



**POLITÉCNICA**



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID**

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA**

**AGRONÓMICA, ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS**

**GRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA - INVESTIGACIÓN**

***Test de transformación de linfocitos en  
pacientes ingresados por enfermedad  
COVID\_19 y su asociación con la reacción a  
fármacos usados en tratamiento.***

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**Autor: Carlos Pérez Paniagua**

**Tutor: Dr. Javier Martín- Botas Mateo  
Dr. Mariano Perales**

**Madrid, Julio de 2021**



**POLITÉCNICA**



E.T.S. DE INGENIERÍA AGRONÓMICA,  
ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID**  
**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA**  
**AGRONÓMICA, ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS**

**GRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

Test de transformación de linfocitos en  
pacientes ingresados por enfermedad  
COVID\_19 y su asociación con la  
reacción a fármacos usados en  
tratamiento.

**TRABAJO DE FIN DE GRADO**

**Carlos Pérez Paniagua**

**MADRID, 2021**

Tutor: Dr. Javier Martín Botas Mateo

CoTutor UPM: Dr. Mariano Perales

Dpto. de Biotecnología y Genómica de Plantas



**POLITÉCNICA**



E.T.S. DE INGENIERÍA AGRONÓMICA,  
ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS

**TÍTULO DEL TFG-** Test de transformación de linfocitos en pacientes ingresados por enfermedad COVID\_19 y su asociación con la reacción a fármacos usados en tratamiento.

**Memoria presentada por CARLOS PÉREZ PANIAGUA  
para la obtención del título de Graduado en Biotecnología por la Universidad  
Politécnica de Madrid**

**Fdo:**

**VºBº Tutor**

**Dr Javier Martín-Botas Mateo  
Dpto de Microarrays  
IRYCIS - Hospital Universitario Ramón y Cajal**

**VºBº CoTutor UPM**

**Dr. Mariano Perales  
Dpto. de Biotecnología - Biología  
Vegetal. ETSIAAB- Universidad  
Politécnica de Madrid**

**Madrid, 8 de Julio 2021**

*Para ti Moisés, por ser mi fuente de inspiración para  
el Trabajo y perder en el Póker, te debo una.*

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a Javier Martín-Botas Mateo por el apoyo, la ayuda y los consejos a la hora de realizar este trabajo. Gracias también por mostrarme el esfuerzo, la dedicación y la pasión por la investigación, así como por todo el aprendizaje y la confianza en mí durante estos meses. Agradecer también a todos los miembros del laboratorio por toda su ayuda y sus consejos.

Por otra parte, agradecer a Carlos Fernández por ofrecerme la oportunidad de incorporarme al grupo de Investigación para la realización de las prácticas académicas y este trabajo, y por los consejos durante mi estancia en el hospital.

Gracias a mi madre, por ser un apoyo incondicional, por aguantar mis días insoportables, pero también por poder celebrar mis éxitos como mi aprobado en Inglés y por haberme inculcado unos valores y unos principios que me han llevado a ser quién soy, de lo cual me siento muy orgulloso. Gracias carritos, por haber sido mi fuente de motivación, de ánimos y de ganas de vivir al máximo cada día. Gracias Esther, por haberme enseñado la maravilla de Zotero, haciendo la vida más fácil y divertida con las bibliografías y a comer manzanas con estilo. Gracias a las queridas *darlings* por ser otra fuente de motivación y de inspiración. Gracias Monis porque juntos somos el dúo dinámico de la sordomudez y la tontería. Gracias Trufillas por ser mi fuente de inspiración para la piratería. Gracias a Hector, por ser un magnífico entrenador y solo saber decir “Ordeen, Ordeen”. Gracias a mi profesor de Biología de 1º de carrera Juanpe, por enseñarme a decirme Amanita Phalloides. Gracias Rosario por demostrarme que mi presentación de la Escherichia Coli será siempre recordada. Y por último, gracias a todos, amigos, compañeros y profesores, que habéis formado parte de esta increíble etapa universitaria inolvidable.

# ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE SÍMBOLOS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMEN .....	xi
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	1
<i>OBJETIVOS</i> .....	15
CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
<i>Pacientes</i> .....	16
<i>Reactivos</i> .....	16
<i>Metodología</i> .....	17
<i>Análisis Estadístico</i> .....	18
CAPÍTULO 4: RESULTADOS.....	19
CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN.....	25
<i>CONCLUSIONES</i> .....	28
CAPÍTULO 6: BIBLIOGRAFÍA .....	29

# ÍNDICE DE TABLAS

## CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

- *Tabla 1. Resumen de los fármacos empleados* ..... 17
- *Tabla 2. Concentraciones empleadas de los fármacos* ..... 18

# ÍNDICE DE FIGURAS

## CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

- *Figura 1. Clasificación de Coronavirus Humanos. Tomada de Malik, 4.* ..... 2
- *Figura 2. Estructura del virus SARS-CoV-2. Representación esquemática del virus SARS-CoV-2. Tomada de Novak et al. 5*..... 3
- *Figura 3. Ciclo infeccioso del virus SARS CoV-2. (Adaptada de Astuti y Ysrafil (11))*..... 4
- *Figura 4. Ensamblaje del virus por gemación en las membranas del compartimento intermedio ubicadas cerca de retículo endoplásmico ERES. (Adaptado de Saraste y Prydz, (15))*..... 5
- *Figura 5. Características inmunológicas en la piel del exantema maculopapular. DC, célula dendrítica, B, célula B, Mo, Monocitos, Eo, eosinófilos. (Adaptada de Novak et al. (5))* ..... 10
- *Figura 6. Características histológicas de las biopsias de piel de dos pacientes con COVID-19 positivo con erupciones maculopapulares. Tomada de Novak et al. (5)*..... 10
- *Figura 7. Características inmunológicas en la piel de erupciones de urticaria. M, mastocitos, T, células T. Tomada de Novak et al. (5))*..... 11
- *Figura 8. Histología (tinción H&E) de la piel de DRESS. (Adaptado de Novak et al. (5))*..... 11
- *Figura 9. Las diferentes causas inmunológicas de vasculitis de vasos pequeños, medianos y grandes. Tomada de Novak et al. (5)* ..... 12

## CAPÍTULO 4. RESULTADOS

- *Figura 10. Índice de Estimulación (SI) del test de transformación de linfocitos (LTT) del Paciente 1*..... 20
- *Figura 11. Índice de Estimulación (SI) del test de transformación de linfocitos (LTT) del Paciente 2*..... 21
- *Figura 12.. Índice de Estimulación (SI) del test de transformación de Linfocitos (LTT) del Paciente 3*..... 22
- *Figura 13. Índice de Estimulación (SI) del test de transformación de linfocitos (LTT) del Paciente 4*..... 23
- *Figura 14. Índice de Estimulación (SI) del test de transformación de linfocitos (LTT) del Paciente 5*..... 24
- *Figura 15. Índice de Estimulación (SI) del test de transformación de linfocitos (LTT) del Paciente 6*..... 24

## LISTA DE SÍMBOLOS

**%**, porcentaje

**°C**, grados centígrados

**p / v**, peso de soluto por volumen de solución

**cpm**: cuentas por minuto

**ml**, mililitro

**μ l**, microlitro

**μ g / ml**, microgramos por mililitro

**μg / μl**, microgramos por microlitro



## LISTA DE ABREVIATURAS

- ACE2:** *angiotensin-converting enzyme 2*, enzima convertidora de angiotensina 2.
- AINE:** *anti-inflammatory drugs nonsteroidal*, fármacos antiinflamatorios no esteroideos.
- APC:** *antigen presenting cells*, células presentadoras de antígenos.
- ADN:** ácido desoxirribonucleico.
- ARN:** ácido ribonucleico.
- ARNm:** ácido ribonucleico mensajero.
- BAT:** *basophil activation test*, test de activación de basófilos.
- CCL:** *chemokine ligand*
- cMO:** monocitos clásicos.
- COVID-19:** enfermedad del coronavirus.
- CoV:** Coronavirus.
- CTD:** *C-terminal domain*.
- CXCL:** *chemokine ligand*
- DiHS:** *drug-induced hypersensitivity syndrome*, síndrome de hipersensibilidad inducida por fármacos.
- DMV:** *double membrane vesicles*, vesículas de doble membrana.
- DRESS:** *drug rash with eosinophilia and systemic symptoms*, reacción de sensibilidad a medicamentos con eosinofilia y síntomas sistémicos.
- dsRNA:** ácido ribonucleico de doble cadena.
- E:** glicoproteína de envoltura pequeña.
- ERGIC:** retículo endoplásmico-Golgi.
- gp130:** glucoproteína 130.
- GM-CSF:** *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, factor estimulante de las colonias de granulocitos y macrófagos.
- IC:** *middle compartment*, compartimento intermedio.
- IDT:** *intra dermal tests*, pruebas cutáneas intradérmicas.
- IFN:** interferón.
- Ig:** inmunoglobulina.
- IL:** interleucina.
- IRF3:** *regulation factor 3*, factor de Regulación 3.
- IP-10:** *Interferon-γ-Inducible Protein 10*.
- LTT:** *lymphocyte transformation test*, test de transformación de linfocitos.
- HLA:** *human leukocyte antigen*, antígeno leucocitario humano.
- N:** la proteína de la nucleocápsida.
- NET:** necrólisis epidérmica tóxica.
- NK:** *natural killer*.

**NLR:** *NOD-like receptor*.

**NF- $\kappa$ B:** *nuclear factor enhancing kappa light chains of activated B cells*, factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

**Nsps:** *non-structural proteins*, Proteínas no estructurales.

**NTD:** *N-terminal domain*.

**M:** glicoproteína de membrana.

**MAPK:** *Mitogen-Activated Protein Kinases*.

**MCP-1:** *monocyte chemotactic protein 1*, proteína quimiotáctica de monocitos 1.

**MERS:** *Middle East Respiratory Syndrome*, síndrome respiratorio de Oriente Medio.

**MHC:** *major histocompatibility complex*, complejo mayor de la histocompatibilidad.

**OMS:** Organización Mundial de la Salud.

**PAMPs:** *Pathogen-associated molecular patterns*.

**PBMCs:** *peripheral blood mononuclear cell*, célula mononuclear de sangre periférica.

**PBP 1A:** *penicillin binding protein*.

**PGE2:** prostaglandina natural E2.

**pMo:** Monocitos patrulleros.

**PRR:** *Pattern Recognition Receptor*.

**RE:** retículo endoplásmico.

**RIG-I:** *retinoic acid inducible gene-I*.

**RTC:** replicase-transcriptase complex, complejo de replicasa-transcriptasa.

**S:** glicoproteína de pico.

**SARS:** *Severe Acute Respiratory Syndrome*, síndrome respiratorio severo agudo.

**SDRA:** *severe respiratory syndrome*, síndrome respiratorio severo.

**SJS:** síndrome de Stevens-Johnson.

**SI:** *stimulation index*, índice de estimulación.

**SPT:** *skin prick test*, prueba cutánea por punción.

**SsRNA:** ácido ribonucleico de una sola cadena.

**STAT:** *Signal Transducer and Activator of Transcription*.

**TCR:** *T cell receptor*.

**TGF $\beta$ :** *transforming growth factor  $\beta$  receptors*, receptores del factor de crecimiento transformante  $\beta$ .

**TLR:** *toll-like receptor*.

**TNF-  $\alpha$ :** *tumor necrosis factor alpha*, factor de necrosis tumoral alfa.

**TMPRSS2:** transmembrane serine protease serin type II, proteasa transmembrana de tipo II.

**VII-1:** *Human immunodeficiency virus 1*.

## RESUMEN

En los inicios de la enfermedad pandémica por coronavirus (COVID-19), causada por el síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-CoV-2) presenta una gravedad variable desde episodios asintomáticos hasta muy graves. El COVID-19, de la familia *Coronaviridae*, afecta principalmente a las vías respiratorias que produce tos seca, fiebre, mialgia, dolor de cabeza, fatiga hasta una neumonía intersticial e insuficiencia respiratoria grave.

Sin embargo, algunos de estos pacientes registraron manifestaciones cutáneas y lesiones del sistema vascular fuera de la esfera respiratoria como síndromes autoinflamatorios severos (fiebre mediterránea familiar, dermatosis neutrofilicas), erupciones vesiculares, urticarianas y maculopapulares, livedo, necrosis y otras formas de vasculitis o síndromes DRESS conocidos por reacciones adversas hacia fármacos. Se desconocen los mecanismos por el que se lleva cabo estas lesiones cutáneas que se han ido relacionando con mayor frecuencia dentro del cuadro infeccioso COVID-19. Estos síntomas pueden estar provocados por una infección viral, una respuesta adversa hacia el fármaco o ambos. Además, estos signos clínicos pueden empeorar acorde a la susceptibilidad de los pacientes ligada a los antígenos leucocitarios humanos (HLA) que pueden provocar una tormenta inmune que causa un daño multiorgánico e incluso la muerte.

El objetivo principal de este Trabajo de Fin de Grado consiste en estudiar la importancia del papel de la respuesta celular en las lesiones cutáneas inducidos por virus y por fármacos a través de la prueba de transformación de linfocitos (LTT). Estos basados en la capacidad de las células T de memoria del paciente específicas del fármaco para que proliferen una vez que hayan sido estimuladas por un antígeno. Los resultados obtenidos muestran si los linfocitos han proliferado sobre los diferentes tratamientos genéricos que se usaron en la primera oleada COVID-19: Azitromicina, Amoxicilina, Ácido Clavulánico, Hidroxicloroquina, Lopinavir y Ritonavir. De modo que en presencia de proliferación nos puede aportar información para acercarnos el origen de las lesiones cutáneas descritas de los pacientes.

Aunque aún desconocemos el mecanismo molecular, los datos obtenidos en este trabajo permiten apoyar la idea de que los ensayos LTT no se correlaciona con las pruebas cutáneas y de provocación y parece tan solo asociarse con la exposición hacia fármacos.

## CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La pandemia por COVID-19 golpeó con fuerza en el hospital Ramón y Cajal, siendo el único hospital de Madrid con dermatólogos de guardia 24 horas donde se recopilaron manifestaciones cutáneas en los pacientes con la enfermedad viral. Por entonces, no existía más que dos casos reportados en la literatura sin descripción. La experiencia dermatológica indicaba que algunos de estos pacientes presentaban más que un cuadro infeccioso COVID-19 que recordaban a síndromes autoinflamatorios severos o a reacciones farmacológicas con eosinofilia y síntomas sistémicos (DRESS). En estos síndromes se produce una reacción adversa severa a algunos medicamentos caracterizada por erupción generalizada en la piel, fiebre, y aumento del número de algunas células de la sangre como los eosinófilos (eosinofilia) y los linfocitos (linfocitosis). También se observaban fenómenos vasculares en pacientes graves sugerentes de vasculitis cutáneas proponiendo algo más que un cuadro de distress respiratorio. Las lesiones cutáneas (erupciones, sabañones, vasculitis entre otros) aparecían de forma tardía y eso llevó al servicio de dermatología a recopilar numerosos casos con afectación cutánea generalizada, donde se realizaron biopsias cutáneas que demostraron que no existía ARN vírico en la piel. Esto puede ser por escasas cantidades de ARN o que el virus no infecte células de la piel, sin descartar que pueda encontrarse en otros compartimentos celulares. Por ello se le empezó a dar más importancia a los fármacos que se emplearon durante la pandemia con la sospecha de que fuesen los responsables de las lesiones cutáneas como una reacción alérgica. En la literatura recopilada, no se ha considerado esta posibilidad y sólo se encontraron referencias aisladas, aunque se ha visto que los tratamientos empleados son conocidos por producir reacciones cutáneas que puede conducir a una reacción inflamatoria descontrolada sistémica que puede conducir a la muerte hasta en un 20% o 40% de los pacientes.

### 1.1. Coronavirus: Aspectos generales

Los coronavirus (familia *Coronaviridae*) son virus de forma esférica, de aproximadamente 125 nm de diámetro con picos que le sobresalen desde la superficie y se asemeja como una corona <sup>(1,2)</sup>. Su genoma es ARN de sentido positivo monocatenario (++ssARN) que oscila entre 26–32 kpb <sup>(3)</sup>. Dentro de la familia *Coronaviridae* del orden *Nidovirales* se encuentran dos subfamilias: el *Orthocoronavirinae* y el *Torovirinae*. Dentro de la primera familia incluyen cuatro géneros: *alfacoronavirus* ( $\alpha$ -CoV), *betacoronavirus* ( $\beta$ -CoV), *gammacoronavirus* ( $\gamma$ -CoV) y *deltacoronavirus* (d-CoV)<sup>(4)</sup> (Figura 1). Son patógenos para los humanos produciendo enfermedades en las vías respiratorias, intestino, hígado y sistema nervioso. Algunos miembros de la familia de los coronavirus pueden infectar las vías respiratorias superiores y otros pueden afectar a las vías respiratorias inferiores incluyendo neumonía y cursos mortales con infectividad respiratoria y fecal-oral <sup>(5)</sup>.

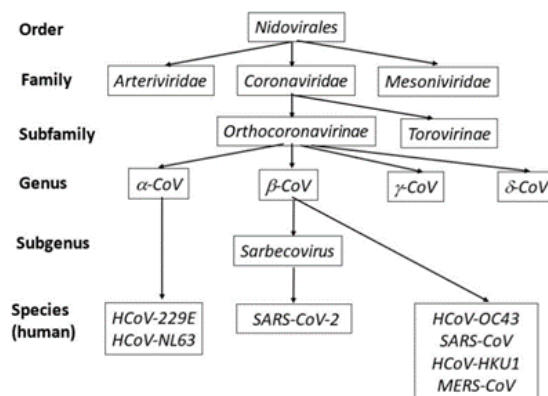


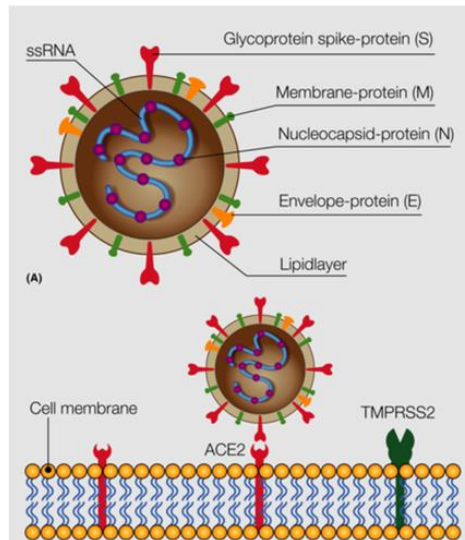
Figura 1. Clasificación de Coronavirus Humanos. Tomada de Malik, 4.

El virus SARS-CoV-2, siendo el miembro más estudiado de esta familia pertenece al género *betacoronavirus* ( $\beta$ -CoV) dentro de la subfamilia *Orthocoronavirinae* que presenta un 51,8% de identidad con MERS-CoV y un 96% de identidad en todo el genoma con un coronavirus de murciélago, suponiendo el reservorio natural del SARS-CoV-2 <sup>(5)</sup>. Este virus marcó el inicio de una nueva pandemia llamada enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) desde la detección de numerosos casos de neumonía de 425 pacientes iniciales de etiología desconocida en la Ciudad de Wuhan, provincia de Hubei, China conocido como síndrome respiratorio severo (SDRA) <sup>(6)</sup>.

## 1.2. El virus SARS-CoV-2

### 1.2.1. Estructura y morfología del virión

El virus consta de cuatro proteínas estructurales principales que incluyen la glicoproteína de pico (S), la glicoproteína de envoltura pequeña (E), la glicoproteína de membrana (M) y la proteína de la nucleocápsida (N) (Figura 2) <sup>(7)</sup>. La glicoproteína S o también denominado la espiga, es una proteína de transmembrana de 150 kDa que se encuentra en la parte externa del virus. La proteína S forma homotrímeros que se sobresalen en la superficie viral y facilita la unión de la envoltura del virus a las células huésped gracias a la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) que se expresa solamente en la superficie apical de las células epiteliales que recubren las vías respiratorias conductoras, así como las células epiteliales alveolares<sup>(8)</sup>. El virus entra por el citosol del huésped a través de la vía ácida proteolítica que produce la escisión de la proteína S gracias a una serin proteasa transmembrana de tipo II (TMPRSS2) de tipo furina que se encuentra en la membrana celular produciéndose la fusión de la envoltura del virus con la célula <sup>(9)</sup>.



**Figura 2. Estructura del virus SARS-CoV-2.** Representación esquemática del virus SARS-CoV-2. Tomada de Novak et al.5

La proteína N, también conocida como nucleocápside, es el componente estructural del virus que se localiza en el retículo endoplásmico- región de Golgi que estructuralmente se une al ácido nucleico del virus. Se encuentra unida al ARN, la proteína participa en procesos relacionados con el ciclo de replicación, el genoma viral y la respuesta celular de las células huésped a las infecciones virales<sup>(10)</sup>. Esta proteína se encuentra fosforilada que junto a los dominios N – terminal (NTD) y dominio central (CTD), facilita la unión al ARN de forma óptima<sup>(4)</sup>. La glicoproteína M, juega un papel importante en la determinación de la forma de la envoltura del virus y tiene la capacidad de asociarse a las demás proteínas estructurales. Participa en la finalización del ensamblaje viral al estabilizar el complejo N (proteína N + ARN) dentro del virión interno. La proteína E participa en la producción y maduración de este virus<sup>(11)</sup>.

### 1.2.2. Ciclo infeccioso

El virus SARS-CoV-2 puede introducirse en el cuerpo humano a través de sus receptores ACE2 que son expresados por las células CD8+, natural killer (NK) en reposo y activadas, células epiteliales alveolares de tipo II, células endoteliales vasculares, macrófagos, monocitos y adipocitos<sup>(12)</sup>. Por ello la nariz y epitelio nasal juegan un papel importante en la propagación del virus ya que muestran la expresión más alta del gen ACE2. Sin embargo, se ha observado que en la lengua presenta una alta expresión del gen ACE2 en las células endoteliales de la mucosa oral, por lo que podría proporcionar una entrada al virus y se declararía la cavidad oral como un órgano potencial de alto riesgo viral de un individuo a otro<sup>(13)</sup>. De forma genérica, ACE2 se distribuye por el intestino delgado, los testículos, los riñones, el corazón, la tiroides y el tejido adiposo que presentan una alta expresión del gen. La unión de SARS CoV a ACE2 regula a la baja la expresión del gen e influye en el papel principal del ACE2, la regulación del sistema renina-angiotensina. Por ello, esto conlleva a una desregulación del equilibrio de los factores solubles, electrolitos y la presión arterial combinada con un aumento de la permeabilidad e inflamación vascular.

El ciclo infeccioso del COVID-19 (CoV) se divide en cuatro etapas: entrada, transcripción y replicación del complejo de replicasa-transcriptasa (RTC) de las proteínas subgenómicas, traducción de las proteínas estructurales M, S, E y N y exocitosis. (Figura 3.)

El proceso de entrada del coronavirus a la célula huésped comienza con la unión de la proteína S de la superficie del virus al receptor ACE2. Después de la fusión del virus, la TMPRSS2 que está presente en la superficie de la célula huésped eliminará la ACE2 y activará a las proteínas S unidas al receptor. Tras esa activación provoca una serie de cambios conformacionales que permite al virus que ingrese en la célula. De este modo las proteínas ACE2 y TMPRSS2 son determinantes para la entrada del virus.

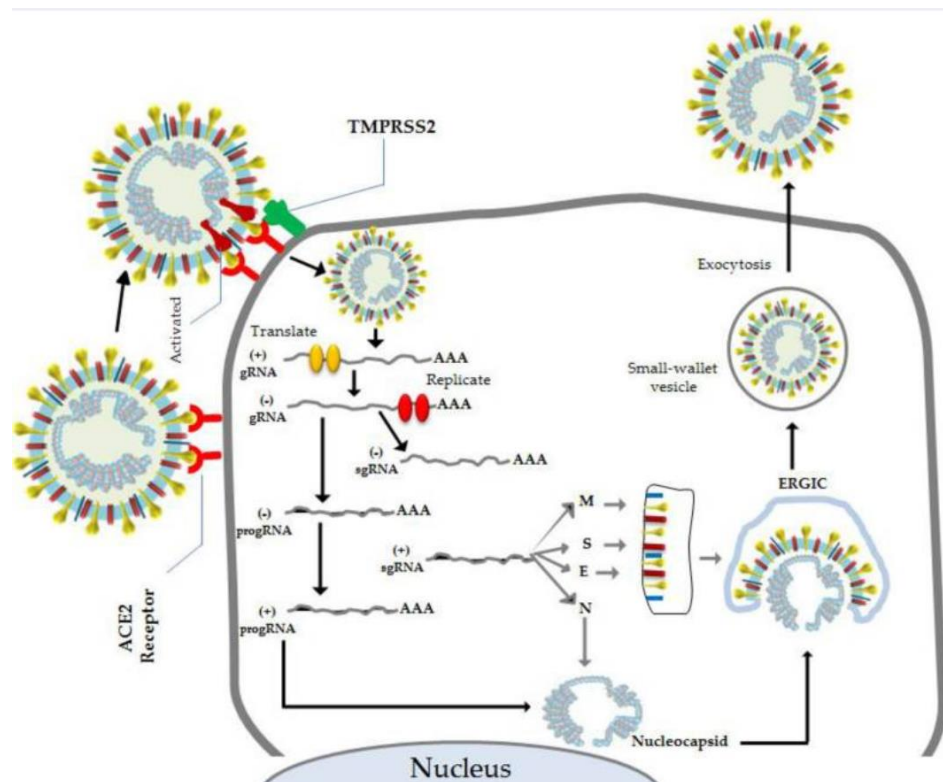


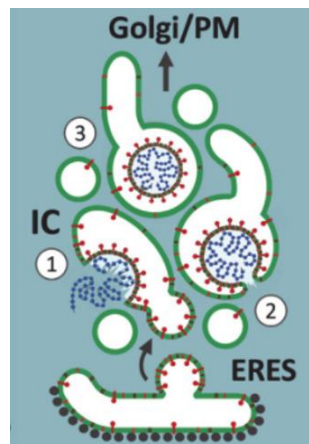
Figura 3. Ciclo infeccioso del virus SARS CoV-2. (Adaptada de Astuti y Ysrafil (11)).

Tras la escisión entre pp1a y pp1ab en proteínas no estructurales (nsps), muchos de ellos forman posteriormente el complejo RTC en vesículas de doble membrana (DMV), que son principalmente un ensamblaje de ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) y subunidades que contienen la helicasa. Además, el complejo RTC transcribe una plantilla de genoma endógeno de entrada viral a genes de sentido negativo tanto del genoma de la progenie como del ARN subgenómico como productos intermedios y seguidamente de la transcripción a ARNm de sentido positivo mediados por RdRp<sup>(14)</sup>. Dichas proteínas subgenómicas se traducen en las proteínas estructurales M, S y E. A continuación, se aíslan en el retículo endoplásmico y luego se trasladan al compartimento intermedio (IC) del retículo endoplásmico-Golgi (ERGIC) (Figura 3.) siendo esto un sello general de los CoV<sup>(15)</sup>. Por otro lado, la proteína N se involucra en la forma de la nucleocápside y pasar al



compartimento ERGIC donde se asocia con el resto de las proteínas estructurales formando pequeñas vesículas en forma de “libro” que se exportará fuera de la célula a través de la exocitosis.<sup>(11)</sup>

Los viriones pleomórficos del CoV muestran un tamaño que van de 100 a 160 nm de diámetro. Esto consiste en una nucleocápside interna y una bicapa lipídica, que proviene del IC durante el proceso de gemación donde da lugar el proceso de incorporación de las proteínas estructurales S, M y E sintetizados en los ribosomas del RE. Múltiples copias de la proteína N se unen en forma de perlas en una cuerda al ARN genómico monocatenario formando nucleocápsides citoplasmáticos (Figura 4. – *Paso 1*). La ribonucleoproteína resultante se pliega sobre sí misma, formando la correspondiente nucleocápside helicoidal <sup>(16)</sup>. Las proteínas estructurales se empaquetan en vesículas de transporte para su entrega en el IC. La proteína S se encuentra ligada a la proteína N donde posteriormente se sobresale de la envoltura dando al virión su forma de corona, clave para la unión y entrada celular. La proteína M, principal componente proteico de la envoltura viral, tras su homooligomeración e interacción con las proteínas N, S y E, y por tanto con el ARN genómico, da forma al virión.



