



LA RADIOTERÀPIA A DOSIS BAIXES: UNA ALTERNATIVA TERAPÈUTICA EN PACIENTS ANCIANS AMB PNEUMÒNIA SEVERA CAUSADA PER COVID-19

Berta Piqué Smith

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LA RADIOTERÀPIA A DOSIS BAIXES: UNA ALTERNATIVA TERAPÈUTICA EN PACIENTS ANCIANS AMB PNEUMÒNIA SEVERA CAUSADA PER COVID-19

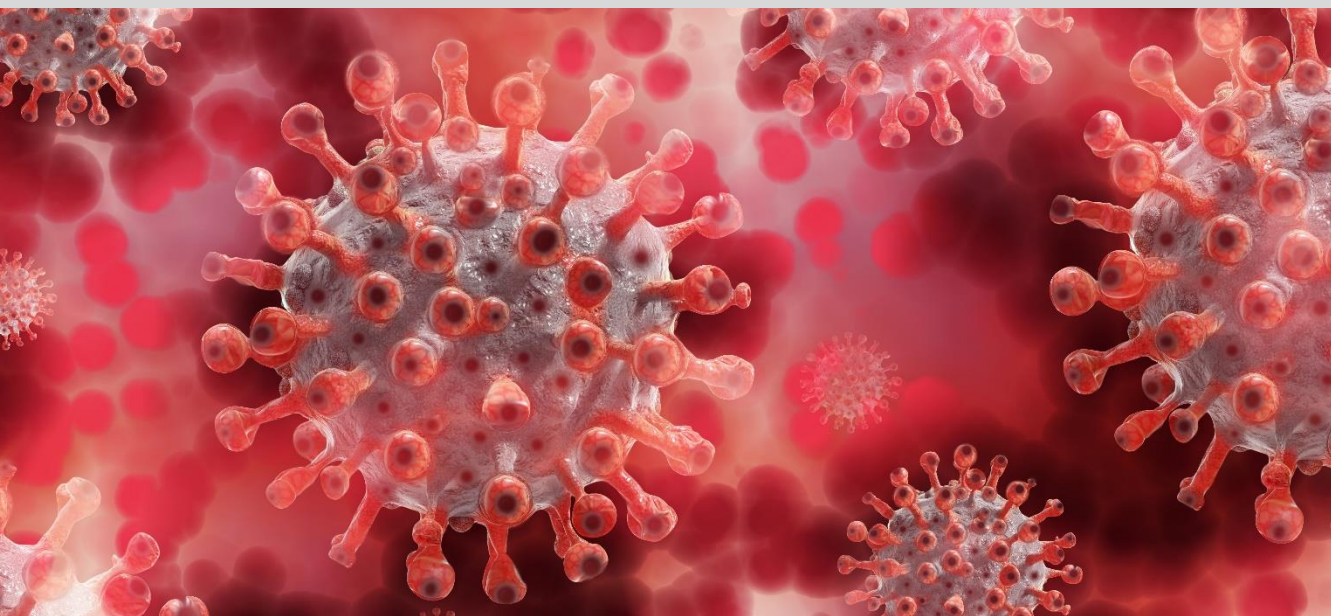
Berta Piqué Smith



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

LA RADIOTERÀPIA A DOSIS BAIXES: UNA ALTERNATIVA TERAPÈUTICA EN PACIENTS ANCIANS AMB PNEUMÒNIA SEVERA CAUSADA PER COVID-19

BERTA PIQUÉ SMITH



TESI DOCTORAL
2023

Berta Piqué Smith

**La radioteràpia a dosis baixes:
una alternativa terapèutica en pacients
ancians amb pneumònia severa causada
per COVID-19**

TESI DOCTORAL

Dirigida per:

Dra. Meritxell Arenas Prat

Dr. David Parada Domínguez



UNIVERSITAT ROVIRA i VIRGILI

2023



FAIG CONSTAR que aquest treball, titulat “La radioteràpia a dosis baixes: una alternativa terapèutica en pacients ancians amb pneumònia severa causada per COVID-19”, que presenta Berta Piqué Smith per a l’obtenció del títol de Doctor, ha estat realitzat sota la meva direcció al Departament de Biomedicina d’aquesta universitat.

HAGO CONSTAR que el presente trabajo, titulado “La radioterapia a dosis bajas: una alternativa terapéutica en pacientes ancianos con neumonía severa causada por COVID-19”, que presenta Berta Piqué Smith para la obtención del título de Doctor, ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Biomedicina de esta universidad.

I STATE that the present study, entitled “Low-dose radiotherapy: a therapeutic alternative in elderly patients with severe COVID-19 pneumonia”, presented by Berta Piqué Smith for the award of the degree of Doctor, has been carried out under my supervision at the Department of Biomedicine of this university.

Tarragona, 20 de juny de 2023

El/s director/s de la tesi doctoral
El/los director/es de la tesis doctoral
Doctoral Thesis Supervisor/s

Dra Meritxell Arenas Prat

Dr. David Parada Domínguez

AGRAÏMENTS

Escriure aquesta tesi mai hagués estat possible sense l'ajuda d'una xarxa de persones que m'han guiat i m'han acompanyat al llarg de tot el procés. Son a aquestes persones a qui vull agrair sincerament el seu suport incondicional i donar les gràcies per haver cregut en les meves possibilitats des del començament.

Primerament, voldria expressar el meu agraïment a en Dr. Francesc Riu, cap del servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Universitari Sant Joan de Reus. Perquè tu Kiko, vas creure en mi i em vas facilitar tots els mitjans per poder iniciar la recerca, sense saber cap a on ens portaria. També, perquè em va introduir a la Dra. Meritxell Arenas i al Dr. David Parada, que han esdevingut els meus directors. Moltes gràcies per la teva ajuda, sense la qual res d'això hagués estat possible.

A tot el servei d'Oncologia Radioteràpica de l'Hospital Universitari Sant Joan de Reus, ja que en els moments més difícils de la pandèmia van poder reunir les forces per a iniciar un assaig clínic amb l'objectiu de millorar la vida de pacients amb un pronòstic molt dolent. Perquè la vostra determinació, en aquells moments tan foscos, van fer que el món fos un lloc una mica més lluminós. Especialment, moltes gràcies a la Marta, perquè les teves correccions van ser de gran ajuda!

A en Dr. David Parada, perquè sempre m'has ajudat i orientat, fos l'hora que fos, i m'has donat forces per a seguir endavant a cada pas d'aquest camí. La teva supervisió ha estat indispensable en tot el procés. Els teus coneixements i la teva guia constant han estat fonamentals per a la planificació de la part experimental, per a l'elaboració dels manuscrits i per a l'escriptura d'aquesta tesi.

Al meu padrí, perquè la teva ajuda va ser crucial per a transportar el material. Perquè tot i la reticència inicial, sempre vas estar disposat a acompanyar-me. Gràcies padrí, perquè quan cal, sempre hi ets.

Al Dr. Arnau Hervera, perquè en els meus inicis en el camp de la recerca a l'IBEC i mentre realitzava el TFM sota la teva supervisió, em vas ensenyar què és el pensament crític!

A la Dra. Susana Sales, perquè des que vaig emprendre la meva trajectòria científica he sentit el teu suport i guiatge en tot moment. Gràcies Susi per ser la meva mentora!

A la Dra. Meritxell Arenas, perquè per mi, ets el clar exemple de que els límits se'ls posa un mateix i que quan estimes el que fas res no et pot aturar. Treballar amb tu durant aquests tres anys m'ha incentivat a no parar mai d'aprendre. Agraïxo que sempre has cregut en mi i m'has encoratjat a continuar i sempre aspirar a més. Moltes gràcies Meritxell, perquè de manera sincera et dic que has esdevingut un referent per a mi, ha estat un plaer.

A les meves amigues, que han tingut una gran paciència i m'han escoltat en els moments més difícils quan no veia el final. Gràcies per les trucades i els cafès de 30 minuts per posar-nos ràpidament al dia, pels runnings a la platja i les excursions per desconnectar. Perquè sou una part molt important de la meva vida.

A la meva família extensa, perquè tot i no entendre gaire de què es tracta, sempre m'heu donat suport. Sobretot a tu tia, pels nostres estius a la platja (poques hores que si no ens cremem), per convidar-me sempre a dinar a casa teva, per les caminades i per escoltar-me i aconsellar-me. Perquè ets una de les persones més importants, molts ànims tia, tu pots!

A tu Tere, perquè sense cap dubte has sigut la persona que més m'ha sentit a parlar del doctorat. Perquè ets un dels meus motors i sempre em dones ales. Perquè al teu costat, soc una mica millor i el món és un lloc més bonic. Gràcies infinites!

Finalment, als meus pares, Mercè i Jordi, per tot el que m'heu ensenyat i perquè sense vosaltres no seria qui soc. Sou un pilar fonamental a la meva vida i els ideals que m'heu transmès, en quant a respecte, esforç, justícia i perseverança sempre els portaré a dins. Gràcies mare per sempre trobar un toc d'humor a les coses i ser la nostra força motriu. Gràcies pare, pels teus savis consells i perquè quan em perdo, sempre trobes la manera de fer-me tornar. Moltes gràcies per la vostra infinita paciència i el suport que em doneu cada dia, perquè amb vosaltres cada dia aprenc i per això us admiro sense mesura. Tinc una sort infinita tenint-vos! Gràcies per tot família!

ÍNDEX

ABREVIATURES UTILITZADES	7
JUSTIFICACIÓ DE LA TESI.....	13
INTRODUCCIÓ	17
1. Retrospectiva temporal.....	19
2. Coronavirus humans	19
3. SARS-CoV-2	20
3.1. Variants i evolució.....	21
3.2. Variants d'interès (VOI).....	22
3.3. Variants de preocupació (VOC)	22
4. Cicle cel·lular	23
5. Manifestacions clíniques del SARS-CoV-2.....	25
5.1. Pneumònia i ARDS causades per la infecció del SARS-CoV-2.....	26
5.2. Manifestacions extrapulmonars	27
6. Tractaments aprovats per a la COVID-19.....	28
6.1. Teràpies antivirals.....	29
6.2. Anticossos monoclonals	29
6.3. Teràpia antiinflamatòria.....	30
7. Vacunes aprovades per a la COVID-19.....	30
8. Efectes del SARS-CoV-2 al sistema respiratori i patogènesi de la pneumònia.....	32
8.1. Desequilibri en els receptors ACE i ACE2 del sistema RAS.....	32
8.2. Activació del sistema cal·licreïna-cinina (KKS)	35
8.3. Immunopatologia i inflamació als pulmons en els casos de COVID-19 severa.....	38
9. Radioteràpia en malalties benignes.....	52
9.1. Introducció.....	52

9.2.	Indicacions acceptades de la RT i de la RT-DB	53
9.3.	Consideracions radiobiològiques	55
9.4.	Limitacions	56
9.5.	Mecanismes de l'acció antiinflamatòria i immunomoduladora de la RT-DB.....	57
10.	Radioteràpia i COVID-19	66
10.1.	Estudis preclínic.....	67
10.2.	Assajos clínics en humans	68
10.3.	Aspectes a tenir en compte	73
HIPÒTESI		75
OBJECTIUS		79
RESULTATS		87
Article 1.....		89
Article 2.....		101
RESUM DE RESULTATS.....		119
Article 1.....		121
Article 2.....		123
DISCUSSIÓ		127
PERSPECTIVES DE FUTUR.....		141
CONCLUSIONS		147
BIBLIOGRAFIA		151

ABREVIATURES UTILITZADES

ACE	Enzim convertidor de l'angiotensina. De l'anglès <i>Angiotensin-converting enzyme</i>
ACE2	Enzim convertidor de l'angiotensina 2. De l'anglès <i>Angiotensin-converting enzyme 2</i>
ADAM17	Desintegrina i metaloproteasa 17. De l'anglès <i>Disintegrin and metalloprotease 17</i>
ALT	Alanina aminotransferasa
AM	Macròfags alveolars. De l'anglès <i>Alveolar macrophages</i>
Ang	Angiotensina
ANGPT2	Angiopietina 2
ARDS	Síndrome de dificultat respiratòria aguda. De l'anglès <i>Acute respiratory distress syndrome</i>
AST	Aspartat aminotransferasa
AT1	Cèl·lules alveolars de tipus 1
AT2	Cèl·lules alveolars de tipus 2
AT1R	Receptors d'angiotensina II de tipus 1. De l'anglès <i>Angiotensin II receptor type 1</i>
AT2R	Receptors d'angiotensina II de tipus 2. De l'anglès <i>Angiotensin II receptor type 2</i>
BEIR	Acadèmia Nacional de Ciències dels Efectes Biològics de la Radiació Ionitzant. De l'anglès <i>National Academy of Sciences Biologic Effects of Ionizing Radiation</i>
BK	Bradicinina. De l'anglès <i>Bradykinin</i>
BKB1R	Receptor de bradicinina B1. De l'anglès <i>Bradykinin B1 receptor</i>
BKB2R	Receptor de bradicinina B2. De l'anglès <i>Bradykinin B2 receptor</i>
CAP	Pneumònia adquirida de la comunitat. De l'anglès <i>Community acquired pneumonia</i>
CCL	Quimiocina amb motiu C-C. De l'anglès <i>Chemokine (C-C motif) ligand</i>
cDC	Cèl·lules dendrítiques convencionals. De l'anglès <i>Conventional dendritic cells</i>
CPM	Carboxipeptidasa M

CPN	Carboxipeptidasa N
CRP	Proteïna C reactiva. De l'anglès <i>C reactive protein</i>
CS	Tempesta de citocines. De l'anglès <i>Citokine storm</i>
Ct	Llindar de cicle. De l'anglès <i>Cycle threshold</i>
CXCL	Quimiocina amb motiu C-X-C. De l'anglès <i>C-X-C motif chemokine ligand</i>
DABK	Des-Arg9-bradicinina
DAMP	Patrons moleculars associats a dany. De l'anglès <i>Damage-associated molecular patterns</i>
DC	Cèl·lules dendrítiques. De l'anglès <i>Dendritic cells</i>
DAMP	Patrons moleculars associats a dany. De l'anglès <i>Danger-associated molecular patterns</i>
E	Proteïna de l'embolcall
EC	Cèl·lules endotelials. De l'anglès <i>Endothelial cells</i>
EMA	Agència Europea del Medicament
FGF-2	Factor de creixement de fibroblast 2
FiO₂	Fracció inspirada d'oxigen
FP	Pèptid de fusió. De l'anglès <i>Fusion peptide</i>
FXII	Factor de coagulació XII
gRNA	Àcid ribonucleic genòmic. De l'anglès <i>Genomic RNA</i>
G-CSF	Factor estimulant de colònies de granulòcits. De l'anglès <i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
GM-CSF	Factor estimulant de colònies de granulòcits i macròfags. De l'anglès <i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HCoV s	Coronavirus humans. De l'anglès <i>Human coronavirus</i>
HMWK	Cininogen d'alt pes molecular. De l'anglès <i>High molecular weight kininogen</i>
ICAM-1	Molècula d'adhesió intercel·lular 1. De l'anglès <i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
ICRP	Comissió Internacional de Protecció Radiològica. De l'anglès <i>International Commission on Radiological Protection</i>
IFN	Interferó
IgG	Immunoglobulina G

IgM	Immunoglobulina M
IL	Interleucina
iNOS	Forma induïble de la sintasa d'òxid nítric. De l'anglès <i>Inducible isoform of nitric oxide synthase</i>
KKS	Sistema cal·licreïna-cinina. De l'anglès <i>Kallikrein-Kinin System</i>
LDH	Lactat deshidrogenasa
LPS	Lipopolisacàrid
M	Proteïna de la membrana
M1	Macròfags de tipus 1
M2	Macròfags de tipus 2
MAS	Síndrome d'activació de macròfags. De l'anglès <i>Macrophage activation syndrome</i>
MASR	Receptor MAS
MERS-CoV	Coronavirus de la síndrome respiratòria de l'Orient Mitjà
MHC	Complex major d'histocompatibilitat. De l'anglès <i>Major histocompatibility complex</i>
mo-AM	Macròfags alveolars derivats de monòcits. De l'anglès <i>Monocyte-derived alveolar macrophages</i>
moDCs	Cèl·lules dendrítiques derivades de monòcits. De l'anglès <i>Monocyte-Derived Dendritic Cells</i>
mRNA	Àcid ribonucleic missatger. De l'anglès <i>Messenger ribonucleic acid</i>
NET	Trampes extracel·lulars de neutròfils. De l'anglès <i>Neutrophil extracellular traps</i>
NF-κB	Factor nuclear-kappa B. De l'anglès <i>Nuclear factor kappa</i>
NK	Cèl·lules assassines naturals. De l'anglès <i>Natural killers</i>
NLRP3	Família NLR amb domini de pirina que conté la proteïna 3. De l'anglès <i>NLR family pyrin domain containing protein 3</i>
NO	Òxid nítric. De l'anglès <i>Nitric oxide</i>
NOS	Òxid nítric sintasa. De l'anglès <i>Nitric oxide synthase</i>
NSP	Proteïnes no estructurals. De l'anglès <i>Non structural proteins</i>
O₂	Oxigen
OMS	Organització Mundial de la Salut

ORF	Marcos oberts de lectura. De l'anglès <i>Open Reading Frame</i>
PAMP	Patrons moleculars associats a patògens. De l'anglès <i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PaFi	Ràtio de pressió parcial d'oxigen arterial/fracció inspirada d'oxigen
PBMC	Cèl·lules polimorfonucleades de la sang. De l'anglès <i>Peripheral blood mononuclear cell</i>
pDC	Cèl·lules dendrítiques plasmacitoides. De l'anglès <i>Plasmacytoid dendritic cells</i>
PMN	Cèl·lules polimorfonucleades
PON-1	Paraoxonasa 1
PP1a	Poliproteïna 1a
PP1ab	Poliproteïna 1ab
PRR	Receptor de reconeixement de patrons. De l'anglès <i>Pattern Recognition Receptor</i>
PD-1	Proteïna de mort cel·lular 1. De l'anglès <i>Programmed cell death protein 1</i>
RAS	Sistema renina-angiotensina. De l'anglès <i>Renin-angiotensin System</i>
RBD	Domini d'unió al receptor. De l'anglès <i>Receptor binding domain</i>
RNA	Àcid ribonucleic. De l'anglès <i>Ribonucleic acid</i>
ROS	Espècies reactives d'oxigen. De l'anglès <i>Reactive oxygen species</i>
RT	Radioteràpia
RTC	Complex de replicació i transcripció. De l'anglès <i>Replication and transcription complex</i>
RT-DB	Radioteràpia a dosis baixes
S	Proteïna espícula. De l'anglès <i>Spike</i>
S1	Subunitat 1
S2	Subunitat 2
SaFi	Ràtio de saturació parcial d'oxigen/fracció inspirada d'oxigen
SARS-CoV	Coronavirus de la síndrome respiratòria aguda greu
SARS-CoV-2	Coronavirus de la síndrome respiratòria aguda greu de tipus 2

SCI	Lesió de la medul·la espinal. De l'anglès <i>Spinal cord injury</i>
SpO₂	Saturació d'oxigen
TC	Tomografia computada
TD	Domini transmembrana. De l'anglès <i>Transmembrane domain</i>
TF	Factor tissular. De l'anglès <i>Tissue factor</i>
TGF-β	Factor de creixement transformant beta. De l'anglès <i>Transforming growth factor beta</i>
Th	Cèl·lules T auxiliars. De l'anglès <i>T helper cells</i>
Tfh	Cèl·lules T auxiliars fol·liculars. De l'anglès <i>Follicular helper T cells</i>
TLR	Receptor de tipus Toll. De l'anglès <i>Toll-like receptor</i>
TMPRSS2	Proteasa transmembrana serina 2. De l'anglès <i>Transmembrane protease serine 2</i>
TNF-α	Factor de necrosi tumoral alfa. De l'anglès <i>Tumoral necrosis factor alfa</i>
TR-AM	Macròfags alveolars residents al teixit. De l'anglès <i>Tissue-resident alveolar macrophages</i>
UCI	Unitat de Cures Intensives
UE	Unió Europea
VCAM-1	Molècula d'adhesió cel·lular vascular 1. De l'anglès <i>Vascular cell adhesion protein 1</i>
VEGFR1	Receptor 1 del factor de creixement endotelial vascular. De l'anglès <i>Vascular endothelial growth factor receptor 1</i>
VOC	Variants de preocupació. De l'anglès <i>Variant of concern</i>
VOI	Variants d'interès. De l'anglès <i>Variant of interest</i>
XIAP	Proteïna inhibidora de l'apoptosi lligada a l'X. De l'anglès <i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>

Les figures presents en aquesta tesi són d'elaboració pròpia i s'han realitzat mitjançant el programa "Biorender". Les figures de representacions tridimensionals proteïques s'han generat mitjançant el programa Chimera i han estat extretes de la base de dades "Protein Data Bank".

JUSTIFICACIÓ DE LA TESI

JUSTIFICACIÓ GENERAL

Davant del repte global sense precedents que ha suposat la pandèmia de COVID-19, la comunitat científica va respondre amb estratègies col·laboratives per investigar tractaments que poguessin reduir la mortalitat de la infecció, així com per dissenyar noves vacunes per tal de frenar l'avenç del contagi. La urgència per trobar vies terapèutiques capaces de millorar la simptomatologia i l'evolució dels pacients va conduir a utilitzar medicaments ja existents indicats per a d'altres infeccions o malalties. En aquest context, ressorgeix la radioteràpia a dosis baixes (RT-DB) com a un tractament potencial per a la pneumònia causada per la COVID-19. Aquesta, s'havia usat a principis del segle passat per a l'abordatge terapèutic de la pneumònia pels seus efectes antiinflamatoris i immunomoduladors¹, però va caure en desús amb la introducció de les sulfonamides. Actualment, la RT-DB s'empra per al tractament de diferents malalties artrodegeneratives i inflamatòries pels seus potents efectes antiinflamatoris, tot i que el seu ús no és homogeni en els diferents països.

L'espectre de la simptomatologia de la COVID-19 és ampli i, mentre que la majoria dels casos són lleus i es resolen sense complicacions clíniques, en els casos més severes es produeix un fenomen hiperinflamatori anomenat tempesta de citocines (CS). En aquests pacients, a més del dany pulmonar directe causat per la mateixa infecció de SARS-CoV-2 que indueix la piroptosi i altres formes de mort cel·lular, es produeix un alliberament massiu de citocines, com la IL-4, la IL-6 i el TNF- α , per part d'un sistema immune altament desregulat. La CS agreujarà el dany alveolar, causant hipòxia i, en absència de resolució, pneumònia, síndrome de dificultat respiratòria aguda (ARDS) i eventualment la mort². Paradoxalment, tot i que l'objectiu del sistema immune és eliminar el virus, les conseqüències fisiopatològiques de la seva activació desmesurada i la inflamació secundària que se'n deriva, poden arribar a causar un dany major que el de la pròpia infecció de SARS-CoV-2.

El potencial antiinflamatori i immunomodulador de la RT-DB s'ha validat tant amb estudis *in vitro*^{3,4} com *in vivo*^{5,6}. Durant la pandèmia de la COVID-19, tenint en compte aquesta base de coneixement preclínic, així com els resultats favorables provinents d'Alemanya, país en què aquest tractament s'utilitza de manera

rutinària per a diverses malalties benignes⁷, la RT-DB es va considerar com una alternativa terapèutica per al tractament de la pneumònia causada per la COVID-19. Per aquesta raó, es van iniciar diversos assajos clínics arreu del món per a provar la seguretat i l'eficàcia de la RT-DB en pacients infectats amb COVID-19 i els resultats fins al dia d'avui, constaten beneficis terapèutics sense generar signes de toxicitat en la gran majoria dels estudis⁸⁻¹⁰. Tot i això, la manca d'homogeneïtat en el disseny metodològic i la presència d'interrogants encara pendents de resoldre, tant pel que fa als mecanismes radiobiològics subjacents, com a l'edat idònia dels pacients, la finestra terapèutica de la RT-DB i la dosi òptima de radiació, fan que sigui indispensable continuar en aquesta línia de recerca.

INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

1. Retrospectiva temporal

La COVID-19, també coneguda com a malaltia respiratòria causada pel SARS-CoV-2, que són les sigles que donen nom al coronavirus de la síndrome respiratòria aguda greu de tipus 2, és una malaltia infecciosa identificada per primera vegada a la ciutat xinesa de Wuhan, el desembre de 2019. Diverses institucions sanitàries de la ciutat van atendre grups de pacients amb pneumònies per causes desconegudes que cursaven amb febre, tos, astènia, i fins i tot dispnea i infiltració bilateral als pulmons en els casos més greus¹¹. Tot i que el primer cas documentat de COVID-19 data del 8 de desembre de 2019, la Comissió de Salut Municipal de Wuhan no va informar l'Organització Mundial de la Salut (OMS) fins al dia 31. Només en dos mesos, la COVID-19 s'havia estès massivament a 34 províncies xineses amb més de 70.000 casos confirmats i la sospita de molts altres no reportats¹². A partir de l'aïllament del virus trobat en el líquid broncoalveolar dels pacients amb pneumònia greu i de l'anàlisi metagenòmica d'RNA, es va poder seqüenciar i identificar el SARS-CoV-2 com a causant dels brots^{13,14}. L'11 de març del 2020, l'OMS va classificar el brot de la COVID-19 com una pandèmia global¹⁵.

A data 11 d'abril de 2023 s'han confirmat 762.791.152 casos de COVID-19 i 6.897.025 morts segons dades de l'OMS amb un total de 13.340.275.493 vacunes administrades arreu del món¹⁶.

2. Coronavirus humans

Els coronavirus pertanyen a la família *Coronaviridae* i es caracteritzen per presentar un genoma de cadena simple d'RNA monocatenari positiu d'entre 26 i 32 quilobases. Segons la seva genètica, els coronavirus es divideixen en quatre gèneres, els *Alphacoronavirus*, els *Betacoronavirus*, els *Gammacoronavirus* i els *Deltacoronavirus*¹⁷. Pertanyents als dos primers gèneres, es coneixen 7 coronavirus zoonòtics, originats majoritàriament en rat-penats, capaços d'infectar els humans o coronavirus humans (HCoVs)¹⁸. Aquests causen infeccions al sistema respiratori amb diferents graus de severitat, des de constipat comú a

pneumònia i ARDS, però també poden provocar danys renals, hepàtics i neurològics, fallada multiorgànica i eventualment la mort¹⁹.

El primer HCoV que es va identificar va ser el coronavirus 229E l'any 1966²⁰. Tot i això, no ha estat ja fins al segle XXI que els coronavirus s'han considerat altament patogènics i en el cas del coronavirus de la síndrome respiratòria aguda greu (SARS-CoV), el coronavirus de la síndrome respiratòria de l'Orient Mitjà (MERS-CoV) i el SARS-CoV-2, responsables de provocar tres epidèmies. El novembre de 2002, es va reportar el primer cas de la síndrome respiratòria aguda greu (SARS) a la Xina. L'agent causant d'aquestes infeccions respiratòries era el SARS-CoV i aviat es va estendre a Vietnam, Canadà i altres països²¹. L'OMS va declarar la pandèmia de SARS el 12 de març de 2003 que ha infectat 8.096 persones i causat 774 morts²². Després de 10 anys, el 13 de juny de 2012 es va aïllar a l'Aràbia Saudí, un nou *Betacoronavirus* que va rebre el nom de MERS-CoV²³. D'aleshores ençà, aquest coronavirus ha infectat 2500 persones i provocat 858 morts repartides en 27 països²⁴. Tot i ser una amenaça per la salut pública, l'OMS mai l'ha declarat oficialment com a pandèmia.

3. SARS-CoV-2

De manera similar als altres coronavirus, el SARS-CoV-2, és un virus amb embolcall i RNA monocatenari positiu que forma part de la família *Coronaviridae*, del gènere *Betacoronavirus*. Aquest virus té forma rodona o el·líptica, presenta un diàmetre d'entre 60-140 nm aproximadament i és sensible als rajos ultraviolats i a les altes temperatures, tot i ser resistent a temperatures sota 0°. A més, es pot inactivar amb diversos solvents lípids com l'etanol i l'èter (75%)²⁵. El seu genoma consta gairebé de 30.000 parells de bases amb una estructura de 5'-cap i una cua de poli-A i és el més gran dels virus d'RNA descoberts fins ara. La seqüència del genoma del SARS-CoV-2 presenta una identitat del 79,5% amb el SARS-CoV i del 50% amb el MERS-CoV²⁶ i consta de 14 marcs oberts de lectura (ORF) que codifiquen per 31 proteïnes, de les quals 16 són no estructurals (NSP), 4 són estructurals: espícula (S), embolcall (E), membrana (M) i nucleocàpsida (N) i 11 són proteïnes accessòries: ORF3a, ORF3b, ORF3c, ORF3d, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9b, ORF9c i ORF10. Aquestes proteïnes accessòries no són essencials per a la replicació del virus, però tenen diverses funcions en la seva

patogènesi. Seguint l'ordre típic d'aparició de 5' a 3' l'estructura genòmica és la següent: un complex replicasa (ORF1a/ORF1b), S, ORF3a, E, M, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, N i ORF10²⁷. Inicialment, el complex replicasa que consta dels gens ORF1a i ORF1b, es tradueix en forma de dues poliproteïnes, la poliproteïna 1a (PP1a) i la poliproteïna 1ab (PP1ab) que posteriorment són escindides per proteases víriques per donar lloc a les 16 NSP²⁸. El gen ORF1b no es tradueix de manera independent perquè hi ha un ORF encavalcat amb el gen ORF1a. Això permet que la PP1ab estigui codificada pel final del gen ORF1a i la totalitat del gen ORF1b²⁹. Les NSP participen en la replicació del genoma i en la regulació de la transcripció, mentre que les proteïnes estructurals estan altament conservades i són la principal diana terapèutica dels fàrmacs antivirals²⁸.

Tot i que l'origen del SARS-CoV-2 és motiu de controvèrsia en la comunitat científica, es creu que aquest podria haver evolucionat a partir d'una soca de coronavirus de rat-penat localitzat a Laos. Concretament, el coronavirus BANAL-52 que presenta una identitat genòmica del 96,8% amb el SARS-CoV-2 i que fins al dia d'avui, és el coronavirus més proper evolutivament^{30,31}. Pel que fa a l'hoste intermediari del SARS-CoV-2, alguns autors postulen que és el pangolí³² o la mustela³³. La taxa de mortalitat del virus varia significativament entre països, i per altres factors com l'edat, el gènere³⁴, les condicions de salut preexistents incloses les comorbiditats com malaltia respiratòria o patologia pulmonar crònica³⁵, malaltia cardiovascular³⁶, malaltia neurològica³⁷ i altres, com l'obesitat i la diabetis³⁸. També la severitat de la malaltia i la variant del virus implicada poden influir en el risc de mortalitat. A més, la sobrecàrrega dels hospitals i la falta d'homogeneïtat en la comptabilització de les morts relacionades amb la COVID-19 a tot el món dificulta la determinació d'una taxa de mortalitat precisa i fiable. L'estimació de la mortalitat de la COVID-19 feta per l'OMS és del 2.2%³⁹. Segons alguns autors, però, la mortalitat causada per la pandèmia és considerablement superior a la xifra oficial^{40,41}. En comparació amb altres coronavirus, la taxa de mortalitat és més baixa que en el cas del SARS-CoV que és d'un 9,6% de mortalitat²⁶ i del MERS-CoV que és d'un 35%⁴², però és més contagiós.

3.1. Variants i evolució

Els virus evolucionen constantment degut a canvis en el seu codi genètic durant la replicació del genoma, sigui per mutacions genètiques o per recombinació viral,

i donen lloc a múltiples variants. Concretament, els virus d'RNA tenen un ritme de mutacions més elevat, i específicament el SARS-CoV-2 presenta uns enzims RNA polimerasa amb una baixa fidelitat en la replicació⁴³. Durant la pandèmia de la COVID-19 s'han reportat un gran nombre de variants del SARS-CoV-2 classificades com a variants d'interès (VOI) o variants de preocupació (VOC)⁴⁴.

3.2. Variants d'interès (VOI)

Les VOI del SARS-CoV-2 presenten canvis genètics en el domini d'unió al receptor (RBD) que poden afectar la capacitat del virus per infectar les cèl·lules humanes. A més, també poden presentar una reducció de la neutralització per anticossos generats per infeccions prèvies o vacunes, reduir l'eficàcia dels tractaments antivirals i dels tests diagnòstics i tenir una major transmissibilitat o severitat. Per aquesta raó, la vigilància epidemiològica és indispensable per a monitorar l'evolució de les VOI, ja que aquestes poden ser reclassificades com a VOC⁴⁵. L'OMS ha descrit 8 VOI: Epsilon (B.1.427 i B.1.429), Zeta (P.2), Eta (B.1.525), Theta (P.3), Iota (B.1.526), Kappa (B.1.617.1), Lambda (C.37) i Mu (B.1.621)⁴⁶.

3.3. Variants de preocupació (VOC)

Les VOC del SARS-CoV-2 han acumulat múltiples mutacions genètiques que poden modificar les seves propietats biològiques, incrementant la transmissibilitat o virulència i l'habilitat d'evadir la detecció per part del sistema immunitari, reduint la neutralització per anticossos, o bé disminuint l'eficàcia dels tractaments, de les proves diagnòstiques i de les vacunes⁴⁵. La presència de les VOC ha estat motiu de preocupació global, ja que poden eludir les mesures de prevenció i control de la pandèmia, així com comprometre l'èxit de la vacunació a escala mundial⁴⁷.

Les diferents VOC reconegudes per l'OMS són: Alfa (B.1.1.7) que apareix el setembre del 2020 al Regne Unit, Beta (B.1.351) que s'identifica l'octubre de 2020 a Sud Àfrica, Gamma (P.1) que sorgeix el novembre de 2020 al Brasil, Delta (B.1.617.2) que s'identifica a l'Índia el desembre del 2020 i finalment, la variant Òmicron (B.1.1.529). L'Òmicron s'identifica per primera vegada a Sud Àfrica el novembre de 2021 i actualment, és la més prevalent al món. Tot i ser més infecciosa que les variants anteriors, presenta una patogenicitat més baixa⁴⁶.

4. Cicle cel·lular

El curs clínic de la COVID-19 es caracteritza per una primera fase d'incubació que és asimptomàtica, seguida d'una fase simptomàtica i finalment una fase pulmonar. La mitjana de la fase d'incubació és de 5 dies, la fase simptomàtica dura entre 5 i 7 dies i posteriorment, s'entra a la fase pulmonar. Aquesta es divideix en la fase primerenca que dura 4 dies de mitjana i la fase tardana, a partir del dia 14 des de l'inici de la infecció⁴⁸.

El SARS-CoV-2 infecta les cèl·lules a partir de la unió del RBD de la proteïna S amb l'ACE2. La proteïna S és una glicoproteïna homotrimèrica de membrana de tipus I que consta de 66 glicans units per l'extrem amino-terminal. Cada protòmer de la proteïna S està format per dues subunitats, la subunitat 1 (S1) que conté el RBD i s'uneix a l'ACE2 i la subunitat transmembrana 2 (S2) que permet l'ancoratge del viriò a la membrana cel·lular i presenta un pèptid de fusió (FP) i un domini transmembrana (TD), entre d'altres⁴⁹. Per al procés d'entrada del SARS-CoV-2 a les cèl·lules diana són necessaris dos esdeveniments d'escissió a la proteïna S, un a la unió de les dues subunitats S1/S2 i l'altre a una regió interna de la S2 coneguda com a lloc de tall S2'⁵⁰.

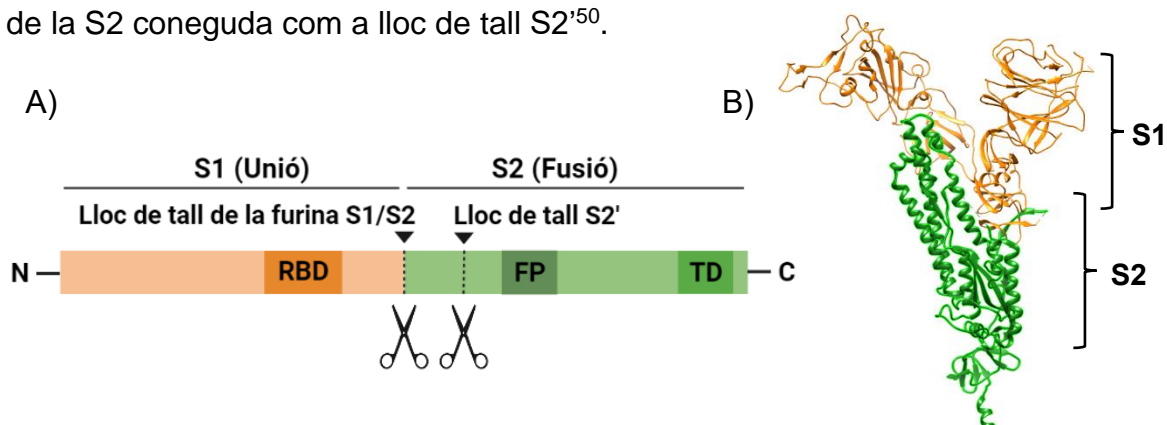


Figura 1. Representació esquemàtica de les dues subunitats de la proteïna S. (A) Protòmer de la proteïna S del SARS-CoV-2 amb els dos llocs de clivatge: S1/S2 i S2'. Figura modificada de Hoffman et al.⁵⁰ (B) Conformació tridimensional de les dues subunitats d'un protòmer de la proteïna S del SARS-CoV-2. Abreviatures: RBD, domini d'unió al receptor; FP, pèptid de fusió; S1, subunitat 1; S2, subunitat 2; TD, domini transmembrana.

Durant la biosíntesi i la maduració dels virions a la cèl·lula infectada, la proteïna S pateix el primer procés d'escissió, necessari per a la seva preactivació. Aquest

consisteix en un tall al lloc d'unió S1/S2 mediat per la pro-proteïna convertasa furina a l'aparell de Golgi, tot i que les subunitats es mantenen associades per un enllaç no-covalent^{51,52}. Quan la proteïna S ha estat preactivada, s'uneix a través del RBD a l'ACE2 de la cèl·lula diana. Aquesta unió produeix un canvi conformacional de la proteïna S que deixa accessible el lloc de clivatge S2', que serà tallat per la proteasa transmembrana serina 2 (TMPRSS2) de la superfície de la cèl·lula diana⁵³. Aleshores la S1 i la S2 es dissocien i aquest canvi en l'estructura terciària empeny el FP cap a la membrana que genera un porus a través del qual la seqüència d'RNA genòmic (gRNA) viral entra al citoplasma de la cèl·lula infectada⁵⁴.

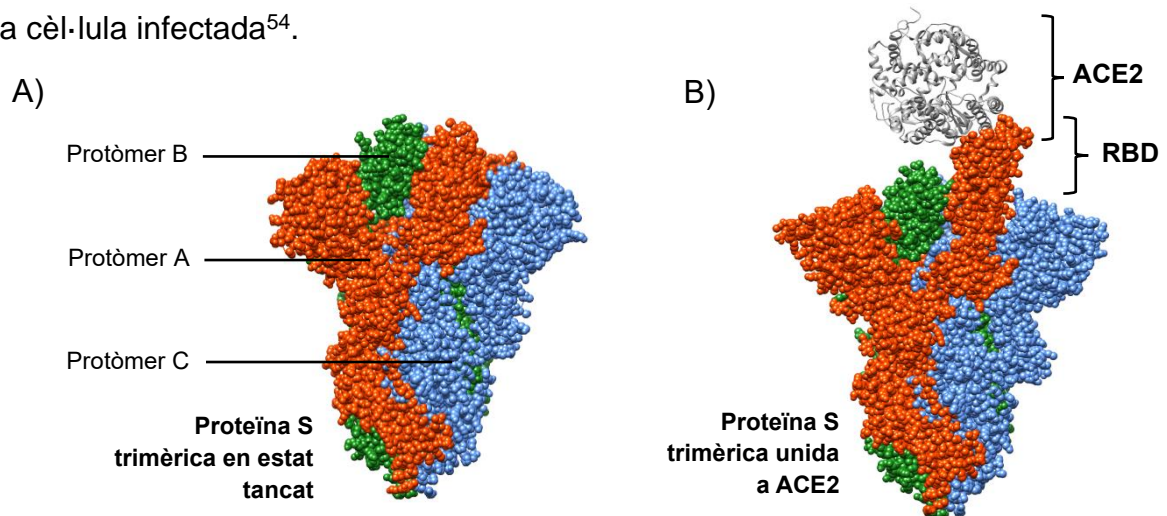


Figura 2. Estructura tridimensional de la proteïna S del SARS-CoV-2 de la variant òmicron. (A) Estructura de la proteïna S trimèrica amb els 3 protòmers A, B i C de color vermell, verd i blau, respectivament. (B) Unió de la proteïna S a l'ACE2 mostrant el canvi conformacional. *Abreviatures: ACE2, enzim convertidor de l'angiotensina II; RBD, domini d'unió al receptor.*

En el moment que el gRNA arriba al citoplasma es tradueix reclutant ribosomes de l'hoste i dona lloc a la pp1a i la pp1ab que posteriorment es tallaran a 16 NSP. Aquestes proteïnes formen, per una banda, un complex de replicació i transcripció (RTC)⁵⁵ i, per l'altra, indueixen la formació de vesícules des de l'aparell de Golgi i el reticle endoplasmàtic⁵⁶. Dins d'aquestes vesícules, el RTC sintetitzarà nou gRNA antisentit que servirà de motlle per realitzar noves còpies, i RNA missatger (mRNA) subgenòmic que codificarà per les 4 proteïnes estructurals i algunes proteïnes accessòries. Els nous virions del SARS-CoV-2 es formaran encapsulant el gRNA dins la nucleocàpsida. Finalment, les vesícules amb els virions es

fusionaran amb la membrana cel·lular en l'exocitosi i el virus s'alliberarà a l'espai extracel·lular⁵⁷.

Tot i que el virus pot unir-se a proteïnes alternatives a l'ACE2, com per exemple, la neuropilina-1⁵⁸, l'ACE2 ha estat reconegut com el principal determinant de vulnerabilitat d'una cèl·lula per a ser infectada per SARS-CoV-2 i és considerada la ruta d'entrada canònica⁵⁴. L'ACE2 és una aminopeptidasa unida a la membrana cel·lular que s'expressa en un gran nombre de cèl·lules del cos humà incloent cèl·lules alveolars epitelials de tipus II (AT2), cèl·lules miocardiàques, cèl·lules de l'epiteli de l'esòfag i cèl·lules de l'estómac, entre d'altres. La simptomatologia de la COVID-19 és molt diversa perquè més enllà del sistema respiratori, altres sistemes fisiològics del cos poden ser infectats pel SARS-CoV-2⁵⁹. Zou *et al.* han demostrat que tant l'expressió de mRNA de l'ACE2, com l'expressió proteica d'aquest, determinen el grau de vulnerabilitat dels diferents òrgans a la infecció per COVID-19. Els pulmons són els òrgans amb major risc d'infecció per SARS-CoV-2 seguit del tracte respiratori, l'esòfag, els ronyons, la melsa, l'íleum i el miocardi del cor⁶⁰.

5. Manifestacions clíniques del SARS-CoV-2

L'espectre de la simptomatologia de la COVID-19 és molt ampli i depèn de múltiples variables, que inclouen la variant, el gènere, l'edat i l'estat vacunal⁶¹. En un estudi de 72.314 casos a la Xina, un 81% van ser classificats com a lleus o asimptomàtics, un 14% com a severos i un 5% com a crítics¹². Es considera que aproximadament un 35,1% de les infeccions són asimptomàtiques, percentatge que es redueix amb l'edat i amb la presència de comorbiditats⁶².

Dins dels individus simptomàtics, la majoria de les infeccions de SARS-CoV-2 són lleus i les manifestacions clíniques més comunes són febre, tos, dispnea, diarrea, astènia, cefalea i miàlgia. Da Rosa *et al.* en una metaanàlisi que incloïa 114.046 pacients recollits de 184 articles científics diferents, van reportar que la febre era el símptoma més comú amb una prevalença del 58,66%, seguida de la tos amb un 54,52% i la dispnea amb un 30,82%⁶³.

Pel que fa a les característiques clinicopatològiques, una metaanàlisi de 8.697 pacients amb COVID-19 a la Xina, va observar alteracions en els paràmetres analitzats al laboratori que incloïen uns nivells elevats de proteïna C reactiva

(CRP) en un 65,9% dels pacients infectats, limfopènia en un 47,6%, una funció del fetge anormal en un 26,4%, leucopènia en un 23,5% i uns nivells de dímer D elevats en un 20,4%, que revela la presència de coagulopatia⁶⁴. Altres paràmetres bioquímics que caracteritzen la COVID-19 inclouen nivells elevats de lactat deshidrogenasa (LDH), que és un indicador de dany pulmonar, així com de ferritina sèrica, que és un indicador d'inflamació⁶⁵. També es poden observar augments en els nivells d'alanina aminotransferasa (ALT) i d'aspartat aminotransferasa (AST), enzims que reflecteixen una disfunció hepàtica⁶⁶.

L'OMS ha dissenyat una classificació dels pacients amb COVID-19 segons els graus de severitat:

- CRÍTICS: presenten ARDS, xoc sèptic o altres condicions que normalment requereixen la prestació de teràpies de suport vital com la ventilació mecànica (invasiva o no invasiva) o la teràpia vasopressora.
- SEVERS: presenten una saturació d'oxigen menor al 90% en aire ambient o l'ús dels músculs accessoris per a respirar, signes de pneumònia, incapacitat de completar les frases i una freqüència respiratòria inferior a 30 respiracions per minut.
- NO SEVERS: cap de símptoma de severitat⁶⁷.

5.1. Pneumònia i ARDS causades per la infecció del SARS-CoV-2

Aproximadament, el 20% dels casos de COVID-19 presenten pneumònia, dels quals el 10% és pneumònia moderada i no hipoxèmica, i el 10% restant és pneumònia hipoxèmica que habitualment requereix hospitalització i l'administració de teràpia d'oxigen. En un 3% dels casos, quan l'administració d'oxigen és inferior a 6L/min i no millora la hipoxèmia, es considera una pneumònia crítica⁶⁸. En aquest context, els pacients són ingressats a la Unitat de Cures Intensives (UCI) on s'utilitzarà teràpia amb oxigen amb un flux major de 6L/min, ventilació mecànica, sigui no invasiva o per intubació, o amb una membrana extracorpòria⁶⁹.

Hi ha diversos tipus de pneumònies segons la causa i adquisició. Quan la pneumònia es manifesta en pacients hospitalitzats es classifica com a pneumònia nosocomial, mentre que en pacients no hospitalitzats, es denomina pneumònia adquirida a la comunitat (CAP). La CAP es pot dividir en típica, quan és causada per bacteris comuns⁷⁰ o atípica, originada per patògens atípics, inclosos els virus

SARS-CoV i SARS-CoV-2⁷¹. En el cas de la COVID-19, la pneumònia associada acostuma a ser intersticial i bilateral, ja que es veuen afectats ambdós pulmons i s'inflama el teixit al voltant dels alvèols, que pot omplir-se de secrecions purulentes i altres líquids. Els resultats de la tomografia computada (TC) de tòrax en aquests casos inclouen opacitats i/o reticulacions als lòbuls pulmonars inferiors⁷². Per a determinar la severitat de la pneumònia i seleccionar el tractament més eficient s'utilitza el CURB-65, que també es pot emprar com un factor pronòstic de mortalitat de COVID-19⁷³. Aquest sistema atorga una puntuació a cada pacient segons els següents factors: confusió, urèmia (nitrogen ureic a la sang major de 20 mg/dL), freqüència respiratòria > 30 per minut, hipotensió i ser major de 65 anys⁷⁴.

En un estudi que monitorava 201 pacients amb pneumònia, es va observar que un 42% desenvolupava ARDS, i que en aquests casos, entre un 61% i un 81% requerien hospitalització a l'UCI. La mortalitat dels pacients amb COVID-19 i que presenten ARDS és molt elevada, aproximadament d'un 52,4%⁶⁵. L'ARDS causat per la infecció del SARS-CoV-2 es qualifica d'acord amb els criteris diagnòstics de Berlín del 2012 que inclouen: fallada respiratòria hipoxèmica aguda, empitjorament dels símptomes respiratoris en una setmana, malaltia bilateral de l'espai aeri observada mitjançant radiografia, TC de tòrax o ultrasonografia que no es pot explicar completament per efusions, col·lapse lobular o pulmonar o nòduls, i que la causa principal de la fallada respiratòria aguda hipoxèmia no sigui la fallada cardíaca⁷⁵.

5.2. Manifestacions extrapulmonars

Les manifestacions clíniques no directament relacionades amb els pulmons seran breument esmentades, ja que no formen part de l'objectiu d'aquesta tesi. L'ACE2 es troba àmpliament expressat en diferents òrgans del cos, per la qual cosa el virus SARS-CoV-2 pot infectar una gran varietat de teixits extrapulmonars i causar manifestacions clíniques molt diverses. Aquestes condicions inclouen símptomes gastrointestinals, manifestacions cardiovasculars i hepatobiliars, dany agut als ronyons, alteracions hepàtiques i dermatològiques i alteracions al sistema nerviós, sistema endocrí i sistema limfàtic-vascular^{76,77}.

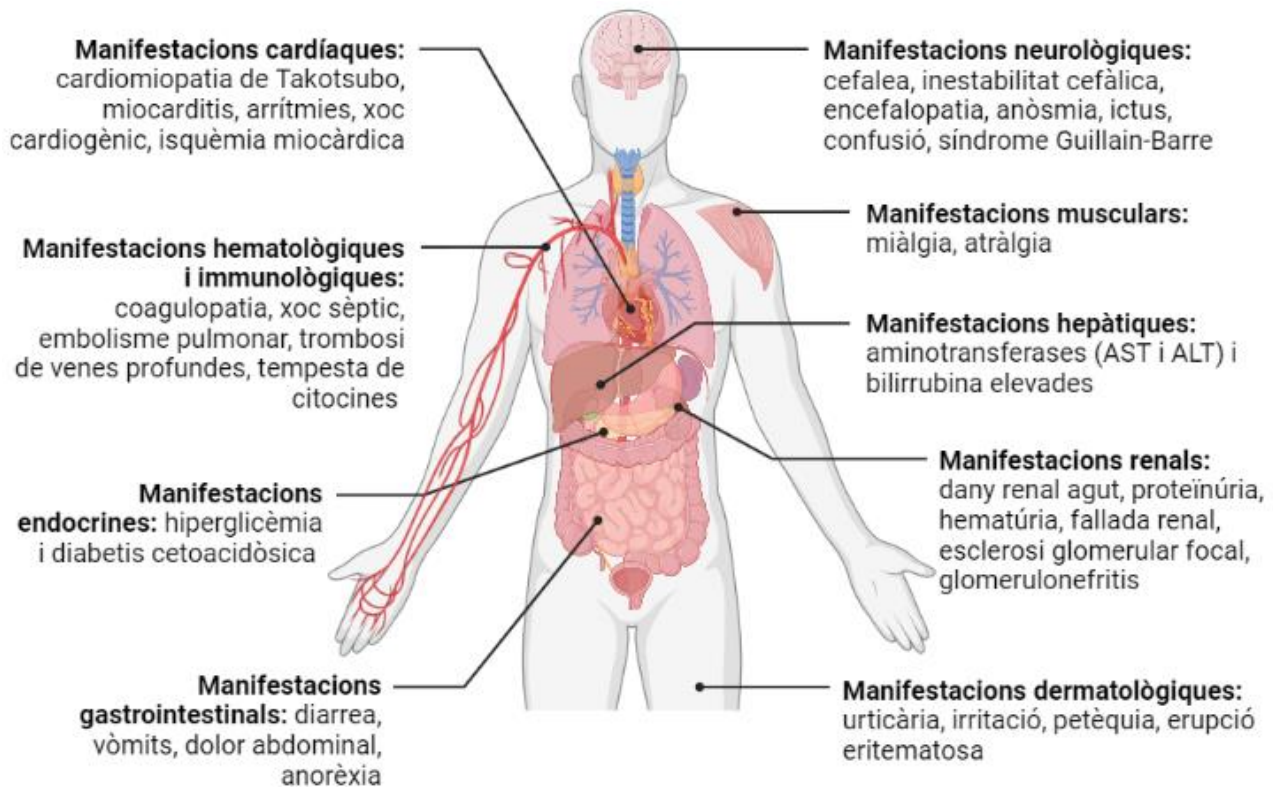


Figura 3. Resum del quadre clínic extrapulmonar de la COVID-19. *Abreviatures:* AST, aspartat aminotransferasa; ALT, alanina aminotransferasa. Figura modificada de Louis et al.⁷⁷

6. Tractaments aprovats per a la COVID-19

L'elecció del tractament està determinada pel moment de la infecció viral en què es troba el pacient. Com s'ha esmentat prèviament, primerament es produeix la fase d'incubació, posteriorment la fase simptomàtica, que es produeix al tracte respiratori superior, i finalment la fase pulmonar, que es presenta en els casos més greus i afecta el tracte respiratori inferior. En aquesta última, es desencadena l'anomenada CS que causa un estat hiperinflamatori i l'activació del sistema de coagulació. En les dues primeres fases s'empren majoritàriament tractaments antivirals i teràpies basades en anticossos, mentre que a la fase pulmonar, s'utilitzen tractaments antiinflamatoris i teràpies immunomoduladores⁷⁸.

La crisi sanitària global causada per la pandèmia de COVID-19 exigia el descobriment urgent de teràpies eficaces, cosa que va conduir a la utilització de molècules experimentals de nou desenvolupament i a la reutilització de fàrmacs existents per a altres indicacions. En aquest context, l'Agència Europea del

Medicament (EMA) va aprovar l'ús precoç de Molnupiravir (Lagevrio) abans d'autoritzar-ne la comercialització⁷⁹ i d'altres medicaments indicats per a l'artritis reumatoide com l'Anakinra (Kineret)⁸⁰, el Tocilizumab (RoActemra)⁸¹ i el Baricitinib (Olumiant)⁸², que tot i presentar poques evidències científiques respecte al tractament de la COVID-19, es van utilitzar en casos de pacients hospitalitzats greus que cursaven amb una resposta inflamatòria extrema. Finalment, cap d'aquests tractaments ha estat aprovat per l'EMA per falta d'efectivitat o seguretat.

Els tractaments per a la COVID-19 aprovats per l'EMA inclouen 2 tractaments antivirals, 4 teràpies d'anticossos monoclonals i 1 tractament antiinflamatori⁸³.

6.1. Teràpies antivirals

Aquests tractaments actuen sobre el SARS-CoV-2, n'inhibeixen la replicació i en redueixen la càrrega viral. Estan indicats en adults amb COVID-19 que no necessiten oxigen suplementari i presenten risc d'evolució a COVID-19 severa.

