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> N/A
EPOC/Neumopatía	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> N/A	Enf hepatica	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> N/A
Obesidad (BMI $\geq$ 30)	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> N/A	Enfermedad inflamatoria	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> N/A
Inmunosupresión	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> N/A	Dementia	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> N/A

##### MEDICACION CONCOMITANTE

IECAS	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> N/A	Corticoides sistméticos	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> N/A
ARA_II	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> N/A	Estatinas	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> N/A
AAS	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> N/A	Inmunosupresores	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> N/A



## SIGNOS Y SÍNTOMAS

Fiebre	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> N/A	Mialgia/artralgia	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> N/A
Malestar	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> N/A	Cefalea	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> N/A
Síntomas respiratorios superiores	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> N/A	Alteración conciencia	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> N/A
Disnea	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> N/A	Convulsiones	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> N/A
Dolor torácico	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> N/A	Dolor abdominal	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> N/A
Tos	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> N/A	Nausea/vomitos	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> N/A
Espujo	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> N/A	Diarrea	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> N/A
Hemoptisis	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> N/A	Anosmia	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> N/A
		Disgeusia	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> N/A

## GRAVEDAD A LA ADMISIÓN EN EL HOSPITAL SI HOSPITALIZADO

CURB-65		Tensión arterial sistólica, mmHg	
SOFA		Tensión arterial diastólica, mmHg	
PaO <sub>2</sub> /FIO <sub>2</sub>			

## RESULTADOS DE LABORATORIO EN EL MOMENTO DE LA EXTRACCIÓN DE LA ANALÍTICA

Prueba	VALOR	Prueba	Valor
- Ac. Anti-Cardiolipinas (IgM)		- IgA sérica	
- Ac. Anti-DNA Cuantitativo IgG		- IgG sérica	
- Ac. Anti-Nucleares		- IgM sérica	
- Albúmina		- LDH	
- CPK		- POTASIO (suero)	
- Anticoagulante lúpico		- Proteína C Reactiva	
- Bilirrubina total		- Proteínas totales	
- Calcio		- PROTEINOGRAMA	
- Fosforo		- PTTA ratio	
- Colesterol		- SODIO (suero)	
- Creatinina		- T. Protrombina (Actividad)	
- Triglicéridos		- C3	
- Urea		- C4	
- Factor Reumatoide		- Dimero D	
- Ferritina		- Interleucina 6	

- Fibrinógeno derivado		- Serología SARS CoV2 IgG	
- Fosfatasa alcalina		- Serología SARS CoV2IgM	
- Glucosa		- Serología VIH	
- GOT		Serología VHC	
- GPT		Serología VHB	
- Grupo sanguíneo ABO			
- HDL_SUERO			
- Hemograma			
- Hierro			

### Radiografía de tórax

Infiltrados presentes al comienzo de la sintomatología o ingreso	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> N/A	
Si si, indicar el tipo	<input type="checkbox"/> Unilateral unilobar / <input type="checkbox"/> Unilateral multilobar / <input type="checkbox"/> Bilateral	
Empeoramiento durante el seguimiento	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> N/A	
Si empeoramiento	Indicar día cuando empeoró:	
Infiltrados presentes en el momento de la visita actual	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> N/A	

### SITUACIÓN CLINICA DE ACUERDO CON LA ESCALA DE 6 CATEGORIAS DURANTE EL INGRESO (SI INGRESA) (PEOR SITUACIÓN ALCANZADA)

		D0
1	No ingreso	<input type="checkbox"/>
2	Ingreso con O2 ambiente	<input type="checkbox"/>
3	Ingreso con O2 de bajo flujo	<input type="checkbox"/>
4	Ingreso con ventilación no invasiva u oxigenoterapia de alto flujo	<input type="checkbox"/>
5	Ingreso con ventilación invasiva	<input type="checkbox"/>
6	Muerte	<input type="checkbox"/>

### TRATAMIENTO DE SOPORTE EN CUALQUIER MOMENTO DURANTE LA ADMISION



O2 (nasal, mascarilla, reservorio)	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
BiPAP, CPAP, OCNAF	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
Ingreso en UCI	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Fecha:
Ventilación mecánica	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Fecha:
Inotropos/vasopresores	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
Soporte extracorporeo (ECMO)	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
Dialisis o sustitución renal	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	

### COMPLICACIONES DURANTE EL INGRESO

SINDROME RESPIRATORIO AGUDO (SDRA)*	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Fecha:
Leve SDRA	<input type="checkbox"/>	
Moderado SDRA	<input type="checkbox"/>	
Severo SDRA	<input type="checkbox"/>	
Trombosis venosa profunda	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Fecha:
Tromboembolismo pulmonar	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Fecha:
Arritmias	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Fecha:
Isquemia cardíaca	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Fecha:
Insuficiencia cardíaca	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Fecha:
Miocarditis	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Fecha:
Pericarditis	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Fecha:
Endocarditis	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Fecha:
Neumonía bacteriana	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Fecha:
Bacteriemia	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Fecha:
Neumotorax	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Fecha:
Meningitis / Encefalitis	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Fecha:
Epilepsia	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Fecha:
Guillain-Barré	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Fecha:
Coagulación intravascular diseminada	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Fecha:
Rabdomiolisis	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Fecha:
Insuficiencia renal aguda	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Fecha:
Pancreatitis	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Fecha:
Disfunción hepática	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Fecha:
Other specify:	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Fecha:

\*SDRA: se define como el inicio agudo o empeoramiento de los síntomas respiratorios con hipoxemia y opacidades bilaterales en la radiografía de tórax que no se explica completamente por insuficiencia cardíaca o sobrecarga de líquidos. Clasificación según pO<sub>2</sub> / FiO<sub>2</sub>: Leve: 200-300, Moderado: 100-200, Severo: <100

### AGENTES VIRALES CONTRA COVID-19

Medicación	Uso	Dosis	Primer día uso	Último día uso	Efecto adverso	Describe efecto adverso
LPV/r	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO				<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	

DRV/r	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO				<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
IFN-B	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO				<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
H-CQ	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO				<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
AZM	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO				<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
RDS	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO				<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	

LPV/r, lopinavir/ritonavir; DRV/r, darunavir/ritonavir; IFN-B, beta-interferon; H-CQ, hydroxychloroquine; AZM, azithromycin; RDS, remdesivir

### MEDICACION ANTIINFLAMATORIA

Medicación	Uso	Dosis diaria	Fecha primera dosis	Fecha última dosis	Días totales
Metilprednisolona	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO				
Dexametasonal	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO				
Tocilizumab	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO				
Cyclosporine A	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO				
Anakinra	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO				
Heparina de bajo peso	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO				
Other (specify)					
	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO				
	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO				

### EVOLUCIÓN

<input type="checkbox"/> Vivo	Si vivo	Día del alta (si hospitalizado)	
		Día del último contacto	
<input type="checkbox"/> Muerte	Si muerte	Fecha muerte	
PCR for SARS-CoV-2 NEGATIVA CONFIRMADA <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO			Si negativa poner fecha =

### RESUMEN DE LA EVOLUCIÓN CLÍNICA CON COVID-19

Síndrome		Definición
Leve	<input type="checkbox"/>	Infección respiratoria sin neumonía
Moderado	<input type="checkbox"/>	Neumonía no complicada
Severa	<input type="checkbox"/>	curso con disnea, taquipnea (>30 RPM), saturación de oxígeno <93%, PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> ratio <300 y/o infiltrados pulmonares en >
Crítica	<input type="checkbox"/>	curso con fallo respiratorio, shock séptico, y/o fallo/disfunción multiorgánica.





