

**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.** The 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.

# TESIS DOCTORAL

Estudio de la forma soluble de la enzima  
convertidora de angiotensina tipo 2 (sACE2) y  
otros biomarcadores plasmáticos en pacientes con  
*Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)*

Programa de Doctorado en Bioquímica,  
Biología Molecular y Biomedicina

Facultad de Biociencias – Universidad Autónoma de Barcelona  
Servicio de Bioquímica – Hospital Universitario de la Vall d’Hebron  
Vall d’Hebron Instituto de Investigación

Noelia Díaz Troyano

Directores: Francisco Rodríguez Frías y Roser Ferrer Costa

Tutor: Francisco Blanco Vaca

2024



Quisiera expresar mi agradecimiento a todas las personas que de una u otra manera han contribuido a la realización de esta tesis doctoral.

En primer lugar, deseo agradecer a mis directores de tesis el Dr. Francisco Rodríguez Frías y a la Dra. Roser Ferrer Costa por su inestimable perseverancia y respaldo a lo largo de este proyecto. Su experiencia y sabiduría han sido fundamentales para el desarrollo de esta investigación. Así mismo, agradezco al tutor el Dr. Francisco Blanco Vaca su incorporación en la fase final de este proyecto y a los miembros de la Comisión de Seguimiento por sus valiosas aportaciones y colaboración.

Agradezco al Servicio de Bioquímica del Hospital Universitario de la Vall d'Hebron por proporcionar los recursos y el financiamiento necesarios para llevar a cabo esta investigación. También a mis compañeros, por sus ánimos durante todo este tiempo. En especial a los adjuntos jóvenes y “residentillos salvajes” por hacerme reír en los momentos de tensión.

Por otro lado, quisiera expresar mi gratitud a mi familia por su amor incondicional, especialmente a mis padres, Javier y Luisa, por su apoyo, confianza, comprensión y paciencia. A mis hermanos, Javi y Luis, por su transparencia y sostén continuo. A mis cuñados Laura y Miguel por el apoyo emocional durante todos estos años.

A mi serendipia, Javi, gracias por tu amor inquebrantable, por apoyar mis decisiones y ayudarme a mantener el foco en lo importante. Cualquier frase de agradecimiento no sería suficiente para expresar lo afortunada que me siento de nuestro amor.

También agradezco a mis amigos “granaínos” Alex, Dani, Fer y Carmen; son la inspiración, la locura, la guía y el sostén a pesar de la distancia. A mis amigos, Adri, mis “Co-Rs” (Laura y Eli), mis “R-petitas” (Marta y Teresa) y a Laura Castillo (primera residentilla) gracias por vuestras palabras de aliento y abrazos en los momentos más difíciles.

Finalmente, a los que han contribuido a la culminación de esta tesis, a pesar de no nombraros a todos os doy mi más sincero agradecimiento. Sin vuestro granito de arena, no habría sido posible, este trabajo también es vuestro.



# Índice

Listado de abreviaturas.....	7
1. Introducción.....	12
1.1. Coronavirus humanos y SARS-CoV-2.....	12
1.2. Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona y ACE2.....	16
1.3. Relación entre el virus SARS-CoV-2 y la ACE2.....	18
1.4. Polimorfismo rs2106809 del gen <i>ACE2</i> .....	26
1.5. Fisiopatología de la COVID-19 y la participación de la ACE2.....	27
1.6. Interés en el ámbito científico y profesional .....	30
2. Hipótesis y objetivos .....	36
2.1. Hipótesis y finalidad del estudio .....	36
2.2. Objetivo principal.....	36
2.3. Objetivos específicos y aplicaciones prácticas .....	37
3. Metodología y desarrollo de la investigación.....	39
3.1. Diseño del estudio.....	39
3.1.1. Metodología empleada .....	39
3.1.2. Almacenamiento de las muestras.....	40
3.1.3. Consideraciones éticas.....	40
3.2. Cohorte de pacientes .....	41
3.2.1. Pacientes de las primeras “olas” COVID-19.....	41
3.2.2. Pacientes en seguimiento 1 año después de la infección.....	43
3.2.3. Pacientes con estudio del polimorfismo rs2106809 de ACE2.....	43
3.3. Análisis estadístico.....	44
3.3.1. Pacientes de las primeras “olas” COVID-19.....	44
3.3.2. Pacientes en seguimiento 1 año después de la infección.....	45
3.3.3. Pacientes con estudio del polimorfismo rs2106809 de ACE2.....	45

4.	Resultados.....	46
4.1.	Pacientes de las primeras “olas” COVID-19 .....	46
4.1.1.	Descripción de variables clínicas y bioquímicas .....	47
4.1.2.	Análisis de las comparaciones entre los distintos grupos de pacientes.....	48
4.2.	Pacientes en seguimiento 1 año después de la infección.....	58
4.2.1.	Descripción de las variables clínicas y bioquímicas .....	58
4.2.2.	Análisis de las comparaciones en función del resultado RT-PCR para el virus SARS-CoV-2 .....	61
4.3.	Pacientes con estudio del polimorfismo rs2106809 de <i>ACE2</i> .....	69
4.3.1.	Descripción de las variables clínicas y bioquímicas .....	69
4.3.2.	Análisis de las comparaciones en función del alelo para el polimorfismo rs2106809 de <i>ACE2</i> .....	71
5.	Discusión .....	73
5.1.	Pacientes de las primeras “olas” COVID-19 .....	73
5.2.	Pacientes en seguimiento 1 año después de la infección.....	78
5.3.	Pacientes con estudio del polimorfismo rs2106809 de <i>ACE2</i> .....	84
5.4.	Síntesis de la discusión del estudio .....	85
6.	Conclusiones .....	90
6.1.	Principales hallazgos .....	90
6.2.	Limitaciones del estudio.....	90
6.3.	Futuras líneas de investigación.....	92
	Bibliografía .....	94

## Listado de abreviaturas

A continuación, se detalla la lista de acrónimos y abreviaturas, por orden alfabético, usados en el presente estudio de investigación.

ACE	Enzima convertidora de angiotensina
ACE2	Enzima convertidora de angiotensina tipo 2
ADAM-17	<i>Disintegrin and metalloproteinase-17</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALT	Alanina aminotransferasa
ALP	Fosfatasa alcalina
Ang	Angiotensinógeno
Ang-I	Angiotensina I
Ang-II	Angiotensina II
Ang-(1-5)	Angiotensina-(1-5)
Ang-(1-7)	Angiotensina-(1-7)
Ang-(1-9)	Angiotensina-(1-9)
ARAI	Antagonista de los receptores de angiotensina-II
AST	Aspartato aminotransferasa
AT <sub>1</sub> R	Receptor angiotensina-II tipo 1
AT <sub>2</sub> R	Receptor angiotensina-II tipo 2
AUC	<i>Area under the curve</i>
CH	<i>Central hélix</i>
Crea	Creatinina
CoIT	Colesterol total
COVID-19	Coronavirus disease 19
CTD1	<i>C-terminal domain 1</i>



CTD2	<i>C-terminal domain 2</i>
cv	Validación cruzada
DD	Dímero D
DIS	Dislipemia
DM	Diabetes mellitus
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
ECMO	<i>Extracorporeal membrane oxygen</i>
ECV	Enfermedad cardiovascular
EHC	Enfermedad hepática crónica
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ERC	Enfermedad renal crónica
FIB	Fibrinógeno
FUM	Fumador
FP	<i>Fusión peptide</i>
FPPR	<i>Fusión-peptide proximal región</i>
GDF-15	Factor 15 de crecimiento/diferenciación
GGT	Gamma-glutamyltransferasa
Glc	Glucosa
Hb	Hemoglobina
Hem	Recuento de hematíes
HR1	<i>Heptad repeat 1</i>
HR2	<i>Heptad repeat 2</i>
HTA	Hipertensión arterial
HCoV	<i>Human coronavirus</i>
IC	Insuficiencia cardiaca
ICs	Intervalos de confianza

IECA	Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de masa corporal
INR	Ratio internacional normalizado
IQR	Rango intercuartílico
IRA	Insuficiencia renal aguda
IRC	Insuficiencia renal crónica
Leucos	Recuento de leucocitos
Linfos	Recuento de linfocitos
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MAS	<i>Mitochondrial assembly</i>
M <sup>pro</sup>	<i>Main protease</i>
MERS-CoV	<i>Middle east respiratory syndrome</i>
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
ND	No datos
NTD	<i>N-terminal domain</i>
NSPs	Proteínas no estructurales
OBE	Obesidad
OMS	Organización mundial de la salud
ORF	<i>Open reading frames</i>
PL <sup>pro</sup>	<i>Papain-like protease</i>
pp1a	Poliproteína 1a
pp1b	Poliproteína 1b
p50	Percentil 50
PCR	Proteína C reactiva
PA	Presión arterial

PAM	Presión arterial media
PLT	Recuento de plaquetas
POL	Polimorfismo
PS	Presión sanguínea
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
RBD	<i>Receptor binding domain</i>
RBM	<i>Receptor binding motif</i>
RdRP	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i>
rhsACE2	<i>Recombinant human sACE2</i>
ROC	<i>Receiver operating characteristics</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
S1/S2	<i>Furin-cleavage site</i>
sACE2	Forma soluble de la enzima convertidora de angiotensina tipo 2
SARS-CoV	<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus</i>
SARS-CoV-2	<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>
SCA	Síndrome coronario agudo
SDRA	Síndrome de diestrés respiratorio agudo
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
sFlt-1	Forma soluble de <i>Fms-like tyrosine kinase-1</i>
SLC	Síndrome por liberación de citoquinas
SNP	<i>Single-nucleotide polymorphism</i>
ssRNA	<i>Single- stranded ribonucleic acid</i>
TFG	Tasa de filtración glomerular
TG	Triglicéridos
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor beta</i>
TM	<i>Transmembrane anchor</i>

TMPRSS2	<i>Transmembrane protease serine 2</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TP	Tiempo de protrombina
TTPA	Tiempo de tromboplastina parcial activado
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo
UCI	Unidad de cuidados intensivos
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
WES	<i>Whole-exome sequencing</i>

# 1. Introducción

## 1.1. Coronavirus humanos y SARS-CoV-2

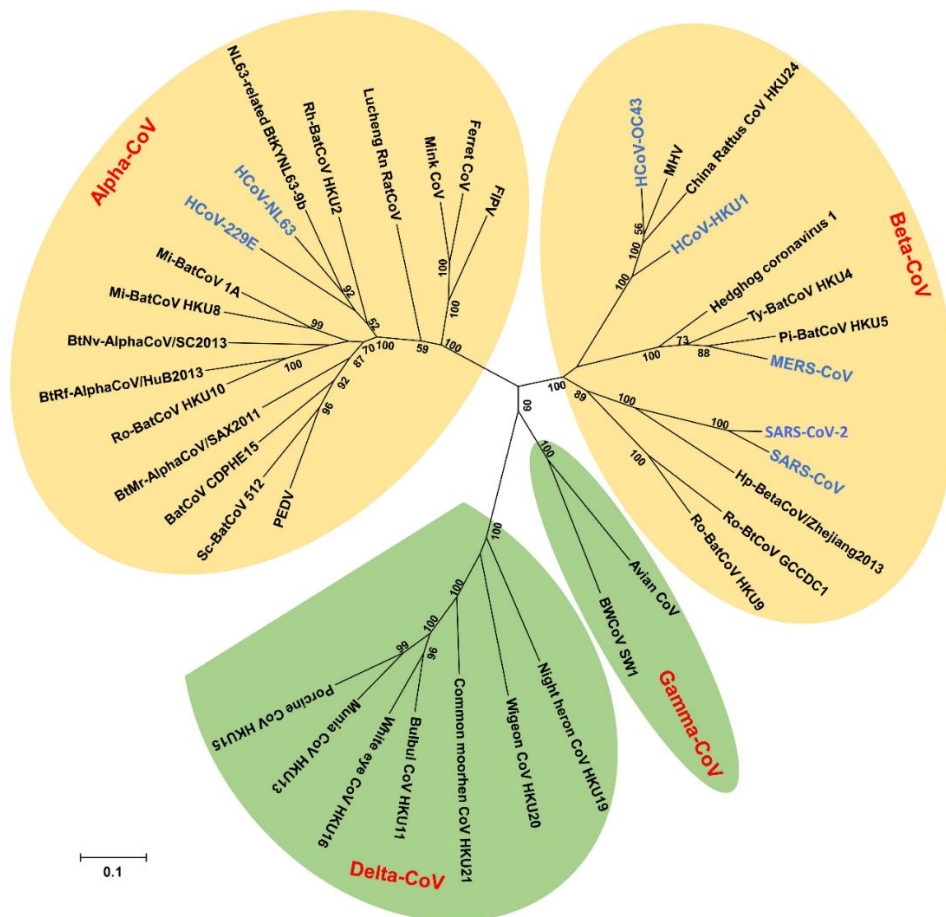
La enfermedad *Coronavirus Disease 2019* (COVID-19) es causada por el virus *Severe Acute Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2), cuya infección fue declarada pandemia el 11 de marzo de 2020 por la Organización Mundial de la Salud (OMS)(1). Los coronavirus tienen la capacidad de adaptarse a una amplia gama de hospedadores debido a la alta tasa de recombinación y mutaciones que dan lugar a una gran variedad de especies(2).