**Figura 4. Ensamblaje del virus por gemación en las membranas del compartimento intermedio ubicadas cerca de retículo endoplásmico ERES. (Adaptado de Saraste y Prydz, (15)).**

Por último, la proteína E que se encuentra modificada por palmitoilación, presenta un papel importante en el ensamblaje del virus, interactuando con la proteína M podría provocar la curvatura de la membrana durante la gemación o actuar como proteína de escisión para completar el ensamblaje del virus. En ausencia de la proteína se ha observado que se producen CoV recombinantes lisados o una progenie incompetente incapaz de infectar <sup>(4)</sup> (Figura 4. - *Paso 2*). Después de la entrada en el lumen de IC, las partículas de virus están preparadas para moverse por la membrana plasmática. Mientras tanto los componentes del IC sirven de portadores de transporte móviles (Figura 4. – *Paso 3*). Finalmente, la proteína E presenta un papel crucial para la liberación de los virus gracias a la formación de un canal iónico pentamérico (vioporina) que facilita la exocitosis.<sup>(15)</sup>



### 1.3. Respuesta inmunitaria a la infección por coronavirus.

La respuesta inmunitaria hacia los virus SARS-CoV-2 y SARS-CoV son similares al estar mediada por citocinas<sup>(17)</sup>. En base a los primeros 425 pacientes de Wuhan se reveló de forma genérica un aumento de neutrófilos, interleucinas 6 (IL-6) y proteínas c reactivas, disminución de linfocitos, mayor expresión de citocinas proinflamatorias y quimiocinas IP-10, MCP-1, MIP-1A y factor de necrosis tumoral alfa (TNF  $\alpha$ )<sup>(18)</sup>. Estas condiciones se pueden llegar a correlacionar con la gravedad y la mortalidad de esta enfermedad. La respuesta inmune innata del huésped se desencadena con la entrada viral a través de las células presentadoras de antígeno (APC) como células dendríticas y macrófagos como primera línea de defensa del sistema inmune<sup>(19)</sup>. Las células APC tienen receptores de reconocimiento (PRR) que incluyen receptores de tipo Toll (TLR), receptores de tipo NOD (NLR), receptores de tipo RIG-I (RLR) que pueden llegar a reconocer los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que son compuestos por ácidos nucleicos, restos carbohidratos, glicoproteínas, lipoproteínas y otras moléculas que se encuentran en componentes estructurales de virus o productos intermedios como dsRNA e inducen señales en cascada inflamatoria del sistema inmune.

Hirano y Murakami<sup>(20)</sup> propusieron un mecanismo potencial de la infección a través de la vía de ACE2. El receptor 4 tipo Toll (TLR-4) puede llegar a reconocer el pico de proteína (S) de CoV. Mediante la MyD88, desencadenará la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y quinasas activadas por patógenos (MAPK) para inducir proteínas proinflamatorias. Debido a la ocupación del receptor ACE2 en la superficie celular provoca una reducción de la expresión de ACE2, seguida de un aumento de angiotensina 2. Esto resulta junto con la activación de NF- $\kappa$ B, la inducción de TNF- $\alpha$  y la forma soluble de IL6-Ra (sIL-6Ra) a través de la desintegrina y la metaloproteasa 17 (ADAM17)<sup>(21)</sup>. IL-6 se une a sIL-6Ra a través de gp130 para formar el complejo IL-6-sIL-6R, que pueden activar el transductor de señal y el activador de la transcripción 3 (STAT3) en células no inmunes. Consecuentemente, se produce una amplificación de IL-6 que induce una liberación de citocinas proinflamatorias como TGF $\beta$  (factor de crecimiento endotelial), la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), IL-8 e IL-6<sup>(22)</sup>. Por otro lado, la activación de receptores endosomales como TLR-3 podrían reconocer el genoma ARN o dsRNA del virus que provoca el reclutamiento de la proteína TRIF que posteriormente activa los factores de transcripción IRF3 y NF- $\kappa$ B para inducir citocinas proinflamatorias como el interferón- $\alpha$  y el TNF- $\beta$ . A través de TLR-4, también la introducción de PAMP puede reclutar proteínas adaptadoras TRIF<sup>(11)</sup>. Mientras tanto, el INF tipo I activará las vías JAK-STAT que junto con la fosforilación de las quinasas JAK1 y TYK2 se activaba aún más STAT1 y 2 que junto con IRF9, migran al núcleo para iniciar la transcripción de genes estimulados por IFN, conduciendo la supresión de la replicación viral y mitigando la gravedad de la enfermedad<sup>(23)</sup>.

Por otro lado, se produce una liberación excesiva de citocinas proinflamatorias como IFN  $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-18, IL-33, TNF- $\alpha$ , TGF $\beta$  y quimiocinas CCL2, CCL3, CCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10 de las células efectoras inmunes dando lugar a una tormenta de citocinas que posteriormente conducirán al síndrome severo respiratorio (SDRA)<sup>(24)</sup>. Las células APC presentarán el antígeno de CoV a los linfocitos T CD4+ mediante el MHC de clase I, y esto conduce a la liberación de IL-12 y como consecuencia se estimulan las células Th1. Además, el aumento de IL-12 e IFN- $\alpha$  produce la expresión del MHC de clase I y la activación de las células NK para evitar la replicación viral y producir la eliminación de las células infectadas por el virus. A raíz de ello, se producen citocinas proinflamatorias a través de NF-Kb, como la IL-17 que es un fenómeno indicativo de infección por SARS-CoV-2. Como consecuencia del aumento de citocinas, provoca el reclutamiento de neutrófilos, monocitos CD14<sup>dim</sup> CD16+ patrulleros, macrófagos CD68+ al sitio de infección y producirán a su vez varias citocinas y quimiocinas proinflamatorias, incluidas IL-1, IL-6, IL-8, IL-21, TNF- $\beta$  y MCP-1 resultando en una respuesta exacerbada del sistema inmune incontrolable.

Con la activación de las células Th1 se estimulan las células T CD8+ que las responsables del ataque hacia las células infectadas con CoV. Mientras tanto, las células T CD4+ podrían estimular la respuesta inmunitaria humoral mediante la producción de anticuerpos específicos de antígeno mediante la activación de las células B<sup>(19)</sup>. En una primera fase se producirán anticuerpos IgM durante las primeras 12 semanas y en una respuesta más tardía IgG. La exposición del virus junto con la formación de anticuerpos provoca la producción de células T CD4+ y CD8+ con memoria que pueden llegar a durar 4 años<sup>(25)</sup>.

### **1.3.1. Hipersensibilidad a Fármacos**

El síndrome de hipersensibilidad inducida por fármacos (DiHS) o reacción farmacológica con eosinofilia y síntomas sistémicos (DRESS) respecto a otras reacciones adversas a fármacos, la reactivación viral es un signo característico que aparece al inicio de la enfermedad. Entre los síntomas en su etapa inicial se encuentran las erupciones agudas, leucocitosis linfocitos atípicos y eosinofilia. El origen de las enfermedad coincide en que varios pacientes presentaron una infección viral previa antes de los síntomas descritos, teniendo los virus un papel relevante en la generación y activación de células T específicas del fármaco<sup>(26)</sup>. Dicho esto, se ha observado en ciertos pacientes que presentaron virus respiratorios como la influenza, rinovirus o incluso los coronavirus que posteriormente provocaron asma dando una pista del aumento de la sensibilidad alérgica en aquellos pacientes con infecciones virales previas<sup>(27)</sup>.

DRESS/ DiHS comienza con un exantema morbiliforme maculopapular con cierta fiebre, semanas después de la introducción del fármaco responsable. Las lesiones cutáneas se clasifican en máculas

eritematosas, lesiones pustulosas que a menudo adquieren un color púrpura cuya distribución reside en las zonas cutáneas del tronco y extremidades. También se ha visto en superficies mucosas junto con las palmas de las manos y las plantas de los pies. Tras la supresión de la administración de los fármacos usados, puede producirse un empeoramiento de los síntomas mencionados a los 3-4 días, que en ocasiones se podría confundirse con enfermedad infecciosa grave y daría el comienzo de una segunda terapia antibiótica. Dichas terapias pueden empeorar aún más los síntomas e incluso nuevas reacciones por el riesgo de reactividad cruzada a múltiples medicamentos. De este modo, se han informado erróneamente que la segunda terapia sea la responsable de la aparición de los síntomas de DRESS/ DiHS<sup>(26)</sup>.

En la fase aguda de la enfermedad se observa la disminución significativa de células NK CD56+ y las células BCD 19+ y el aumento de las frecuencias de CD4+, CD25+, FoxP3+ y células T reguladoras (Tregs). Las poblaciones de monocitos se pueden clasificar en distintos subconjuntos: CD14+ CD16- monocitos clásicos (cMO) y CD14<sup>dim</sup> CD16+ monocitos patrulleros (pMO), los responsables de la búsqueda de infecciones en todo el cuerpo controlando el desarrollo de las Tregs. Respecto estas poblaciones, los pMO se agotan en la fase aguda de la enfermedad y por tanto un aumento de las frecuencias de cMO. También se ha visto una disminución de los niveles de inmunoglobulinas (Ig), particularmente los niveles de IgG caen a 300-600 mg/dL en la fase aguda. Tras la recuperación clínica del paciente, todos los niveles alterados vuelven a la normalidad<sup>(28)</sup>. La prueba de transformación de linfocitos (LTT) es un método *in vitro* que se utiliza para la confirmación del fármaco causante de las erupciones farmacológicas. Para los síndromes DRESS/DiHS, se ha propuesto que las LTT se realicen tras dos meses, en la fase de recuperación.<sup>(29)</sup>

La patogenia de estos síndromes sigue siendo un misterio, pero de forma genérica se consideran una hipersensibilidad mediada por células T. En ese sentido, se planteó una hipótesis de que el deterioro de la inmunosupresión mediada por Tregs es debido a una regulación alterada de los subconjuntos de monocitos. Durante la fase aguda de DRESS/DiHS el nivel de Tregs activados/inducidos aumentan considerablemente, donde posteriormente se destaca la diferenciación de Tregs a Th17 en la resolución clínica (fase de recuperación) que coincide con la disminución de Tregs. Como se ha descrito anteriormente, se ha observado que las pMO se agotan y las cMO se mantienen inalteradas durante la fase aguda provocando una capacidad de inducir a las Tregs a través de la producción de IL-10. Tras una semana se ve una recuperación de la población de pMO que induce un cambio en las poblaciones de Tregs hacia Th17 por la producción diferencial de la IL-6<sup>(26,30)</sup>. Por ello la prueba LTT solo se realiza en los casos de resolución clínica por la presencia de poblaciones Th17 en la fase de recuperación. De este modo se debate entre un equilibrio de Tregs y Th17 respecto a las secreciones de IL-10 o IL-6 respectivamente, que puede explicar que a la semana de la administración del fármaco se produzca una variedad de respuestas inmunes durante la resolución

clínica. Esto unido a la tormenta de citocinas que provoca el SARS-CoV-2, puede llegar a producir una respuesta desmedida hacia aquellos fármacos que se incluyen en el tratamiento por la secreción excesiva de IL-6 por parte de los monocitos pMO que resulta en lesiones cutáneas como indicativos de los síndromes DRESS/DiHS, aunque se necesita la confirmación de más estudios debido a la falta de conocimiento de la patogenia que se lleva a cabo.

### **1.3.2. Transmisión y síntomas**

La transmisión viral reside en las gotitas respiratorias de una persona infectada, de modo que, durante el habla, se puede llegar a emitir gotas en grandes cantidades que permanecen hasta 8-14 minutos<sup>(31)</sup>. El período promedio de incubación hasta la aparición de los síntomas es de 4 a 11 días<sup>(32)</sup>. Entre ellos incluyen tos seca, fiebre, mialgia, dolor de cabeza, anosmia (pérdida de olfato) y ageusia (pérdida de gusto) y dependiendo de la gravedad de la enfermedad puede afectar al sistema renal, el sistema cardiaco o el tracto gastro intestinal <sup>(33)</sup>.