- Nirmatrelvir/ritonavir (Paxlovid): inhibeix la proteasa NSP5 del virus implicant el processament dels precursors de poliproteïnes⁸⁴.
- Remdesivir (Veklury): desenvolupat prèviament pel tractament de l'Èbola, és un anàleg de l'adenosina trifosfat que quan s'incorpora a l'RNA de nova síntesi del SARS-CoV-2 n'interromp la replicació⁸⁵.

6.2. Anticossos monoclonals

Els anticossos monoclonals han estat dissenyats artificialment per dirigir-se al RBD de la proteïna S del SARS-CoV-2, impedir l'entrada d'aquest a les cèl·lules i la seva replicació, i frenar així la propagació. Aquests anticossos s'administren per via intravenosa i són els següents:

- Regdanvimab (Regkirona): està indicat per al tractament d'adults amb COVID-19 que no requereixen oxigen suplementari i poden progressar a estats més severos de la infecció. És un anticòs monoclonal IgG1 humà recombinant⁸⁶.
- Casirivimab/imdevimab (Ronapreve): està indicat per al tractament d'adults i adolescents a partir de 12 anys, que no requereixen ventilació i poden progressar a fases més greus de la infecció. Són els anticossos monoclonals recombinants IgG1κ i IgG1λ⁸⁷.

- Sotrovimab (Xevudy): amb les mateixes indicacions que l'anterior. És un anticòs monoclonal IgG1⁸⁸.
- Tixagevimab/cilgavimab (Evusheld): està indicat com a profilaxis i tractament en adults i adolescents de més de 12 anys. Els dos són anticossos recombinants monoclonals IgG1κ⁸⁹.

6.3. Teràpia antiinflamatòria

En pacients amb COVID-19 greu, la resposta immunitària descontrolada del cos a la infecció pot provocar una inflamació excessiva i la CS, que causa danys secundaris als teixits i òrgans del pacient. Els corticoesteroides poden reduir aquesta resposta inflamatòria i millorar els símptomes de la COVID-19 en pacients hospitalitzats que requereixen oxigenoteràpia. A partir dels resultats de l'estudi clínic *Recovery*, que va analitzar l'ús de diversos tractaments per a la COVID-19, l'EMA va aprovar l'ús de la dexametasona⁹⁰.

- Dexametasona: està indicada en pacients adults i en adolescents a partir dels 12 anys i amb un mínim de 40 kg de pes que requereixen oxigenoteràpia⁹¹ a partir de l'administració per via oral o intravenosa⁹².

7. Vacunes aprovades per a la COVID-19

La vacunació de la COVID-19 ha estat un dels passos fonamentals per frenar la propagació del SARS-CoV-2 a tot el món. Tot i que les mesures de salut pública, com el confinament i l'ús de mascaretes han estat efectives, les vacunes han tingut un paper clau en la resolució de l'epidèmia. Els esforços extraordinaris de la comunitat científica han permès desenvolupar diferents vacunes en un temps rècord. Malgrat tot, les desigualtats econòmiques, les limitacions en la producció i la falta d'accés als recursos per a la vacunació han generat una distribució desigual⁹³.

A la Unió Europea (UE), l'EMA ha autoritzat l'ús de 8 vacunes i 4 vacunes adaptades per a prevenir la infecció de SARS-CoV-2. Les vacunes adaptades són vacunes modificades per proporcionar protecció immunitària contra l'aparició de noves variants del virus que tenen una major capacitat d'evadir el sistema immune de l'hoste⁹⁴. A la Taula 1 es descriuen les vacunes per a la COVID-19 autoritzades a la UE⁹⁵.

Taula 1. Vacunes per a la COVID-19 autoritzades a la UE

Vacuna	Tipus	Edat recomanada	N° de dosis	Interval de temps entre dosis	Dosi de reforç	Variants	Observacions
Comirnaty (BioNTech i Pfizer)	mRNA de la proteïna S	> 12 anys (30µg)	2	3 setmanes	Després de 3 mesos de la primera vacuna (30µg)	Original	Es pot fer el reforç amb Comirnaty Original/Òmicron BA.1 o Comirnaty Original/Òmicron BA.4-5
		5 – 11 anys (10µg)	2	3 setmanes	Després de 6 mesos de la primera vacuna (10µg)		
		6 mesos – 4 anys (3µg)	3	3 setmanes entre la 1a i la 2a dosi, 8 setmanes entre la 2a i la 3a dosi	/		
Vla2001 (Valneva)	SARS-CoV-2 inactivat	18 – 50 anys (0,5mL)	2	3 setmanes	Després de 8 mesos de completar la 1a vacunació (0,5mL)	Original	El reforç s'ha de fer amb Valneva o una altra vacuna basada en vectors adenovirals
Nuvaxovid (Novavax)	Proteïna S	> 12 anys (0,5mL)	2	3 setmanes	Després de 6 mesos de la 1a vacunació a >18 anys (0,5mL)	Original	El reforç es pot fer amb una vacuna de mRNA o amb vectors adenovirals
Spikevax (Moderna)	mRNA	> 12 anys (100µg)	2	3 setmanes	Després de 3 mesos de completar la 1a vacunació a >12 anys (50µg)	Original	El reforç es pot fer amb una vacuna de mRNA o amb vectors adenovirals
		6 – 11 anys (50µg)					
Vaxzevria (AstraZeneca)	Adenovirus	> 18 anys (0,5mL)	2	Entre 4 i 12 setmanes	Després de 3 mesos després de la 2a dosi (0,5mL)	Original	Es pot utilitzar com a dosi de reforç en pacients vacunats amb vacunes de mRNA
Jcovden (Janssen)	Adenovirus	> 18 anys (0,5mL)	1	-	Després de 2 mesos (0,5mL)	Beta	Es pot utilitzar com a dosi de reforç en pacients vacunats amb vacunes de mRNA
VidPrevtyn Beta (Sanofi Pasteur)	Proteïna S	> 18 anys (0,5mL)	1	-	Després de 4 mesos (0,5mL)	Beta	Es pot utilitzar com a dosi de reforç en pacients vacunats amb vacunes de mRNA
Bimervax (HIPRA)	Proteïna S	> 16 anys (0,5mL)	1	-	Després de 6 mesos (0,5mL)	Alfa i Beta	Es pot utilitzar com a vacuna de reforç en pacients vacunats amb vacunes de mRNA
Vacunes adaptades							
Comirnaty Original/Òmicron BA.1	mRNA	> 6 mesos (0,3mL)	Autoritzades només en persones que ja han rebut una 1a vacunació contra la COVID-19		Després de 3 mesos de la 1a vacunació en persones > 12 anys (0,3mL)	Original i Òmicron BA.1	-
Comirnaty Original/Òmicron BA.4-5	mRNA	> 6 mesos (0,3mL)	Autoritzades només en persones que ja han rebut una 1a vacunació contra la COVID-19		Després de 3 mesos de la 1a vacunació en persones > 12 anys (0,3mL)	Original i Òmicron BA.4-5	-
Spikevax bivalent Original/Òmicron BA.1	mRNA	> 6 mesos (0,5mL)	Autoritzades només en persones que ja han rebut una 1a vacunació contra la COVID-19		Després de 3 mesos de la 1a vacunació en persones > 6 anys (0,5mL)	Original i Òmicron BA.1	-
Spikevax bivalent Original/Òmicron BA.4-5	mRNA	> 6 mesos (0,5mL)	Autoritzades només en persones que ja han rebut una 1a vacunació contra la COVID-19		Després de 3 mesos de la 1a vacunació en persones > 12 anys (0,5mL)	Original i Òmicron BA.4-5	-

Abreviatures: mRNA, àcid ribonucleic missatger.

8. Efectes del SARS-CoV-2 al sistema respiratori i patogènesi de la pneumònia

L'ARDS és la principal malaltia pulmonar de la COVID-19 i es caracteritza per la presència d'un increment de la permeabilitat epitelial i endotelial, vessaments de fluids a l'interstici pulmonar, defectes en l'intercanvi gasós, dany alveolar difús, presència de membranes de hialina, hipòxia i fallada respiratòria⁹⁶.

Primerament, la infecció i la replicació del SARS-CoV-2 es produeixen localment a l'epiteli sinonasal, concretament a les cèl·lules mucoses secretores i ciliades⁹⁷. La infecció de les cèl·lules de la cavitat nasal no desencadena una resposta immune significativa i es correspon amb la fase d'incubació de la malaltia en la qual l'individu infectat és asimptomàtic però transmissor del virus⁹⁸. La fase simptomàtica de la infecció es produeix al tracte respiratori superior i es manifesten símptomes de febre, tos i malestar. Es desencadena una resposta immunitària basada en l'alliberació de la quimiocina amb motiu C-X-C lligand 10 (CXCL10) i d'interferons (IFN- α i IFN- λ) que en la majoria dels pacients pot contenir l'avenç de la infecció⁹⁹. Només un 20% dels pacients entren a la fase pulmonar en què el virus envaeix el tracte respiratori inferior i es manifesten els símptomes greus de la malaltia. El virus infecta les cèl·lules AT2 que alliberen citocines i marcadors inflamatoris i finalment moren per piroptosi. Paral·lelament, les cèl·lules immunes són atretes als alvèols per gradients de quimiocines i incrementen la magnitud de la resposta inflamatòria que desencadena la CS, que és un estat d'hiperinflamació generalitzat i altament patològic que es caracteritza per un augment de citocines proinflamatòries com la IL-6, la IL-4 i el TNF- α ¹⁰⁰. Aquest estat patogènic provoca alteracions a l'intercanvi gasós alveolar i l'aparició de pneumònia que pot progressar a ARDS i conduir eventualment a una fallada multiorgànica i a la mort del pacient¹⁰¹.

La fisiopatologia de la pneumònia de la COVID-19 és causada per la desregulació del sistema renina-angiotensina (RAS) i el sistema cal·licreïna-cinina (KAS), i l'aparició de la CS.

8.1. Desequilibri en els receptors ACE i ACE2 del sistema RAS

L'ACE2, a més de tenir un paper clau en l'entrada del SARS-CoV-2 a les cèl·lules del cos, actua com un enzim regulador del RAS, que és un sistema hormonal i

fisiològic que regula la funció vascular i controla la pressió arterial. Als ronyons, la renina, que és un dels enzims que en forma part, és secretada a la màcula densa en resposta a estímuls nerviosos simpàtics o a concentracions baixes de sodi intratubulars. La renina circula pel torrent sanguini i hidrolitza l'angiotensinogen a angiotensina I (Ang I). Posteriorment, als pulmons l'enzim convertidor de l'angiotensina (ACE) talla l'Ang I a angiotensina II (Ang II). Aquesta és una hormona octapeptídica que pot activar diferents cascades de senyalització intracel·lular visiblement contràries segons el receptor de superfície cel·lular al qual s'uneix¹⁰². Per una banda, l'Ang II es pot unir als receptors d'angiotensina de tipus 1 (AT1R) promovent les funcions fisiològiques clàssiques d'augment de la pressió sanguínia, vasoconstricció i de secreció d'aldosterona, entre d'altres. Concretament als pulmons, l'activació de l'eix AT1R pot causar fibrosi pulmonar, ja que augmenta les espècies reactives d'oxigen (ROS)¹⁰³, estimula la producció de factor de creixement transformant beta (TGF- β) que és una citocina clau per a la fibrogènesi¹⁰⁴ i indueix el creixement cel·lular i la proliferació de fibroblasts produint una acumulació de matriu extracel·lular¹⁰⁵. A més, també incrementa la permeabilitat vascular i pot causar edemes pulmonars¹⁰⁶ i, finalment, l'apoptosi de les cèl·lules alveolars epitelials¹⁰⁷. Per aquesta raó, medicaments que inhibeixen la via Ang II/AT1R s'han proposat per al tractament de la fibrosi pulmonar¹⁰⁸. Alternativament, l'Ang II pot unir-se als receptors d'angiotensina de tipus 2 (AT2R) que actuen com a mecanisme de compensació de la via anterior promovent la vasodilatació i la natriuresi i disminuint la pressió arterial¹⁰⁹.

L'ACE2 participa al RAS a partir del clivatge de l'Ang I a Angiotensina 1-9 i l'Ang II a l'angiotensina 1-7 (Ang 1-7). L'Ang 1-7 és el lligand del receptor MAS (MASR) acoblat a proteïnes G que actua com un mecanisme protector i compensatori dels AT1R, ja que promou la vasodilatació, l'antiproliferació, la protecció vascular i la inhibició de l'estrès oxidatiu¹¹⁰. L'Ang 1-7 als pulmons inhibeix la via NF- κ B i disminueix el nombre de cèl·lules immunes al líquid broncoalveolar, reduint la inflamació¹¹¹, i suprimeix significativament l'expressió de TGF- β prevenint la fibrosi pulmonar¹¹². S'ha demostrat que una inhibició de l'expressió de l'ACE2 en ratolins amb ARDS augmenta la gravetat de la malaltia, deguda a una major acumulació de neutròfils i un augment de la permeabilitat vascular¹¹³.

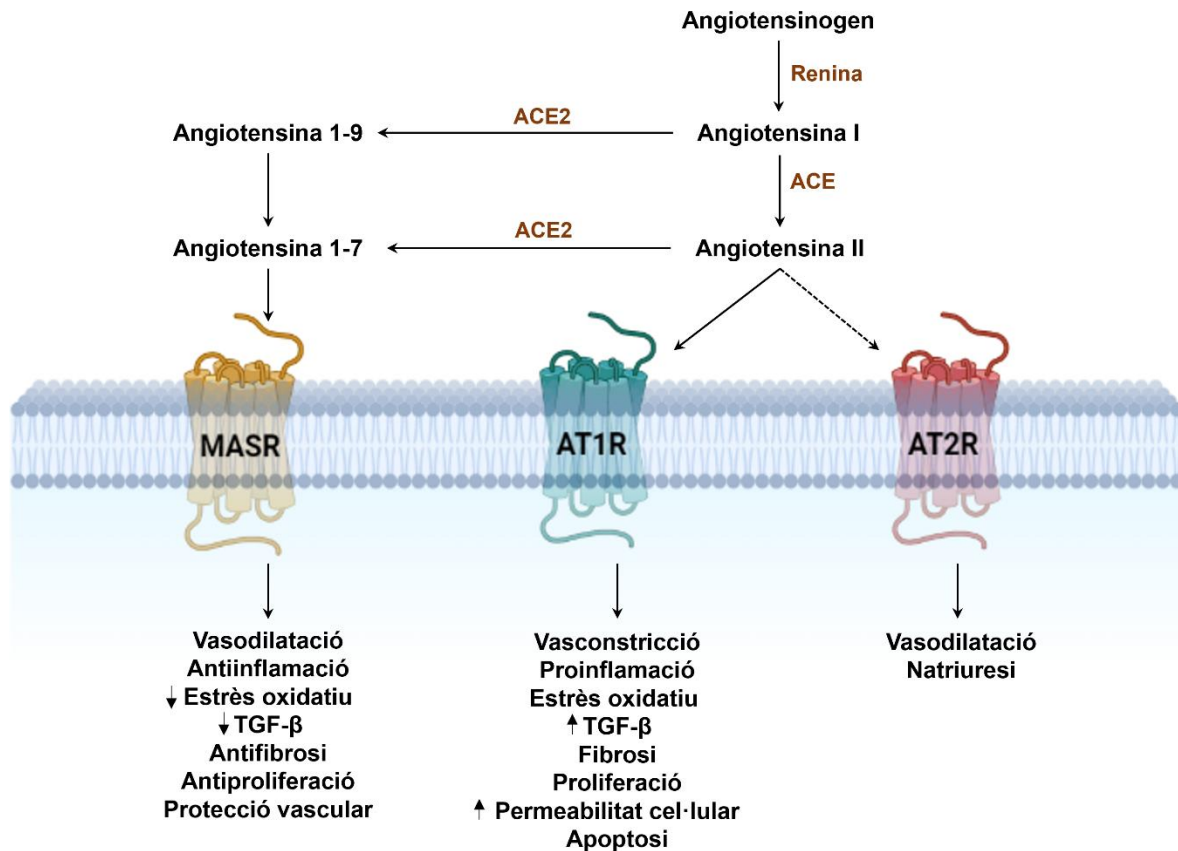


Figura 4. Enzims, substrats i funcions del sistema renina-angiotensina en condicions fisiològiques. *Abreviatures: ACE, enzim convertidor de l'angiotensina; ACE2, enzim convertidor de l'angiotensina II; AT1R, receptors d'angiotensina de tipus 1; AT2R, receptors d'angiotensina de tipus 2; MASR, receptor MAS; TGF-β, factor de creixement transformant beta.*

La infecció per SARS-CoV-2 no només utilitza l'ACE2 com a porta d'entrada a les cèl·lules del cos, sinó que és capaç de reduir-ne l'expressió a les membranes cel·lulars per diferents mecanismes. Aquests inclouen la internalització del complex SARS-CoV-2/ACE2 en el procés de fusió de les membranes¹¹⁴⁻¹¹⁶, l'increment de l'activitat de la proteasa ADAM17 que es troba a la superfície de les cèl·lules epitelials alveolars i talla el domini extracel·lular d'ACE2¹¹⁷ i finalment, l'activació de senyals intracel·lulars, induïdes per la proteïna S del virus, que causen la degradació del mRNA de l'ACE2¹¹⁸. Aquesta disminució dels receptors ACE2 a la superfície cel·lular provoca un augment significatiu de l'Ang II¹¹⁹ i la pèrdua del balanç protector entre les vies Ang 1-7/MASR i Ang II/AT1R. Aquest desequilibri del sistema RAS és el responsable de gran part de la fisiopatologia de la COVID-19, com per exemple, l'augment de la permeabilitat cel·lular que causa la formació d'edemes i l'aparició de trombosi^{120,121}. A més, l'Ang II també promou la resposta

inflamatòria, ja que indueix el reclutament de leucòcits a través d'una sobrerregulació d'E-selectina, P-selectina, interleucina 8 (IL-8) i quimiocina amb motiu C-C lligand 2 i 5 (CCL2 i CCL5) a les cèl·lules endotelials (EC)¹²², i també pot activar els receptors de tipus toll 4 (TLR4) a diverses cèl·lules estímulant la resposta immune innata¹²³, incrementant així la inflamació i el dany pulmonar.

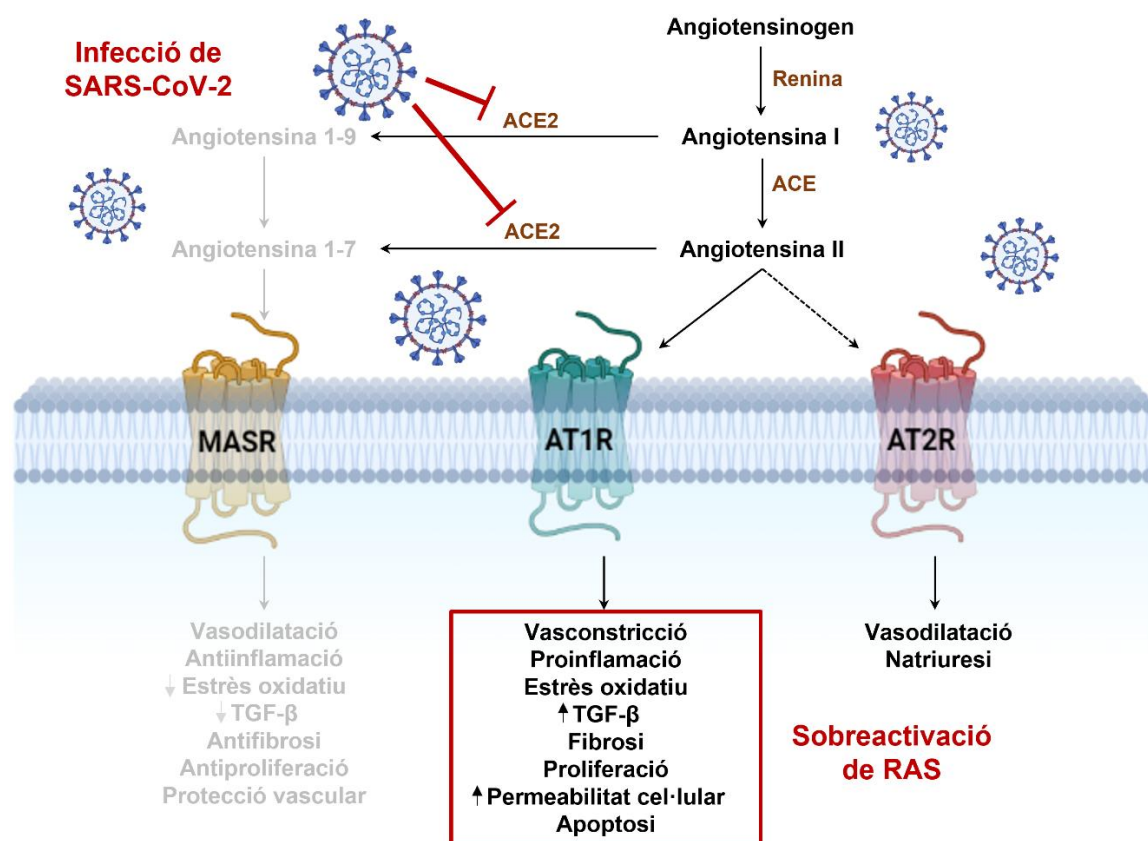


Figura 5. Enzims, substrats i funcions del sistema renina-angiotensina durant la infecció del SARS-CoV-2, que causa patologia pulmonar diversa. *Abreviatures:* ACE, enzim convertidor de l'angiotensina; ACE2, enzim convertidor de l'angiotensina II; AT1R, receptors d'angiotensina de tipus 1; AT2R, receptors d'angiotensina de tipus 2; MASR, receptor MAS; RAS, sistema renina-angiotensina; TGF- β , factor de creixement transformant beta.

8.2. Activació del sistema cal·licreïna-cinina (KKS)

El KSS és un altre sistema, que juntament amb el RAS, manté l'homeòstasi vascular i participa en la reparació tissular i la inflamació. Durant la infecció del SARS-CoV-2, però, es produeixen alteracions patològiques al KSS¹²⁴.

El precursor del KSS és el cininogen que se sintetitza majoritàriament al fetge en condicions basals, o a l'epiteli alveolar en condicions inflamatòries, i s'allibera a la

sang. Aquest precursor es classifica segons el seu pes molecular, sent el cininogen d'alt pes molecular (HMWK) el més rellevant al KSS¹²⁵. El HMWK es processa a bradiginina (BK) pels efectes de la proteasa cal·licreïna dels teixits¹²⁶. La BK és el primer metabòlit bioactiu del sistema i s'uneix als receptors B2 (BKB2R) que s'expressen constitutivament a diversos teixits, com per exemple, a les EC. Aquests receptors promouen la vasodilatació i la reducció de la pressió arterial, així com l'increment de la permeabilitat vascular i el reclutament de neutròfils, molt rellevant en la patogènesi de la COVID-19¹²⁷. També s'ha observat que l'activació dels BKB2R promou l'expressió de proteïnes procoagulants i antifibrinolítiques¹²⁸. Pels seus amplis efectes, cal que la seva degradació estigui estrictament regulada per evitar possibles efectes patològics. La carboxipeptidasa M (CPM) que es troba àmpliament expressada a la membrana de diversos tipus cel·lulars i la carboxipeptidasa N (CPN) del plasma s'encarreguen de degradar la BK a des-Arg9-bradiginina (DABK), que s'uneix a un altre tipus de receptor del KSS anomenat receptor B1 (BKB1R)¹²⁹. Les funcions d'aquest són similars al BKB2R, i està relacionat amb l'expressió de gens vinculats al sistema immunitari i la inflamació, amb la migració dels neutròfils i amb la infiltració tissular dels macròfags¹³⁰.

La degradació de la BK i DABK als òrgans depèn dels enzims ACE i ACE2, respectivament, que retornen el KSS al seu estat fisiològic després de la seva activació¹³¹. La reducció de l'expressió d'ACE2 per la COVID-19 pot activar de manera descontrolada diverses cascades de senyalització, resultant en l'aparició de manifestacions clíniques patològiques. Per una banda, es dificulta la degradació fisiològica de DABK per la disminució de l'expressió d'ACE2¹¹⁴, i per l'altra, la infecció de SARS-CoV-2 provoca un augment de BK al plasma. Tot i que es desconeixen les causes d'aquest fenomen, diversos estudis demostren que el líquid broncoalveolar dels pacients amb COVID-19 greu presenten uns nivells més elevats de BK¹³² i de cininogen^{133,134}. L'augment de DABK sobreactiva els BKB1R que indueixen l'alliberació de superòxid i l'aparició d'estrès oxidatiu¹³⁵ i un augment de la secreció de quimiocines proinflamatòries, com la CXCL1, CXCL2 i CXCL5, i de TNF- α que es tradueix en una major infiltració de neutròfils als pulmons i un increment de la inflamació¹³⁶. En paral·lel, l'activació dels BKB2R també promou la resposta inflamatòria, ja que indueix l'expressió d'IL-6¹³⁷, i l'aparició d'estrès oxidatiu per l'alliberació d'òxid nítric (NO)¹³⁸ i superòxid a les EC¹³⁹. A més, Shariat-

Madar *et al.* demostren que la deficiència del receptor BKB2R redueix el risc de trombosi, suggerint que la sobreactivació d'aquest receptor causada per la COVID-19 podria induir un efecte proinflamatori i protrombòtic¹⁴⁰.

La sobreactivació del KSS causada per la COVID-19, ha estat anomenada tempesta de bradicinines¹³⁹ i pot explicar una gran part de les manifestacions clíniques de la COVID-19, inclosos l'increment de la permeabilitat vascular que condueix a la formació d'edemes, a la inflamació¹⁴¹, a un major risc de trombosi, i a l'augment de la vasodilatació que provoca hipotensió, característica dels pacients amb COVID-19 crítica¹⁴².

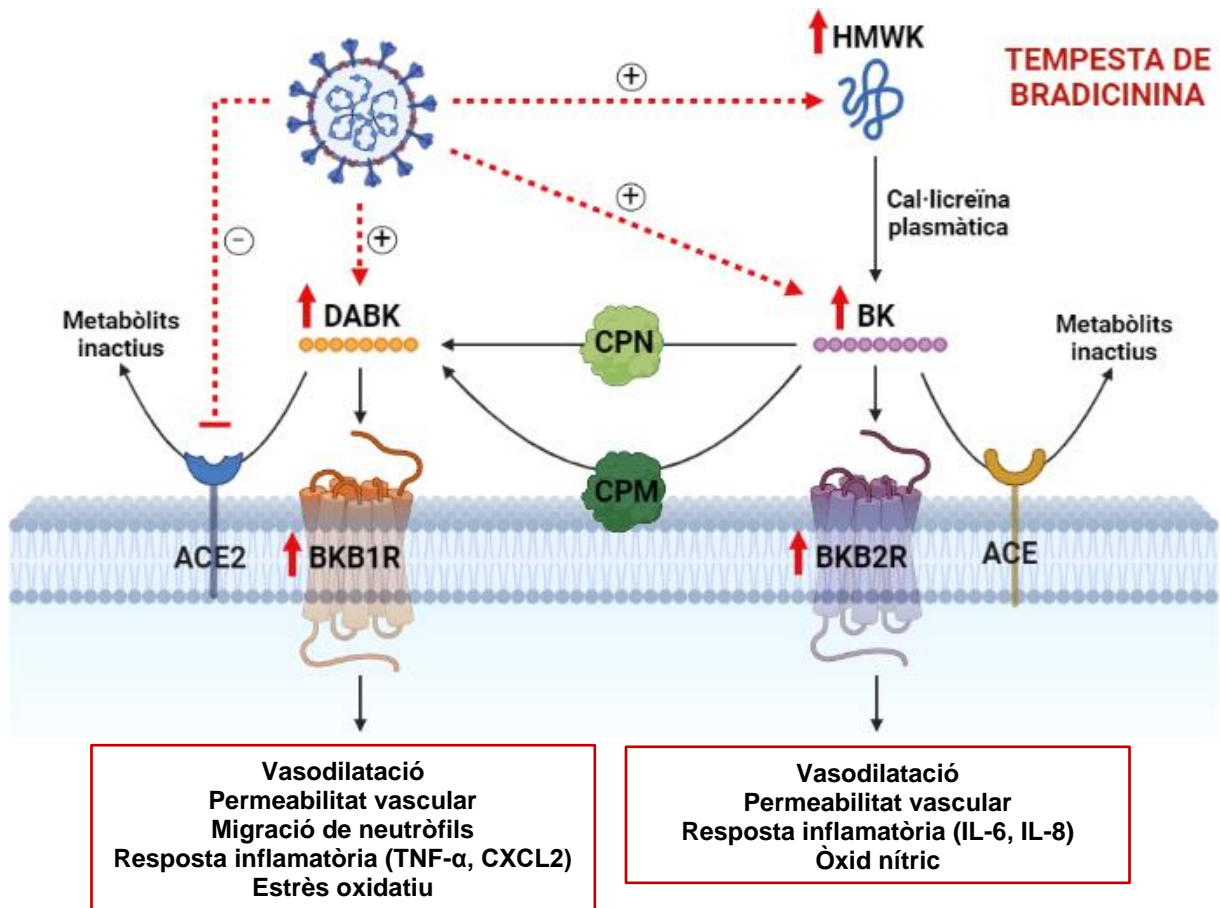


Figura 6. Desregulació del sistema cal·licreïna-cinina causada per la infecció del SARS-CoV-2. Abreviatures: ACE, enzim convertidor de l'angiotensina; ACE2, enzim convertidor de l'angiotensina II; BK, bradicinina; BKB1R, receptor de bradicinina B1; BKB2R, receptor de bradicinina B2; DABK, des-Arg9-bradicinina; CPM, carboxipeptidasa M; CPN, carboxipeptidasa N; CXCL2, quimiocina amb motiu C-X-C 2; HMWK, cininogen d'alt pes molecular; IL, interleucina; TNF-α, factor de necrosi tumoral alfa.

8.3. Immunopatologia i inflamació als pulmons en els casos de COVID-19 severa

Marcadors d'inflamació elevats en sang, com per exemple la CRP, la ferritina i el dímer D, així com un increment en la ràtio neutròfil/limfòcit i la presència de citocines i quimiocines proinflamatòries, s'han associat amb una major severitat i mortalitat per la COVID-19¹⁴³.

Els factors causants de la patologia severa de pulmó que s'observa a la COVID-19 són molt complexos i actualment encara estan sent estudiats. Els diversos mecanismes que hi participen inclouen la mort de les cèl·lules epitelials alveolars a causa de la infecció per SARS-CoV-2, el retard en la resposta d'IFN de l'hoste que propicia una replicació viral descontrolada, i l'alliberació de patrons moleculars associats a patògens (PAMP) i a dany (DAMP) que afavoriran la migració de cèl·lules immunes als pulmons i que induiran un alliberament massiu de citocines i quimiocines. Cada cèl·lula juga un paper característic en la immunopatologia de la COVID-19 severa que serà descrit amb detall en els següents apartats.

8.3.1. Cèl·lules epitelials alveolars

Les dues cèl·lules epitelials principals que recobreixen els alvèols són les cèl·lules alveolars de tipus 1 (AT1) i de tipus 2 (AT2). L'anàlisi d'expressió del gen ACE2 en diferents tipus de cèl·lules provinents de pulmó sa i adult han revelat que el 83% de les cèl·lules que expressen el gen ACE2 són cèl·lules AT2, seguides de EC, fibroblasts, macròfags i finalment les cèl·lules AT1¹⁴⁴. No només l'expressió d'ACE2 és important per a l'entrada del SARS-CoV-2 a les cèl·lules sinó també la de TMPRSS2. L'elevada coexpressió d'ambdós a les cèl·lules AT2 fa que aquestes siguin molt sensibles a la infecció¹⁴⁵. Les cèl·lules AT2 sintetitzen surfactant pulmonar, tenen funció immunològica, ja que alliberen citocines i quimiocines^{146,147}, promouen el desenvolupament i el manteniment dels macròfags pulmonars^{148,149} i participen en la renovació i reparació de l'epiteli alveolar¹⁵⁰.

Un model *in vitro* de cèl·lules AT2 de pulmó ha demostrat que l'entrada del SARS-CoV-2 produeix un canvi cap a un patró transcriptòmic proinflamatori, caracteritzat per una sobrerregulació de la senyalització de NF-κB i una pèrdua d'expressió de gens relacionats amb la producció de surfactant¹⁵¹. A més, també s'ha observat mitjançant talls de pulmó post mortem de pacients amb COVID-19, que el virus

causa la mort cel·lular de les cèl·lules AT2¹⁵². El virus indueix tant l'apoptosi, per un augment de la proteïna assassina ovàrica BCL-2¹⁵³ i de la caspasa-8, que regula l'augment de l'expressió de les citocines proinflamatòries IL-7, IL-8, TNF- α , CXCL10 i CCL5¹⁵⁴, com la piroptosi¹⁵⁵. La piroptosi és una forma de mort cel·lular programada que s'activa amb l'objectiu d'eliminar les cèl·lules infectades i frenar la propagació viral. Aquesta es caracteritza per la formació de porus a la membrana cel·lular que permeten l'alliberació de citocines i diversos DAMP, i per l'assemblatge de l'inflamasoma NLRP3 al citoplasma. El NLRP3 és una estructura multiproteica que activa la caspasa-1 i que processa diverses proteïnes precursors, com la pro-IL-1 β i la pro-IL-18, per convertir-les en les seves formes actives i secretables¹⁵⁶. Aquestes dues citocines són marcadors d'inflamació pulmonar i han estat associades amb un pitjor pronòstic de la COVID-19¹⁵⁷.

La depleció de les cèl·lules AT2 causa, per una banda, una disminució de la producció de surfactant, que és un líquid format per proteïnes i lípids que redueix la tensió superficial a la interfície aire-líquid, preveu el col·lapse alveolar i manté la barrera alveolo-capil·lar¹⁵⁸. Per altra banda, dificulta la reparació del dany pulmonar i pot acabar produint fibrosi pulmonar¹⁵⁹, que és la seqüela més severa en els supervivents de la COVID-19¹⁶⁰. Conseqüentment, la destrucció de les cèl·lules AT2 condueix a la pèrdua de la funció pulmonar i pot provocar una fallada respiratòria, i a més, causa l'alliberació de citocines i quimiocines que indueix la migració i l'activació de diverses cèl·lules del sistema immune als alvèols.

8.3.2. Monòcits

Les cèl·lules alveolars epitelials infectades pel SARS-CoV-2 alliberen quimioatracients, com la CCL2 i la CCL7, que indueixen la migració dels monòcits circulants cap als pulmons¹⁶¹. Un cop allà, i en presència de citocines proinflamatòries, els monòcits es diferencien a macròfags derivats de monòcits (mo-AM) a partir de l'activació de diverses vies de senyalització, com les vies janus quinasa i de l'activador de la transcripció STAT. A la vegada, les NK i les cèl·lules T que també migren als pulmons, alliberen factors estimulants de colònies de granulòcits (G-CSF) i macròfags (GM-CSF), TNF- α i IFN- γ que incrementaran el reclutament i l'activació de més mo-AM¹⁶².

La COVID-19 greu produeix canvis fenotípics funcionals en els monòcits. Específicament, s'ha observat un augment de les poblacions de monòcits més proinflamatoris en pacients hospitalitzats o a l'UCI¹⁶³. Els mecanismes subjacents a aquests canvis encara estan sent estudiats, però s'ha demostrat que els monòcits poden ser infectats pel SARS-CoV-2 a partir d'una via independent a ACE2, facilitada pels receptors CD16a i CD64. Un cop el SARS-CoV-2 entra a aquestes cèl·lules, activa l'inflamasoma NLRP3 que promou la secreció de citocines proinflamatòries i provoca la piroptosi, contribuint així a l'hiperinflamació^{164,165}. Per aquesta raó, molècules relacionades amb l'activació de l'inflamasoma i la piroptosi, com la LDH, s'han associat a una major severitat¹⁶⁶.

A més, els monòcits han estat associats amb l'aparició de micro i macrotrombes en venes i artèries, patologia que ha rebut el nom de coagulopatia associada a la COVID-19 (CAC)¹⁶⁷. Hi ha diverses causes involucrades en aquesta patologia i una d'elles són alteracions al factor de teixit (TF), que és una glicoproteïna transmembrana que es troba a les EC vasculares i que també es pot expressar a les cèl·lules mononuclears en un context inflamatori, com a resposta a la IL-6. El TF permet iniciar la cascada extrínseca de coagulació de la sang que finalment provoca la formació de coàguls¹⁶⁸. En els casos de COVID-19 greu, es produeix l'activació de les plaquetes deguda a un increment dels mediadors proinflamatoris i procoagulants circulants al plasma, com el fibrinogen i la CRP. La seva activació augmenta l'expressió de P-selectina que permet l'adhesió entre elles i la formació d'agregats amb monòcits, en els que s'indueix la sobreexpressió de TF¹⁶⁹. Aquest augment de TF als monòcits s'associa amb una major mortalitat en pacients amb COVID-19 severa¹⁷⁰, ja que, juntament amb el TF expressat a les EC vasculares, causa la coagulació de la sang i la simptomatologia del CAC¹⁶², tal com confirmen uns nivells elevats de dímer D a la sang¹⁷¹.

8.3.3. Macròfags alveolars

Els macròfags són una peça clau en la resposta immune innata contra els patògens invasors. A partir del reconeixement d'antígens microbians i en resposta a citocines que els estimulen, els macròfags incrementen la producció d'altres citocines, inclosos, TNF- α , IL-1 i NO, que tenen propietats antimicrobianes. També poden modular el sistema immune adaptatiu, ja que secreten IL-12 i IL-23 que regulen la diferenciació i l'expansió de cèl·lules T auxiliars de tipus 1 (Th1) i 17(Th17)¹⁷². Per

últim, participen en el manteniment de la salut dels teixits a partir de coordinar la reparació tissular¹⁷³.

Tot i això, la nomenclatura i la caracterització dels macròfags ha estat motiu de controvèrsia en els últims anys a la comunitat científica¹⁷⁴. En un intent de classificar els diferents estats d'activació dels macròfags, Mills *et al.* van publicar l'any 2000, un article definint el paradigma de la polarització dels macròfags de tipus 1 (M1) i de tipus 2 (M2), en funció de les seves diferències en el metabolisme energètic cel·lular i funcions. Per una banda, van definir que els macròfags M1 o tradicionalment coneguts com a “macròfags clàssicament activats”, s'activen per lipopolisacàrid (LPS), IFN- γ i TNF- α i augmenten l'expressió de la forma induïble de la sintasa d'òxid nítric (iNOS) que alliberarà NO, incrementen la secreció de TNF- α i altres citocines i promouen l'activació de cèl·lules Th1. També, els macròfags proinflamatoris alliberen superòxid a partir de l'expressió i l'activació de les NADPH oxidases¹⁷⁵, promovent així l'estrès oxidatiu¹⁷⁶. Per altra banda, els macròfags M2 o “macròfags alternativament activats”, s'activen per IL-4 i IL-13, presenten un fenotip antiinflamatori i participen en l'activació de cèl·lules Th2 i la regeneració tissular¹⁷⁷. Diversos estudis han demostrat que aquesta classificació dicotòmica és una simplificació i que és només aplicable *in vitro*, quan els diferents estímuls poden ser controlats. *In vivo*, els macròfags no presenten només una funció específica sinó una progressió de canvis fenotípics i funcionals en resposta a les fluctuacions constants del microambient on es troben¹⁷⁸.

Cal tenir en compte aquesta variabilitat fenotípica per entendre els efectes de la infecció de SARS-CoV-2 en les funcions dels macròfags¹⁷⁹. A més, la població de macròfags als pulmons és heterogènia i cada tipus de macròfag presenta unes característiques determinades. Als pulmons hi ha tres poblacions majoritàries de macròfags, els macròfags alveolars (AM), que es troben dins del compartiment alveolar i que es classifiquen en AM residents al teixit (TR-AM) o AM derivats de monòcits (Mo-AM), i els macròfags intersticials, que abunden a l'epiteli microvascular i a la zona epitelial alveolar¹⁸⁰. Els TR-AM actuen com a vigilants per a mantenir l'equilibri immune i tenen una capacitat de resposta baixa a estímuls, mentre que els Mo-AM, provenen de monòcits que migren als alvèols guiats pel gradient de quimiocines i, tot i que presenten una plasticitat funcional que depèn majoritàriament del microambient pulmonar, són molt més reactius¹⁸¹. En absència

de dany o estímuls inflamatoris, els TR-AM presenten un fenotip majoritàriament antiinflamatori i realitzen la fagocitosi per eliminar xenobiòtics inhalats i mantenir l'homeòstasi¹⁸². En el context d'inflamació aguda, com la que caracteritza la COVID-19 severa, es produeix una pèrdua dels TR-AM per la infecció directa d'aquestes cèl·lules pel virus, que indueix la piroptosi a partir de l'activació de l'inflamasoma NLRP3¹⁶⁵. Els TR-AM seran substituïts pels Mo-AM¹⁸³, que dominaran la població d'AM¹⁸⁴ i adoptaran un fenotip fortament proinflamatori¹⁸¹. Quan els Mo-AM arriben al compartiment alveolar s'activen a través de la unió dels seus receptors de reconeixement de patrons (PRR) amb els PAMP, els DAMP i les citocines proinflamatòries alliberades per les cèl·lules alveolars AT2 piroptòtiques. Aleshores s'activaran diverses cascades de senyalització intracel·lulars que promouran l'alliberació de citocines i quimiocines com la IL-6, IL-8, TNF- α , CCL2, CCL3, CCL4 i CXCL10^{185,186} i induiran la formació de l'inflamasoma NLRP3 amb la consegüent secreció d'IL-1 β i IL-18¹⁸⁷. Aquest ambient tant reactiu i inflamatori incrementarà l'apoptosi de les cèl·lules epitelials alveolars i incrementarà el dany pulmonar¹⁸⁸. Els pacients amb COVID-19 severa i pneumònia presenten un perfil característic de citocines sistèmiques causat per la CS, com el que s'observa a la síndrome d'activació de macròfags (MAS)¹⁶². Aquesta consisteix en un estat d'hiperinflamació que es caracteritza per una hiperactivació anòmala i descontrolada dels macròfags que alliberen quantitats massives de citocines, com la IL-6, IL-7 i TNF- α i quimiocines inflamatòries, com la CCL2, CCL3 i CXCL10¹⁸⁹. La IL-6 alliberada pels macròfags juga un paper clau a la CS, ja que estimula la secreció d'altres citocines proinflamatòries i la diferenciació de les cèl·lules Th17 i de les cèl·lules T CD8+ efectores. A més, incrementa la permeabilitat de les EC dels capil·lars pulmonars promovent una major migració de cèl·lules immunes als alvèols¹⁹⁰.

En resum, el grau de severitat de la COVID-19 es veurà influenciat per la distribució poblacional d'AM als pulmons durant la infecció i per la presència de MAS. Tant els macròfags com els monòcits tenen un paper clau en la CS que acabarà conduint a dany tissular, disfunció sistèmica i l'aparició d'ARDS en els casos més greus.

8.3.4. Neutròfils

Els neutròfils formen part de la resposta immune innata i juguen un paper clau en la defensa immediata contra microorganismes. Aquestes cèl·lules fagociten els

microbis que són eliminats dins de grànuls citoplasmàtics i formen les trampes extracel·lulars de neutròfils (NET) que són estructures extracel·lulars de cromatina provinents del nucli que permeten immobilitzar i liquidar patògens¹⁹¹.

Els neutròfils participen en la fisiopatologia de la COVID-19, i les directrius clíniques coincideixen en utilitzar-los com a indicadors pronòstics de gravetat. Una major severitat ha estat relacionada amb un augment dels neutròfils a l'epiteli nasofaringi, als pulmons, al líquid broncoalveolar i a la sang¹⁹² i amb un increment de la ràtio neutròfil/limfòcit¹⁹³. A més, durant la infecció de SARS-CoV-2 es produeix un desequilibri en els diferents subgrups de neutròfils i un increment del nombre de neutròfils immadurs a la sang en els casos greus¹⁹⁴.

En la COVID-19, els neutròfils circulants migren per quimiotaxis cap als pulmons¹⁹⁵ on s'activen en resposta a citocines, com la IL-8 i altres PAMP, i comencen la fagocitosi del SARS-CoV-2, la desgranulació de mieloperoxidasa i elastasa i l'alliberació de ROS a través de l'activació de la NADPH oxidasa¹⁹⁶. Loyer *et al.* van observar que els neutròfils de pacients amb COVID-19 presenten una major expressió de CD11b, que és un marcador d'activació. Aquesta hiperactivació es tradueix en una major desgranulació, en la formació d'agregats entre neutròfils i plaquetes contribuint a la formació de microtrombes i a una major concentració de P-selectina i E-selectina solubles a la sang¹⁹⁷, que són marcadors de dany endotelial i inflamació vascular^{198,199} i una de les manifestacions clíniques de la COVID-19 aguda²⁰⁰. Més enllà de la hiperactivació, també s'ha observat una major migració dels neutròfils en pacients amb COVID-19²⁰¹, facilitada per un increment de l'expressió de molècules d'adhesió com la MAC-1²⁰² i per la pèrdua de funció de les NK, tal i com es descriurà a continuació.

Els neutròfils en la COVID-19 presenten una dualitat de funcions, ja que, per una banda, poden limitar la progressió del SARS-CoV-2, però per l'altra, la producció de NET, la secreció d'enzims proteolítics i l'alliberació de ROS, indueixen processos immunològics i inflamatoris que poden causar lesions agudes i conduir a l'aparició d'ARDS²⁰³. Malgrat això, la funció del neutròfil que més s'ha associat amb la fisiopatologia de la COVID-19 és la síntesi de NET²⁰⁴ que acaba causant la seva mort en un procés anomenat NETosi²⁰⁵. Les NET estan associades amb el marcador d'inflamació alveolar IL-8 en pacients amb pneumònia²⁰⁶, causen citotoxicitat i la mort de les cèl·lules alveolars epitelials i endotelials²⁰⁷, i en alguns

casos, poden produir processos d'autoimmunització¹⁸⁷. A més, les NET poden formar-se als vasos sanguinis provocant la seva oclusió i causant trombosi microvascular²⁰⁸, característica de la COVID-19 crítica²⁰⁹.

La formació de ROS per part dels neutròfils ha estat motiu de controvèrsia. Alguns autors defensen que es veu significativament reduïda en pacients amb COVID-19 greu^{197,201}, així com l'activitat fagocítica²¹⁰, fenomen que explicaria el nombre significatiu d'infeccions bacterianes secundàries a la COVID-19. Les causes d'aquest fenomen són desconegudes, però s'hipotetitza que podria ser degut a una migració massiva de neutròfils immadurs als pulmons. Contràriament, hi ha autors que demostren que en la COVID-19, els neutròfils presenten una major producció de ROS²¹¹ i que l'estrès oxidatiu que se'n deriva magnifica la resposta immunopatològica i condueix a l'aparició d'hipòxia i fallada respiratòria. A més, les ROS poden afectar l'estabilitat de la membrana lipídica i l'estructura dels glòbuls vermells circulants al torrent sanguini, augmentant el risc de trombosi²¹².

8.3.5. Cèl·lules assassines naturals (NK)

Les NK juguen un paper clau en la vigilància immunitària innata contra tot tipus d'infeccions i la majoria de NK són citotòxiques i causen la mort de les cèl·lules diana a partir de l'alliberació de grànuls lítics²¹³, o induint l'apoptosi a partir de la unió de les proteïnes transmembrana TRAIL i FASL amb els seus receptors de membrana²¹⁴. A més, també produeixen citocines com l'IFN- γ , TNF- α i IL-10, factors de creixement com el GM-CSF i G-CSF i quimiocines com la CCL3 i la CCL4 i CXCL1. Finalment, les NK poden millorar la presentació d'antígens a les cèl·lules T per part de les cèl·lules dendrítiques (DC) i modular l'activitat dels macròfags²¹⁵.

Durant la infecció aguda de la COVID-19, s'ha observat que el nombre de NK a la sang perifèrica disminueix, ja que aquestes migren als pulmons atretes per l'alliberació de quimiocines, com la CXCL16¹⁸⁴. Aquesta reducció de NK circulants es correlaciona amb una major severitat²¹⁶ i s'ha vist que retorna als valors normals durant la fase de recuperació del pacient²¹⁷. En els casos de COVID-19 severa s'han observat deficiències en les funcions normals de les NK que limiten el control viral, la producció de citocines i la citotoxicitat²¹⁸. Als pulmons, les NK s'activen segons un balanç entre senyals activadores o inhibidores que es troben a altres

cèl·lules i s'uneixen als seus receptors, per la presència de citocines com la IL-12, IL-18, IL-15 i IFN i finalment, a partir de l'activació dels TLR²¹⁹. En general, el SARS-CoV-2 produeix a les NK un augment de l'expressió de receptors inhibitoris i una disminució dels activadors²²⁰. Concretament, en mostres de pacients amb COVID-19 severa, s'ha observat un increment significatiu de l'expressió del receptor de superfície inhibitori NKG2A²²¹, que és degut a un augment de certes citocines als pulmons, com la IL-6²²². Una major expressió del receptor NKG2A limita la secreció normal de citocines com la IL-2, TNF- α , granzims i IFN²²³. En paral·lel, l'ambient proinflamatori que es genera als pulmons causa un excés de l'alliberació d'IL-6 i IL-8 que també redueixen la funció citotòxica de les NK a través de l'activació de la via STAT3 que es relaciona amb una menor expressió de receptors d'activació²²⁴. Tot això causa una disminució de les funcions de les NK i de la secreció d'IFN, que és un component essencial de la defensa antiviral de l'hoste, ja que modula les funcions del sistema immune per a restringir la replicació del virus a les cèl·lules infectades i frenar la seva propagació. A més, l'IFN- γ secretat per les NK activades és d'especial importància en la COVID-19, ja que inhibeix l'acumulació dels neutròfils als pulmons, que és altament patogènica²²⁵. Tot això resultarà en una migració massiva de neutròfils als pulmons atrets per l'ambient hiperinflamatori.

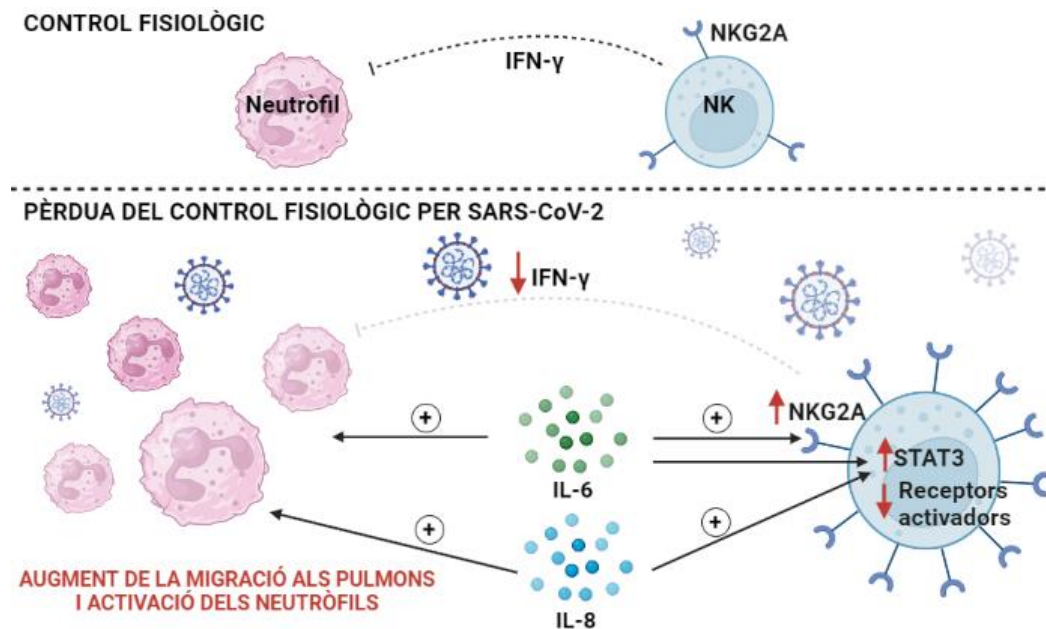


Figura 7. Control fisiològic de la migració dels neutròfils als pulmons per part de les NK i pèrdua de l'homeòstasi durant la COVID-19. Abreviatures: IL, interleucina; IFN- γ , interferó gamma; NK, natural killers.

8.3.6. Cèl·lules dendrítiques (DC)

Les DC inclouen dos tipus cel·lulars principals, les cèl·lules plasmacitoides (pDC) que són cèl·lules especialitzades a produir de manera massiva i ràpida IFN de tipus I, com l'INF- α i l'IFN- β , i les cèl·lules convencionals (cDC) que s'especialitzen en la presentació d'antígens als limfòcits T i es divideixen en tipus 1 (cDC1) i tipus 2 (cDC2). A més, en presència d'un ambient inflamatori, els monòcits poden adoptar la morfologia i la funció de cèl·lules presentadores d'antígens i s'anomenen DC derivades de monòcits (moDC)²²⁶. Les DC tenen PRR a les membranes que reconeixen l'RNA viral i activen diverses cascades de senyalització com la TLR3 i IRF7, implicades en la producció d'IFN I, citocines proinflamatòries com el TNF- α , IL-1 β i IL-6 i quimiocines com la CCL2, CCL3 i CCL4. Aquestes quimiocines reclutaran monòcits i macròfags cap a la zona d'inflamació. Paral·lelament, les DC serveixen de vincle amb el sistema immune adaptatiu, ja que presenten antígens a les cèl·lules T²²⁷.

De manera general, els virus activen l'expressió d'IFN I per part de les pDC al cap de dues hores des de l'inici de la infecció. Als pacients severos i crítics de COVID-19, el SARS-CoV-2 pot evadir el control inicial del sistema immune innat i retardar i limitar la producció d'IFN I de l'hoste. Això farà que les defenses antivirals es vegin minvades i que la càrrega viral incrementi massivament²²⁸. S'hipotetitza que la resposta massiva de citocines en els pacients amb COVID-19 severa pot ser un intent del sistema immune innat per a suplir el retard que es produeix en la seva activació²²⁹.