De manera sencilla puede decirse que los coronavirus pertenecen al orden *Nidovirales*, familia *Coronaviridae*, subfamilia *Orthocoronaviridae*; dentro de esta subfamilia existen cuatro géneros (*Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus*) que pueden verse representados de forma esquemática en la figura 1(3). Esta descripción taxonómica es una simplificación de la compleja clasificación de los virus, que puede ser consultada en la *International Committee on Taxonomy of Viruses*. Los alfacoronavirus y los betacoronavirus son los únicos géneros que infectan a mamíferos, los gammacoronavirus y deltacoronavirus infectan principalmente a pájaros, pero algunos de ellos pueden infectar a mamíferos(2,4,5).

Actualmente, se conocen siete tipos de coronavirus que pueden causar infección en humanos son los *Human Coronavirus* (HCoV). Cuatro de ellos causan infecciones respiratorias leves, son el HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 y HCoV-HKU1(6,7). Los tres restantes son los coronavirus responsables del *Severe Acute Syndrome Coronavirus* (SARS-CoV), el *Middle East Respiratory Syndrome* (MERS-CoV) y el SARS-CoV-2 que tienen como origen hospedadores animales que han transmitido la infección a los humanos, estas zoonosis han causado epidemias respiratorias con miles de casos y decenas de muertes(3).

El SARS-CoV (2002) seguido del MERS-CoV (2012) fueron los dos primeros coronavirus altamente patogénicos para los humanos de propagación mundial en el siglo XXI. Respecto al SARS-CoV, cuyo origen fue en China, se han registrado un total de 8096 casos en 27 países diferentes y con una mortalidad cercana al 10%. Aunque, los últimos casos se reportaron a finales del año 2003, desde entonces, se ha registrado que virus similares al SARS-CoV en murciélagos pueden infectar células humanas, lo que indica que este virus podría volver a emerger si volviese a estar en contacto con huéspedes que puedan acceder a seres humanos, como por ejemplo animales salvajes enjaulados en mercados, principalmente civetas, como así ha ocurrido con el SARS-CoV(6,8).

Diez años después del SARS-CoV, se detectó en Arabia Saudí el primer caso de MERS-CoV. Según la OMS se han confirmado 2600 casos con una mortalidad sumamente elevada, entorno al 35%(6,9), la tasa de detección disminuyó con la llegada del SARS-CoV-2; y aunque las medidas sanitarias y restrictivas impuestas con la llegada de la COVID-19 hayan contribuido a la disminución de la transmisión del MERS-CoV entre personas, la transmisión entre dromedarios y camellos es improbable que haya disminuido. Por ello, en la actualidad, sigue habiendo riesgo de transmisión zoonótica del MERS-CoV, considerándose un virus activo(8,10). Por otro lado, tanto SARS-CoV como MERS-CoV se han originado a partir de murciélagos que infectan a otras especies animales que están en contacto más estrecho con humanos (civetas y dromedarios, respectivamente), como ha ocurrido con la especie que nos ocupa, el SARS-CoV-2(11).



**Figura 1.** Representación de los géneros de la subfamilia *Orthocoronaviridae*. Aparecen representados los *Alphacoronavirus* (Alpha-CoV) y *Betacoronavirus* (Beta-CoV) que contienen especies que infectan a humanos (HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoV-HKU1, MERS-CoV, SARS-CoV y SARS-CoV-2) *Deltacoronavirus* (Delta-CoV) y *Gammacoronavirus* (Gamma-CoV). Imagen adaptada del artículo de Wang et al(3).

Los coronavirus son virus envueltos y esféricos con un tamaño entre 100-160 nm de diámetro. Su genoma es de ARN de una sola cadena (*single-stranded ribonucleic acid* - ssRNA) con sentido positivo, es decir de 5' a 3', por lo que puede actuar como un ARN mensajero (*messenger ribonucleic acid* - mRNA), con un tamaño entre 27-32 kb. Desde 5', dos tercios del genoma codifica para dos poliproteínas no estructurales: 1a (pp1a) y 1b (pp1b). Estas, darán lugar a las proteasas virales implicadas en la replicación y la transcripción viral. El otro tercio del genoma, codifica para cuatro glicoproteínas estructurales: la proteína *spike* (S), la proteína de membrana (M), la proteína de la envuelta (E) y la proteína de la nucleocápside (N) y otros genes accesorios implicados en la replicación viral y que son específicos de cada especie. Se caracterizan por una elevada recombinación genética y altas tasas de mutación, lo que da lugar a su elevada diversidad ecológica en cuanto a hospedadores(2,12). En la figura 2 puede observarse una representación esquemática de la estructura de los coronavirus.

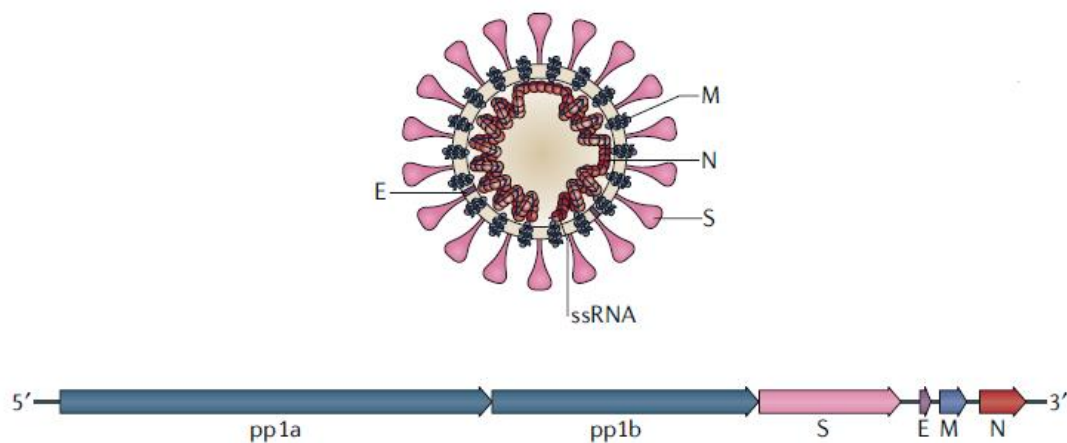


Figura 2. Representación de la partícula viral (parte superior) y del genoma (parte inferior) de los coronavirus humanos. Las proteínas *spike* (S), *envuelta* (E), *membrana* (M) y *nucleocápside* (N) son propias de cada especie de coronavirus. Imagen adaptada del artículo de Cui et al(2).

El agente causal de la COVID-19, SARS-CoV-2, comparte con SARS-CoV un 80% de similitud en su secuencia de ssRNA genómico, como peculiaridad, cabe destacar que ambos virus tienen el mismo receptor en humanos, la enzima convertidora de angiotensina tipo II (ACE2), en los siguientes apartados se discutirá sobre las implicaciones de este receptor en la enfermedad(13). En la figura 3 podemos observar el genoma del SARS-CoV-2 de forma detallada.

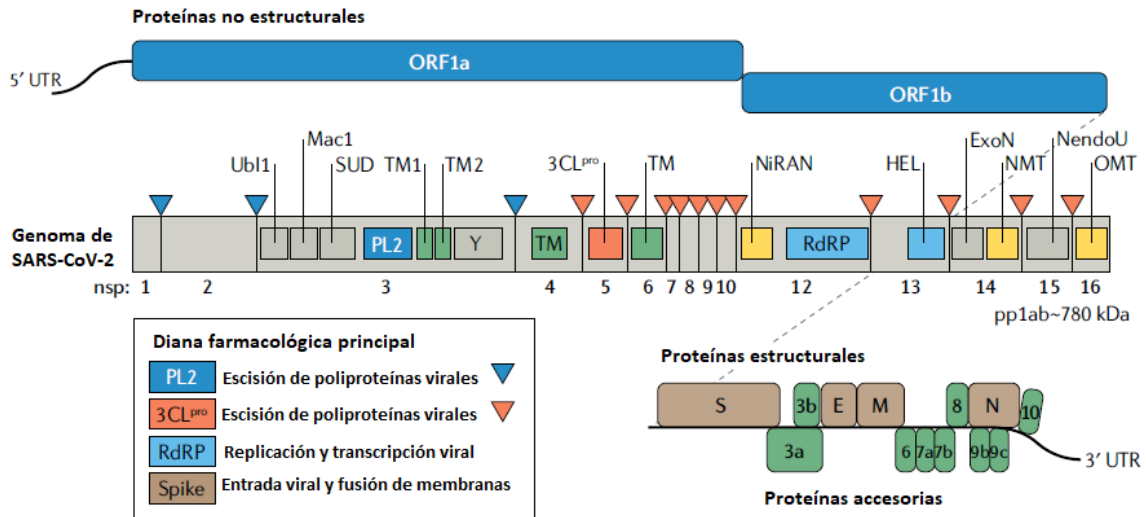


Figura 3. Representación del genoma de SARS-CoV-2, los dominios funcionales aparecen representados como rectángulos. La primera parte del genoma codifica para proteínas no estructurales a partir de dos **poliproteínas** (pp1a y pp1b) dando lugar a 16 proteínas no estructurales (NSPs). En la segunda parte del genoma se encuentran las cuatro **proteínas estructurales** (S, E, M y N) y entre ellas están codificadas diferentes **proteínas accesorias** (3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8, 9b, 9c y 10). Imagen adaptada del artículo de Yang et al(14).

El genoma de SARS-CoV-2 tiene un tamaño de casi 30 kb, contiene 14 marcos de lectura abiertos (*open reading frames* - ORFs) y codifica para 29 proteínas virales. Aproximadamente, dos tercios del genoma (si miramos la figura 3 desde 5'UTR) codifica para dos poliproteínas: 1a y 1b (pp1a y pp1b). Las pp1a y pp1b son escindidas por dos proteínas virales codificadas dentro de las 16 proteínas no estructurales (NSPs), esenciales para la replicación y transcripción viral, entre las que se encuentran dos proteasas *main protease* ( $M^{pro}$ ), *papain-like protease* ( $PL^{pro}$ ) y la *RNA-dependet RNA polymerase* (RdRP)(14). Cuatro ORFs hacia 3'UTR del genoma viral codifica para las proteínas estructurales que incluyen: la proteína de la nucleocápside (N), proteína *spike* (S), proteína de membrana (M) y proteína de la envuelta (E). Estas proteínas son responsables del ensamblaje del virión y también participan en la supresión de la respuesta inmunitaria. En la figura 4 se puede observar un modelo de la distribución de las proteínas estructurales, de su receptor la ACE2 y su correceptor la *Transmembrane Protease Serine 2* (TMPRSS2), cuyas funciones e interacciones con SARS-CoV-2 se explicarán en los siguientes apartados(14,15). Por otro lado, el genoma contiene una serie de genes que codifican para proteínas accesorias (3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8, 9b, 9c y 10) que se localizan entre los genes de las proteínas estructurales(14).



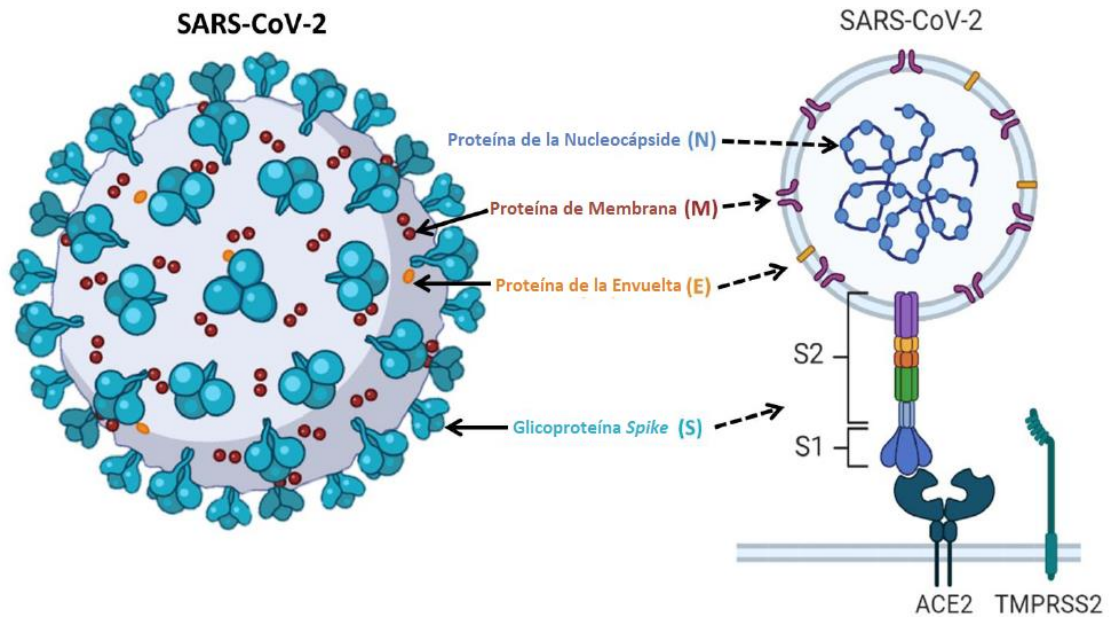


Figura 4. Representación esquemática del SARS-CoV-2 y las proteínas implicadas en la entrada del virus a la célula. En la izquierda se observa una imagen tridimensional del virus y sus proteínas de superficie: **envuelta (E)**, **membrana (M)** y **spike (S)**. En la derecha se puede ver la proteína de la **nucleocápside (N)** asociada al **ssRNA** de cadena simple; además se observa las dos subunidades (**S1** y **S2**) de la proteína **spike** y su interacción con la **enzima convertidora de angiotensina tipo 2 (ACE2)**, posterior a esta unión se produce la interacción con la **transmembrane protease serine 2 (TMPRSS2)**. Imagen adaptada del artículo de Kumar et al(15).