Más allá de los síntomas mencionados, se han observado lesiones cutáneas y lesiones del sistema vascular en varios pacientes siendo el 1% al 20% de los síntomas de la enfermedad. Entre ellas se han observado erupciones vesiculares, exantemas maculopapulares, erupciones de urticaria, necrosis y sabañones (placas violáceas dolorosas).<sup>(5)</sup>

#### **1.3.2.1. Exantemas maculopapulares**

Los exantemas maculopapulares son reacciones de hipersensibilidad pruriginosas caracterizados morfológicamente por la aparición de una pápula sobre una mancha. Raramente se ha observado en estas lesiones presencia viral, siendo posible diferenciar de un exantema viral del exantema inducido por fármacos en pacientes con SARS-CoV-2 en base a las características histológicas y los cambios inmunológicos de la piel. Alrededor del 7% de los pacientes hospitalizados desarrollan reacciones de hipersensibilidad al fármaco de gravedad variable y se produce en el 2%-3% de estos casos exantemas maculopapulares. En el caso de un exantema viral es inducido por el virus con la activación de anticuerpos e interacción con las células inmune, reclutamiento de células activadas de la piel, extravasación de eritrocitos a través de los vasos sanguíneos, producción de citocinas y con la posterior apoptosis de los queratinocitos y afines y, por tanto, cambios en la dermis y la epidermis acompañada de una fiebre maculopapular (Figura 6, panel izquierdo). Por otro lado, el exantema inducido por fármacos es derivada de una hipersensibilidad de tipo IV mediada por células T activadas, extravasación de eritrocitos, infiltrados perivasculares, citocinas de perforina y granzima B y Th1. Además, como la secreción de diferentes quimiocinas, reclutamiento de células T y eosinófilos provocando cambios en la dermis y la epidermis (Figura 6, panel derecho). <sup>(5)</sup>

También se puede llegar a distinguir a través de las características histológicas en las biopsias de piel de los pacientes con CoV. En el caso de un exantema viral no se observan eosinófilos, se observa

una dermis sin edema, un infiltrado inflamatorio perivascular que se extiende focalmente a la capa basal, provocando un leve daño vacuolado e incontinencia pigmentaria. Se muestra una epidermis con hiperqueratosis leve, ocasionalmente multinucleadas, que recuerda a un daño citopático. (Figura **5A-Virus**). Por otro lado, en el caso de un exantema inducido por fármacos, se observa un infiltrado linfocítico perivascular sutil con o sin infiltración en la dermis superior con una mezcla de pocos granulocitos eosinofílicos (Figura **5B-Drug**).<sup>(5)</sup>

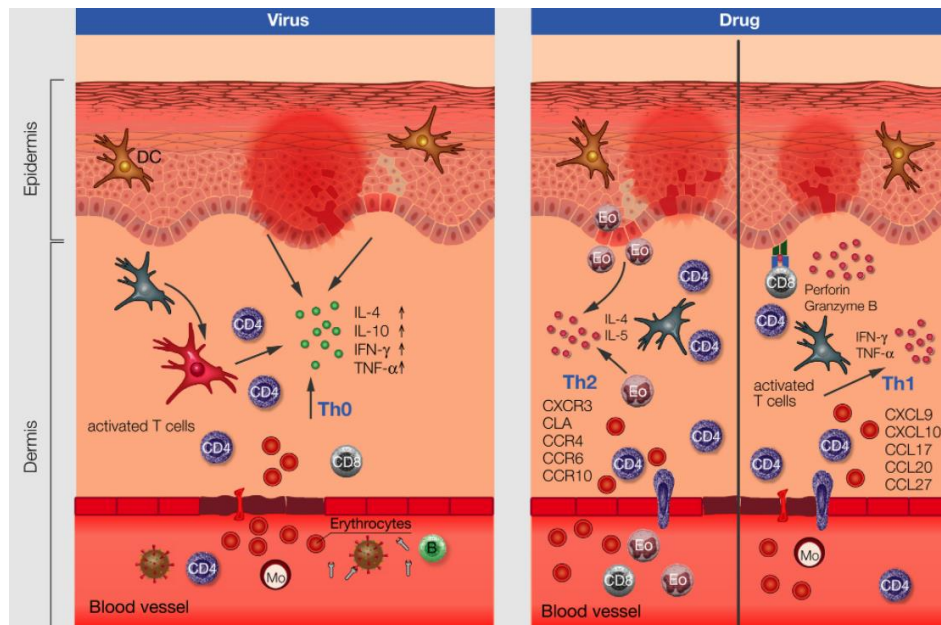


Figura 5. Características inmunológicas en la piel del exantema maculopapular. DC, célula dendrítica, B, célula B, Mo, Monocitos, Eo, eosinófilos. (Adaptada de Novak et al. (5))

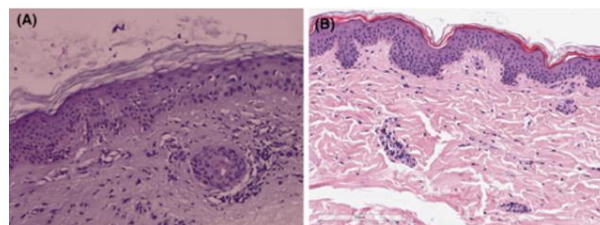
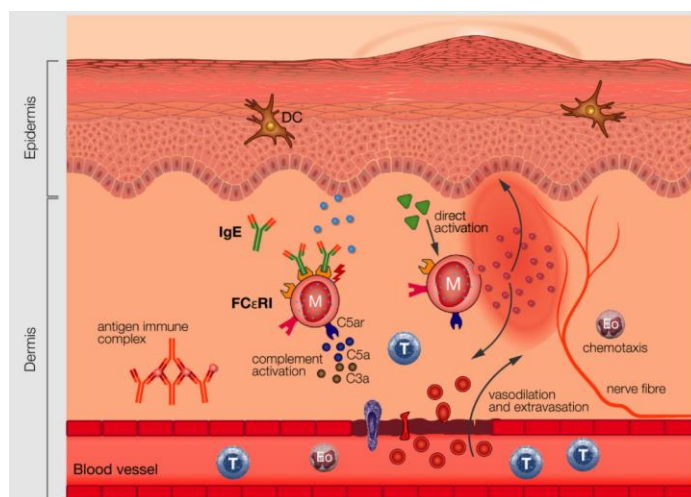


Figura 6. Características histológicas de las biopsias de piel de dos pacientes con COVID-19 positivo con erupciones maculopapulares. Tomada de Novak et al. (5)

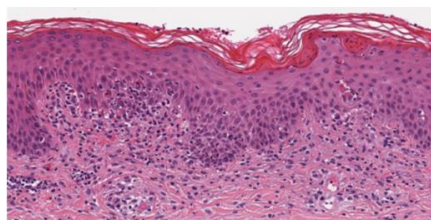
### 1.3.2.2. Erupciones urticarianas

La urticaria y las erupciones son dermatitis que provocan descamación, picazón o irritación, presentes hasta en un 50% de las infecciones respiratorias del tracto superior mediadas por la activación del complemento y la enfermedad del suero inducida por antígenos virales en el que se da a lugar la activación de mastocitos mediada por inmunocomplejos de antígenos e IgE en la urticaria <sup>(5)</sup> (Figura 7.).



**Figura 7. Características inmunológicas en la piel de erupciones de urticaria. M, mastocitos, T, células T.** Tomada de Novak et al. (5))

En el caso de erupciones inducidas por fármacos sigue un mecanismo inmunológico muy similar al caso de inducido por virus, en el que se considera como una reacción de hipersensibilidad de tipo I mediado por IgE (Figura 7.). También se involucran los otros mecanismos ya mencionados como la formación y/o precipitación de inmunocomplejos, la activación del complemento o además la interacción con las vías metabólicas de fármacos como el metabolismo del ácido araquidónico<sup>(34)</sup>. De este modo, esta reacción cutánea puede ser inducida por ARN viral, por fármacos o una mezcla de ambos.



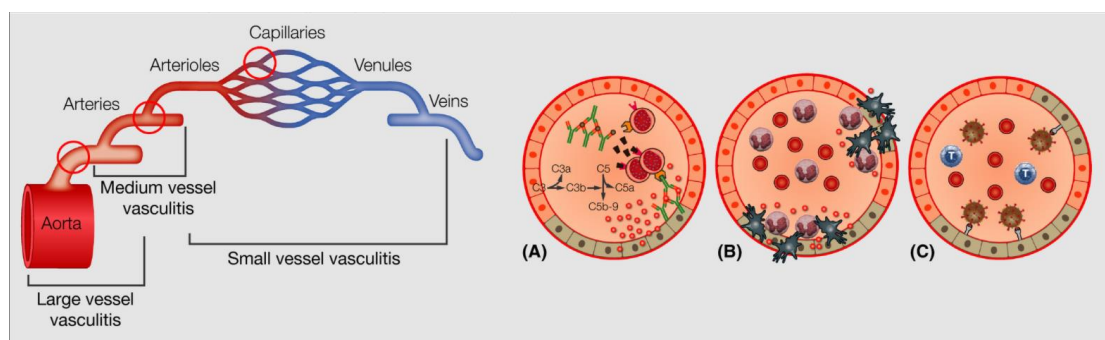
**Figura 8. Histología (tinción H&E) de la piel de DRESS.** (Adaptado de Novak et al. (5))

### 1.3.2.3. Vasculitis

La vasculitis es una inflamación que afecta a arterias (pequeños, medianos o grandes), capilares, venas o una combinación de todos los tipos de vasos sanguíneos. Los mecanismos pueden ser de reacción de tipo III o mediados por complejos mediadores inmunes a antígenos virales o parte de antígenos virales. De modo que los complejos mediadores inmunes pueden precipitar y acumularse dentro de los vasos que conducen a una lesión vascular. Una causa de vasculitis puede ser un infiltrado inflamatorio en la pared de los vasos dérmicos o subcutáneos (pueden ser neutrófilos, linfocíticos o granulomatosos), extravasación de glóbulos rojos, necrosis fibrinoide variable de las paredes de los vasos y detritos nucleares<sup>(35)</sup>. (Figura 9A.)



La hipersensibilidad mediada por células, en exposición a antígenos virales inducen en el reclutamiento de linfocitos que liberan citocinas proinflamatorias atrayendo a macrófagos y posteriormente a más linfocitos dando lugar a una respuesta exacerbada que provoca un daño tisular de los vasos como causa de una vasculitis infecciosa (Figura 9B). Como una tercera causa de vasculitis, puede ser debido a una desregulación del sistema inmune anormal que provoca una expresión diferente de moléculas de adhesión y citocinas en el endotelio vascular debido a la invasión del virus o la estimulación directa del sistema inmune por agentes infecciosos (Figura 9C).<sup>(5)</sup>



**Figura 9. Las diferentes causas inmunológicas de vasculitis de vasos pequeños, medianos y grandes.** Tomada de Novak et al. (5)

Vasculitis o livedo racemosa púrpura como resultado de una reacción de hipersensibilidad a los fármacos pueden llegar a representar de un 10% al 20% de las reacciones cutáneas. Existen numerosos fármacos que puede provocar vasculitis, mediadas por reacciones de hipersensibilidad de tipo III, depósitos de inmunocomplejos con exceso de antígeno en arterias, arteriolas, vénulas o capilares, aunque algunos medicamentos también pueden inducir la producción de anticuerpos<sup>(5)</sup>. De este modo sigue un mecanismo similar a un infiltrado inflamatorio en la pared de los vasos, mencionado anteriormente (Figura 9A)<sup>(36)</sup>.

### 1.3.3. Tratamiento de enfermedades relacionadas con el SARS-CoV-2

Desde el inicio de la pandemia y la oleada de pacientes con COVID-19 llegando al Hospital Universitario Ramón y Cajal, la experiencia dermatológica indicaba que en ciertos pacientes mostraba algo más que un cuadro clínico de SARS-CoV-2. En ese momento no existía ningún tratamiento específico para la erradicación del virus CoV y por tanto, se tuvo que basar en el enfoque terapéutico de los tratamientos de otros coronavirus como el SARS-CoV o MERS-CoV<sup>(11)</sup>. Algunas terapias que se manejaron en la primera oleada son la azitromicina, la amoxicilina junto con el ácido clavulánico, la hidroxycloquina y el Lopinavir junto con el Ritonavir entre otros.

#### **1.3.4. Azitromicina**

Antibiótico de la familia de fármacos de macrólidos con actividad antibacteriana y antivírica e inmunomoduladora siendo propiedades interesantes para las infecciones virales por COVID-19. Puede llegar a interferir en la unión del virus a la célula ya que provoca la subida de pH en la red de Trans – Golgi alterando la glicosilación de ACE2 inhibiendo la infección de SARS-CoV, también incrementa el pH de los lisosomas, responsables en el proceso de endocitosis del virus donde entra el papel de la furina o las catepsinas implicadas en la escisión de la proteína S del virus. Suprime la activación de las células T CD4+ y participa en la reducción de la producción de citocinas proinflamatorias y quimiocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, IFN- $\gamma$ , IP-10 y TNF- $\alpha$  evitando una excesiva actividad de la respuesta inmune. De este modo, puede lograr cambiar la polarización del fenotipo a antiinflamatorio a los macrófagos alveolares e incrementando la apoptosis, también con la reducción de TGF-  $\beta$  con actividad antifibrótico favoreciendo la lucha contra el virus<sup>(37)</sup>.

#### **1.3.5. Amoxicilina y ácido clavulánico.**

Considerado un antibiótico de acceso básico por la Organización Mundial de la Salud (OMS), usado desde la década de 1970, es la penicilina más usada en combinación con el ácido clavulánico, inhibidor de la  $\beta$ -lactamasa. La amoxicilina se une a la proteína fijadora de penicilina (PBP) 1A, una enzima esencial para la síntesis de la pared celular bacteriana. El anillo  $\beta$ -lactámico que contiene la amoxicilina se abre para acilar el dominio C-terminal de la transpeptidasa de PBP 1A provocando esta unión irreversible la inactivación de PBP 1A. De este modo la bacteria no puede sintetizar peptidoglucano, un componente integral de la pared celular bacteriana, responsable de la permeabilidad de la pared celular conduciendo a la lisis y muerte celular. La administración de este fármaco viene derivada de la eficacia que presenta en los tratamientos de neumonía. Esta administración suele venir acompañada del ácido clavulánico, denominado también como clavulanato en su forma de sal, que no presenta la suficiente eficacia como antibiótico, pero actúa como inhibidor suicida, que se une de forma irreversible a las enzimas  $\beta$ -lactamasas y por tanto evita que se hidrolice la amoxicilina y otras penicilinas. De este modo ayuda a mantener la función farmacológica de la amoxicilina<sup>(38)</sup>.