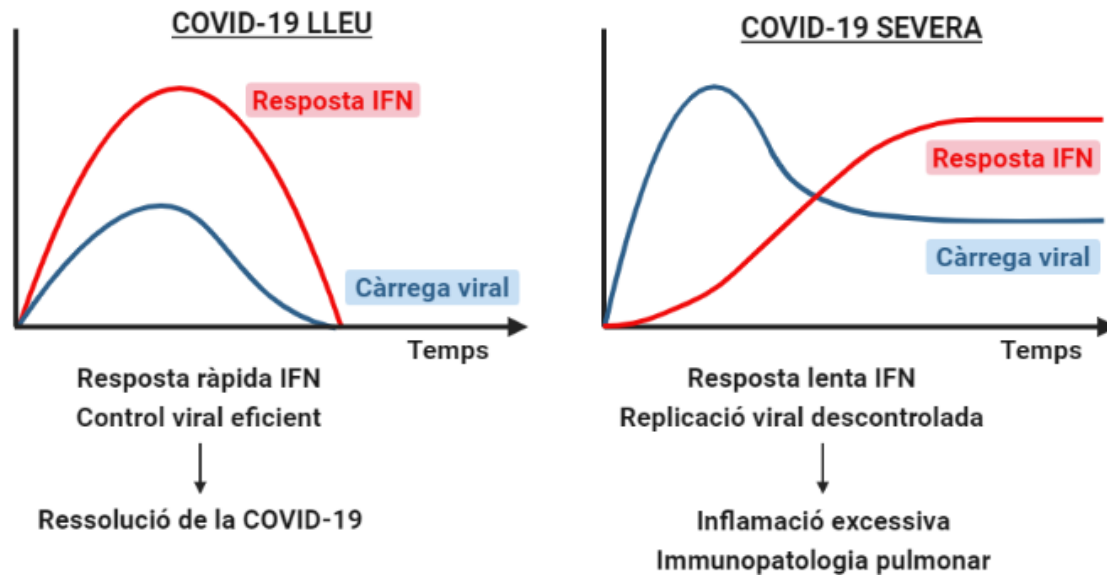


Figura 8. Diferències temporals en la resposta dels IFN en els casos de COVID-19 lleu i COVID-19 severa. En els casos de COVID-19 severa, l'alliberació retardada dels IFN causa una replicació massiva del virus. *Abreviatures: IFN, interferó.* Figura modificada de Park et al.²²⁹

Aquesta disruptió de la resposta dels IFN I en presència de SARS-CoV-2 es deu a canvis en la distribució de la població de DC. En els casos de COVID-19 greu, per una banda, la ràtio de cDC/pDC està significativament augmentada²³⁰ i per l'altra, les DC es veuen atretes cap als teixits pulmonars per les quimiocines alliberades durant la piroptosi de les cèl·lules AT2, però curiosament, només les cDC2 s'hi acumulen, però no les cDC1 o les pDC²²⁷. Això podria explicar perquè el SARS-CoV-2 indueix uns nivells molt baixos d'IFN que s'associen amb altes càrregues virals i una resposta inflamatòria excessiva de la via NF- κ B, que causa l'alliberació massiva de TNF- α i IL-6²²⁸. També s'ha demostrat que mutacions genètiques amb pèrdues de funció que afecten les vies TLR3 i IRF7, relacionades en la inducció dels IFN I, incrementen la severitat de la COVID-19²³¹.

Diversos estudis han estudiat les causes d'aquest fenomen d'evasió del SARS-CoV-2 a la resposta dels IFN. Alguns autors apunten a la disminució del nombre de DC a la sang perifèrica en la fase aguda de la COVID-19 severa²³². També, el SARS-CoV-2 pot infectar les DC intersticials pulmonars, perquè presenten ACE2 i altres receptors facilitadors com el DC-SIGN²³³ i el CD147²³⁴. Tot i que el virus no és capaç de replicar-se en el seu interior, pot alterar les seves funcions. Experiments *in vitro* han demostrat que quan el SARS-CoV-2 infecta les moDC

altera les seves funcions inflamatòries i impedeix l'expressió dels gens d'IFN a partir de la inhibició de STAT1, que és un modulador clau de l'expressió d'IFN. A més, també s'ha observat que el SARS-CoV-2 incrementa l'expressió de CXCL10 a les moDC²³⁵. Els nivells d'IFN I també modulen la resposta de cèl·lules del sistema immune innat, com els monòcits i els neutròfils, a la fase aguda de la infecció. Concretament, els IFN I estimulen els monòcits clàssics, que es veuen augmentats en els casos lleus de COVID-19, mentre que als casos severes, aquesta disminució d'IFN està associada amb una major quantitat de monòcits no-clàssics que són més proinflamatoris i produeixen ROS²³⁶.

Per altra banda, les DC tenen un paper clau en fer de pont entre el sistema immune innat i adaptatiu. Aquestes cèl·lules activen els limfòcits a través de la presentació d'antígens mitjançant el complex major d'histocompatibilitat (MHC)²³⁷. En els casos més severes de COVID-19, el SARS-CoV-2 redueix l'eficiència de la presentació d'antígens de les DC a partir d'induir canvis en l'expressió de les molècules MHC. Concretament, el virus causa una disminució de l'expressió d'HLA-DR, que és un receptor de superfície de tipus MHC II²³⁸ i una reducció de la molècula coestimuladora CD80 i CD86 a la superfície cel·lular, necessària per a l'activació de les cèl·lules T²³⁹. A més, els mateixos IFN- α i IFN- β alliberats per les DC influeixen en la funció de les cèl·lules T CD4+ o CD8+ i milloren la resposta de les cèl·lules B. Per això, la disminució d'INF impedeix una resposta efectora eficient de les cèl·lules T²³⁹. En aquesta línia, algunes metaanàlisis han demostrat que el tractament amb IFN- β en casos de COVID-19 moderada i severa produeix una millora clínica²⁴⁰ i una reducció del risc d'entrada a l'UCI²⁴¹.

8.3.7. Limfòcits

El sistema adaptatiu es constitueix de 3 tipus cel·lulars, les cèl·lules B productores d'anticossos, les cèl·lules T CD4+ amb efectes moduladors i efectors, i les cèl·lules T CD8+ que presenten activitat citotòxica²⁴². En el cas de la COVID-19, la resposta dels limfòcits T es detecta a gairebé totes les infeccions, sent la de les CD4+ major que la de les CD8+. La principal diana antigènica de les cèl·lules T CD4+ i CD8+ és majoritàriament la proteïna S²⁴³.

Tal com s'ha descrit anteriorment, la resposta deficient dels IFN causa un retard en l'activació dels limfòcits T que és compensada per una sobreactivació del sistema

immune innat causant amplis efectes patològics. Generalment, la participació de les cèl·lules T a la lluita contra el SARS-CoV-2 es considera beneficiosa, fins i tot quan la resposta es demora en el temps i és simplement massa tard per poder frenar el dany tissular produït²⁴². Després dels TR-AM, les cèl·lules T són les cèl·lules immunes més nombroses del teixit pulmonar, sobretot les CD8+ i les CD4+ residents de memòria. En la COVID-19, la presència de cèl·lules T als pulmons té un efecte regulador del microambient alveolar que facilita una eliminació ordenada del virus, a la vegada que controla la inflamació²⁴⁴. L'anàlisi del líquid broncoalveolar de pacients amb COVID-19, mostra que els casos severes presenten un menor nombre de cèl·lules T infiltrades als alvèols respecte als pacients moderats¹⁸⁴, que podria ser degut a una disminució dels limfòcits circulants²⁴⁵. La COVID-19 severa es caracteritza per la presència d'eosinopènia i limfopènia amb una reducció de les cèl·lules T CD4+ i CD8+, de les cèl·lules B i de les NK²⁴⁶. Fins a un 63% dels pacients amb COVID-19 crítica presenten limfopènia²⁴⁷ que, entre altres causes, es pot explicar per la infecció directa del SARS-CoV-2 a les cèl·lules T a través d'una via independent d'ACE2²⁴⁸, que causa un augment de l'expressió del receptor de mort programada Fas²⁴⁹, que s'ha correlacionat amb una major apoptosi²⁵⁰.

Més enllà del nombre de limfòcits T, en els casos severes de COVID-19 aquestes cèl·lules es troben altament desregulades, esgotades i/o estancades en estats naïfs²⁵¹. Concretament, en casos de pneumònia s'ha observat un increment dels marcadors de cèl·lules T relacionats amb senescència i extenuació²⁵².

Les cèl·lules T CD4+ específiques per a SARS-CoV-2 es poden detectar entre 2 i 4 dies després de l'aparició de símptomes²⁵³ i s'han relacionat amb una menor severitat de la COVID-19²⁵⁴. Aquestes cèl·lules es poden diferenciar a cèl·lules Th1 que presenten activitat antivírica perquè alliberen IFN- γ ²⁵⁵. També, les CD4+ poden donar lloc a les cèl·lules auxiliars fol·liculars (Tfh) que promouen la diferenciació de les cèl·lules B als centres germinals i la seva disminució ha estat relacionada amb una major mortalitat per COVID-19²⁵⁶. Finalment, en els casos de pneumònia deguda a la COVID-19, s'ha observat un increment de la diferenciació cap a Th17 en presència de citocines proinflamatòries com la IL-1 β , IL-6 i IL-23²⁵². Aquestes cèl·lules tenen efectes deleteris en la infecció, ja que alliberen més citocines proinflamatòries, com la IL-17, que incrementa la inflamació sistèmica i la infiltració

de cèl·lules immunes als pulmons²⁵⁷ i és molt important en la patogènesi de la COVID-19²⁵⁸.

Les cèl·lules T CD8+ contribueixen a una resposta protectora contra el SARS-CoV-2. Quan detecten un antigen a través dels seus receptors MHC I es diferencien a cèl·lules CD8+ efectores i eliminen les cèl·lules diana a partir de l'alliberació de citocines, com el TNF- α . Una fracció d'aquestes cèl·lules pot esdevenir cèl·lules T CD8+ de memòria²⁵⁹. La COVID-19 severa provoca una disminució en el nombre de CD8+ efectores²⁶⁰, canvis en marcadors associats al cicle cel·lular²⁶¹ i un augment de receptors inhibitoris a la superfície, com la proteïna de mort cel·lular 1 (PD-1). Això causa un fenomen anomenat extenuació que impedeix la seva funció fisiològica i redueix l'alliberació d'IFN- γ , dificultant la resolució de la infecció²⁶².

Finalment, els anticossos produïts per les cèl·lules B són una part important de la resposta immune adaptativa contra la COVID-19. La seroconversió d'immunoglobulina M (IgM) contra la proteïna S es produeix de mitjana al desè dia després de l'aparició de símptomes i la d'IgG al catorzè dia²⁶³. Hi ha diversos factors que relacionen la cinètica de la producció d'anticossos amb els graus de severitat de la COVID-19, incloent-hi la magnitud de la resposta²⁶⁴, la velocitat de la seroconversió dels individus²⁶⁵ i finalment, la durabilitat d'aquests anticossos a la sang després del pic, que podria guardar relació amb una generació més eficient de cèl·lules plasmàtiques longeves²⁶⁶.

L'estudi d'individus asimptomàtics de COVID-19 ha revelat que aquests presenten una immunitat antiviral equilibrada i eficient. S'ha demostrat que tant els asimptomàtics com els casos lleus mostren una resposta de memòria de cèl·lules T i B²⁶⁷, que dura entre 5 i 8 mesos i no té correlació amb la severitat de la malaltia²⁶⁸, i que els individus asimptomàtics presenten una major producció d'IFN- γ i IL-2 per part de les seves cèl·lules T²⁶⁹.

Aquest esquema resumeix la immunofisiopatologia general en la fase pulmonar de la COVID-19.

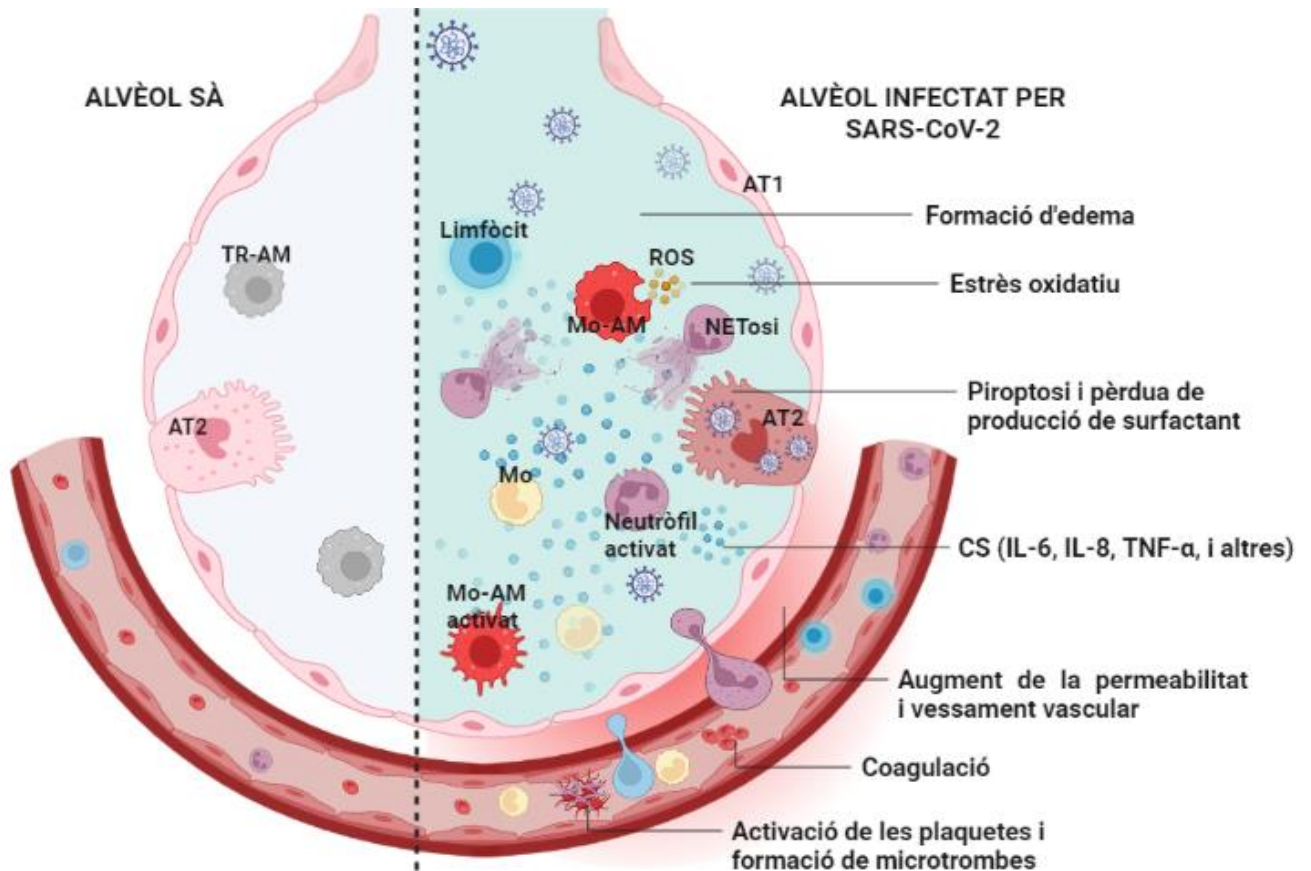


Figura 9. Alvèol sa i alvèol infectat per SARS-CoV-2. Durant la COVID-19, la infecció de les cèl·lules AT2 causa la seva piroptosi, amb la consegüent secreció de citocines, quimiocines i DAMP que a la vegada atreuen altres cèl·lules del sistema immunitari. Aquesta migració de cèl·lules immunes genera una alliberació massiva de més citocines i quimiocines que promourà una inflamació excessiva i causarà la CS. A més, es produirà un augment de la coagulació i l'activació de les plaquetes que acaben format microtrombes als vasos. *Abreviatures: AT1, cèl·lula alveolar de tipus 1; AT2, cèl·lula alveolar de tipus 2; Mo, monòcit; Mo-AM, macròfag alveolar derivat de monòcit; ROS, espècies reactives d'oxigen; TR-AM, macròfag alveolar resident al teixit.*

9. Radioteràpia en malalties benignes

9.1. Introducció

La radioteràpia (RT) és un dels pilars fonamentals en el tractament del càncer. Més del 50% dels pacients oncològics requeriran la RT com a tractament, de manera curativa o pal·liativa, durant el curs de la malaltia. La dosi de la RT dependrà de l'objectiu del tractament, així com de la localització i el tipus de tumor, però normalment s'utilitzen dosis altes de més de 50 Gy.

Més enllà del paper indiscutible de la RT en el tractament del càncer, existeix una altra via terapèutica de la RT com a tractament per algunes malalties benignes. Les malalties benignes comprenen una sèrie de malalties que no són neoplàsies malignes, però que poden representar una amenaça per a la funció dels òrgans o la qualitat de vida del pacient. Generalment, la RT per tractar malalties benignes utilitza dosis més baixes que per al maneig de tumors malignes²⁷⁰. No obstant això, aquesta aplicació alternativa de la RT és generalment poc coneguda per part de la comunitat científica i la seva acceptació a nivell mundial, sobretot en països fora d'Europa és limitada. La reticència a l'ús de la RT per a malalties benignes es deu en gran part al risc de l'aparició de tumors secundaris radioinduits, que desestima l'ús d'aquest tractament enfront d'altres opcions terapèutiques que no empen radiació. Per aquesta raó, la RT es reserva com una opció terapèutica alternativa per a casos en què els tractaments més conservadors no tenen èxit o quan no hi ha disponibilitat d'un tractament mèdic o quirúrgic adequat. Alemanya és un dels pocs països del món on la RT s'utilitza de manera rutinària per a tractar malalties benignes. Concretament, el 2014 es van tractar amb RT un total de 53.932 pacients, dels quals 36.830 presentaven malalties benignes. D'aquests, 16.989 presentaven malalties degeneratives, 14.936 artrosi, 1.563 malalties hiperproliferatives i 2.440 trastorns funcionals⁷. Les dosis que s'utilitzen per a les malalties benignes són intermèdies i baixes, és a dir, d'entre 1 Gy a 50 Gy²⁷¹.

La RT pot presentar efectes dicotòmics segons les dosis administrades. Per una banda, la RT-DB que empra dosis per sessió menors d'1 Gy presenta propietats antiinflamatòries i de modulació i activació del sistema immune, mentre que dosis majors de 2 Gy tenen efectes proinflamatoris, indueixen l'apoptosi cel·lular i inhibeixen la funció immune. A més, també s'ha demostrat que la RT-DB té efectes

antiproliferatiu, ja que retarda el progrés en les diferents fases del cicle cel·lular i inhibeix el creixement cel·lular, i també té efectes antiinflamatoris²⁷².

9.2. Indicacions acceptades de la RT i de la RT-DB

Nombroses publicacions demostren resultats favorables del tractament de RT per a les malalties benignes. No obstant això, el temor de l'aparició de tumors radioinduits, així com la manca d'estudis randomitzats, dificulta l'acceptació d'aquest tractament, a excepció d'Alemanya i països de l'est d'Europa. A causa de la pandèmia de la COVID-19, l'interès per la RT-DB i els seus efectes antiinflamatoris ha ressorgit i diversos assajos clínics s'han realitzat arreu del món per tal d'investigar l'eficiència i la seguretat d'aquest tractament.

Les indicacions de la RT en malalties benignes, més enllà de la COVID-19 que s'explicarà a l'apartat 10 (pàgina 66), cobreixen un ampli espectre de trastorns relacionats amb inflamació aguda o crònica, malalties degeneratives òssies doloroses i desordres proliferatius. L'any 2002, es va constituir un comitè d'experts en el camp de la RT amb l'objectiu d'elaborar un conjunt de directrius i guies per al tractament de RT en malalties benignes²⁷⁰. Les indicacions conegudes i utilitzades de la RT en països d'Europa Central i de l'Est són les següents:

- 1) Malalties inflamatòries agudes i cròniques: abscessos axil·lars de glàndules sudorípares, furúncols, carboncles, panadís periungual i altres infeccions que no responen als antibiòtics.
- 2) Trastorns degeneratius dolorosos aguts o crònics: tendinitis d'inserció i malalties osteoartrítiques cròniques o agudes que cursen amb dolor.
- 3) Desordres proliferatius de teixit tou: RT profilàctica en les primeres etapes de la malaltia de Dupuytren i Ledderhose, malaltia de Peyronie i en els postoperatoris per a queloides i pterígon.
- 4) Trastorns funcionals: malaltia de Graves, malformacions arteriovenoses, degeneració macular senil i fístula limfàtica persistent.
- 5) Malalties dermatològiques: dermatosis pruriginoses i èczemes, focus psoriàsics i basaliomes.
- 6) Altres indicacions: profilaxi de l'ossificació heterotòpica en diverses articulacions posteriors a la implantació d'una pròtesi, profilaxi de reestenosi

vascular després de la dilatació arterial o la implantació d'un stent, hemangiomes i altres trastorns vasculars²⁷³.

Concretament, a Alemanya, la dosi total mitjana de la RT per a tractar les malalties degeneratives és de menys de 10 Gy i inclouen periartritis escàpula-humeral, epicondilitis humeral, esperó calcani i malalties degeneratives osteoarticulares. Pel que fa als trastorns hiperproliferatius, el rang de les dosis utilitzades és entre 8,75 Gy i 30 Gy i s'hi inclouen la malaltia de Dupuytren, Lefferhose i queloides. Els desordres funcionals comprenen ginecomàstia, malaltia de Graves i fístules limfàtiques i són tractats amb dosis d'entre 21 Gy i 40 Gy. Finalment, la RT per a la profilaxis d'ossificació heterotòpica utilitza dosis d'entre 21 Gy i 60 Gy⁷.

El tractament de RT per a la profilaxi de l'ossificació heterotòpica és una de les indicacions que s'han estudiat més àmpliament amb assajos randomitzats en els que es demostra que la RT pre i postoperatòria de maluc amb dosis de 2 Gy o 3,5 Gy fraccionades en 5 sessions ajuda a prevenir l'ossificació heterotòpica^{274,275}. Pel que fa a la malaltia de Dupuytren, la revisió sistemàtica de Kadhum *et al.* que inclou 6 estudis, 5 dels quals són retrospectius i 1 és prospectiu randomitzat, demostra que l'ús de RT a les etapes inicials de la malaltia produeix una millora significativa dels graus d'estabilització i remissió, i porta a un millor pronòstic. Tot i això, una limitació important és la falta de grups control en el disseny dels assajos clínics²⁷⁶.

9.2.1. Radioteràpia per al tractament de la pneumònia

La RT amb rajos X es va utilitzar durant la primera meitat del segle XX com a tractament per a la pneumònia. L'any 1905, es va realitzar a la Universitat de Pensilvània el primer estudi amb 5 pacients amb pneumònia tractats amb rajos X²⁷⁷. El següent estudi que recollia els efectes de la RT sobre la pneumònia incloïa 12 pacients i es va publicar el 1916²⁷⁸. Ambdós estudis confirmaven que la RT promovia la resolució de la malaltia, però la reduïda grandària de la mostra requeria més investigació per a obtenir resultats concloents. L'any 1924, un estudi va recollir 243 casos que presentaven diferents manifestacions inflamatòries, des de pneumònia fins a furóncols a la pell. Aquests pacients van ser tractats amb teràpia amb rajos X i es va observar una millora de la seva simptomatologia²⁷⁹. A partir d'aquell moment, la publicació de diversos articles confirmant millores clíniques gràcies al tractament amb RT va incrementar substancialment i es van tractar un gran nombre de pacients²⁸⁰. A final dels anys 30, la RT emergia com un tractament

potencial i alternatiu per a la pneumònia, tot i que calia seguir investigant per a determinar les dosis més eficaces i poder dilucidar els mecanismes subjacents. No obstant això, l'arribada de les sulfonamides l'any 1939, juntament amb la por de carcinogènesi, va deixar en desús el tractament amb RT i la recerca en aquest àmbit es va abandonar¹. Amb el pas dels anys, s'han produït avenços en el camp de la radiobiologia que han permès estudiar els mecanismes pels quals aquest tractament presenta efectes antiinflamatoris i antiproliferatius, tant *in vitro* com *in vivo*. Tot i això, el coneixement científic sobre les vies i els mecanismes cel·lulars implicats és limitat i cal continuar amb la investigació en aquest camp.

L'inici de la pandèmia de la COVID-19 va provocar un ressorgiment de la RT-DB pel seu potencial en el tractament de la pneumònia causada per la infecció en els casos moderats i severs. Tal com s'explicarà a l'apartat 10 (pàgina 66), s'han realitzat estudis *in vitro* que han permès demostrar els efectes antiinflamatoris i immunomoduladors de la RT-DB durant la infecció per SARS-CoV-2^{281,282}, així com diversos assajos clínics que han reportat els beneficis de la RT-DB en la pneumònia deguda a la COVID-19 en humans^{10,283}.

9.3. Consideracions radiobiològiques

Les indicacions de la RT per al tractament de les malalties benignes són molt àmplies i els efectes més importants que expliquen la seva acció terapèutica són:

- Efecte antiproliferatiu: la RT produeix un retard en el cicle cel·lular mitòtic i inhibeix la proliferació cel·lular al teixit irradiat²⁸⁴. Per aquesta raó, presenta eficàcia clínica per al tractament de malalties caracteritzades per una hiperproliferació cel·lular, com és el cas de la malaltia de Dupuytren²⁸⁵, i per a prevenir l'ossificació heterotòpica²⁸⁶ i de queloides²⁸⁷.
- Efecte antiinflamatori: la RT produeix una disminució de l'adhesió de cèl·lules polimorfonucleades a les EC, promou la secreció de citocines antiinflamatòries com el TGF- β , disminueix l'activitat de l'enzim iNOS i la producció de NO i redueix l'estrès oxidatiu. Aquests mecanismes seran ampliat a l'apartat 9.5 (pàgina 57). A més, el tractament amb RT també presenta propietats analgèsiques que fa que sigui eficaç en casos d'osteoartritis amb dolor, malalties degeneratives de les articulacions, periartritis i sinovitis, que es caracteritzen per la presència d'inflamació i

migració de cèl·lules immunes als teixits²⁸⁸. Un estudi retrospectiu amb 703 pacients va demostrar que la RT-DB presentava uns bons efectes analgèsics en pacients amb dolor al calcani, al genoll i a l'espatlla²⁸⁹.

- Efecte immunomodulador: la RT té efectes sobre les cèl·lules del sistema immune i els mecanismes implicats seran ampliat a l'apartat 9.5 (pàgina 57). A més, pel fet que el SARS-CoV-2 infecta les cèl·lules immunes i provoca un desajust del sistema immune, els efectes immunomoduladors de la RT-DB poden ser beneficiosos en pacients amb COVID-19.

9.4. Limitacions

La reticència de la comunitat científica per acceptar l'ús de la RT per al tractament de malalties benignes inclou diversos factors, com l'aparició de teràpies alternatives i els avenços en l'àmbit de la cirurgia, però sobretot un risc potencial d'aparició de càncers induïts per RT. Aquests poden tenir un llarg període de latència, com en el cas dels tumors sòlids, que és de 10 fins a 60 anys. Alguns articles han exposat que la RT pot promoure l'aparició de tumors secundaris de diversos tipus i incrementar la mortalitat en els pacients irradiats. Alguns exemples són un estudi de RT per al tractament de l'espondilitis anquilosant amb dosis de 2 Gy administrades diàriament durant dues setmanes, que incrementava el risc de patir leucèmia, limfoma i càncer d'esòfag²⁹⁰. Un altre assaig en què s'administrava una única dosi de RT d'1,5 Gy al cervell de nens per a tractar la "tinea capitis" també va reportar un increment del risc de patir meningiomes i càncer de cap i coll²⁹¹.

Hi ha diverses aproximacions per tal de poder estimar el risc de carcinogènesi induïda per la RT. Una de les més freqüents és a partir del seguiment d'estudis epidemiològics que recullen casos de poblacions que han rebut diferents dosis de radiació. És el cas del "Life Span Study" que ha monitoritzat durant més de 50 anys la incidència de càncer i la mortalitat en els supervivents japonesos de les bombes atòmiques²⁹². Aquests estudis presenten resultats de difícil extrapolació perquè la dosi rebuda és a tot el cos i a més, presenten limitacions metodològiques com l'absència de grups control i la grandària mostral. Per aquesta raó, per tal de poder determinar el risc de carcinogènesi derivat de la RT per al tractament de malalties benignes, cal analitzar estudis en què s'ha utilitzat per a irradiar zones concretes del cos emprant les mesures de protecció necessàries. No obstant això, els estudis

realitzats presenten diverses limitacions en el disseny experimental, ja que majoritàriament són retrospectius i no contenen amb grups control i és difícil trobar assajos clínics prospectius i randomitzats que permetin comparar la RT amb altres estratègies terapèutiques, com la cirurgia o els medicaments antiinflamatoris²⁹³. A més, cada estudi utilitza dosis i fraccionaments diferents i cal un seguiment de diversos anys per a determinar el risc de carcinogènesi radioinduída. Actualment, la manera més adequada per a estimar el risc d'aparició de càncers radioinduíts és mitjançant el concepte de dosi efectiva que es mesura en Sievert (Sv). Aquesta, té en compte la dosi absorbida pels òrgans del cos en Gy, el nivell relatiu de dany de la radiació segons si són rajos X, alfa, beta, gamma o neutrons, i la sensibilitat específica que té cada òrgan a aquesta. Aquest valor es recull a la publicació número 103 de la Comissió Internacional de Protecció Radiològica (ICRP)²⁹⁴.

En el cas de la RT-DB, l'Acadèmia Nacional de Ciències dels Efectes Biològics de la Radiació Ionitzant (BEIR) va declarar que el model lineal sense llindar, que implica que no hi ha una dosi segura de radiació per sota la qual no apareguin efectes secundaris i assumeix una relació lineal dosi-risc, permet estimar el risc de carcinogènesi per RT-DB. En els estudis, aquest risc es determina a partir de l'extrapolació dels resultats obtinguts amb dosis de radiació moderades o altes. En aquesta estimació del risc cal tenir en compte l'edat en què es produeix la radiació i el gènere, tal i com es recull a la publicació del BEIR número 7²⁹⁵. En nens i adolescents, cal limitar l'ús de la RT perquè presenten un major risc de patir càncers radioinduíts. En cada cas, caldrà considerar si els beneficis terapèutics del tractament amb RT són superiors als riscos estimats que se'n deriven, i si els tractaments convencionals per a la malaltia poden resultar més perjudicials que la mateixa RT.

9.5. Mecanismes de l'acció antiinflamatòria i immunomoduladora de la RT-DB

Els efectes de la RT a la resposta inflamatòria depenen majoritàriament de la dosi administrada. Quan les dosis són altes (majors d'1 Gy) s'indueix una resposta proinflamatòria basada en una sobrerregulació i alliberació de citocines incloent el TNF- α , IL-1, TGF- β i IL-6 que ha estat observada en diferents teixits, com per exemple al pulmó, on pot induir fibrosi²⁹⁶, al cervell²⁹⁷ i als fibroblasts de la pell²⁹⁸. Aquest augment de citocines que es produeix com a resposta a la radiació

desencadena processos inflamatoris que causen toxicitat cel·lular²⁹⁹. Curiosament, quan la RT s'administra a dosis baixes (menors d'1 Gy), els efectes observats són contraris i es produeix una resposta antiinflamatòria. Tal com es veurà a continuació, aquests efectes inclouen un augment de la secreció de TGF- β a les EC, una reducció de l'activitat de l'enzim iNOS i la producció de NO que minimitzarà l'estrès oxidatiu, i una disminució de la secreció de citocines proinflamatòries per part dels macròfags i dels limfòcits. Per altra banda, la RT-DB també presenta efectes immunomoduladors que inclouen un augment de la funció de les NK i un increment de la proliferació i l'activació dels limfòcits T, entre d'altres.

9.5.1. Apoptosi

Diversos estudis han demostrat que la RT-DB és capaç d'augmentar l'apoptosi dels limfòcits, sent major a les 48 h post-irradiació³⁰⁰. L'estudi de Kern *et al.* demostra que la RT-DB amb dosis úniques d'entre 0,1 Gy i 3 Gy provoca un augment de l'apoptosi de cèl·lules polimorfonucleades de la sang (PBMC) aïllades de pacients sans, amb una resposta dosi-dependent discontinua, amb un pic relatiu màxim d'apoptosi amb dosis d'entre 0,3 Gy i 0,7 Gy³⁰¹. La RT-DB també pot induir l'apoptosi d'altres cèl·lules immunes, com les cèl·lules polimorfonucleades (PMN), una categoria que inclou els neutròfils, els basòfils i els eosinòfils. Un estudi *in vitro* amb PMN humanes aïllades de la sang de donants sans, va demostrar que la RT-DB indueix l'apoptosi d'aquestes cèl·lules mostrant els màxims nivells d'apoptosi amb una dosi de 0,3 Gy i els mínims quan s'irradiaven amb 0,5 Gy, que es correlacionaven amb un increment o una disminució de les concentracions totals d'AKT, respectivament³⁰².

L'apoptosi és un procés de mort cel·lular controlada que no només desencadena una resposta inflamatòria, sinó que les cèl·lules apoptòtiques alliberen citocines antiinflamatòries, com és el cas dels limfòcits T apoptòtics que alliberen TGF- β ³⁰³. En paral·lel, també s'alliberen diversos senyals quimioatracients, com la CCL2 i la GM-CSF³⁰⁴ per tal d'atreure monòcits i macròfags que promouran l'eliminació de les restes cel·lulars. A més dels senyals antiinflamatoris alliberats per les mateixes cèl·lules en el procés, la pròpia presència de cèl·lules apoptòtiques té efectes immunosupressors. Concretament, l'apoptosi promou un fenotip més antiinflamatori als monòcits caracteritzat per l'augment de la secreció d'IL-10 i la disminució de citocines proinflamatòries com el TNF- α , la IL-1 i la IL-

12³⁰⁵. L'apoptosi produeix senyals immunosupressors que podrien estar relacionats amb els efectes antiinflamatoris de la RT-DB.

9.5.2. NF-κB

Un altre mecanisme que pot estar relacionat amb les funcions antiinflamatòries de la RT-DB és la via de la NF-κB, que promou l'expressió d'un gran espectre de gens relacionats amb la reparació de dany al DNA, l'apoptosi i processos generalment proinflamatoris a partir de l'expressió de citocines com el TNF-α. Curiosament, en resposta a la RT-DB, es produeix una activació de la via NF-κB que indueix l'expressió de TGF-β i promou processos antiinflamatoris.

Estudis *in vitro* mostren que la RT-DB indueix l'activació de NF-κB, sent màxima amb la dosi de 0,5 Gy i a les 8 h després de la irradiació³⁰⁶. A partir de 0,6 Gy i fins a 1 Gy, l'activació de NF-κB és la mínima, però torna a créixer quan la dosi és de 3 Gy. Els autors postulen que l'activació de NF-κB en resposta a la RT-DB està relacionada amb un augment de l'expressió de TGF-β₁ i que presenta propietats antiinflamatòries³⁰⁷. Rödel et al. van investigar possibles vies moleculars relacionades amb l'augment de NF-κB en resposta a RT-DB a les EC i es va demostrar que una de les proteïnes que activa la via NF-κB, l'anomenada proteïna inhibidora de l'apoptosi lligada a l'X (XIAP), augmentava la seva expressió en resposta a la RT-DB, presentant un pic màxim amb dosis de 0,5 Gy. A més, aquest pic es correlacionava amb un pic d'activitat transcripcional de NF-κB i un pic de secreció de TGF-β. D'aquesta manera, els autors van teoritzar que la RT-DB presenta propietats antiinflamatòries a partir de la secreció de TGF-β per l'activació de la via NF-κB, a causa de l'augment d'expressió de XIAP. A més, XIAP inhibeix l'apoptosi cel·lular, i per aquesta raó, en resposta a dosis de 0,5 Gy l'apoptosi a les cèl·lules és mínima³⁰⁸. Aquesta troballa es veu recolzada amb els resultats d'altres estudis que confirmen que, tot i que en general la RT-DB indueixi apoptosi, concretament, en resposta a dosis de 0,5 Gy, l'apoptosi és baixa³⁰².

9.5.3. TGF- β_1 i disminució de l'adhesió de cèl·lules polimorfonucleades

La superfamília TGF- β inclou diverses proteïnes que participen en diversos processos biològics com la regulació del sistema immune, l'homeòstasi dels teixits i el desenvolupament. Dins d'aquesta superfamília hi ha la subfamília TGF- β que inclou tres polipèptids, el TGF- β_1 , el TGF- β_2 i el TGF- β_3 , sent el primer la isoforma prototípica, més abundant i expressada ubícuament³⁰⁹.

El TGF- β_1 és un mediador de la inflamació que presenta funcions molt àmplies que inclouen la inhibició de la proliferació dels monòcits i els macròfags i la promoció d'un fenotip més antiinflamatori amb una menor producció de ROS³¹⁰, la inhibició de l'activació i la proliferació de les cèl·lules T CD4+ i CD8+³¹¹, la inhibició de la proliferació i funció de les cèl·lules B i una regulació negativa de la funció de les NK³¹². D'aquesta manera, el TGF- β_1 és un modulador immune essencial de la resposta antiinflamatòria de l'organisme i en ratolins, la seva absència provoca autoimmunitat multiorgànica i la mort³¹³. En el context de la inflamació, la migració i l'adhesió dels leucòcits a les EC és un pas fonamental per a que les cèl·lules immunes puguin arribar al lloc de la inflamació. Les EC juguen un paper clau en el procés inflamatori, ja que són la porta que regula el pas dels leucòcits des de la sang als teixits inflamats i a la vegada tenen la capacitat de secretar citocines, quimiocines i factors de creixement. Els efectes del TGF- β_1 sobre les EC es coneixen des de fa més de vint anys. Un estudi *in vitro* del 1987, va mostrar que el TGF- β_1 inhibeix la proliferació, la migració i l'angiogènesi d'EC bovines³¹⁴.

Diversos estudis *in vitro* han demostrat que la RT-DB causa un augment de la secreció de TGF- β_1 , presentant el màxim amb dosis de 0,5 Gy i 24 h després de la irradiació, que a la vegada es correlaciona amb un mínim d'adherència de les PBMC amb dosis d'entre 0,3 Gy i 0,7 Gy⁴. En aquesta línia, i confirmant aquestes dosis, es va descobrir que la secreció de TGF- β_1 en resposta a RT-DB a les EC presentava una resposta en el temps bifàsica presentant dos pics màxims de secreció aproximadament a les 4 h i a les 24 h post-irradiació. També s'ha observat que aquests es correlacionen amb una menor adhesió de les PBMC a les EC i que la via implicada en aquesta disminució és la NF- κ B³. Aquesta disminució de l'adhesió dels leucòcits a les EC també s'ha reportat en altres estudis³¹⁵ i s'ha suggerit que podria ser deguda a canvis en l'expressió de molècules d'adhesió a les EC. La RT-DB produeix una disminució de l'expressió d'E-selectina a la

membrana de les EC sent màxima amb dosis de 0,7 Gy⁴ mentre que no afecta altres molècules d'adhesió, com la ICAM-1 i la VCAM-1³¹⁵.

Aquests resultats van ser confirmats posteriorment amb diversos estudis *in vivo*. Arenas *et al.* van demostrar que la RT-DB amb una única dosi de 0,3 Gy provocava un increment de TGF- β_1 al plasma dels ratolins irradiats, tant si prèviament havien estat estimulats amb LPS com si no. En estimular els ratolins amb LPS, l'adhesió i la migració dels leucòcits augmenta significativament. Els autors van demostrar que en ratolins tractats amb LPS i RT-DB, la irradiació era capaç de reduir els nivells d'adhesió leucocitària als nivells dels ratolins no estimulats amb LPS⁶. Un altre estudi *in vivo* dels mateixos autors, reportava que la RT-DB amb dosis de 0,3 Gy en ratolins que posteriorment són estimulats amb LPS, produeix una disminució significativa de l'adherència dels leucòcits a les 5 h, 24 h i 48 h post-irradiació que es perd a les 72 h. També, que la RT-DB inhibeix el rodament dels leucòcits i causa una secreció significativa de TGF- β_1 a les 5 h i 24 h després de la irradiació i que torna als valors basals a les 48 h i 72 h post-irradiació. Aquesta secreció de TGF- β_1 es correlaciona amb la inhibició de l'adherència dels leucòcits⁵.

9.5.4. Efectes de la RT-DB a cèl·lules del sistema immune

Diversos estudis *in vitro* i *in vivo* han demostrat la capacitat immunomoduladora de la RT-DB sobre diversos tipus cel·lulars del sistema immunitari, tal i com s'ampliarà en els apartats següents. Actualment, els mecanismes subjacents que expliquen aquest fenomen encara estan sent investigats.

9.5.4.1. Metabolisme dels macròfags i resposta antioxidant

La RT-DB pot induir canvis en el fenotip funcional dels macròfags segons la dosi administrada. Un gran nombre d'evidències científiques demostren que la irradiació amb dosis menors a 1 Gy indueix un canvi cap a un fenotip M2 o antiinflamatori.

Els macròfags proinflamatoris generen NO, una de les ROS més reactives, a partir d'un augment en l'expressió d'iNOS, que incrementa la permeabilitat vascular, contribueix a la formació d'edemes i juga un paper clau en la resposta inflamatòria i el dolor¹⁷⁷. Estudis amb macròfags cultivats *in vitro* i prèviament activats amb LPS/IFN- γ han demostrat que la RT-DB, concretament amb dosis d'entre 0,6 Gy i 1,25 Gy, disminueix la producció de NO en macròfags mitjançant un mecanisme

dosi-dependent. Aquesta disminució es deu a uns nivells reduïts de la proteïna iNOS entre 6 h i 24 h després de l'estimulació i la irradiació, sent màxima a les 12 h³¹⁶. En aquesta línia, la RT-DB també redueix l'activitat oxidativa dels macròfags i els nivells de superòxid, aconseguint la màxima reducció amb dosis de 0,6 Gy³¹⁷. A més, també pot modular la producció de citocines. Concretament, la RT-DB suprimeix la producció de citocines proinflamatòries com el TNF- α a partir de la desfosforilació de la MAPK p38 (a 0,5 Gy)³¹⁸ i disminueix la secreció d'IL-1 β (a 0,7 Gy) en macròfags prèviament activats amb LPS³¹⁹. Contràriament, quan les dosis de RT són majors d'1 Gy, els macròfags adopten fenotips més proinflamatoris³²⁰.

9.5.4.2. Cèl·lules assassines naturals (NK)

La RT-DB, concretament amb dosis de 0,075 Gy, incrementa la proliferació, l'activitat citotòxica i la secreció de TNF- α i IFN- γ a les NK. Estudis *in vitro* han demostrat que aquest fenomen es deu, en part, a l'activació de la via MAPK p38³²¹. Altres autors destaquen que una dosi baixa d'IL-2 prèvia a la irradiació és necessària perquè es produeixi l'augment de citotoxicitat induït per la RT-DB a NK de ratolins *in vitro*, i que la RT-DB no influeix en la proliferació³²². En el context d'un organisme viu, les NK ja es troben fisiològicament estimulades per la presència de citocines en resposta a patògens.

En aquesta línia, un estudi *in vivo* confirma que les NK provinents de ratolins irradiats amb dosis de 0,1 Gy i 0,2 Gy incrementen les seves funcions citotòxiques i que aquesta és màxima a les 48 h post-irradiació³²³.

9.5.4.3. Limfòcits T i B

Múltiples estudis han demostrat que la RT-DB pot modular la diferenciació, l'activació i la proliferació dels limfòcits T, majoritàriament en limfòcits T CD8+ que s'ha vist que són més reactius que els limfòcits T CD4+^{324,325}. La RT-DB induïx un augment de la proliferació de cèl·lules T CD8+ CD69+ i de la seva citotoxicitat. L'expressió de CD69 es relaciona amb una activació inicial dels limfòcits³²⁶. La RT-DB també modula l'expressió de mRNA de diverses citocines, específicament incrementa l'expressió d'IFN- γ alliberat per les cèl·lules Th1, i d'IL-4 i IL-5 per les cèl·lules Th2. També induïx l'expressió de gens involucrats en la funció mitocondrial, la regulació del cicle cel·lular i la traducció de mRNA³²⁷.

Als limfòcits B, la RT-DB amb dosis de 0,1 Gy provoca canvis en l'expressió dels gens i indueix l'expressió d'alguns micro-RNA relacionats amb l'enzim glicerol-3-fosfat acetiltransferasa, que es correlaciona amb l'activitat immunogènica³²⁸. També augmenta la proliferació dels limfoblasts B a partir d'elevat la fosforilació de la proteïna Ikaros, que té la capacitat de regular la progressió G1/S del cicle cel·lular³²⁹.

9.5.4.4. Cèl·lules dendrítiques (DC)

La RT-DB també provoca canvis a la població de DC. En ratolins irradiats amb dosis d'entre 0,01 Gy i 0,1 Gy s'ha observat una disminució de les DC després de 2 i 7 dies de la irradiació, que recupera els valors normals al cap de 14 dies³³⁰. A més, la RT-DB pot influir en la seva activació i funció, ja que amb dosis de 0,2 Gy incrementa l'expressió de molècules MHC i coestimuladores a la superfície de DC diferenciades a partir de cèl·lules de la medulla òssia de ratolins irradiats³³¹. Quan les dosis són de 0,25 Gy incrementen l'alliberació de les citocines IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 i TNF- α de les DC³³².

9.5.4.5. Monòcits

La RT-DB disminueix el nombre de monòcits proinflamatoris circulants en ratolins models d'aterosclerosi, sent més important amb dosis de 0,05 Gy, mentre que els monòcits no inflamatoris no es veuen afectats³³³.

9.5.4.6. Cèl·lules endotelials i angiogènesi

La RT-DB ha estat relacionada en diversos estudis amb el procés d'angiogènesi. Curiosament, quan les EC microvasculars de pulmó humà *in vitro* són irradiades amb una única dosi de 0,3 Gy i s'analitza l'expressió d'RNA, s'observen canvis significatius en l'expressió de 1.344 gens respecte a les cèl·lules control. Aquests gens estan relacionats amb factors de creixement, proteïnes i receptors involucrats en l'angiogènesi com el VEGFR1, ANGPT2, FGF-2 i TGF- β . *In vivo*, en models de ratolí d'isquèmia a les extremitats inferiors, la RT-DB millora la perfusió de la sang a partir d'induir l'expressió de gens proangiogènics a les EC musculars, d'incrementar la densitat de capil·lars i de mobilitzar i reclutar EC progenitores³³⁴.

9.5.4.7. Resposta de citocines

A causa dels canvis que la RT-DB origina en els limfòcits i també en la capacitat de diferenciació de les cèl·lules de la medul·la òssia, es produeixen variacions en les concentracions de quimiocines, citocines i factors de creixement. El sèrum de ratolins irradiats amb dosis de 0,2 Gy mostra una disminució d'IL-12 i un augment d'IL-10 i G-CSF³³¹. A més, la RT-DB a les EC després de l'estimulació amb TNF- α presenta un augment de l'expressió de TFG- β_1 i d'IL-6⁴. Quan les EC es troben en co-cultiu amb neutròfils i estimulades amb TNF- α , s'ha observat que la RT-DB d'entre 0,5 Gy i 1 Gy disminueix la secreció de la quimiocina CCL20 per part de les PBMC i a la vegada, provoca una disminució de l'adhesió d'aquestes a les EC, participant així en la complexa resposta antiinflamatòria induïda per la RT-DB³³⁵.

Taula 2. Mecanismes o factors antiinflamatoris i immunomoduladors de la RT-DB

Cèl·lules	Factor/Mecanisme	Efecte	Tipus d'estudi	Referències
Cèl·lules endotelials	Adhesió dels leucòcits a l'endoteli	Reducció de l'adhesió de PBMC amb dosis entre 0,3 i 0,7 Gy, presentant dos pics a les 4 h i a les 24 h post-irradiació	<i>In vitro</i>	(3,4)
		Disminució de l'adherència dels leucòcits a 0,3 Gy en ratolins prèviament estimulats amb LPS a les 5 h, 24 h i 48 h post-irradiació	<i>In vivo</i>	(5,6)
	TGF- β_1	Augment de la secreció de TGF- β_1 bifàsica amb dosis de 0,5 Gy a les 4 h i a les 24 h després de la irradiació	<i>In vitro</i>	(3,4)
		Augment de la secreció de TGF- β_1 amb 0,3 Gy a les 5 h i 24 h després de la irradiació	<i>In vivo</i>	(5,6)
	XIAP	Augment de l'expressió de XIAP a 0,5 Gy i a les 24 h post-irradiació, aquest pic es correlaciona amb un augment de l'activitat de NF-Kb, un pic de secreció de TGF- β i una reducció significativa de l'apoptosi	<i>In vitro</i>	(302,308)
	Apoptosi	Reducció significativa de l'apoptosi a 0,5 Gy i a les 24 h post-irradiació	<i>In vitro</i>	(300,301)
	NF- κ B	Activació màxima de NF- κ B amb dosis de 0,5 Gy i presentant dos pics a les 8 h o 24 h de la RT-DB	<i>In vitro</i>	(3,306)
	E-selectina	Disminució de l'expressió d'E-selectina sent màxima amb dosis de 0,7 Gy	<i>In vitro</i>	(4)
Angiogènesi	Augment de l'expressió de VEGFR1, ANGPT2, FGF-2 i TGF- β i de la densitat de capil·lars en un model de ratolí d'isquèmia a les extremitats inferiors amb 4 dosis fraccionades de 0,3 Gy	<i>In vivo</i>	(334)	
Macròfags	iNOS/NO	Disminució dels nivells de la proteïna iNOS, sense efectes a nivell transcripcional, amb dosis d'entre 0,6 Gy i 1,25 Gy, essent màxima a les 12 h després de la irradiació en la que disminueix la producció de NO	<i>In vitro</i>	(316)
	Estrès oxidatiu	Disminució de l'esclat oxidatiu i de superòxid amb una reducció del 28% amb dosis de 0,6 Gy en macròfags estimulats	<i>In vitro</i>	(317)
	Disminució de citocines	Disminució en macròfags prèviament activats de la secreció de TNF- α amb RT-DB, que és màxima amb dosis de 0,5 Gy i de IL-1 β , que és màxima amb dosis de 0,7 Gy		(318,319)
Natural killers	Funció augmentada	Increment de la proliferació, l'activitat citotòxica i la producció i secreció de les citocines TNF- α i IFN- γ a les NK amb un màxim amb dosis de 0,075 Gy i a les 24 h	<i>In vitro</i>	(321)
		Increment de toxicitat de les NK en ratolins irradiats amb dosis de 0,1 Gy i 0,2 Gy amb un augment màxim a les 48 h	<i>In vivo</i>	(323)
Limfòcits T	Proliferació i activació de limfòcits T	Augment de la proliferació de cèl·lules T CD8+ CD69+ i de la citotoxicitat en ratolins tractats amb una dosi total de 0,2 Gy administrada a partir de dosis fraccionades de 0,04 Gy durant 5 dies	<i>In vivo</i>	(326)
	Citocines	Increment d'IFN- γ , IL-4 i IL-5 quan els limfòcits T CD4+ són irradiats amb 0,01 Gy	<i>In vitro</i>	(327)
Limfòcits B	Proliferació	Augmenta la proliferació dels limfoblasts B amb dosis de 0,05 Gy a partir d'elevar la fosforilació de la proteïna Ikaros que té la capacitat de regular la progressió G1/S del cicle cel·lular	<i>In vitro</i>	(329)
Cèl·lules dendrítiques	Disminució de la població	Disminució de DC en ratolins irradiats amb dosis d'entre 0,001 Gy i 0,1 Gy després de 2 i 7 dies que recupera els nivells normals als 14 dies post-irradiació	<i>In vivo</i>	(330)
	Activació i funció	Increment de les molècules MHC i coestimuladores a la superfície amb dosis de 0,2 Gy a DC diferenciades a partir dels progenitors de la medulla òssia de ratolins irradiats	<i>In vivo</i>	(331)
Monòcits	Disminució de monòcits proinflamatoris	Reducció dels monòcits proinflamatoris circulants en un model de ratolí amb aterosclerosi amb dosis de 0,05 Gy	<i>In vivo</i>	(333)
Neutròfils	Quimiocines	En co-cultiu amb EC i estimulades amb TNF- α , dosis d'entre 0,5 Gy i 1 Gy disminueixen la secreció de CCL20	<i>In vitro</i>	(335)

Abreviatures: ANGPT2, angiopoietina 2; CCL, quimiocina amb motiu C-C; DC, cèl·lules dendrítiques; EC, cèl·lules endotelials; FGF-2, factor de creixement de fibroblast 2; IFN- γ , interferó gamma; IL, interleucina; iNOS, forma induïble de la sintasa d'òxid nítric; LPS, lipopolisacàrid; MHC, complex major d'histocompatibilitat; NF-Kb, factor nuclear-kappa B; NK, natural killers; NO, òxid nítric; PBMC, cèl·lules polimorfonucleades de la sang; RT-DB, radioteràpia a dosis baixes; TGF- β_1 , factor de creixement transformant beta 1; TNF- α , factor de necrosi tumoral alfa; VEGFR1, receptor 1 del factor de creixement endotelial vascular; XIAP, proteïna inhibidora de l'apoptosi lligada a l'X.

10. Radioteràpia i COVID-19

La infecció de SARS-CoV-2 causa un dany directe a les cèl·lules epitelials alveolars, desencadenant processos de piroptosi. En paral·lel, el virus infecta les cèl·lules del sistema immunitari provocant una alteració de les seves funcions fisiològiques i desregulant la resposta immunitària. En els casos més severes, a aquests efectes deleteris directes de la infecció sobre les cèl·lules de l'hoste, s'afegeix una resposta immune exacerbada que intenta combatre la infecció viral pulmonar. No obstant això, en lloc de resoldre la infecció, es produeix una CS que es caracteritza per l'alliberament massiu de citocines que agreuja el dany alveolar i causa disfunció pulmonar i hipòxia i, en absència de resolució, pneumònia i ARDS². Més enllà de les afectacions pulmonars, la CS desencadenarà un estat d'hiperinflamació generalitzat, sistèmic i altament patològic⁷⁶ que pot causar una fallada multiorgànica i la mort de l'hoste.

Aquest estat hiperinflamatori causat per la CS i la desregulació del sistema immunitari, requereix l'ús de diversos tractaments. D'una banda, l'ús de tractaments antivirals i per l'altra, tractaments antiinflamatoris per a frenar i resoldre la CS, que en última instància, provoca gran part de la fisiopatologia de la COVID-19 severa⁷⁸. En aquest context, i per la funció antiinflamatòria de la RT-DB demostrada en un gran nombre d'estudis *in vitro* i *in vivo* (Taula 2), el tractament amb RT-DB s'ha estudiat per a la COVID-19 pel seu potencial d'inhibir la CS i les conseqüències fisiopatològiques que se'n deriven i a la vegada, promoure el sistema immunitari de l'hoste. Durant la pandèmia s'han realitzat diversos assajos clínics en humans que han demostrat eficàcia i seguretat en la resolució d'una part de la simptomatologia de la COVID-19. El nombre d'estudis *in vitro* i *in vivo*, en canvi, són reduïts i no han tingut un paper tan rellevant en la investigació. La dificultat de realitzar models de pneumònia *in vitro* i la complexitat d'instal·lar els equips de RT, així com la difícil translacionalitat en humans, ha generat poca evidència preclínica sobre l'ús de la RT-DB en la COVID-19, els mecanismes d'acció i les dosis més eficaces.