## 1.2. Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona y ACE2

El Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA) es el regulador principal del volumen plasmático y su función es la de mantener la homeostasis cardiovascular e hidroelectrolítica, esencial para hacer frente a la hipotensión y a la pérdida hidrosalina. Debido a ello, su desregulación tiene implicación en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares(16). La activación de la vía principal de este sistema comienza en el aparato yuxtaglomerular con la liberación de renina a partir de su precursor prorenina, como consecuencia de reflejos sobre los barorreceptores, estímulos  $\beta$ -adrenérgicos o moleculares sobre la mácula densa(17).

La renina escinde el angiotensinógeno (Ang), sintetizado en el hígado, en angiotensina I (Ang-I)(17). Este decapeptido, se escinde a su vez en un octapéptido, la angiotensina II (Ang-II), gracias a la enzima convertidora de angiotensina (ACE) sintetizada mayoritariamente en células endoteliales de pulmón. La Ang-II ejerce sus efectos sobre el receptor de angiotensina II tipo 1 (AT<sub>1</sub>R), induciendo a la vasoconstricción sistémica y a eventos proliferativos. Entre sus funciones está la liberación de la aldosterona desde la corteza adrenal para promover la

retención de agua y sodio. En cambio, la unión al receptor de angiotensina II tipo 2 (AT<sub>2</sub>R) se producen los fenómenos contrarios, los de vasodilatación y antiproliferativos(18). Aunque esta es la vía “clásica” o principal, se ha puesto en evidencia que existen otras vías locales del SRAA que serían independientes a la principal, una de estas vías “no clásicas” es la llevada a cabo a través de ACE2(19,20). En la figura 5 se puede observar un esquema resumido del SRAA y como el ACE2 actúa para mantener el equilibrio de este sistema.

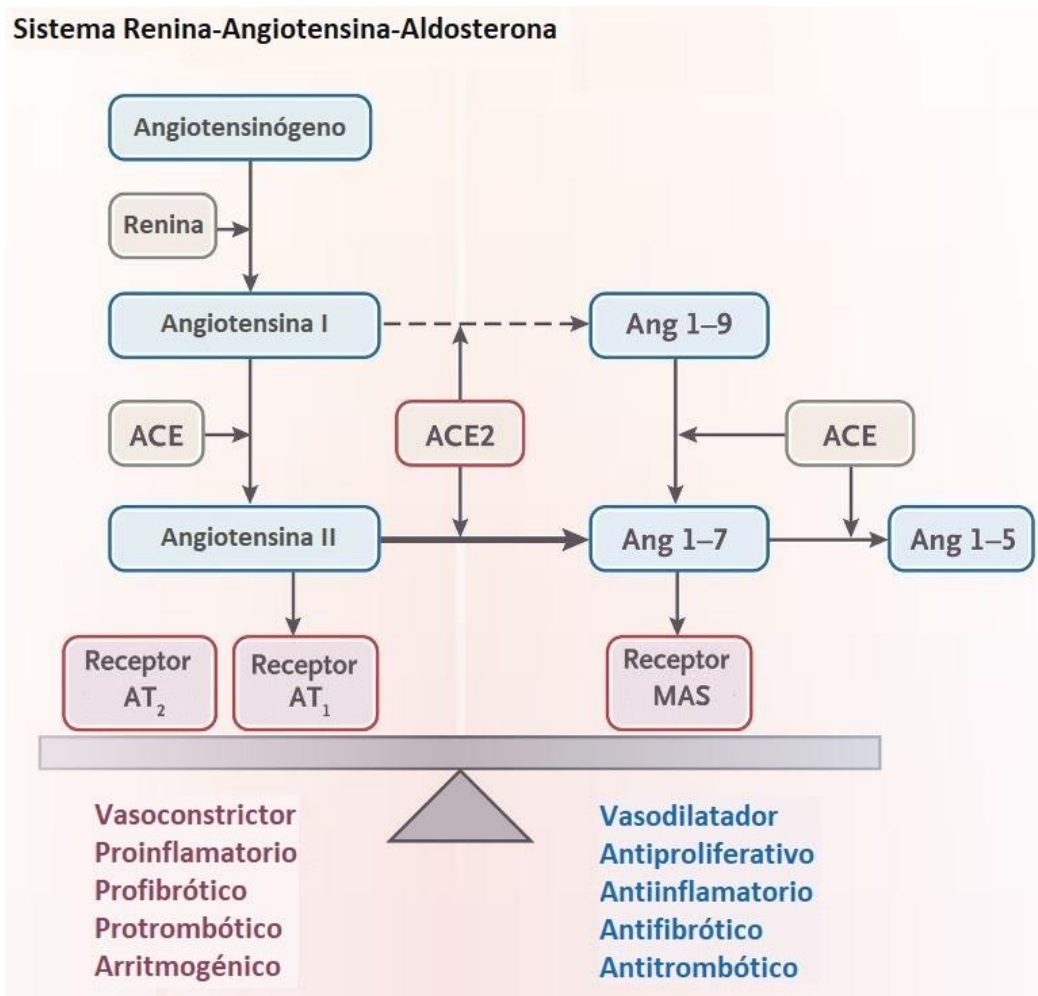


Figura 5. Representación del SRAA. En la parte izquierda de la imagen se observa la **vía clásica** de este sistema y como la Ang-II induce a efectos **vasoconstrictores, proinflamatorios, profibróticos, protrombóticos** y **aritmogénicos** a través de AT<sub>1</sub>R. En la parte derecha se observar la **vía no clásica**, llevada a cabo por el receptor MAS, que induce a efectos **vasodilatadores, antiproliferativos, antiinflamatorios, antifibróticos** y **antitrombóticos**. ACE: Enzima Convertidora de Angiotensina; ACE2: Enzima Convertidora de Angiotensina tipo 2; Ang-1-9: Angiotensina-(1-9); Ang-1-7: Angiotensina-(1-7); Ang-1-5: Angiotensina-(1-5); AT<sub>1</sub>R: receptor de angiotensina-II tipo 1. Imagen adaptada de Haug et al(21).

El descubrimiento de ACE2 permitió conocer un sistema “no clásico” del SRAA, que permitiría actuar sobre la Ang-II como un mecanismo regulador. La angiotensina-(1-7) (Ang-(1-7)) se produce mediante la escisión de la Ang-II llevada a cabo por ACE2(22). Además, la ACE2 también escinde la Ang-I en angiotensina-(1-9) (Ang-(1-9)). La Ang-(1-9) puede transformarse de forma secundaria en Ang-(1-7) por la acción de ACE. El papel fundamental de esta vía “no clásica” sería llevada a cabo por la Ang-(1-7) y su capacidad para unirse a los receptores transmembrana acoplados a proteína G tipo *mitochondrial assembly* (MAS). Esta unión induce a acciones vasodilatadoras, antiinflamatorias y cardioprotectoras mediadas por óxido nítrico, que limitan el efecto vasoconstrictor de la Ang-II(23,24). La Ang-(1-7) finalmente será degradada a angiotensina-(1-5) (Ang-(1-5)) por ACE(21).

En la enfermedad cardiovascular (ECV), el SRAA suele estar desregulado, ejerciendo la mayoría de sus efectos patológicos mediante la Ang-II. Por el contrario, la ACE2 y sus productos, la Ang-(1-7) y la Ang-(1-9)) forman la rama reguladora del SRAA, y tiene efectos protectores a nivel pulmonar (antifibrótico) y cardiovascular (vasodilatador)(25–27).

El SRAA se encontraría ligado a la respuesta del organismo frente a la infección por SARS-CoV-2 a través del su receptor, ACE2, pudiendo provocar la desregulación del mismo a nivel pulmonar y sistémico. En la revisión de Gheblawi et al.(28), se indica que la activación de SRAA debido a la unión de SARS-CoV-2, ocasiona de forma directa la pérdida de ACE2 para regular este sistema y esta pérdida también se produciría de forma indirecta, ocasionada por las manifestaciones sistémicas de la COVID-19.

### **1.3. Relación entre el virus SARS-CoV-2 y la ACE2**

La ACE2 ha sido propuesta como receptor celular del SARS-CoV-2. Esta carboxipeptidasa se expresa de forma ubicua por todo el organismo: en células del intestino, del páncreas, del riñón, del tejido adiposo, del pulmón, del corazón, de los vasos sanguíneos, de los testículos, de la placenta, entre otros; esto ha sido confirmado mediante técnicas de inmunohistoquímica e inmunoblot en tejido(28–31). Entre sus funciones destaca el ser parte del SRAA actuando como contraregulador de la ACE. Como se destacó en el apartado anterior, la ACE2 actuaría como un limitador de la activación continuada del SRAA por la ACE.

La ACE2 es el receptor de los virus SARS-CoV y el SARS-CoV-2 es esencial para que se produzca la entrada del virus en las células; así lo han demostrado estudios *in vitro* e *in vivo* como el de Kuba et al.(32) para el SARS-CoV, en el que utilizaba *knockout mice* y cultivos de células humanas y en el estudio de Hoffmann et al.(33) para el SARS-CoV-2, también en células humanas. Estos hallazgos fueron confirmados por estudios genéticos en los que utilizaban células humanas de diferentes órganos y ratones mutantes para *ACE2*, estos experimentos dedujeron que la ACE2 es el receptor esencial para SARS-CoV-2 en infecciones tanto *in vitro* como *in vivo*(34).

Para la entrada del virus a la célula también se requiere de una proteína adicional en la célula hospedadora, considerada como correceptor es la *Transmembrane Protease Serine 2* (TMPRSS2)(35). La TMPRSS2 es una serina proteasa que ayuda en la escisión de la proteína *spike* para la fusión y entrada del virus, tanto en SARS-CoV como en SARS-CoV-2(33). Al igual que ACE2, TMPRSS2 tiene una expresión ubicua en el organismo, se expresa en la próstata, tejido mamario, conducto biliar, riñón, colon, intestino delgado, páncreas, ovario, glándula salival, estómago, pulmón, además de todo el tracto aerodigestivo(36,37). El gen *TMPRSS2* es activado en presencia de andrógenos, esto ha sido demostrado en células de cáncer de próstata en la que su presencia está aumentada cuando estas son dependientes de andrógenos, además la fusión de los genes *TMPRSS2-ETS* genera un oncogén visto en aproximadamente el 50% de los cánceres de próstata(36,38).

La proteína viral *spike* es una proteína de fusión que está compuesta de dos subunidades (S1 y S2). La S1 es la responsable de unirse al receptor de membrana en la célula humana, la ACE2, a través del *Receptor Binding Domain* (RBD) y la subunidad S2 facilita la fusión de la membrana viral con la membrana celular, gracias a la acción serina proteasa de TMPRSS2(11,39).

A lo largo de la pandemia mediada por SARS-CoV-2 se han observado modificaciones en la estructura biológica de la proteína *spike* dando lugar a las diferentes variantes y subvariantes del virus que se han ido detectando(40). Algunas revisiones recientes como las de Hattab et al.(41), indican que la duración de la pandemia y la continua transmisibilidad entre individuos, junto con la presión selectiva ejercida sobre el virus para intentar erradicarlo han contribuido a la aparición de un amplio número de variantes.

La subunidad S1 de la proteína *spike* está formada por cuatro dominios: el *N-Terminal Domain* (NTD) el dominio RBD y dos dominios C-terminal, *C-Terminal Domain 1* y *2* (CTD1 y

CTD2). La subunidad S2 está formada por los dominios: *fusión peptide* (FP), *fusión-peptide proximal región* (FPPR), *heptad repeat 1 y 2* (HR1 y HR2), *central hélix* (CH) y *transmembrane anchor* (TM). Además, donde termina la S1 y comienza la S2 está el dominio *furin-cleavage site* (S1/S2)(15,39).

En la figura 6 podemos observar los diferentes dominios de la proteína *spike* y su conformación tridimensional de la primera variante aislada Wuhan-Hu-1 con la mutación D614G, una de las primeras mutaciones conocidas en la variante primigenia y que permanece en todas las variantes. En la parte inferior de la imagen de izquierda a derecha, observamos la conformación tridimensional de la variante Wuhan-Hu-1 y de la variante con la mutación D614G donde el dominio RBD está más expuesto y el bucle 630 que une la subunidad S1-S2 tiene una conformación más ordenada y por tanto, más estable, en las siguientes dos imágenes tridimensionales se puede ver cómo queda expuesto el dominio RBD preparado para la interacción con ACE2 y el drástico cambio conformacional impulsado por HR1 para la inserción del FP en la membrana celular(39).