#### **1.3.6. Hidroxicloroquina**

La hidroxicloroquina y la cloroquina son medicamentos que se han utilizado para los tratamientos y la profilaxis de la malaria. Además, se sabe que estos fármacos antipalúdicos presentan efectos antiinflamatorios y antivirales y se han usado en enfermedades crónicas como el lupus eritematoso sistémico. Entre los mecanismos antiinflamatorios destacan la acidificación lisosomal y la presentación de antígenos, inhibición del receptor de tipo Toll (TLR), inhibición de los receptores de células T y B, la disminución de la producción de citocinas por macrófagos como la IL-1, IL-6 y TNF - $\alpha$  disminuyendo de este modo el daño tisular y la inflamación endotelial. La interacción con



los receptores de tipo Toll y los receptores de células T hace que el fármaco sea eficaz en la cascada de señalización en la respuesta inflamatoria favoreciendo la autoinmunidad sin inmunodeprimir al paciente<sup>(39)</sup>. En múltiples estudios se han observado que la cloroquina puede inhibir la replicación de SARS-CoV-2 con la reducción de la glicosilación terminal del receptor ACE2 en la unión del virus con la célula huésped y por tanto inhibe la activación de la proteína quinasa MAPK afectando a la cascada de señalización<sup>(40)</sup>.

### **1.3.7. Lopinavir y Ritonavir**

El fármaco Lopinavir es un inhibidor selectivo y potente de la proteasa del VIH tipo 1 (VIH-1), una enzima esencial para la producción de virus infecciosos maduros siendo la función principal del Lopinavir, la prevención de infecciones posteriores en células susceptibles. Por tanto, no tiene efecto sobre las células con ADN viral ya integrado. En la eliminación presistémica (primer paso hepático) del fármaco se ve atenuada la actividad farmacológica, pero en caso de coadministración con Ritonavir inhibe la inactivación metabólica. De modo que resulta en una coformulación de Lopinavir con dosis bajas de Ritonavir suficientes para suprimir el 50% de la replicación viral en células CD4+, monocitos/ macrófagos, siendo los principales reservorios humanos de la infección por VIH-1<sup>(41)</sup>.

### **1.4. Diagnóstico con ensayos de Test Transformación Linfocitaria (LTT)**

En el Servicio de Alergología del Hospital se realizan de forma rutinaria pruebas *in vivo* cutáneas por punción (SPT) y pruebas intradérmicas (IDT). Estas pruebas *in vivo* se basan en el desarrollo de una respuesta inflamatoria localizada sustentado en la activación de células T o en reacciones mediada por IgE. Para la detección de reacciones mediadas por IgE (hipersensibilidad de tipo I) se usan pruebas *in vivo* cutáneas por punción (SPT) y pruebas intradérmicas (IDT) que se tratan en la introducción del fármaco diluido en pequeñas marcas en la espalda (patch) o en el antebrazo (prick) donde al paso entre 15 minutos y 1 hora se produce una respuesta como indicativo de reacción mediada por IgE. Por otro lado la prueba *in vivo* con parches cutáneos que se trata de un ensayo para observar si la sustancia está causando inflamación alérgica en la piel ( dermatitis de contacto) durante 48 horas resultando en pacientes sensibilizados la formación de vesículas, pústulas y pápulas para confirmar la detección de una reacción retardada mediada por células T (hipersensibilidad de tipo IV)<sup>(42)</sup>

La prueba más usada para determinar la sensibilización de células T a fármacos son los ensayos de transformación linfocitaria o *Lymphocyte Transformation Test* (LTT), que mide la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina al DNA de las células T en división. Para ello se aíslan las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante gradiente de Lymphoprep y se incuban en presencia de diferentes concentraciones de los fármacos a analizar. Se consideran ensayos *in vitro* seguros y más útiles que las pruebas cutáneas mencionadas<sup>(43)</sup>, concretamente en las reacciones severas como

DRESS o reacciones mediadas por IgE en el caso de las anafilaxias graves, para confirmar la hipersensibilidad hacia al fármaco concreto. Sin embargo, la determinación de la causalidad del fármaco es con frecuencia un problema en las reacciones adversas, dado que la opción de reexposición no es factible por razones de seguridad<sup>(44)</sup>. Los ensayos LTT son pruebas donde se basan en la capacidad de la memoria de células T específicas de antígeno y que se activen tras la estimulación con el antígeno en pacientes sensibilizados siendo la prueba más utilizada. Las células T desempeñan un papel central en la defensa inmunitaria incluyendo la secreción de citocinas IL-4 e IL-13 en reacciones mediadas por IgE , IL-5 en inflamación eosinofílica, IL-8 (CXCL-8) en inflamación neutrofílica, GM-CSF y IFN  $\gamma$  , TNF  $\alpha$  y otras citocinas para el reclutamiento de macrófagos y neutrófilos<sup>(42,45)</sup>. Este ensayo presenta una buena sensibilidad y especificidad siendo una herramienta fiable para el diagnóstico de la causalidad del fármaco, principalmente cuando se realiza en la fase de recuperación en el síndrome DRESS, aunque puede llegar a ser informativos en reacciones agudas en otros síndromes como el síndrome de Stevens-Johnson (SJS)/ necrólisis epidérmica tóxica (NET). La prueba más usada para detectar la sensibilización de células T hacia los fármacos es la prueba de proliferación, que mide la captación de <sup>3</sup>H-timidina de las células en división.

Como alternativa al LTT, existe la prueba de activación de basófilos (BAT) considerado como una herramienta útil *in vitro* para facilitar el diagnóstico de alergia a fármacos mediada por IgE en caso de probabilidad de anafilaxia. En un ensayo que se trató la hipersensibilidad tipo I a amoxicilina y ácido clavulánico llegó a mostrar un valor predictivo positivo de 92%<sup>(46)</sup>.

## OBJETIVOS

El objetivo general de este Trabajo de Fin de Grado consiste en el estudio de la importancia de establecer el origen de las lesiones cutáneas de los pacientes infectados por el virus SARS-Cov-2. Este objetivo se estudiará a través de los siguientes propósitos:

- Evaluar la utilidad del test de transformación de linfocitos (TTL) para el diagnóstico de la hipersensibilidad tardía a fármacos en pacientes con COVID-19

## CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.1. Pacientes

Los pacientes del presente trabajo se reclutaron en el Servicio de Dermatología del Hospital Universitario Ramon y Cajal en el proyecto “Caracterización de las manifestaciones cutáneas en pacientes ingresados por Enfermedad COVID-19 y su asociación con la infección y la reacción inmune o con la reacción a fármacos usados en tratamiento: mecanismos subyacentes” financiado por los Fondos Supera COVID financiado por Crue/Santander cuyo IP es Montserrat Fernández Guarino del Servicio de Dermatología del Hospital Universitario Ramón y Cajal.

En una primera fase transversal del estudio, se seleccionaron 53 pacientes ingresados por COVID-19 con lesiones cutáneas asociadas y se llevó a cabo realización estudios séricos y biopsias cutáneas de las lesiones y estudios histológicos e inmunohistoquímicos para la caracterización de la respuesta inmune, incluyendo la activación endotelial y la detección del virus en la muestra cutánea. Una vez dados de alta los pacientes, se realizaron una anamnesis detallada sobre los fármacos que tomaron los pacientes previos a su ingreso, los que se le administraron durante sus estancias hospitalarias y la cronología respecto la aparición de las lesiones cutáneas. Posteriormente, se realizaron pruebas de exposición controladas donde los pacientes se sometieron a pruebas epicutáneas, tests de transformación linfoblástica y a la determinación de los antígenos leucocitarios humanos (HLA). Para este estudio se seleccionaron 3 pacientes que dieron positivo en la exposición controlada o prueba epicutáneas y 3 pacientes con pruebas negativas.

### 1.2. Reactivos

#### 1.2.1. Soluciones químicas y anticuerpos.

- **DMSO:** dimetilsulfóxido,  $C_2H_6OS$
- **Lymphoprep:** Diatrizoato de sodio (9.1% p / v), Polisacárido (5,7% p / v)
- **Dynabeads:** Gránulos superparamagnéticos con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28.
- **<sup>3</sup>H-timidina:** Nucleósido de timina.
- **ULTIMA-FLO M:** fenilxililetano y alquilbenceno lineal (líquido de centelleo)
- **Azul de tripano:** Diamina derivada de la toluidina  $C_{34}H_{28}N_6O_{14}S_4$

#### 1.2.2. Medios de cultivo

Los cultivos celulares se crecieron en medio sin suero Gibco AIM-V (Gibco) que contiene L-glutamina y los siguientes antibióticos: sulfato de estreptomicina a 50  $\mu$ g / ml y sulfato de gentamicina a 10  $\mu$ g / ml. Medio de cultivo útil para la activación de células T para los tests de proliferación de linfocitos (LTT).

### 1.2.3. Fármacos

Los fármacos empleados en el ensayo se diluyeron según su solubilidad en medio acuoso (Tabla 1.). En el caso de Lopinavir y Ritonavir dada su baja solubilidad en medio acuoso se disolvieron en Dimetilsulfóxido (DMSO). En este caso, para evitar los efectos adversos que pueda tener el DMSO sobre las células se mantuvo a una concentración del 0.044%, que en estudios previos se ha demostrado no tener efecto. Para los ensayos de LTT se debe recurrir a sustancias puras para evitar la interferencia de los excipientes en los ensayos modificando los contados de centelleo. Por ello, en los fármacos Dolquine y el Kaletra, se optaron por adquirir las sustancias puras que en este caso corresponderían a Hidroxicloroquina del Dolquine y Ritonavir y Lopinavir del Kaletra. El resto de los fármacos, Azitromicina, Amoxicilina y Ácido Clavulánico no contienen excipientes. De este modo se emplearán 6 sustancias puras relevantes del tratamiento para la enfermedad del COVID-19.

**Tabla 1. Resumen de los fármacos empleados**

Fármacos ( Principios Activos)	Diluyentes	Nombre Comercial	Procedencia
Azitromicina	Solución Salina (NaCl)	Zitromax 500mg inyectable-vial polvo	Farmacia del Hospital Ramón y Cajal
Amoxicilina	Agua de Inyección	Clamoxyl-GSK ( Amoxicilina 1 g - polvo disolvente)	Farmacia del Hospital Ramón y Cajal
A.Clavulanico	Agua de Inyección	DIATER 5 mg	Farmacia del Hospital Ramón y Cajal
Hidroxicloroquina	Agua de Inyección	Dolquine comprimidos 200 mg	Sigma-Aldrich
Lopinavir	DMSO	Kaletra (200 mg/50 mg Comprimidos)	Sigma-Aldrich
Ritonavir	DMSO	Kaletra (200 mg/50 mg Comprimidos)	Sigma-Aldrich

## 1.3. Metodología

### 1.3.1. Cultivo y diseño de ensayo

Presentamos una serie de 6 pacientes que dieron positivo en COVID-19 (50% mujeres) procedentes de la Unidad de Alergias del Hospital de Ramón y Cajal con lesiones cutáneas en los que incluyen reacciones leves como exantemas maculopapulares y urticarias de tipo pruriginosas. Ninguno de los pacientes presentaba antecedentes de reacción a otros fármacos. Tres pacientes dieron positivo en las pruebas epicutáneas y de provocación oral controlada y los otros tres pacientes dieron negativo en las pruebas correspondientes. Se procedió a la realización de los ensayos LTT empezando con la extracción de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de muestras de sangre fresca con anticoagulante (heparina de litio) y aislamiento a través del separador de gradiente de densidad Lymphoprep. Una vez recogida la fase celular del gradiente, se cuantifican los PBMCs en la cámara de Neubauer a una dilución 1:16 con medio de cultivo y con azul de tripano para el conteo de células. En base a la disponibilidad celular se recogen las células en una densidad  $2 \times 10^6$ /ml y se siembran en pocillos de fondo plano (100  $\mu$ l) suplementado con medio AIM-V donde se adicionarán otros 100  $\mu$ l del fármaco correspondiente diluido en medio AIM-V en una placa de 96 pocillos. El ensayo se diseñó por triplicado para respetar un error estándar de <30% con las distintas concentraciones de fármacos (Tabla 2.) reuniendo un total de 23 condiciones incluyendo el control positivo por Dynabeads, control negativo DMSO y control negativo. Las Dynabeads presentan anticuerpos CD3

y CD28, receptores de los linfocitos T humanos que nos aseguran de este modo, de su activación de toda la población de células T. Tras el reparto de células se incuban durante 5 días en una incubadora ventilada con CO<sub>2</sub> (5%) a 37°C. A partir de entonces, se agrega <sup>3</sup>H-timidina al ADN de las células T durante toda la noche. En el día 6 de ensayo se recolectarán con un recolector de células y mediante el líquido de centelleo ULTIMA-FLO M para detectar la radiación β en un contador de centelleo TRI-CARB 2800 TR. Esta técnica conocida como centelleo líquido consiste en la detección de la luz emitida por un líquido centelleador debida a la interacción de las radiaciones ionizantes con este. La sustancia radiactiva <sup>3</sup>H-timidina se mezcla con dicho líquido en un vial de vidrio o plástico emitiendo una cantidad determinada de luz detectada por los fotomultiplicadores dando cuentas por minuto (cpm) en proporción a la cantidad proliferativa de células T hacia un determinado fármaco <sup>(47)</sup>.