10.1. Estudis preclínic

Els estudis preclínic, tant *in vitro* com *in vivo* en model de ratolí, han demostrat que la RT-DB té efectes antiinflamatoris, ja que redueix la producció de citocines proinflamatòries i disminueix la migració de cèl·lules immunes als pulmons.

S'ha demostrat que cèl·lules alveolars bronquials cultivades amb la proteïna S del SARS-CoV-2 augmenten la secreció de citocines com el TNF- α i la IL-6 mentre que s'inhibeix l'expressió de la proteïna ACE2 després de 24 h. Quan aquestes cèl·lules s'irradien amb rajos gamma d'entre 0,5 Gy i 1,5 Gy, es restableix l'expressió d'ACE2 i s'atenua l'augment de citocines proinflamatòries induït per la presència de SARS-CoV-2³³⁶. L'estudi *in vivo* de Meziani *et al.* investiga els efectes de la RT-DB, utilitzant un model de ratolí amb pneumònia i un model de ratolí infectat pel virus influença. En el primer, la RT-DB amb dosis d'1 Gy disminueix la destrucció i l'afectació del parènquima pulmonar en comparació amb els ratolins control. Aquesta disminució de la inflamació pulmonar es correlaciona amb un augment dels macròfags alveolars que expressen IL-10. En els ratolins infectats amb el virus influença, la RT-DB amb dosis de 0,5 Gy i 1 Gy, redueix l'emfisema i la ruptura del septum alveolar. A més, també s'observa una menor migració de neutròfils i leucòcits i un increment del nombre de macròfags productors d'IL-10. També es demostra que la RT-DB, amb dosis de 0,5 Gy, a macròfags humans extrets de biòpsies pulmonars augmenta el nombre de macròfags productors d'IL-10 mentre que redueix els que secreten IL-6²⁸². Un altre estudi amb ratolins amb pneumonitis induïda per bleomicina, simulant la patologia pulmonar de la COVID-19, va mostrar que dosis d'1 Gy milloren les troballes histopatològiques als pulmons i redueixen la migració de macròfags intersticials, DC i neutròfils³³⁷. Finalment, un estudi del nostre grup, ha investigat els possibles mecanismes bioquímics de la RT-DB en pacients amb COVID-19. Aquest estudi amb 30 participants amb COVID-19, mostra que els pacients més greus presenten uns nivells més baixos d'IL-10 i d'IFN- γ circulants. També, que 24 h després de la RT-DB es produeix al sèrum una disminució de marcadors d'inflamació, com la LDH o la CRP, i un increment al sèrum de TGF- β , de l'activitat de l'enzim antioxidant paraoxonasa 1 (PON-1) i dels limfòcits CD4+ i CD8+. L'augment de la PON-1 induït per la RT-DB està correlacionat amb una millora clínica dels pacients, revelant així un nou

mecanisme bioquímic implicat en l'acció terapèutica de la RT-DB en pacients amb COVID-19²⁸¹.

En resum, la infecció del SARS-CoV-2 desregula les cèl·lules del sistema immune i, a la vegada, causa l'alliberació massiva de citocines que condueix a l'estat hiperinflamatori anomenat CS. La Taula 3 sintetitza els mecanismes prèviament explicats pels quals la RT-DB alberga un gran potencial terapèutic com a tractament de la COVID-19 perquè, per una banda, pot limitar la CS a partir dels seus efectes antiinflamatoris i, per l'altra, revertir els efectes deleteris de la infecció de SARS-CoV-2 sobre el sistema immune, pels seus efectes immunomoduladors.

Taula 3. Efectes de la RT-DB a nivell dels mecanismes immunomoduladors patològics de la COVID-19

Cèl·lules immunes i citocines	COVID-19	RT-DB
Limfòcits T	Limfopènia	Increment de la proliferació i la funció
Limfòcits B	Limfopènia	Increment de la proliferació de limfoblasts B
IL-6, IL-4 i TNF-α	Augmenta	Disminueix
TGF-β	Disminueix	Augmenta
IFN-γ	Disminueix	Augmenta
Macròfags	Proinflamatoris (M1)	Antiinflamatoris (M2), reducció iNOS, NO i estrès oxidatiu
NK	Disminueix	Incrementa la proliferació i la funció
Monòcits proinflamatoris	Augmenta	Disminueix
Neutròfils	Incrementa	Disminueix la secreció de la quimiocina CCL20

10.2. Assajos clínics en humans

El gran nombre d'estudis experimentals sobre els efectes de la RT-DB que s'han descrit anteriorment ha generat, malgrat la falta d'estudis específics sobre RT-DB i COVID-19, una base sòlida de coneixement preclínic. Aquests fonaments científics sobre els efectes antiinflamatoris de la RT-DB avalen la investigació d'aquest tractament per a la COVID-19 en assajos clínics amb humans, per tal d'avaluar la seva seguretat i l'eficàcia. Segons la plataforma ClinicalTrials.gov³³⁸,

que és una base de dades que recull assajos clínics realitzats a escala mundial, en cercar les paraules “COVID-19” com a condició i “Radioteràpia” com a intervenció, s’identifiquen un total de 89 assajos clínics en diferents fases. D’aquests, només 18 són estudis específics amb pacients de COVID-19 que empren la RT-DB com a tractament. En el moment àlgid de la pandèmia de COVID-19, la manca de tractaments eficaços va impulsar la investigació de noves rutes terapèutiques, entre elles la RT-DB per a millorar la simptomatologia en els casos més greus. Actualment, la pandèmia de la COVID-19 ha finalitzat i el reclutament de pacients infectats que compleixin els criteris d’inclusió per a participar en assajos clínics amb RT-DB s’ha vist limitat. Per aquesta raó, dels 18 assajos clínics registrats a ClinicalTrials.gov, només 9 s’han completat amb èxit i han publicat els seus resultats, que seran revisats a la Taula 4 (pàgina 71).

Els assajos clínics demostren una millora dels paràmetres clínics, majoritàriament respiratoris, incloent-hi la saturació d’oxigen (SpO_2), la ràtio de saturació d’oxigen per fracció inspirada d’oxigen (SpO_2/FiO_2) i una reducció dels requeriments d’oxigen dels pacients estudiats. A més, en alguns estudis es demostra una disminució dels marcadors proinflamatoris després de la RT-DB. Hess *et al.* reporten una reducció significativa de CRP i de creatinina quinasa en el grup intervenció, respecte al grup control. A més, tot i que aquest estudi no reporta una millora en la supervivència dels pacients tractats amb RT-DB, sí que demostra una reducció significativa de la intubació en aquests pacients⁸. L’assaig de Sanmamed *et al.*, tot i l’absència d’un grup control, mostra una reducció significativa de la CRP després d’una setmana de la RT-DB, respecte als valors pre-tractament. Altres paràmetres inflamatoris com la ferritina, la LDH i el dímer D no es veuen alterats¹⁰. En aquesta línia, l’estudi d’Ameri *et al.* va mostrar un decreixement d’IL-6 i CRP després d’1 i 3 dies de la RT-DB en el 80% i el 100% dels pacients, respectivament. Tot i així, els valors no són estadísticament significatius perquè la mostra analitzada és de només 10 pacients³³⁹. De tots els assajos clínics que s’han realitzat, només el de Papachristofilou *et al.* no demostra cap efecte beneficiós de la RT-DB, mentre que sí presenta una reducció significativa del nombre de limfòcits en el grup tractat amb RT-DB³⁴⁰. En resposta als resultats d’aquest estudi, que contradiuen àmpliament les troballes clíniques de la resta d’assajos clínics, Bevelacqua va escriure una carta

a l'editor en que hipotetitzava que l'estudi de Papachristofilou no respecta la finestra terapèutica de la RT-DB, ja que el tractament es realitza després de la fase hiperinflamatòria, i que els pacients reclutats estan massa greus per a poder presentar millora³⁴¹.

Tot i que els diversos assajos clínics que s'han realitzat avalen aquest tractament i reporten millores clíniques en els pacients i una reducció dels dies d'hospitalització, les diferents aproximacions metodològiques emprades fan difícil la comparació dels resultats. Una part important d'aquests assajos clínics no contempen un disseny amb un grup control, i els valors obtinguts després de la RT-DB es comparen amb els valors pre-irradiació. A més, tot i que la majoria d'estudis inclouen pacients d'edat avançada, a partir de 70 anys, la mitjana d'edat de l'estudi de Ganesan *et al.*³⁴², i de Sharma *et al.*⁹ és de 56 i 51 anys, respectivament. També, els objectius primaris són diferents i utilitzen diverses puntuacions i/o marcadors clínics per analitzar l'eficàcia del tractament de RT-DB. És el cas de l'estudi de Sharma *et al.* en què avaluen millores en la severitat de la COVID-19 a partir de l'escala de puntuació NEWS⁹, mentre que l'assaig de Sanmamed *et al.* es basa en l'escala de Borghesi¹⁰. Finalment, la grandària mostral d'aquests estudis és generalment petita i a més, el disseny de l'estudi en un gran nombre dels casos és no randomitzat i es troba en diferents fases. Aquestes discrepàncies entre els estudis dificulten l'estandardització del tractament de RT-DB per a la COVID-19.

La següent taula conté els resultats que s'han publicat dels 9 assajos clínics registrats a ClinicalTrials.gov i 2 estudis que no hi estan registrats, però que van ser aprovats pel Comitè Institucional Ètic de l'Índia^{342,343}. L'últim estudi de la taula és un dels articles que forma part de la present tesi doctoral.

Taula 4. Assajos clínics de la RT-DB en pacients amb COVID-19

Autor, any, nom de l'assaig clínic, número de registre	Disseny	Lloc	Núm. Pacients	Edat mitjana (anys)	Críteris d'inclusió	Intervenció	Dosi (Gy)	Objectiu primari	Seguiment i efectes adversos	Resultats
Ameri et al. ³⁴⁴ , 2020 NCT04390412	Estudi pilot	Hospital Imam Hossein (Iran)	5	71,8	≥60 anys i COVID-19 positius o amb requeriments d'O ₂ amb SpO ₂ ≤93% i/o PaFi ≤300 mm Hg	No medicaments antivirals ni corticoesteroides. Única dosi de RT-DB	0,5 bilateral	Millores de la SpO ₂ , canvis al nombre de dies d'hospitalització o a l'UCI	7 dies. No hi ha toxicitat aguda	Millora dels paràmetres clínics i de la SpO ₂ en 4/5 pacients
Hess et al. ³⁴⁵ , 2020 (RESCUE 1-19) NCT04366791	Estudi fase I	Hospital Universitari Emory (Estats Units)	20 (10 control i 10 intervenció)	78	COVID-19 positius hospitalitzats, amb consolidacions radiogràfiques i requeriments d'O ₂	Única dosi de RT-DB	1,5 bilateral	Recuperació clínica, millora radiogràfica i de biomarcadors	21 dies. No hi ha toxicitat aguda	Millora clínica dels pacients
Papachristofilou et al. ³⁴⁰ , 2021 (COVID-RT-01) NCT04598581	Estudi randomitzat, doble cec, fase II	Hospital Universitari de Basel (Suïssa)	22 (11 control i 11 intervenció)	75	Homes >40 anys i dones >50 anys, COVID-19 positius i que requereixen ventilació mecànica	Tots els pacients reben dexametasona, 4 en el grup intervenció i 7 en el control reben remdesivir. Única dosi de RT-DB	1 bilateral	Millora en el nombre de dies en què el pacient no ha requerit ventilació des del dia de la intervenció fins a 15 dies després	28 dies. Presència de limfopènia després de la RT-DB	No compleixen l'objectiu primari
Ganesan. et al. ³⁴² , 2021 ECR/926/Inst/TN/2017/RR-20	Estudi fase II	Hospital Sundaram (Índia)	25	56	>40 anys, COVID-19 positius, hospitalitzats, reben medicació antiviral, SpO ₂ <94 %, FR ≥24/min i SaFi >89 però <357	Única dosi de RT-DB	0,5 bilateral	Millora de la SaFi a les 48 h, 72 h i 7 dies des del dia de la irradiació comparat amb els valors basals	7 dies. No hi ha toxicitat aguda	Millora de la SaFi i dels resultats de la TC pulmonar, reducció dels requeriments d'O ₂ , millora de la hipòxia
Hess et al. ⁸ , 2021 (RESCUE 1-19) NCT04366791	Estudi prospectiu fase II	Hospital Universitari Emory (Estats Units)	40 (20 control i 20 intervenció)	90	>18 anys, COVID-19 positius, hospitalitzats amb opacitats als pulmons i requeriments d'O ₂	Pacients tractats amb dexametasona i/o remdesivir. Única dosi de RT-DB	1,5 bilateral	Seguretat i eficàcia de la RT-DB quan s'administra conjuntament amb dexametasona i/o remdesivir	28 dies. No hi ha toxicitat aguda	Disminució de la intubació dels pacients tractats, reducció dels dies d'hospitalització
Sharma et al. ⁹ , 2021 NCT04394793	Estudi pilot	Institut de Ciències Mèdiques "All India" (Índia)	10	51	>8 anys, COVID-19 positius, malaltia moderada o severa, FR >24/min i/o SpO ₂ <94%	Única dosi de RT-DB	0,7 bilateral	Recuperació clínica basada en la puntuació de l'escala NEWS	14 dies. No hi ha toxicitat aguda	Millora clínica amb el sistema de puntuació de severitat NEWS
Arenas et al. ²⁸³ , 2021 (IPACOVID) NCT04380818	Estudi multicèntric, prospectiu i no randomitzat	Hospital Universitari Sant Joan de Reus, Hospital del Mar (Espanya)	36	84	COVID-19 positius moderat o sever, no aptes per a l'admissió a l'UCI degut a comorbiditats	Pacients tractats amb dexametasona, 1 amb tocilizumab, 1 amb remdesivir i 1 amb ambdós tractaments. Única dosi de RT-DB	0,5 bilateral	Millores de la FIO ₂ , la SaFi i la PaFi, de l'avaluació radiològica dels infiltrats pulmonars, del CURB-65 i de l'Índex de Barthel a 24 h i 7 dies després de la RT-DB en comparació amb els valors basals	1 mes. Sense efectes adversos	Augmenta la SaFi i millora del percentatge d'afectació pulmonar després d'una setmana de la RT-DB

Moreno-Omedo et al. ³⁴⁶ , 2021 (ULTRA-COVID) NCT04394182	Estudi preliminar	Hospital La Milagrosa (Espanya)	2	72,5	COVID-19 positius amb pneumònia i que no són candidats per a rebre ventilació mecànica ni presenten millora amb teràpia mèdica	Medicaments estàndard antivirals. Única dosi de RT-DB	0,8 bilateral	Millores a la puntuació de severitat utilitzant imatge de TC després d'1 i 4 setmanes del tractament, a la SpO ₂ , a la PaFi i als paràmetres immunològics i inflamatoris	2 mesos. Sense efectes adversos aguts	Disminució de l'afectació pulmonar
Sanmamed et al. ¹⁰ , 2022 (LOWRAD-Cov19) NCT04420390	Fase I/II, prospectiu, no randomitzat	Hospital San Carlos de Madrid (Espanya)	41	71	≥50 anys, COVID-19 positius, afectació bilateral dels pulmons en l'estudi d'imatge i requeriments d'O ₂	18 pacients reben antivirals i 32 pacients corticoesteroides. Única dosi de RT-DB	1 bilateral	Examen radiològic als 0, 3 i 7 dies després del tractament, basats en el sistema de Borghesi	60 dies. Apareix limfopènia després de la RT-DB	42% milloren la puntuació d'extensió pulmonar, incrementa la SaFi i disminueix la CRP
Magrini et al. ³⁴⁷ , 2022 (COLOR-19) NCT0437747	Estudi preliminar	Departament d'Oncologia radioteràpica, Universitat de Brescia (Itàlia)	3	74	≥50 anys, COVID-19 positius, puntuació de 2-3 a l'escala Brescia, resultats radiològics i criteris de laboratori	Única dosi de RT-DB	0,7 bilateral	Avaluació de la viabilitat de la RT-DB per tractar la COVID-19 per a continuar amb un estudi de fase II	10 dies. No hi ha toxicitat aguda	Manifesten viabilitat de la RT-DB
Ameri et al. ³³⁹ , 2022 NCT04390412	Estudi pilot	Hospital Imam Hossein (Iran)	10	75	>60 anys, COVID-19 positius o amb afectacions radiogràfiques característiques de pneumònia amb SpO ₂ ≤93% i FR >30/min	Única dosi de RT-DB en 9 pacients i doble dosi de 0,5 Gy al cap de 6 dies de la primera en un dels pacients	0,5 i 1 bilateral en grups de 5 pacients	Millora de la SpO ₂	28 dies. No es detecta toxicitat aguda	No s'observa una millora significativa de la SpO ₂
Singh et al. ³⁴³ , 2022 CTRI/2021/06/033912	Estudi randomitzat	Institut de Ciències Mèdiques "All India" de Nova Patna (Índia)	13 (6 control i 7 intervenció)	57	>18 anys, COVID-19 positius i moderada amb SpO ₂ <94% i FR >20/min	Medicació estàndard per la COVID-19. Única dosi de RT-DB	0,7 bilateral	Millores al sistema de puntuació NEWS-2 als pacients tractats respecte als controls	14 dies. No es detecta toxicitat aguda	Augmenta la SaFi al tercer dia post-tractament i es redueix la LDH, CRP, ferritina i dímer D al grup tractat respecte als valors basals
Ortiz et al. ³⁴⁸ , 2022 NCT04534790	Estudi prospectiu no randomitzat	Bajío National Medical Center, (Mèxic)	60 (29 control i 31 intervenció)	55	>18 anys, COVID-19 positius amb pneumònia confirmada i pacients amb ARDS moderat o sever	Tractament per a la pneumònia deguda a COVID-19. Única dosi de RT-DB	1 bilateral	Millores de la supervivència als pacients tractats respecte als controls	3 mesos. No reporten toxicitat aguda	Millores significatives de la supervivència als pacients tractats respecte als controls
Arenas et al. ³⁴⁹ , 2023 (IPACOVID) NCT04380818	Estudi no randomitzat de dues cohorts	Hospital Universitari Sant Joan de Reus, Hospital del Mar (Espanya)	100 (50 control i 50 intervenció)	85	COVID-19 positius, que no són candidats per a l'admissió a l'UCI per a rebre ventilació mecànica	Tots els pacients reben el tractament amb dexametasona, i al grup control, 1 tocilizumab i 4 remdesivir. Única dosi de RT-DB	0,5 bilateral	Augment de la PaFi a les 48 h	1 mes. No hi ha toxicitat aguda	Augmenta la SaFi després d'una setmana i la PaFi després d'un mes, hi ha un avenç de l'alta mèdica i augmenta la supervivència als pacients tractats

Abreviatures: CRP, proteïna C reactiva; CURB-65, criteris de confusió, urea, freqüència respiratòria i pressió sanguínia; FR, freqüència respiratòria; PaFi, ràtio de la pressió arterial d'oxigen per fracció inspirada d'oxigen; RT-DB, radioteràpia a dosis baixes; TC, tomografia computada de tòrax; SaFi, ràtio de la pressió arterial d'oxigen per fracció inspirada d'oxigen; SpO₂, saturació d'oxigen; UCI, unitat de cures intensives.

10.3. Aspectes a tenir en compte

L'ús de la RT-DB ha de tenir en compte diversos aspectes, com per exemple, el moment en el transcurs de la infecció en què s'ha de realitzar la irradiació, la seguretat del personal a les instal·lacions, tant pel risc d'infecció per SARS-CoV-2, com de la radiació, i la monitorització de l'estat de salut dels pacients³⁵⁰.

Referent al moment més idoni durant el curs de la infecció per SARS-CoV-2 en la que s'ha de realitzar el tractament amb la RT-DB, alguns autors hipotetitzen que la finestra terapèutica de la RT-DB es troba entre la fase pulmonar primerenca i l'aparició de l'estat hiperinflamatori que pot conduir a ARDS³⁵¹. Per aquesta raó, i amb l'objectiu d'augmentar l'eficàcia del tractament és necessari fer un seguiment dels biomarcadors d'inflamació per tal de determinar en quina fase es troba el pacient. Els diferents assajos clínics en què s'utilitza la RT-DB per al tractament de la COVID-19 presenten molta variabilitat pel que fa a l'interval de dies d'ençà que el pacient arriba a l'hospital fins que es realitza la RT-DB. En l'estudi de Magrini *et al.*³⁴⁷, aquest període de temps era de 12 dies fins al tractament, mentre que d'altres estudis com el d'Améri *et al.*³⁴⁴, Hess *et al.*⁸ i Sharma *et al.*⁹ presenten temps més curts de 2, 5 i 3 dies, respectivament. Per aquesta raó, caldria estandarditzar el moment òptim per a realitzar la RT-DB en el curs de la infecció de COVID-19 del pacient a partir del monitoratge de biomarcadors específics en sang.

Hi ha diversos avantatges de la RT-DB, que inclouen la disminució dels dies d'hospitalització del pacient, així com evitar la necessitat de requerir un ingrés a l'UCI. A més, s'ha demostrat àmpliament que la RT-DB pot millorar els paràmetres respiratoris i produir una reducció de l'estat hiperinflamatori. També, cal destacar que aquesta teràpia està dissenyada per aquells pacients que no són candidats a rebre ventilació mecànica i que no són aptes per a tractaments alternatius. Pel que fa a les limitacions, la probabilitat de dany secundari a la RT-DB és molt baixa perquè la gran majoria dels assajos clínics han mostrat que no hi ha toxicitat aguda. Només els estudis de Papachristofilou *et al.*³⁴⁰, i Sanmamed *et al.*¹⁰, reporten la presència de limfopènia, com a resultat de la RT-DB, tot i que els autors del segon suggereixen que el mateix SARS-CoV-2, així com el tractament amb dexametasona, poden influir en la població de limfòcits i que la majoria de pacients ja presentaven limfopènia abans de la radiació. Pel que fa al

risc de carcinogènesi derivat del tractament amb RT, l'ús de models computacionals ha permès avaluar aquest risc en pacients amb COVID-19 tractats amb RT-DB. En aquest estudi es va demostrar que el risc de carcinogènesi en dones és major que en homes i que la mama i els pulmons són els òrgans amb un risc més gran. També, que el risc dels òrgans fora del camp de la RT-DB, és a dir, aquells que es troben fora de la zona d'irradiació directa, però que reben dosis més baixes a causa del fenomen de dispersió, és negligible. Finalment, els autors defensen que en pacients de 80 anys o més, el risc de carcinogènesi de la RT-DB per al tractament de la COVID-19 és menor de l'1%³⁵². Per tant, en el cas de la COVID-19 i en pacients d'edats avançades és molt probable que l'acció terapèutica beneficiosa de la RT-DB superi significativament el risc d'aparició de tumors, avalant d'aquesta manera el desenvolupament de més assajos clínics. Aquests resultats tan esperançadors posen de manifest la necessitat de continuar investigant el tractament amb RT-DB, ja que més enllà de la COVID-19, aquest presenta un potencial terapèutic que podria obrir noves vies d'abordatge per a altres infeccions o malalties de base inflamatòria que, actualment, no compten amb opcions terapèutiques eficaces.

HIPÒTESI

HIPÒTESI

A principis del segle passat, la RT s'utilitzava per al tractament de la pneumònia oferint uns resultats prometedors fins que la introducció de les sulfonamides i la penicil·lina va conduir al seu desús. Actualment, la RT-DB s'empra per al tractament de malalties inflamatòries i artrodegeneratives, i aconsegueix beneficis terapèutics en els pacients tractats, tot i que el seu ús no és homogeni, existint països com Alemanya on aquesta s'utilitza freqüentment.

La infecció per SARS-CoV-2 en els casos més severos causa un dany pulmonar directe a les cèl·lules alveolars desencadenant una CS que és l'estat hiperinflamatori que agreuja la patologia pulmonar podent arribar a causar pneumònia i eventualment la mort.

La hipòtesi de la present tesi és que la RT-DB, per les seves reconegudes funcions antiinflamatòries i immunomoduladores, podria ser un tractament potencialment eficaç per a millorar la simptomatologia, l'evolució de la malaltia i la supervivència en pacients amb COVID-19 i pneumònia, a partir de l'efecte beneficiós de diversos mecanismes radiobiològics en el restabliment dels efectes deleteris de la infecció de SARS-CoV-2 sobre el sistema immune i la reducció de la CS.

OBJECTIUS

OBJECTIUS GENERALS

Tenint en compte el potencial terapèutic que té la RT-DB i els resultats encoratjadors dels assajos clínics realitzats fins al moment, que demostren la seva seguretat, es va dissenyar un assaig clínic no randomitzat prospectiu amb un grup control i un grup intervenció per a avaluar els efectes de la RT-DB en la pneumònia causada per la COVID-19 en pacients ancians. Un cop es van demostrar els beneficis terapèutics de la RT-DB en els nostres pacients, es va iniciar un segon estudi per a determinar si la presència de càrrega viral al sèrum dels pacients abans de la irradiació podia estar relacionada amb una major mortalitat, tanmateix també es van analitzar altres possibles factors pronòstic de risc i predictius de mortalitat en els nostres pacients.

OBJECTIUS ESPECÍFICS

Article 1

Treatment of COVID-19 pneumonia with low-dose radiotherapy plus standard of care versus standard of care alone in frail patients: The SEOR-GICOR IPACOVID comparative cohort trial.

Arenas M, Piqué B, Torres-Royo L, Acosta JC, Rodríguez-Tomás E, De Febrer G, Vasco C, Araguas P, Gómez JA, Malave B, Árquez M, Algara M, Montero A, Montero M, Simó JM, Gabaldó X, Parada D, Riu F, Sabater S, Camps J, Joven J.

Strahlenther Onkol, 1–10, 2023. Doi: 10.1007/s00066-023-02067-9.

El SARS-CoV-2 és capaç d'infectar cèl·lules immunes i alterar la distribució de les seves poblacions i el seu fenotip funcional. Això provoca una desregulació de la resposta immunitària que acaba induint una alliberació massiva de citocines proinflamatòries, incloent la IL-4, la IL-6 i el TNF- α , que rep el nom de CS.

De manera resumida, en els casos més crítics de la COVID-19, el SARS-CoV-2 pot inhibir la producció d'IFN I, que són activadors importants de la defensa antiviral de l'hoste, per part de les DC²³⁰ i les NK³⁵³. A més, el SARS-CoV-2 causa limfopènia i extenuació dels limfòcits^{246,354}, una reducció de la població de les cèl·lules NK i un augment dels monòcits¹⁶³ i els macròfags proinflamatoris¹⁸¹, entre altres efectes deleteris sobre el sistema immunitari. Aquesta alteració immunitària permet una lliure replicació del virus que incrementarà significativament la seva càrrega viral en l'hoste. Amb l'objectiu d'eliminar-lo, caldrà una secreció de citocines proinflamatòries molt amplificada que conduirà a l'estat hiperinflamatori característic de la CS. Aquesta resposta inflamatòria massiva no només es troba circumscrita als pulmons, sinó que es produeix sistèmicament, amb conseqüències patològiques extrapulmonars a diferents òrgans de l'hoste.

En aquest context, es podria hipotetitzar que els efectes antiinflamatoris i immunomoduladors de la RT-DB podrien, per una banda, inhibir la CS i per l'altra,

regular el sistema immunitari de l'hoste. Concretament, la RT-DB pot induir l'alliberació de citocines antiinflamatòries com el TGF- β i la IL-10^{4,6} a la vegada que limitar la secreció de les citocines proinflamatòries IL-6 i TNF- α ³³⁶. A més, també polaritza la població de macròfags cap a una major producció d'IL-10 i redueix el nombre de macròfags proinflamatoris productors d'IL-6²⁸². Pel que fa als seus efectes immunomoduladors, s'ha demostrat que la RT-DB causa un augment significatiu de la població i l'activació dels limfòcits T³²⁶ i incrementa la funció citotòxica de les NK i la secreció d'IFN- γ ^{321,323}.

Aquestes evidències preclíniques dels efectes de la RT-DB van impulsar el disseny d'assajos clínics per avaluar la seva seguretat i eficiència com a tractament per a la pneumònia causada per COVID-19. Els resultats d'aquests assajos clínics demostren millores a nivell de la funció respiratòria⁸⁻¹⁰, una reducció significativa de marcadors inflamatoris en sang³⁴³ i fins i tot, un increment de la supervivència dels pacients tractats amb RT-DB³⁴⁸, sense presentar signes de toxicitat aguda.

Durant el moment àlgid de la pandèmia de COVID-19, l'escassetat de dispositius respiratoris i la saturació a l'hospital, va fer que persones amb COVID-19 severa i que cursaven amb comorbiditats, no poguessin ser considerades per a l'admissió a l'UCI. Aquest context, juntament amb les evidències de l'acció terapèutica beneficiosa de la RT-DB reportada per altres assajos clínics primerencs, va impulsar el disseny d'un assaig clínic no randomitzat prospectiu amb un grup control i un grup intervenció que rebia una única dosi (0,5 Gy) de RT-DB. Això va permetre oferir a aquestes persones amb un pronòstic desfavorable, una teràpia alternativa que, tot i trobar-se encara en fase d'investigació, es preveia que podia aportar beneficis clínics significatius.

Els objectius del primer estudi són:

1. Increment de la ràtio de pressió parcial d'oxigen arterial/fracció inspirada d'oxigen (PaFi) i de la ràtio de saturació parcial d'oxigen/fracció inspirada d'oxigen (SaFi) a les 24 hores, a la setmana i al mes d'haver realitzat o no la RT-DB.

2. Milllores en la mortalitat i en la supervivència actuarial al cap de 30 dies del tractament.
3. Disminució de l'afectació pulmonar en l'examen radiològic.
4. Reducció dels dies d'hospitalització dels pacients i de la duració dels símptomes, i avenç de l'alta mèdica.

Article 2

SARS-CoV-2 Serum Viral Load and Prognostic Markers Proposal for COVID-19 Pneumonia in Low-Dose Radiation Therapy Treated Patients.

Piqué B, Peña K, Riu F, Acosta JC, Torres-Royo L, Malave B, Araguas P, Benavides R, de Febrer G, Camps J, Joven J, Arenas M, Parada D.

J Clin Med, 12(3):798, 2023. Doi: 10.3390/jcm12030798.

Els beneficis terapèutics de la RT-DB en el tractament de la COVID-19 s'han confirmat en diversos assajos clínics. Tot i que no s'han reportat efectes secundaris aguts i el risc de carcinogènesi radioinduïda amb RT-DB en pacients COVID-19 positius a partir de 80 anys és menor a l'1%³⁵², la presència de marcadors predictius que puguin ajudar a preveure l'eficàcia del tractament podria ser de gran utilitat. A més, la majoria d'assajos clínics realitzats fins a la data d'avui inclouen pacients en estats avançats de la malaltia. Diversos autors han hipotetitzat que el moment de l'evolució de la infecció de la COVID-19 en què s'administra la RT-DB determina l'eficàcia del tractament. Es creu que la finestra terapèutica òptima per a la RT-DB es troba entre la fase pulmonar i l'aparició de l'estat hiperinflamatori, i que un cop s'ha produït la CS, l'eficàcia del tractament disminueix³⁵¹. Tot i que encara queda un llarg camí a recórrer, sobretot per a poder dilucidar els mecanismes subjacents i les vies moleculars involucrades en la RT-DB, el monitoratge de marcadors inflamatoris a la sang i l'estudi d'una possible associació amb la mortalitat, podria resultar molt avantatjós. Per una banda, permetria saber si l'individu ja es troba en la fase hiperinflamatòria, i per l'altra, realitzar en un futur, una teràpia de RT-DB personalitzada en aquells pacients en els quals el marge terapèutic de millora és més gran.

Hi ha diversos factors de risc associats amb severitat i mortalitat de la COVID-19, inclosos l'edat, el gènere masculí³⁴, la presència de comorbiditats³⁵⁵ i la càrrega viral a la sang³⁵⁶, entre d'altres. També s'han descrit marcadors inflamatoris que reflecteixen el dany que s'està produint a l'hoste, com per exemple, el dímer D³⁵⁷, la ferritina³⁵⁸, l'AST³⁵⁹ i la LDH³⁶⁰.

Tot i que el risc d'aparició de tumors en pacients amb edats avançades és molt baix, en el context de la pandèmia de COVID-19, la necessitat de mobilitzar i sotmetre a irradiació a pacients greus, així com la manca de disponibilitat de les instal·lacions de RT, ens va conduir a estudiar si possibles marcadors sanguinis podrien estar associats amb una major taxa de mortalitat i de possible resposta a la RT. En aquest segon article ens hem plantejat investigar si la càrrega viral al sèrum abans del tractament en el grup de pacients tractats amb RT-DB està associada a una major mortalitat, ja que aquesta és un indicador de propagació sistèmica del virus i de dany pulmonar. També, hem volgut investigar si existeix relació entre la càrrega viral i altres factors de risc de severitat descrits prèviament a la literatura i, finalment, fer un cribratge preliminar i de manera teòrica, de diversos paràmetres sanguinis en el moment de la RT-DB que puguin ajudar a predir la mortalitat als 30 dies post-tractament.

Els objectius del segon estudi són:

1. Analitzar si la càrrega viral, ja sigui de forma categòrica (detectable vs. no detectable) o contínua, en sèrum 24 hores abans del tractament de RT-DB està associada amb una major mortalitat als 30 dies post-tractament.
2. Investigar si existeix una associació de la càrrega viral en sèrum amb una major puntuació de severitat del CURB-65 i d'aquest amb els nivells d'IL-6.
3. Determinar si la virèmia en sèrum és un factor que influencia la supervivència actuarial al cap de 30 dies després del tractament.
4. Estudiar si els individus virèmics presenten unes concentracions més elevades d'RNA total circulant al sèrum.
5. Fer un cribratge preliminar de diferents factors de risc, prèviament descrits a la literatura, i determinar si estan associats amb una major mortalitat en els pacients 30 dies després del tractament.
6. Investigar la capacitat predictora de mortalitat dels factors de risc, prèviament identificats, que estiguin relacionats amb la taxa de mortalitat de manera teòrica.
7. Examinar la correlació entre la càrrega viral al sèrum amb altres factors de risc.

RESULTATS

RESULTATS

Article 1

Treatment of COVID-19 pneumonia with low-dose radiotherapy plus standard of care versus standard of care alone in frail patients: The SEOR-GICOR IPACOVID comparative cohort trial.

Arenas M, Piqué B, Torres-Royo L, Acosta JC, Rodríguez-Tomás E, De Febrer G, Vasco C, Araguas P, Gómez JA, Malave B, Árquez M, Algara M, Montero A, Montero M, Simó JM, Gabaldó X, Parada D, Riu F, Sabater S, Camps J, Joven J.

Revista: *Strahlenther Onkol*, 1–10, 2023. Doi: 10.1007/s00066-023-02067-9.

Quartil: Medicine - Radiology, Nuclear Medicine and Imaging (Q1)

Factor d'impacte: 4.033 (2021)

DOI: 10.1007/s00066-023-02067-9



Treatment of COVID-19 pneumonia with low-dose radiotherapy plus standard of care versus standard of care alone in frail patients

The SEOR-GICOR IPACOVID comparative cohort trial

M. Arenas^{1,4} · B. Piqué² · L. Torres-Royo^{1,4} · J. C. Acosta^{1,4} · E. Rodríguez-Tomás^{1,3,4} · G. De Febrer⁵ · C. Vasco⁵ · P. Araguas^{1,4} · J. A. Gómez^{1,4} · B. Malave^{1,4} · M. Áquez^{1,4} · M. Algara^{6,7,8} · A. Montero⁹ · M. Montero¹⁰ · J. M. Simó¹¹ · X. Gabaldó¹¹ · D. Parada² · F. Riu² · S. Sabater¹² · J. Camps^{3,4} · J. Joven^{3,4}

Received: 4 October 2022 / Accepted: 19 February 2023

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany 2023

Abstract

Purpose To assess the efficacy of lung low-dose radiotherapy (LD-RT) in the treatment of patients with COVID-19 pneumonia.

Materials and methods Ambispective study with two cohorts to compare treatment with standard of care (SoC) plus a single dose of 0.5 Gy to the whole thorax (experimental prospective cohort) with SoC alone (control retrospective cohort) for patients with COVID-19 pneumonia not candidates for admission to the intensive care unit (ICU) for mechanical ventilation.

Results Fifty patients treated with LD-RT were compared with 50 matched controls. Mean age was 85 years in both groups. An increase in arterial oxygen partial pressure (PaO₂)/fraction of inspired oxygen (PAFI) in the experimental LD-RT-treated group compared to the control group could not be found at 48 h after LD-RT, which was the primary endpoint of the study. However, PAFI values significantly improved after 1 month (473 vs. 302 mmHg; $p < 0.0001$). Pulse oxymetric saturation/fraction of inspired oxygen (SAFI) values were also significantly higher in LD-RT-treated patients than in control patients at 1 week (405 vs. 334 mmHg; $p = 0.0157$) and 1 month after LD-RT (462 vs. 326 mmHg; $p < 0.0001$). All other timepoint measurements of the respiratory parameters were similar across groups. Patients in the experimental group were discharged from the hospital significantly earlier (23 vs. 31 days; $p = 0.047$). Fifteen and 26 patients died due to COVID-19 pneumonia in the experimental and control cohorts, respectively (30% vs. 48%; $p = 0.1$). LD-RT was associated with a decreased odds ratio (OR) for 1-month COVID-19 mortality (OR = 0.302 [0.106–0.859]; $p = 0.025$) when adjusted for potentially confounding factors. Overall survival was significantly prolonged in the LD-RT group compared to the control group (log-rank $p = 0.027$). No adverse events related to radiation treatment were observed.

Conclusion Treatment of frail patients with COVID-19 pneumonia with SoC plus single-dose LD-RT of 0.5 Gy improved respiratory parameters, reduced the period of hospitalization, decreased the rate of 1-month mortality, and prolonged actuarial overall survival compared to SoC alone.

Keywords COVID-19 pneumonia · Low-dose radiation therapy · Standard of care · Anti-inflammatory effects · Frail patients

Introduction

Person-to-person respiratory transmission of a new severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-Cov-2) led to the global pandemic that emerged in December 2019. At that time, an outbreak of pneumonia cases of unknown origin was reported in China, which were subsequently

✉ M. Arenas, MD, PhD
meritxell.arenas@urv.cat

Extended author information available on the last page of the article

recognized as the first cases of coronavirus disease 2019 (COVID-19). On March 12, 2020, the World Health Organization (WHO) formally declared that humankind was suffering from a pandemic with highly variable clinical manifestations. While most patients experience asymptomatic or mildly symptomatic infection, a minority of cases present with the severe form, with pneumonia, associated with a remarkable inflammatory response.

SARS-Cov-2 is an RNA virus with a lipid membrane taken from the host cells where viral proteins are inserted. The spike (S) protein is essential and gives the virus its name due to a corona-like appearance. SARS-Cov-2 uses the S protein to bind to host cells through a receptor-binding domain to the human angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) receptor [1]. COVID-19 infection is distinguished by a time sequence in which after the initial phase of viral replication, a small percentage of patients with SARS-CoV-2 infection experience a serious form of pneumonia due to dysregulation of the immune response, which triggers a cytokine-release syndrome [2]. Then, an excessive inflammatory response can lead to adult respiratory distress syndrome with severe respiratory failure due to attraction and accumulation of immune cells in the lung parenchyma [3], leading to acute lung tissue damage [4]. Cytokine dysregulation associated with SARS-Cov-2 infection has a distinctive profile, with decreases in some cytokines (CD3, CD4, CD8, interleukin [IL]-10, and interferon [IFN]), natural killer cells and B cells, while others are increased (IL-1, IL-2, IL-6, IL-4, IL-8, IL-17, tumor necrosis factor-alpha [TNF], G-CSF, GM-CSF [2, 4]).

Therefore, the medications currently approved for COVID-19 infection with pneumonia belong to two main groups: treatments administered to reduce viral replication and treatments with an anti-inflammatory effect. The most frequently used are remdesivir [5] and dexamethasone [6]. The efficacy of these treatments is controversial, with reports both for and against, and at best, the benefits are limited, which warrants investigation on new treatments for COVID-19. The anti-inflammatory potential of low-dose radiotherapy (LD-RT) has long been known, becoming an option for treating selected cases of patients with non-malignant inflammatory diseases [7, 8], including infectious pneumonia [9]. The anti-inflammatory effect of LD-RT is mediated by a decrease in polymorphonuclear and endothelial cells, decreased production of nitric oxide, increased activation of apoptosis mediators, and increased production of IL-10 [10] and transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) [11].

The ethical standards that mandate that assisted ventilation and admission to intensive care units (ICUs) should be limited to one segment of the population means that patients in the other segments have very limited therapeutic options. The strong anti-inflammatory effects of LD-RT could pre-

vent or reduce the inflammatory cascade caused by COVID-19. Therefore, to test the hypothesis that total-lung LD-RT treatment could benefit these patients by improving their oxygenation and decreasing mortality, we conducted a multicenter, prospective comparative clinical trial (IPACOVID trial, NCT04380818). The preliminary results of this trial have been reported previously [12] and the final results are reported herein.

Methods

Study design

This study was designed as a non-randomized comparison of two cohorts, with an ambispective design. Patients received standard of care (SoC) treatment in the control cohort or SoC plus LD-RT in the experimental cohort. SoC included antiviral or anti-inflammatory pharmacological treatment. We planned to include a prospective series of 50 consecutive patients in the experimental cohort and to compare the results with those of 50 consecutive patients in the control cohort, matched by age, gender, comorbidities, and the rate of pulse oxymetric saturation (SpO₂)/fraction of inspired oxygen (FiO₂; SAFI) values. The primary endpoint of the study was the difference in the variation of the rate of arterial oxygen partial pressure (PaO₂)/fraction of inspired oxygen (PAFI) between the experimental and the control cohorts measured at 48 h after LD-RT treatment. If PAFI measurement was not possible, SAFI was determined. Secondary endpoints were SAFI, adverse events, radiological response, overall mortality, and 30-day actuarial overall survival. The baseline reference date had to be the day of the LD-RT treatment in the experimental cohort and the day of the start of SoC treatment for COVID-19 pneumonia in the control cohort. Clinical follow-up and radiological parameters were assessed before LD-RT, at 7 days, and 1 month after treatment. PAFI and SAFI ratios were assessed at 24 h, 1 week, and 1 month after treatment. Radiological CT scan images were classified according to the degree of parenchymal involvement. CURB-65 score (based on age, vital signs, urea level, and presence of confusion) was used to assess the severity of pneumonia and to predict mortality risk (score 1 assigned to low risk and scores 3 or 4 assigned to high risk). In the control group, the diagnosis was made with chest X-ray.

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki in its latest version, Fortaleza 2013, and was approved by the institutional review board (IRB) of the Hospital Universitari Sant Joan de Reus (project code: 089/2020). All patients allocated to the prospective experimental cohort provided written informed consent. Patients allocated to the retrospective control cohort did not pro-

vide consent to the IRB agreement (most patients had died, others were discharged and lost to follow-up; data were anonymized and taken from a single, one-time retrospective review without further follow-up).

Patients

Patients eligible for the prospective study were diagnosed with COVID-19 pneumonia, deemed to not be candidates for invasive mechanical ventilation and therefore not admitted to the ICU, who were treated during the acute phase of the viral infection with a single dose of 0.5 Gy to the whole thorax. Patients included in the study were those aged 18 years and over, with fewer than 8 days from onset of symptoms or having PAFI below 300 or SAFI below 315, needing supplemental oxygen, and receiving standard COVID-19 medication at appropriate doses. Also, the lung infiltrates has to affect more than 50% of the parenchyma and present one of the following biochemical changes: dimer-D > 1500 ng/mL, IL-6 > 40 UI, CRP > 100 mg/l.

Treatment

It was planned for all patients to undergo CT for simulation using a simple and repositionable immobilization device (pillow and leg wedge) exclusively for COVID-19 patients. For the preparation and administration of the treatment, all the necessary measures had to be taken to guarantee the safety of patients and staff faced with the risk of SARS-CoV-2 infection, following the regulations and instructions of the hospital. On the day of treatment, two technicians wearing appropriate personal protective equipment worked with the patient. The treatment of patients with COVID-19 pneumonia was carried out in the same linear accelerator, grouping all patients in the same time slot to avoid the risk of transmission to other patients. According to the established protocol, the room was decontaminated after completing the treatments.

The planning of the irradiation volume was based on the definition of the clinical target volume (CTV) involving the volume of both lungs, which was increased by 5 mm in all directions. Planning was carried out to achieve a homogeneous distribution in the area to be treated that met International Commission on Radiation Units (ICRU) criteria of between 95% and 107% of the prescribed dose [13]. The heart was defined as the organ at risk and the dose received was calculated, although it was not necessary to establish dose limits in critical organs beyond the ALARA principle (as low as reasonably achievable), in accordance with the common procedure with the use of ultra-low doses [14]. Patients had to receive a dose of 0.5 Gy in a single dose.

Statistical analyses

For sample size calculation, to demonstrate that a 50% difference between the medians of the PAFIs is statistically significant from the 20% expected, with an alpha risk of 0.05 and a beta risk of less than 0.2 in a bilateral contrast, accepting a loss of patients of 10%, with a 1:1 allocation, it was necessary to include 100 patients, 50 in the experimental group and 50 in the control group. We used the Mann–Whitney U test to compare continuous clinical variables in the two groups. We used Fisher's exact test to assess differences between categorical variables. Multiple groups were compared with the Kruskal–Wallis test or the analysis of variance (ANOVA) test. Multivariable logistic regression was used to calculate odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI) to evaluate the association between clinical risk factors and COVID-19 mortality. Categorical variables were expressed as frequencies and percentages, and continuous variables were presented as means and standard deviation. Kaplan–Meier curves and the log-rank test were used to calculate actuarial survival. Statistical analyses, logistic regressions, and graph representations were performed in SPSS Statistics version 25 (IBM SPSS Statistics, Armonk, NY, USA) and GraphPad Prism 8.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Results

Baseline demographics

Between June 15, 2020, and February 28, 2021, 50 inpatients treated at a single center were included (LD-RT-treated experimental cohort) and compared with 50 inpatient controls matched blindly by age, gender, comorbidities, and SAFI values (control cohort). Table 1 shows the demographic, clinical, and imaging baseline characteristics of the patients. Mean age was 85 years, and 46% of the patients were female in both groups. Participants presented a similar incidence of comorbidities, including neurological (28% vs. 38%), cardiovascular (82% in both groups), and respiratory diseases (40% vs. 28%) in the LD-RT-treated group and the control group, respectively. SoC treatment for COVID-19 was dexamethasone for all patients in both groups. In addition, one patient had received tocilizumab and four patients remdesivir in the control group. The functional status of the participants according to the Barthel index was not statistically different between the two groups. However, the control group presented a higher number of minimally dependent patients ($p=0.044$). Also, when looking at the Geriatric Depression Scale, there was heterogeneity in the cognitive decline status, with only one LD-RT-treated patient in the moderate cognitive decline classifica-

Table 1 Baseline characteristics of patients with COVID-19 treated with low-dose radiotherapy (LD-RT) and control patients

Characteristic	LD-RT cohort (n = 50)	Control cohort (n = 50)	p-value
Female sex ^b	23 (46)	23 (46)	>0.999
Age ^a	84.74 ± 6.583	85.04 ± 6.934	0.819
<i>Comorbidities</i> ^b			
Neurological diseases	14 (28)	19 (38)	0.395
Cardiovascular diseases	41 (82)	41 (82)	>0.999
Respiratory diseases	20 (40)	14 (28)	0.291
Other comorbidities	44 (88)	37 (74)	0.125
<i>Pharmacological treatment</i> ^b			
Corticosteroids (dexamethasone)	50 (100)	50 (100)	–
Tocilizumab	0 (0)	1 (2)	–
Remdesivir	0 (0)	4 (8)	–
<i>Functional status (Barthel index)</i> ^b			
Independent	9 (18)	15 (30)	0.241
Minimally dependent	19 (38)	9 (18)	0.044*
Partially dependent	12 (24)	11 (22)	>0.999
Very dependent	7 (14)	6 (12)	0.234
Totally dependent	3 (6)	9 (18)	0.121
<i>Geriatric Depression Scale (GDS)</i> ^b			
No cognitive decline	25 (50)	16 (32)	0.103
Very mild cognitive decline	10 (20)	10 (20)	>0.999
Mild cognitive decline	9 (18)	5 (10)	0.388
Moderate cognitive decline	1 (2)	11 (22)	0.004*
Moderately severe cognitive decline	2 (4)	4 (8)	0.678
Severe cognitive decline	3 (6)	4 (8)	>0.999
Very severe cognitive decline	–	–	–
Basal SpO ₂ ^a	93.20 ± 2.969	93.32 ± 3.395	0.832
Basal SAFI (SpO ₂ /FiO ₂) ^a	280.86 ± 93.021	274.88 ± 88.41	0.572
Mild (310–460)	29 (58) ^b	28 (56)	0.820
Moderate (160–310)	10 (20)	10 (20)	0.774
Severe (<160)	11 (22)	12 (24)	>0.999
<i>CURB-65 score</i> ^b			
Score 1	–	–	–
Score 2	13 (26.5)	13 (26)	>0.999
Score 3	26 (53.1)	15 (30)	0.025*
Score 4	10 (20.4)	22 (44)	0.018*
Score 5	–	–	–
<i>First radiological findings</i> ^b	<i>CT</i>	<i>Chest X-ray</i>	
CT lung involvement <5%	–	None: 1 (2)	–
CT lung involvement 5–25%	1 (2)	Unilateral: 4 (8)	–
CT lung involvement 26–49%	8 (16)	NA	–
CT lung involvement 50–75%	23 (46)	Bilateral: 45 (90)	–
CT lung involvement >75%	17 (34)	NA	–

SAFI ratio of pulse oximetry saturation (SpO₂) to fractional inspired oxygen (FiO₂), CURB-65 clinical criteria validated to guide the treatment of community-acquired pneumonia based on confusion, BUN respiratory rate, systolic blood pressure and age, CT computed tomography, NA not available

^aData shown as mean ± standard deviation

^bData shown as number of patients and percentages in parenthesis

*Statistically significant p-value

Table 2 Comparison of outcomes between the case groups treated with low-dose radiotherapy (LD-RT) and the control group

Outcome	LD-RT cohort (n = 50)	Control cohort (n = 50)	p-value
Duration of symptoms (d) ^a	5.10 ± 1.644	6.88 ± 3.662	0.015*
Duration of hospitalization (d) ^a	18.58 ± 13.902	20.04 ± 56.845	0.010*
Discharge from hospital (d) ^a	22.69 ± 14.915	31.46 ± 79.821	0.047*
Final status, 1 month after treatment ^b			
Alive	32 (64)	24 (48)	0.158
Death due to COVID-19	15 (30)	24 (48)	0.100
Death due to other causes	3 (6)	2 (4)	>0.999

^aData shown as mean ± standard deviation^bData shown as number of patients and percentage in parenthesis

*Statistically significant p-value

tion grade, whereas 11 patients were classified as such in the control group ($p=0.004$). We believe that these heterogeneities appear as a result of difficulties in recruitment. It is important to bear in mind that incomprehension of the treatment or agitation is, worldwide, a contraindication for radiotherapy, considering patient's safety.

A CURB-65 score of 3 for the severity of pneumonia was reported more frequently in the patients in the LD-RT-treated group (54% vs. 30%; $p=0.025$), while a CURB-65 score of 4 was reported more frequently in the control group (21% vs. 44%; $p=0.018$). Although higher CURB-65 scores are associated with higher mortality, the differences in CURB-65 scores within the different groups were analyzed and there were no significant differences in the mortality ratio. This could be due to the fact that there is an homogenization between groups and, consequently, the generally reported effect that higher CURB-65 scores are associated with higher mortality was not observed in this sample. To further investigate whether a different distribution of CURB-65 at baseline in the control and the LD-RT-treated groups could have an impact on COVID-19 mortality and hospitalization, the following groups were considered: control group vs. LD-RT-treated group both with CURB-65 scores of 4, control group vs. LD-RT-treated group both with CURB-65 scores of 3, and, finally, control group vs. LD-RT-treated group both with CURB-65 scores of 2. None of the groups showed a significant association with either COVID-19 mortality (using a Fisher's exact test) or hospitalization length (employing the Mann–Whitney U test) when comparing the same CURB-65 scores in both studied groups before LD-RT treatment. Most patients (46%) in the experimental group had a value higher than 50% of lung parenchyma affected before irradiation, as measured with CT scan, while most patients in the control group (90%) had bilateral pneumonia assessed with chest X-ray. No differences were observed between the groups in terms of pre-irradiation SpO₂ and SAFI values.

Outcomes

Thirty-four patients (68%) in the LD-RT cohort were evaluated 1 week after irradiation (11 patients died within 1 week and five were in too poor a condition for further examination) and 32 patients (64%) were evaluated 1 month after LD-RT. During the first week, 11 and 15 patients died in the LD-RT and control groups, respectively. In the experimental group, 18 (36%) patients died, of whom 15 died due to COVID-19 pneumonia and three due to other causes, whereas in the control group, 26 patients died (56%), 24 were due to COVID-19 pneumonia and two due to other causes (Table 2).

Regarding respiratory parameters, our primary endpoint hypothesis was not fulfilled due to PAFI values not improving by over 20% at 48 h after LD-RT treatment. However, a post-hoc analysis showed significant long-term respiratory parameter improvement. At baseline, respiratory parameters revealed no differences between the experimental and the control cohorts, but a post-hoc analysis showed that significant changes in respiratory parameters appeared 1 week after the intervention. Seven days after treatment, LD-RT-treated patients experienced a significant increase in SpO₂ (97% vs. 94%; $p=0.0052$) and a significant reduction in the FiO₂ they needed (27% vs. 35%; $p=0.038$; Fig. 1). Regarding PAFI (277 vs. 252; $p=0.113$) and SAFI (297 vs. 292; $p=0.577$) parameters, no significant differences were found at 24 h after treatment. At 1 week after treatment, the LD-RT-treated patients' SAFI values were significantly higher than in control patients (405 vs. 334; $p=0.0157$), but no PAFI differences were reported (360 vs. 301; $p=0.117$). A significant improvement was observed in all respiratory parameters in the LD-RT group after 1 month of LD-RT compared with the control group: SpO₂ (97 vs. 95; $p<0.0051$), FiO₂ (21% vs. 36; $p=0.0002$), SAFI (462 vs. 326; $p<0.0001$), and PAFI (473 vs. 302; $p<0.0001$; Fig. 2). All other timepoint measurements of the respiratory parameters were similar across the groups (Fig. 2).