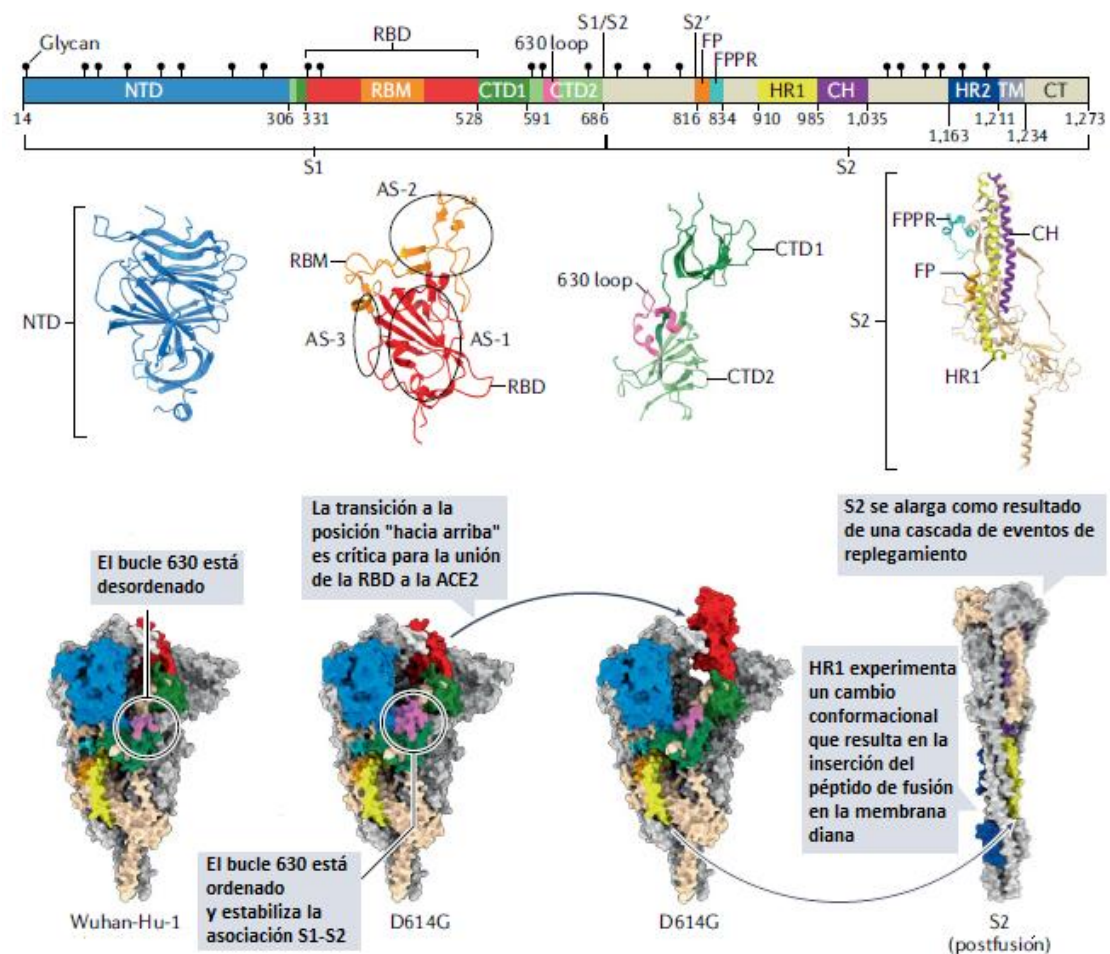


Figura 6. Representación de los diferentes dominios de la **proteína spike** y los cambios conformacionales para la unión al receptor. En la parte superior de la imagen, se puede observar la secuencia proteica de la **proteína spike**, cabe destacar el dominio **Receptor Binding Domain (RBD)** y **Receptor Binding Motif (RBM)** donde se encuentran tres sitios antigénicos (**AS-1, AS-2 y AS-3**) y lugar de unión con el receptor ACE2. En la parte inferior de la imagen, se observa la estructura tridimensional de la **proteína spike** y los cambios conformacionales para la fusión con la membrana celular. Imagen adaptada de Jackson et al(39).

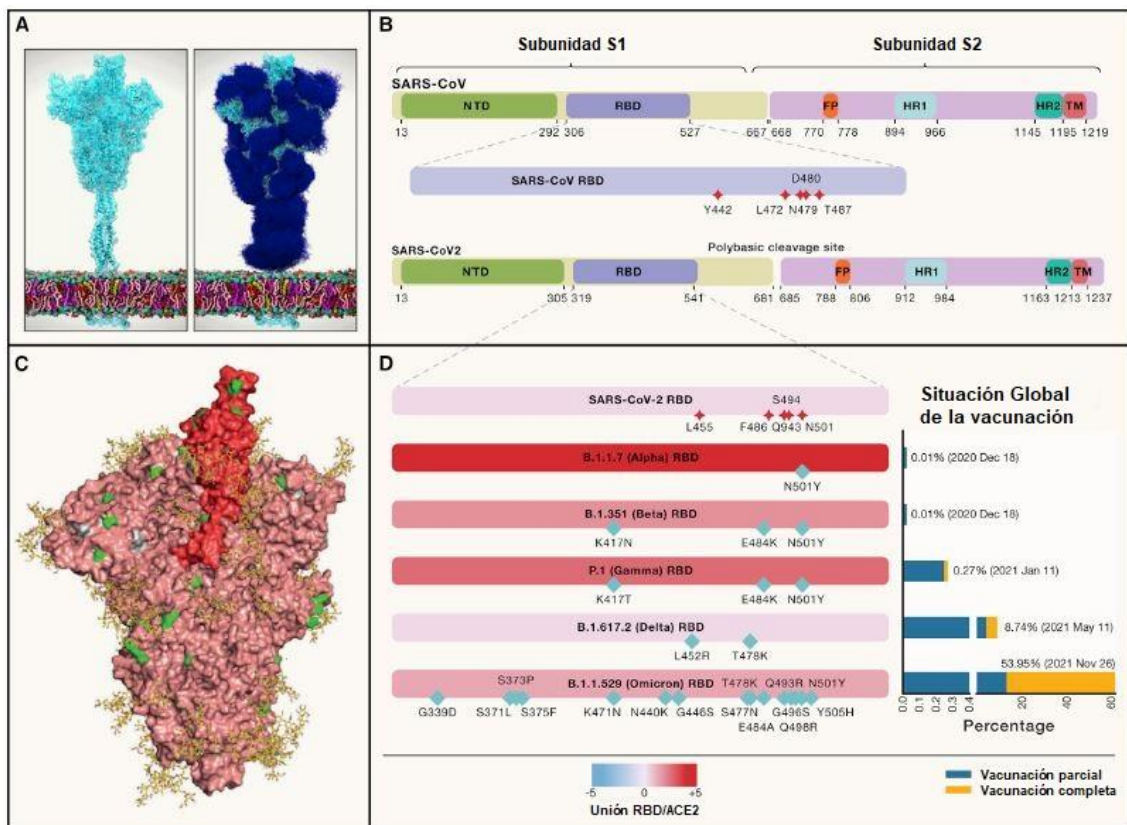
El gen *S* del genoma de SARS-CoV-2 y de los coronavirus similares como SARS-CoV, codifica para la proteína *spike*, esta región de su genoma es un “punto caliente” de recombinación, posiblemente para aumentar la afinidad por el receptor ACE2; esto no deja de ser una adaptación evolutiva, especialmente cuando ocurre en el dominio RBD, pero que puede tener otras consecuencias como la transmisión entre especies diferentes (zoonosis) y la evasión del sistema inmune(42). Los análisis *in silico* e *in vivo* han demostrado que numerosos animales tanto domésticos como salvajes son candidatos a ser infectados por el SARS-CoV-2, como gatos, perros, hurones, hámsteres y ovejas, pero no roedores ni cerdos; al menos en la variante original de Wuhan(43,44). Sin embargo, la variante *Omicron*, sí que tiene tropismo por los roedores, esto demuestra la adaptabilidad de los coronavirus a múltiples hospedadores(45).

El dominio RBD de SARS-CoV-2 consta de 21 kDa perfectamente conservados y optimizados para la interacción y unión con el dominio extracelular N-terminal de ACE2. Además, la subunidad S1 de SARS-CoV-2, comparte un alto grado de homología estructural con la subunidad S1 de SARS-CoV y este exhibe entre 5-10 veces más afinidad por la unión a ACE2. La mayor diferencia entre ambas en la sustitución de cinco residuos de aminoácidos que están directamente implicados en la unión con ACE2, estas sustituciones suponen cambios en la conformación de los enlaces de hidrógeno e las interacciones hidrofóbicas que aumentan la afinidad por la unión(46).

En la figura 7 puede observarse la representación tridimensional de la proteína *spike* y como las diferentes variantes tienen mutaciones en el dominio RBD para aumentar su afinidad por ACE2 y su potencial transmisibilidad.

La presión selectiva por las infecciones naturales, tratamientos y vacunas promueven el desarrollo de mutaciones aleatorias, y esto ocurre en aquellos dominios proteicos más expuestos al sistema inmunitario como es el dominio RBD. Este dominio es la diana principal de los anticuerpos para neutralizar la entrada del virus a la célula, lo que supone una presión

selectiva constante e induce a la aparición de variantes SARS-CoV-2. Algunos ejemplos son: B.1.1.7 (*Alpha*), B.1.351 (*Beta*) y P.1 (*Gamma*) variantes que ha adquirido de forma independiente la mutación N501Y en el dominio RBD que confiere un incremento de la afinidad por ACE2. Además, las variantes *Beta* y *Gamma* tienen mutaciones en los residuos K417 y E484 que introducen una hélice adicional en su conformación tridimensional que la hace más resistente a la unión de anticuerpos neutralizadores(15,39,46).



**Figura 7.** Representación de la unión del SARS-CoV-2 a ACE2 y cómo las diferentes variantes del virus afectan a la unión. A) Representación a la izquierda la **proteína spike** no glicosilada y a la derecha la glicosilada; los glicanos están colorados en **azul oscuro**. B) Comparación entre las subunidades S1 y S2 de la **proteína spike** de los virus SARS-CoV y SARS-CoV-2, la localización de los residuos clave para la unión con ACE2 están marcados con **estrellas rojas**. C) Representación de la **proteína spike** con las **mutaciones en verde** que definen la **variante Omicron**, **en rojo** está representado el **dominio RBD** y las modificaciones de los **glicanos en amarillo**. D) Afinidades de unión a ACE2 entre SARS-CoV, SARS-CoV-2 de tipo salvaje y las variantes de SARS-CoV-2 **Alpha**, **Beta**, **Gamma**, **Delta**, **Omicron**. Las alteraciones de aminoácidos clave en el dominio RBD de las variantes se representan con **rombos azules**. En general, las variantes preocupantes del SARS-CoV-2 tienden a tener una mayor afinidad de unión hacia la ACE2 en comparación con el SARS-CoV-2 primigenio. En la parte de la derecha se observan datos de vacunación (09/02/2022) en relación con la fecha

de designación de la variante. Se pone de manifiesto que la inmunidad natural y mediada por las vacunas supone una presión selectiva para que nuevas variantes escapen a esta vigilancia inmunitaria. Imagen adaptada de Oudit et al(46).

Con el curso de la pandemia, aparecieron otras variantes como la B.1.617.2 (*Delta*) que superó a las otras variantes. La variante *Delta* posee dos mutaciones clave: L452R y T478K que quedan de forma periférica al punto de contacto entre RBD-ACE2, estas junto con las modificaciones antigénicas vistas en el dominio N-terminal fueron probablemente impulsadas por la presión selectiva en el reconocimiento inmunológico. En esta situación de equilibrio entre mantener la fuerte afinidad por ACE2 mientras se escapa del reconocimiento inmunológico, aparece la variante B.1.1.529 (*Omicron*)(15,39,46). La variante *Omicron* tiene un total de 37 alteraciones genéticas en la proteína *spike*, 15 de ellas situadas en el dominio RBD que aumentan la afinidad por ACE2, lo que demuestra la importancia de esta unión para la propagación del virus(15,46).

Otras variantes conocidas con mutaciones en el dominio RBD: la variante B1.427 (*Epsilon*) que también posee la mutación L452R como la variante B1.617.1 (*Kappa*) que además tiene la E484Q. Ambas tienen una moderada evasión frente a anticuerpos, pero la variante *Kappa*, además posee otras mutaciones que sugieren que incrementan la escisión de S1-S2. Por último, la variante C.37 (*Lambda*) con mutaciones L452Q y F490S entre otras tendría un incremento de la infectividad, pero una menor evasión frente a anticuerpos(15,39).

En conjunto todas las variantes del virus, tanto presentes como probablemente futuras, muestra una gran afinidad y avidez por la unión ACE2 lo que explica el aumento de la infectividad y transmisibilidad en las variantes consecutivas a la variante original de Wuhan(39,46).

En figura 8 puede observarse la unión entre el dominio RBD de SARS-CoV-2, el dominio N-terminal de ACE2 y el punto de contacto entre ambos, con las mutaciones clave previamente citadas.



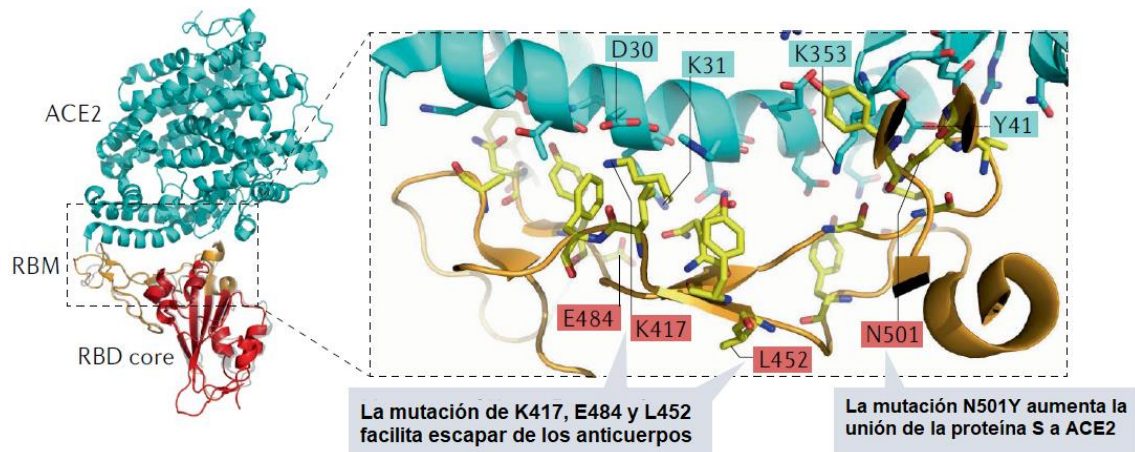


Figura 8. Representación de la interacción entre SARS-CoV-2 y ACE2. En la izquierda de la imagen se observa el **Receptor Binding Motif (RBM)** entre **ACE2** y el dominio **RBD** de SARS-CoV-2. En la parte derecha, se observa el dominio **RBM** ampliado donde participan 20 residuos de **ACE2** y 17 del dominio **RBD** de SARS-CoV-2. Aparecen destacados los residuos mutados de **RBD** (**K417**, **E484**, **L452**, **N501Y**) y los residuos de **ACE2** (**D30**, **K31**, **K353**, **Y41**) con los que interactúan. Imagen adaptada de Jackson et al(39).