## 5. ANEXO 5. DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN



### DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO REINA SOFÍA ÁREA DE SALUD VII DE MURCIA

D<sup>a</sup> Inmaculada Sellés Navarro, presidenta del Comité de Ética de la Investigación del Hospital General Universitario Reina Sofía, Área de Salud VII, Murcia Este, le notifica que en la sesión extraordinaria celebrada el 11/05/2020, en Comisión Permanente, se examinó la propuesta para que se lleve a cabo en este ámbito el proyecto: **"PAPEL DE LAS CÉLULAS NK EN LA SUSCEPTIBILIDAD Y EL PRONÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR SARS-CoV2 (COVID19)"**, que realizará como investigador principal el Dr. Enrique Bernal Morell.

Que en esta reunión los miembros del CEI presentes que figuran en el Anexo I y se cumplieron los requisitos establecidos en la legislación vigente R.D. 1090/2015, y que el CEI, tanto en su composición como en sus procedimientos, cumple con las normas BCP (CPMP/ICH/135/95), que regulan su funcionamiento.

Se considera que:

- El estudio cumple con los principios y garantías de la Ley de Investigación Biomédica 14/2007, de 3 de julio, y su realización es pertinente.
- El seguro o la garantía financiera previstos son adecuados.
- Se cumplen los requisitos de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, teniendo en cuenta los beneficios esperados.
- El procedimiento para obtener el consentimiento informado de los pacientes es adecuado, incluyendo el modelo empleado para dicho documento y para la hoja de información a los mismos.
- El plan de reclutamiento de sujetos previsto es adecuado, así como las compensaciones previstas para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el estudio.
- La capacidad del investigador, las instalaciones y medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.

**Por lo que este Comité emite Dictamen Favorable. Para la realización de dicho estudio es indispensable obtener la aprobación de la Dirección Médica de este Hospital.**



Murcia, a 11 de mayo de 2020

La Presidenta del CEI



Inmaculada Selles Navarro

## **BIBLIOGRAFÍA**





## BIBLIOGRAFÍA

1. Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* [Internet]. 2020 Mar 12;579(7798):270–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
2. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*. 2020;382(8):727–33.
3. Shereen MA, Khan S, Kazmi A, Bashir N, Siddique R. COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *J Adv Res*. 2020;24:91–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.03.005>
4. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, de Groot RJ, Drosten C, Gulyaeva AA, et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol*. 2020;5(4):536–44.
5. Aitken C. *Clinical Virology*, 3rd Edition Edited by D. D. Richman , R. J. Whitley , and F. G. Hayden Washington, DC: ASM Press, 2009. 1408 pp, Illustrated. \$259.59 (hardcover). *Clin Infect Dis*. 2010;50(12):1692–1692.
6. Perlman S. Pathogenesis of coronavirus-induced infections. Review of



- pathological and immunological aspects. *Adv Exp Med Biol.* 1998;440:503-13.
7. Nickbakhsh S, Ho A, Marques DFP, Mcmenamin J, Gunson RN, Murcia PR. Epidemiology of Seasonal Coronaviruses : Establishing the Context for the Emergence of Coronavirus Disease 2019. *J Infec Dis.* 2020 Jun 16;222(1):17-25.
  8. Galbadage T, Peterson BM, Gunasekera RS. Does COVID-19 Spread Through Droplets Alone ? *Frontiers in Public Health.* 2020;8:163.
  9. Reed SE. The Behaviour of Recent Isolates of Human Respiratory Coronavirus In Vitro and in Volunteers : Evidence of Heterogeneity Among 229E-Related Strains. *Journal of Medical Virology.*1984;13:179–92.
  10. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Articles Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus : implications for virus origins and receptor binding. *Lancet.* 2020;395(10224):565–74. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)
  11. Chan JFW, Lau SKP, To KKW, Cheng VCC, Woo PCY, Yuen K. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus : Another Zoonotic Betacoronavirus Causing SARS-Like Disease. *Clin Microbiol Rev.*2015;28(2):465–522.
  12. Market M, Angka L, Martel AB, Bastin D, Ardolino M, Auer RC. Flattening the COVID-19 Curve With Natural Killer Cell Based Immunotherapies. *Front Immunol.* 2020;11:1512.
  13. Houtman JJ, Fleming J. Pathogenesis of mouse hepatitis virus-induced demyelination. *J Neurovirol.*1996;2(6):361–76.
  14. Report MW, Collection M. Outbreak of severe acute respiratory syndrome--

- Worldwide. *MMWR*. 2003 / 52(12);241-248.
15. Lee JY, Kim Y, Chung EH, Kim D, Jeong I, Kim Y, et al. The clinical and virological features of the first imported case causing MERS-CoV outbreak in South Korea. *BMC Infectious Diseases*.2017;17(1):498.
  16. Meyerowitz EA, Richterman A, Gandhi RT, Sax PE. REVIEW Transmission of SARS-CoV-2: A Review of Viral , Host , and Environmental Factors. *Ann Intern Med*. 2021;(1):1–12.
  17. Zhou AJ, Otter JA, Price JR, Cimpeanu C, Garcia DM, Kinross J, et al. Investigating Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Surface and Air Contamination in an Acute Healthcare Setting During the Peak of the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Pandemic in London. *Clin Infect Dis* 5 Oct 2021;73(7):e1870-e1877.
  18. Sean Wei Xiang Ong 1, Yian Kim Tan 2, Po Ying Chia 1, Tau Hong Lee 1, Oon Tek Ng 1, Michelle Su Yen Wong 2 KM 1. Air, Surface Environmental, and Personal Protective Equipment Contamination by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) From a Symptomatic Patient. *JAMA*. 2020 Apr 28; 323(16):1610-1612.
  19. Wenling Wang 1 YX 2, Ruqin Gao 3, Roujian Lu 1, Kai Han 2, Guizhen Wu 1 WT 1. Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2020;323(18):1843–4.
  20. European Centre for Disease Prevention and Control. Detection of new SARS-



CoV-2 variants related to mink – 12 November 2020. ECDC: Stockholm; 2020;(November).

21. Kohorn I Von, Stein SR, Shikani BT, Ramos-benitez MJ, Vannella KM, Hewitt SM, et al. In Utero Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection. *J Pediatric Infect Dis Soc.* 2020;9:769–71.
22. Rüdger Grob, Carina Conzelmann, Janis A Müller, Steffen Stenger, Karin Steinhart, Frank Kirchhoff JM. Detection of SARS-CoV-2 in human breastmilk. *Lancet.* 2020; 395 (10239):1757-1758.
23. Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias, Sanidad MDE. Información Científico Técnica- Parámetros epidemiológicos. Available from: <https://www.sanidad.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCoV/documentos.htm>
24. Johansson MA, Quandelacy TM, Kada S, Prasad PV, Steele M, Brooks JT, et al. SARS-CoV-2 Transmission from People without COVID-19 Symptoms. *JAMA Netw Open.* 2021;4(1):1–8.
25. Scola B La, Bideau M Le, Andreani J, Hoang VT, Grimaldier C. Viral RNA load as determined by cell culture as a management tool for discharge of SARS-CoV-2 patients from infectious disease wards. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2020;39(6):1059–61.
26. Yang liu, Li Meng Yan, Lagen Wan, Tian-Xin Xiang, Aiping Le, Jia-Ming Liu, Malik Peiris, Leo Lm Poon, Wei Zhang. Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19. *Lancet Infect Dis.* 2020;20(6):656-657.