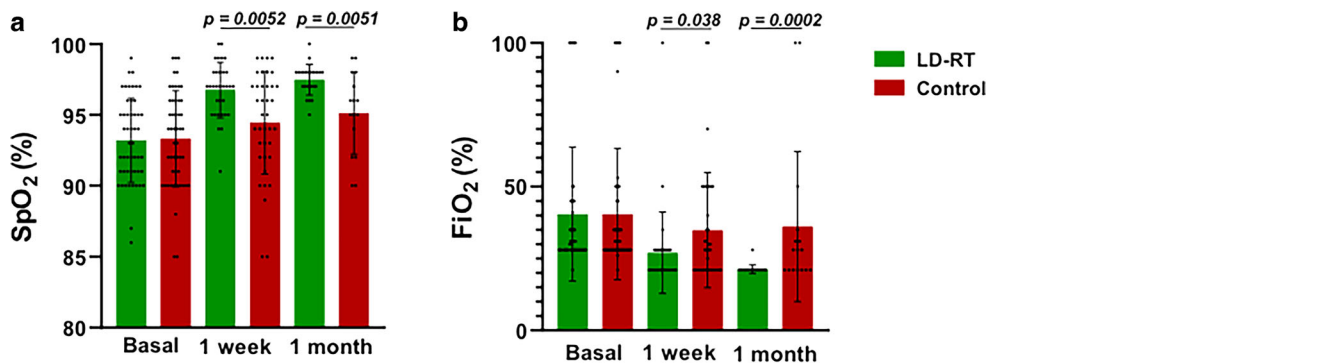


Fig. 1 Comparison of SpO₂ and FiO₂ parameters between the LD-RT-treated and the control group at different timepoints. **a** SpO₂ values in treated and control patients at baseline ($n=50$), at 1 week (LD-RT $n=32$, control $n=38$), and at 1 month (LD-RT $n=23$ and control $n=16$). **b** FiO₂ values in treated and control patients at baseline ($n=50$), at 1 week (LD-RT $n=34$, control $n=38$), and at 1 month (LD-RT $n=23$, control $n=16$). Data are expressed as mean \pm standard deviation. P -values are from a Mann–Whitney test

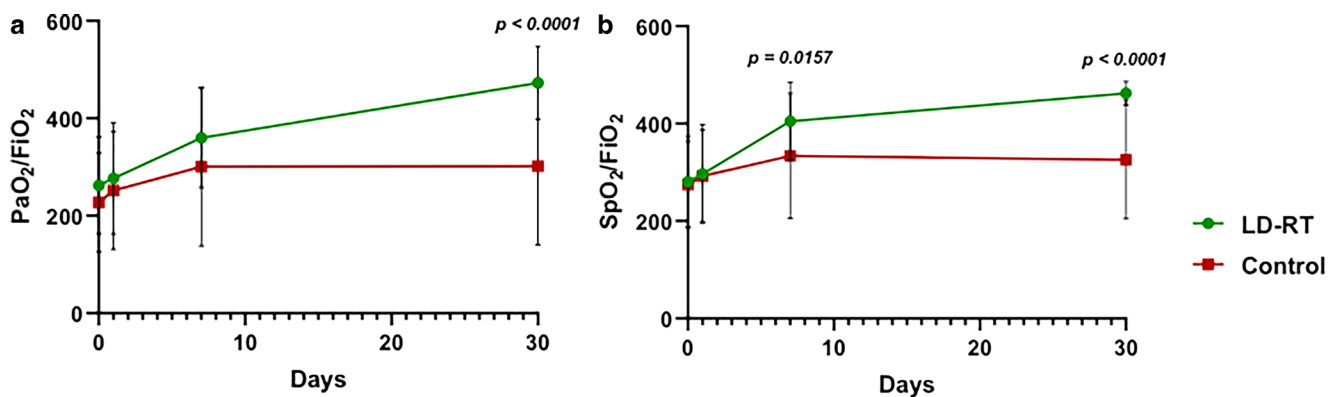


Fig. 2 Evolution of respiratory parameters PAFi and SAFi in patients treated with LD-RT and control patients. **a** PAFi (PaO₂/FiO₂) values in treated and control patients at baseline (LD-RT $n=48$, control $n=50$), at 24 h (LD-RT $n=47$, control $n=46$), at 1 week (LD-RT $n=32$, control $n=38$), and at 1 month (LD-RT $n=23$, control $n=16$). **b** SAFi (SpO₂/FiO₂) values in treated and control patients at baseline (LD-RT and control $n=50$), at 24 h (LD-RT and control $n=46$), at 1 week (LD-RT $n=33$, control $n=38$), and at 1 month (LD-RT $n=28$, control $n=16$). Data are expressed as mean \pm standard deviation. P -values are from a Mann–Whitney test

The length of hospitalization was not an endpoint in the IPACOVID trial. However, regarding the global health crisis during the COVID-19 pandemic, these data were extracted from our cohorts. Using Mann–Whitney U, the length of hospitalization was significantly shorter in the LD-RT-treated group than in the control group (19 vs. 20 days; $p=0.01$). Patients allocated to the experimental group were discharged from the hospital significantly earlier (23 vs. 31 days; $p=0.047$). Fifteen and 26 patients died due to COVID-19 pneumonia in the experimental and control cohorts, respectively, resulting in a non-significant trend towards lower mortality due to COVID-19 (30 vs. 48%; $p=0.1$). Three and two patients died of other causes in the LD-RT and control cohorts, respectively. The same trend was observed for all-cause mortality (36% vs. 56%; $p=0.158$; Table 2). When adjusted for potentially confounding factors (sex, age, comorbidities, and number of days with symptoms), only age and LD-RT treatment showed a significant association with COVID-19 mortality (Table 3). Specifically, age was associated with an increased

odds ratio (OR) for COVID-19 mortality (OR=1.147; 95% confidence interval [1.033–1.272]; $p=0.010$) whereas LD-RT was associated with a decreased OR for COVID-19 mortality (OR=0.302 [0.106–0.859]; $p=0.025$). Therefore, the odds of dying due to COVID-19 were significantly reduced by 70% in patients treated with LD-RT. In line with this, actuarial analysis with Kaplan–Meier curves showed prolonged survival in the LD-RT group compared to the control group (log-rank $p=0.027$; Fig. 3). We considered the log-rank test to be the best statistical method to estimate survival over time, rather than Mann–Whitney U, as reported previously, due to the fact that the specific time of patient death was known.

One week after treatment, 35 patients (70%) underwent a CT scan in the experimental group. According to the comparison with percentage of lung parenchyma involved at baseline CT scan, 66% of patients experienced radiological improvement (no patient had >75% involvement, 5 [14%] had involvement of 50–75%, 13 [37%] of 25–50%, 13 [37%] of 5–25%, and 4 [11%] involvement <5%). Only

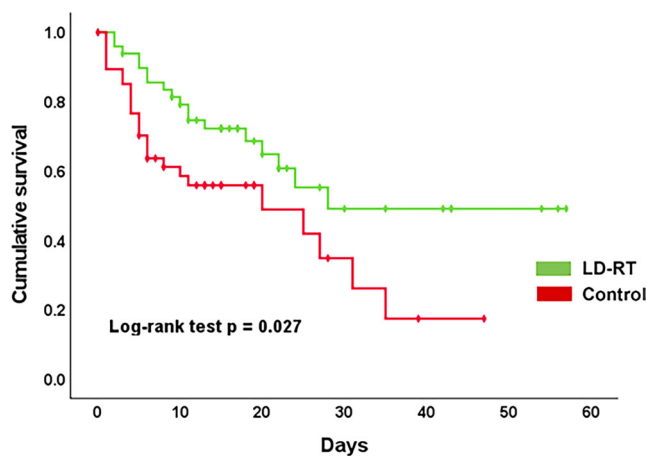
Table 3 Multivariate logistic regression analysis of factors associated with COVID-19 mortality

Factors associated with mortality	OR (95% CI)	p-value
LD-RT treatment	0.302 (0.106–0.859)	0.025*
Sex (female)	0.859 (0.331–2.231)	0.755
Age	1.147 (1.033–1.272)	0.010*
Neurological disease	1.592 (0.567–4.484)	0.377
Respiratory disease	1.838 (0.654–5.155)	0.249
Cardiovascular disease	1.044 (0.250–4.348)	0.953
Other comorbidities	3.311 (0.769–14.286)	0.108
Days with symptoms	0.927 (0.773–1.111)	0.410

Data were obtained from a multivariate logistic regression model including the different clinically relevant factors able to be associated with the following outcomes: COVID-19 death, death from other causes, and alive. This table shows concretely the odds for COVID-19 mortality compared to alive patients
OR odds ratio, *CI* confidence interval

one patient experienced radiological worsening, and another experienced no changes on CT images. One month after LD-RT, 29 patients had their comparative CT, and 2% (1/29) of patients presented 25–50% parenchyma involvement, 10% (5/29) presented 5–25% involvement, and 46% (23/29) presented <5% involvement. In the control group, the image obtained during the diagnosis was a chest X-ray. The second control was taken after a mean of 33 days in 28 patients. Forty percent of the patients experienced radiological improvement, and 16% experienced radiological worsening, with an increased area of parenchymal infiltration. In the control group, 15 patients died in the first week, and seven did not get the image control after individual clinical decisions.

No acute adverse events related to radiation treatment were observed.

**Fig. 3** Kaplan–Meier overall survival curves stratified according to LD-RT treatment or control group. ■■■■

Discussion

The results of this study show that SoC treatment plus LD-RT significantly improved respiratory parameters compared with SoC alone in patients with COVID-19 pneumonia. This improvement was associated with a reduction in the percentage of lung volume involvement and a statistically nonsignificant but numerically remarkable improvement in 1-month mortality from half in the SoC cohort to one third in the LD-RT cohort. LD-RT treatment is associated with lower mortality due to COVID-19 pneumonia when adjusted for risk factors and a prolonged actuarial overall survival. Of note, these benefits were achieved with no acute adverse events experienced by patients.

One of the most relevant concerns of radiation treatment for patients with COVID-19 is the safety of healthcare personnel and other patients using the same facilities [15]. The movement of patients with an infectious contagious disease through the hospital is an unavoidable risk that has to be minimized. In our experience with 50 patients, we did not observe any outbreaks as a result of the treatment during this clinical trial. The careful use of personal protective equipment and individual material for the patients, and the disinfection of the surfaces of the facilities, have allowed this successful result, adding to reports in the recently published studies that we will comment on below. Although these procedures may seem time consuming, such treatment is possible if coordinated well [16]. Furthermore, if the patients' benefit was indisputable, assuming a reasonable level of risk in a controlled manner and making every effort to avoid it should not be an obstacle to the implementation of this treatment for COVID-19 pneumonia in the future.

The results of the present study, the largest of those published to date, run opposite to the results of the other comparative study, which is the only randomized one available to date. Indeed, Papachristofilou et al. reported the results of a randomized trial [17] in which 22 elderly and comor-

bid patients undergoing mechanical ventilation in the ICU were randomized to LD-RT vs. sham irradiation. No benefit of LD-RT was observed in that study, measured as ventilator-free interval and 28-day mortality. However, 22 patients seem too small a sample size for a randomized trial, and the lack of statistical power may have impacted this negative result. Nevertheless, that study had a positive design feature with a sham irradiation control group, which should be the standard control in randomized trials of radiation in patients with COVID-19 pneumonia. Another two randomized trials, one of them for patients with moderate COVID-19 (seven patients in the LD-RT arm and six in the control group) [18] and the other for patients with moderate to severe COVID-19 (34 patients in the LD-RT and 17 patients in the control group) [19], have shown that LD-RT can be an option for these patients. Another study, a prospective comparative cohort with 58 patients (31 in the treatment group and 29 in the control group), has demonstrated that LD-RT could be an alternative to lessen the mortality of patients with moderate COVID-19 pneumonia [20]. Other previous reports are based on small case series, with two cases [21], nine cases [22], and ten cases [23–25]. A systematic review published recently including four studies with 61 patients does not support mortality benefit, clinical course improvement, or imaging changes with LD-RT [17, 22–26]. The present study shows benefits for respiratory function and mortality at 1 month and radiological improvement, the latter being more difficult to compare between groups due to different evaluation methods (thoracic CT vs. chest X-ray). The other noncomparative studies evaluated the same parameters and also found improvement in one or more of these endpoints. Thus, an impact on radiological [21], clinical [22], or respiratory parameters [19, 20] has been observed in some studies, while in others, improvement was observed for a combination of clinical and radiological endpoints [18]. We administered a dose of 0.5 Gy, which is in line with that administered to patients with COVID-19 pneumonia in these previous studies, ranging from 0.5 Gy [20] to 1.5 Gy [21]. The mean age of study participants is over 70 in almost all of these studies, including one in which the mean age was 90 years [21]. Our study sample also consisted of elderly and frail patients. Investigating initially in frail patients not admitted to ICUs made sense, as it allowed us to offer these patients the treatment option under investigation. At the same time, if it resulted beneficial, LD-RT could be considered in the future to treat patients during the acute phase, before mechanical ventilation becomes necessary. This could be valuable in other similar scenarios in which the health system could collapse, resulting in a shortage of respiratory devices. We note that a subgroup of these patients rapidly worsened, although that was due to COVID-19 infection, not LD-RT, because this deterioration was also reported in patients in the control

cohort who did not receive radiotherapy. This issue raises the need to investigate this strategy in less frail patients using LD-RT associated with SoC, including mechanical ventilation and ICU admission.

This study has several weaknesses. The non-randomized design cannot definitively establish causality. The retrospective nature of the control cohort may be of concern. The comparability of the radiological imaging is not optimal for establishing causality, because in patients treated with LD-RT, thoracic CT was used, and in the patients of the control cohort, chest X-ray. Furthermore, better homogenization between the control and the cohort groups was limited owing to the fact that this study was conducted during the COVID-19 outbreak and hospital personnel were clearly overwhelmed. In addition, patients fitting our inclusion criteria were limited, and difficulties were also encountered regarding the organization of a study involving irradiation. Although some parameters such as age, gender, comorbidities, and respiratory parameters were homogenous, others such as grade of independence and cognitive decline were more difficult to match between the groups. Several factors hindered a higher homogenization between the two groups, including the reluctance of potential candidates and physicians to participate in a radiotherapy study, the advanced age of patients, and agitation, which is a significant contraindication to radiotherapy. On the other hand, a strength of the study is its sample size, which compares favorably with previous studies, as well as the concordance of improvement in the three endpoints (respiratory function, mortality at 1 month, and radiological assessment), suggesting that LD-RT could be related to better outcomes observed in the experimental group. The next steps in COVID-19 research are difficult to predict, because they will depend on how the pandemic evolves. Let us suppose it behaves as it has so far, with successive waves of greater or lesser intensity. In that case, a multicenter effort is needed to conduct a prospective randomized clinical trial of SoC plus LD-RT versus SoC plus sham irradiation, given that the data from the studies conducted so far indicate a possible benefit of this treatment, even though this has not yet been demonstrated conclusively [15]. Also, the most pressing issues would seem to be the leap to including less frail patients in the sample and combining LD-RT in an experimental regimen in patients admitted to the ICU.

In conclusion, although in this prospective, non-randomized comparative study, SoC plus LD-RT 0.5 Gy single dose to treat frail patients with COVID-19 pneumonia did not meet the primary endpoint, we observed an improvement of respiratory parameters, 1-month mortality, and actuarial overall survival compared to SoC alone, thus fulfilling the secondary endpoints. No acute radiation-related adverse events were observed. Further multicenter collaboration in a large randomized trial including patients in earlier stages

of infection is key to determining the actual value of LD-RT for treating COVID-19 pneumonia.

Acknowledgements To the Spanish Group for Clinical Research in Radiation Oncology—Spanish Society of Radiation Oncology (GICOR-SEOR 2020) for an extraordinary grant for radiation research during COVID-19 to cover the cost of legal insurance for the clinical trial.

To all professionals who make the treatment of patients possible: radiotherapy technicians, nurses, physicists, hospital porters, cleaning staff, and all the doctors, especially M. Arguís, D. Gómez, F.A. Castaño, J. Trilla, M. Murcia, Y. López, and E. Roquer.

Funding Grant from the Spanish Group for Clinical Research in Radiation Oncology—Spanish Society of Radiation Oncology (GICOR-SEOR 2020) for radiation research during COVID-19 to cover the cost of legal insurance for the clinical trial.

Author Contribution Conceptualization of the study: M.A.R., M.A.L., and Á.M.; methodology of the study: M.A.R. and M.A.L.; formal analysis: E.R.-T., J.C.A., L.T.-R., G.D.F., G.B.-G., H.C., A.J., C.V., and P.A.; investigation of the study: J.G., B.M., M.Á., D.C., J.M.S., X.G.-B., B.P., and S.S.; writing—original draft preparation: E.R.-T., J.C., J.J., and M.A.R.; writing—review and editing the manuscript: E.R.-T., J.C., J.J., and M.A.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Conflict of interest M. Arenas, B. Piqué, L. Torres-Royo, A.J. Acosta, E. Rodríguez-Tomás, G. De Febrer, C. Vasco, P. Araguas, J.A. Gómez, B. Malave, M. Árqez, M. Algara, A. Montero, M. Montero, J.M. Simó, X. Gabaldó, D. Parada, F. Riu, S. Sabater, J. Camps and J. Joven declare that they have no competing interests.

References

- Zhang H, Penninger JM, Li Y, Zhong N, Slutsky AS (2020) Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target. *Intensive Care Med* 46:586. <https://doi.org/10.1007/s00134-020-05985-9>
- Cao X (2020) COVID-19: immunopathology and its implications for therapy. *Nat Rev Immunol* 20:269–270
- Fung TS, Liu DX (2014) Coronavirus infection, ER stress, apoptosis and innate immunity. *Front Microbiol* 5:296
- Shi Y, Wang Y, Shao C et al (2020) COVID-19 infection: the perspectives on immune responses. *Cell Death Differ* 27:1451–1454
- Beigel JH, Tomashek KM, Dodd LE et al (2020) Remdesivir for the treatment of Covid-19—final report. *N Engl J Med* 383:1813–1826
- Horby P, Lim WS, Emberson JR et al (2021) Dexamethasone in hospitalized patients with Covid-19. *N Engl J Med* 384:693–704
- Arenas M, Sabater S, Hernández V et al (2012) Anti-inflammatory effects of low-dose radiotherapy. *Strahlenther Onkol* 188:975–981
- Torres Royo L, Antelo Redondo G, Árqez Pianetta M, Arenas Prat M (2020) Low-Dose radiation therapy for benign pathologies. *Rep Pract Oncol Radiother* 25:250–254
- Calabrese EJ, Dhawan G (2013) How radiotherapy was historically used to treat pneumonia: could it be useful today? *Yale J Biol Med* 86:555
- Rödel F, Frey B, Manda K et al (2012) Immunomodulatory properties and molecular effects in inflammatory diseases of low-dose x-irradiation. *Front Oncol* 2:120
- Arenas M, Gil F, Gironella M, Hernández V et al (2008) Time course of anti-inflammatory effect of low-dose radiotherapy: correlation with TGF-beta(1) expression. *Radiother Oncol* 86:399–406
- Arenas M, Algara M, De Febrer G et al (2021) Could pulmonary low-dose radiation therapy be an alternative treatment for patients with COVID-19 pneumonia? Preliminary results of a multicenter SEOR-GICOR nonrandomized prospective trial (IPACOVID trial). *Strahlenther Onkol* 197:1010–1020
- ICRU (1999) Prescribing, recording, and reporting photon beam therapy (supplement to ICRU report 50). In: ICRU Report, vol 62. International Commission on Radiation Units and Measurements, Bethesda
- <https://www.cdc.gov/nceh/radiation/alara.html>. Accessed 19 Jan 2022
- Mortazavi SMJ, Shams S, Mohammadi S, Mortazavi AR, Sihver L (2021) Low-dose radiation therapy for COVID-19: a systematic review. *Radiation* 1:234–249
- Bonet M, Vázquez S, García E et al (2021) Saving time in the radiotherapy procedures for COVID-19 pneumonia treatment. A single-institution experience. *Clin Transl Oncol* 23:2344–2349
- Papachristofilou A, Finazzi T, Blum A et al (2021) Low dose radiation therapy for severe COVID-19 pneumonia: a randomized double-blind study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 110:1274–1282
- Sing P, Mandal A, Singh D (2022) Interim analysis of impact of adding low dose pulmonary radiotherapy to moderate COVID-19 pneumonia patients: IMPACT-RT study. *Front Oncol* 12:822902
- Ganesan G, Ponniah S, Sundaram V et al (2021) Whole lung irradiation as a novel treatment for COVID-19: Interim results of an ongoing phase 2 trial in India. *Radiother Oncol* 163:83–90
- Ortiz CS, Hernández D, Trujillo C et al (2022) The clinical efficacy of low-dose whole-lung irradiation in moderate-to-severe COVID-19 pneumonia: RTMX-20 trial. *Radiother Oncol* 166:133–136
- Moreno-Olmedo E, Suárez-Gironzini V, Pérez M, Filigheddu T et al (2021) COVID-19 pneumonia treated with ultra-low doses of radiotherapy (ULTRA-COVID study): a single institution report of two cases. *Strahlenther Onkol* 197:429–437
- Sanmamed N, Alcantara P, Cerezo E et al (2021) Low-dose radiation therapy in the management of Coronavirus disease 2019 (COVID-19) pneumonia (LOWRAD-Cov19): preliminary report. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 109:880–885
- Ameri A, Ameri P, Rahnama N et al (2021) Low-dose whole-lung irradiation for COVID-19 pneumonia: final results of a pilot study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 109:859–866
- Hess CB, Buchwald ZS, Stokes W et al (2020) Low-dose whole-lung radiation for COVID-19 pneumonia: planned day 7 interim analysis of a registered clinical trial. *Cancer* 126:5109–5113
- Sharma DN, Guleria R, Wig N et al (2021) Low-dose radiation therapy for COVID-19 pneumonia: a pilot study. *Br J Radiol* 94(1126):20210187
- Pandey SR, Adhikari Yadav S, Gautam S et al (2022) Effectiveness of low-dose radiation therapy in COVID-19 patients globally: a systematic review. *F1000Res* 11:62

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

Affiliations

M. Arenas^{1,4} · B. Piqué² · L. Torres-Royo^{1,4} · J. C. Acosta^{1,4} · E. Rodríguez-Tomás^{1,3,4} · G. De Febrer⁵ · C. Vasco⁵ · P. Araguas^{1,4} · J. A. Gómez^{1,4} · B. Malave^{1,4} · M. Àrquez^{1,4} · M. Algara^{6,7,8} · A. Montero⁹ · M. Montero¹⁰ · J. M. Simó¹¹ · X. Gabaldó¹¹ · D. Parada² · F. Riu² · S. Sabater¹² · J. Camps^{3,4} · J. Joven^{3,4}

B. Piqué, MD
berta.pique@estudiants.urv.cat

L. Torres-Royo, MD
lauratroyo@gmail.com

J. C. Acosta, MD
johanac.acostaa@gmail.com

E. Rodríguez-Tomás, MD
elisabet.rodriguez@urv.cat

G. De Febrer, MD, PhD
gabrielde.febrer@urv.cat

C. Vasco, MD
carlos.vasco@salutsantjoan.cat

P. Araguas, MD
pablo.araguasmora@gmail.com

J. A. Gómez, MD
junioranderson.gomez@gmail.com

B. Malave, MD
barbaraantonia.malave@salutsantjoan.cat

M. Àrquez, MD
miguelarquez@gmail.com

M. Algara, MD, PhD
85368@parcdesalutmar.cat

A. Montero, MD, PhD
angel.monteroluis@gmail.com

M. Montero, MD, PhD
manueljesus.montero@salutsantjoan.cat

J. M. Simó, MD, PhD
jmsimo@lrsud.cat

X. Gabaldó, MD, PhD
xgabaldo@lrsud.cat

D. Parada, MD, PhD
david.parada@salutsantjoan.cat

F. Riu, MD
francesc.riu@salutsantjoan.cat

S. Sabater, MD, PhD
ssabaterm@gmail.com

J. Camps, MD, PhD
jorge.camps@salutsantjoan.cat

J. Joven, MD, PhD
jorge.joven@salutsantjoan.cat

¹ Department of Radiation Oncology, Hospital Universitari Sant Joan de Reus, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain

² Department of Pathology, Hospital Universitari Sant Joan de Reus, Tarragona, Spain

³ Unitat de Recerca Biomèdica, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain

⁴ Institut d'Investigacions Pere Virgili, Tarragona, Spain

⁵ Department of Geriatric and Palliative care, Hospital Universitari Sant Joan de Reus, Tarragona, Spain

⁶ Department of Radiation Oncology, Hospital del Mar, Barcelona, Spain

⁷ Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain

⁸ Institut d'Investigacions Mèdiques, Barcelona, Spain

⁹ Department of Radiation Oncology, HM Hospitales, Madrid, Spain

¹⁰ Department of Radiology, Hospital Universitari Sant Joan de Reus, Tarragona, Spain

¹¹ Laboratori de Referència Sud, Hospital Universitari de Sant Joan, Tarragona, Spain

¹² Department of Radiation Oncology, Complejo Hospitalario de Albacete, Albacete, Spain

Article 2

SARS-CoV-2 Serum Viral Load and Prognostic Markers Proposal for COVID-19 Pneumonia in Low-Dose Radiation Therapy Treated Patients.

Piqué B, Peña K, Riu F, Acosta JC, Torres-Royo L, Malave B, Araguas P, Benavides R, de Febrer G, Camps J, Joven J, Arenas M, Parada D.

Revista: *J Clin Med*, 12(3):798, 2023. Doi: 10.3390/jcm12030798.

Quartil: Medicine (Q1)





Factor d'impacte: 4.964 (2021)

DOI: 10.3390/jcm12030798



Article

SARS-CoV-2 Serum Viral Load and Prognostic Markers Proposal for COVID-19 Pneumonia in Low-Dose Radiation Therapy Treated Patients

Berta Piqué¹, Karla Peña¹, Francesc Riu¹, Johana C. Acosta², Laura Torres-Royo², Barbara Malave², Pablo Araguas², Rocío Benavides², Gabriel de Febrer³ , Jordi Camps⁴ , Jorge Joven⁴ , Meritxell Arenas^{2,*} and David Parada^{1,*} 

¹ Molecular Pathology Unit, Department of Pathology, Hospital Universitari Sant Joan de Reus, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, 43204 Tarragona, Spain

² Department of Radiation Oncology, Hospital Universitari Sant Joan de Reus, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, 43204 Tarragona, Spain

³ Department of Geriatric and Palliative Care, Hospital Universitari Sant Joan de Reus, 43204 Tarragona, Spain

⁴ Unitat de Recerca Biomèdica, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, 43003 Tarragona, Spain

* Correspondence: meritxell.arenas@salutsantsoan.cat (M.A.); david.parada@urv.cat (D.P.)

Abstract: Several studies have shown that the plasma RNA of SARS-CoV-2 seems to be associated with a worse prognosis of COVID-19. In the present study, we investigated plasma RNA in COVID-19 patients treated with low-dose radiotherapy to determine its prognostic value. Data were collected from the IPACOVID prospective clinical trial (NCT04380818). The study included 46 patients with COVID-19 pneumonia treated with a whole-lung dose of 0.5 Gy. Clinical follow-up, as well as laboratory variables, and SARS-CoV-2 serum viral load, were analyzed before LDRT, at 24 h, and one week after treatment. The mean age of the patients was 85 years, and none received any of the SARS-CoV-2 vaccine doses. The mortality ratio during the course of treatment was 33%. RT-qPCR showed amplification in 23 patients. Higher mortality rate was associated with detectable viremia. Additionally, C-reactive protein, lactate dehydrogenase, and aspartate aminotransferase were significant risk factors associated with COVID-19 mortality. Our present findings show that detectable SARS-CoV-2 plasma viremia 24 h before LDRT is significantly associated with increased mortality rates post-treatment, thus downsizing the treatment success.

Keywords: COVID-19; pneumonia; low-dose radiation therapy; viral; load; RNA; prognostic; markers



Citation: Piqué, B.; Peña, K.; Riu, F.; Acosta, J.C.; Torres-Royo, L.; Malave, B.; Araguas, P.; Benavides, R.; de Febrer, G.; Camps, J.; et al. SARS-CoV-2 Serum Viral Load and Prognostic Markers Proposal for COVID-19 Pneumonia in Low-Dose Radiation Therapy Treated Patients. *J. Clin. Med.* **2023**, *12*, 798. <https://doi.org/10.3390/jcm12030798>

Academic Editor: Mario Plebani

Received: 19 December 2022

Revised: 16 January 2023

Accepted: 17 January 2023

Published: 19 January 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

As of November 2022, Coronavirus disease 2019 (COVID-19), the highly transmissible viral illness caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), has affected more than 600 million people and caused over 6 million deaths worldwide (<https://COVID19.who.int/>, accessed on 10 November 2022). Even though the efforts of the entire scientific community have led to unquestionable progress in unraveling the pathogenesis of SARS-CoV-2, and together with mass vaccination campaigns, the persisting spread of the virus has been limited, the emergence of potential new variants able to threaten the global public health again is an issue of concern.

SARS-CoV-2 is an enveloped, positive-sense, single-stranded RNA virus from the Coronaviridae family [1,2]. Although the mortality rate of SARS-CoV-2 is around 2.3%, while other members of the family, such as MERS-CoV, present an approximate mortality rate of 35% [3], it spreads faster than its viral antecessors. The SARS-CoV-2 genome presents 14 open reading frames (ORFs) encoding 31 proteins, of which 16 are non-structural, 4 are structural proteins: spike (S), envelope (E), membrane (M), and nucleocapsid (N), and 11 are accessory proteins [4,5]. The clinical manifestation of COVID-19 is wide, ranging from

mild illness to severe symptoms; however, the primary underlying cause of death of infected patients is respiratory failure [6]. Viral pneumonia is the most common indication for hospital admission and can lead to pulmonary dysfunction and acute respiratory distress syndrome (ARDS) [7]. COVID-19 severity is mainly attributed to a hyper-inflammatory response that leads to excessive secretion of pro-inflammatory cytokines [8,9].

Thus far, considerable progress in the therapeutic management of hospitalized patients has been made; however, there is still a significant gap in our knowledge to treat those patients that are not eligible for pharmacological intervention or mechanical ventilation, as described in the official guidelines [10]. In this scenario, some authors highlight low-dose radiotherapy (LDRT) as a novel therapeutic approach to treat COVID-19 pneumonia due to its anti-inflammatory properties [11–14]. The aim of the present study is to analyze how plasma viral load determination at the moment of irradiation, along with other clinical and laboratory factors, could help to predict the effectiveness of LDRT treatment in terms of survival in severe COVID-19 patients.

2. Materials and Methods

2.1. Participant Enrollment and Study Design

In this prospective and descriptive cohort study conducted at the Sant Joan University Hospital, Reus, Spain, we enrolled 46 hospitalized patients who tested positive for SARS-CoV-2 by RT-PCR from the IPACOVID clinical trial (NCT04380818) between June 2020 and February 2021. Inclusion criteria included patients with a positive COVID-19 diagnosis with moderate to severe pneumonia confirmed by chest X-ray requiring hospitalization with supplemental O₂, who, due to comorbidities or general status, were not eligible for admission to the intensive care unit (ICU). Patients were treated with LDRT, specifically a single dose of 0.5 Gy to the whole thorax, during the acute phase of COVID-19 infection. The detailed protocol regarding the radiotherapy plan and sample collection has been previously published [11]. The present study was approved by the Institutional Review Board (IRB) of the Sant Joan University Hospital in Reus. Written informed consent was obtained from each participant in accordance with the recommendations established in the latest version of the Declaration of Helsinki, Fortaleza 2013.

The primary endpoint of the present study was to study baseline SARS-CoV-2 serum viral load, whether as a continuous or a categorical variable, and its gene profiling among patients in an LDRT-treated cohort. In this line, we wanted to analyze if pre-treatment serum viral load could be used as a predictor of infection mortality, either on its own or in combination with other relevant clinical and laboratory parameters that have been previously related to worse outcomes. The secondary aim was to investigate the direct association between SARS-CoV-2 serum viral load and the severity score CURB-65 (based on age, urea level, vital signs, and presence of confusion) and of the latter with the inflammatory blood marker interleukin-6 (IL-6). The third objective was to study if serum SARS-CoV-2 viremic individuals presented higher circulating total RNA serum concentration compared to aviremic patients. The fourth aim was to investigate whether differences were found in the evolution of C-reactive protein (CRP), aspartate aminotransferase (AST), and lactate dehydrogenase (LDH) concentrations throughout the 30-day follow-up of the trial between the serum SARS-CoV-2 positive group and the serum SARS-CoV-2 negative group. Finally, we wanted to examine the correlation between SARS-CoV-2 serum viral load and other COVID-19 severity risk factors.

2.2. Blood Samples

Peripheral blood samples of 5 mL were obtained from each hospitalized patient at four different time points: right before and 24 h, one week, and one month after LDRT. After collection, blood was left undisturbed for 20–30 min at room temperature to allow the clotting. Subsequently, tubes were centrifuged at 1000× g for 10 min to remove the clot, whereas the serum was transferred into 0.5 mL cryovials and immediately stored at

–80° until use. Blood samples were used to determine serum SARS-CoV-2 viral load and biochemical markers.

2.3. RNA Serum Extraction

RNA was extracted from 500 µL of serum by using the High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume Kit (Roche, Basel, Switzerland), according to the manufacturer's instructions. In summary, serum samples were mixed with a working solution of binding buffer containing proteinase K and poly-A. Following 15 min of incubation at 70°, samples were transferred into a spin column inside a 50 mL tube and centrifuged for 5 min at 4000 rpm discarding the filtered liquid. Afterward, the spin column was placed in an elution tube and subjected to several washing steps. Finally, sample RNA was eluted in 50 mL of elution buffer, of which 10 µL were added to real-time RT-PCR Master Mix for amplification.

2.4. RT-PCR and SARS-CoV-2 Viral Load Quantification

SARS-CoV-2 serum RNA was amplified by RT-PCR using the TaqPath 1-Step Multiplex Master Mix commercial kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). This RT-PCR assay for SARS-CoV-2 includes forward and reverse primers and probes specific to three SARS-CoV-2 genomic regions in the ORF1ab, Nucleocapside (N), and Spike (S) genes. MS2 phage ribonucleoprotein RNA was used as an internal process control for RNA extraction and amplification. RNA was quantified using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) by analyzing 2 µL of each sample. Samples were considered RT-qPCR SARS-CoV-2 positive if two of the three genes were amplified together with a Ct < 37 or the ORF or S genes were amplified alone with a Ct < 35. When the N gene was amplified alone, samples were considered negative for SARS-CoV-2 following the Interpretive Software determined by the manufacturer (Thermo Fisher Scientific).

SARS-CoV-2 RNAemia was quantified using a standard curve generated with known concentrations of viral load standards. The standard was the TaqPath™ COVID-19 RNA positive control provided by the TaqPath 1-Step Multiplex Master Mix commercial kit. 10-fold serial dilutions of the SARS-CoV-2 RNA positive control were used, setting the detection limit to approximately 4 copies/mL. Viral load expressed as log₁₀ copies/mL was calculated by interpolating the Ct value of each sample into the ORF1ab gene standard curve, given that it was consistently amplified in all positive samples and was less likely to change among COVID-19 variants presenting spike protein mutations. Each RT-PCR assay was run with its specific standard curve, and each sample was analyzed in duplicate.

2.5. Statistical Analyses

Wilcoxon rank-sum test was used to compare continuous clinical variables, and Fisher's exact test was used to assess differences between categorical variables. Actuarial survival analysis was calculated with Kaplan-Meier curves and a log-rank test. We performed Cox proportional hazards regression for COVID-19 mortality to calculate hazard ratios (HR) with 95% confidence intervals (CI) of different predictor variables. Significant variables from the univariate analysis were then included in a multivariate analysis. In order to do a broad screening of factors, the predictive efficacy for COVID-19 mortality in LDRT-treated patients was measured with receiver operating characteristic (ROC) curves and the area under the curve (AUC) for all the significant independent risk factors obtained in the univariate model. In order to study the combination of these individual risk factors with the aim of increasing the efficacy for predicting COVID-19 mortality, new variables combining two predictors were presented in the form of predicted probabilities obtained from a bivariate logistic regression model. These new combined predictors were analyzed with ROC analysis. Spearman's Rho test was employed to analyze the correlation between two quantitative variables. Continuous variables are expressed as means and standard deviation, and categorical variables are expressed as frequencies and percentages. Statistical significance was set at $p < 0.05$. Statistical analyses, logistic regression, and graph representations were performed on SPSS Statistics version 25 (IBM SPSS Statistics, Armonk,

NY, USA), GraphPad Prism 8.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), and NCSS Statistical Software 2022 version 12.0.10 (NCSS software, Kaysville, UT, USA).

3. Results

3.1. Clinical Findings

Between June 2020 and February 2021, 46 COVID-19-positive, 25 male and 21 female patients with a median age of 85 years, and all received dexamethasone treatment. None of the patients received any of the SARS-CoV-2 vaccine doses. Participants were treated with LDRT, specifically a single dose of 0.5 Gy to the whole thorax, during the acute phase of viral infection. The mortality ratio during the course of treatment was 33%. Table 1 summarizes the main clinical characteristics and laboratory findings categorized by survival at baseline.

Table 1. Baseline demographic and clinical characteristics of COVID-19 patients.

Characteristic	Entire Cohort (N = 46)	Recovered (N = 31)	Deceased (N = 15)
Female	21 (45.65) ^b	15 (48.39) ^b	6 (40) ^b
Male	25 (54.35) ^b	16 (51.61) ^b	9 (60) ^b
Age	84.61 ± 6.611 ^a	84.97 ± 5.351 ^a	83.87 ± 8.847 ^a
Comorbidities			
Neurological diseases	13 (28.26) ^b	7 (22.58) ^b	6 (40) ^b
Cardiovascular diseases	37 (80.43)	25 (80.65)	12 (80)
Respiratory diseases	17 (36.96)	12 (38.71)	5 (33.33)
Other comorbidities	40 (86.96)	26 (83.87)	14 (93.33)
Pharmacological treatment			
Corticosteroids (dexamethasone)	46 (100) ^b	31 (100)	15 (100)
Functional Status (Barthel Index)			
Independent	8 (17.39) ^b	7 (22.58) ^b	1 (6.67) ^b
Minimally dependent	19 (41.30)	14 (45.16)	5 (33.33)
Partially dependent	9 (19.57)	4 (12.90)	5 (33.33)
Very dependent	7 (15.22)	5 (16.13)	2 (13.33)
Total dependent	3 (6.52)	1 (3.23)	2 (13.33)
Geriatric Depression Scale (GDS)			
No cognitive decline	23 (50) ^b	19 (61.29) ^b	4 (26.67)
Very mild cognitive decline	8 (17.39)	4 (12.90)	4 (26.67)
Mild cognitive decline	9 (19.57)	5 (16.13)	4 (26.67)
Moderate cognitive decline	1 (2.17)	1 (3.23)	0 (0)
Moderately severe cognitive decline	2 (4.35)	2 (6.45)	0 (0)
Severe cognitive decline	3 (6.52)	0 (0)	3 (20)
Very severe cognitive decline	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Basal SpO ₂	93.43 ± 2.713 ^a	94.03 ± 2.627 ^a	92.20 ± 2.541 ^a
Basal SaFi	283 ± 94.720 ^a	305 ± 80.870 ^a	237.40 ± 107.400 ^a
Mild	37 (80.43) ^b	28 (90.32) ^b	9 (60) ^b
Moderate	4 (8.70)	2 (6.45)	2 (13.33)
Severe	5 (10.87)	1 (3.23)	4 (26.67)

Table 1. Cont.

Characteristic	Entire Cohort (N = 46)	Recovered (N = 31)	Deceased (N = 15)
CURB-65 Score			
Score 1	-	-	-
Score 2	12 (26.09) ^b	10 (32.26) ^b	2 (13.33)
Score 3	25 (54.35)	19 (61.29)	6 (40)
Score 4	9 (19.56)	2 (6.45)	7 (46.67)
Score 5	-	-	-
First radiological findings			
CT lung involvement <5%	-	-	-
CT lung involvement 5–25%	1 (2.17) ^b	-	1 (6.67)
CT lung involvement 26–49%	7 (15.22)	6 (19.35)	1 (6.67)
CT lung involvement 50–75%	22 (47.83)	17 (54.84)	5 (33.33)
CT lung involvement >75%	16 (34.78)	8 (25.81)	8 (53.33)

SaFi: ratio of oxygen saturation (SpO₂) to fractional inspired oxygen (FiO₂); CURB-65: clinical criteria validated to guide the treatment of community-acquired pneumonia based on confusion, BUN, respiratory rate, systolic blood pressure, and age; CT: computed tomography. ^a Data shown as means ± standard deviations. ^b Data shown as the number of patients and percentages in parenthesis.

3.2. RT-PCR and SARS-CoV-2 Viral Load Quantification Findings

Serum samples were collected at baseline and 1, 7, and 30 days after LDRT treatment was performed. Regarding gene distribution at baseline, serum RT-qPCR showed amplification for the ORF1ab, N, and/or S gene in 23 (50%) patients out of 46. 9 (39.13%) patients presented ORF, N and S gene amplification. One gene amplification was observed in 1 (4.35%) patient for the ORF gene, in 7 (30.43%) patients for the N gene, and in 2 (8.70%) patients for the S gene. ORF and S gene amplification was reported in 1 (4.35%) patient, ORF and N amplification was found in 3 (13.04%) patients, and none of the participants was positive for both N and S genes (Figure 1a). However, from these 23 samples that showed general amplification and following the standards of our laboratory, samples with the S and ORF1ab gene amplified alone with a Ct > 35 and the N gene amplified alone with no consideration of the Ct value were considered negative. Consequently, only 14 out of 46 participants (30.43%) exhibited SARS-CoV-2 serum RNA above the quantification limit (1 log₁₀ copies/mL) at the time of basal blood collection and were considered viremic or SARS-CoV-2 RNA detectable participants. Among those individuals, the median serum viral load was 2.678 log₁₀ RNA copies/mL (range 1.345–5.283 log₁₀ RNA copies/mL; Figure 2a). Serum SARS-CoV2 viral load was reported as a continuous and categorical variable (detectable vs. undetectable), categorized as undetectable in all the samples below the quantification range.

3.3. LDRT and SARS-CoV-2 Viral Load Quantification Findings

Of the 46 participants studied, 31 (67.39%) patients recovered during the LDRT treatment, and 15 patients died (32.60%), of which 12 (26.09%) due to COVID-19 pneumonia and 3 (6.52%) due to other causes. When we considered the percentage of deaths, regardless of the cause, a higher mortality rate was associated with detectable viral load, as 57% of those patients with detectable serum viral load died compared to 22% in the undetectable viral load group (Fisher's exact $p = 0.0377$; Figure 1c). Regarding COVID-19 mortality, serum viremia was also associated with increased mortality, as 57% of patients testing positive for SARS-CoV-2 serum RNA died compared to only 14% of those with undetectable viral load (Fisher's exact $p = 0.0085$; Figure 1d). When analyzing viral load as a continuous variable, higher serum viral loads were significantly associated with mortality (Wilcoxon rank sum

test $p = 0.0068$; Figure 1e), with a median viral load of 1.345 log₁₀ RNA copies/mL (range 0–3.866 log₁₀ RNA copies/mL) in the deceased group compared to a median viral load of 0 log₁₀ RNA copies/mL (range 0–5.283 log₁₀ RNA copies/mL) in the recovered group. Furthermore, patients were classified according to their CURB-65 score. Eleven (23.91%) patients presented a CURB-65 score of 2, 26 (56.52%) patients of 3, and 9 (19.56%) patients with a score of 4. The proportion of deceased patients with a CURB-65 score of 4 (77.8%) was significantly higher compared to patients with a score of 3 (26.9%) and a score of 2 (9.1%, Chi-square test $p = 0.0032$; Figure 1f). In this line, greater CURB-65 scores were correlated with SARS-CoV-2 plasma RNAemia (Figure 1g; Kruskal-Wallis $p = 0.0006$) and with higher levels of the inflammatory marker IL-6 (Figure 1h; Kruskal-Wallis $p = 0.041$). While the proportion of patients with SARS-CoV-2 plasma RNAemia was significantly associated with mortality and illness severity, no significant association was found between the length of hospitalization and the presence of SARS-CoV-2 plasma RNAemia among participants (Figure 1i). Moreover, in the recovered group, there is no significant association between the length of medical discharge and the presence of SARS-CoV-2 plasma RNAemia (Figure 1j). Considering circulating viral RNA detected in the 46 serum samples from the participants, no significant differences were found between serum SARS-CoV-2 positive (378.7 ± 33.21 ng/mL) and negative patients (385.9 ± 51.32 ng/mL) (Figure 1).

In this line, Kaplan-Meier survival analysis was used to estimate the survival time of patients in both the viremic and the aviremic groups, considering exclusively COVID-19 pneumonia as the cause of death. Kaplan-Meier analysis reported that those patients presenting SARS-CoV-2 serum positivity at admission survived less than negative SARS-CoV-2 serum patients. With a median follow-up of 15 days after hospital admission (range 0–57 days), the 30-day overall survival (OS) estimation was 54.4% for the entire studied cohort (Figure 2a). According to SARS-CoV-2 RNA serum presence, 30-day OS was 72.6% for negative serum SARS-CoV-2 patients and 30.5% for positive serum SARS-CoV-2 individuals (log-rank test $p = 0.043$; Figure 2b). Thus, it is confirmed that there is a significant association between COVID-19 serum RNA positivity and higher mortality rates.

In order to validate the usefulness of COVID-19 serum positivity one day before LDRT as a predictor of mortality, we wanted to analyze whether an association exists with some of the most relevant clinical and laboratory parameters that have been previously related to worse outcomes and disease severity. The univariate Cox proportional hazards regression analysis showed that viral load, C-reactive protein (CRP), lactate dehydrogenase (LDH), and aspartate aminotransferase (AST) were significant risk factors associated with COVID-19 mortality. Moreover, we set a p-value cut-off point of 0.1 in the Wald Test for identifying more potential candidates for further analysis, resulting in the addition of the age factor to the multivariate model as well. Subsequently, these parameters were incorporated into the multivariate Cox proportional-hazard model, which revealed that age (aHR = 1.463 [95% CI: 1.062–2.014]; Cox regression analysis $p = 0.020$) and viral load (aHR = 1.738 [95% CI: 1.009–2.992]; Cox regression analysis $p = 0.046$) were independent significant predictors of survival (Table 2).

Afterward, we performed a receiver operating characteristics (ROC) curve analysis with the significant variables from the univariate Cox analysis in order to perform a more extensive screening of factors in addition to viral load and age. When considering individual single parameters, AST showed the best results as per area under the curve (AUC: 0.755, $p = 0.003$), followed by LDH (AUC: 0.7467, $p = 0.0018$) and viral load (AUC: 0.746, $p = 0.0015$) (Figure 3a). Then, we combined all the parameters with viral load and also the combination of AST and LDH since they gave the best AUC values (Figure 3b). New variables were generated in the form of predicted probability from a binary logistic regression model.

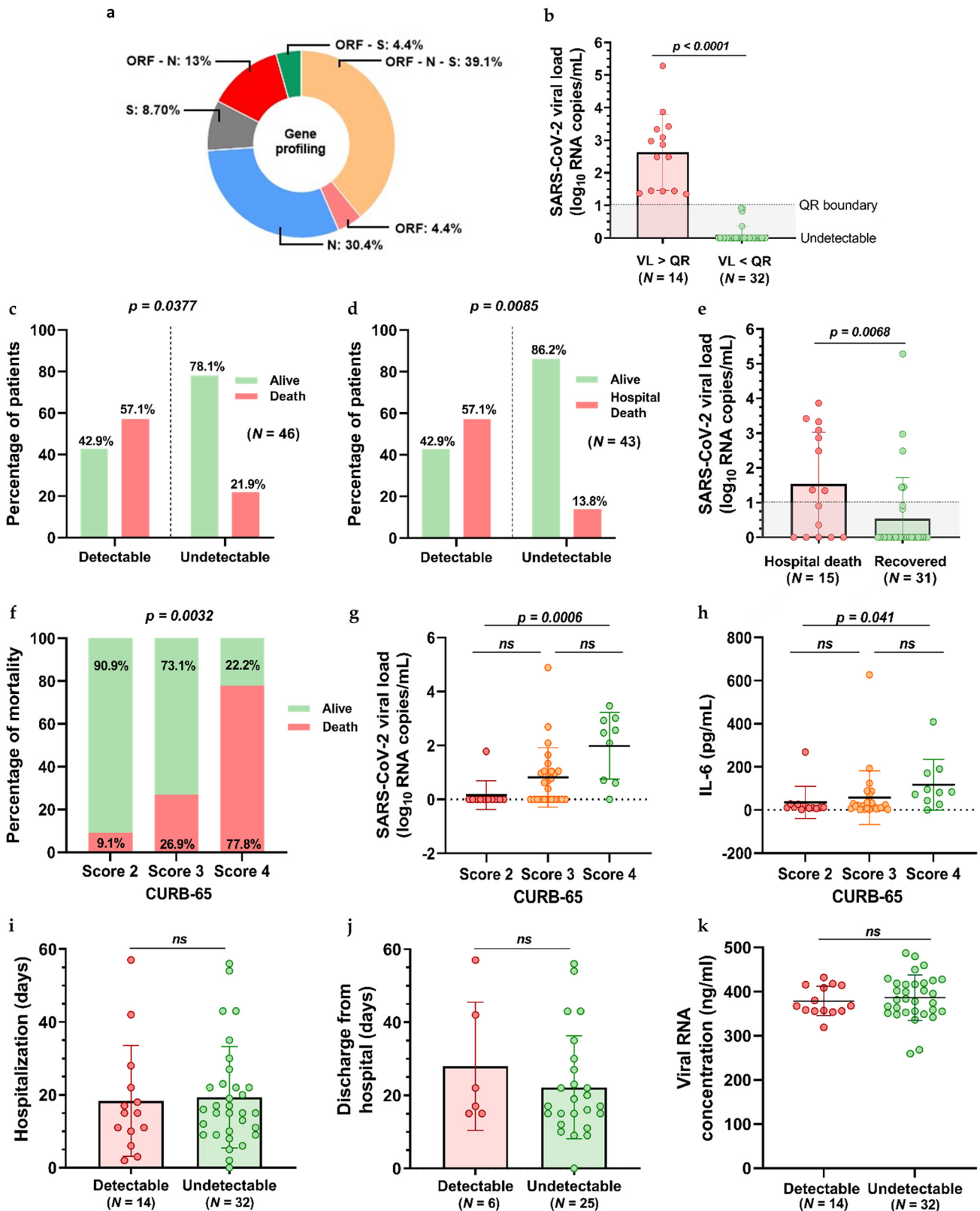


Figure 1. Gene profiling and SARS-CoV-2 RNA detection in serum at baseline before LDRT is administered. (a) Distribution of N, S, and ORF1ab gene amplification by qRT-PCR was detected in 23 patients, from which 14 were subsequently considered positive for SARS-CoV-2 following the guidelines of our laboratory. (b) SARS-CoV-2 viral load (VL) distribution; 4 patients presented viral loads below the range of detection and were considered undetectable throughout the trial. *p* values

are from a two-tailed Wilcoxon rank sum test. (c,d) Percent of participants with detectable and undetectable serum SARS-CoV-2 viral load by mortality outcome, with (d) or without (c) consideration of COVID-19 pneumonia as the cause of death. *p* values are from a Fisher's exact test. (e) Quantification of SARS-CoV-2 serum viral load at baseline in recovered and dead patients. (f) Distribution of patients' mortality according to their CURB-65 scores. (g) Distribution of SARS-CoV-2 plasma viral load of patients according to their CURB-65 scores. (h) Interleukin-6 concentration corresponding to different CURB-65 scores. (i,j) Length of hospitalization (f) and medical discharge in detectable and undetectable SARS-CoV-2 serum patients. (k) Serum viral RNA concentration of participants. *p* values obtained from a two-tailed Wilcoxon rank sum test. ns stands for non-significant.

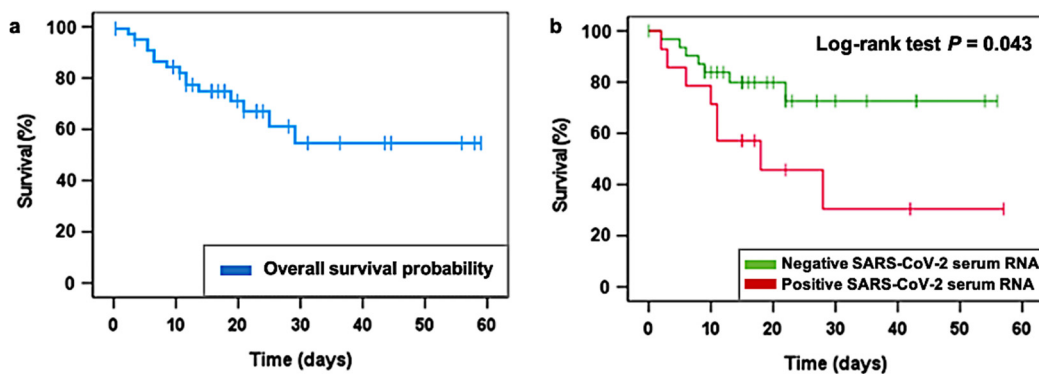


Figure 2. Overall survival (OS) estimates of COVID-19 patients treated with LDRT considering deaths due to COVID-19 pneumonia. (a) OS in the studied population ($N = 47$). (b) 30-day OS of patients testing positive for SARS-CoV-2 serum RNA ($N = 14$) and patients testing negative for SARS-CoV-2 serum RNA ($N = 29$). *p* value obtained from a log-rank test.