El servidor web *Nextstrain* se puede consultar la epidemiología genómica de SARS-CoV-2 a nivel mundial, actualizada cada 6 meses (<https://nextstrain.org/ncov/gisaid/global/6m>). Se puede ver que el número de variantes y subvariantes no deja de aumentar. Las consecuencias de las mutaciones en la proteína *spike* y no solo en el dominio RBD comentado anteriormente, implican cambios estructurales en la proteína que aumentan su estabilidad, afectan a la unión a anticuerpos neutralizantes, a la flexibilidad del dominio RBD y por tanto a la accesibilidad de unión a ACE2. Su análisis permite ver las diferentes tácticas evolutivas y adaptativas de las variantes de SARS-CoV-2 que la hacen mantenerse y seguir expandiéndose(15).

Las múltiples manifestaciones clínicas ocasionadas por SARS-CoV-2 que ocurren en otros tejidos que no son el pulmón están asociadas a la distribución y expresión amplia de ACE2. Se sabe que la enfermedad COVID-19 se desarrolla inicialmente en el tracto respiratorio superior, en la zona nasofaríngea. Desde aquí, el virus se puede diseminar hasta el alveolo pulmonar donde desarrolla la neumonía característica de esta enfermedad. Esto no deja de ser el reflejo de la distribución celular específica de ACE2 y también de las distintas proteínas que pueden estar implicadas en la entrada viral. Una vez que la colonización pulmonar y el daño ocasionado es severo, la difusión del virus puede realizarse a otros tejidos, esto se

evidencia con el daño ocasionado en múltiples órganos en aquellos casos más graves de COVID-19(28,47).

Respecto al sistema respiratorio, la expresión de ACE2 es elevada en las células caliciformes y ciliadas nasales; y aunque disminuye su presencia, también es detectable en células basales, ciliadas, club y alveolares tipo II de las vías respiratorias inferiores(48). El SARS-CoV-2 a diferencia del SARS-CoV, se replica de forma más eficiente en el tracto respiratorio superior, esto contribuye a que la transmisión de la infección sea más eficiente en el SARS-CoV-2, debido a que los principales lugares de replicación del SARS-CoV son el tracto respiratorio inferior y las células alveolares o neumocitos(49). La principal proteasa para la entrada del virus tras la unión con ACE2 es la TMRSS2, el SARS-CoV-2 ha evolucionado para utilizar otras proteasas del huésped como son la catepsina B, la catepsina L y la furina para la escisión de la proteína *spike*(28). Las variantes *Omicron* y sus subvariantes parecen realizar esta escisión de forma independiente a TMRSS2(50).

El ACE2 existe en dos formas, una unida a membrana y otra soluble (sACE2); esta última, es una forma más corta que se elimina por los fluidos corporales y circula en sangre en baja concentración; además, la sACE2 conserva el dominio catalítico, y por tanto conservaría la capacidad de unión a SARS-CoV-2, lo que podría modular su infectividad(51,52). La presencia viral podría desencadenar la escisión proteolítica aberrante de ACE2 a la circulación, por mecanismos virales directos o de forma indirecta a través de la respuesta inflamatoria producida, esto se ha visto en el SARS-CoV que también utiliza el ACE2 como receptor; como consecuencia, reduce los efectos reguladores locales sobre el SRAA(53).

La activación de la vía de Ang-II a través de AT<sub>1</sub>R y el receptor del factor de necrosis tumoral (*Tumor Necrosis Factor* - TNF) inducen a la expresión de la *disintegrin and metalloproteinase-17* (ADAM-17) y su actividad proteolítica sobre ACE2, esto también se observa cuando se activa la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (*Mitogen-Activated Protein Kinases* - MAPK), debido a la inflamación y al estrés celular(54). Concentraciones de sACE2 elevadas y mantenidas en el tiempo refleja una supuesta elevación patológica de la actividad de ADAM-17 e inflamación, que estaría asociada con el incremento de la gravedad, mortalidad e incidencia del daño agudo de miocardio en la COVID-19(47). Estos hallazgos, la inflamación inducida por el virus y el estrés celular con la desregulación de la ACE2,

contribuiría al daño multiorgánico y a la severidad que ha sido asociada a SARS-CoV y SARS-CoV-2.

Se han encontrado algunos estudios en los que la relación de la actividad y la concentración de sACE2 con la COVID-19 no es clara. En la investigación de Chirinos et al.(55), en el que se ha estudiado a pacientes con fallo cardíaco y COVID-19, tienen menores concentraciones de sACE2 y esto está asociado a pacientes de sexo masculino, edad avanzada, fumadores, con hipertensión arterial (HTA) y la obesidad (OBE). En cambio, el estudio prospectivo de Wallentin et al.(56), realizado en pacientes con fibrilación auricular y COVID-19 asociaron que elevadas concentraciones ACE2 daban lugar a mayores concentraciones de sACE2 a nivel local y peores resultados clínicos. Por otro lado, en el estudio de Narula et al.(57), han encontrado que alta actividad de sACE2 en suero están asociadas de forma independiente a los factores de riesgo cardiovascular tradicionales, a una alta probabilidad de incidencia y causa de muerte por IAM y fallo cardíaco. El resultado de todos estos estudios nos lleva a pensar que queda un considerable campo por estudiar en relación a la concentración y la actividad de sACE2, debido a que son dos medidas difícilmente comparables, considerando que una alta concentración de sACE2 no tiene por qué corresponderse con una alta actividad enzimática y viceversa. Por ello, se hace necesario más investigaciones que permitan llegar a una convergencia sobre la utilidad de los receptores solubles como el sACE2.

#### **1.4. Polimorfismo rs2106809 del gen *ACE2***

El gen *ACE2* se encuentra localizado en *Xp22.2* y se han encontrado numerosos polimorfismos que pueden inducir a una mayor o menor expresión de su forma soluble. Por ello, es importante tener en cuenta, que la concentración de ACE2 y por tanto de sACE2 podría estar influida por diferentes polimorfismos del gen *ACE2*. Se han identificado varios polimorfismos que pueden influir en la expresión de ACE2(58–60). El polimorfismo rs2106809 (NG\_012575.1:g.7132 T>C) es una variante intrónica, estas variantes clásicamente se han descrito como poco patogénicas(61). Concretamente se localiza en el intrón 2 y según los datos de Sabater et al.(62), mediante análisis *In silico* (*Mutation Taster*) no genera un sitio de *splicing* alternativo. En cambio, otro artículo más reciente de Karakaş et al.(63), indican que con la herramienta *Human Splicing Finder* esta variante podría generar un sitio de empalme intrón-exón. A pesar de las discrepancias encontradas, hay artículos como el de Pan et al.(58), en los que relacionan esta variante con una mayor probabilidad de HTA

y dislipemia. En relación con la COVID-19 Sabater et al.(62), ha encontrado que este polimorfismo de un solo nucleótido (*Single-Nucleotide Polymorphism* - SNP) está asociado con un incremento del riesgo de ser hospitalizado y de desarrollar un curso más grave de la enfermedad.

Si nos centramos en la variabilidad de ACE2, hay diferentes polimorfismos implicados en su actividad. El polimorfismo rs2106809 (alelo C) se ha asociado a una mayor actividad enzimática en mujeres, esto podría contrarrestar la síntesis de Ang-II y su mayor degradación llevada a cabo por ACE2 en Ang-(1-7), lo que significa que tendría un papel protector frente a la COVID-19 al compensar la acción del SRAA(64). Por otro lado, la presencia del alelo T (mujeres TT) se ha asociado a síndrome metabólico (alta concentración de triglicéridos, baja concentración de colesterol HDL) e HTA(58,64,65); esto podría favorecer el desarrollo de una COVID-19 más severa y ser susceptibles al desarrollo de episodios de HTA y daño circulatorio que ocasionaba el Síndrome por Liberación de Citoquinas (SLC) en las primeras olas. Sería de gran interés establecer la asociación entre el polimorfismo rs2106809 de *ACE2* y la enfermedad COVID-19, como parece ser que ha encontrado Sabater et al(62). en su estudio. Además del polimorfismo rs2106809, se han descrito otros polimorfismos de *ACE2* asociados a enfermedades cardiovasculares y pulmonares(66). Por ello, diferentes polimorfismos del gen *ACE2* podrían estar implicados en el curso y la severidad de la COVID-19(67), hecho que aún no ha sido suficientemente estudiado. Aunque en este estudio solo se analice el polimorfismo rs2106809, todas las investigaciones parecen indicar que las variantes genéticas en el gen *ACE2* podrían estar implicados en el curso de la COVID-19. Por esta razón, resulta de gran interés el estudio de la concentración de ACE2 y del polimorfismo rs2106809 en pacientes diagnosticados y tratados de esta enfermedad; para así, poder entender las implicaciones clínicas que tienen los virus, además del SARS-CoV-2, que utilizan el receptor ACE2 como vía de entrada a nuestro organismo.

### **1.5. Fisiopatología de la COVID-19 y la participación de la ACE2**

La fisiopatología y daño multiorgánico asociado a la COVID-19 es causada por la infección llevada a cabo por SARS-CoV-2. Esta puede producirse debido a un efecto citotóxico directo sobre las células infectadas que darán lugar a procesos de trombosis e inflamación cuando ocurren en el endotelio vascular y, de forma indirecta, a través de la desregulación del SRAA y de la respuesta inmunitaria(68).

La principal diana del virus es el sistema respiratorio, inicialmente causada por daño en el tejido a nivel local, seguida de una segunda fase en la que infecta las células de todo el organismo, desencadenando una respuesta inmunitaria sistémica. Algunos de los pacientes con infección grave por SARS-CoV-2 desencadenaban el SLC, también conocida como la “tormenta” de citoquinas, debida a la activación masiva del sistema inmune. Esta respuesta inmunitaria ocasionaba una respuesta inflamatoria tanto local como sistémica, dando lugar a una disfunción y provocando daño en otros sistemas del organismo(69).

Los cambios patológicos que se producen en pacientes COVID-19 con enfermedad grave, como el aumento de la permeabilidad vascular, la lesión tisular local y la fibrosis, se han atribuido a una disminución de la actividad de la ACE2 debida a la presencia del virus SARS-CoV-2(70,71). A continuación, se detallan los diferentes eventos que ocurren a nivel tisular durante la COVID-19, su representación simplificada se puede ver en la figura 9.

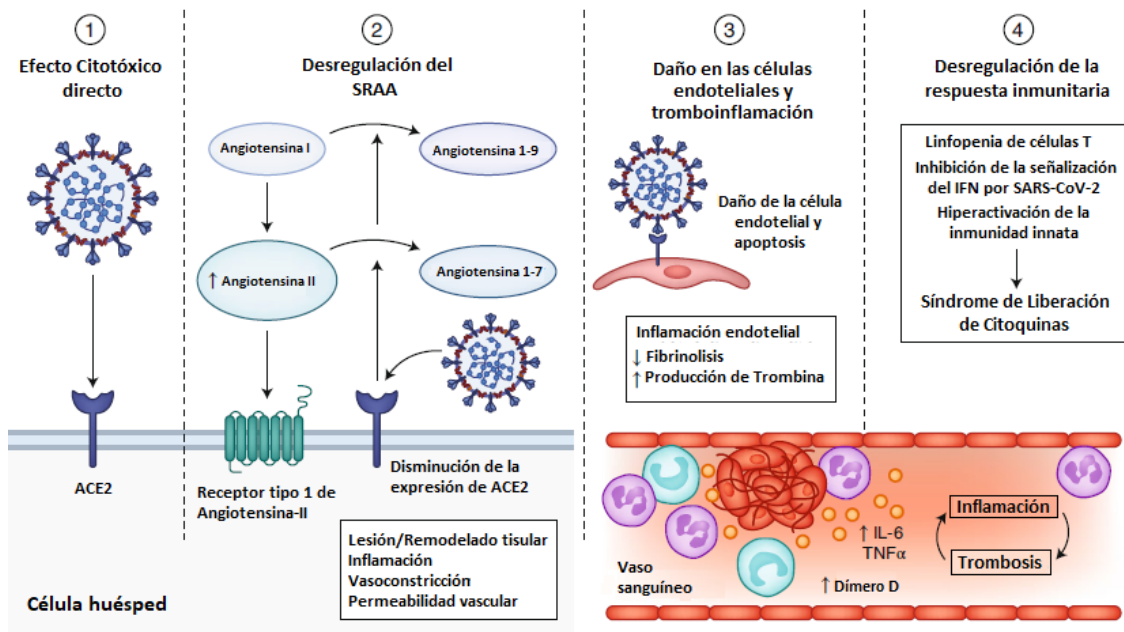


Figura 9. Representación esquemática de la fisiopatología de la COVID-19. De izquierda a derecha están representados los diferentes mecanismos de daño que causa el SARS-CoV-2: 1) Efecto citotóxico directo. 2) Desregulación de SRAA. 3) Daño de las células endoteliales y tromboinflamación y 4) Desregulación de la respuesta inmunitaria. Imagen adaptada de Gupta et al(68).