**Tabla 2. Concentraciones empleadas de los fármacos**

Fármacos ( Principios Activos)	Concentraciones			
Azitromicina	0,1 µg/µl	1 µg/µl	10 µg/µl	-
Amoxicilina	100 µg/µl	200µg/µl	500µg/µl	-
A.Clavulanico	1 µg/µl	10 µg/µl	100 µg/µl	-
Hidroxicloroquina	1 µg/µl	10 µg/µl	100 µg/µl	-
Lopinavir	0,02 µg/µl	0,1 µg/µl	0,5 µg/µl	2,5 µg/µl
Ritonavir	0,04 µg/µl	0,2 µg/µl	1 µg/µl	5 µg/µl

### 1.3.2. Análisis de resultados.

A raíz de estos resultados, podemos obtener el índice de estimulación (SI) que se calcula por proliferación (cpm) con fármaco / proliferación (cpm) sin fármaco. Los ensayos se consideran positivos a partir de un determinado SI dependiendo de ciertas variables, como el número de células precursoras de un fármaco, el tipo de reacción (las células Th1 en reacciones de hipersensibilidad parecen proliferar más que las Th2) y la afinidad del receptor de células T por el antígeno (TCR) por el fármaco. Según los resultados del control negativo de fondo (por ejemplo 2000 cpm) en respecto a los resultados con fármacos (por ejemplo 4000 cpm) podemos concluir un SI de 2 mostrando un resultado débilmente positivo. En base a eso si el SI > 3, el LTT se considera fuertemente positivo, aunque depende mucho de la naturaleza del fármaco a analizar ya que otros fármacos pueden mostrar mayor proliferación que en otros. En base al control positivo con Dynabeads dependiendo del resultado obtenido podemos concluir si un fármaco puede significar una sensibilización sustancial o, todo lo contrario. De forma genérica se opta por un LTT positivo si su SI > 3 considerándose negativas las que no superen dicho valor. <sup>(48)</sup>

### 1.4. Análisis Estadístico

El análisis estadístico de los datos aplicados para determinar el índice de estimulación (SI) de cada concentración de fármaco, se realiza mediante la desviación estándar y la media de cada triplicado. Respecto a la media del control negativo, con las medias de cada concentración de fármaco se calcula el SI.

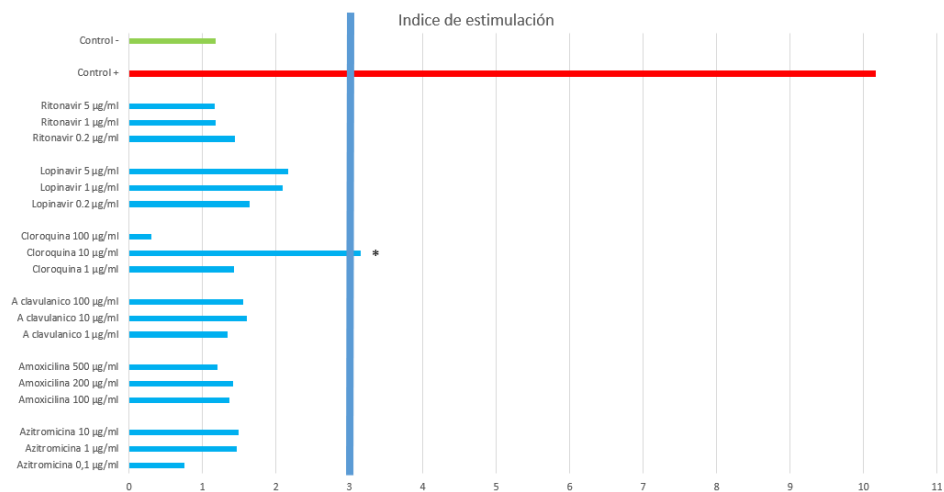
## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

Se estudiaron un total seis pacientes ingresados en el Hospital Universitario Ramón y Cajal por en la primera ola de la pandemia, entre marzo y abril de 2020. La mayoría presentaban neumonía bilateral por infección por SARS-CoV-2, eran pacientes de avanza edad (>50 años) y durante el tratamiento presentaron lesiones cutáneas. Una vez dados de alta los pacientes, se analizó la evolución de las lesiones y se procedió a la realización de un estudio alergológico. Para ello, se realizaron pruebas epicutáneas y de provocación oral o de exposición controlada de los fármacos que se administraron durante el tratamiento para comprobar si presentaban reacciones específicas o alergias. De los 53 pacientes incluido en el estudio, tres presentaron pruebas positivas para alguno de los fármacos. Como controles se seleccionaron 3 pacientes que habiendo presentado también lesiones cutáneas durante el tratamiento infección por SARS-CoV-2, fueron negativos en las pruebas epicutáneas y de provocación. Para demostrar la causalidad de la reacción cutánea se realizaron pruebas de transformación de linfocitos (LTT) a todos los pacientes basándose en la capacidad de proliferación de las células T de memoria específicas del fármaco una vez que han sido estimuladas por un antígeno. La prueba se considera positiva con un índice de estimulación (SI)  $\geq 3$  calculado en base a la proliferación (cpm) con fármaco/ proliferación (cpm) sin fármaco siendo un indicativo de sensibilización<sup>(48)</sup>. Se analizó la respuesta proliferativa de Ritonavir y Lopinavir (principios activos del Kaletra), hidroxyclorequina (principio activo del Dolquine), ácido clavulánico y amoxicilina (principios activos del Augmentine) y Azitromicina.

### 1.1. Paciente 1

Mujer de 60 años sin síntomas cutáneos previos de interés, empezó un tratamiento con Dolquine y azitromicina por infección de SARS-CoV-2. Durante el tratamiento presentó exantemas micropapulares pruriginosos generalizados en las palmas de las manos y plantas de los pies. Ninguna muestra de arteriosclerosis ni otra sintomatología asociada, se paró el tratamiento y se le administró antihistamínicos. Los síntomas se disiparon a los 15 días, sin descamación ni lesiones residuales.

Se sometió a las pruebas epicutáneas con azitromicina 5% y 10% y dolquine 5% y 10%. Todas las pruebas resultaron negativas a las 48 horas y 96 horas. También se realizaron pruebas de tolerancia oral controlada a azitromicina e hidroxyclorequina que resultaron negativas. Se realizaron las pruebas de LTT simultáneamente al paciente 2 y por motivos de poco rendimiento en la extracción de PBMCs se realizaron las pruebas por duplicado en vez de triplicado. y se suprimió las concentraciones de 0,04  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de Lopinavir y 0,02  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de Ritonavir. Tomando como punto de corte un SI de 3, se observó reacción positiva a la dosis de hidroxyclorequina 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (Figura 10.)

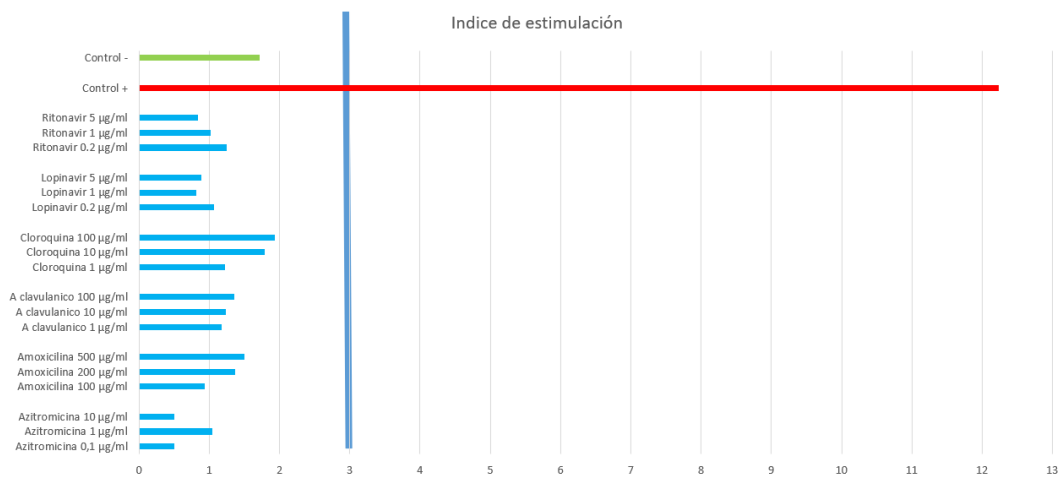


**Figura 10. Índice de Estimulación (SI) del test de transformación de linfocitos (LTT) del Paciente 1.**

### 1.2. Paciente 2

Hombre de 59 años ingresado por neumonía bilateral de COVID-19 que presenta entre sus antecedentes familiares la Diabetes Mellitus por parte de su parental materno y neoplasia de próstata por parte del parental paterno y presentaba antecedentes de hipertrofia benigna de próstata sin tratamiento, hiperuricemia asintomática, angiomas hepáticos y colelitiasis. Recibió un tratamiento para la enfermedad vírica con Kaletra, Dolquine, ceftriaxona y azitromicina desde su ingreso. Durante el tratamiento empezó a presentar lesiones cutáneas de tipo pruriginosas generalizadas y se le administró loratadina cada 8 horas y corticoides. Los síntomas cutáneos mejoraron a los días.

Se sometió a las pruebas epicutáneas con hidroxiclороquina 5% y 10%, Kaletra 1% y 5%, ceftriaxona 10% y azitromicina 5%. Las pruebas salieron negativas a las 48 y 96 horas. Además, se realizaron pruebas de exposición controlada con dolquine y kaletra a dosis terapéuticas con resultados negativos y se probó de forma controlada con azitromicina con un resultado positivo a una cantidad de ¼ de 500 mg donde presentó exantemas cutáneos en la espalda, tórax, cara y cuello de tipo mácula eritematosas pruriginosas. Se le realizó el ensayo LTT en conjunto con el Paciente 1, por tanto, se realizó la prueba por duplicado y se suprimieron las concentraciones de 0,04 µg/µl de Lopinavir y 0,02 µg/µl de Ritonavir. Se observa que el paciente no presenta ningún valor superior de  $SI \geq 3$  (Figura 11.)



**Figura 11. Índice de Estimulación (SI) del test de transformación de linfocitos (LTT) del Paciente 2.**

### 1.3. Paciente 3

Hombre de 51 años sin síntomas cutáneos previos, ingresado por neumonía de COVID-19. Se le empezó a administrar hidroxycloquinina, kaletra, azitromicina, tocilizumab y amoxicilina/ ácido clavulánico. Durante el tratamiento aparecieron lesiones cutáneas tipo maculopapulares morbiliformes en el cuello, axila y en el costado derecho extendiéndose hacia al tronco. Se le empezó a administrar diproderm y los síntomas remitieron.

Se sometió a las pruebas epicutáneas con Kaletra, azitromicina e hidroxycloquinina resultando todas negativas. También se le sometió a la provocación oral con kaletra, azitromicina, hidroxycloquinina y amoxicilina siendo los resultados negativos. Además, se le sometió a una prueba de provocación con augmentine (amoxicilina y ácido clavulánico) dando un positivo tardío a las 6 horas con la aparición de exantemas pruriginosos en los brazos, zona cervical y lumbar. Se realizaron las pruebas de LTT de los simultáneamente al paciente 4, que por motivos de disponibilidad insuficiente tras la extracción de PBMCs para las condiciones propuestas, se procedió a realizar el ensayo por duplicado manteniendo todas las concentraciones postuladas. En los resultados del paciente 3 se puede observar hasta 2 fármacos sensibles: la azitromicina 10 µg/µl y en el Ritonavir las concentraciones 5 µg/µl y 0.04 µg/µl en base a la condición propuesta de un índice de estimulación  $SI \geq 3$ . (Figura 12.)



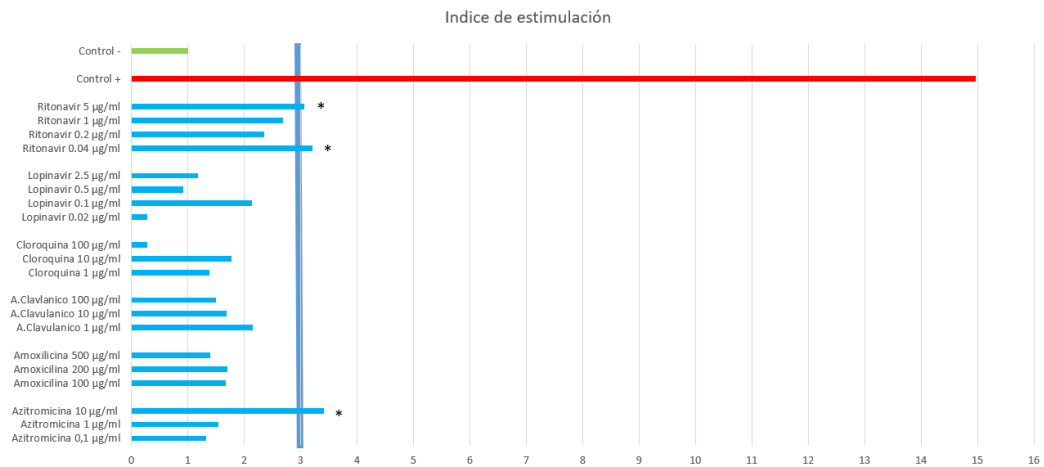


Figura 12.. Índice de Estimulación (SI) del test de transformación de Linfocitos (LTT) del Paciente 3.

#### 1.4. Paciente 4

Mujer sin aparentes síntomas ni fiebre se le sometió a un tratamiento con azitromicina, kaletra y dolquine por infección de SARS-CoV-2. Durante el tratamiento se le diagnosticaron placas eritemato-edematosas por el tronco y en las extremidades sin llegar a presentar edema facial, ampollas y lesiones palmo-plantares. En la mucosa yugal llegó a presentar lesiones blanquecinas que señalaba una posible candidiasis.

Se le realizaron pruebas epicutáneas con azitromicina 10 % y 20 %, kaletra 5% y 10 %, dolquine 5% y 10% resultando en todos los casos respuesta negativa a las 48 y 96 horas. Además, se le sometió a una provocación oral controlada con azitromicina, dolquine y kaletra con resultados negativos. Como se ha mencionado en el caso del paciente 3, se realizó el ensayo LTT de forma conjunta, de modo que se procedió por duplicado en base al poco rendimiento celular. En los resultados obtenidos del ensayo se pueden observar la sensibilidad en dos fármacos: El Ritonavir con la concentración 0.2 µg/µl y el Lopinavir con la concentración 0.1 µg/µl. (Figura 13.)