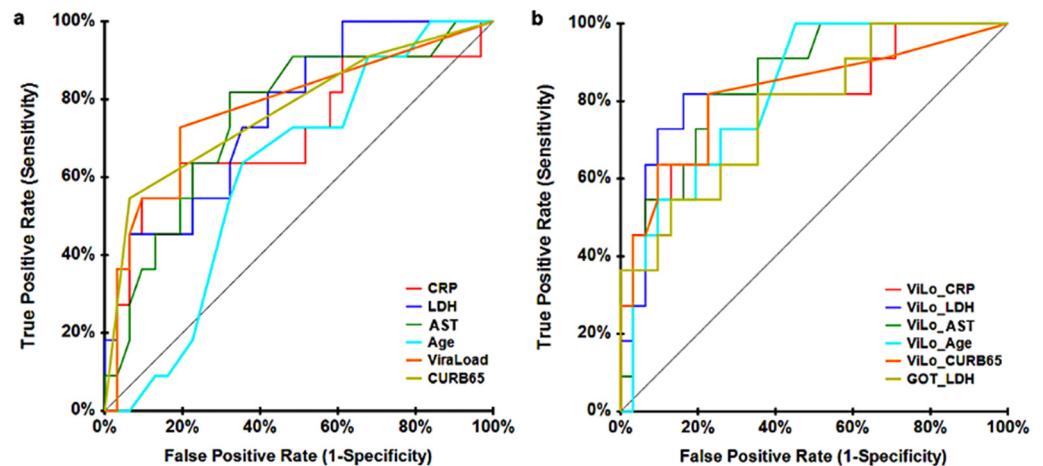


Figure 3. Receiver operating characteristics (ROC) curve analysis of different parameters in COVID-19 patients treated with LDRT to predict COVID-19 mortality. (a) ROC plot of single parameters (CRP, LDH, AST, Viral Load, CURB-65, Age). (b) ROC plot using a combination of parameters (Viral Load and C-reactive protein, Viral Load and LDH, Viral Load and AST, Viral Load and Age, Viral Load and CURB-65, AST and LDH).

Combined parameters were considered in order to improve the diagnostic efficacy of our predictors in the differentiation between the survivors and the deceased group during the first 30 days after LDRT administration. When combining AST and LDH with the other factors, AUC values were not as optimal as when these factors were combined with viral load. The viral load and AST combination showed the best diagnostic efficiency (AUC: 0.8589, $p = 0$), followed by viral load and LDH (AUC: 0.8468, $p = 0$; Table 3) in predicting COVID-19 mortality during a period of 30 days after LDRT treatment. Thus, a personalized

analysis of viral load and AST parameters for each patient could help to predict the survival probability after LDRT treatment and be useful to distinguish which patients can benefit more from this treatment.

Table 2. Bivariate and multivariate Cox proportional hazards regression model for COVID-19 mortality.

Risk Factors	Univariate Cox Regression Analysis		Multivariate Cox Regression Analysis	
	HR (95% CI)	p Value	HR (95% CI)	p Value
Age	1.125 (0.990–1.279)	0.071	1.463 (1.062–2.014)	0.020
Sex (Female)	0.897 (0.325–2.481)	0.835	-	-
Viral Load	1.596 (1.166–2.184)	0.004	1.738 (1.009–2.992)	0.046
RNA serum concentration	1.005 (0.991–1.019)	0.466	-	-
Neurological disease	1.542 (0.525–4.525)	0.431	-	-
Cardiovascular disease	1.355 (0.378–4.865)	0.641	-	-
Respiratory disease	1.111 (0.394–3.130)	0.843	-	-
Other comorbidities	2.578 (0.338–19.648)	0.361	-	-
Days with symptoms	1.075 (0.782–1.476)	0.657	-	-
IL-6	1.000 (0.995–1.005)	0.927	-	-
Ferritin	1.000 (1.000–1.000)	0.143	-	-
C-reactive protein	1.075 (1.017–1.138)	0.011	0.979 (0.841–1.141)	0.789
LDH	1.004 (1.001–1.007)	0.005	1.007 (1.000–1.014)	0.064
Hemoglobin	1.244 (0.953–1.625)	0.108	-	-
CD4 cells	0.998 (0.994–1.003)	0.486	-	-
CD8 cells	0.999 (0.994–1.004)	0.708	-	-
CD4/CD8 ratio	0.961 (0.774–1.192)	0.715	-	-
D-dimer	1.000 (1.000–1.000)	0.278	-	-
CURB-65	3.153 (1.348–7.373)	0.008	1.795 (0.398–8.081)	0.446
Glucose	1.002 (0.996–1.008)	0.485	-	-
Respiratory Frequency	1.000 (0.981–1.019)	0.986	-	-
AST	1.019 (1.005–1.034)	0.009	0.996 (0.974–1.018)	0.706
ALT	1.010 (0.992–1.029)	0.255	-	-
Leukocytes	1.000 (1.000–1.000)	0.951	-	-
Lymphocytes	0.999 (0.998–1.001)	0.348	-	-
Platelets	1.000 (1.000–1.000)	0.165	-	-

IL-6: interleukin-6; LDH: lactate dehydrogenase; CURB-65: clinical criteria validated to guide the treatment of community-acquired pneumonia based on confusion, BUN, respiratory rate, systolic blood pressure, and age; AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase.

Table 3. Area under the curve for various factors in COVID-19 patients.

Variable	AUC	p Value	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
Viral Load	0.7460	0.0015	0.5352	0.8693
CURB-65	0.7377	0.0019	0.5309	0.8616
LDH	0.7467	0.0018	0.5293	0.8720
AST	0.7552	0.0003	0.5670	0.8685
CRP	0.7313	0.0032	0.5184	0.8588
Age	0.6698	0.0201	0.4747	0.8022
Viral Load + CRP	0.7957	0.0001	0.5774	0.9078
Viral Load + LDH	0.8468	0.0000	0.6313	0.9409
Viral Load + AST	0.8589	0.0000	0.6894	0.9392
Viral Load + Age	0.8320	0.0000	0.6590	0.9214
Viral Load + CURB-65	0.8196	0.0001	0.5790	0.9297
AST + LDH	0.7768	0.0001	0.5846	0.8864

CURB-65: clinical criteria validated to guide the treatment of community-acquired pneumonia based on confusion; LDH: lactate dehydrogenase; AST: aspartate aminotransferase; CRP: C-reactive protein. New variables were generated by combining two factors in form of predicted probability from a binary logistic regression model.

Then, we analyzed longitudinal measurements of CRP, LDH, and AST concentrations in both groups, the viremic and the aviremic participants. Although statistical

significance was not found, we observed that after LDRT administration and during the following 30 days, there is a trend toward homogenization of CRP, LDH, and AST concentration values between patients with SARS-CoV-2 detectable serum viremia and those without (Figure 4).

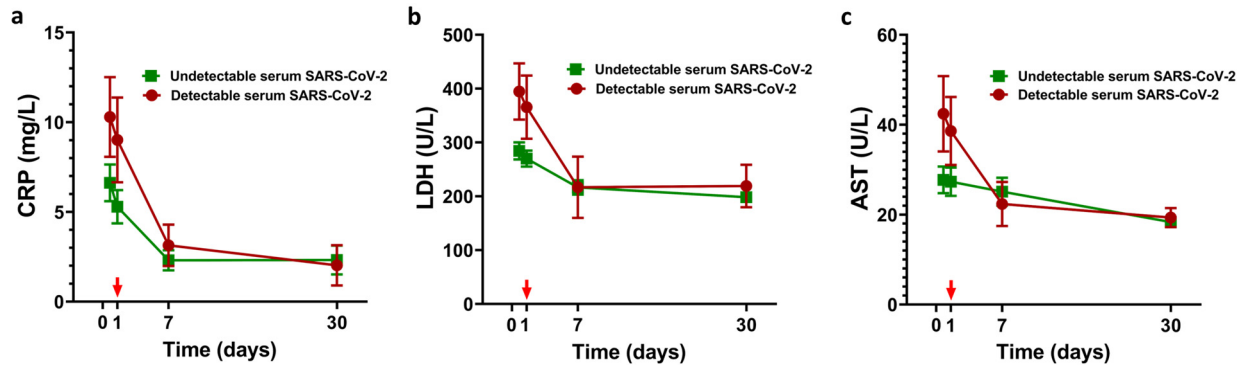


Figure 4. Longitudinal measurements of selected factors. Analysis of CRP (a), LDH (b), and AST (c) levels from baseline at day 0 to 30 days after LDRT. Treatment with LDRT was performed on day 1, indicated with a red arrow. Two-tailed Wilcoxon signed rank test did not show significant p values. SEM values are plotted.

Finally, we studied the correlation between the significant factors from the univariate Cox regression analysis and viral load (Figure 5). There was a significant moderate correlation between CURB-65 and viral load ($r: 0.511, p < 0.001$) (Figure 5d) and a low significant correlation between LDH and viral load ($r: 0.317, p = 0.032$) (Figure 5a). In the case of CRP/AST/Age and VL (Figure 5b,c,e), no statistical significance was achieved.

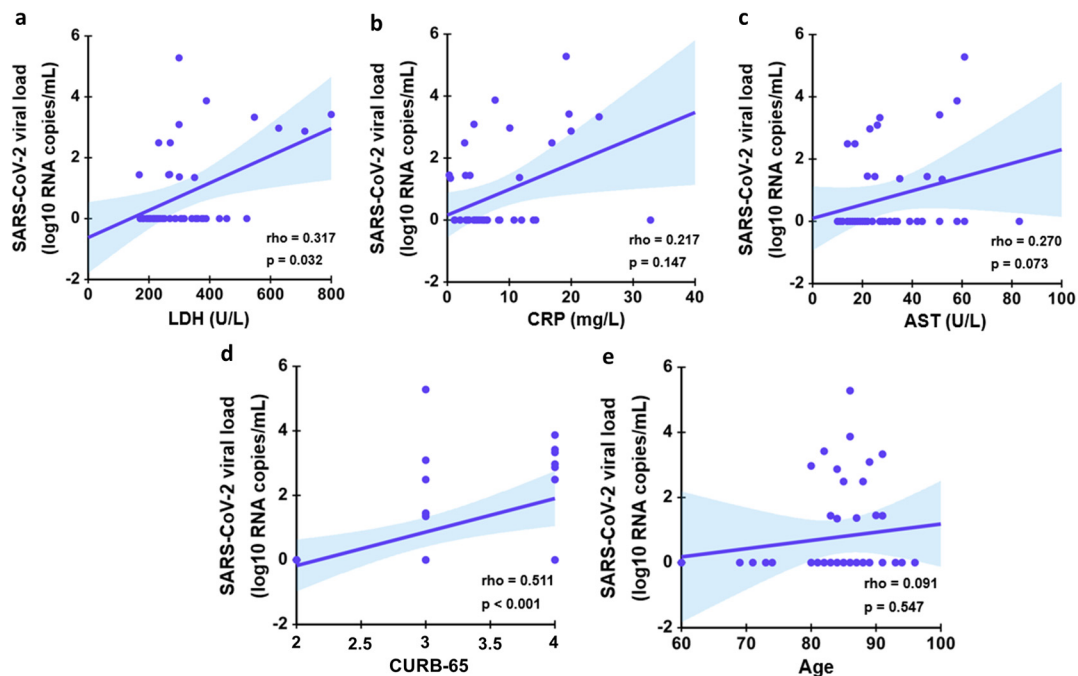


Figure 5. Correlation between viral load and other factors at baseline. Analysis of the association between LDH (a), CRP (b), AST (c), CURB-65 (d) and Age (e) with serum viral load. p values are obtained from Spearman correlation coefficient ρ .

4. Discussion

The present study appears to be the first to analyze baseline SARS-CoV-2 plasma viral load in 46 LDRT-treated patients before irradiation and to investigate the usefulness of this

parameter as a predictor of COVID-19 mortality during a 30-day follow-up period after the LDRT treatment. Our present findings show that detectable SARS-CoV-2 plasma viremia 24 h before LDRT is significantly associated with increased mortality rates post-treatment, thus downsizing the treatment success. Furthermore, we demonstrate that the patients with the larger scores in CURB-65 are the ones with the highest SARS-CoV-2 plasma viral load and that this pneumonia severity scale is significantly associated with inflammation, specifically with the cytokine IL-6. Furthermore, we report a significant positive correlation between SARS-CoV-2 viral load and LDH. Lastly, we suggest a potential novel mortality factor combining viral load and AST values that should be further investigated.

On March 11th of the year 2020, the WHO declared COVID-19 as a pandemic characterized by a broad clinical spectrum, being severe pneumonia and respiratory failure the main cause of death [7]. In this scenario, with the absence of specific antiviral drugs and sanitary systems collapsing over the globe, LDRT was resurrected as a potential treatment against COVID-19. The beneficial effects of LDRT treatment, based on its anti-inflammatory properties, date back to the last century. LDRT showed real curative benefits in the management of a variety of clinical conditions in which inflammation plays an important role, such as epicondylitis [15], osteoarthritis [16], necrotizing abscesses [17], and pneumonia. Several studies show that LDRT improves respiratory parameters and lung involvement and reduces serum inflammation markers [13,18–20]. A comparative cohort study reported a reduction in mortality among moderate COVID-19 patients treated with LDRT compared to the control group [21]. Furthermore, a systematic review, including nine clinical trials, supports that LDRT improves clinical parameters, radiological findings, and mortality rates, while at the same time, no side effects of radiation, such as acute toxicity, are found [22]. Regarding the biochemical mechanisms underlying LDRT, a recent study has broadened our knowledge, reporting an increase in serum PON1 activity while reducing inflammatory markers [12]. Although LDRT has shown promising results, considering the small sample and the lack of a randomized design in the majority of these studies, together with the knowledge gap in the understanding of the mechanistic behind LDRT, further research must be done.

In light of the results achieved thus far, LDRT could be an effective therapeutic strategy in cases of moderate and severe COVID-19, although there are some aspects regarding safety and dose that should be further investigated. For this reason, in our study, we propose a predictive method to maximize treatment success in terms of survivability based on the detection of SARS-CoV-2 viremia at baseline and thus be able to determine the most suitable patients for LDRT treatment. Several studies reported that SARS-CoV-2 serum viral load is associated with a higher risk of death, systemic inflammation, and disease progression [6,23,24]. The results of the present study confirm that the detection of serum viremia is related to higher mortality rates, and when quantified, there is a significant relationship between an increase in SARS-CoV-2 serum viral load and higher scores in the CURB-65 scale. Since the benefits of LDRT have not yet been demonstrated conclusively, together with the fact that not all hospitals have a radiotherapy department able to carry out LDRT in controlled safety conditions, we suggest this method to target LDRT treatment to the groups that can benefit most from its results. Furthermore, we found that patients with higher CURB-65 scores before treatment had larger baseline concentrations of IL-6, which has been highlighted to play a key role in the cytokine storm characterizing COVID-19 patients [25]. Both CURB-65 [26] and IL-6 [27] have been pointed out as reliable prognosis markers of COVID-19 patient outcomes, suggesting that SARS-CoV-2 baseline viral load could also be an effective severity predictor because of the relationship, either direct or indirect, we have demonstrated with both CURB-65 and IL-6.

We also analyzed other potential risk factors associated with COVID-19 mortality in LDRT-treated patients. In the present study, the univariate Cox regression model revealed other risk factors, apart from baseline serum viral load, including age, higher serum concentrations of CRP, LDH, and AST, and higher CURB-65 scores at baseline, which was consistent with findings of recent studies [28–31]. However, when multivariate Cox

regression was performed, only viral load and age remained significant risk factors. In spite of this, we wanted to explore broadly possible prognosis predictive factors, and therefore we chose the ones from the univariate analysis. When we explored the predictive capacity of COVID-19 mortality of these individual parameters, AST, LDH, and viral load at baseline showed the best AUC values. Furthermore, we investigated whether the combination of different factors would give better AUC values in discriminating between patients who died after LDRT treatment over the 30-day follow-up of the study and those who did not, and indeed when combining viral load and AST factors, we maximized AUC values (AUC = 0.847). Liver damage causes elevated levels of both aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT), which have been reported in COVID-19 patients [32]. Lei et al. reported that of these two enzymes, AST, in particular, is the one most closely associated with mortality [33]. Finally, CRP, LDH, and AST serum concentrations were monitored during the 30-day follow-up of the trial, and although no statistical differences were found, there is a tendency towards homogenization after LDRT is performed between SARS-CoV-2 serum detectable and the SARS-CoV-2 non-detectable group, we hypothesize it could be due to LDRT effect however, further research should be done.

Different studies have shown the presence of proinflammatory Th1 and Th2 cytokines in the serum of SARS patients compared to healthy controls, with significantly higher concentrations of TNF- β , IL-6, IL-8, IL-10 and IL-12 in the stage early stage of SARS-CoV infection [34,35]. In the present study, we confirmed the role of the T cell response through the cytokine IL-6. Decreased serum cytokine levels have been reported to correlate with recovery from SARS-induced pneumonia. On the contrary, elevated levels of IL-4, IL-5, and IL-10 have been associated with fatal cases of SARS [36]. This cytokine response has been demonstrated with other viruses. Thus, in MERS-CoV, the increased secretion of IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, and IFN, has been documented as a consequence of an antiviral and inflammatory response [36]. In addition, it has been shown that in, MERS-CoV the cytokines IL-8 and IL-12 are produced in greater amounts compared to the response to SARS-CoV [37]. It is interesting to highlight that increased plasma IL-6 concentration in SARS patients has been documented to be significantly increased in severe cases but not in convalescent or control subjects, suggesting a positive correlation between serum IL-6 level and disease severity [37]. Our findings confirm that plasma IL-6 levels are associated with severe COVID-19 disease and that IL-6 levels decrease in the convalescent period.

Our study has some limitations. First and most important, a control group could not be assembled. This control cohort would have consisted of patients receiving the standard of care (SoC) treatment without LDRT, enabling a comparative analysis of plasma COVID-19 viral load evolution, mortality ratio, length of hospitalization, viral RNA, and IL-6 concentration with the experimental cohort treated with SoC plus LDRT. Moreover, a longitudinal analysis of plasma SARS-CoV-2 viral load dynamics after LDRT could have provided more value to the results reported; however, our study was limited due to early discharges or COVID-19 negativization that did not facilitate further blood draws. In future studies, we would like to determine a cut-off point for the potential novel prognostic factor combining baseline AST concentration and plasma viral load that we have already pointed out. Furthermore, sample size was limited owing to difficulties encountered when matching different patient characteristics to form a homogenous group. Moreover, the limited number of patients in the hospital fitting in our inclusion criteria, along with the obstacles for every single one to be included in the trial, made it challenging to increase our sample size. On the other hand, the main strength of the present study lies in the fact that it is the first one to analyze baseline SARS-CoV-2 plasma viral load and to propose this parameter to be a good predictor for COVID-19 mortality in a LDRT-treated cohort. This would allow us to specifically treat patients that can benefit the most. In addition, we have demonstrated the association between plasma SARS-CoV-2 viral load and CURB-65 and LDH and, at the same time, the correlation between CURB-65 higher scores and larger IL-6 concentrations. Finally, in the present study, we highlight a novel COVID-19 mortality

predictor combining viral load and AST concentrations that should be further investigated. Currently, it might appear that focusing efforts to further understand LDRT treatment is not required since COVID-19 progress is being restrained. However, we consider it important to broaden our knowledge on LDRT effects and underlying mechanisms due to new variables may emerge in world areas where massive vaccine campaigns are not being implemented, and also because we consider that LDRT treatment could open a new therapeutic window not only for COVID-19 treatment but also in several diseases where inflammatory response plays a role.

Author Contributions: Conceptualization, D.P. and M.A.; methodology, B.P., D.P. and M.A.; formal analysis, K.P., F.R., J.C.A., L.T.-R., B.M., P.A., R.B., G.d.F., J.C. and J.J.; investigation, K.P., F.R., J.C.A., L.T.-R., B.M., P.A., R.B., G.d.F., J.C. and J.J.; writing—original draft preparation, B.P., J.C., J.J., M.A. and D.P.; writing—review and editing, B.P., M.A. and D.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Grant for radiation research during COVID-19 to cover the cost of legal insurance for the clinical trial from the Spanish Group for Clinical Research in Radiation Oncology Spanish Society of Radiation Oncology (GICOR-SEOR 2020).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (protocol code 089/2020; 15 April 2020).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Data is contained within the article.

Acknowledgments: To all professionals who make the treatment of patients possible: radiotherapy technicians, nurses, physicists, porters, cleaning staff, and all the doctors, especially M. Arguís, D. Gómez, F.A. Castaño, J. Trilla, M. Murcia, Y. López, and E. Roquer.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Hu, B.; Guo, H.; Zhou, P.; Shi, Z. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat. Rev. Microbiol.* **2021**, *19*, 141–154. [[CrossRef](#)]
2. Aimrane, A.; Laaradia, M.A.; Sereno, D.; Perrin, P.; Draoui, A.; Bougadir, B.; Hadach, M.; Zahir, M.; Fdil, N.; el Hiba, O.; et al. Insight into COVID-19's epidemiology, pathology, and treatment. *Heliyon* **2022**, *8*, e08799. [[CrossRef](#)]
3. Ganesh, B.; Rajakumar, T.; Malathi, M.; Manikandan, N.; Nagaraj, J.; Santhakumar, A.; Elangovan, A.; Malik, Y.S. Epidemiology and pathobiology of SARS-CoV-2 (COVID-19) in comparison with SARS, MERS: An updated overview of current knowledge and future perspectives. *Clin. Epidemiol. Glob. Health* **2021**, *10*, 100694. [[CrossRef](#)]
4. Redondo, N.; Zaldívar-López, S.; Garrido, J.; Montoya, M. SARS-CoV-2 Accessory Proteins in Viral Pathogenesis: Knowns and Unknowns. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 708264. [[CrossRef](#)]
5. Alipoor, S.D.; Mortaz, E.; Jamaati, H.; Tabarsi, P.; Bayram, H.; Varahram, M.; Adcock, I.M. COVID-19: Molecular and Cellular Response. *Front. Cel. Infec. Microbiol.* **2021**, *11*, 563085. [[CrossRef](#)]
6. Fajnzylber, J.; Regan, J.; Coxen, K.; Corry, H.; Wong, C.; Rosenthal, A.; Worrall, D.; Giguel, F.; Piechocka-Trocha, A.; Atyeo, C.; et al. SARS-CoV-2 viral load is associated with increased disease severity and mortality. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 5493. [[CrossRef](#)]
7. Ketcham, S.; Bolig, T.C.; Molling, D.J.; Sjoding, M.W.; Flanders, S.A.; Prescott, H.C. Causes and Circumstances of Death among Patients Hospitalized with COVID-19: A Retrospective Cohort Study. *Ann. Am. Thorac. Soc.* **2021**, *18*, 1076–1079. [[CrossRef](#)]
8. Yang, L.; Xie, X.; Tu, Z.; Fu, J.; Xu, D.; Zhou, Y. The signal pathways and treatment of cytokine storm in COVID-19. *Sig. Transd. Targ. Ther.* **2021**, *6*, 255. [[CrossRef](#)]
9. Chen, R.; Lan, Z.; Ye, J.; Pang, L.; Liu, Y.; Wu, W.; Qin, X.; Guo, Y.; Zhang, P. Cytokine Storm: The Primary Determinant for the Pathophysiological Evolution of COVID-19 Deterioration. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 589095. [[CrossRef](#)]
10. World Health Organization. *Therapeutics and COVID-19: Living Guideline*, 16 September 2022; (WHO/2019-nCoV/therapeutics/2022.5); World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2022.
11. Arenas, M.; Algara, M.; de Febrer, G.; Rubio, C.; Sanz, X.; de la Casa, M.A.; Vasco, C.; Marín, J.; Fernández-Letón, P.; Villar, J.; et al. Could pulmonary low-dose radiation therapy be an alternative treatment for patients with COVID-19 pneumonia? Preliminary results of a multicenter SEOR-GICOR nonrandomized prospective trial (IPACOVID trial). *Strahlenther. Onkol.* **2021**, *197*, 1010–1020. [[CrossRef](#)]

12. Rodríguez-Tomás, E.; Acosta, J.C.; Torres-Royo, L.; de Febrer, G.; Baiges-Gaya, G.; Castañé, H.; Jiménez, A.; Vasco, C.; Araguas, P.; Gómez, J.; et al. Effect of Low-Dose Radiotherapy on the Circulating Levels of Paraoxonase-1-Related Variables and Markers of Inflammation in Patients with COVID-19 Pneumonia. *Antioxidants* **2022**, *11*, 1184. [[CrossRef](#)]
13. Hess, C.B.; Nasti, T.H.; Dhere, V.R.; Kleber, T.J.; Switchenko, J.M.; Buchwald, Z.S.; Stokes, W.A.; Weinberg, B.D.; Roupheal, N.; Steinberg, J.P.; et al. Immunomodulatory Low-Dose Whole-Lung Radiation for Patients with Coronavirus Disease 2019-Related Pneumonia. *Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.* **2021**, *109*, 867–879. [[CrossRef](#)]
14. Moreno-Olmedo, E.; Suárez-Gironzini, V.; Pérez, M.; Filigheddu, T.; Minguez, C.; Sanjuan-Sanjuan, A.; González, J.A.; Rivas, D.; Gorospe, L.; Larrea, L.; et al. COVID-19 pneumonia treated with ultra-low doses of radiotherapy (ULTRA-COVID study): A single institution report of two cases. *Strahlenther. Onkol.* **2021**, *197*, 429–437. [[CrossRef](#)]
15. Hautmann, M.G.; Beyer, L.P.; Süß, C.; Neumaier, U.; Steger, F.; Putz, F.J.; Kölbl, O.; Pohl, F. Radiotherapy of epicondylitis humeri. *Strahlenther. Onkol.* **2019**, *195*, 343–351. [[CrossRef](#)]
16. Gibson, T.; Winter, P.J.; Grahame, R. Radiotherapy in the treatment of osteoarthritis of the knee. *Rheumatology* **1973**, *12*, 42–46. [[CrossRef](#)]
17. Trott, K.R. Therapeutic effects of low radiation doses. *Strahlenther. Onkol.* **1994**, *170*, 1–12.
18. Ameri, A.; Ameri, P.; Rahnama, N.; Mokhtari, M.; Sedaghat, M.; Hadavand, F.; Bozorgmehr, R.; Haghighi, M.; Taghizadeh-Hesary, F. Low-Dose Whole-Lung Irradiation for COVID-19 Pneumonia: Final Results of a Pilot Study. *Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.* **2021**, *109*, 859–866. [[CrossRef](#)]
19. Ganesan, G.; Ponniah, S.; Sundaram, V.; Marimuthu, P.K.; Pitchaikannu, V.; Chandrasekaran, M.; Thangarasu, J.; Kannupaiyan, G.; Ramamoorthy, P.; Thangaraj, B.; et al. Whole lung irradiation as a novel treatment for COVID-19: Interim results of an ongoing phase 2 trial in India. *Radiother. Oncolog.* **2021**, *163*, 83–90. [[CrossRef](#)]
20. Singh, P.; Mandal, A.; Singh, D.; Kumar, S.; Kumar, A.; Rakesh, A.; Ranjan, R.; Verma, M.; Rai, D.K.; Bhushan, D.; et al. Interim Analysis of Impact of Adding Low Dose Pulmonary Radiotherapy to Moderate COVID-19 Pneumonia Patients: IMpaCt-RT Study. *Front. Oncol.* **2022**, *12*, 822902. [[CrossRef](#)]
21. Ortiz, C.S.; Hernández, D.; Trujillo, C.; Calderón, D.; Esqueda, P.; Calva, F.; Betancourt, A.; Ramírez, M.; Cervantes, G.; Souto, M.A.; et al. The clinical efficacy of low-dose whole-lung irradiation in moderate-to-severe COVID-19 pneumonia: RTMX-20 trial. *Radiother. Oncol.* **2022**, *166*, 133–136. [[CrossRef](#)]
22. Mortazavi, S.M.J.; Shams, S.F.; Mohammadi, S.; Mortazavi, S.A.R.; Sihver, L. Low-Dose Radiation Therapy for COVID-19: A Systematic Review. *Radiation* **2021**, *1*, 234–249. [[CrossRef](#)]
23. Bermejo-Martin, J.F.; González-Rivera, M.; Almansa, R.; Micheloud, D.; Tedim, A.P.; Domínguez-Gil, M.; Resino, S.; Martín-Fernández, M.; Ryan Murua, P.; Pérez-García, F.; et al. Viral RNA load in plasma is associated with critical illness and a dysregulated host response in COVID-19. *J. Crit. Care* **2020**, *24*, 691. [[CrossRef](#)]
24. Peña, K.B.; Riu, F.; Gumà, J.; Guilarte, C.; Pique, B.; Hernandez, A.; Àvila, A.; Parra, S.; Castro, A.; Rovira, C.; et al. Study of the Plasma and Buffy Coat in Patients with SARS-CoV-2 Infection—A Preliminary Report. *Pathogens* **2021**, *10*, 805. [[CrossRef](#)]
25. Majidpoor, J.; Mortezaee, K. Interleukin-6 in SARS-CoV-2 induced disease: Interactions and therapeutic applications. *Biomed. Pharmacother.* **2022**, *145*, 112419. [[CrossRef](#)]
26. Guo, J.; Zhou, B.; Zhu, M.; Yuan, Y.; Wang, Q.; Zhou, H.; Wang, X.; Lv, T.; Li, S.; Liu, P.; et al. CURB-65 may serve as a useful prognostic marker in COVID-19 patients within Wuhan, China: A retrospective cohort study. *Epidemiol. Infect.* **2020**, *148*, e241. [[CrossRef](#)]
27. Santa Cruz, A.; Mendes-Frias, A.; Oliveira, A.I.; Dias, L.; Matos, A.R.; Carvalho, A.; Capela, C.; Pedrosa, J.; Castro, A.G.; Silvestre, R. Interleukin-6 Is a Biomarker for the Development of Fatal Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Pneumonia. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 613422. [[CrossRef](#)]
28. Romero Starke, K.; Reissig, D.; Petereit-Haack, G.; Schmauder, S.; Nienhaus, A.; Seidler, A. The isolated effect of age on the risk of COVID-19 severe outcomes: A systematic review with meta-analysis. *BMJ Glob. Health* **2021**, *6*, e006434. [[CrossRef](#)]
29. Han, Y.; Zhang, H.; Mu, S.; Wei, W.; Jin, C.; Tong, C.; Song, Z.; Zha, Y.; Xue, Y.; Gu, G. Lactate dehydrogenase, an independent risk factor of severe COVID-19 patients: A retrospective and observational study. *Aging* **2020**, *12*, 11245–11258. [[CrossRef](#)]
30. Smilowitz, N.R.; Kunichoff, D.; Garshick, M.; Shah, B.; Pillinger, M.; Hochman, J.S.; Berger, J.S. C-reactive protein and clinical outcomes in patients with COVID-19. *Eur. Heart J.* **2021**, *42*, 2270–2279. [[CrossRef](#)]
31. Nguyen, Y.; Corre, F.; Honsel, V.; Curac, S.; Zarrouk, V.; Fantin, B.; Galy, A. Applicability of the CURB-65 pneumonia severity score for outpatient treatment of COVID-19. *J. Infect.* **2020**, *81*, e96–e98. [[CrossRef](#)]
32. Qin, C.; Wei, Y.; Lyu, X.; Zhao, B.; Feng, Y.; Li, T.; Cao, H.; Yang, X.; Zhou, X.; Wang, W.; et al. High aspartate aminotransferase to alanine aminotransferase ratio on admission as risk factor for poor prognosis in COVID-19 patients. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 16496. [[CrossRef](#)]
33. Lei, F.; Liu, Y.M.; Zhou, F.; Qin, J.J.; Zhang, P.; Zhu, L.; Zhang, X.J.; Cai, J.; Lin, L.; Ouyang, S.; et al. Longitudinal Association Between Markers of Liver Injury and Mortality in COVID-19 in China. *Hepatology* **2020**, *72*, 389–398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Dosch, S.F.; Mahajan, S.D.; Collins, A.R. SARS Coronavirus Spike Protein-Induced Innate Immune Response Occurs via Activation of the NF-kappaB Pathway in Human Monocyte Macrophages in Vitro. *Virus Res.* **2009**, *142*, 19–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

35. Wu, H.; Yan, H.; Ma, S.; Wang, L.; Zhang, M.; Tang, X.; Temperton, N.J.; Weiss, R.A.; Brenchley, J.M.; Douek, D.C.; et al. T Cell Responses to Whole SARS Coronavirus in Humans. *J. Immunol.* **2008**, *181*, 5490–5500.
36. Sinderewicz, E.; Czelejewska, W.; Jezierska-Wozniak, K.; Staszkiwicz-Chodor, J.; Maksymowicz, W. Immune Response to COVID-19: Can We Benefit from the SARS-CoV and MERS-CoV Pandemic Experience? *Pathogens* **2020**, *9*, 739. [[CrossRef](#)]
37. Zhang, Y.; Li, J.; Zhan, Y.; Wu, L.; Yu, X.; Zhang, W.; Ye, L.; Xu, S.; Sun, R.; Wang, Y.; et al. Analysis of Serum Cytokines in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. *Infect. Immun.* **2004**, *72*, 4410–4415. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LA RADIOTERÀPIA A DOSIS BAIXES: UNA ALTERNATIVA TERAPÈUTICA EN PACIENTS ANCIANS AMB PNEUMÒNIA SEVERA CAUSADA PER COVID-19

Berta Piqué Smith

RESUM DELS RESULTATS

RESUM DELS RESULTATS

Article 1

Treatment of COVID-19 pneumonia with low-dose radiotherapy plus standard of care versus standard of care alone in frail patients: The SEOR-GICOR IPACOVID comparative cohort trial.

Arenas M, Piqué B, Torres-Royo L, Acosta JC, Rodríguez-Tomás E, De Febrer G, Vasco C, Araguas P, Gómez JA, Malave B, Árquez M, Algara M, Montero A, Montero M, Simó JM, Gabaldó X, Parada D, Riu F, Sabater S, Camps J, Joven J.

Strahlenther Onkol, 1–10, 2023. Doi: 10.1007/s00066-023-02067-9.

El primer estudi és un assaig clínic no randomitzat prospectiu, registrat com IPACOVID (NCT04380818) al Clinical Trials³³⁸, que consta d'un grup control i un grup intervenció, que rep una dosi única de RT-DB (0,5 Gy). Cada grup està format per 50 pacients hospitalitzats que han estat diagnosticats de COVID-19 per qRT-PCR nasofaríngia i que presenten pneumònia.

Entre el 15 de juny de 2020 i el 28 de febrer de 2021, es van reclutar un total de 100 pacients ingressats a l'Hospital Universitari Sant Joan de Reus per a participar en aquest estudi, dels quals 50 formarien part del grup intervenció i 50 del grup control. L'edat mitjana dels participants, tant dels pacients controls com dels pacients tractats és de 85 anys i un 46% són dones. Les característiques demogràfiques, clíniques i radiològiques pulmonars dels participants estan descrites a la Taula 1.

En termes de supervivència, 34 pacients sobreviuen després de 30 dies del tractament en el grup tractat amb RT-DB, respecte 24 pacients en el grup control (64% vs. 48%). Tot i que aquesta diferència de mortalitat entre els dos grups no és estadísticament significativa, els valors numèrics revelen una millora remarcable en el grup que ha rebut tractament. Pel que fa als paràmetres

respiratoris dels participants, no es mostren diferències entre ambdós grups 24 hores després de la RT-DB. Al cap d'una setmana del tractament, però, sí que es reporten millores en la funció respiratòria en el grup tractat, respecte als participants controls, concretament incrementa significativament la SpO₂ (97% vs. 94%; $p = 0.0052$) i la SaFi (405 vs. 334; $p = 0.0157$) i es redueix la FiO₂ (27% vs. 35%; $p = 0.038$). Després d'un mes, la millora dels paràmetres respiratoris no només es manté, sinó que és més notable en el grup RT-DB, respecte al grup control, pel que fa als valors de SpO₂ (97 vs. 95; $p < 0.0051$), de FiO₂ (21% vs. 36; $p = 0.0002$), de SaFi (462 vs. 326; $p < 0.0001$) i de PaFi (473 vs. 302; $p < 0.0001$). Més enllà de les millores en la funció respiratòria observades en el grup tractat amb RT-DB, també es produeix una disminució significativa dels dies d'hospitalització (19 vs. 20 dies; $p = 0.01$), un avançament de les altes mèdiques (23 vs. 31 dies; $p = 0.047$) i una disminució de la durada dels símptomes (5 vs. 7; $p = 0.015$), respecte al grup control.

L'anàlisi de regressió logística multivariant revela que quan s'incorporen al model les variables de confusió gènere, comorbiditats (neurològiques, respiratòries, cardiovasculars i altres tipus), edat i nombre de dies amb símptomes, el tractament amb RT-DB és un factor de protecció (OR 0.302, IC 95% [0.106–0.859]; $p = 0.025$) per a la mortalitat deguda a la COVID-19, mentre que l'edat és un factor de risc (OR = 1.147, IC 95% [1.033–1.272]; $p = 0.010$). Per tant, el tractament amb RT-DB és un factor independent que redueix el risc de mortalitat per COVID-19. En aquesta línia, la supervivència actuarial és significativament més gran en el grup RT-DB respecte al grup control (log-rank $p = 0.027$).

En el grup de pacients tractats, es produeix una millora dels resultats de l'examen radiològic que reflecteix una disminució de l'afectació pulmonar a la setmana i al mes d'haver realitzat el tractament amb RT-DB. No obstant això, la comparativa amb els pacients control no va ser possible a causa de diferències en les proves radiològiques dutes a terme en cada grup.

Article 2

SARS-CoV-2 Serum Viral Load and Prognostic Markers Proposal for COVID-19 Pneumonia in Low-Dose Radiation Therapy Treated Patients.

Piqué B, Peña K, Riu F, Acosta JC, Torres-Royo L, Malave B, Araguas P, Benavides R, de Febrer G, Camps J, Joven J, Arenas M, Parada D.

J Clin Med, 12(3):798, 2023. Doi: 10.3390/jcm12030798.

El segon article de la tesi inclou 46 pacients del grup RT-DB que formen part de l'estudi prospectiu i descriptiu de cohorts IPACOVID (NCT04380818), descrit anteriorment. Els pacients es van reclutar entre el juny del 2020 i el febrer del 2021 a l'Hospital Universitari Sant Joan de Reus.

Les característiques demogràfiques, clíniques i radiològiques dels participants estan descrites a la Taula 1. La distribució dels gens del SARS-CoV-2 amplificats per RT-qPCR al sèrum dels pacients revela que en 23 pacients (50%) respecte al total es detecta amplificació d'ORF, N i/o S. D'aquests, 9 pacients (39%) presenten l'amplificació dels tres gens simultàniament, i pel que fa a l'amplificació d'un sol gent hi ha 1 pacient (4.35%) amb el gen ORF, 7 (30.43%) amb el gen N i 2 (8.70%) amb el gen S. Finalment, 1 pacient (4.35%) presenta amplificació d'ORF i S, i 3 pacients (13.04%) d'ORF i N. En el temps basal, 14 pacients (30.43%) presenten RNA de SARS-CoV-2 per sobre del límit de quantificació i es consideren virèmics. La càrrega viral del SARS-CoV-2 al sèrum en el temps basal està significativament associada a major mortalitat per pneumònia deguda a la COVID-19 als 30 dies post-tractament, ja que el 57% dels pacients amb virèmia moren en comparació amb el 14% dels pacients amb RNA viral indetectable a la sang ($p = 0.0085$). A més, quan s'avalua de forma contínua segons el nombre de còpies/mL, també es demostra que les càrregues virals més elevades estan associades a una major mortalitat ($p = 0.0068$).

Quan els participants es distribueixen segons l'escala de CURB-65, unes puntuacions més elevades en aquesta estan associades a un increment de la

mortalitat ($p = 0.0032$) i a la vegada a una major càrrega viral al sèrum ($p = 0.0006$) i unes concentracions més elevades d'IL-6 ($p = 0.041$).

Pel que fa a la supervivència 30 dies després del tractament, hi ha diferències significatives entre els pacients avirèmics, que presenten una supervivència del 72.6%, respecte als pacients virèmics que és del 30.5% ($p = 0.043$), considerant la COVID-19 com la causa de mortalitat.

Davant els resultats obtinguts en la primera part de l'estudi on vam demostrar que la càrrega viral en sèrum estava associada significativament amb la mortalitat per COVID-19, vam voler ampliar aquesta anàlisi estudiant l'efecte d'altres factors de risc, prèviament documentats a la literatura, relacionats amb el risc de mort per pneumònia causada pel SARS-CoV-2. Com ja hem comentat anteriorment, l'anàlisi de regressió de Cox univariant revela que la càrrega viral (HR 1.596, IC 95% [1.166–2.184]; $p = 0.004$), la CRP (HR 1.075, IC 95% [1.017–1.138]; $p = 0.011$), la LDH (HR 1.004, IC 95% [1.001–1.007]; $p = 0.005$) i l'AST (HR 1.019, IC 95% [1.005–1.034]; $p = 0.009$) són factors de risc associats amb la mortalitat per COVID-19 en els nostres pacients. Amb l'objectiu d'identificar més factors de risc potencials en l'anàlisi multivariant posterior i poder entendre la influència conjunta dels diferents paràmetres de manera més realista, vam establir un punt de tall del valor de p a la prova de Wald a $p = 0.1$. D'aquesta manera, a l'anàlisi multivariant es van incloure totes les variables significatives de l'anàlisi univariant i es va afegir el factor edat. El nostre model va revelar que l'edat (aHR = 1.463, IC 95% [1.062–2.014]; $p = 0.020$) i la càrrega viral al sèrum (aHR = 1.738, IC 95% [1.009–2.992]; $p = 0.046$) són factors de risc independents associats a la mortalitat de la COVID-19.

Encara que només les variables de l'edat i la càrrega viral al sèrum van mostrar significança en l'anàlisi multivariable, vam decidir incloure tots les variables significatives de la regressió univariant en l'anàlisi ROC posterior. Aquest estudi, secundàriament a l'anàlisi de la càrrega viral, té com a objectiu proporcionar una visió general del potencial predictiu de diversos paràmetres sanguinis a nivell teòric. L'anàlisi ROC demostra que els factors amb més poder de predicció per a la mortalitat de COVID-19 són l'AST (AUC: 0.755; $p = 0.003$), la LDH (AUC: 0.7467; $p = 0.0018$) i la càrrega viral al sèrum (AUC: 0.746; $p = 0.0015$).

Posteriorment, les noves variables generades en forma de probabilitat estimada a partir de la combinació de dos dels paràmetres anteriors, revelen que la variable càrrega viral i l'AST (AUC: 0.8589; $p < 0.001$), així com la càrrega viral i la LDH (AUC: 0.8468; $p < 0.001$) són les que presenten la major capacitat predictiva.

En resum, aquest segon article demostra que la càrrega viral al sèrum 24 hores abans del tractament amb RT-DB, està associada a una major mortalitat per COVID-19 en els següents 30 dies. També demostra que la càrrega viral està correlacionada positivament amb el CURB-65 i la LDH. Quan la càrrega viral en sèrum es combina amb d'altres factors de risc, concretament l'AST i la LDH, s'obtenen bones correlacions que poden ser útils com a marcadors predictors de pronòstic i de mortalitat per COVID-19 en els pacients de l'estudi.

DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ

La pandèmia de la COVID-19 ha infectat més de 760 milions de persones i ha causat més de 6 milions de morts confirmades arreu del món³⁹. Inqüestionablement, la pandèmia ha posat a prova la capacitat dels sistemes de salut que s'han vist greument desbordats. La col·laboració de la comunitat científica mundial ha permès el descobriment de noves teràpies específiques per a la COVID-19 i el disseny de vacunes efectives per a les diferents variants del SARS-CoV-2, que han frenat el seu avenç. No obstant això, molts dels tractaments que s'empren en l'abordatge terapèutic de la COVID-19 ja existien i estan indicats per a d'altres malalties. En aquest context, l'ús de la RT-DB per al tractament de la pneumònia, que es remunta a principis del segle XX, ha ressorgit com una teràpia potencialment efectiva per a la pneumònia causada per la COVID-19, tant pels seus efectes antiinflamatoris com immunomoduladors.

El primer estudi d'aquesta tesi és un assaig clínic no randomitzat prospectiu amb un grup control i un grup intervenció que rep tractament amb RT-DB, format cadascun per 50 pacients hospitalitzats diagnosticats de COVID-19 per qRT-PCR nasofaríngia i pneumònia. S'han avaluat diversos paràmetres respiratoris que inclouen la SpO_2 , la FiO_2 , la SaFi i la PaFi als 7 dies i al cap d'un mes del tractament amb RT-DB. Després d'una setmana del tractament, s'observa una millora de tots els indicadors respiratoris, llevat de la PaFi, mentre que després d'un mes del tractament tots els paràmetres milloren significativament en comparació amb els pacients del grup control. Es podria hipotetitzar que aquesta millora de la funció respiratòria es deu als efectes antiinflamatoris de la RT-DB que inclouen, per una banda, la capacitat de promoure un fenotip funcional antiinflamatori i reduir la producció de ROS als macròfags disminuint així l'estrès oxidatiu³¹⁶, i per l'altra, la de promoure l'alliberament de citocines antiinflamatòries com el TGF- $\beta^{4,6}$ i paral·lelament inhibir la secreció de citocines proinflamatòries com la IL-6 i el TNF- α a les cèl·lules alveolars pulmonars³³⁶, com s'ha demostrat en estudis *in vitro* i amb model de ratolí. Aquesta modulació de les citocines podria reduir l'estat d'hiperinflamació causada per la CS, la qual caracteritza la infecció de SARS-CoV-2 severa, frenar alhora el dany pulmonar i ajudar a la resolució de la pneumònia. A nivell clínic, aquestes millores

significatives de la funció respiratòria concorden amb els resultats obtinguts en altres assajos clínics publicats anteriorment^{8,339,343}. Els estudis realitzats per Ganesan *et al.*³⁴² i Sanmamed *et al.*¹⁰, tot i que no contempen un grup control en el seu disseny experimental, reporten millores significatives a la ràtio SaFi després de 3 i 7 dies post-tractament en comparació amb els valors basals o pre-tractament. El nostre estudi és el primer en analitzar els valors de PaFi, que proporcionen informació clínica de gran rellevància, ja que permeten determinar els nivells d'hipòxia, i que a més es correlacionen amb diferents graus de gravetat de l'ARDS, segons els criteris de Berlin³⁶¹. Aquests valors són essencials per a l'avaluació de la funció respiratòria i fonamenten una base objectiva per a la classificació de la severitat de la malaltia.

Diversos estudis han analitzat factors de risc de mortalitat i severitat de la COVID-19. L'edat és un dels factors de risc més significatius³⁶² degut a que les persones d'edat avançada presenten una resposta retardada de l'IFN- γ durant la infecció, un augment de l'estrès oxidatiu, una resposta immune adaptativa menys coordinada i un estat d'inflamació basal caracteritzat per un augment d'IL-1 β i IL-18³⁶³. A més, tot i que aquesta ha estat associada amb una major presència de comorbiditats, certes patologies han estat definides com a factors de risc independents que influeixen en la severitat i la mortalitat deguda a la COVID-19. Aquest és el cas de malalties respiratòries³⁵, cardiovasculars³⁶ i neurològiques³⁷. Per a determinar si la RT-DB estava relacionada amb una major o menor probabilitat de mort es van tenir en compte totes aquestes variables, ja que podien influir en l'efecte del tractament en els nostres pacients. A més, vam incloure a l'anàlisi multivariant les variables de gènere i el nombre de dies en què el pacient presentava simptomatologia. Seguint els criteris d'inclusió de l'estudi, tots els participants eren reclutats amb menys de 8 dies des de l'inici dels símptomes i en la fase aguda de la infecció. Tot i així, vam considerar necessari incloure aquesta variable com un possible factor de confusió, ja que l'inici dels símptomes es relaciona amb el començament de la fase simptomàtica de la COVID-19 i, a partir de la seva aparició, la durada d'aquests pot ser un indicador del moment en què es troba el pacient en el curs de la infecció. Els teòrics posen èmfasi en que l'eficàcia del tractament amb RT-DB està intrínsecament vinculada al moment de l'evolució de la infecció en el qual s'inicia. Quan s'administra en

els estadis primerencs o intermedis de la infecció per SARS-CoV-2, la RT-DB pot alleujar la inflamació i prevenir-ne la cronicitat, mentre que quan ja s'ha produït la CS, aquest tractament pot perdre part de la seva eficàcia. Això es deu, en part, a que la RT-DB estimula l'activitat de les NK i la secreció d'IFN- γ que indueix l'expressió de gens que juguen un paper clau en les defenses antivirals de l'hoste³²¹. Conseqüentment, la RT-DB podria revertir parcialment els efectes d'evasió del SARS-CoV-2 sobre la resposta interferònica a les fases agudes de la infecció²²⁸. Per aquesta raó, alguns autors han hipotetitzat que la finestra terapèutica de la RT-DB es troba entre la fase pulmonar primerenca i l'aparició de l'estat hiperinflamatori que pot conduir a l'aparició d'ARDS³⁵¹.

Els nostres resultats, però, no van trobar una associació significativa entre el nombre de dies amb símptomes dels pacients i la mortalitat per COVID-19. Concretament, de tots els factors que es contemplaven, només l'edat i el tractament amb RT-DB tenen una influència significativa en la mortalitat causada per la COVID-19 en els nostres pacients, ja sigui per un efecte perjudicial o un efecte protector, respectivament. En aquesta línia, degut a que el grup intervenció veia reduïda en un 70% la probabilitat de mortalitat deguda a COVID-19, vam voler determinar si la RT-DB afectava la supervivència dels pacients al cap d'un mes. Els nostres resultats confirmen que el tractament amb RT-DB augmenta la supervivència actuarial després de 30 dies del tractament, en comparació amb els pacients control. Es podria pensar que aquesta millora en la supervivència està en part relacionada amb els efectes immunomoduladors de la RT-DB que s'han demostrat de manera preclínica, tant per l'increment de la secreció de l'INF- γ per part de les NK³²¹, que permetria revertir l'evasió del SARS-CoV-2 sobre sistema immune, com per poder reduir la limfopènia³²⁶ i promoure una major funció de cèl·lules immunes, com les DC³³¹. Des del punt de vista clínic, alguns assajos clínics han documentat també aquesta disminució de la mortalitat dels pacients tractats amb RT-DB, tot i que el fet que una gran part d'aquests no comptin amb la presència d'un grup control impedeix l'anàlisi de la supervivència. També, perquè els estudis que presenten grup control no recullen l'anàlisi de supervivència dins dels seus objectius primaris. Un estudi de fase II no randomitzat que feia un seguiment durant 14 dies després de la RT-DB amb 20 pacients a cada grup, mostrava que el grup intervenció presentava

una tendència a una major supervivència que el grup control (77% vs. 68%), tot i que no va ser estadísticament significativa⁸. Ja sigui, degut al disseny metodològic o per la mida reduïda dels grups reclutats per a participar, creiem que fins al moment, només el nostre assaig clínic i el d'Ortiz *et al.*³⁴⁸ han demostrat que la supervivència actuarial augmenta de manera estadísticament significativa en el grup tractat un mes després del tractament amb RT-DB en comparació al grup control.

Una altra manera d'avaluar la severitat de la COVID-19 és a partir de les proves radiològiques, sent la TC el mètode més efectiu per a detectar anormalitats en els pulmons de pacients amb COVID-19³⁶⁴. Evidències prèvies recolzen que els resultats de l'examen radiològic presenten una bona associació amb la gravetat de la malaltia³⁶⁵, concretament, es constata que existeix una correlació significativa entre una afectació pulmonar de més del 23% amb l'aparició de COVID-19 crítica i l'ingrés a l'UCI³⁶⁶. Les nostres troballes radiològiques en el grup tractat amb RT-DB no podien ser comparades amb els pacients control degut a que en aquest últim grup, la imatge radiològica va ser obtinguda amb radiografia de tòrax ateses les dificultats en la planificació i l'ús de les instal·lacions. Tot i així, les proves d'imatge revelen que en el grup intervenció, hi ha un 96% dels pacients que presenten una afectació pulmonar de més del 25% abans de la RT-DB mentre que passat un mes no arriben al 5%. És a dir, després del tractament s'observa una millora radiològica en termes de disminució de les alteracions pulmonars. En base a les correlacions teòriques anteriors i de manera simplificada, podem dir que només una minoria seguiria requerint l'entrada a l'UCI després de la RT-DB. Tot i això, i per tal de poder establir una relació causal directa entre la RT-DB i la disminució de l'afectació pulmonar, caldria en futures investigacions realitzar la TC també en el grup control i poder determinar així si existeixen diferències significatives entre les cohorts. En aquesta línia, l'assaig clínic de Hess *et al.*, analitza les diferències entre grups i demostra que al dia 21 post-irradiació, el 90% del grup de pacients tractats presenta millores radiogràfiques significatives respecte del 57% en el grup control⁸.

Com s'ha dit anteriorment, el principal temor de l'acceptació de la RT-DB com a tractament, per una part important de la comunitat científica mundial, rau en el

risc de carcinogènesi induïda per la radiació. Alguns autors s'oposen al tractament amb RT-DB³⁶⁷, argumentant que els riscos potencials sobrepassen els possibles beneficis i que abans d'iniciar assajos clínics cal fonamentar els mecanismes d'acció de la RT-DB amb estudis *in vitro* i amb models animals i consolidar així l'evidència preclínica d'aquest tractament. No obstant això, la gran majoria d'experts que han teoritzat sobre els efectes de la RT-DB en la COVID-19³⁶⁸⁻³⁷⁰, defensen que una dosi de RT és eficient en termes de cost i temps, a més de ser potencialment capaç d'alleugerir la simptomatologia respiratòria dels pacients amb COVID-19 i, fins i tot, poder augmentar la supervivència sense generar efectes secundaris significatius a llarg termini.

Fins a la data, els assajos clínics que estudien la RT-DB amb dosis menors d'1 Gy per al tractament de la COVID-19, el nostre inclòs, no han reportat senyals de toxicitat aguda derivada del tractament^{8,9,342,343,348,349}. Només l'estudi de Papachristofilou *et al.* és l'únic que no reporta cap efecte beneficiós de la RT-DB pel que fa a reducció dels requeriments d'oxigen o disminució de CRP i ferritina, ni a la supervivència dels pacients, mentre que sí que s'observa limfopènia en el grup tractat amb RT-DB³⁴⁰. En resposta als resultats d'aquest estudi, que contradiuen les troballes clíniques de la resta d'assajos clínics, Bevelacqua va escriure una carta a l'editor en que hipotetitzava que la finestra terapèutica de la RT-DB abans de la fase hiperinflamatòria no era respectada en l'estudi de Papachristofilou, on l'estat dels pacients era massa crític per a presentar marge terapèutic de millora³⁴¹.