### 1. Efecto citotóxico directo por la entrada del virus.

La entrada del virus al organismo se produce a través del tracto respiratorio debido a la alta expresión de ACE2 en múltiples tipos de células epiteliales de las vías aéreas, primero las vías respiratorias altas y luego las bajas, incluyendo las células del epitelio alveolar tipo II situadas en el pulmón(48,72). Esta replicación viral, causa en los casos más graves neumonía y el Síndrome de Diestrés Respiratorio Agudo (SDRA)(68,73).

Una vez que se produce la infección en el sistema respiratorio el virus se disemina por la sangre infectando otros tejidos que también expresan ACE2 y TMPRSS2. Entre las células afectadas se destacan: colangiocitos, colonocitos, queratinocitos del esófago, células epiteliales gastrointestinales, células  $\beta$  pancreáticas, células del túbulo proximal renal y podocitos(74–77). Estos hallazgos indicarían que el daño multiorgánico podría ser debido en parte al daño viral, provocando la sintomatología más allá del pulmón.

### 2. Desregulación del SRAA.

Como se mencionó previamente, la disminución de ACE2 de las membranas celulares produce un desbalance en el mecanismo de regulación del SRAA a nivel local. Esta disminución del receptor de SARS-CoV-2 provoca un aumento de Ang-I y Ang-II respecto a Ang-(1-7) y Ang-(1-9), favoreciendo los efectos vasoconstrictores y profibróticos(24,28).

### 3. Daño en las células endoteliales y tromboinflamación.

A causa de la infección viral en las células endoteliales, se produce un ambiente de inflamación y protrombosis que sería responsable de la fisiopatología de la COVID-19(70). El aumento del factor de von Willebrand junto con la activación de neutrófilos y macrófagos ocurre cuando se produce daño sobre el endotelio vascular en los diferentes tejidos. En los pacientes con COVID-19, se ha encontrado una excesiva producción de trombina, la inhibición de la fibrinólisis y la activación de las vías del complemento. Esto también se ve favorecido por la activación de plaquetas, neutrófilos y macrófagos que liberan citoquinas proinflamatorias, causando el SLC, más conocido como tormenta de citoquinas. Marcando así el inicio de una tromboinflamación que generará disfunción del sistema vascular(78–80).

#### 4. Desregulación de la respuesta inmunitaria.

Se produce como consecuencia de una liberación masiva de citoquinas que causan la activación excesiva del sistema inmune innato junto con la disminución de linfocitos T, esto es característico de los pacientes que desarrollan una COVID-19 grave(81). Se ha visto que los pacientes cursan la enfermedad de forma grave tienen elevación en suero de marcadores inflamatorios como la proteína C reactiva (PCR), la ferritina, el dímero D (DD), el fibrinógeno (FIB), la enzima lactato deshidrogenasa o la interleucina-6 (IL-6). Estas elevaciones se han asociado a un peor pronóstico(82,83).

### **1.6. Interés en el ámbito científico y profesional**

La proteína ACE2 escinde la Ang-I en Ang-(1-9) y la Ang-II en Ang-(1-7), actuando como enzima reguladora del SRAA al competir con la proteína ACE, la cual escinde la Ang-I en Ang-II. El aumento de la actividad y concentración de ACE produce un aumento del tono vascular, esto indica que la posibilidad de la elevación de ACE2 se produzca como parte de la respuesta compensatoria a la HTA(84,85). Por ello, la medida de su actividad y concentración en el organismo resulta de interés principalmente en estos pacientes(25–27).

Como se ha comentado anteriormente, es importante considerar que la ACE2 es una proteína transmembrana que se expresa en múltiples tejidos y que su forma soluble, sACE2, circula en sangre a concentraciones bajas dependiendo de la escisión llevada a cabo por la ADAM-17. Los sucesos que tienen lugar a nivel post-traducciona l regulan el equilibrio entre la forma unida a membrana, ACE2, y la soluble, sACE2, por lo que esta metaloproteasa tendría implicación directa en su concentración(86).

Respecto a su relación con la enfermedad COVID-19, la sACE2 podría no ser capaz de mediar la entrada del SARS-CoV-2, debido a que no se encuentra unida a membrana, pero podría mantener la afinidad con la proteína viral *spike*; por ello, podría competir con el receptor de membrana interfiriendo en la unión de las partículas virales al mismo bloqueando su entrada a las células diana. En este sentido, sería de gran interés establecer la asociación ente la concentración de sACE2 y los diferentes estados clínicos de la enfermedad COVID-19, además de su relación con la fase de recuperación tras la infección viral.

Una concentración basal baja de sACE2 podría predisponer a una peor evolución de la enfermedad COVID-19, posiblemente debido a la relación directa con el SARS-CoV-2 y por

su papel como regulador del SRAA, como se ha visto en otros virus similares (SARS-CoV)(87). Sumado a ello, la presencia del virus produce una disminución de la ACE2, que está insertado en la membrana, provocando la menor presencia de este en el ambiente tisular. Como consecuencia a esto, deja de ejercer su función reguladora del SRAA, ocasionando que se incremente la concentración local de Ang-II, debido a que no es metabolizada a Ang-(1-7), siendo este un metabolito con efecto vasodilatador y antiinflamatorio. Probablemente, el incremento de la Ang-II tenga influencia sobre el daño agudo y los procesos de fibrosis que ocasiona el SARS-CoV-2 sobre el tejido pulmonar(88).

Los receptores solubles son comunes en el sistema inmunitario, cuando ocurre un proceso inflamatorio que desencadena una activación de los linfocitos, se produce la escisión de los receptores de membrana en su forma soluble, ejemplos de ello son: la interleucina 2 y el TNF(89,90). Como estos, se pueden ver otros ejemplos en la literatura como el receptor soluble del activador del plasminógeno uroquinasa que se ha estudiado como marcador pronóstico de la COVID-19(91). En el caso que nos ocupa, la forma soluble de ACE2, sACE2, se origina a través de la ADAM-17, estimulada por la Ang-II, como se ha comentado anteriormente(92).

El riesgo o el beneficio de la presencia de sACE2 en el contexto de la infección por SARS-CoV-2 es controvertido. Swärd et al.(93), propusieron que concentraciones elevadas de sACE2 reflejan una alta concentración de ACE2 y probablemente una mayor escisión de ACE2 a través de ADAM-17 y, por tanto, podría tener valor como indicador de riesgo de infección grave por SARS-CoV-2. En cambio, Leow(94), describe los potenciales beneficios que tendrían las concentraciones elevadas de sACE2, ya que este podría mantener la afinidad y unirse al SARS-CoV-2 a través de proteína *spike* sin mediar la entrada del virus en la célula. Por otro lado, el estudio de Yeung et al.(52), indica que la sACE2 podría unirse con la vasopresina y la proteína *spike*, formando un complejo, internalizándose en las células mediante endocitosis al producirse la unión con receptores de vasopresina 1B presente en las células renales. Del mismo modo, también indican que sACE2 podría unirse a la proteína *spike* de SARS-CoV-2 y promover la endocitosis del virus mediante la interacción con AT<sub>1</sub>R. Este estudio *in vitro*, realizado a nivel de líneas celulares modificadas sugiere que podría haber una relación entre las concentraciones elevadas de sACE2 en el tejido y la pérdida de protección frente a la activación del SRAA tisular, debido a una disminución de la ACE2, aunque se necesitan más estudios para aclarar qué concentración de ACE2 y por tanto de



sACE2 sería necesaria para que ocurra la endocitosis. Por otro lado, Cocozza et al.(95), en su estudio utiliza vesículas extracelulares que contienen ACE2, estas fueron capaces de bloquear la infección de manera más eficiente que con sACE2, por lo que, aunque sACE2 conserve afinidad por la proteína *spike*, la eficiencia con la que ocurría la unión sería menor que con ACE2, ya que como hemos comentado anteriormente se necesitan otras proteínas para la internalización viral como la TMPRSS2.

Hay otros estudios en los que, utilizando modelos *in vitro*, se ha estudiado la *recombinant human* sACE2 (rhsACE2) para inhibir la infección y entrada celular por SARS-CoV-2. En el estudio de Zoufaly et al.(96), se indica que el tratamiento con rhsACE2, tiene beneficios hemodinámicos en pacientes COVID-19 con hipertensión arterial pulmonar. Por otro lado, el estudio de Monteil et al.(34), demuestran que la rhsACE2 puede bloquear la infección por SARS-CoV-2 actuando como un agente neutralizante, aunque la efectividad de esta neutralización fue dependiente de la cantidad inicial de inóculo viral y de la dosis de rhsACE2. Por ello, la terapia basada en sACE2 es una estrategia que podría ser útil en la prevención y tratamiento de infecciones por SARS-CoV-2, aplicable a diferentes variantes de este virus y otros coronavirus zoonóticos que tengan ACE2 como su receptor celular.

Lo que sí que parece claro es que se hace necesario más investigaciones, sobre todo en tejido pulmonar donde ocurre la infección primaria, que permitan aclarar la relación y las implicaciones de la interacción de sACE2 con múltiples proteínas a nivel de todo el organismo, para así poder establecer la implicación de este receptor soluble en el SRAA y en la infección mediada por SARS-CoV-2 u otros coronavirus.

En el estudio de la progresión de las enfermedades sistémicas se hace necesario incluir marcadores de inflamación y de daño tisular. En la actualidad, existen gran variedad de marcadores bioquímicos de inflamación y daño tisular asociados con el pronóstico de SARS-CoV-2, en función de los aspectos más específicos que se deseen caracterizar(97). Los marcadores bioquímicos de activación del sistema inmune, como los mediadores de citoquinas potenciadoras de la inflamación, como la IL-6, y proteínas con diversas funciones que pueden ser activadas en estados proinflamatorios (la PCR, el factor 15 de crecimiento/diferenciación (GDF-15) y la forma soluble de *Fms-like tyrosine kinase-1* (sFlt-1)), podrían contribuir a la identificación de los pacientes COVID-19 más graves. La IL-6 y la

PCR son conocidas por su asociación con los procesos inflamatorios en la infección por SARS-CoV-2 grave(67,94,98–101). Respecto a otros marcadores bioquímicos que podrían ser interesantes en la infección causada por SARS-CoV-2 están el GDF-15 y el sFlt-1, como indicadores de daño isquémico y endotelial(102–104).

El GDF-15 es una proteína de la superfamilia de las citoquinas *transforming growth factor beta* (TGF- $\beta$ ), expresada por diferentes tipos celulares, entre ellas las células cardíacas. Su concentración se ve aumentada en la ECV en respuesta a hipoxia, inflamación, lesión y remodelado tisular. Además, es un marcador que refleja una situación de gravedad, ante una agudización en pacientes con Síndrome Coronario Agudo (SCA) e Insuficiencia Cardíaca (IC)(105–107). En enfermedades como la COVID-19, el GDF-15 aumenta como respuesta al daño tisular y parece ser un buen predictor de un peor desenlace en pacientes en estado crítico con COVID-19(108). En el estudio de Babalghith et al.(109), analizan el papel de GDF-15 en la COVID-19, debido a que juega un papel esencial en el crecimiento celular, la apoptosis y la activación de la inflamación; posiblemente, el aumento de la concentración de GDF-15 en pacientes COVID-19 sea un mecanismo compensatorio antiinflamatorio para estabilizar y contener la hiperinflamación y la respuesta inmune exagerada que se genera en la COVID-19 grave.

Por otro lado, la sFlt-1 es una proteína antiangiogénica, también conocida como variante soluble del receptor 1 del *vascular endothelial growth factor* (VEGF), que se correlaciona con la disfunción cardíaca y de otros órganos a través del daño endotelial(110). Una de las utilidades de este marcador de daño endotelial es en el diagnóstico de la preeclampsia y la sepsis(110,111). Respecto a la COVID-19, las comorbilidades más comunes y con un impacto significativo en la supervivencia son: la HTA, la diabetes mellitus (DM) y la OBE; y estas, están caracterizadas por una disfunción endotelial crónica(78,83). En el estudio de Negro et al.(112), llegan a la conclusión de que la sFlt-1 podría ser una herramienta fiable para monitorizar la disfunción endotelial en pacientes con COVID-19; el aumento de sus concentraciones podría indicar a los clínicos que sería necesario realizar cambios en el tratamiento de los pacientes para aumentar la probabilidad de su supervivencia.

Los factores de riesgo implicados en el desarrollo de una enfermedad más grave por la infección SARS-CoV-2 son el ser hombre, la edad, la HTA, la OBE, la dislipemia (DIS), y la DM(82,113–116). Esto podría deberse en parte a que todas ellas están correlacionadas de forma negativa con la actividad de ACE2; la infección viral podría contribuir al desarrollo de arterioesclerosis y, por tanto, contribuiría en el deterioro la ECV en los pacientes de riesgo(117,118).