27. Centers for Disease Control and Prevention. SARS-CoV2 variant Classifications and Definitions.pdf [Internet]. Available from: [https://covid.cdc.gov/covid-data-tracker/?CDC\\_AA\\_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fcoronavirus%2F2019-ncov%2Fcases-updates%2Fvariant-proportions.html#variant-proportions](https://covid.cdc.gov/covid-data-tracker/?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fcoronavirus%2F2019-ncov%2Fcases-updates%2Fvariant-proportions.html#variant-proportions)
28. OMS. Genomic sequencing of SARS-CoV-2 [Internet]. 2021. Available from: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240018440>
29. Organization WH. Tracking SARS-CoV-2 variants. Available from: <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>
30. Korber B, Fischer WM, Gnanakaran S, Labranche CC, Saphire EO, Montefiori DC, et al. Article Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike : Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. *Cell*.2020;182(4):812–27.
31. Huang Y, Yang C, Xu X, Xu W, Liu S. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein : potential antivirus drug development for COVID-19. *Acta Pharmacol Sin*.2020; 41(9):1141-1149. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41401-020-0485-4>
32. Oran DP, Topol EJ. The Proportion of SARS-CoV-2 Infections That Are Asymptomatic : A Systematic Review. *Ann Intern Med*. 2021;174(5):655–62.
33. Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China. *JAMA*. 2020;323(13):1239-1242.



34. Kral AH, Lambdin BH, Wenger LD, Davidson PJ. Multiorgan and Renal Tropism of SARS-CoV-2 To. *N Engl J Med*. 2020;383(6):589–90.
35. Siddiqi HK, Mehra MR. COVID-19 illness in native and immunosuppressed states: A clinical–therapeutic staging proposal. *J Hear Lung Transplantation*, Vol 39, No 5, May 2020;39(5):405-407.
36. Patel P, Decuir J, Abrams J, Campbell AP, Godfred-cato S, Belay ED. Clinical Characteristics of Multisystem Inflammatory Syndrome in Adults A Systematic Review. *JAMA Netw Open*. 2021;4(9):1–15.
37. Xiong Q, Xu M, Li J, Liu Y, Zhang J, Xu Y. Clinical sequelae of COVID-19 survivors in Wuhan, China: a singlecentre longitudinal study. *Clin Microbiol Infect* 27 89-95. 2021;27(1):89-95.
38. National Institute for Health and Care excellence (NICE). Guía clínica para la atención al paciente Long COVID/COVID persistente.
39. Nice CE, Intercollegiate S, Network G, College R, RCGP P. COVID-19 rapid guideline : managing the long- term effects of COVID-19. 2022;1–106. Available from: <https://www.nice.org.uk/guidance/ng188/chapter/4-Planning-care>
40. Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias. Información clínica COVID 19. Minist Sanid [Internet]:1–34. Available from: [chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/viewer.html?pdfurl=https%3A%2F%2Fwww.sanidad.gob.es%2Fprofesionales%2FsaludPublica%2Fccayes%2FalertasActual%2FnCov%2Fdocumentos%2F20211028\\_CLINICA.pdf&cflen=1055092&chunk=true](chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/viewer.html?pdfurl=https%3A%2F%2Fwww.sanidad.gob.es%2Fprofesionales%2FsaludPublica%2Fccayes%2FalertasActual%2FnCov%2Fdocumentos%2F20211028_CLINICA.pdf&cflen=1055092&chunk=true)

41. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Müller MA, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*. 2020;581(7809):465-469.
42. Kerster G, Bentlage AEH, Haaren MM Van, Guerra D, Burger JA. Potent neutralizing antibodies from COVID-19 patients define multiple targets of vulnerability. *Science*. 2020;369(6504):643–50.
43. Irina Arkhipova-Jenkins, MD, MBA; Mark Helfand, MD, MPH; Charlotte Armstrong, BA; Emily Gean, PhD; Joanna Anderson, MPH; Robin A. Paynter, MLIS; and Katherine Mackey, MD M. Antibody Response After SARS-CoV-2 Infection and Implications for Immunity: A Rapid Living Review. *Ann Intern Med*. 2021;174(6):811-821.
44. Radbruch A, Chang H. A long-term perspective on immunity to COVID. *Nature* 595,359-360(2021). [Internet] Available from: <https://www.nature.com/articles/d41586-021-01557-z>
45. Hansen CH, Michlmayr D, Gubbels SM, Mølbak K, Ethelberg S. Assessment of protection against reinfection with SARS-CoV-2 among 4 million PCR-tested individuals in Denmark in 2020: a population-level observational study *Christian*. *Lancet*. 2021;397(10280):1204-1212.
46. Qureshi AI, Baskett WI, Huang W, Lobanova I, Naqvi SH, Shyu C. Reinfection With Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 ( SARS-CoV-2 ) in Patients Undergoing Serial Laboratory Testing. *Clin Infect Dis Major a rticle*



- Reinfection. 2022;74(2):294-300.
47. Baden LR, El Sahly HM, Essink B, Follmann D, Neuzil KM, August A, et al. Severity of SARS-CoV-2 Reinfections as Compared with Primary Infections. *N Engl J Med*. 2021;385(26):2485–7.
  48. Alejandro Lawandi, Sara Warner, Junfeng Sol, Cumhur y Demirkale, Roberto L Danner, Miguel Klompas, Adi Gundlapalli, Deblina Datta, Aarón Harris, Sapna Bamrah Morris, Pavithra Natarajan, Sameer S Kadri. Suspected SARS-CoV-2 Reinfections: Incidence, Predictors, and Healthcare Use among Patients at 238 U.S. Healthcare Facilities, June 1, 2020- February 28, 2021. *Clin Infect Dis*. 2022;74(8):1489-1492.
  49. Network V, January A, Thompson MG, Natarajan K, Irving SA, Rowley EA. Effectiveness of a Third Dose of mRNA Vaccines Against COVID-19 – Associated Emergency Department and Urgent Care Encounters and Hospitalizations Among Adults During Periods of Delta and Omicron Variant Predominance —. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2022;71(4):139–45.
  50. Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias. Información sobre la inmunidad frente a COVID-19. *Minist Sanid* [Internet]. :1–49. Available from://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/viewer.html?pdfurl=https%3A%2F%2Fwww.sanidad.gob.es%2Fprofesionales%2FsaludPublica%2Fcayes%2FalertasActual%2FnCov%2Fdocumentos%2F20211015\_INMUNIDAD\_y\_VACUNAS.pdf&clen=1263122&chunk=true
  51. World Health Organization. Coronavirus Disease (COVID-19): Vaccines. :0–4. Available from: <https://www.who.int/es/emergencies/diseases/novel-coronavirus->

- 2019/question-and-answers-hub/q-a-detail/coronavirus-disease-(covid-19)-vaccines?adgroupsurvey=%7Badgroupsurvey%7D&gclid=CjwKCAiAgbiQBhAHEiwAuQ6Bkqk7Un2g2fPX4\_\_uvx5NW-yG9yzPYpuis8K3a9qDzj2rZCY2
52. Krammer F. SARS-CoV-2 vaccines in development. *Nature* [Internet]. 2020;586(7830):516-527. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2798-3>
  53. Province H, Acute S, Syndrome R. Initial Public Health Response and Interim Clinical Guidance for the 2019 Novel Coronavirus Outbreak — United States ,. *Morb Mortal Wkly Rep*. 2020;69(5);140-146.
  54. Long DR, Gombar S, Hogan CA, Greninger AL, Reilly-shah VO, Bryson-cahn C, et al. Occurrence and Timing of Subsequent Severe Acute Respiratory Syndrome Polymerase Chain Reaction Positivity Among Initially Negative Patients. *Clin Infect Dis*. 2021;72:323–6.
  55. Food and Drug Administration. SARS-CoV-2 Viral Mutations: Impact on COVID-19 Tests. Available from: <https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-covid-19-and-medical-devices/sars-cov-2-viral-mutations-impact-covid-19-tests>
  56. Shi Y, Wang Y, Shao C, Huang J, Gan J, Huang X. COVID-19 infection : the perspectives on immune responses. *Cell Death Differ*. 2020;27(5): 1451–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41418-020-0530-3>
  57. Gandhi RT. The Multidimensional Challenge of Treating COVID-19:



- Remdesivir is a Foot in the Door. *Clin Infect Dis*. 2021;73(11):e4175-e4178.
58. Liang W, Liang H, Ou L, Chen B, Chen A, Li C, et al. Development and validation of a clinical risk score to predict the occurrence of critical illness in hospitalized patients with COVID-19. *JAMA Intern Med*. 2020;180(8):1081–9.
  59. Bernal E, García-villalba E, Pons E, Dolores M, Báguena C, Puche G, et al. Remdesivir plus dexamethasone is associated to improve the clinical outcome of COVID-19 hospitalized patients regardless of their vaccination status. *Med Clin (Barc)*. 2023;S0025-7753(23)00173-2.
  60. Prevention C for DC and. Science Brief: Evidence Used to Update the List of Underlying Medical Conditions Associated with Higher Risk for Severe COVID-19. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/clinical-care/underlying-evidence-table.html>
  61. Wynants L, Calster B Van, Collins GS, Riley RD, Heinze G, Schuit E, et al. Prediction models for diagnosis and prognosis of covid-19 : systematic review and critical appraisal. *BMJ*.2020;369:m1328.
  62. Outcomes M. Risk Factors Associated With Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients With Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern Med*. 2020;180(7):934–43.
  63. Verity R, Okell LC, Dorigatti I, Winskill P, Whittaker C, Imai N, et al. Articles Estimates of the severity of coronavirus disease 2019 : a model-based analysis. *Lancet Infect Dis*.2020;20(6):669–77.
  64. Wynants L, Calster B Van, Collins GS, Riley RD, Heinze G, Schuit E, et al.

- Prediction models for diagnosis and prognosis of covid-19 : systematic review and critical appraisal. *BMJ* 2020;369:m1328.
65. Lombardi Y, Azoyan L, Szychowiak P, Bellamine A, Lemaitre G, Bernaux M. External validation of prognostic scores for COVID - 19 : a multicenter cohort study of patients hospitalized in Greater Paris University Hospitals. *Intensive Care Med.* 2021;47(12):1426-1439.
66. Magleby R, Westblade LF, Trzebucki A, Simon MS, Rajan M, Park J, et al. Impact of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Viral Load on Risk of Intubation and Mortality Among Hospitalized Patients With Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis.* 2021;73(11):e4197–e4205.
67. Hogan CA, Stevens BA, Sahoo MK, Huang C, Garamani N, Gombar S, et al. High Frequency of SARS-CoV-2 RNAemia and Association With Severe Disease. *Clin Infect Dis.* 2021;72(9):e291-e295.
68. Elisabet Pujadas, Fayzan Chaudhry, Russell McBride, Félix Richter, Shan Zhao, Ania Wajnberg, Girish Nadkarni, Benjamin S. Glicksberg, Jane Houldsworth, Carlos Cordón-Cardo, Elisabet Pujadas, Fayzan Chaudhry, Russell McBride, Félix CC-C 2. SARS-CoV-2 viral load predicts COVID-19 mortality. *Lancet Respir Med.* 2020;8(9);e70.
69. Yilmaz A, Marklund E, Andersson M, Nilsson S. Upper Respiratory Tract Levels of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 RNA and Duration of Viral RNA Shedding Do Not Differ Between Patients With Mild and Severe /



Critical Coronavirus Disease 2019. *J Infect Dis.* 2021;223(1):15–18.

70. Instituto de Salud Carlos III. Situación de COVID-19 en España. 2022; Available from: <https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/INFORMES/Informes COVID-19/INFORMES COVID-19 2022/Informe nº 112 Situación de COVID-19 en España a 5 de enero de 2022.pdf>
71. Annemarie B Docherty, Ewen M Harrison, Christopher A Green, Hayley E Hardwick, Riinu Pius, Lisa Norman, Karl A Holden, Jonathan M Read, Frank Dondelinger, Gail Carson, Laura Merson, James Lee, Daniel Plotkin, Louise Sigf et al. 2. Features of 20 133 UK patients in hospital with covid-19 using the ISARIC WHO Clinical Characterisation Protocol: prospective observational cohort study. *BMJ.* 2020;369:m1985.
72. Bartoletti M, Azap O, Barac A, Bussini L, Power NR, Ergonul O, et al. ESCMID COVID-19 living guidelines : drug treatment and clinical management. *Clin Microbiol Infect.* 2022;28(2):222–38.
73. Gustine JN, Jones D. Immunopathology of Hyperinflammation in COVID 19. *Am J Pathol.* 2021;191(1):4-17.
74. F Bao 1, W L Shi 2, J Hu 1, D Zhang 1, D H Gao 3, Y X Xia 4, H M Jing 1, X Y Ke 1, Q G Ge 5 NS 3. Analysis of the correlation between lymphocyte subsets and severity of corona virus disease 19. *Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2020;52(6):1075-1081.
75. Jiang Y, Wei X, Guan J, Qin S, Wang Z, Lu H. COVID-19 pneumonia: CD8 + T and NK cells are decreased in number but compensatory increased in cytotoxic

- potential. *Clin Immunol.*2020;218:108516.
76. Wilk AJ, Rustagi A, Zhao NQ, Roque J, Martínez-Colón GJ, McKechnie JL, et al. A single-cell atlas of the peripheral immune response in patients with severe COVID-19. *Nat Med* [Internet]. 2020;26(7):1070–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41591-020-0944-y>
77. Cunningham L, Kimber I, Basketter D, Simmonds P, Mcsweeney S, Tziotzios C, et al. Perforin, COVID-19 and a possible pathogenic auto-inflammatory feedback loop. *Scand J Immunol.*2021;94(5):e13102.
78. Zhou Z, Li Y, Ma Y, Zhang H, Deng Y, Zhu Z. Multi-biomarker is an early-stage predictor for progression of Coronavirus disease 2019 ( COVID-19 ) infection. *Int J Med Sci.* 2021;18(13):2789-2798.
79. Masselli E, Vaccarezza M, Carubbi C, Pozzi G. NK cells: A double edge sword against SARS-CoV-2. *Adv Biol Regul.* 2020;77:100737.
80. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Chapter 2 - Innate Immunity: The Early Defense Against Infections. *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System, Sixth Edition.* 2020. 23–50 p.
81. Zuo W, Zhao X. Natural killer cells play an important role in virus infection control: Antiviral mechanism, subset expansion and clinical application. *Clin Immunol.* 2021;227:108727.
82. Natalia A. Tabordaa, Juan C. Hernándezb CJM y MTR. Las células natural killer



- y su papel en la respuesta inmunitaria durante la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo-1. *Inmunologia*. 2014;3(1):11–20.
83. Diaz-salazar C, Sun JC. Natural killer cell responses to emerging viruses of zoonotic origin. *Curr Opin Virol*. 2020;44:97-111.
  84. Cheent K, Khakoo SI. Natural killer cells: Integrating diversity with function. Vol. 126, *Immunology*. 2009. p. 449–57.
  85. Sivori S, Vacca P, Del Zotto G, Munari E, Mingari MC, Moretta L. Human NK cells: surface receptors, inhibitory checkpoints, and translational applications. *Cell Mol Immunol*. 2019;16(5):430–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41423-019-0206-4>.
  86. Tabellini G, Patrizi O, Dobbs K, Lougaris V, Baronio M, Coltrini D, et al. From natural killer cell receptor discovery to characterization of natural killer cell defects in primary immunodeficiencies. *Front Immunol*. 2019;10:1757.
  87. National G, Pillars H. Markers and function of human NK cells in normal and pathological conditions. *Cytom B Clin Cytom*. 2017;92(2):100-114.
  88. Waggoner SN, Cornberg M, Selin LK, Welsh RM. Natural killer cells act as rheostats modulating antiviral T cells. *Nature*. 2012;481(7381):394–8.
  89. Falco M, Pende D, Munari E, Vacca P, Mingari MC, Moretta L. Natural killer cells: From surface receptors to the cure of high-risk leukemia (Ceppellini Lecture). *Hla*. 2019;93(4):185–94.
  90. Abel AM, Yang C, Thakar MS, Malarkannan S. Natural killer cells: Development, maturation, and clinical utilization. *Front Immunol*. 2018;9:1869.

91. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* (80- ). 2011;331(6013):44–9.
92. Sullivan TEO, Sun C. Generation of Natural Killer Cell Memory during Viral Infection. *Journal of Innate Immunity*. 2015;7(6):557-62.
93. Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood*. 2008;112(3):461–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2007-09-077438>
94. Long EO, Sik Kim H, Liu D, Peterson ME, Rajagopalan S. Controlling natural killer cell responses: Integration of signals for activation and inhibition. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:227–58.
95. Godfrey J, Benson DM. The role of natural killer cells in immunity against multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 2012;53(9):1666–76.
96. Van Acker HH, Capsomidis A, Smits EL, Van Tendeloo VF. CD56 in the immune system: More than a marker for cytotoxicity? *Front Immunol*. 2017;8:892.
97. Maghazachi AA. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2010;341:37-58.
98. Melsen JE, Lugthart G, Lankester AC, Schilham MW. Human Circulating and Tissue-Resident CD56bright Natural Killer Cell Populations. *Front Immunol*. 2016;7:262.



99. Bozzano F, Dentone C, Perrone C, Di Biagio A, Fenoglio D, Parodi A, et al. Extensive activation, tissue trafficking, turnover and functional impairment of NK cells in COVID-19 patients at disease onset associates with subsequent disease severity. *PLoS Pathog.* 2021;17(4):1–18.
100. Lanier LL. Nk cell recognition. *Annu Rev Immunology.* 2005;23:225-74.
101. Chen Y, Shi Y, Cheng H, An YQ, Gao GF. Structural immunology and crystallography help immunologists see the immune system in action: How T and NK cells touch their ligands. *IUBMB Life.* 2009;61(6):579–90.
102. Philipp Eissmann, Imperial College, London, UK. Células Natural Killer. *Br Soc Immunol.* Available from: <https://www.immunology.org/es/public-information/inmunolog%C3%ADa-bitesized/celulas/celulas-natural-killer>.
103. Carsten Watzl EO long. Signal Transduction During Activation and Inhibition of Natural Killer Cells. *Curr Protoc Immunology.* 2010;Chapter 11:Unit 11.9B.
104. Long EO. Negative signaling by inhibitory receptors: The NK cell paradigm. *Immunol Rev.* 2008;224(1):70–84.
105. Chen Y, Lu D, Churov A, Fu R. Research Progress on NK Cell Receptors and Their Signaling Pathways. *Mediators Inflamm.* 2020;6437057.
106. Ruiz-sánchez BP, Cruz-zárate D, Estrada-garcía I, Wong-baeza I. Innate lymphoid cells and their role in immune response regulation. *Rev Alerg Mex.* 2017;64(3):347–63.
107. Lanier LL. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol.* 2009;9(5):495–502.

108. Bastidas-Legarda LY, Khakoo SI. Conserved and variable natural killer cell receptors: diverse approaches to viral infections. *Immunology*. 2019;156(4):319–28.
109. Pende D, Falco M, Vitale M, Cantoni C, Vitale C, Munari E, et al. Killer Ig-like receptors (KIRs): Their role in NK cell modulation and developments leading to their clinical exploitation. *Front Immunol*. 2019;10:1179.
110. Long EO, Sik Kim H, Liu D, Peterson ME, Rajagopalan S. Controlling natural killer cell responses: Integration of signals for activation and inhibition. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:227–58.
111. Schenk A, Bloch W, Zimmer P. Natural killer cells—An epigenetic perspective of development and regulation. *Int J Mol Sci*. 2016;17(3):326.
112. Backström E, Kristensson K, Ljunggren HG. Activation of natural killer cells: Underlying molecular mechanisms revealed. *Scand J Immunol*. 2004;60(1):14–22.
113. Baychelier F, Sennepin A, Ermonval M, Dorgham K, Debre P, Vieillard V. Identification of a cellular ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44. *Blood*. 2013;122(17):2935–42.
114. Veillette A. NK cell regulation by SLAM family receptors and SAP-related adapters. *Immunol Rev*. 2006;214(1):22–34.
115. Leivas Aldea A. Células natural killer como estrategia terapéutica frente a



mieloma múltiple. Tesis Dr. 2018;36. Available from:  
<https://eprints.ucm.es/id/eprint/49164/1/T40190.pdf>

116. Torres-García D, Rodrigo B, Zúñiga J. Receptores de células NK (KIR): Estructura, función y relevancia en la susceptibilidad de enfermedades. *Rev del Inst Nac Enfermedades Respir.* 2008;21(1):57–65.
117. Valiante NM, Uhrberg M, Shilling HG, Lienert-weidenbach K, Arnett KL, Andrea AD, et al. Functionally and Structurally Distinct NK Cell Receptor Repertoires in the Peripheral Blood of Two Human Donors. 1997;7(6):739–51.
118. Middleton D, Gonzelez F. The extensive polymorphism of KIR genes. *Immunology.* 2010;129(1):8–19.
119. Campbell KS, Purdy AK. Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: Lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations. *Immunology.* 2011;132(3):315–25.
120. Bruijnesteijn J, van der Wiel MKH, de Groot N, Otting N, de Vos-Rouweler AJM, Lardy NM, et al. Extensive Alternative Splicing of KIR Transcripts. *Front Immunol.* 2018;9:2846.
121. Carrillo-Bustamante P, Keşmir C, de Boer RJ. The evolution of natural killer cell receptors. *Immunogenetics.* 2016;68(1):3–18.
122. Joanna Dębska-Zielkowska, Grazyna, Moszkowska, Maciej Zielinski, Hanna Zielínka, Anna Dukat-Mazurek, Piotr Trzonkowski and Katarzyna Stefńska. KIR Receptors as Key Regulators of NK Cells Activity in Health and Disease. *Cells.* 2021;10(7):1777.

123. Leung W. Use of NK cell activity in cure by transplant. *Br J Haematol.* 2011;155(1):14–29.
124. Bruijnesteijn J, de Groot NG, Bontrop RE. The Genetic Mechanisms Driving Diversification of the KIR Gene Cluster in Primates. *Front Immunol.* 2020;11:582804.
125. Uhrberg M. The KIR gene family: Life in the fast lane of evolution. *Eur J Immunol.* 2005;35(1):10–5.
126. Francesco Colucci<sup>1, 2</sup> and JT. KIR on the cusp of modern immunogenetics. *Immunology.* 2017;152(4):556-561.
127. Mehta RS, Rezvani K. Can we make a better match or mismatch with KIR genotyping ?. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2016;2016 (1):106–18.
128. Alicata C, Ashouri E, Nemat-Gorgani N, Guethlein LA, Marin WM, Tao S, et al. KIR Variation in Iranians Combines High Haplotype and Allotype Diversity With an Abundance of Functional Inhibitory Receptors. *Front Immunol.* 2020;11:556.
129. Yawata M, Yawata N, Draghi M, Little AM, Partheniou F, Parham P. Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J Exp Med.* 2006;203(3):633–45.
130. Béziat V, Hilton HG, Norman PJ, Traherne JA. Deciphering the killer-cell