La determinació del risc de carcinogènesi induïda per la RT-DB és difícil de quantificar, ja que fora necessari realitzar un seguiment dels pacients a llarg termini, considerant que alguns tumors sòlids que han rebut RT poden presentar un període de latència per produir un càncer radioduït de fins a 60 anys. Gràcies a l'ús de models computacionals s'han pogut fer estimacions del risc en pacients COVID-19 tractats amb RT-DB, les quals han revelat que en pacients de 80 anys o més, el risc de carcinogènesi de la RT-DB per al tractament de la COVID-19 és menor a l'1%³⁵². Aquest aspecte es va tenir en compte en els nostres criteris d'inclusió, i per aquest motiu els participants a l'estudi eren pacients hospitalitzats de més de 70 anys, amb una mitjana d'edat de 85 anys. A més, aquests pacients no eren aptes per a rebre ventilació mecànica invasiva ni candidats a entrar a

l'UCI, tot i la gravetat de la seva patologia, degut a la presència de comorbiditats. La proposta de participar en l'assaig clínic va brindar a aquests pacients amb un pronòstic molt desfavorable, una teràpia alternativa que, tot i que encara es trobava en fase d'investigació, podia oferir beneficis clínics. Es va considerar que els beneficis terapèutics del tractament amb RT-DB eren superiors als riscos potencials de carcinogènesi a llarg termini, ja que els participants, tots ells d'edat avançada, presentaven una infecció de COVID-19 severa i no comptaven amb tractaments curatius eficaços.

El nostre estudi clínic prospectiu, comparatiu i no randomitzat, evidencia que una única dosi de 0,5 Gy pot millorar la funció respiratòria, incrementar la supervivència 1 mes després del tractament i disminuir l'afectació pulmonar en pacients diagnosticats amb la COVID-19 que presenten pneumònia resultant de la infecció per SARS-CoV-2. A més, també vam demostrar que la RT-DB reduïa significativament la duració dels símptomes i els dies d'hospitalització, respecte als pacients control. Aquestes observacions són molt rellevants, especialment en el context d'una pandèmia com la de la COVID-19 que va sobrecarregar i literalment col·lapsar els hospitals.

Algunes de les limitacions del nostre estudi inclouen que es tracta d'un assaig no randomitzat, així com també es constata la dificultat d'homogeneïtzació entre el grup control i el grup tractat pel que fa als graus d'independència i deteriorament cognitiu. Aquestes es poden explicar tenint en compte que aquest estudi es va dur a terme en el moment àlgid de la pandèmia de la COVID-19 i en el moment de màxima saturació del sistema sanitari. La situació general a l'hospital va obstaculitzar en part la planificació de les instal·lacions de RT, així com el reclutament de pacients i el compliment dels criteris de inclusió per tal de poder participar a l'estudi. Això també va causar que en el grup control no es pogués realitzar l'examen radiològic amb TC sinó amb radiografies de rajos X, impedit així la comparativa entre els grups. No obstant això, i tot i les circumstàncies adverses, el nostre assaig clínic prospectiu, comparatiu i no randomitzat, és el més gran realitzat al món fins al dia d'avui.

Un cop demostrats els beneficis terapèutics de la RT-DB en els pacients, vam investigar específicament el grup intervenció, és a dir, aquells participants amb COVID-19 i pneumònia que havien completat la pauta de tractament amb RT-

DB. Tot i que el risc de carcinogènesi és baix en pacients d'edats tan avançades, la necessitat de mobilitzar i sotmetre a radiació pacients greus, així com la disponibilitat d'instal·lacions de RT en el context de la pandèmia, ens van conduir a estudiar possibles marcadors de risc presents abans del tractament amb RT-DB que poguessin estar associats amb una major mortalitat durant els 30 dies post-tractament. En el futur, l'objectiu seria poder oferir una teràpia personalitzada, basant-nos en la presència de biomarcadors en sang abans del tractament.

La principal causa de mort deguda a la COVID-19 és la parada respiratòria, tot i així, hi ha diverses manifestacions de la malaltia a nivell extrapulmonar que poden ser letals, com la síndrome de disfunció multiorgànica. La càrrega viral en sang indica que el virus ha entrat al torrent circulatori i que pot afectar a altres òrgans més enllà de l'aparell respiratori, per la qual cosa s'ha associat amb un pitjor pronòstic i una manifestació severa de la COVID-19^{371,372}. Tot i així, la majoria d'articles publicats prèviament que investiguen l'associació de la càrrega viral amb la mortalitat per COVID-19 ho fan de manera qualitativa a partir de l'ús dels valors del llindar de cicle (Ct que prové de l'anglès cycle thresholds) de la RT-qPCR³⁷³⁻³⁷⁵, que són una estimació indirecta de la càrrega viral. El nostre estudi, mitjançant l'ús de corbes estàndards de còpies d'RNA de concentracions conegudes de SARS-CoV-2 ha pogut quantificar la càrrega viral al sèrum dels pacients. Hem demostrat que la càrrega viral a les 24 hores abans del tractament, ja sigui de forma categòrica (detectable vs. no detectable) o contínua (nombre de còpies/mL), està associada amb una major mortalitat per pneumònia derivada de la infecció de SARS-CoV-2 als 30 dies post-tractament. En aquesta línia, aquesta tesi demostra que la supervivència actuarial després d'un mes del tractament amb RT-DB també augmenta significativament en els pacients avirèmics, amb un 72,6% de probabilitat de sobreviure, respecte als pacients que presenten RNA de SARS-CoV-2 detectable en sèrum, amb només un 30,5% de probabilitat.

A més de la càrrega viral, hi ha un gran nombre de publicacions prèvies que identifiquen altres factors de risc que també augmenten la gravetat i la mortalitat de la COVID-19^{356,376}. Un d'ells és el valor al CURB-65, que és un sistema de puntuació que permet determinar la severitat i guiar el tractament de les

pneumònies adquirides a la comunitat. Per aquesta raó, alguns especialistes l'han utilitzat en el context de la pneumònia causada per la infecció del SARS-CoV-2 i diferents autors han mostrat el seu valor predictiu en la mortalitat atribuïda a la COVID-19^{73,377}. En aquesta línia, els nostres resultats mostren que unes puntuacions més elevades de CURB-65 s'associen amb una major mortalitat al cap de 30 dies després del tractament i amb concentracions més elevades d'IL-6, una de les citocines proinflamatòries que s'allibera durant la CS i que té un paper clau en induir la inflamació generalitzada característica de la COVID-19 severa³⁷⁸. A més, i de manera novedosa, hem demostrat una correlació positiva significativa entre les puntuacions del CURB-65 i la càrrega viral al sèrum.

Més enllà de la simptomatologia respiratòria, el SARS-CoV-2 es pot propagar sistèmicament a d'altres òrgans i causar manifestacions gastrointestinals, hepàtiques i neurològiques, entre d'altres⁷⁶. La presència d'RNA de SARS-CoV-2 al sèrum suggereix una lesió significativa a les EC pulmonars³⁷⁸ i un augment de la permeabilitat dels vasos sanguinis deguda a la inflamació, que permet l'entrada del virus al torrent sanguini¹²¹. La virèmia en si és a la vegada un reflex del dany pulmonar que s'està produint i un predictor de severitat que assenyala que la infecció s'està expandint i afectant altres òrgans. En aquest estudi confirmem que la càrrega viral en sèrum és un predictor de mortalitat independent en els pacients tractats amb RT-DB i que es correlaciona positivament amb les concentracions de LDH. Aquesta és un enzim intracel·lular que participa en el metabolisme energètic de la cèl·lula i que es troba a les cèl·lules de la majoria dels teixits, amb diferents isoformes, catalitzant el pas bidireccional de piruvat a lactat. Quan es produeixen lesions als teixits, la LDH s'allibera a la sang, per la qual cosa és un signe inespecífic de dany tissular. Concretament, aquesta proteïna té un valor pronòstic en l'aparició i la gravetat de malaltia pulmonar intersticial i de fibrosi pulmonar³⁷⁹. En el cas de la pneumònia per COVID-19, hi ha un gran nombre d'evidències que relacionen els nivells elevats de LDH amb una major gravetat de la infecció³⁶⁰. Els nostres resultats en pacients tractats amb RT-DB, també revelen un poder de predicció significatiu de la LDH en la mortalitat causada per la COVID-19 després de 30

dies del tractament, que millora quan aquesta variable es combina amb la càrrega viral en sèrum.

A més de la LDH, un dels factors relacionats amb una major mortalitat el qual s'ha recomanat per a monitoritzar l'estat dels pacients amb COVID-19 és l'enzim AST³⁸⁰. Diversos símptomes gastrointestinals com per exemple, vòmits, diarrea, nàusees i dolor abdominal han estat reportats en pacients amb COVID-19. El SARS-CoV-2 envaeix el fetge a partir de la unió a l'ACE2 que es troba majoritàriament expressat als colangiòcits que recobreixen els conductes biliars³⁸¹ i produeix dany tissular a partir de la infecció directa, o indirectament, a partir de la resposta inflamatòria que es desencadena³⁸². Un estudi amb 5.771 pacients amb pneumònia per COVID-19 va analitzar diversos marcadors de dany hepàtic i va concloure que específicament l'AST, amb unes concentracions majors de 40 U/L, està associat significativament a una major mortalitat³⁵⁹. El nostre estudi demostra que l'AST, individualment o combinat amb el factor càrrega viral, podria tenir capacitat predictiva de la mortalitat per COVID-19 en els participants tractats amb RT-DB.

Respecte les limitacions del nostre segon estudi, primerament, és important destacar que aquest estudi no disposa d'un grup control i per tant, no s'ha pogut realitzar una comparativa de l'evolució de la càrrega viral al sèrum entre el grup control i el grup tractat amb RT-DB. Aquesta hagués estat interessant per a determinar si el tractament amb RT-DB influeix en l'evolució de la càrrega viral al sèrum. A més, la mida de la mostra és reduïda, pel que cal interpretar amb precaució els resultats de predicció de mortalitat. L'objectiu principal era investigar la càrrega viral en la nostra cohort tractada amb RT-DB, i de manera secundària, fer un cribratge preliminar, així com presentar un esbós de la capacitat predictiva d'alguns factors de risc prèviament documentats a la literatura. En un futur, per tal de poder establir un biomarcador predictiu eficaç del benefici del tractament de RT-DB en termes de mortalitat, caldria augmentar la grandària mostral per incrementar la potència estadística i, segons el context clínic i el propòsit, afavorir més la sensibilitat o l'especificitat. Podríem hipotetitzar que comptar amb l'ajuda d'aquest biomarcador permetria poder realitzar la RT-DB en pacients en etapes primerenques de la infecció viral, els quals presenten una simptomatologia menys greu i majors expectatives de millora. Tal i com s'ha

dit anteriorment, el moment en el transcurs de la infecció viral per COVID-19 en el que s'administra el tractament és clau per al seu èxit. Per tal de realitzar un triatge dels pacients, destinat a seleccionar aquells que podrien respondre millor al tractament, seria interessant monitoritzar els seus paràmetres inflamatoris i determinar si ja s'ha entrat en l'estat hiperinflamatori característic de la COVID-19 severa.

Encara queden un gran nombre d'incògnites sobre l'ús de la RT-DB pendent de resoldre, incloent l'edat idònia dels pacients, l'interval de temps en l'evolució de la infecció viral que permeti maximitzar l'acció terapèutica, i la dosi òptima de radiació. Un dels grans obstacles per a donar resposta a aquests interrogants és l'heterogeneïtat en el disseny dels assajos clínics pel que fa als criteris d'inclusió dels participants o l'ús de diferents indicadors clínics per avaluar l'eficàcia del tractament. A més, pocs assajos clínics compten amb un disseny metodològic randomitzat i amb una irradiació simulada, que és el millor plantejament per determinar si existeix causalitat entre els efectes de la RT i les millores que se'n deriven sense interferències externes. També, la grandària de la mostra en la majoria d'assajos clínics és generalment petita i a més, un gran nombre dels estudis no compta amb un grup control. Aquestes discrepàncies respecte dels criteris d'inclusió dels participants i dels sistemes de mesura per a determinar l'eficiència del tractament, així com les diferències en el disseny dels assajos clínics, dificulta una possible estandardització del tractament de RT-DB per als pacients infectats amb SARS-CoV-2. Per altra banda, tot i que hi ha evidència preclínica *in vitro* i amb models animals sobre els efectes antiinflamatoris i immunomoduladors de la RT, alguns d'aquests estudis daten del segle passat i han quedat obsolets. Per aquesta raó, és essencial continuar la recerca per tal de comprendre completament els mecanismes subjacents i les vies moleculars implicades en els efectes de la RT, que no es coneixen en la seva totalitat. Això és de vital importància perquè més enllà de l'aplicació de la RT-DB en el tractament de la pneumònia causada per la COVID-19, es podria obrir una nova finestra terapèutica per a l'abordatge d'altres malalties en les quals la inflamació i la desregulació del sistema immune juguen un paper important.

En conclusió, cal desestigmatitzar el tractament amb RT-DB, ja que més enllà dels resultats del nostre assaig clínic, el més gran realitzat fins al moment, que

demostra una millora en la funció respiratòria i uns efectes protectors de la RT-DB associats a una millora de la supervivència actuarial, hi ha un gran nombre d'assajos clínics que també reporten beneficis clínics mentre que no informen d'efectes adversos aguts ni tardans que se'n derivin. En un futur, podria ser interessant comptar amb marcadors sanguinis que ajudin a predir l'eficàcia del tractament en cada pacient. La càrrega viral al sèrum està associada amb una major mortalitat i podria, individualment o en combinació amb d'altres factors de risc, presentar-se com un possible marcador pronòstic per a realitzar una teràpia personalitzada en aquells pacients que més se'n puguin beneficiar. Aquesta tesi fonamenta i suposa un avenç molt rellevant en el coneixement dels beneficis i els possibles efectes radiobiològics de la RT-DB en la pneumònia causada per la infecció de la COVID-19. Més enllà d'aquesta infecció viral, creiem que la RT-DB presenta un potencial terapèutic que cal ser investigat, atès que les millores clíniques observades es podrien extrapolar a d'altres infeccions sense opcions terapèutiques i com a tractament alternatiu per a malalties amb base inflamatòria.

PERSPECTIVES DE FUTUR

PERSPECTIVES DE FUTUR

L'OMS va declarar el 5 de maig del 2023 que la COVID-19 deixava de ser una emergència de salut pública d'interès internacional³⁸³. El gran ventall de vacunes disponibles contra la COVID-19, així com una millor distribució d'aquestes sobretot als països del continent africà, clarament desproveïts en el moment àlgid de la pandèmia, han permès frenar la propagació viral. Com a resultat, s'ha reduït substancialment el risc d'aparició de noves variants més contagioses i patogèniques, o amb una capacitat incrementada per evadir el sistema immune en els pacients vacunats. Aquest nou escenari sens dubte esperançador, pot desplaçar a un segon pla, però, l'interès de la comunitat científica per a seguir avançant en la recerca de la COVID-19, així com la necessitat d'investigar els efectes terapèutics de la RT-DB. La realització de nous assajos clínics randomitzats, amb irradiació simulada i doble cec, que és el disseny metodològic òptim per a continuar amb la recerca de la RT-DB, es veurà clarament limitat. Per una banda, per la dificultat en el reclutament de pacients que compleixin amb els criteris d'inclusió pel que fa a gravetat i edat i, per l'altra, perquè les UCI, que han recuperat els nivells d'ocupació pre-pandèmics, podrien acceptar gran part dels pacients que anteriorment es quedaven fora del circuit. En el context de la RT-DB per al tractament de la COVID-19, tot apunta al fet que malgrat el gran avenç que s'ha produït en aquest camp, algunes incògnites quedaran sense resposta, inclosos el temps idoni per a l'administració de la RT-DB en el transcurs de la infecció de la COVID-19, la dosi ideal i l'edat en què els beneficis terapèutics són més grans respecte als riscos potencials que se'n poden derivar.

No obstant això, l'ordre cíclic de la història ha demostrat que en moltes ocasions la clau per entendre el futur es basa en estudiar el nostre passat. Només en un quart de segle, tres *Betacoronavirus* altament patogènics, el SARS-CoV a la Xina, el MERS-CoV a l'Orient Mitjà i ara el SARS-CoV-2, han estat els responsables de causar tres epidèmies que han posat a prova els sistemes de salut pública arreu del món. Tots ells, són patògens zoonòtics que es caracteritzen per una fisiopatologia comuna que afecta majoritàriament el tracte respiratori i que, en els casos més severos, pot desencadenar pneumònia i ARDS. Actualment, el creixement sense fre de la població humana a nivell mundial,

juntament amb una major necessitat d'explotació dels recursos naturals, té com a resultat la destrucció dels ecosistemes naturals i fa que les interaccions entre les poblacions humanes i les espècies d'animals salvatges siguin cada vegada més freqüents. Això porta a hipotetitzar que la transmissió de virus, especialment de coronavirus, des dels animals als humans serà cada vegada més comuna i que l'estudi en l'àmbit preclínic de la RT-DB per al tractament de la pneumònia atípica encara és de vital importància. Cal tenir present, que tot i haver posat fi a l'última pandèmia per coronavirus, aquesta podria ser només una de les moltes que queden per arribar i que continuar la recerca en aquest àmbit és necessari per evitar un altre col·lapse sanitari com el que s'ha viscut.

Històricament, el tractament amb RT per a malalties benignes s'ha vist amb recel per una gran part de la comunitat científica, a causa del temor d'aparició de carcinogènesi induïda per radiació, de la falta d'estudis randomitzats prospectius que permetin determinar els efectes de la RT comparant amb un grup control o amb un grup amb tractament estàndard, i de la falta de finançament o de disponibilitat de les instal·lacions adequades als centres sanitaris. Alemanya és un dels pocs països al món que utilitza la RT de manera rutinària per al tractament de malalties inflamatòries, hiperproliferatives i degeneratives osteoarticulars, en pacients amb contraindicacions o refractaris per als tractaments estàndard⁷. La nostra recerca amb RT-DB, en línia amb els resultats d'altres assajos clínics^{8,343,348}, demostra que aquest tractament no causa toxicitat en els pacients, sinó que, en canvi, presenta amplis beneficis terapèutics. La investigació en el camp de la RT és essencial per a millorar l'escassa acceptació que té la RT per al tractament de patologia no neoplàsica a escala mundial i potser en un futur, poder adoptar un model semblant a l'alemany. Tot i així, cal considerar de manera individual cada cas per saber si els beneficis clínics són superiors al risc estimat de carcinogènesi que se'n derivi, o si els tractaments estàndards poden resultar més perjudicials que la mateixa RT.

La RT es va fer servir com a tractament alternatiu per a la pneumònia bacteriana i atípica majoritàriament a la primera meitat del segle XX. Tot i que reduïa significativament la mortalitat, l'aparició de les sulfonamides i posteriorment de la penicil·lina, van portar al seu desús i es va perdre l'interès per a continuar amb la recerca¹. El gran nombre de publicacions científiques realitzades sobre la

pneumònia de la COVID-19 que reporten els beneficis terapèutics de la RT-DB, juntament amb tota l'evidència clínica que data del segle passat, podria incentivar en un futur l'ús d'aquest tractament com a complement o alternativa a la pauta terapèutica convencional en pacients amb pneumònia greu. A més, l'aparició de soques resistents de patògens respiratoris, com és el cas del *Streptococcus pneumoniae* i el *Mycobacterium tuberculosis*, als antibiòtics és un greu problema en l'actualitat que cal abordar, ja que es considera que aquesta serà una de les grans amenaces per a la salut pública del futur³⁸⁴. Per a poder fer front a aquesta crisi, cal descobrir noves rutes terapèutiques, més enllà dels antibiòtics, que puguin ser eficients per a tractar la pneumònia i l'ARDS, sent la RT-DB un tractament amb un gran potencial curatiu.

Les indicacions de la RT en patologia benigna, com ja hem comentat, inclouen malalties artrodegeneratives com l'artrosi i trastorns inflamatoris^{288,385} i s'indica també per a la prevenció de l'ossificació heterotòpica²⁷⁴, en la reestenosi vascular després d'una angioplàstia³⁸⁶, així com en síndromes hiperproliferatives²⁷⁶, entre d'altres indicacions establertes. Malgrat tot, pensem que el seu ús podria presentar beneficis clínics en altres camps de la medicina i nosaltres hipotetitzem de manera innovadora que la RT-DB podria ser una alternativa terapèutica en els pacients que presenten una lesió de la medul·la espinal (SCI) que no tenen més opcions de tractament. De manera resumida, immediatament després d'una SCI, es produeix en el lloc de la lesió un ambient molt reactiu que bloqueja, juntament amb la incapacitat de les neurones del sistema nerviós central per activar un programa gènic proregeneratiu, el recreixement axonal. Primerament, després d'una SCI, es produeix una resposta inflamatòria primerenca per part de macròfags proinflamatoris i la micròglia que és necessària per a eliminar les restes cel·lulars i els teixits danyats^{387,388}, així com per alliberar factors de creixement i citocines³⁸⁹. En la majoria dels casos, però, una subpoblació de macròfags proinflamatoris romanen al lloc de la lesió durant setmanes i s'acaben imposant sobre altres macròfags que alliberen citocines antiinflamatòries necessàries per a resoldre la inflamació inicial que s'ha produït. Aquests macròfags proinflamatoris, que alliberen mediadors inflamatoris com la IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, TNF- α i IFN- γ ³⁹⁰, acaben causant la cronificació de la resposta inflamatòria que deriva en neurotoxicitat i dany

secundari³⁹¹. En paral·lel, induirà també la mort cel·lular dels oligodendròcits produint la desmielinització dels axons i la pèrdua dels potencials d'acció³⁹⁰. La presència de macròfags proinflamatoris o antiinflamatoris en el moment adequat després d'una SCI és clau i determinarà el seu desenllaç posterior. En aquest context, es podria teoritzar que la capacitat de la RT-DB per induir canvis cap a un fenotip funcional més antiinflamatori dels macròfags i disminuir així la secreció de citocines proinflamàtores^{318,319}, podria ser útil després de la SCI, i que una única dosi de RT-DB (0,5 Gy) al lloc de la lesió podria reduir la resposta inflamàtoria mal adaptativa i impedir la seva cronificació posterior. D'aquesta manera, es podria teoritzar que la RT-DB podria obrir una finestra terapèutica en un camp totalment nou, el de la regeneració axonal, pel seu potencial per a modular l'ambient reactiu que es genera després d'una SCI i que inhibeix, en part, el creixement axonal.

En conclusió, les perspectives de futur de la RT-DB són àmplies i molt diverses. Per aquesta raó, cal continuar investigant tant els mecanismes subjacents involucrats, com els possibles efectes terapèutics potencials de la RT-DB en malalties inflamàtores, fins ara sense opcions terapèutiques, ja que la RT podria obrir noves rutes terapèutiques que exigeixen ser explorades.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

Les conclusions del primer i del segon estudi realitzats en la present tesi doctoral són que el tractament amb RT-DB (0,5 Gy) en pacients amb un diagnòstic de SARS-CoV-2 positiu i que presenten pneumònia:

1. Millora la funció respiratòria en termes d'un augment de la SpO₂, la PaFi i la SaFi i una disminució de la FiO₂ després d'un mes d'haver realitzat el tractament.
2. Incrementa la supervivència dels pacients tractats respecte als pacients controls.
3. Redueix el període d'hospitalització i la durada dels símptomes.
4. Actua com un factor de protecció disminuint la probabilitat de risc de mortalitat en els pacients tractats.
5. La càrrega viral al sèrum dels pacients, tant de manera categòrica (detectable vs. no detectable) o contínua (nombre de còpies/mL), 24 hores abans de la RT-DB està associada amb una major mortalitat als 30 dies després del tractament.
6. La càrrega viral al sèrum es correlaciona positivament amb unes puntuacions més elevades de CURB-65 i unes majors concentracions de LDH.
7. La supervivència actuarial als 30 dies després del tractament amb RT-DB és significativament major en els pacients que són avirèmics 24 hores abans del tractament respecte als individus virèmics.
8. Els paràmetres sanguinis AST, LDH i càrrega viral al sèrum 24 hores abans del tractament tenen una capacitat predictora mitjana de mortalitat als 30 dies després del tractament, que millora quan es combina la càrrega viral amb l'AST i la càrrega viral amb la LDH.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Calabrese EJ, Dhawan G. How radiotherapy was historically used to treat pneumonia: could it be useful today? *Yale J Biol Med.* 2013;86(4):555-70.
2. 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.
3. Rödel F, Schaller U, Schultze-Mosgau S, Beuscher HU, Keilholz L, Herrmann M, et al. The Induction of TGF- β 1 and NF- κ B Parallels a Biphasic Time Course of Leukocyte/Endothelial Cell Adhesion Following Low-Dose X-Irradiation. *Strahlenther Onkol.* 2004;180(4):194-200.
4. Roedel F, Kley N, Beuscher HU, Hildebrandt G, Keilholz L, Kern P, et al. Anti-inflammatory effect of low-dose X-irradiation and the involvement of a TGF- β 1 -induced down-regulation of leukocyte/endothelial cell adhesion. *Int J Radiat Biol.* 2002;78(8):711-9.
5. Arenas M, Gil F, Gironella M, Hernández V, Biete A, Piqué JM, et al. Time course of anti-inflammatory effect of low-dose radiotherapy: Correlation with TGF- β 1 expression. *Radiother Oncol.* 2008;86(3):399-406.
6. Arenas M, Gil F, Gironella M, Hernández V, Jorcano S, Biete A, et al. Anti-inflammatory effects of low-dose radiotherapy in an experimental model of systemic inflammation in mice. *Int J Radiat Oncol.* 2006;66(2):560-7.
7. Kriz J, Seegenschmiedt HM, Bartels A, Micke O, Muecke R, Schaefer U, et al. Updated strategies in the treatment of benign diseases—a patterns of care study of the german cooperative group on benign diseases. *Adv Radiat Oncol.* 2018;3(3):240-4.
8. Hess CB, Eng TY, Nasti TH, Dhare VR, Kleber TJ, Switchenko JM, et al. Whole-lung low-dose radiation therapy (LD-RT) for non-intubated oxygen-dependent patients with COVID-19-related pneumonia receiving dexamethasone and/or remdesivir. *Radiother Oncol.* 2021;165:20-31.
9. Sharma DN, Guleria R, Wig N, Mohan A, Rath G, Subramani V, et al. Low-dose radiation therapy for COVID-19 pneumonia: a pilot study. *Br J Radiol.* 2021;94(1126):20210187.
10. Sanmamed N, Alcantara P, Gómez S, Bustos A, Cerezo E, Gaztañaga M, et al. Low-dose Radiation Therapy in the Management of COVID-19 Pneumonia (LOWRAD-Cov19). Final results of a prospective phase I-II trial. *Radiother Oncol.* 2022;171:25-9.
11. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med.* 2020;382(8):727-33.
12. Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA.* 2020;323(13):1239.
13. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020;579(7798):270-3.
14. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature.* 2020;579(7798):265-9.
15. World Health Organization. Coronavirus disease 2019 (COVID-19). Situation report – 51 [Internet]. 2020 [citat 10 de juny de 2023]. Disponible a: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200311-sitrep-51-covid-19.pdf?sfvrsn=1ba62e57_10.
16. World Health Organization [Internet]. 2020 [citat 10 de juny de 2023]. Disponible a: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331475>
17. Su S, Wong G, Shi W, Liu J, Lai ACK, Zhou J, et al. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends Microbiol.* 2016;24(6):490-502.
18. Ye ZW, Yuan S, Yuen KS, Fung SY, Chan CP, Jin DY. Zoonotic origins of human coronaviruses. *Int J Biol Sci.* 2020;16(10):1686-97.
19. Santacrose L, Charitos IA, Carretta DM, De Nitto E, Lovero R. The human coronaviruses (HCoVs) and the molecular mechanisms of SARS-CoV-2 infection. *J Mol Med.* 2021;99(1):93-106.
20. Hamre D, Procknow JJ. A New Virus Isolated from the Human Respiratory Tract. *Exp Biol Med.* 1966;121(1):190-3.
21. Drosten C, Günther S, Preiser W, Van Der Werf S, Brodt HR, Becker S, et al. Identification of a Novel Coronavirus in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. *N Engl J Med.* 2003;348(20):1967-76.
22. De Wit E, Van Doremalen N, Falzarano D, Munster VJ. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14(8):523-34.
23. Zaki AM, Van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med.* 2012;367(19):1814-20.
24. Rabaan AA, Al-Ahmed SH, Sah R, Alqumber MA, Haque S, Patel SK, et al. MERS-CoV: epidemiology, molecular dynamics, therapeutics, and future challenges. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2021;20(1):8.

25. Biryukov J, Boydston JA, Dunning RA, Yeager JJ, Wood S, Ferris A, et al. SARS-CoV-2 is rapidly inactivated at high temperature. *Environ Chem Lett*. 2021;19(2):1773-7.
26. Ganesh B, Rajakumar T, Malathi M, Manikandan N, Nagaraj J, Santhakumar A, et al. Epidemiology and pathobiology of SARS-CoV-2 (COVID-19) in comparison with SARS, MERS: An updated overview of current knowledge and future perspectives. *Clin Epidemiol Glob Health*. 2021;10:100694.
27. Redondo N, Zaldívar-López S, Garrido JJ, Montoya M. SARS-CoV-2 Accessory Proteins in Viral Pathogenesis: Knowns and Unknowns. *Front Immunol*. 2021;12:708264.
28. Finkel Y, Mizrahi O, Nachshon A, Weingarten-Gabbay S, Morgenstern D, Yahalom-Ronen Y, et al. The coding capacity of SARS-CoV-2. *Nature*. 2021;589(7840):125-30.
29. Khurstalev VV, Giri R, Khurstaleva TA, Kapuganti SK, Stojarov AN, Poboinev VV. Translation-Associated Mutational U-Pressure in the First ORF of SARS-CoV-2 and Other Coronaviruses. *Front Microbiol*. 2020;11:559165.
30. Temmam S, Vongphayloth K, Baquero E, Munier S, Bonomi M, Regnault B, et al. Bat coronaviruses related to SARS-CoV-2 and infectious for human cells. *Nature*. 2022;604(7905):330-6.
31. Mallapaty S. Closest known relatives of virus behind COVID-19 found in Laos. *Nature*. 2021;597(7878):603-603.
32. Zhang T, Wu Q, Zhang Z. Probable Pangolin Origin of SARS-CoV-2 Associated with the COVID-19 Outbreak. *Curr Biol*. 2020;30(7):1346-1351.e2.
33. Oude Munnink BB, Sikkema RS, Nieuwenhuijse DF, Molenaar RJ, Munger E, Molenkamp R, et al. Transmission of SARS-CoV-2 on mink farms between humans and mink and back to humans. *Science*. 2021;371(6525):172-7.
34. Guan W jie, Ni Z yi, Hu Y, Liang W hua, Ou C quan, He J xing, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med*. 2020;382(18):1708-20.
35. Kilic H, Arguder E, Karalezli A, Unsal E, Guner R, Kayaslan B, et al. Effect of chronic lung diseases on mortality of prevariant COVID-19 pneumonia patients. *Front Med*. 2022;9:957598.
36. Cordero A, Santos García-Gallego C, Bertomeu-González V, Fácila L, Rodríguez-Mañero M, Escribano D, et al. Mortality associated with cardiovascular disease in patients with COVID-19. *Rec Cardioclinics*. 2021;56(1):30-8.
37. Park JM, Woo W, Lee SC, Park S, Yon DK, Lee SW, et al. Prevalence and Mortality Risk of Neurological Disorders during the COVID-19 Pandemic: An Umbrella Review of the Current Evidence. *Neuroepidemiology* [Internet]. 12 d'abril de 2023 [citat 16 de juny de 2023]; Disponible a: <https://doi.org/10.1159/000530536>
38. Al-Sabah S, Al-Haddad M, Al-Youha S, Jamal M, Almazeedi S. COVID-19: Impact of obesity and diabetes on disease severity. *Clin Obes*. 2020 Dec;10(6):e12414.
39. World Health Organization. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard [Internet]. 2020 [citat 10 de juny de 2023]. Disponible a: <https://covid19.who.int/>.
40. Wang H, Paulson KR, Pease SA, Watson S, Comfort H, Zheng P, et al. Estimating excess mortality due to the COVID-19 pandemic: a systematic analysis of COVID-19-related mortality, 2020 - 21. *Lancet*. 2022;399(10334):1513-36.
41. Tracking covid-19 excess deaths across countries. *The Economist* [Internet]. 2021 [citat 10 de juny de 2023]. Disponible a: <https://www.economist.com/graphic-detail/coronavirus-excess-deaths-tracker>
42. World Health Organization. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) [Internet]. 2013 [citat 10 de juny de 2023]. Disponible a: www.who.int/emergencies/mers-cov/en/.
43. Pachetti M, Marini B, Benedetti F, Giudici F, Mauro E, Storici P, et al. Emerging SARS-CoV-2 mutation hot spots include a novel RNA-dependent-RNA polymerase variant. *J Transl Med*. 2020;18(1):179.
44. World Health Organization. Statement on the update of WHO's working definitions and tracking system for SARS-CoV-2 variants of concern and variants of interest [Internet]. 2023 [citat 10 de juny de 2023]. Disponible a: <https://www.who.int/news/item/16-03-2023-statement-on-the-update-of-who-s-working-definitions-and-tracking-system-for-sars-cov-2-variants-of-concern-and-variants-of-interest>.
45. Centers for Disease Control and Prevention. SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions [Internet]. 2021 [citat 10 de juny de 2023]. Disponible a: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html#print>.
46. World Health Organization. Historical working definitions and primary actions for SARS-CoV-2 variants [Internet]. 2021 [citat 10 de juny de 2023]. Disponible a: <https://www.who.int/publications/m/item/historical-working-definitions-and-primary-actions-for-sars-cov-2-variants>
47. Marco Cascella; Michael Rajnik; Abdul Aleem; Scott C. Dulebohn; Raffaella Di Napoli. Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19). *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [citat 16 de juny 2023]. Disponible a: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/>
48. Marik PE, Iglesias J, Varon J, Kory P. A scoping review of the pathophysiology of COVID-19. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2021;35:205873842110480.

49. Huang Y, Yang C, Xu X feng, Xu W, Liu S wen. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antivirus drug development for COVID-19. *Acta Pharmacol Sin.* 2020;41(9):1141-9.
50. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Pöhlmann S. A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells. *Mol Cell.* 2020;78(4):779-784.e5.
51. Zhang L, Mann M, Syed ZA, Reynolds HM, Tian E, Samara NL, et al. Furin cleavage of the SARS-CoV-2 spike is modulated by O-glycosylation. *Proc Natl Acad Sci.* 2021;118(47):e2109905118.
52. Shang J, Wan Y, Luo C, Ye G, Geng Q, Auerbach A, et al. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci.* 2020;117(21):11727-34.
53. 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.
54. Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022;23(1):3-20.
55. Yan L, Zhang Y, Ge J, Zheng L, Gao Y, Wang T, et al. Architecture of a SARS-CoV-2 mini replication and transcription complex. *Nat Commun.* 2020;11(1):5874.
56. Knoops K, Kikkert M, Worm SHEVD, Zevenhoven-Dobbe JC, Van Der Meer Y, Koster AJ, et al. SARS-Coronavirus Replication Is Supported by a Reticulovesicular Network of Modified Endoplasmic Reticulum. *PLoS Biol.* 2008;6(9):e226.
57. Malone B, Urakova N, Snijder EJ, Campbell EA. Structures and functions of coronavirus replication-transcription complexes and their relevance for SARS-CoV-2 drug design. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022;23(1):21-39.
58. Daly JL, Simonetti B, Klein K, Chen KE, Williamson MK, Antón-Plágaro C, et al. Neuropilin-1 is a host factor for SARS-CoV-2 infection. *Science.* 2020;370(6518):861-5.
59. Xu H, Zhong L, Deng J, Peng J, Dan H, Zeng X, et al. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *Int J Oral Sci.* 2020;12(1):8.
60. Zou X, Chen K, Zou J, Han P, Hao J, Han Z. Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. *Front Med.* 2020;14(2):185-92.
61. Galmiche S, Cortier T, Charmet T, Schaeffer L, Chény O, Von Platen C, et al. SARS-CoV-2 incubation period across variants of concern, individual factors, and circumstances of infection in France: a case series analysis from the ComCor study. *Lancet Microbe.* 2023;4(6):e409-17.
62. Sah P, Fitzpatrick MC, Zimmer CF, Abdollahi E, Juden-Kelly L, Moghadas SM, et al. Asymptomatic SARS-CoV-2 infection: A systematic review and meta-analysis. *Proc Natl Acad Sci.* 2021;118(34):e2109229118.
63. Da Rosa Mesquita R, Francelino Silva Junior LC, Santos Santana FM, Farias De Oliveira T, Campos Alcântara R, Monteiro Arnozo G, et al. Clinical manifestations of COVID-19 in the general population: systematic review. *Wien Klin Wochenschr.* 2021;133(7-8):377-82.
64. Zhu J, Zhong Z, Ji P, Li H, Li B, Pang J, et al. Clinicopathological characteristics of 8697 patients with COVID-19 in China: a meta-analysis. *Fam Med Community Health.* 2020;8(2):e000406.
65. Wu C, Chen X, Cai Y, Xia J, Zhou X, Xu S, et al. Risk Factors Associated With Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients With Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern Med.* 2020;180(7):934.
66. Zhang C, Shi L, Wang FS. Liver injury in COVID-19: management and challenges. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2020;5(5):428-30.
67. World Health Organization. Living guidance for clinical management of COVID-19 [Internet]. 2021 [citad 10 de juny de 2023]. Disponible a: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-clinical-2021-2>
68. Zhang Q, Bastard P, COVID Human Genetic Effort, Karbusz A, Gervais A, Tayoun AA, et al. Human genetic and immunological determinants of critical COVID-19 pneumonia. *Nature.* 2022;603(7902):587-98.
69. Attaway AH, Scheraga RG, Bhimraj A, Biehl M, Hatipoğlu U. Severe covid-19 pneumonia: pathogenesis and clinical management. *BMJ.* 2021;n436.
70. Gadsby NJ, Musher DM. The Microbial Etiology of Community-Acquired Pneumonia in Adults: from Classical Bacteriology to Host Transcriptional Signatures. *Clin Microbiol Rev.* 2022;35(4):e00015-22.
71. Miyashita N. Atypical pneumonia: Pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Respir Investig.* 2022;60(1):56-67.
72. Konopka KE, Perry W, Huang T, Farver CF, Myers JL. Usual Interstitial Pneumonia is the Most Common Finding in Surgical Lung Biopsies from Patients with Persistent Interstitial Lung Disease Following Infection with SARS-CoV-2. *eClinicalMedicine.* 2021;42:101209.

73. Guo J, Zhou B, Zhu M, Yuan Y, Wang Q, Zhou H, et al. CURB-65 may serve as a useful prognostic marker in COVID-19 patients within Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Epidemiol Infect.* 2020;148:e241.
74. Lim WS. Defining community acquired pneumonia severity on presentation to hospital: an international derivation and validation study. *Thorax.* 2003;58(5):377-82.
75. Gibson PG, Qin L, Puah SH. COVID-19 acute respiratory distress syndrome (ARDS): clinical features and differences from typical pre-COVID-19 ARDS. *Med J Aust.* 2020;213(2):54.
76. Gupta A, Madhavan MV, Sehgal K, Nair N, Mahajan S, Sehrawat TS, et al. Extrapulmonary manifestations of COVID-19. *Nat Med.* 2020;26(7):1017-32.
77. Louis TJ, Qasem A, Abdelli LS, Naser SA. Extra-Pulmonary Complications in SARS-CoV-2 Infection: A Comprehensive Multi Organ-System Review. *Microorganisms.* 2022;10(1):153.
78. Toussi SS, Hammond JL, Gerstenberger BS, Anderson AS. Therapeutics for COVID-19. *Nat Microbiol.* 2023;8(5):771-86.
79. Summary of product characteristics (Molnupiravir). European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) [Internet]. 2022 [citat 10 de juny de 2023]. Disponible a: https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/lagevrio-also-known-molnupiravir-mk-4482-covid-19-article-53-procedure-assessment-report_en.pdf.
80. Summary of product characteristics (Kineret). European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) [Internet]. 2021 [citat 10 de juny de 2023]. Disponible a: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/kineret-epar-product-information_en.pdf.
81. Summary of product characteristics (Roacterma). European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) [Internet]. 2021 [citat 10 de juny de 2023]. Disponible a: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/roactemra-epar-product-information_en.pdf.
82. Summary of product characteristics (Olumiant). European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) [Internet]. 2022 [citat 10 de juny de 2023]. Disponible a: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/olumiant-epar-product-information_en.pdf.
83. Bellino S. COVID-19 treatments approved in the European Union and clinical recommendations for the management of non-hospitalized and hospitalized patients. *Ann Med.* 2022;54(1):2844-8.
84. Summary of product characteristics (Paxlovid). European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) [Internet]. 2022 [citat 10 de juny de 2023]. Disponible a: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/paxlovid-epar-product-information_en.pdf.
85. Summary of product characteristics (Veklury). European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) [Internet]. 2022 [citat 10 de juny de 2023]. Disponible a: https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/veklury-product-information-approved-chmp-25-june-2020-pending-endorsement-european-commission_en.pdf.
86. Summary of product characteristics (Regkirona). European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) [Internet]. 2021 [citat 10 de juny de 2023]. Disponible a: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/regkirona-epar-product-information_en.pdf.
87. Summary of product characteristics (Ronapreve). European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) [Internet]. 2021 [citat 10 de juny de 2023]. Disponible a: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/ronapreve-epar-product-information_en.pdf.
88. Summary of product characteristics (Xevudy). European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) [Internet]. 2021 [citat 10 de juny de 2023]. Disponible a: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/xevudy-epar-product-information_en.pdf.
89. Summary of product characteristics (Evusheld). European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) [Internet]. 2022 [citat 10 de juny de 2023]. Disponible a: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/evusheld-epar-product-information_en.pdf.
90. Chaudhuri D, Sasaki K, Karkar A, Sharif S, Lewis K, Mammen MJ, et al. Corticosteroids in COVID-19 and non-COVID-19 ARDS: a systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med.* 2021;47(5):521-37.
91. European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) [Internet]. 2020 [citat 10 de juny de 2023]. Disponible a: <https://www.ema.europa.eu/en/news/ema-endorses-use-dexamethasone-covid-19-patients-oxygen-mechanical-ventilation>.

92. European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) [Internet]. 2021 [citat 10 de juny de 2023]. Disponible a: <https://www.ema.europa.eu/en/news/insufficient-data-use-inhaled-corticosteroids-treat-covid-19>.
93. Tatar M, Shoorekchali JM, Faraji MR, Wilson FA. International COVID-19 vaccine inequality amid the pandemic: Perpetuating a global crisis? *J Glob Health*. 2021;11:03086.
94. European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) [Internet]. 2022 [citat 10 de juny de 2023]. Disponible a: <https://www.ema.europa.eu/en/news/first-adapted-covid-19-booster-vaccines-recommended-approval-eu>.
95. European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) [Internet]. 2021 [citat 10 de juny de 2023]. Disponible a: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/public-health-threats/coronavirus-disease-covid-19/covid-19-medicines#%2Fcovid-19-vaccines%3A-strains%2C-use-and-age-ranges-section>.
96. Aslan A, Aslan C, Zolbanin NM, Jafari R. Acute respiratory distress syndrome in COVID-19: possible mechanisms and therapeutic management. *Pneumonia*. 2021;13(1):14.
97. Ravindra NG, Alfajaro MM, Gasque V, Huston NC, Wan H, Szigeti-Buck K, et al. Single-cell longitudinal analysis of SARS-CoV-2 infection in human airway epithelium identifies target cells, alterations in gene expression, and cell state changes. *PLOS Biol*. 2021;19(3):e3001143.
98. Mason RJ. Thoughts on the alveolar phase of COVID-19. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2020;319(1):L115-20.
99. Parasher A. COVID-19: Current understanding of its Pathophysiology, Clinical presentation and Treatment. *Postgrad Med J*. 2021;97(1147):312-20.
100. Hu B, Huang S, Yin L. The cytokine storm and COVID-19. *J Med Virol*. 2021;93(1):250-6.
101. Hanna R, Dalvi S, Sălăgean T, Pop ID, Bordea IR, Benedicenti S. Understanding COVID-19 Pandemic: Molecular Mechanisms and Potential Therapeutic Strategies. An Evidence-Based Review. *J Inflamm Res*. 2021; 14:13-56.
102. Santos RAS, Oudit GY, Verano-Braga T, Canta G, Steckelings UM, Bader M. The renin-angiotensin system: going beyond the classical paradigms. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 2019;316(5):H958-70.
103. Okada M, Suzuki K, Matsumoto M, Takada K, Nakanishi T, Horikoshi H, et al. Effects of angiotensin on the expression of fibrosis-associated cytokines, growth factors, and matrix proteins in human lung fibroblasts. *J Clin Pharm Ther*. 2009;34(3):289-99.
104. Duangrat R, Parichatikanond W, Morales NP, Pinthong D, Mangmool S. Sustained AT1R stimulation induces upregulation of growth factors in human cardiac fibroblasts via Gαq/TGF-β/ERK signaling that influences myocyte hypertrophy. *Eur J Pharmacol*. 2022;937:175384.
105. Marshall RP, McANULTY RJ, Laurent GJ. Angiotensin II Is Mitogenic for Human Lung Fibroblasts via Activation of the Type 1 Receptor. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(6):1999-2004.
106. Deng J, Wang D xin, Deng W, Li C yi, Tong J. The Effect of Endogenous Angiotensin II on Alveolar Fluid Clearance in Rats with Acute Lung Injury. *Can Respir J*. 2012;19(5):311-8.
107. Rosenfeld CR, Zagariya AM, Liu XT, Willis BC, Fluharty S, Vidyasagar D. Meconium Increases Type 1 Angiotensin II Receptor Expression and Alveolar Cell Death. *Pediatr Res*. 2008;63(3):251-6.
108. Yu Q, Zhu D, Zou Y, Wang K, Rao P, Shen Y. Catalpol Attenuates Pulmonary Fibrosis by Inhibiting Ang II/AT1 and TGF-β/Smad-Mediated Epithelial Mesenchymal Transition. *Front Med*. 2022;9:878601.
109. Kaschina E, Unger T. Angiotensin AT1/AT2 Receptors: Regulation, Signalling and Function. *Blood Press*. 2003;12(2):70-88.
110. Ni W, Yang X, Yang D, Bao J, Li R, Xiao Y, et al. Role of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in COVID-19. *Crit Care*. 2020;24(1):422.
111. El-Hashim AZ, Renno WM, Raghupathy R, Abduo HT, Akhtar S, Benter IF. Angiotensin-(1-7) inhibits allergic inflammation, via the MAS1 receptor, through suppression of ERK1/2- and NF-κB-dependent pathways: Effect of Ang-(1-7)/MAS1 receptors on airway inflammation. *Br J Pharmacol*. 2012;166(6):1964-76.
112. Shenoy V, Ferreira AJ, Qi Y, Fraga-Silva RA, Díez-Freire C, Dooies A, et al. The Angiotensin-Converting Enzyme 2/Angiogenesis-(1-7)/Mas Axis Confers Cardiopulmonary Protection against Lung Fibrosis and Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182(8):1065-72.
113. Imai Y, Kuba K, Rao S, Huan Y, Guo F, Guan B, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature*. 2005;436(7047):112-6.
114. Verdecchia P, Cavallini C, Spanevello A, Angeli F. COVID-19: ACE2centric Infective Disease? *Hypertension*. 2020;76(2):294-9.
115. Bayati A, Kumar R, Francis V, McPherson PS. SARS-CoV-2 infects cells after viral entry via clathrin-mediated endocytosis. *J Biol Chem*. 2021;296:100306.
116. Ou X, Liu Y, Lei X, Li P, Mi D, Ren L, et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat Commun*. 2020;11(1):1620.
117. Zipeto D, Palmeira JDF, Argañaraz GA, Argañaraz ER. ACE2/ADAM17/TMPRSS2 Interplay May Be the Main Risk Factor for COVID-19. *Front Immunol*. 2020;11:576745.

118. Gao X, Zhang S, Gou J, Wen Y, Fan L, Zhou J, et al. Spike-mediated ACE2 down-regulation was involved in the pathogenesis of SARS-CoV-2 infection. *J Infect.* 2022;85(4):418-27.
119. Camargo RL, Bombassaro B, Monfort-Pires M, Mansour E, Palma AC, Ribeiro LC, et al. Plasma Angiotensin II Is Increased in Critical Coronavirus Disease 2019. *Front Cardiovasc Med.* 2022;9:847809.
120. Liu F, Liu F, Wang L. COVID-19 and cardiovascular diseases. *J Mol Cell Biol.* 2021;13(3):161-7.
121. Teuwen LA, Geldhof V, Pasut A, Carmeliet P. COVID-19: the vasculature unleashed. *Nat Rev Immunol.* 2020;20(7):389-91.
122. Mateo T, Naim Abu Nabah Y, Abu Taha M, Mata M, Cerdá-Nicolás M, Proudfoot A, et al. Angiotensin II-Induced Mononuclear Leukocyte Interactions with Arteriolar and Venular Endothelium Are Mediated by the Release of Different CC Chemokines. *J Immunol.* 2006;176(9):5577-86.
123. Biancardi VC, Bomfim GF, Reis WL, Al-Gassimi S, Nunes KP. The interplay between Angiotensin II, TLR4 and hypertension. *Pharmacol Res.* 2017;120:88-96.
124. Levy JH, Iba T, Olson LB, Corey KM, Ghadimi K, Connors JM. COVID-19: Thrombosis, thromboinflammation, and anticoagulation considerations. *Int J Lab Hematol.* 2021;43(S1):29-35.
125. Tabassum A, Iqbal MS, Sultan S, Alhuthali RA, Alshubaili DI, Sayyam RS, et al. Dysregulated Bradykinin: Mystery in the Pathogenesis of COVID-19. Cervellati C, editor. *Mediators Inflamm.* 2022;2022:1-8.
126. Bekassy Z, Lopatko Fagerström I, Bader M, Karpman D. Crosstalk between the renin-angiotensin, complement and kallikrein-kinin systems in inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2022;22(7):411-28.
127. Prado GN, Taylor L, Zhou X, Ricupero D, Mierke DF, Polgar P. Mechanisms regulating the expression, self-maintenance, and signaling-function of the bradykinin B2 and B1 receptors. *J Cell Physiol.* 2002;193(3):275-86.
128. Kimura S, Tsuji H, Nishimura H, Kato H, Ukimura N, Yano S, et al. Bradykinin enhances in vitro procoagulant and antifibrinolytic properties of rat vascular endothelial cells. *Thromb Res.* 2002;106(1):41-50.
129. Bryant J, Shariat-Madar Z. Human Plasma Kallikrein-Kinin System: Physiological and Biochemical Parameters. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* 2009;7(3):234-50.
130. Bascands JL, Bachvarova M, Neau E, Schanstra JP, Bachvarov D. Molecular determinants of LPS-induced acute renal inflammation: Implication of the kinin B1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;386(2):407-12.
131. Alhenc-Gelas F, Bouby N, Girolami JP. Kallikrein/K1, Kinins, and ACE/Kininase II in Homeostasis and in Disease Insight From Human and Experimental Genetic Studies, Therapeutic Implication. *Front Med.* 2019;6:136.
132. Martens CP, Van Mol P, Wauters J, Wauters E, Gangnus T, Noppen B, et al. Dysregulation of the kallikrein-kinin system in bronchoalveolar lavage fluid of patients with severe COVID-19. *eBioMedicine.* 2022;83:104195.
133. Garvin MR, Alvarez C, Miller JI, Prates ET, Walker AM, Amos BK, et al. A mechanistic model and therapeutic interventions for COVID-19 involving a RAS-mediated bradykinin storm. *eLife.* 2020;9:e59177.
134. Alfaro E, Díaz-García E, García-Tovar S, Zamarrón E, Mangas A, Galera R, et al. Impaired Kallikrein-Kinin System in COVID-19 Patients' Severity. *Front Immunol.* 2022;13:909342.
135. Dias JP, Talbot S, Sénécal J, Carayon P, Couture R. Kinin B1 Receptor Enhances the Oxidative Stress in a Rat Model of Insulin Resistance: Outcome in Hypertension, Allodynia and Metabolic Complications. *PLoS ONE.* 2010;5(9):e12622.
136. Sodhi CP, Wohlford-Lenane C, Yamaguchi Y, Prindle T, Fulton WB, Wang S, et al. Attenuation of pulmonary ACE2 activity impairs inactivation of des-Arg-9-bradykinin/BKB1R axis and facilitates LPS-induced neutrophil infiltration. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2018;314(1):L17-31.
137. Lee CH, Shieh DC, Tzeng CY, Chen CP, Wang SP, Chiu YC, et al. Bradykinin-induced IL-6 expression through bradykinin B2 receptor, phospholipase C, protein kinase C δ and NF- κ B pathway in human synovial fibroblasts. *Mol Immunol.* 2008;45(14):3693-702.
138. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987;327(6122):524-6.
139. Holland JA, Pritchard KA, Pappolla MA, Wolin MS, Rogers NJ, Stemerman MB. Bradykinin induces superoxide anion release from human endothelial cells. *J Cell Physiol.* 1990;143(1):21-5.
140. Shariat-Madar Z, Mahdi F, Warnock M, Homeister JW, Srikanth S, Krijanovski Y, et al. Bradykinin B2 receptor knockout mice are protected from thrombosis by increased nitric oxide and prostacyclin. *Blood.* 2006;108(1):192-9.
141. Ghahestani SM, Mahmoudi J, Hajebrahimi S, Sioofy-Khojine AB, Salehi-Pourmehr H, Sadeghi-Ghyassi F, et al. Bradykinin as a Probable Aspect in SARS-Cov-2 Scenarios: Is Bradykinin Sneaking out of our Sight? *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 2020;17;19(S1):13-17.