Respecto al sexo, se ha visto que las hormonas esteroideas participan en la expresión y actividad de ACE2, los andrógenos de forma inhibidora y los estrógenos de forma activadora, por lo que el sexo, podría influir en una mayor probabilidad de desarrollar una COVID-19 más grave(38,119). Además, se debe considerar al correceptor TMPRSS2, esta serina proteasa cuya acción está regulada por andrógenos, podría marcar las diferencias encontradas entre hombres y mujeres. Algunos artículos, indican que los hombres presentarían una mayor predisposición a la infección por SARS-CoV-2 y a desarrollar una enfermedad más grave que las mujeres(36,38,120).

En cuanto a la edad, se evidencia que la presencia de ACE2 en los tejidos disminuye en ancianos, por ello, podría situarlos en un riesgo mayor de enfermedad grave, además de las comorbilidades que suelen tener este grupo de pacientes. En general, se han encontrado concentraciones más elevadas en niños que en adultos(121), y esto podría estar relacionado con el hecho de que los pacientes pediátricos presentan un curso de la COVID-19 más leve que los adultos y que raramente tienen un mal desenlace, como se indica la revisión sistemática llevada a cabo por Ludvigsson(122).

Estados patológicos, tal como el fallo cardiaco, la HTA, la DM y la OBE, podrían modificar las concentraciones de ACE2(46). En el estudio de Zhou et al.(83), en el que tenían 813 adultos hospitalizados por COVID-19, la comorbilidad más común fue la HTA seguida de la DM. Esto también es apoyado por otros artículos como el de Guan et al.(123), en su estudio de 1099 pacientes, en los que la HTA y la DM estaban más representadas en los pacientes con una enfermedad más grave.

Respecto a la relación de la COVID-19 con la OBE y la DM, podrían ser comorbilidades que facilitarían el desarrollo de un curso grave de la enfermedad. Ambas entidades, predisponen a los individuos a una respuesta proinflamatoria excesiva, a resistencia a la insulina y a una reducción de la reparación vascular, lo que podría asociarse a un mayor riesgo de morbimortalidad en la COVID-19(124). Se ha encontrado que tanto las células de los

islotes pancreáticos como los adipocitos podrían servir como sitio para la replicación del SARS-CoV-2(125). Si esto es así, la infección viral de los adipocitos induciría a la desregulación de la secreción de citoquinas del tejido adiposo y a la resistencia a la insulina y esto podría exacerbar la gravedad de la COVID-19(126).

Así, teniendo en cuenta las comorbilidades, los marcadores bioquímicos GDF-15 y sFlt-1, junto con el sACE2, podrían dar un marco adecuado de la situación del paciente en los casos más graves.

## **2. Hipótesis y objetivos**

Existe una necesidad clínica no cubierta de predecir mejor la evolución de la COVID-19 en pacientes con infección por SARS-CoV-2 para poder aportar valor en la evaluación de los pacientes y garantizar un tratamiento oportuno. Aunque se sabe que la sACE2 interviene en la fisiopatología de la COVID-19, este marcador no ha sido investigado a fondo como un marcador bioquímico de la enfermedad.

### **2.1. Hipótesis y finalidad del estudio**

En este estudio se parte de la hipótesis de que la concentración de sACE2 está relacionada con la infección por SARS-CoV-2 y el estado clínico del paciente durante la enfermedad COVID-19. De forma que la concentración de sACE2 puede ser útil para el pronóstico de la gravedad y desenlace de la infección, así como la probabilidad de que sucedan complicaciones posteriores a la infección, tanto de forma independiente como junto a otros marcadores bioquímicos como el GDF-15 y el sFlt-1.

### **2.2. Objetivo principal**

Dado que la sACE2 es un nuevo marcador bioquímico, en este proyecto de tesis doctoral se ha pretendido evaluar su posible valor pronóstico, apoyándonos para ello en otros marcadores bioquímicos conocidos y bien caracterizados que están implicados en procesos variados de inflamación y daño tisular (PCR, GDF-15, IL-6 y sFlt-1). Esta evaluación se realizará mediante el estudio de pacientes con y sin infección por SARS-CoV-2 que presentaron diferentes estados clínicos, y también se estudiará una parte de los pacientes en los que se realizó seguimiento al año de la resolución de la infección por SARS-CoV-2, con el fin de valorar la evolución de estos marcadores en dicho periodo temporal.

El objetivo principal de este proyecto es demostrar la hipótesis de que la concentración de sACE2 está relacionada con la infección por SARS-CoV-2 y el estado clínico del paciente durante la enfermedad COVID-19. Los resultados esperados de este estudio es intentar poder establecer si la concentración de sACE2 puede presentar utilidad en el pronóstico de la gravedad y desenlace de la infección, así como la probabilidad de que sucedan complicaciones posteriores a la infección, tanto de forma independiente como junto a otros marcadores bioquímicos como el GDF-15 y el sFlt-1. Además, debido a la gran relación que

tiene la ACE2 con la regulación del SRAA, el aumento del conocimiento sobre la sACE2 derivado del presente trabajo podría utilizarse en otras enfermedades no implicadas directamente en la COVID-19, pero sí muy prevalentes en la población, como la enfermedad pulmonar crónica y la HTA.

Con respecto a la posible relación del polimorfismo rs2106809 (T>C) de *ACE2*, en esta tesis doctoral se pretende demostrar la asociación entre este polimorfismo y la gravedad de la COVID-19. En el mismo sentido establecer si la presencia del alelo C puede ser útil para establecer o predecir un buen pronóstico de la infección y una menor probabilidad de desarrollar complicaciones asociadas a la enfermedad. Además, resultará sumamente beneficioso poder definir la relación con la concentración del marcador bioquímico en estudio, el sACE2.

En consecuencia, la comprensión de este polimorfismo y su relación con la COVID-19 puede ayudar en la toma de decisiones clínicas que resulten en una mejora de la salud de los pacientes.

### **2.3. Objetivos específicos y aplicaciones prácticas**

Los objetivos específicos se enumeran a continuación:

1. La medida de la concentración de sACE2 en plasma podría estar asociada con la severidad de la enfermedad COVID-19.
  - 1.1. Realizar la medida de la concentración de sACE2 plasmática en pacientes infectados por el virus SARS-CoV-2 en diferentes estados clínicos y momentos de la infección.
  - 1.2. Realizar el cálculo de valores discriminantes para la concentración de sACE2 que podrían ser utilizados como marcadores pronósticos de la enfermedad COVID-19.
  
2. Establecer si la monitorización de la concentración de sACE2 podrían ser útil en la evaluación, gravedad y pronóstico del paciente con el apoyo de la medida del GDF-15 y sFlt-1 en plasma, como marcadores de isquemia y daño endotelial, respectivamente.

3. Realizar el seguimiento de la concentración de sACE2 en pacientes infectados por SARS-CoV-2 que cursen una enfermedad grave en el inicio del ingreso, al alta hospitalaria y al año de la resolución de la enfermedad. El cambio en las concentraciones de sACE2 podría ser indicativo de buen pronóstico.
  
4. Establecer si el polimorfismo rs2106809 del gen *ACE2* podría estar relacionado con la presencia de la enfermedad COVID-19.

## 3. Metodología y desarrollo de la investigación

### 3.1. Diseño del estudio

#### 3.1.1. Metodología empleada

Los marcadores de bioquímica general utilizados en este estudio fueron: alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), bilirrubina total (BiliT), colesterol total (CoIT), creatinina (Crea), ferritina, fosfatasa alcalina (ALP) gamma-glutamilttransferasa (GGT), glucosa (Glc), hemoglobina (Hb), plaquetas (PLT), proteína C reactiva (PCR), recuento de hematíes (Hem), recuento de leucocitos (Leucos), recuento de linfocitos (Linfos), tasa de filtración glomerular (TFG) triglicéridos (TG) y urea. Su medida se realiza mediante la tecnología de espectrofotometría UV-VIS e inmunoturbidimetría (ferritina y PCR) siguiendo las instrucciones del fabricante en el analizador AU5800 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). El resto de marcadores bioquímicos GDF-15, IL-6 y sFlt-1 en plasma fueron medidos usando los reactivos de Elecsys® mediante la tecnología de inmunoensayo electroquimioluminiscente y de acuerdo a las instrucciones del fabricante en el analizador Cobas 8000, Roche Diagnostics International Ltd. (Rotkreuz, Suiza). En la medida de sACE2 en plasma se utilizó un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) de RayBiotech (Atlanta, GA, USA) acoplado al analizador Triturus, Grifols Diagnostic Solution Inc., (Emeryville, CA, USA). Los materiales de calibración y control fueron aquellos proporcionados por los mismos fabricantes.

Para la medida de los marcadores de coagulación: dímero D (DD), tiempo de protrombina (TP), tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPA) y fibrinógeno (FIB), se utilizó el analizador ACL TOP 550 de Werfen (L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, España) mediante turbidimetría (detección mediante espectrofotometría del tiempo que tarda en generarse el coágulo) e inmunoturbidimetría (solo para el DD).

Para el estudio del polimorfismo de ACE2 rs2106809 el principio de medida utilizado es el genotipado alelo-específico con sondas específicas de *quantitative polymerase chain reaction* (qPCR) y análisis de curvas de fusión (*Melting*) en un termociclador LightCycler 480, Roche Diagnostics International Ltd. (Rotkreuz, Suiza). Dado que el gen de ACE2 se encuentra en el cromosoma X, los posibles genotipos para hombres son C o T, ya que son hemicigotos para este cromosoma. Las mujeres pueden presentar dos alelos, uno por cada cromosoma X, su genotipo puede ser: CC, CT o TT.



En el estudio de la presencia del virus SARS-CoV-2, se realizó mediante RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*) obtenida con un escobillón nasofaríngeo en la plataforma analítica Cobas 6800, Roche Diagnostics International Ltd. (Rotkreuz, Suiza).

Para finalizar, fueron recogidas diferentes variables de la historia clínica del paciente, que podrían estar relacionadas con la COVID-19: diabetes mellitus tipo 2 (DM2), dislipemia (DIS), enfermedad hepática crónica (EHC), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad renal crónica (ERC), hipertensión arterial (HTA), obesidad (OBE).

### *3.1.2. Almacenamiento de las muestras*

Se realizaron alícuotas a partir de las muestras primarias y se les dio una nueva codificación para así eliminar la identificación que pudiera hacerlas trazables a individuos concretos (muestreo anonimizado). Los datos fueron almacenados en un base de datos protegida mediante formato electrónico y accesible exclusivamente a los investigadores asociados a este proyecto. Las alícuotas de plasma fueron almacenadas entre 2-8°C durante la semana de análisis. Una vez realizadas todas las medidas, las muestras fueron almacenadas en un banco de sueros a -80°C. En cuanto a las muestras de sangre, se realizó la extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) y también se codificaron de forma que no fueran trazables a individuos concretos. Las alícuotas de ADN fueron conservadas a -20°C.

### *3.1.3. Consideraciones éticas*

La presente investigación se trata de un estudio prospectivo, observacional y unicéntrico realizado en el Hospital Universitari Vall d'Hebron. Este estudio cumple con los principios de declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial y ha recibido la aprobación (referencias: PR [AG] 577/2020 y PR [AG] 487/2021) del Comité Ético de Investigación del Hospital Universitari Vall d'Hebron (Barcelona, Cataluña, España). Todos los datos de los pacientes se trataron conforme con el Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento Europeo sobre la protección de datos. Se concedió por parte del Comité Ético de Investigación la exención del consentimiento informado del paciente debido a la emergencia sanitaria presentada por la pandemia COVID-19.

## 3.2. Cohorte de pacientes

### 3.2.1. Pacientes de las primeras “olas” COVID-19

Se seleccionó una cohorte de pacientes adulta con una edad comprendida entre los 25 y los 90 años que acudieron tanto al Servicio de Urgencias como al ámbito de Atención Primaria del Hospital Universitario de la Vall d’Hebron, en el periodo comprendido entre los meses de marzo y octubre de 2020. A todos los pacientes se les realizó el estudio para la detección del SARS-CoV-2 mediante la prueba RT-PCR, con una muestra obtenida mediante escobillón nasofaríngeo. Los pacientes con cáncer o patologías relacionadas con enfermedades autoinmunes o cardiovasculares, y pacientes con tratamientos inmunosupresores fueron excluidos del estudio. Si se incluyeron las siguientes comorbilidades: HTA, DM2, DIS y OBE. Los pacientes se dividieron en diferentes grupos en función del resultado de estas variables y adaptando la clasificación dada por la OMS(127) a nuestra población de estudio. Los grupos en los que se dividieron a los pacientes fueron:

- Pacientes con un resultado de RT-PCR positiva para SARS-CoV-2 se dividieron en:
  1. Pacientes que acudían a Urgencias, pero no eran ingresados: fueron pacientes que tenían síntomas sugestivos de infección por SARS-CoV-2 pero no necesitaron ser ingresados en el hospital debido a una sintomatología leve. Se les recomendó aislamiento domiciliario, aunque alguno de ellos requirió soporte de oxígeno a su llegada a Urgencias.
  2. Pacientes que eran ingresados con una enfermedad moderada: pacientes que fueron hospitalizados a causa de presentar síntomas sugestivos de infección por SARS-CoV-2, hallazgos radiológicos compatibles con neumonía por la enfermedad y requirieron soporte ventilatorio no invasivo (cánulas nasales, máscara de oxígeno...).
  3. Pacientes admitidos en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI): fueron pacientes hospitalizados e ingresados en la UCI debido a una neumonía grave como consecuencia de la infección por SARS-CoV-2. La mayoría de estos pacientes requirieron soporte ventilatorio invasivo con intubación ortotraqueal y oxigenación a través de una *Extracorporeal Membrane Oxygen* (ECMO).
  4. Pacientes fallecidos a causa de SARS-CoV-2: todos los pacientes de este grupo tuvieron como primera causa de la muerte la neumonía por SARS-CoV-2 en su certificado de defunción. Estos pacientes requirieron soporte ventilatorio y algunos de ellos el soporte ventilatorio fue no invasivo tras la retirada de cuidados.