- immunoglobulin-like receptor system at super-resolution for natural killer and T-cell biology. *Immunology*. 2017;150(3):248–64.
131. Meyer D, Thomson G. How selection shapes variation of the human major histocompatibility complex: A review. *Ann Hum Genet*. 2001;1996(1):1–26.
  132. Batool Mutar Mahdi. Introductory Chapter: Concept of Human Leukocyte Antigen (HLA). *Human Leukocyte Antigen (HLA)*. Intech [Internet]. 2019. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/65210>.
  133. Liu B, Shao Y, Fu R. Current research status of HLA in immune-related diseases. *Immunity, Inflamm Dis*. 2021;9(2):340–50.
  134. Kenneth Murphy, Paul Travers and MW. Antigen Presentation to T lymphocytes. *Janeway's Immunobiology*, 7th Ed. 2007.
  135. Kaufman J. Generalists and Specialists: A New View of How MHC Class I Molecules Fight Infectious Pathogens. *Trends Immunol* [Internet]. 2018;39(5):367–79. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2018.01.001>
  136. Flajnik MF, Kasahara M. Comparative genomics of the MHC: Glimpses into the evolution of the adaptive immune system. *Immunity*. 2001;15(3):351–62.
  137. Duygu B, Olieslagers TI, Groeneweg M, Voorter CEM, Wieten L. HLA Class I Molecules as Immune Checkpoints for NK Cell Alloreactivity and Anti-Viral Immunity in Kidney Transplantation. *Front Immunol*. 2021;12:680480.
  138. Vizcaíno JA, Kubiniok P, Kovalchik KA, Ma Q, Duquette JD, Mongrain I, et al. The human immunopeptidome project: A roadmap to predict and treat immune diseases. *Mol Cell Proteomics*. 2020;19(1):31–49.

139. Serc O, Ozbek P. Sequence-structure-function relationships in class I MHC : A local frustration perspective. *PLoS One*.2020;15(5):e0232849.
140. Saunders PM, Maclachlan BJ, Pymm P, Illing PT, Deng Y. The molecular basis of how buried human leukocyte antigen polymorphism modulates natural killer cell function. *Proc Natl Acad Sci USA*.2020;117(21):11636-11647.
141. Huhn O, Chazara O, Ivarsson MA, Retière C, Venkatesan TC, Norman PJ, et al. High-Resolution Genetic and Phenotypic Analysis of KIR2DL1 Alleles and Their Association with Pre-Eclampsia. *J Immunol*. 2019;202(6):1904–1904.
142. Cisneros E, Moraru M, Gómez-Lozano N, López-Botet M, Vilches C. KIR2DL5: An orphan inhibitory receptor displaying complex patterns of polymorphism and expression. *Front Immunol*. 2012;3:289..
143. Ligotti ME, Aiello A, Accardi G, Calabrò A, Ciaccio M, Colomba C, et al. Distribution of KIR Genes and Their HLA Ligands in Different Viral Infectious Diseases: Frequency Study in Sicilian Population. *Int J Mol Sci*. 2022;23(24):15466.
144. Leaton LA, Shortt J, Kichula KM, Tao S, Nemat-Gorgani N, Mentzer AJ, et al. Conservation, extensive heterozygosity, and convergence of signaling potential all indicate a critical role for KIR3DL3 in higher primates. *Front Immunol*. 2019;10:24.
145. Hui-HuiXuacAifenLinbcWei-HuaYanac. Chapter 14 - HLA-G-mediated immunological tolerance and autoimmunity. *TranslationalAutoimmunity* .Nima



Rezaei, editor;2021.p.265–95.

146. Ashouri E, Rajalingam K, Barani S, Farjadian S, Ghaderi A, Rajalingam R. Coexistence of inhibitory and activating killer-cell immunoglobulin-like receptors to the same cognate HLA-C2 and Bw4 ligands confer breast cancer risk. *Sci Rep.* 2021;11(1):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86964-y>
147. Dulberger CL, McMurtrey CP, Neu KE, Liu V, Steinbach AM, Garcia-beltran WF, et al. Human leukocyte antigen F (HLA-F) presents peptides and regulates immunity through interactions with NK-cell receptors. *Immunity.* 2017;46(6):1018-1029.e7.
148. Sim MJW, Rajagopalan S, Altmann DM, Boyton RJ, Sun PD, Long EO. Human NK cell receptor KIR2DS4 detects a conserved bacterial epitope presented by HLA-C. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(26):12964–73.
149. Lin A, Yan W, Bernard N. The Emerging Roles of Human Leukocyte Antigen-F in Immune Modulation and Viral Infection. *Front Immunol.* 2019;10:964.
150. Tallon B, Corpo A Del, Gilbert L, Bruneau J. HIV exposed seronegative (HESN) compared to HIV infected individuals have higher frequencies of telomeric Killer Immunoglobulin-like Receptor ( KIR ) B motifs ; Contribution of KIR B motif encoded genes to NK cell responsiveness. *PLoS One.*2017;12(9):e0185160.
151. Brown MG, Gamache A, Nash WT, Cronk J. Natural selection for killer receptors and their MHC class I ligands: In pursuit of gene pairs that fit well in tandem. *J Leukoc Biol.* 2019;105(3):489-495.

152. Zahra Kiani, a, b Julie Bruneau, c, d Daniel E. Geraghty, e Nicole F. Bernarda, b, f G, AResearch. crossm HLA-F on Autologous HIV-Infected Cells Activates Primary NK Cells Expressing the Activating Killer Immunoglobulin-Like. *J Virol Methods*. 2019;93(18):1–14.
153. Luc-aimé K-CI-LR( K) in H-EI in CKS, Louis-marie Y, Gabriel LE, Yengo CK, Livo FE, Jules N, et al. Killer-Cell Immunoglobulin-Like Receptors ( KIR ) in HIV- Exposed Infants in Cameroon. *J Immunol Res*. 2021:9053280.
154. Mori M, Leitman E, Walker B, Ndung’u T, Carrington M, Goulder P. Impact of HLA Allele-KIR Pairs on HIV Clinical Outcome in South Africa. *J Infect Dis*. 2019;219(9):1456–63.
155. Boudreau JE, Hsu KC, Kettering S. Natural Killer Cell Education and the Response to Infection and Cancer Therapy: Stay Tuned. *Trends Immunol*. 2018;39(3):222-239.
156. Zajonc DM. Unconventional peptide presentation by classical mhc class i and implications for t and nk cell activation. *Int J Mol Sci*. 2020;21(20):1–13.
157. Yindom LM, Mendy M, Bodimeade C, Chambion C, Aka P, Whittle HC, et al. KIR content genotypes associate with carriage of hepatitis B surface antigen, e antigen and HBV viral load in Gambians. *PLoS One*. 2017;12(11):1–14.
158. Podhorzer A, Dirchwolf M, Machicote A, Belen S, Montal S, Paz S, et al. The clinical features of patients with chronic hepatitis C virus infections are associated with killer cell immunoglobulin-like receptor genes and their



- expression on the surface of natural killer cells. *Front Immunol.* 2018;8:1912.
159. Ursu L, Calenic B, Diculescu M, Dima A, Constantinescu I. HLA Alleles and KIR Genes in Romanian Patients with Chronic Hepatitis C. *J Gastrointest Liver Dis.* 2020;29(4):595–601.
  160. Auer ED, Tong H Van, Amorim LM, Malheiros D, Hoan NX, Issler HC, et al. Natural killer cell receptor variants and chronic hepatitis B virus infection in the Vietnamese population. *Int J Infect Dis.* 2020;96:541–7.
  161. Zhuang YL, Li XX, Xu HC, Ye H, Sun D, Liu XZ, et al. Association between kir genes and efficacy of treatment of hbeag-positive chronic hepatitis B patients with entecavir. *Iran J Immunol.* 2018;15(2):112–21.
  162. Di Bona D, Pandey JP, Aiello A, Bilancia M, Candore G, Caruso C, et al. The immunoglobulin  $\gamma$  marker 17 allotype and KIR/HLA genes prevent the development of chronic hepatitis B in humans. *Immunology.* 2020;159(2):178–82.
  163. Deborska-Materkowska D, Perkowska-Ptasinska A, Sadowska-Jakubowicz A, Gozdowska J, Ciszek M, Pazik J, et al. Killer immunoglobulin-like receptor 2DS2 (KIR2DS2), KIR2DL2-HLA-C1, and KIR2DL3 as genetic markers for stratifying the risk of cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients. *Int J Mol Sci.* 2019;20(3):1–14.
  164. Stern M, Hadaya K, Hönger G, Martin PY, Steiger J, Hess C, et al. Telomeric rather than centromeric activating KIR genes protect from cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Am J Transplant.* 2011;11(6):1302–7.