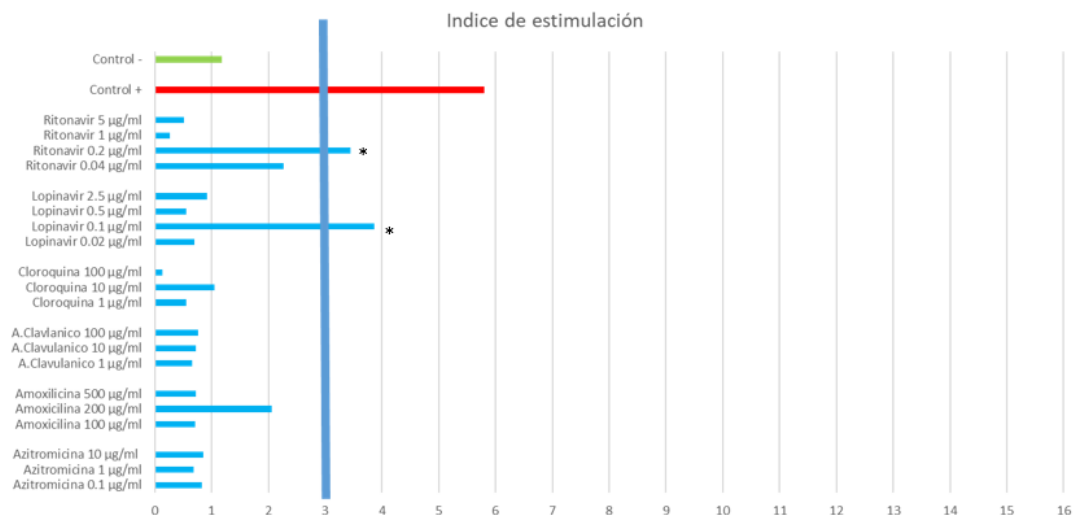


Figura 13. Índice de Estimulación (SI) del test de transformación de linfocitos (LTT) del Paciente 4

### 1.5. Paciente 5

Hombre de 64 años ingresado por neumonía bilateral por SARS-CoV-2. Presentaba antecedentes de síndrome de apnea hipopnea de sueño e hipertensión arterial. Para la infección se le administró hidroxicloroquina, azitromicina y kaletra (se suspendió su administración por temor a efectos secundarios cardiovasculares). Durante el tratamiento aparecieron pápula-vesículas paucissintomáticas diseminadas por el tronco. Se suspendió el tratamiento e inició tratamiento con antihistamínicos.

El paciente se sometió a pruebas epicutáneas con kaletra, azitromicina e hidroxicloroquina resultando negativas. También se le realizaron pruebas de exposición controlada a kaletra y a azitromicina resultando esta última positiva. Como en el resto de los ensayos, se procedieron en el mismo día las pruebas de LTT en los pacientes 5 y 6 y por problemas de escasez de rendimiento celular tras la extracción de PBMCs para cumplir todas las condiciones propuestas, se procedió a realizar el ensayo por duplicado manteniendo todas las concentraciones. Se puede observar en los resultados de la LTT que el paciente presenta una sensibilidad a los fármacos de hidroxicloroquina 1 µg/µl y azitromicina 10 µg/µl en base a la condición propuesta de  $SI \geq 3$  como indicativo de sensibilidad. (Figura 14.)

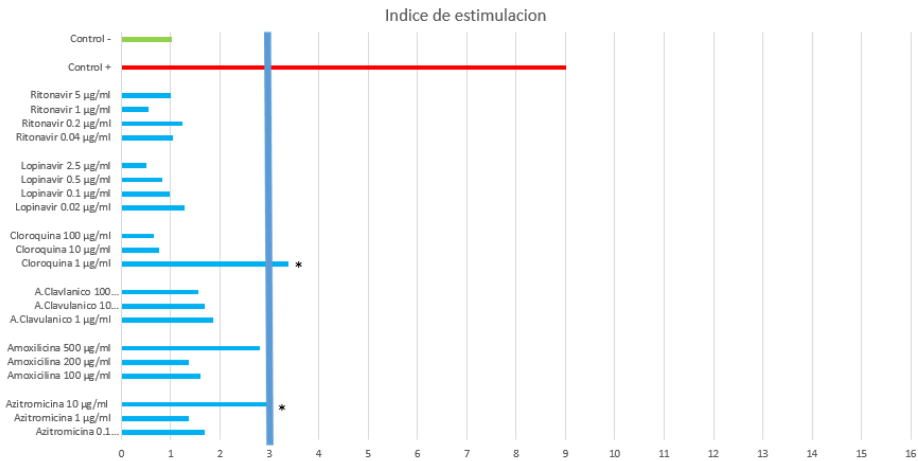


Figura 14. Índice de Estimulación (SI) del test de transformación de linfocitos (LTT) del Paciente 5

### 1.6. Paciente 6

Mujer ingresada por sospechas de la enfermedad de COVID-19, se le administró un tratamiento con azitromicina y dolquine. Durante el tratamiento se le diagnosticaron exantema cutáneo papular en la espalda, tórax y abdomen no pruriginoso con cierto escozor. Por ello, se paró el tratamiento y se le empezó a administrar prednisona como antihistamínico mejorando los síntomas.

Se sometió a pruebas de parches de dolquine y azitromicina que resultaron negativas. No hay indicio de realización de pruebas de provocación oral o de exposición controlada como el resto de los pacientes. En conjunto con el paciente 5 en el ensayo de LTT, se procedieron seguir el mismo camino con la realización del ensayo por duplicado. En los resultados del paciente 6 se puede ver varios fármacos sensibles: Ritonavir de concentraciones de 0.2 µg/µl y 0.04 µg/µl, Lopinavir de 0.1 µg/µl, hidroxiclороquina de 100 µg/µl y 1 µg/µl y por último azitromicina 0.1 µg/µl (Figura 15.).



Figura 15. Índice de Estimulación (SI) del test de transformación de linfocitos (LTT) del Paciente 6

## CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

El 12 de marzo de 2020, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró la enfermedad de nuevo coronavirus (COVID-19) una pandemia mundial, causada por el virus SARS-CoV-2<sup>(49)</sup>. Desde la llegada de pacientes al Hospital Universitario Ramón y Cajal, se registraron diversas manifestaciones cutáneas que se han ido informando cada vez más frecuentemente reportadas en el contexto de la enfermedad de CoV y que incluyen exantemas maculopapulares o urticarianas, erupciones, vasculitis como lesiones cutáneas purpúricas. En este contexto ganan relevancia el papel de los dermatólogos en respuesta a la pandemia a pesar de la escasez de datos debido a la falta de consultas dermatológicas de rutina. Las lesiones cutáneas aparecen en el 0,2% al 20,4% de los pacientes que dieron positivo en SARS-CoV-2<sup>(50)</sup>, en los cuales algunos se han asociado a patrones clínicos cutáneos distintos al cuadro de la enfermedad COVID-19<sup>(50)</sup>. Hasta ahora, los mecanismos fisiopatológicos detrás de las lesiones cutáneas que ocurren en la enfermedad viral son especulativos, podrían estar relacionado con el virus, el fármaco o ambos.

Recientemente, como se ha mencionado, la entrada viral a la célula huésped se realiza por el receptor ACE2, que se expresan en las células endoteliales en la que se ha mostrado la presencia de elementos virales, junto con células inflamatorias, en su interior. Esto podría explicar las endotelitis en diferentes órganos, incluida las manifestaciones cutáneas, como un posible efecto directo de presencia viral y respuesta inflamatoria. Según estas afirmaciones podemos especular que las lesiones cutáneas pueden presentarse en dos grandes grupos según el origen patológico: características clínicas similares a exantemas virales como resultado de una respuesta inmune a DNA viral y por otro lado las erupciones cutáneas secundarias como consecuencia de la patogenia sistémica del virus incluyendo vasculitis entre otros patrones vasculares<sup>(51)</sup>. Sin embargo, en los pacientes descritos, todos los síntomas cutáneos tardíos, aparecen durante el tratamiento tras previamente ya haber mostrado síntomas respiratorios comunes como tos seca, fiebre, mialgia, anosmia como ageusia típicos de un cuadro COVID-19.

Ante el desconocimiento de las causas que derivan en lesiones cutáneas durante el tratamiento, se realizaron pruebas epicutáneas y de exposición controlada en los 53 pacientes seleccionados para la primera fase transversal del estudio. Los pacientes **1, 4 y 6** fueron recopilados como un grupo control que no presentaron respuesta respecto a los pacientes **2, 3 y 5** que conforman el grupo de pacientes que dieron positivo. Las pruebas epicutáneas *in vivo* sean por punción (SPT) o intradérmicas (IDT) y las pruebas de provocación oral miden el diagnóstico de la hipersensibilidad de tipo I mediada por IgE siendo el estándar de oro para las pruebas de diagnóstico de alergia inmediata a medicamentos<sup>(52)</sup>. Como alternativa, la prueba *in vitro* de

activación de basófilos (BAT) es un método como hemos mencionado que muestra ser útil para numerosas alergias mediadas por IgE<sup>(46)</sup>.

Por otro lado, para el diagnóstico de las reacciones adversas de tipo IV mediado por la activación de linfocitos T, se ha usado la prueba *in vivo* del parche como procedimiento estándar para las reacciones retardadas. Sin embargo, estas pruebas ofrecen un rendimiento bajo debido a la posibilidad de falsos positivos ya sea por el excipiente o el vehículo (por ejemplo, vaselina sin fármaco) utilizado en el ensayo. La sensibilidad del parche varía considerablemente, según el fenotipo clínico específico inmunológico de la reacción retardada o la metabolización del fármaco alcanzando una sensibilidad aproximada de 50%. Además, de que se puedan producir falsos negativos que no excluyen una reacción de hipersensibilidad, pero en el caso de darse positivo se considera un indicador fiable<sup>(52)</sup>. Como alternativa se sitúa las pruebas *in vitro* de transformación de linfocitos (LTT), un ensayo útil para la detección de reacciones retardadas facilitando el diagnóstico para identificar el fármaco responsable<sup>(48)</sup>.

Empezando por la paciente **1** no presentó respuesta en las pruebas cutáneas y las de exposición oral, pero en el ensayo LTT dio positivo con SI de 3,15 el fármaco hidroxyclo-roquina a una concentración de 10 µg/µl dando a entender de una reacción retardada hacia el fármaco que debido a la presencia viral previa se agudizó la respuesta inmune de linfocitos T hacia el fármaco generando una respuesta desmedida provocando las lesiones cutáneas correspondientes. Algo similar ocurre en los pacientes **4** y **6**. En el caso del paciente **4**, dio negativo en todas las pruebas realizadas y presentó en los ensayos LTT reacciones hacia el Ritonavir con la concentración 0.2 µg/µl y el Lopinavir con la concentración 0.1 µg/µl, indicativo de una reacción retardada hacia el fármaco Kaletra. La paciente **6** como en los anteriores casos, no presentaron respuesta en las pruebas *in vivo* y se observó en los ensayos LTT proliferación linfocitaria hacia el Ritonavir de concentraciones de 0.2 µg/µl y 0.04 µg/µl, Lopinavir de 0.1 µg/µl, hidroxyclo-roquina de 100 µg/µl y 1 µg/µl y por último azitromicina 0.1 µg/µl, indicativo de una reacción retardada como en el caso de los pacientes **1** y **4** por presencia viral que enmascara el sistema inmune generando mayor reactividad hacia los fármacos empleados. No obstante, en el caso del paciente **6** presenta reacciones retardadas en varios fármacos, siendo posible que se tratasen de falsos positivos de LTT por una excesiva proliferación de linfocitos debido a la química del fármaco o factores genéticos inmunológicos ligada a la HLA. Esto se ha visto en numerosos ensayos con el paracetamol o algunos medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) que ha demostrado que presenta la capacidad de inhibir la síntesis de prostaglandina natural E 2 (PGE2) que provoca la reducción de IL-2 conduciendo a una proliferación de células T<sup>(48,52)</sup>. Prueba de ello, el paciente **3** que presentó respuesta hacia el augmentine (amoxicilina y ácido clavulánico) en la prueba de provocación oral y en los ensayos LTT dió proliferación en los fármacos de

azitromicina 10 µg/µl y en el Ritonavir las concentraciones 5 µg/µl y 0.04 µg/µl destacando una vez más la presencia de proliferación en el Ritonavir. De este modo, en los pacientes **3**, **4** y **6** (50 %) presentan una destacada proliferación de linfocitos en los principios activos del fármaco Kaletra dando la posibilidad de que pueda estimular a los linfocitos T y por ello se debe realizar más ensayos LTT hacia el Lopinavir y Ritonavir para confirmar dicho efecto proliferativo.

El paciente **5** dió positivo en las pruebas de exposición controlada en azitromicina y dió lugar en el ensayo LTT correspondiente proliferación en los fármacos de hidroxiclороquina 1 µg/µl y azitromicina 10 µg/µl. De esta manera, se puede confirmar la hipersensibilidad de tipo IV específica hacia la azitromicina apoyado por dos diferentes pruebas de diagnóstico in vivo e in vitro además de la reacción hacia la hidroxiclороquina.

El paciente **2** fue positivo en el fármaco de azitromicina en las pruebas de exposición controlada dando lugar a un ensayo LTT negativo para todas las concentraciones. Esto sugiere una posible reacción temprana mediada por IgE excluyendo la opción de una reacción retardada de tipo IV. Para confirmar este hecho, se propone realizar la prueba BAT para confirmar que se trata de una reacción mediada por IgE a través del suero del paciente y observar por inmunofluorescencia el receptor CD63+ de los basófilos. Similar a lo que ocurre en las pruebas de exposición oral hacia el Augmentine del paciente **3**, que se dieron a las 6 horas cuestionando si se trata de una reacción retardada sino una reacción mediada por IgE en la cual se le debería someter a una prueba BAT. En los ensayos LTT del paciente **3** como ya he mencionado, presenta proliferación en los fármacos de Ritonavir y Azitromicina, y no los principios activos del Augmentine (Ácido clavulánico y amoxicilina) dando entender de que presenta una reacción retardada hacia el Ritonavir y azitromicina y una reacción temprana mediada por IgE hacia el Augmentine. Por tanto, en este caso no se puede confirmar la existencia reacción temprana por ambos principios activos de Ácido Clavulánico y Amoxicilina.