142. Roche JA, Roche R. A hypothesized role for dysregulated bradykinin signaling in COVID-19 respiratory complications. *FASEB J*. 2020;34(6):7265-9.
143. 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.
144. Zhao Y, Zhao Z, Wang Y, Zhou Y, Ma Y, Zuo W. Single-Cell RNA Expression Profiling of ACE2, the Receptor of SARS-CoV-2. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020;202(5):756-9.
145. Lukassen S, Chua RL, Trefzer T, Kahn NC, Schneider MA, Muley T, et al. SARS-CoV-2 receptor ACE2 and TMPRSS2 are primarily expressed in bronchial transient secretory cells. *EMBO J*. 2020;39(10):e105114.
146. Mason RJ. Biology of alveolar type II cells. *Respirology*. 2006;11(s1):S12-5.
147. Wong MH, Johnson MD. Differential Response of Primary Alveolar Type I and Type II Cells to LPS Stimulation. *PLoS ONE*. 2013;8(1):e55545.
148. Gschwend J, Sherman SPM, Ridder F, Feng X, Liang HE, Locksley RM, et al. Alveolar macrophages rely on GM-CSF from alveolar epithelial type 2 cells before and after birth. *J Exp Med*. 2021;218(10):e20210745.
149. Singh G, Katyal SL, Brown WE, Collins DL, Mason RJ. Pulmonary Lysozyme-A Secretory Protein of Type II Pneumocytes in the Rat. *Am Rev Respir Dis*. 1988;138(5):1261-7.
150. Desai TJ, Brownfield DG, Krasnow MA. Alveolar progenitor and stem cells in lung development, renewal and cancer. *Nature*. 2014;507(7491):190-4.
151. Huang J, Hume AJ, Abo KM, Werder RB, Villacorta-Martin C, Alysandratos KD, et al. SARS-CoV-2 Infection of Pluripotent Stem Cell-Derived Human Lung Alveolar Type 2 Cells Elicits a Rapid Epithelial-Intrinsic Inflammatory Response. *Cell Stem Cell*. 2020;27(6):962-973.e7.
152. Colmenero I, Santonja C, Alonso-Riaño M, Noguera-Morel L, Hernández-Martín A, Andina D, et al. SARS-CoV-2 endothelial infection causes COVID-19 chilblains: histopathological, immunohistochemical and ultrastructural study of seven paediatric cases. *Br J Dermatol*. 2020;183(4):729-37.
153. Yang Y, Wu Y, Meng X, Wang Z, Younis M, Liu Y, et al. SARS-CoV-2 membrane protein causes the mitochondrial apoptosis and pulmonary edema via targeting BOK. *Cell Death Differ*. 2022;29(7):1395-408.
154. Li S, Zhang Y, Guan Z, Li H, Ye M, Chen X, et al. SARS-CoV-2 triggers inflammatory responses and cell death through caspase-8 activation. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5(1):235.
155. Sun X, Liu Y, Huang Z, Xu W, Hu W, Yi L, et al. SARS-CoV-2 non-structural protein 6 triggers NLRP3-dependent pyroptosis by targeting ATP6AP1. *Cell Death Differ*. 2022;29(6):1240-54.
156. Potere N, Del Buono MG, Caricchio R, Cremer PC, Vecchié A, Porreca E, et al. Interleukin-1 and the NLRP3 inflammasome in COVID-19: Pathogenetic and therapeutic implications. *eBioMedicine*. 2022;85:104299.
157. Rodrigues TS, De Sá KSG, Ishimoto AY, Becerra A, Oliveira S, Almeida L, et al. Inflammasomes are activated in response to SARS-CoV-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients. *J Exp Med*. 2021;218(3):e20201707.
158. Han S, Mallampalli RK. The Role of Surfactant in Lung Disease and Host Defense against Pulmonary Infections. *Ann Am Thorac Soc*. 2015;12(5):765-74.
159. Parimon T, Yao C, Stripp BR, Noble PW, Chen P. Alveolar Epithelial Type II Cells as Drivers of Lung Fibrosis in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Int J Mol Sci*. 2020;21(7):2269.
160. Hama Amin BJ, Kakamad FH, Ahmed GS, Ahmed SF, Abdulla BA, Mohammed SH, et al. Post COVID-19 pulmonary fibrosis; a meta-analysis study. *Ann Med Surg*. 2022;77:103590.
161. Zhou Z, Ren L, Zhang L, Zhong J, Xiao Y, Jia Z, et al. Overly Exuberant Innate Immune Response to SARS-CoV-2 Infection. SSRN Electron J [Internet]. 2020 [citat 16 de juny de 2023]; Disponible a: <https://www.ssrn.com/abstract=3551623>
162. Merad M, Martin JC. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(6):355-62.
163. Zhang D, Guo R, Lei L, Liu H, Wang Y, Wang Y, et al. Frontline Science: COVID-19 infection induces readily detectable morphologic and inflammation-related phenotypic changes in peripheral blood monocytes. *J Leukoc Biol*. 2021;109(1):13-22.
164. Brewer RC, Robinson WH, Lanz TV. SARS-CoV-2 infection of monocytes: balancing acts of antibodies and inflammasomes. *Signal Transduct Target Ther*. 2022;7(1):250.
165. Junqueira C, Crespo Â, Ranjbar S, De Lacerda LB, Lewandrowski M, Ingber J, et al. FcγR-mediated SARS-CoV-2 infection of monocytes activates inflammation. *Nature*. 2022;606(7914):576-84.
166. Sefik E, Qu R, Junqueira C, Kaffe E, Mirza H, Zhao J, et al. Inflammasome activation in infected macrophages drives COVID-19 pathology. *Nature*. 2022;606(7914):585-93.
167. Conway EM, Mackman N, Warren RQ, Wolberg AS, Mosnier LO, Campbell RA, et al. Understanding COVID-19-associated coagulopathy. *Nat Rev Immunol*. 2022;22(10):639-49.

168. Witkowski M, Landmesser U, Rauch U. Tissue factor as a link between inflammation and coagulation. *Trends Cardiovasc Med.* 2016;26(4):297-303.
169. Hottz ED, Azevedo-Quintanilha IG, Palhinha L, Teixeira L, Barreto EA, Pão CRR, et al. Platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation trigger tissue factor expression in patients with severe COVID-19. *Blood.* 2020;136(11):1330-41.
170. Sachetto ATA, Mackman N. Tissue Factor and COVID-19: An Update. *Curr Drug Targets.* 2022;23(17):1573-7.
171. Tang N, Li D, Wang X, Sun Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost.* 2020;18(4):844-7.
172. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature.* 2013;496(7446):445-55.
173. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(11):723-37.
174. Gensel JC, Kopper TJ, Zhang B, Orr MB, Bailey WM. Predictive screening of M1 and M2 macrophages reveals the immunomodulatory effectiveness of post spinal cord injury azithromycin treatment. *Sci Rep.* 2017;7(1):40144.
175. Pierini D, Bryan NS. Nitric Oxide Availability as a Marker of Oxidative Stress. *Methods Mol Biol.* 2015;1208:63-71.
176. Canton M, Sánchez-Rodríguez R, Spera I, Venegas FC, Favia M, Viola A, et al. Reactive Oxygen Species in Macrophages: Sources and Targets. *Front Immunol.* 2021;12:734229.
177. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *J Immunol.* 2000;164(12):6166-73.
178. Stout RD, Suttles J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol.* 2004;76(3):509-13.
179. Wynn TA, Vannella KM. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity.* 2016;44(3):450-62.
180. Hu G, Christman JW. Alveolar Macrophages in Lung Inflammation and Resolution. *Front Immunol.* 2019;10:2275.
181. Hou F, Xiao K, Tang L, Xie L. Diversity of Macrophages in Lung Homeostasis and Diseases. *Front Immunol.* 2021;12:753940.
182. Desch AN, Gibbings SL, Goyal R, Kolde R, Bednarek J, Bruno T, et al. Flow Cytometric Analysis of Mononuclear Phagocytes in Nondiseased Human Lung and Lung-Draining Lymph Nodes. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016;193(6):614-26.
183. Bain CC, MacDonald AS. The impact of the lung environment on macrophage development, activation and function: diversity in the face of adversity. *Mucosal Immunol.* 2022;15(2):223-34.
184. Liao M, Liu Y, Yuan J, Wen Y, Xu G, Zhao J, et al. Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. *Nat Med.* 2020;26(6):842-4.
185. Lian Q, Zhang K, Zhang Z, Duan F, Guo L, Luo W, et al. Differential effects of macrophage subtypes on SARS-CoV-2 infection in a human pluripotent stem cell-derived model. *Nat Commun.* 2022;13(1):2028.
186. Cesta MC, Zippoli M, Marsiglia C, Gavioli EM, Mantelli F, Allegretti M, et al. The Role of Interleukin-8 in Lung Inflammation and Injury: Implications for the Management of COVID-19 and Hyperinflammatory Acute Respiratory Distress Syndrome. *Front Pharmacol.* 2022;12:808797.
187. Janiuk K, Jabłońska E, Garley M. Significance of NETs Formation in COVID-19. *Cells.* 2021;10(1):151.
188. Herold S, Steinmueller M, Von Wulffen W, Cakarova L, Pinto R, Pleschka S, et al. Lung epithelial apoptosis in influenza virus pneumonia: the role of macrophage-expressed TNF-related apoptosis-inducing ligand. *J Exp Med.* 2008;205(13):3065-77.
189. Otsuka R, Seino K ichiro. Macrophage activation syndrome and COVID-19. *Inflamm Regen.* 2020;40(1):19.
190. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(10):a016295-a016295.
191. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science.* 2004;303(5663):1532-5.
192. Kåsine T, Dyrhol-Riise AM, Barratt-Due A, Kildal AB, Olsen IC, Nezvalova-Henriksen K, et al. Neutrophil count predicts clinical outcome in hospitalized COVID-19 patients: Results from the NOR-Solidarity trial. *J Intern Med.* 2022;291(2):241-3.
193. Liu Y, Du X, Chen J, Jin Y, Peng L, Wang HHX, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio as an independent risk factor for mortality in hospitalized patients with COVID-19. *J Infect.* 2020;81(1):e6-12.
194. Schulte-Schrepping J, Reusch N, Paclik D, Baßler K, Schlickeiser S, Zhang B, et al. Severe COVID-19 Is Marked by a Dysregulated Myeloid Cell Compartment. *Cell.* 2020;182(6):1419-1440.e23.
195. Zhou Z, Ren L, Zhang L, Zhong J, Xiao Y, Jia Z, et al. Heightened Innate Immune Responses in the Respiratory Tract of COVID-19 Patients. *Cell Host Microbe.* 2020;27(6):883-890.e2.

196. McKenna E, Wubben R, Isaza-Correa JM, Melo AM, Mhaonaigh AU, Conlon N, et al. Neutrophils in COVID-19: Not Innocent Bystanders. *Front Immunol.* 2022;13:864387.
197. Loyer C, Lapostolle A, Urbina T, Elabbadi A, Lavillegrand JR, Chaigneau T, et al. Impairment of neutrophil functions and homeostasis in COVID-19 patients: association with disease severity. *Crit Care.* 2022;26(1):155.
198. Frijns CJM, Kappelle LJ, Gijn JV, Nieuwenhuis HK, Sixma JJ, Fijnheer R. Soluble Adhesion Molecules Reflect Endothelial Cell Activation in Ischemic Stroke and in Carotid Atherosclerosis. *Stroke.* 1997;28(11):2214-8.
199. Constans J, Conri C. Circulating markers of endothelial function in cardiovascular disease. *Clin Chim Acta.* 2006;368(1-2):33-47.
200. Martínez-Salazar B, Holwerda M, Stüdle C, Piragyte I, Mercader N, Engelhardt B, et al. COVID-19 and the Vasculature: Current Aspects and Long-Term Consequences. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10:824851.
201. Belchamber KBR, Thein OS, Hazeldine J, Grudzinska FS, Faniyi AA, Hughes MJ, et al. Dysregulated Neutrophil Phenotype and Function in Hospitalised Non-ICU COVID-19 Pneumonia. *Cells.* 2022;11(18):2901.
202. Blake KM, Carrigan SO, Issekutz AC, Stadnyk AW. Neutrophils migrate across intestinal epithelium using $\beta 2$ integrin (CD11b/CD18)-independent mechanisms. *Clin Exp Immunol.* 2004;136(2):262-8.
203. Borges L, Pithon-Curi TC, Curi R, Hatanaka E. COVID-19 and Neutrophils: The Relationship between Hyperinflammation and Neutrophil Extracellular Traps. *Mediators Inflamm.* 2020;2020:1-7.
204. Tatsiy O, McDonald PP. Physiological Stimuli Induce PAD4-Dependent, ROS-Independent NETosis, With Early and Late Events Controlled by Discrete Signaling Pathways. *Front Immunol.* 2018;9:2036.
205. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2007;176(2):231-41.
206. Mikacenic C, Moore R, Dmyterko V, West TE, Altemeier WA, Liles WC, et al. Neutrophil extracellular traps (NETs) are increased in the alveolar spaces of patients with ventilator-associated pneumonia. *Crit Care.* 2018;22(1):358.
207. Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA, Lochnit G, Barreto G, Galuska SP, et al. Neutrophil Extracellular Traps Directly Induce Epithelial and Endothelial Cell Death: A Predominant Role of Histones. *PLoS ONE.* 2012;7(2):e32366.
208. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107(36):15880-5.
209. Klok FA, Kruip MJHA, Van Der Meer NJM, Arbous MS, Gommers D, Kant KM, et al. Confirmation of the high cumulative incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19: An updated analysis. *Thromb Res.* 2020;191:148-50.
210. Nomani M, Varahram M, Ghazi M, Adcock IM, Mortaz E. Decreased neutrophil phagocytosis and killing of bacteria in COVID-19 patients. *Scand J Immunol.* 2021;94(3):e13083.
211. Veenith T, Martin H, Le Breuille M, Whitehouse T, Gao-Smith F, Duggal N, et al. High generation of reactive oxygen species from neutrophils in patients with severe COVID-19. *Sci Rep.* 2022;12(1):10484.
212. Laforge M, Elbim C, Frère C, Hémadi M, Massaad C, Nuss P, et al. Tissue damage from neutrophil-induced oxidative stress in COVID-19. *Nat Rev Immunol.* 2020;20(9):515-6.
213. O'Brien KL, Finlay DK. Immunometabolism and natural killer cell responses. *Nat Rev Immunol.* 2019;19(5):282-90.
214. Rossin A, Miloro G, Hueber AO. TRAIL and FasL Functions in Cancer and Autoimmune Diseases: Towards an Increasing Complexity. *Cancers.* 2019;11(5):639.
215. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, et al. Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells. *Science.* 2011;331(6013):44-9.
216. Wang F, Nie J, Wang H, Zhao Q, Xiong Y, Deng L, et al. Characteristics of Peripheral Lymphocyte Subset Alteration in COVID-19 Pneumonia. *J Infect Dis.* 2020;221(11):1762-9.
217. Di Vito C, Calcaterra F, Coianiz N, Terzoli S, Voza A, Mikulak J, et al. Natural Killer Cells in SARS-CoV-2 Infection: Pathophysiology and Therapeutic Implications. *Front Immunol.* 2022;13:888248.
218. Witkowski M, Tizian C, Ferreira-Gomes M, Niemeyer D, Jones TC, Heinrich F, et al. Untimely TGF β responses in COVID-19 limit antiviral functions of NK cells. *Nature.* 2021;600(7888):295-301.
219. Cong J, Wei H. Natural Killer Cells in the Lungs. *Front Immunol.* 2019;10:1416.
220. Zafarani A, Razizadeh MH, Pashangzadeh S, Amirzargar MR, Taghavi-Farahabadi M, Mahmoudi M. Natural killer cells in COVID-19: from infection, to vaccination and therapy. *Future Virol.* 2023;18(3):177-91.
221. Zheng M, Gao Y, Wang G, Song G, Liu S, Sun D, et al. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol.* 2020;17(5):533-5.
222. Cho JH, Kim HO, Webster K, Palendira M, Hahm B, Kim KS, et al. Calcineurin-dependent negative regulation of CD94/NKG2A expression on naive CD8+ T cells. *Blood.* 2011;118(1):116-28.
223. Kamiya T, Seow SV, Wong D, Robinson M, Campana D. Blocking expression of inhibitory receptor NKG2A overcomes tumor resistance to NK cells. *J Clin Invest.* 2019;129(5):2094-106.

224. Wu J, Gao F xia, Wang C, Qin M, Han F, Xu T, et al. IL-6 and IL-8 secreted by tumour cells impair the function of NK cells via the STAT3 pathway in oesophageal squamous cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019;38(1):321.
225. Antoniolli L, Fornai M, Pellegrini C, Blandizzi C. NKG2A and COVID-19: another brick in the wall. *Cell Mol Immunol.* 2020;17(6):672-4.
226. Vu Manh TP, Bertho N, Hosmalin A, Schwartz-Cornil I, Dalod M. Investigating Evolutionary Conservation of Dendritic Cell Subset Identity and Functions. *Front Immunol.* 2015 2;6:260.
227. Chang T, Yang J, Deng H, Chen D, Yang X, Tang ZH. Depletion and Dysfunction of Dendritic Cells: Understanding SARS-CoV-2 Infection. *Front Immunol.* 2022;13:843342.
228. Hadjadj J, Yatim N, Barnabei L, Corneau A, Boussier J, Smith N, et al. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science.* 2020;369(6504):718-24.
229. Park A, Iwasaki A. Type I and Type III Interferons - Induction, Signaling, Evasion, and Application to Combat COVID-19. *Cell Host Microbe.* 2020;27(6):870-878.
230. Zhou R, To KKW, Wong YC, Liu L, Zhou B, Li X, et al. Acute SARS-CoV-2 Infection Impairs Dendritic Cell and T Cell Responses. *Immunity.* 2020;53(4):864-877. e5.
231. Zhang Q, Bastard P, Liu Z, Le Pen J, Moncada-Velez M, Chen J, et al. Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science.* 2020;370(6515):eabd4570.
232. Kvedaraitė E, Hertwig L, Sinha I, Ponzetta A, Hed Myrberg I, Lourda M, et al. Major alterations in the mononuclear phagocyte landscape associated with COVID-19 severity. *Proc Natl Acad Sci.* 2021;118(6):e2018587118.
233. Yang ZY, Huang Y, Ganesh L, Leung K, Kong WP, Schwartz O, et al. pH-Dependent Entry of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Is Mediated by the Spike Glycoprotein and Enhanced by Dendritic Cell Transfer through DC-SIGN. *J Virol.* 2004;78(11):5642-50.
234. Wang K, Chen W, Zhou YS, Lian JQ, Zhang Z, Du P, et al. SARS-CoV-2 invades host cells via a novel route: CD147-spike protein. *Signal Transduct Target Ther.* 2020 4;5(1):283.
235. Yang D, Chu H, Hou Y, Chai Y, Shuai H, Lee ACY, et al. Attenuated Interferon and Proinflammatory Response in SARS-CoV-2-Infected Human Dendritic Cells Is Associated With Viral Antagonism of STAT1 Phosphorylation. *J Infect Dis.* 2020;222(5):734-45.
236. Silvin A, Chapuis N, Dunsmore G, Goubet AG, Dubuisson A, Derosa L, et al. Elevated Calprotectin and Abnormal Myeloid Cell Subsets Discriminate Severe from Mild COVID-19. *Cell.* 2020;182(6):1401-1418. e18.
237. Théry C, Amigorena S. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol.* 2001;13(1):45-51.
238. Shi W, Liu X, Cao Q, Ma P, Le W, Xie L, et al. High-dimensional single-cell analysis reveals the immune characteristics of COVID-19. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2021;320(1):L84-98.
239. McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, Wack A, O'Garra A. Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(2):87-103.
240. Kumar S, Saurabh MK, Narasimha VL, Maharshi V. Efficacy of Interferon- β in Moderate-to-Severe Hospitalised Cases of COVID-19: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Drug Investig.* 2021;41(12):1037-46.
241. Chen WC, Hsu CK, Chen CY, Lai CC, Hung SH, Lin WT. Clinical efficacy and safety of interferon- β -containing regimens in the treatment of patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2022;20(5):741-7.
242. Sette A, Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell.* 2021;184(4):861-80.
243. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, Mateus J, Dan JM, Moderbacher CR, et al. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell.* 2020;181(7):1489-1501. e15.
244. Moss P. The T cell immune response against SARS-CoV-2. *Nat Immunol.* 2022;23(2):186-93.
245. Tan L, Wang Q, Zhang D, Ding J, Huang Q, Tang YQ, et al. Lymphopenia predicts disease severity of COVID-19: a descriptive and predictive study. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5(1):33.
246. Dai W, Zhong A, Qiao Q, Wu J, Li W, Wu Q, et al. Characteristics of lymphocyte subset alterations in COVID-19 patients with different levels of disease severity. *Virology.* 2022;19(1):192.
247. Lucas C, Wong P, Klein J, Castro TBR, Silva J, Sundaram M, et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature.* 2020;584(7821):463-9.
248. Shen XR, Geng R, Li Q, Chen Y, Li SF, Wang Q, et al. ACE2-independent infection of T lymphocytes by SARS-CoV-2. *Signal Transduct Target Ther.* 2022;7(1):83.
249. Bellesi S, Metafuni E, Hohaus S, Maiolo E, Marchionni F, D'Innocenzo S, et al. Increased CD95 (Fas) and PD-1 expression in peripheral blood T lymphocytes in COVID-19 patients. *Br J Haematol.* 2020;191(2):207-11.
250. André S, Picard M, Cezar R, Roux-Dalvai F, Alleaume-Butaux A, Soundaramourty C, et al. T cell apoptosis characterizes severe Covid-19 disease. *Cell Death Differ.* 2022;29(8):1486-99.

251. Wauters E, Van Mol P, Garg AD, Jansen S, Van Herck Y, Vanderbeke L, et al. Discriminating mild from critical COVID-19 by innate and adaptive immune single-cell profiling of bronchoalveolar lavages. *Cell Res.* 2021;31(3):272-90.
252. De Biasi S, Meschiari M, Gibellini L, Bellinazzi C, Borella R, Fidanza L, et al. Marked T cell activation, senescence, exhaustion and skewing towards TH17 in patients with COVID-19 pneumonia. *Nat Commun.* 2020;11(1):3434.
253. Tan AT, Linster M, Tan CW, Le Bert N, Chia WN, Kunasegaran K, et al. Early induction of functional SARS-CoV-2-specific T cells associates with rapid viral clearance and mild disease in COVID-19 patients. *Cell Rep.* 2021;34(6):108728.
254. Rydzynski Moderbacher C, Ramirez SI, Dan JM, Grifoni A, Hastie KM, Weiskopf D, et al. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. *Cell.* 2020;183(4):996-1012.e19.
255. Braun J, Loyal L, Frentsch M, Wendisch D, Georg P, Kurth F, et al. SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19. *Nature.* 2020;587(7833):270-4.
256. Duan Y qi, Xia M hui, Ren L, Zhang Y fang, Ao Q lin, Xu S peng, et al. Deficiency of Tfh Cells and Germinal Center in Deceased COVID-19 Patients. *Curr Med Sci.* 2020;40(4):618-24.
257. Pourgholaminejad A, Pahlavanneshan S, Basiri M. COVID-19 immunopathology with emphasis on Th17 response and cell-based immunomodulation therapy: Potential targets and challenges. *Scand J Immunol.* 2022 Feb;95(2):e13131.
258. Gupta G, Shareef I, Tomar S, Kumar MSN, Pandey S, Sarda R, et al. Th1/Th2/Th17 Cytokine Profile among Different Stages of COVID-19 Infection. *Natl Acad Sci Lett.* 2022;45(4):363-9.
259. Cui W, Kaech SM. Generation of effector CD8+ T cells and their conversion to memory T cells: Effector and memory T-cell differentiation. *Immunol Rev.* 2010;236(1):151-66.
260. He R, Lu Z, Zhang L, Fan T, Xiong R, Shen X, et al. The clinical course and its correlated immune status in COVID-19 pneumonia. *J Clin Virol.* 2020;127:104361.
261. Sekine T, Perez-Potti A, Rivera-Ballesteros O, Strålin K, Gorin JB, Olsson A, et al. Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19. *Cell.* 2020;183(1):158-168.e14.
262. Rha MS, Shin EC. Activation or exhaustion of CD8+ T cells in patients with COVID-19. *Cell Mol Immunol.* 2021;18(10):2325-33.
263. Silva MJA, Ribeiro LR, Lima KVB, Lima LNGC. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 infection: A systematic review. *Front Immunol.* 2022;13:1001198.
264. Nelson RW, Chen Y, Venezia OL, Majerus RM, Shin DS, MGH COVID-19 Collection & Processing Team, et al. SARS-CoV-2 epitope-specific CD4+ memory T cell responses across COVID-19 disease severity and antibody durability. *Sci Immunol.* 2022;7(73):eabl9464.
265. Weinreich DM, Sivapalasingam S, Norton T, Ali S, Gao H, Bhoire R, et al. REGN-COV2, a Neutralizing Antibody Cocktail, in Outpatients with Covid-19. *N Engl J Med.* 2021;384(3):238-51.
266. Chen Y, Zuiani A, Fischinger S, Mullur J, Atyeo C, Travers M, et al. Quick COVID-19 Healers Sustain Anti-SARS-CoV-2 Antibody Production. *Cell.* 2020;183(6):1496-1507.e16.
267. Rodda LB, Netland J, Shehata L, Pruner KB, Morawski PA, Thouvenel CD, et al. Functional SARS-CoV-2-Specific Immune Memory Persists after Mild COVID-19. *Cell.* 2021;184(1):169-183.e17.
268. Dan JM, Mateus J, Kato Y, Hastie KM, Yu ED, Faliti CE, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science.* 2021;371(6529):eabf4063.
269. Le Bert N, Clapham HE, Tan AT, Chia WN, Tham CYL, Lim JM, et al. Highly functional virus-specific cellular immune response in asymptomatic SARS-CoV-2 infection. *J Exp Med.* 2021;218(5):e20202617.
270. Micke O, Seegenschmiedt MH. Consensus guidelines for radiation therapy of benign diseases: a multicenter approach in Germany. *Int J Radiat Oncol.* 2002;52(2):496-513.
271. McKeown SR, Hatfield P, Prestwich RJ, Shaffer RE, Taylor RE. Radiotherapy for benign disease; assessing the risk of radiation-induced cancer following exposure to intermediate dose radiation. *Br J Radiol.* 2015;88(1056):20150405.
272. Torres Royo L, Antelo Redondo G, Áquez Pianetta M, Arenas Prat M. Low-Dose radiation therapy for benign pathologies. *Rep Pract Oncol Radiother.* 2020;25(2):250-4.
273. Arenas Prat M. Efectes antiinflamatoris de la radioteràpia a dosis baixes en un model experimental d'inflamació sistèmica [tesi a internet]. Barcelona: Universitat de Barcelona; 2008 [consultat 15 de maig de 2023]. Disponible a: <https://www.tdx.cat/handle/10803/2484#page=1>
274. Seegenschmiedt MH, Keilholz L, Martus P, Goldmann A, Wölfel R, Henning F, et al. Prevention of heterotopic ossification about the hip: Final results of two randomized trials in 410 patients using either preoperative or postoperative radiation therapy. *Int J Radiat Oncol.* 1997;39(1):161-71.
275. Hu ZH, Chen W, Sun JN, Zhang Y, Zhang Y, Chen XY, et al. Radiotherapy for the prophylaxis of heterotopic ossification after total hip arthroplasty: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trails. *Med Dosim.* 2021;46(1):65-73.

276. Kadhum M, Smock E, Khan A, Fleming A. Radiotherapy in Dupuytren's disease: a systematic review of the evidence. *J Hand Surg Eur Vol.* 2017;42(7):689-92.
277. Musser J, Edsall D. A study of metabolism in leukemia, under the influence of the x-ray. With a consideration of the manner of action of the x-ray and of some precautions desirable in its therapeutic use. Transactions of the Association of American Physicians; 1905.
278. Quimby A, Quimby W. Unresolved pneumonia: Successful treatment by roentgen ray. *New York Medical Journal.*; 1916. 681-683 p.
279. Heidenhain L, Fried C. Rontgenstrahlen und Entzündung (Roentgen irradiation in inflammations). *Archiv für Klinische Chirurgie*; 1924. 624-665 p.
280. Scott WR. X-ray Therapy in the Treatment of Acute Pneumonia: Report Covering the Use of X-ray Therapy in the Treatment of Pneumonia at the Niagara Falls Memorial Hospital. *Radiology.* 1939;33(3):331-49.
281. Rodríguez-Tomás E, Acosta JC, Torres-Royo L, De Febrer G, Baiges-Gaya G, Castañé H, et al. Effect of Low-Dose Radiotherapy on the Circulating Levels of Paraoxonase-1-Related Variables and Markers of Inflammation in Patients with COVID-19 Pneumonia. *Antioxidants.* 2022;11(6):1184.
282. Meziani L, Robert C, Classe M, Da Costa B, Mondini M, Clémenson C, et al. Low Doses of Radiation Increase the Immunosuppressive Profile of Lung Macrophages During Viral Infection and Pneumonia. *Int J Radiat Oncol.* 2021;110(5):1283-94.
283. Arenas M, Algara M, De Febrer G, Rubio C, Sanz X, De La Casa MA, et al. Could pulmonary low-dose radiation therapy be an alternative treatment for patients with COVID-19 pneumonia? Preliminary results of a multicenter SEOR-GICOR nonrandomized prospective trial (IPACOVID trial). *Strahlenther Onkol.* 2021;197(11):1010-20.
284. Fournier C, Winter M, Zahnreich S, Nasonova E, Melnikova L, Ritter S. Interrelation amongst differentiation, senescence and genetic instability in long-term cultures of fibroblasts exposed to different radiation qualities. *Radiother Oncol.* 2007;83(3):277-82.
285. Betz N, Ott OJ, Adamietz B, Sauer R, Fietkau R, Keilholz L. Radiotherapy in Early-Stage Dupuytren's Contracture: Long-Term Results After 13 Years. *Strahlenther Onkol.* 2010;186(2):82-90.
286. Georhakopoulos I, Kouloulis V, Kougiountzopoulou A, Platoni K, Antypas C, Liakouli Z, et al. Radiation therapy for the prevention of heterotopic ossification: Efficacy and toxicity of single fraction radiotherapy. *Orthop Rev.* 2020;12(2):8577.
287. Wen P, Wang T, Zhou Y, Yu Y, Wu C. A retrospective study of hypofractionated radiotherapy for keloids in 100 cases. *Sci Rep.* 2021;11(1):3598.
288. Donaubaer AJ, Zhou JG, Ott OJ, Putz F, Fietkau R, Keilholz L, et al. Low Dose Radiation Therapy, Particularly with 0.5 Gy, Improves Pain in Degenerative Joint Disease of the Fingers: Results of a Retrospective Analysis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(16):5854.
289. Micke O, Ugrak E, Bartmann S, Adamietz IA, Schaefer U, Bueker R, et al. Radiotherapy for calcaneodynia, achillodynia, painful gonarthrosis, bursitis trochanterica, and painful shoulder syndrome - Early and late results of a prospective clinical quality assessment. *Radiat Oncol.* 2018;13(1):71.
290. Weiss HA, Darby SC, Doll R. Cancer mortality following X-ray treatment for ankylosing spondylitis. *Int J Cancer.* 1994;59(3):327-38.
291. Ron E, Modan B, Boice JD, Alfandary E, Stovall M, Chetrit A, et al. Tumors of the Brain and Nervous System after Radiotherapy in Childhood. *N Engl J Med.* 1988;319(16):1033-9.
292. Yoshida N, Fujihara M, Preston DL, Ozasa K, Hida A, Ohishi W, et al. Further analysis of incidence of multiple myeloma among atomic-bomb survivors, 1950 to 1994. *Blood Adv.* 2023;7(12):2807-10.
293. Mazonakis M, Damilakis J. Cancer risk after radiotherapy for benign diseases. *Phys Med.* 2017;42:285-91.
294. International Commission on Radiological Protection (ICRP). The 2007 recommendations of the International Commission on Radiological Protection. *Ann ICRP*; 2007. 1-322 p.
295. National Research Council (NRC). Health Risks from Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation: BEIR VII Phase 2. Washington DC: The National Academies Press; 2006.
296. Rubin P, Johnston CJ, Williams JP, McDonald S, Finkelstein JN. A perpetual cascade of cytokines postirradiation leads to pulmonary fibrosis. *Int J Radiat Oncol.* 1995;33(1):99-109.
297. Daigle JL, Hong JH, Chiang CS, McBride WH. The role of tumor necrosis factor signaling pathways in the response of murine brain to irradiation. *Cancer Res.* 2001;61(24):8859-65.
298. Quarumby S, West C, Magee B, Stewart A, Hunter R, Kumar S. Differential Expression of Cytokine Genes in Fibroblasts Derived from Skin Biopsies of Patients who Developed Minimal or Severe Normal Tissue Damage after Radiotherapy. *Radiat Res.* 2002;157(3):243-8.
299. Williams J, Chen Y, Rubin P, Finkelstein J, Okunieff P. The biological basis of a comprehensive grading system for the adverse effects of cancer treatment. *Semin Radiat Oncol.* 2003;13(3):182-8.
300. Hertveldt, J. Philippe, H. Thierens K. Technical Report Flow cytometry as a quantitative and sensitive method to evaluate low dose radiation induced apoptosis in vitro in human peripheral blood lymphocytes. *Int J Radiat Biol.* 1997;71(4):429-33.

301. Kern, L. Keilholz, C. Forster, M.-H P. In vitro apoptosis in peripheral blood mononuclear cells induced by low-dose radiotherapy displays a discontinuous dose-dependence. *Int J Radiat Biol.* 1999;75(8):995-1003.
302. Gaipl US, Meister S, Lödermann B, Rödel F, Fietkau R, Herrmann M, et al. Activation-induced cell death and total Akt content of granulocytes show a biphasic course after low-dose radiation: Brief definite report. *Autoimmunity.* 2009;42(4):340-2.
303. Chen W, Frank ME, Jin W, Wahl SM. TGF- β Released by Apoptotic T Cells Contributes to an Immunosuppressive Milieu. *Immunity.* 2001;14(6):715-25.
304. Cullen SP, Henry CM, Kearney CJ, Logue SE, Feoktistova M, Tynan GA, et al. Fas/CD95-Induced Chemokines Can Serve as "Find-Me" Signals for Apoptotic Cells. *Mol Cell.* 2013;49(6):1034-48.
305. Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature.* 1997;390(6658):350-1.
306. Mohan N, Meltz ML. Induction of Nuclear Factor κ B after Low-Dose Ionizing Radiation Involves a Reactive Oxygen Intermediate Signaling Pathway. *Radiat Res.* 1994;140(1):97.
307. Rödel F, Hantschel M, Hildebrandt G, Schultze-Mosgau S, Rödel C, Herrmann M, et al. Dose-dependent biphasic induction and transcriptional activity of nuclear factor kappa B (NF-kappaB) in EA.hy.926 endothelial cells after low-dose X-irradiation. *Int J Radiat Biol.* 2004;80(2):115-23.
308. Rödel F, Frey B, Capalbo G, Gaipl U, Keilholz L, Voll R, et al. Discontinuous induction of X-linked inhibitor of apoptosis in EA.hy.926 endothelial cells is linked to NF- κ B activation and mediates the anti-inflammatory properties of low-dose ionising-radiation. *Radiother Oncol.* 2010;97(2):346-51.
309. Kubiczkova L, Sedlarikova L, Hajek R, Sevcikova S. TGF- β – an excellent servant but a bad master. *J Transl Med.* 2012;10(1):183.
310. Zhang F, Wang X, Jiang G, Liu H, Zhang G, et al. TGF- β induces M2-like macrophage polarization via SNAIL-mediated suppression of a pro-inflammatory phenotype. *Oncotarget.* 2016;7(32):52294-306.
311. Li MO, Flavell RA. TGF- β : A Master of All T Cell Trades. *Cell.* 2008;134(3):392-404.
312. Viel S, Marçais A, Guimaraes FSF, Loftus R, Rabilloud J, Grau M, et al. TGF- β inhibits the activation and functions of NK cells by repressing the mTOR pathway. *Sci Signal.* 2016 Feb 16;9(415):ra19.
313. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature.* 1992;359(6397):693-9.
314. Müller G, Behrens J, Nussbaumer U, Böhlen P, Birchmeier W. Inhibitory action of transforming growth factor beta on endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci.* 1987;84(16):5600-4.
315. Hildebrandt G, Maggiorella L, Rödel F, Rödel V, Willis D, Trott KR. Mononuclear cell adhesion and cell adhesion molecule liberation after X-irradiation of activated endothelial cells in vitro. *Int J Radiat Biol.* 2002;78(4):315-25.
316. Hildebrandt G, Loppnow G, Jahns J, Hindemith M, Anderegg U, Saalbach A, et al. Inhibition of the iNOS Pathway in Inflammatory Macrophages by Low-Dose X-Irradiation In Vitro: Is There a Time Dependence? *Strahlenther Onkol.* 2003;179(3):158-66.
317. Schaeue D, Marples B, Trott KR. The effects of low-dose X-irradiation on the oxidative burst in stimulated macrophages. *Int J Radiat Biol.* 2002;78(7):567-76.
318. Tsukimoto M, Homma T, Mutou Y, Kojima S. 0.5 Gy Gamma Radiation Suppresses Production of TNF- α through Up-regulation of MKP-1 in Mouse Macrophage RAW264.7 Cells. *Radiat Res.* 2009;171(2):219-24.
319. Lödermann B, Wunderlich R, Frey S, Schorn C, Stangl S, Rödel F, et al. Low dose ionising radiation leads to a NF- κ B dependent decreased secretion of active IL-1 β by activated macrophages with a discontinuous dose-dependency. *Int J Radiat Biol.* 2012;88(10):727-34.
320. McKinney LC, Aquilla EM, Coffin D, Wink DA, Vodovotz Y. Ionizing Radiation Potentiates the Induction of Nitric Oxide Synthase by Interferon- γ and/or Lipopolysaccharide in Murine Macrophage Cell Lines: Role of Tumor Necrosis Factor- α . *Ann N Y Acad Sci.* 2006;899(1):61-8.
321. Yang G, Kong Q, Wang G, Jin H, Zhou L, Yu D, et al. Low-Dose Ionizing Radiation Induces Direct Activation of Natural Killer Cells and Provides a Novel Approach for Adoptive Cellular Immunotherapy. *Cancer Biother Radiopharm.* 2014;29(10):428-34.
322. Sonn CH, Choi JR, Kim TJ, Yu YB, Kim K, Shin SC, et al. Augmentation of natural cytotoxicity by chronic low-dose ionizing radiation in murine natural killer cells primed by IL-2. *J Radiat Res (Tokyo).* 2012;53(6):823-9.
323. Cheda A, Wrembel-Wargocka J, Lisiak E, Nowosielska EM, Marciniak M, Janiak MK. Single Low Doses of X Rays Inhibit the Development of Experimental Tumor Metastases and Trigger the Activities of NK Cells in Mice. *Radiat Res.* 2004;161(3):335-40.
324. Nogami M, Huang JT, Nakamura LT, Makinodan T. T Cells Are the Cellular Target of the Proliferation-Augmenting Effect of Chronic Low-Dose Ionizing Radiation in Mice. *Radiat Res.* 1994;139(1):47.

325. Ishii K, Yamaoka K, Hosoi Y, Ono T, Sakamoto K. Enhanced mitogen-induced proliferation of rat splenocytes by low-dose whole-body X-irradiation. *Physiol Chem Phys Med NMR*. 1995;27(1):17-23.
326. Pandey R, Shankar BS, Sharma D, Sainis KB. Low dose radiation induced immunomodulation: effect on macrophages and CD8+ T cells. *Int J Radiat Biol*. 2005;81(11):801-12.
327. Cho SJ, Kang H, Hong EH, Kim JY, Nam SY. Transcriptome analysis of low-dose ionizing radiation-impacted genes in CD4+ T-cells undergoing activation and regulation of their expression of select cytokines. *J Immunotoxicol*. 2018;15(1):137-46.
328. Tabe Y, Hatanaka Y, Nakashiro M, Sekihara K, Yamamoto S, Matsushita H, et al. Integrative genomic and proteomic analyses identifies glycerol-3-phosphate acyltransferase as a target of low-dose ionizing radiation in EBV infected-B cells. *Int J Radiat Biol*. 2016;92(1):24-34.
329. Cho SJ, Kang H, Kim MY, Lee JE, Kim SJ, Nam SY, et al. Site-Specific Phosphorylation of Ikaros Induced by Low-Dose Ionizing Radiation Regulates Cell Cycle Progression of B Lymphoblast Through CK2 and AKT Activation. *Int J Radiat Oncol*. 2016;94(5):1207-18.
330. Song KH, Kim MH, Kang SM, Jung SY, Ahn J, Woo HJ, et al. Analysis of immune cell populations and cytokine profiles in murine splenocytes exposed to whole-body low-dose irradiation. *Int J Radiat Biol*. 2015;91(10):795-803.
331. Chun SH, Park GY, Han YK, Kim SD, Kim JS, Lee CG, et al. Effect of Low dose Radiation on Differentiation of Bone Marrow Cells into Dendritic Cells. *Dose-Response*. 2013;11(3):dose-response.1.
332. Persa E, Szatmári T, Sáfrány G, Lumniczky K. In Vivo Irradiation of Mice Induces Activation of Dendritic Cells. *Int J Mol Sci*. 2018;19(8):2391.
333. Rey N, Ebrahimian T, Gloaguen C, Kereselidze D, Magneron V, Bontemps CA, et al. Exposure to Low to Moderate Doses of Ionizing Radiation Induces A Reduction of Pro-Inflammatory Ly6chigh Monocytes and a U-Curved Response of T Cells in APOE -/- Mice. *Dose-Response*. 2021;19(2):155932582110162.
334. Ministro A, De Oliveira P, Nunes RJ, Dos Santos Rocha A, Correia A, Carvalho T, et al. Low-dose ionizing radiation induces therapeutic neovascularization in a pre-clinical model of hindlimb ischemia. *Cardiovasc Res*. 2017;113(7):783-94.
335. Rödel F, Hofmann D, Auer J, Keilholz L, Röllinghoff M, Sauer R, et al. The Anti-Inflammatory Effect of Low-Dose Radiation Therapy Involves a Diminished CCL20 Chemokine Expression and Granulocyte/Endothelial Cell Adhesion. *Strahlenther Onkol*. 2008;184(1):41-7.
336. Wen K, Bai C, Zhao H, Zhou P, Gao S, Guan H, et al. Low dose radiation therapy attenuates ACE2 depression and inflammatory cytokines induction by COVID-19 viral spike protein in human bronchial epithelial cells. *Int J Radiat Biol*. 2022;98(10):1532-41.
337. Jackson MR, Stevenson K, Chahal SK, Curley E, Finney GE, Gutierrez-Quintana R, et al. Low-Dose Lung Radiation Therapy for COVID-19 Lung Disease: A Preclinical Efficacy Study in a Bleomycin Model of Pneumonitis. *Int J Radiat Oncol*. 2022;112(1):197-211.
338. Clinical trials [Internet]. 2023 [citat 10 de juny de 2023] Disponible a: <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04380818>.
339. Ameri A, Ameri P, Rahnama N, Mokhtari M, Sedaghat M, Hadavand F, et al. Low-Dose Whole-Lung Irradiation for COVID-19 Pneumonia: Final Results of a Pilot Study. *Int J Radiat Oncol*. 2021;109(4):859-66.
340. Papachristofilou A, Finazzi T, Blum A, Zehnder T, Zellweger N, Lustenberger J, et al. Low-Dose Radiation Therapy for Severe COVID-19 Pneumonia: A Randomized Double-Blind Study. *Int J Radiat Oncol*. 2021;110(5):1274-82.
341. Bevelacqua JJ, Welsh JS, Mortazavi SMJ. In Regard to Papachristofilou et al. *Int J Radiat Oncol*. 2021;110(5):1550-1.
342. Ganesan G, Ponniah S, Sundaram V, Marimuthu PK, Pitchaikannu V, Chandrasekaran M, et al. Whole lung irradiation as a novel treatment for COVID-19: Interim results of an ongoing phase 2 trial in India. *Radiother Oncol*. 2021;163:83-90.
343. Singh P, Mandal A, Singh D, Kumar S, Kumar A, Rakesh A, et al. Interim Analysis of Impact of Adding Low Dose Pulmonary Radiotherapy to Moderate COVID-19 Pneumonia Patients: IMpaCt-RT Study. *Front Oncol*. 2022;12:822902.
344. Ameri A, Rahnama N, Bozorgmehr R, Mokhtari M, Farahbakhsh M, Nabavi M, et al. Low-Dose Whole-Lung Irradiation for COVID-19 Pneumonia: Short Course Results. *Int J Radiat Oncol*. 2020;108(5):1134-9.
345. Hess CB, Nasti TH, Dhare VR, Kleber TJ, Switchenko JM, Buchwald ZS, et al. Immunomodulatory Low-Dose Whole-Lung Radiation for Patients with Coronavirus Disease 2019-Related Pneumonia. *Int J Radiat Oncol*. 2021;109(4):867-79.
346. Moreno-Olmedo E, Suárez-Gironzini V, Pérez M, Filigheddu T, Mínguez C, Sanjuan-Sanjuan A, et al. COVID-19 pneumonia treated with ultra-low doses of radiotherapy (ULTRA-COVID study): a single institution report of two cases. *Strahlenther Onkol*. 2021;197(5):429-37.

347. Magrini SM, Tomasini D, Focà E, Garrafa EM, Singh N, Guerini AE, et al. Low-dose Lung Radiotherapy for COVID-19-related Pneumonia: Preliminary Results of the Italian Mono-institutional COLOR-19 Trial. *In Vivo*. 2022;36(4):1959-65.
348. Ortiz CS, Hernández D, Trujillo C, Calderón D, Esqueda P, Calva F, et al. The clinical efficacy of low-dose whole-lung irradiation in moderate-to-severe COVID-19 pneumonia: RTMX-20 trial. *Radiother Oncol*. 2022;166:133-6.
349. Arenas M, Piqué B, Torres-Royo L, Acosta JC, Rodríguez-Tomás E, De Febrer G, et al. Treatment of COVID-19 pneumonia with low-dose radiotherapy plus standard of care versus standard of care alone in frail patients: The SEOR-GICOR IPACOVID comparative cohort trial. *Strahlenther Onkol*. 2023; 31:1–10.
350. Bonet M, Vázquez S, García E, Visus M, Jové D, Ripol O, Solé C, Gutiérrez L, Morales-Rull JL, Montero Á, Algara M, Arenas M, Mira M. Saving time in the radiotherapy procedures for COVID-19 pneumonia treatment. A single-institution experience. *Clin Transl Oncol*. 2021; 23(11):2344-2349.
351. Prasanna PG, Woloschak GE, DiCarlo AL, Buchsbaum JC, Schae D, Chakravarti A, et al. Low-Dose Radiation Therapy (LDRT) for COVID-19: Benefits or Risks? *Radiat Res*. 2020;194(5):452-464.
352. García-Hernández T, Romero-Expósito M, Sánchez-Nieto B. Low dose radiation therapy for COVID-19: Effective dose and estimation of cancer risk. *Radiother Oncol*. 2020;153:289-95.
353. Acharya D, Liu G, Gack MU. Dysregulation of type I interferon responses in COVID-19. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(7):397-8.
354. Tan M, Liu Y, Zhou R, Deng X, Li F, Liang K, et al. Immunopathological characteristics of coronavirus disease 2019 cases in Guangzhou, China. *Immunology*. 2020;160(3):261-8.
355. Hwang J moon, Kim JH, Park JS, Chang MC, Park D. Neurological diseases as mortality predictive factors for patients with COVID-19: a retrospective cohort study. *Neurol Sci*. 2020;41(9):2317-24.
356. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2020;395(10229):1054-62.
357. Poudel A, Poudel Y, Adhikari A, Aryal BB, Dangol D, Bajracharya T, et al. D-dimer as a biomarker for assessment of COVID-19 prognosis: D-dimer levels on admission and its role in predicting disease outcome in hospitalized patients with COVID-19. *PLOS ONE*. 2021;16(8):e0256744.
358. Deng F, Zhang L, Lyu L, Lu Z, Gao D, Ma X, et al. Increased levels of ferritin on admission predicts intensive care unit mortality in patients with COVID-19. *Med Clin (Barc)*. 2021;156(7):324-31.
359. Lei F, Liu Y, Zhou F, Qin J, Zhang P, Zhu L, et al. Longitudinal Association Between Markers of Liver Injury and Mortality in COVID-19 in China. *Hepatology*. 2020;72(2):389-98.
360. Henry BM, Aggarwal G, Wong J, Benoit S, Vikse J, Plebani M, et al. Lactate dehydrogenase levels predict coronavirus disease 2019 (COVID-19) severity and mortality: A pooled analysis. *Am J Emerg Med*. 2020;38(9):1722-6.
361. Acute Respiratory Distress Syndrome: The Berlin Definition. JAMA [Internet]. 2012 [citad 15 de juny de 2023];307(23). Disponible a: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2012.5669>
362. Dessie ZG, Zewotir T. Mortality-related risk factors of COVID-19: a systematic review and meta-analysis of 42 studies and 423,117 patients. *BMC Infect Dis*. 2021;21(1):855.
363. Bartleson JM, Radenkovic D, Covarrubias AJ, Furman D, Winer DA, Verdin E. SARS-CoV-2, COVID-19 and the aging immune system. *Nat Aging*. 2021;1(9):769-82.
364. Zu ZY, Jiang MD, Xu PP, Chen W, Ni QQ, Lu GM, et al. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Perspective from China. *Radiology*. 2020;296(2):E15-25.
365. Almasi Nokiani A, Shahnazari R, Abbasi MA, Divsalar F, Bayazidi M, Sadatnaseri A. CT severity score in COVID-19 patients, assessment of performance in triage and outcome prediction: a comparative study of different methods. *Egypt J Radiol Nucl Med*. 2022;53(1):116.
366. Leonardi A, Scipione R, Alfieri G, Petrillo R, Dolciami M, Ciccarelli F, et al. Role of computed tomography in predicting critical disease in patients with covid-19 pneumonia: A retrospective study using a semiautomatic quantitative method. *Eur J Radiol*. 2020;130:109202.
367. Salomaa S, Bouffler SD, Atkinson MJ, Cardis E, Hamada N. Is there any supportive evidence for low dose radiotherapy for COVID-19 pneumonia? *Int J Radiat Biol*. 2020;96(10):1228-35.
368. Cuttler JM, Bevelacqua JJ, Mortazavi SMJ. Unethical not to Investigate Radiotherapy for COVID-19. *Dose-Response*. 2020;18(3):155932582095010.
369. Rödel F, Arenas M, Ott OJ, Fournier C, Georgakilas AG, Tapio S, et al. Low-dose radiation therapy for COVID-19 pneumopathy: what is the evidence? *Strahlenther Onkol*. 2020;196(8):679-82.
370. Chakrabarti D, Verma M. Low-dose radiotherapy for SARS-CoV-2 pneumonia. *Strahlenther Onkol*. 2020;196(8):736-7.
371. Bermejo-Martin JF, González-Rivera M, Almansa R, Micheloud D, Tedim AP, Domínguez-Gil M, et al. Viral RNA load in plasma is associated with critical illness and a dysregulated host response in COVID-19. *Crit Care*. 2020;24(1):691.

372. Fajnzylber J, Regan J, Coxen K, Corry H, Wong C, Rosenthal A, et al. SARS-CoV-2 viral load is associated with increased disease severity and mortality. *Nat Commun.* 2020;11(1):5493.
373. Bryan A, Fink SL, Gattuso MA, Pepper G, Chaudhary A, Wener MH, et al. SARS-CoV-2 Viral Load on Admission Is Associated With 30-Day Mortality. *Open Forum Infect Dis.* 2020;7(12):ofaa535.
374. Satlin MJ, Zucker J, Baer BR, Rajan M, Hupert N, Schang LM, et al. Changes in SARS-CoV-2 viral load and mortality during the initial wave of the pandemic in New York City. *PLOS ONE.* 2021;16(11):e0257979.
375. De Pace CC, Lacedonia D, Scioscia G, Del Colle A, Minenna E, De Carlo MR, et al. Impact of viral load on mortality in hospitalized patients affected by Covid-19 infection. *Eur Resp Soc;* 2021; 58:PA804.
376. Kaeuffer C, Le Hyaric C, Fabacher T, Mootien J, Dervieux B, Ruch Y, et al. Clinical characteristics and risk factors associated with severe COVID-19: prospective analysis of 1,045 hospitalised cases in North-Eastern France, March 2020. *Euro Surveill.* 2020;25(48):2000895.
377. Carriel J, Muñoz-Jaramillo R, Bolaños-Ladinez O, Heredia-Villacreses F, Menéndez-Sanchón J, Martín-Delgado J. CURB-65 as a predictor of 30-day mortality in patients hospitalized with COVID-19 in Ecuador: COVID-EC study. *Rev Clin Esp (Barc).* 2022;222(1):37-41.
378. McGonagle D, Sharif K, O'Regan A, Bridgewood C. The Role of Cytokines including Interleukin-6 in COVID-19 induced Pneumonia and Macrophage Activation Syndrome-Like Disease. *Autoimmun Rev.* 2020;19(6):102537.
379. Kishaba T, Tamaki H, Shimaoka Y, Fukuyama H, Yamashiro S. Staging of Acute Exacerbation in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Lung.* 2014;192(1):141-9.
380. He Z, Yan R, Liu J, Dai H, Zhu Y, Zhang F, et al. Lactate dehydrogenase and aspartate aminotransferase levels associated with the severity of COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Exp Ther Med.* 2023;25(5):221.
381. Leowattana W. Angiotensin-converting enzyme 2 receptors, chronic liver diseases, common medications, and clinical outcomes in coronavirus disease 2019 patients. *World J Virol.* 2021;10(3):86-96.
382. Pan L, Mu M, Yang P, Sun Y, Wang R, Yan J, et al. Clinical Characteristics of COVID-19 Patients With Digestive Symptoms in Hubei, China: A Descriptive, Cross-Sectional, Multicenter Study. *Am J Gastroenterol.* 2020;115(5):766-73.
383. World Health Organization. Statement on the fifteenth meeting of the IHR (2005) Emergency Committee on the COVID-19 pandemic [Internet]. 2023 [citad 15 de juny de 2023]. Disponible a: [https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-\(covid-19\)-pandemic](https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-(covid-19)-pandemic).
384. Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T.* 2015;40(4):277-83.
385. Donaubauber AJ, Becker I, Weissmann T, Fröhlich BM, Muñoz LE, Gryc T, et al. Low Dose Radiation Therapy Induces Long-Lasting Reduction of Pain and Immune Modulations in the Peripheral Blood – Interim Analysis of the IMMO-LDRT01 Trial. *Front Immunol.* 2021;12:740742.
386. Tripuraneni P. Coronary artery radiation therapy for the prevention of restenosis after percutaneous coronary angioplasty, II: Outcomes of clinical trials. *Semin Radiat Oncol.* 2002;12(1):17-30.
387. Greenhalgh AD, David S. Differences in the Phagocytic Response of Microglia and Peripheral Macrophages after Spinal Cord Injury and Its Effects on Cell Death. *J Neurosci.* 2014;34(18):6316-22.
388. David S, Kroner A. Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci.* 2011;12(7):388-99.
389. Leon S, Yin Y, Nguyen J, Irwin N, Benowitz LI. Lens Injury Stimulates Axon Regeneration in the Mature Rat Optic Nerve. *J Neurosci.* 2000;20(12):4615-26.
390. Zhou X, He X, Ren Y. Function of microglia and macrophages in secondary damage after spinal cord injury. *Neural Regen Res.* 2014;9(20):1787.
391. Kigerl KA, Gensel JC, Ankeny DP, Alexander JK, Donnelly DJ, Popovich PG. Identification of Two Distinct Macrophage Subsets with Divergent Effects Causing either Neurotoxicity or Regeneration in the Injured Mouse Spinal Cord. *J Neurosci.* 2009;29(43):13435-44.