165. Manser AR, Scherenschlich N, Thöns C, Hengel H, Timm J, Uhrberg M. KIR Polymorphism Modulates the Size of the Adaptive NK Cell Pool in Human Cytomegalovirus–Infected Individuals. *J Immunol.* 2019;203(8):2301–9.
166. Albayati Z, Alyami A, Alomar S, Middleton D, Bonnett L, Aleem S, et al. The Influence of Cytomegalovirus on Expression of HLA-G and its Ligand KIR2DL4 by Human Peripheral Blood Leucocyte Subsets. *Scand J Immunol.* 2017;86(5):396–407.
167. La D, Czarnecki C, El-Gabalawy H, Kumar A, Meyers AFA, Bastien N, et al. Enrichment of variations in KIR3DL1/s1 and KIR2DL2/L3 among H1N1/09 ICU patients: An exploratory study. *PLoS One.* 2011;6(12):e29200.
168. Wawina-Bokalanga T, Vanmechelen B, Lhermitte V, Martí-Carreras J, Vergote V, Koundouno FR, et al. Human diversity of killer cell immunoglobulin-like receptors and human leukocyte antigen class I alleles and ebola virus disease outcomes. *Emerg Infect Dis.* 2021;27(1):76–84.
169. Wauquier N, Petitdemange C, Tarantino N, Maucourant C, Coomber M, Lungay V, et al. HLA-C-restricted viral epitopes are associated with an escape mechanism from KIR2DL2 + NK cells in Lassa virus infection. *EBioMedicine.* 2019;40:605–13.
170. Garg S, Patel K, Pham H, Whitaker M, O’Halloran A, Milucky J, et al. Clinical Trends among U.S. Adults Hospitalized with COVID-19, March to December 2020. *Ann Intern Med.* 2021;174(10):1409–19.



171. Esper FP, Adhikari TM, Tu ZJ, Cheng Y-W, El-Haddad K, Farkas DH, et al. Alpha to Omicron: Disease Severity and Clinical Outcomes of Major SARS-CoV-2 Variants. *J Infect Dis.* 2023;227(3):344-352.
172. Thompson MG, Stenehjem E, Grannis S, Ball SW, Naleway AL, Ong TC, et al. Effectiveness of Covid-19 Vaccines in Ambulatory and Inpatient Care Settings. *N Engl J Med.* 2021;385(15):1355–71.
173. Havers FP, Pham H, Taylor CA, Whitaker M, Patel K, Anglin O, et al. COVID-19-Associated Hospitalizations among Vaccinated and Unvaccinated Adults 18 Years or Older in 13 US States, January 2021 to April 2022. *JAMA Intern Med.* 2022;182(10):1071–81.
174. Singer M, Deutschman CS, Seymour C, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA - J Am Med Assoc.* 2016;315(8):801–10.
175. Mandelboim O, Reyburn HT, Valés-Gómez M, Pazmany L, Colonna M, Borsellino G, et al. Protection from lysis by natural killer cells of group 1 and 2 specificity is mediated by residue 80 in human histocompatibility leukocyte antigen C alleles and also occurs with empty major histocompatibility complex molecules. *J Exp Med.* 1996;184(3):913–22.
176. Hsu KC, Chida S, Geraghty DE, Dupont B. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: Gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunol Rev.* 2002;190:40–52.
177. Ogishi M, Yotsuyanagi H. Quantitative prediction of the landscape of T cell epitope immunogenicity in sequence space. *Front Immunol.* 2019;10:827.

178. Reynisson B, Alvarez B, Paul S, Peters B, Nielsen M. NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: Improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data. *Nucleic Acids Res.* 2021;48(W1):W449–54.
179. O'Connor GM, Vivian JP, Gostick E, Pymm P, Lafont BAP, Price DA, et al. Peptide-Dependent Recognition of HLA-B\*57:01 by KIR3DS1. *J Virol.* 2015;89(10):5213–21.
180. Lutz CT. Human leukocyte antigen Bw4 and Bw6 epitopes recognized by antibodies and natural killer cells. *Curr Opin Organ Transplant.* 2014;19(4):436–41.
181. Grifoni A, Montesano C, Patronov A, Colizzi V, Amicosante M. Immunoinformatic docking approach for the analysis of KIR3DL1/HLA-B interaction. *Biomed Res Int.* 2013;2013(i):14–9.
182. Fan QR, Long EO, Wiley DC. Crystal structure of the human natural killer cell inhibitory receptor KIR2DL1-HLA-Cw4 complex. *Nat Immunol.* 2001;2(5):452–60.
183. Guillamon CF, Martínez-Sánchez M V., Gimeno L, Mrowiec A, Martínez-García J, Server-Pastor G, et al. NK cell education in tumor immune surveillance: DNAM-1/KIR receptor ratios as predictive biomarkers for solid tumor outcome. *Cancer Immunol Res.* 2018;6(12):1537–47.
184. Nowak J, Kościńska K, Mika-Witkowska R, Rogatko-Koroś M, Mizia S, Jaskuła



- E, et al. Role of donor activating KIR-HLA ligand-mediated NK Cell education status in control of malignancy in hematopoietic cell transplant recipients. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(5):829–39.
185. Taylor EH, Marson EJ, Elhadi M, Macleod KDM, Yu YC, Davids R, et al. Factors associated with mortality in patients with COVID-19 admitted to intensive care: a systematic review and meta-analysis. *Anaesthesia*. 2021;76(9):1224–32.
186. Jennifer M. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 ( COVID-19 ) Outbreak in China Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA*. 2020;323(13):2020–3.
187. Viewpoint T, Rate OF. Case-Fatality Rate and Characteristics of Patients Dying in Relation to COVID-19 in Italy. *JAMA*. 2020;323(18):1775-1776.
188. June F, Moore JT, Ricaldi JN, Rose CE, Fuld J, Parise M, et al. Disparities in Incidence of COVID-19 Among Underrepresented Racial / Ethnic Groups in Counties Identified as Hotspots During June 5 – 18 , 2020 —. *Morb Mortal Wkly Rep*. 2020;69(33):1122–6.
189. Peckham H, Gruijter NM De, Ciurtin C, Wedderburn LR, Deakin CT, Raine C, et al. Male sex identified by global COVID-19 meta-analysis as a risk factor for death and ITU admission. *Nat Commun*. 2020;11(1):6317. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-19741-6>
190. Kabarriti R, Brodin NP, Maron MI, Guha C, Kalnicki S, Garg MK, et al. Association of Race and Ethnicity With Comorbidities and Survival Among

- Patients With COVID-19 at an Urban Medical Center in New York. *JAMA Netw Open.* 2020;30(9):e2019795.
191. Paper P. COVID-19 and vitamin D . Position paper of the Spanish Society for Bone Research and Mineral Metabolism ( SEIOMM ). *Rev Osteoporos Metab Min.* 2020;12(4):155–9.
192. Ray JG, Schull MJ, Vermeulen MJ, Park AL. Association between abo and rh blood groups and sars-cov-2 infection or severe covid-19 illness. *Ann Intern Med.* 2021;174(3):308–15.
193. Article O. Genomewide Association Study of Severe Covid-19 with Respiratory Failure. *N Engl J Med.* 2020;383(16):1522-1534.
194. Amor S, Blanco LF. Innate immunity during SARS-CoV-2 : evasion strategies and activation trigger hypoxia and vascular damage. *Clin Exp Immunol.* 2020;202(2):193–209.
195. Blanco-Melo D, Nilsson-Payant BE, Liu WC, Uhl S, Hoagland D, Møller R, et al. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell.* 2020;181(5):1036-1045.e9.
196. Channappanavar R, Perlman S. Pathogenic human coronavirus infections : causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. *Semin Immunopathol.* 2017;39(5):529–39.
197. Tisoncik JR, Korth MJ, Simmons CP, Farrar J, Martin TR, Katze MG. Into the