Cinco pacientes dieron proliferación linfocitaria en los ensayos LTT (83%) a al menos uno de los fármacos ensayados lo cual supondría una sensibilización a esos fármacos. resultando en una contribución valiosa para el diagnóstico de alergia a un fármaco. No obstante, un LTT negativo no puede excluir una hipersensibilidad al fármaco. Se requiere una investigación más sistemática para definir mejor los medicamentos y enfermedades para los que el LTT es más adecuado. En un ensayo LTT hacia benznidazol, tratamiento para la enfermedad crónica de Chagas, demostró en un total de 8 pacientes tolerantes una especificidad del 85,7%<sup>(43)</sup>. También se ha visto en ensayos hacia fármacos β- lactamasa que presentan una sensibilidad general del 60%-70%<sup>(48)</sup>. En base a estos datos, los ensayos LTT se considera una prueba segura y más útil que las pruebas cutáneas que fueron el 50% de los pacientes respecto al 83% en LTT positivos.

En base a la patogenia propuesta de DRESS/DiHS, se puede entender porque en pacientes que presentaron pruebas cutáneas negativas presentasen LTT positivos caracterizados por una hipersensibilidad mediada por linfocitos Th17 debido a la producción diferencial de IL-6 de los monocitos patrulleros en la fase de resolución<sup>(26)</sup>. Esto es provocado por una presencia viral del SARS-CoV-2 que provoca que la tolerancia previa hacia los fármacos específicos empleados por la secreción de IL-10 y la regulación positiva por tanto de los Tregs se disipe. De esta manera por la tormenta de citocinas que provoca el virus se produce la reacción adversa específica ya sea mediada por IgE (hipersensibilidad de tipo I) o por linfocitos T (hipersensibilidad de tipo IV) generando una respuesta exacerbada. Sin embargo, son especulaciones y se necesita más estudios *in vitro* en conjunto con estudios *in vivo* ya que no siempre se corresponde la respuesta observada en ambos casos.

En un futuro, consideramos que son necesarios estudios adicionales que permitan, por un lado, demostrar la proliferación desmedida hacia el fármaco Kaletra en ensayos LTT y por otro demostrar el mecanismo patológico que se lleva a cabo en las lesiones cutáneas a través del análisis de citocinas, poblaciones de linfocitos específicos y anticuerpos IgE en los casos que se correspondan. Además, para completar aún más el ensayo, se diseñará un estudio de 4 pacientes que tuvieron reacciones cutáneas con provocación oral negativa con la adicción como condición de un extracto inactivado del virus SARS-CoV-2 en los ensayos LTT para demostrar que los pacientes presentaban parches negativos por la ausencia del virus.

## CONCLUSIONES

Las conclusiones de este estudio son las siguientes:

1. Solo existe un paciente del ensayo, el Paciente 5, que correlacione positivamente las pruebas cutáneas con un ensayo LTT positivo en el fármaco Azitromicina. Esto demuestra la dificultad del uso de la técnica en las condiciones fisiológicas del ensayo con una infección vírica previa que dificulta el diagnóstico.
2. Los pacientes con LTT negativos con pruebas cutáneas positivas, podría ser indicativo de una reacción temprana mediada por IgE o de baja sensibilidad del ensayo, requiriendo su confirmación por otras técnicas alternativas como BAT.
3. El mecanismo patológico que se lleva a cabo las lesiones cutáneas es desconocido y se necesita más estudios para descartar si el responsable de las lesiones es por el fármaco, el virus o ambos.
4. La mitad de los pacientes del estudio presentaron sensibilización al fármaco Kaletra. Dada su alta capacidad sensibilizadora, se recomienda prudencia en la administración de este fármaco para evitar posibles reacciones de hipersensibilidad en el futuro.
5. Los ensayos LTT son una contribución valiosa al diagnóstico de alergia a un fármaco, aunque la sensibilidad es limitada, ya que un LTT negativo no puede excluir una hipersensibilidad al fármaco. La patogenia es complicada y a pesar de las limitaciones obvias, es una prueba útil y segura (*in vitro*) para solucionar este rompecabezas del diagnóstico.



## CAPÍTULO 6: BIBLIOGRAFÍA

1. Bárcena M, Oostergetel GT, Bartelink W, Faas FGA, Verkley A, Rottier PJM, et al. Cryo-electron tomography of mouse hepatitis virus: Insights into the structure of the coronavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(2):582-7.
2. Neuman BW, Adair BD, Yoshioka C, Quispe JD, Orca G, Kuhn P, et al. Supramolecular Architecture of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Revealed by Electron Cryomicroscopy. *J Virol* 2006;80(16):7918-28.
3. Snijder EJ, van der Meer Y, Zevenhoven-Dobbe J, Onderwater JJM, van der Meulen J, Koerten HK, et al. Ultrastructure and Origin of Membrane Vesicles Associated with the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Replication Complex. *J Virol* 2006;80(12):5927-40.
4. Malik YA. Properties of Coronavirus and SARS-CoV-2. *Malays J Pathol* 2020;42(1):3-11.
5. Novak N, Peng W, Naegeli MC, Galvan C, Kolm-Djamei I, Brügger C, et al. SARS-CoV-2, COVID-19, skin and immunology – What do we know so far? *Allergy* 2021;76(3):698-713.
6. Wollina U. Challenges of COVID-19 pandemic for dermatology. *Dermatol Ther* 2020;33(5):e13430.
7. Jiang S, Hillyer C, Du L. Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2 and Other Human Coronaviruses. *Trends Immunol* 2020;41(6):545.
8. Li F, Li W, Farzan M, Harrison SC. Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor. *Science* 2005;309(5742):1864-8.
9. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* 2020;181(2):271-280.e8.
10. Schoeman D, Fielding BC. Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Virol J* [Internet] 2019 [citado 2021 jun 11];16. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6537279/>
11. Astuti I, Ysrafil. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. *Diabetes Metab Syndr* 2020;14(4):407-12.
12. Li M-Y, Li L, Zhang Y, Wang X-S. Expression of the SARS-CoV-2 cell receptor gene ACE2 in a wide variety of human tissues. *Infect Dis Poverty* 2020;9(1):45.
13. Xu R, Cui B, Duan X, Zhang P, Zhou X, Yuan Q. Saliva: potential diagnostic value and transmission of 2019-nCoV. *Int J Oral Sci* 2020;12(1):11.
14. Chen Y, Liu Q, Guo D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *Journal of Medical Virology* 2020;92(4):418-23.
15. Saraste J, Prydz K. Assembly and Cellular Exit of Coronaviruses: Hijacking an Unconventional Secretory Pathway from the Pre-Golgi Intermediate Compartment via the Golgi Ribbon to the Extracellular Space. *Cells* [Internet] 2021 [citado 2021 jun 12];10(3). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7996754/>
16. Klein S, Cortese M, Winter SL, Wachsmuth-Melm M, Neufeldt CJ, Cerikan B, et al. SARS-CoV-2 structure and replication characterized by in situ cryo-electron tomography. *Nat Commun* 2020;11(1):5885.
17. Yi Y, Lagniton PNP, Ye S, Li E, Xu R-H. COVID-19: what has been learned and to be learned about the novel coronavirus disease. *Int J Biol Sci* 2020;16(10):1753-66.
18. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020;395(10223):497-506.
19. Rabi FA, Al Zoubi MS, Kasasbeh GA, Salameh DM, Al-Nasser AD. SARS-CoV-2 and Coronavirus Disease 2019: What We Know So Far. *Pathogens* [Internet] 2020 [citado 2021 jun 13];9(3). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7157541/>
20. Hirano T, Murakami M. COVID-19: A New Virus, but a Familiar Receptor and Cytokine Release Syndrome. *Immunity* 2020;52(5):731-3.
21. Eguchi S, Kawai T, Scalia R, Rizzo V. Understanding Angiotensin II Type 1 Receptor Signaling in Vascular Pathophysiology. *Hypertension* 2018;71(5):804-10.
22. Hu B, Huang S, Yin L. The cytokine storm and COVID-19. *Journal of Medical Virology* 2021;93(1):250-6.
23. Prompetchara E, Ketloy C, Palaga T. Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: Lessons learned from SARS and MERS epidemic. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2020;38(1):1-9.
24. Li X, Geng M, Peng Y, Meng L, Lu S. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 2020;10(2):102-8.
25. Fan Y-Y, Huang Z-T, Li L, Wu M-H, Yu T, Koup RA, et al. Characterization of SARS-CoV-specific memory T cells from recovered individuals 4 years after infection. *Arch Virol* 2009;154(7):1093-9.
26. Shiohara T, Mizukawa Y. Drug-induced hypersensitivity syndrome (DiHS)/drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS): An update in 2019. *Allergol Int* 2019;68(3):301-8.
27. Edwards MR, Strong K, Cameron A, Walton RP, Jackson DJ, Johnston SL. Viral infections in allergy and immunology: How allergic inflammation influences viral infections and illness. *J Allergy Clin Immunol* 2017;140(4):909-20.
28. Defective Regulatory T Cells In Patients with Severe Drug Eruptions: Timing of the Dysfunction Is Associated with the Pathological Phenotype and Outcome | *The Journal of Immunology* [Internet]. [citado 2021 jun 22]; Available from: <https://www.jimmunol.org/content/182/12/8071>
29. Kano Y, Hirahara K, Mitsuyama Y, Takahashi R, Shiohara T. Utility of the lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug sensitivity: dependence on its timing and the type of drug eruption. *Allergy* 2007;62(12):1439-44.

30. Ushigome Y, Mizukawa Y, Kimishima M, Yamazaki Y, Takahashi R, Kano Y, et al. Monocytes are involved in the balance between regulatory T cells and Th17 cells in severe drug eruptions. *Clinical & Experimental Allergy* 2018;48(11):1453-63.
31. Morawska L, Cao J. Airborne transmission of SARS-CoV-2: The world should face the reality. *Environ Int* 2020;139:105730.
32. Lauer SA, Grantz KH, Bi Q, Jones FK, Zheng Q, Meredith HR, et al. The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application. *Ann Intern Med* 2020;172(9):577-82.
33. Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J, et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA* 2020;323(11):1061-9.
34. Shipley D, Ormerod AD. Drug-induced urticaria. Recognition and treatment. *Am J Clin Dermatol* 2001;2(3):151-8.
35. Millikan LE, Flynn TC. Infectious etiologies of cutaneous vasculitis. *Clin Dermatol* 1999;17(5):509-14.
36. ten Holder SM, Joy MS, Falk RJ. Cutaneous and systemic manifestations of drug-induced vasculitis. *Ann Pharmacother* 2002;36(1):130-47.
37. Echeverría-Esnal D, Martín-Ontiyuelo C, Navarrete-Rouco ME, De-Antonio Cuscó M, Ferrández O, Horcajada JP, et al. Azithromycin in the treatment of COVID-19: a review. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2021;19(2):147-63.
38. Huttner A, Bielicki J, Clements MN, Frimodt-Møller N, Muller AE, Paccaud J-P, et al. Oral amoxicillin and amoxicillin-clavulanic acid: properties, indications and usage. *Clin Microbiol Infect* 2020;26(7):871-9.
39. Sinha N, Balayla G. Hydroxychloroquine and COVID-19. *Postgrad Med J* 2020;96(1139):550-5.
40. Liu X, Chen H, Shang Y, Zhu H, Chen G, Chen Y, et al. Efficacy of chloroquine versus lopinavir/ritonavir in mild/general COVID-19 infection: a prospective, open-label, multicenter, randomized controlled clinical study. *Trials* 2020;21(1):622.
41. Cvetkovic RS, Goa KL. Lopinavir/ritonavir: a review of its use in the management of HIV infection. *Drugs* 2003;63(8):769-802.
42. Pichler WJ, Tilch J. The lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug hypersensitivity. *Allergy* 2004;59(8):809-20.
43. Marques-Mejías MA, Cabañas R, Ramírez E, Domínguez-Ortega J, Fiandor A, Trigo E, et al. Lymphocyte Transformation Test (LTT) in Allergy to Benzimidazole: A Promising Approach. *Front Pharmacol* 2019;10:469.
44. Cabañas R, Calderón O, Ramírez E, Fiandor A, Caballero T, Heredia R, et al. Sensitivity and specificity of the lymphocyte transformation test in drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms causality assessment. *Clin Exp Allergy* 2018;48(3):325-33.
45. Yawalkar N, Shrikhande M, Hari Y, Nievergelt H, Braathen LR, Pichler WJ. Evidence for a role for IL-5 and eotaxin in activating and recruiting eosinophils in drug-induced cutaneous eruptions. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106(6):1171-6.
46. Miller RL, Shtessel M, Robinson LB, Banerji A. Advances in drug allergy, urticaria, angioedema, and anaphylaxis in 2018. *J Allergy Clin Immunol* 2019;144(2):381-92.
47. Optics study of liquid scintillation counting systems; Estudio de la Optica en sistemas de medida por centelle liquido (Technical Report) | ETDEWEB [Internet]. [citado 2021 jun 16];Available from: <https://www.osti.gov/etdeweb/biblio/20685895>
48. Pichler WJ, Tilch J. The lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug hypersensitivity. *Allergy* 2004;59(8):809-20.
49. Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet* 2020;395(10229):1033-4.
50. Gisoni P, Piaserico S, Bordin C, Alaibac M, Girolomoni G, Naldi L. Cutaneous manifestations of SARS-CoV-2 infection: a clinical update. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 2020;34(11):2499-504.
51. Suchonwanit P, Leerunyakul K, Kositkuljorn C. Cutaneous manifestations in COVID-19: Lessons learned from current evidence. *J Am Acad Dermatol* 2020;83(1):e57-60.
52. Rive CM, Bourke J, Phillips EJ. Testing for Drug Hypersensitivity Syndromes. *Clin Biochem Rev* 2013;34(1):15-38.