- Eye of the Cytokine Storm. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2012;76(1):16–32.
198. Zhang Z, Ai G, Chen L, Liu S, Gong C, Zhu X, et al. Associations of immunological features with COVID-19 severity : a systematic review and meta-analysis. *Zhang al BMC Infect Dis*. 2021;21(1):738.
199. Laura A. Montiel-Cervantes DSc, Gabriela Medina MSc, María Pilar Cruz-Domínguez DSc, Sonia-Mayra Pérez-Tapia DSc, María C. Jiménez-Martínez DSc, Hugo-Iván Arrieta-Oliva DSc, Gregorio Carballo-Uicab DSc, Laura López-Pelcastre MD and RC-SDs. Poor Survival in COVID-19 Associated with Lymphopenia and Higher Neutrophile-Lymphocyte Ratio. *Isr Med Assoc J*. 2021;23(3):153-159.
200. Jiang M, Guo Y, Luo Q, Huang Z, Zhao R, Liu S, et al. T-Cell Subset Counts in Peripheral Blood Can Be Used as Discriminatory Biomarkers for Diagnosis and Severity Prediction of Coronavirus Disease 2019. *J Infect Dis*. 2020;222(2):198-202.
201. Thachil J, Tang N, Gando S, Levi M, Clark C, Iba T, et al. ISTH interim guidance on recognition and management of coagulopathy in COVID-19. *J Thromb Haemost* 2020;18(5):1023–1026.
202. Vabret N, Britton GJ, Gruber C, Hegde S, Kim J, Kuksin M, et al. Immunology of COVID-19: Current State of the Science. *Immunity*. 2020;52(6):910–41.
203. Wilk AJ, Rustagi A, Zhao NQ, Roque J, Martínez-Colón GJ, McKechnie JL, et al. A single-cell atlas of the peripheral immune response in patients with severe COVID-19. *Nat Med*. 2020;26(7):1070–6.

204. Liu Y, Tan W, Chen H, Zhu Y, Wan L, Jiang K, et al. Dynamic changes in lymphocyte subsets and parallel cytokine levels in patients with severe and critical COVID-19. *BMC Infect Dis.* 2021;21:79.
205. Xie X, Cheng X, Wang G, Zhang B, Liu M. Single-cell transcriptomes of peripheral blood cells indicate and elucidate severity of COVID-19. *Sci China Life Sci.* 2021;64(10):1634–44.
206. Sanz JM, Gómez Lahoz AM, Martín RO. Role of the immune system in SARS-CoV-2 infection: immunopathology of COVID-19. *Med.* 2021;13(33):1917–31.
207. Varchetta S, Mele D, Oliviero B, Mantovani S, Ludovisi S, Cerino A, et al. Unique immunological profile in patients with COVID-19. *Cell Mol Immunol.* 2021;18(3):604–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41423-020-00557-9>
208. Maucourant C, Filipovic I, Ponzetta A, Aleman S, Cornillet M, Hertwig L, et al. Natural killer cell activation related to clinical outcome of COVID-19. *medRxiv.* 2020;1–26.
209. van Eeden C, Khan L, Osman MS, Tervaert JWC. Natural killer cell dysfunction and its role in covid-19. *Int J Mol Sci.* 2020;21(17):1–17.
210. Yin X, Liu T, Wang Z, Ma M, Lei J, Zhang Z, et al. Expression of the inhibitory receptor TIGIT is up-regulated specifically on NK Cells with CD226 activating receptor from HIV-infected individuals. *Front Immunol.* 2018;9:2341.



211. Zheng M, Gao Y, Wang G, Song G, Liu S, Sun D, et al. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol.* 2020;17(5):533–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41423-020-0402-2>
212. Graef T, Moesta AK, Norman PJ, Abi-Rached L, Vago L, Older Aguilar AM, et al. KIR2DS4 is a product of gene conversion with KIR3DL2 that introduced specificity for HLA-A\*11 while diminishing avidity for HLA-C. *J Exp Med.* 2009;206(11):2557–72.
213. Olvera A, Pérez-Álvarez S, Ibarrondo J, Ganoza C, Lama JR, Lucchetti A, et al. The HLA-C\*04:01/KIR2DS4 gene combination and human leukocyte antigen alleles with high population frequency drive rate of HIV disease progression. *Aids.* 2015;29(5):507–17.
214. Merino AM, Dugast AS, Wilson CM, Goepfert PA, Alter G, Kaslow RA, et al. KIR2DS4 promotes HIV-1 pathogenesis: New evidence from analyses of immunogenetic data and natural killer cell function. *PLoS One.* 2014;9(6):e99353.
215. Merino A, Malhotra R, Morton M, Mulenga J, Allen S, Hunter E, et al. Impact of a functional KIR2DS4 allele on heterosexual HIV-1 transmission among discordant Zambian couples. *J Infect Dis.* 2011;203(4):487–95.
216. Gallez-Hawkins GM, Franck AE, Li X, Thao L, Oki A, Gendzekhadze K, et al. Expression of activating KIR2DS2 and KIR2DS4 genes after hematopoietic cell transplantation: Relevance to cytomegalovirus infection. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011;17(11):1662–72.
217. Mozer-Lisewska I, Zwolińska K, Kowala-Piaskowska AE, Bura M,

- Rozpłochowski B, Pauli A, et al. Genetic (KIR, HLA-C) and Some Clinical Parameters Influencing the Level of Liver Enzymes and Early Virologic Response in Patients with Chronic Hepatitis C. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2016;64(1):65–73.
218. Sakuraba A, Haider H, Sato T. Population difference in allele frequency of HLA-C\*05 and its correlation with COVID-19 mortality. *Viruses*. 2020;12(11):1333.
219. Goodridge JP, Burian A, Lee N, Geraghty DE. HLA-F and MHC Class I Open Conformers Are Ligands for NK Cell Ig-like Receptors. *J Immunol*. 2013;191(7):3553–62.
220. Ni Lee1, Akiko Ishitani2 and DEG. HLA-F is a surface marker on activated lymphocytes. *Eur J Immunol*. 2010;40(8):2308-2318.
221. Pandolfi L, Fossali T, Frangipane V, Bozzini S, Morosini M, D’Amato M, et al. Broncho-alveolar inflammation in COVID-19 patients: A correlation with clinical outcome. *BMC Pulm Med*. 2020;20:301.
222. Hin Chu, Jasper Fuk-Woo Chan, Yixin Wang<sup>1</sup>, Terrence Tsz-Tai Yuen, Yue Chai, Yuxin Hou, Huiping Shuai, Dong Yang, Binjie Hu, Xiner Huang, Xi Zhang Jian-Piao Cai, Jie Zhou, Shuofeng Yuan, Kin-Hang Kok, Kelvin Kai-Wang To, Ivy Hau-Yee Chan, Anna Jinxia Zhang, Ko-Yung Sit, Wing-Kuk Au, Kwok-Yung Yuen. Comparative replication and immune activation profiles of SARS-CoV-2 and SARS-CoV in human lungs: an ex vivo study with implications for the pathogenesis of COVID-19. *Clin Infect Dis*. 2020:ciaa410.



223. Vivian JP, Duncan RC, Berry R, O'Connor GM, Reid HH, Beddoe T, et al. Killer cell immunoglobulin-like receptor 3DL1-mediated recognition of human leukocyte antigen B. *Nature*. 2011;479(7373):401–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature10517>