- Pacientes con un resultado de RT-PCR negativa para SARS-CoV-2 se dividieron en:
  5. Pacientes que acudían a urgencias, pero no eran ingresados: se trata de pacientes que se presentaron en el Urgencias con síntomas sugestivos de infección por SARS-CoV-2, esta infección fue confirmada con una RT-PCR con resultado positivo. Estos pacientes realizaron aislamiento domiciliario ya que tenían síntomas leves. Las muestras de sangre fueron obtenidas un mes después de la finalización del aislamiento, cuando estos no tenían ningún síntoma.
  6. Pacientes admitidos en la UCI: parte de los pacientes hospitalizados del grupo 3, que fueron admitidos en la UCI debido al empeoramiento de la neumonía por COVID-19, incluso requirieron soporte ventilatorio invasivo en forma de intubación orotraqueal y oxigenación mediante ECMO. Se obtuvieron muestras de sangre cuando estos pacientes fueron dados de alta con un resultado de RT-PCR negativo para SARS-CoV-2.
  7. Pacientes no expuestos a SARS-CoV-2: son personas que acudían al médico de Atención Primaria para un análisis de rutina de su patología crónica de base o para un estudio básico de salud. Todos estos pacientes tuvieron una RT-PCR negativa para SARS-CoV-2 o no tenían historia clínica de infección por SARS-CoV-2.

Grupo	Descripción de los grupos de pacientes	Número de muestras
1	Acudían a Urgencias, pero no eran ingresados	112
2	Ingresados con una enfermedad moderada	219
3	Admitidos en la UCI	192
4	Fallecidos a causa de SARS-CoV-2	68
<b>1-4</b>	<b>Resultado de RT-PCR positiva para SARS-CoV-2</b>	<b>591</b>
5	Acudían a Urgencias, pero no eran ingresados	58
6	Admitidos en la UCI	113
7	No expuestos a SARS-CoV-2	201
<b>5-7</b>	<b>Resultado de RT-PCR negativa para SARS-CoV-2</b>	<b>372</b>
<b>Total</b>		<b>963</b>

Tabla 1. Resumen de la cohorte de muestras.

En la tabla 1, puede verse un resumen de la cohorte de muestras. Fueron recogidas 963 muestras pertenecientes a 850 pacientes; el exceso de 113 muestras pertenece al grupo 6 (Admitidos en UCI con RT-PCR negativa) que son seguimientos de parte del grupo 3 (Admitidos en UCI con RT-PCR positiva).

### *3.2.2. Pacientes en seguimiento 1 año después de la infección*

Para esta fase de la investigación, se realizó el seguimiento de pacientes que se habían curado de la enfermedad COVID-19 de forma grave, con ingreso en la UCI (Grupo 3), la mayoría de los cuales requirieron soporte ventilatorio invasivo con intubación ortotraqueal y algunos de ellos con ECMO. La totalidad de ellos sobrevivieron a la enfermedad al menos un año. En total, se obtuvieron muestras en tres momentos: durante su ingreso en UCI (Grupo 3), al alta (Grupo 6) y al año del alta.

En total, se realizó el seguimiento de 31 pacientes, 18 hombres y 13 mujeres, con una analítica de ingreso en la UCI asociada a una RT-PCR para SARS-CoV-2 en muestra nasofaríngea con resultado positivo (Ingreso), a estos pacientes se les realizó dos analíticas de seguimiento. Una de ellas al alta hospitalaria asociada a una RT-PCR para SARS-CoV-2 con resultado negativo (Alta) y otra al año del alta también asociada a una RT-PCR para SARS-CoV-2 negativa o en su historia clínica no consta una reinfección con COVID-19 (Post-COVID).

### *3.2.3. Pacientes con estudio del polimorfismo rs2106809 de ACE2*

Para el estudio del polimorfismo rs2106809 se seleccionó una cohorte independiente de 50 pacientes que habían cursado la enfermedad de COVID-19 con ingreso en UCI. De estos, 34 necesitaron soporte ventilatorio invasivo y fallecieron 14 como consecuencia del proceso infeccioso llevado a cabo por el SARS-CoV-2.

También se seleccionó otra cohorte de 50 pacientes que acudían a consulta de Atención Primaria para un estudio básico de salud. Se certificó que no había cursado la enfermedad COVID-19 hasta el momento de la toma de muestra con la consulta de la historia clínica y el resultado negativo de la RT-PCR para SARS-CoV-2. Se obtienen de forma aleatoria 25 hombres y 25 mujeres para establecer un grupo control, con la consecuente aprobación del Comité Ético del Hospital Vall d'Hebron, como ha sido indicado en el apartado 4.3.1.

### 3.3. Análisis estadístico

#### 3.3.1. Pacientes de las primeras “olas” COVID-19

El tamaño de la muestra dependió de los registros del hospital existentes y de las muestras disponibles en el banco de suero del Institut de Recerca del Hospital Vall d'Hebron, se realizó una estimación del tipo de paciente que se atendía y los recursos del laboratorio para realizar las medidas que se requerían en el estudio estando sujetos al convenio de investigación establecido con el patrocinador. En base a este se realizó la recogida de muestras y el registro de las variables clínicas.

Las variables clínicas recogidas para el análisis estadístico fueron: edad, sexo, ERC, HTA, presión sanguínea (PS), presión arterial media (PAM), DM2, DIS, índice de masa corporal (IMC) y OBE. Por otro lado, se intentó recoger todas las variables bioquímicas posibles, estas variables fueron: recuento de células sanguíneas (incluyendo PLT) coagulación (TP y DD) pruebas de función hepática (ALT, AST ALP, GGT y BiliT), lípidos (ColT y TG), sustratos (Glc), pruebas de función renal (Crea y Urea), marcadores de inflamación (IL-6 y PCR) marcadores de daño cardíaco (GDF-15), marcadores de daño endotelial (sFlt-1) y la sACE2. Aunque en el análisis de resultados solo se consideraron aquellas que estaban representadas de forma equitativa en todos los grupos.

En el análisis estadístico se realizó el estudio de la normalidad de las variables mediante el test de *Kolmogorov-Smirnov* (con la corrección de *Lilliefors* y gráfico p-normal) obteniendo distribuciones no paramétricas. Para estudiar las posibles diferencias entre las variables demográficas y bioquímicas se realizó mediante el test  $\chi^2$  (sexo masculino, ERC, HTA, DM2, DIS e IMC), análisis de la variancia para un factor (ANOVA *one-way* para la edad y la PAM) y comparación de *Kruskal-Wallis* (ALT, AST, PT, DD). Por otro lado, para el análisis univariante de las diferencias en la mediana entre las concentraciones de los diferentes marcadores bioquímicos en pacientes SARS-CoV-2 positivo y SARS-CoV-2 negativo se utilizó el test *U de Mann-Whitney*.

También se realizó el cálculo de la sensibilidad y especificidad de los marcadores bioquímicos con intervalos de confianza (ICs) del 95%, para evaluar el área bajo la curva (*Area under the curve (AUC)*) se usó el análisis de curvas *receiver operating characteristics* (ROC); para establecer los puntos de corte óptimos se utilizó el índice de Youden. Por último, para el análisis bivariante de los marcadores bioquímicos se realizaron regresiones logísticas, en las que las posibles combinaciones de los marcadores bioquímicos se evaluaron mediante una

validación cruzada (cv) de 10 veces; se muestran las combinaciones que obtuvieron una mejora del AUC de 1 punto porcentual con respecto al mejor marcador bioquímico univariante. Para el cálculo de las diferencias en significación estadística (valor  $p$ ) de los AUC de un marcador bioquímico entre la cohorte completa y la sub-cohorte excluyendo las comorbilidades, se aplicó un procedimiento de *bootstrapping*.

### 3.3.2. Pacientes en seguimiento 1 año después de la infección

Para el análisis estadístico, se realizó el test de *Kolmogorov-Smirnov* (con la corrección de *Lilliefors* y gráfico p-normal) y el test de *Levene*. Dado que las variables recogidas tienen una distribución no paramétrica y la mayoría resultaron heterocedásticas se realiza la comparación de mediante el test *U de Mann-Whitney* (ALT, AST, ALP, BilíT, ColT, Crea, Edad, Ferritina, FIB, GGT, Glc, Hb, Hem, Leucos, Linfos, PLT, PCR, TFG, TG, TP, TTPA y Urea); para las variables de más de dos categorías se utiliza el test de comparación de *Kruskal-Wallis*.

### 3.3.3. Pacientes con estudio del polimorfismo rs2106809 de ACE2

Para el análisis estadístico, se realiza el test de *Kolmogorov-Smirnov* (con la corrección de *Lilliefors* y gráfico p-normal) y el test de *Levene*. Dado que las variables recogidas tienen una distribución no paramétrica y la mayoría resultaron heterocedásticas se realiza la comparación de mediante el test *U de Mann-Whitney* (ALT, AST, ALP, BilíT, Crea, DD, Edad, Ferritina, FIB, GDF-15, GGT, Glc, Hb, Hem, Leucos, Linfos, PLT, sACE2, sFlt-1, TFG, TP, TTPA y Urea); para las variables de más de dos categorías se utiliza el test de comparación de *Kruskal-Wallis*. Por otro lado, las variables clínicas se clasificaron de forma categórica (Sí/No), se realiza su estudio mediante la  $\chi^2$ . Las variables clínicas analizadas fueron: COVID-19, DM2, DIS, EHC, ERC, EPOC, FUM, HTA, OBE, UCI, ECMO, Exitus.

En todos los análisis se estableció la presencia de diferencias estadísticamente significativas con un valor  $p < 0,05$ . Los programas estadísticos utilizados fueron R (v. 3.6.2), *STATA* (v. 15.1) y *GraphPad Prism* (v. 8.0.2).

## 4. Resultados

### 4.1. Pacientes de las primeras “olas” COVID-19

Los resultados obtenidos en estos pacientes han sido publicados en el siguiente artículo científico: [Díaz-Troyano, N.](#); Gabriel-Medina, P.; Weber, S.; Klammer, M.; Barquín DelPino, R.; Castillo-Ribelles, L.; Esteban, A.; Hernández-González, M.; Ferrer-Costa, R.; Pumarola, T. and Rodríguez-Frías, F. **Soluble Angiotensin-Converting Enzyme 2 as a Prognostic Biomarker for Disease Progression in Patients Infected with SARS-CoV-2.** *Diagnostics* 2022, 12(4), 886(128).



Article

## Soluble Angiotensin-Converting Enzyme 2 as a Prognostic Biomarker for Disease Progression in Patients Infected with SARS-CoV-2

Noelia Díaz-Troyano <sup>1,2,3,†</sup>, Pablo Gabriel-Medina <sup>1,2,3,†</sup>, Stephen Weber <sup>4</sup>, Martin Klammer <sup>4</sup>, Raquel Barquín-DelPino <sup>1,2</sup>, Laura Castillo-Ribelles <sup>1,2,3</sup>, Angels Esteban <sup>1</sup>, Manuel Hernández-González <sup>2,3,5</sup>, Roser Ferrer-Costa <sup>1,2</sup>, Tomas Pumarola <sup>2,3,6</sup> and Francisco Rodríguez-Frías <sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup> Biochemistry Department (Clinical Laboratories), Vall d'Hebron University Hospital, 08035 Barcelona, Spain; noelia.diaz@vhebron.net (N.D.-T.); pgabriel@vhebron.net (P.G.-M.); rbarquin@vhebron.net (R.B.-D.); laura.castillo@vhebron.net (L.C.-R.); aesteban@vhebron.net (A.E.); roferrer@vhebron.net (R.F.-C.)

<sup>2</sup> Vall d'Hebron Research Institute, 08035 Barcelona, Spain; manhermandez@vhebron.net (M.H.-G.); tpumarola@vhebron.net (T.P.)

<sup>3</sup> Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain

<sup>4</sup> Roche Diagnostics GmbH, 82377 Penzberg, Germany; stephen.weber@roche.com (S.W.); martin.klammer@roche.com (M.K.)

<sup>5</sup> Immunology Department (Clinical Laboratories), Vall d'Hebron University Hospital, 08035 Barcelona, Spain

<sup>6</sup> Microbiology Department (Clinical Laboratories), Vall d'Hebron University Hospital, 08035 Barcelona, Spain

\* Correspondence: [frarodri@vhebron.net](mailto:frarodri@vhebron.net)

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Díaz-Troyano, N.; Gabriel-Medina, P.; Weber, S.; Klammer, M.; Barquín-DelPino, R.; Castillo-Ribelles, L.; Esteban, A.; Hernández-González, M.; Ferrer-Costa, R.; Pumarola, T.; et al. Soluble Angiotensin-Converting Enzyme 2 as a Prognostic Biomarker for Disease Progression in Patients Infected with SARS-CoV-2. *Diagnostics* 2022, 12, 886. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12040886>

Academic Editor: Laurent Bélec

Received: 8 February 2022

Accepted: 31 March 2022

Published: 1 April 2022

**Abstract:** Predicting disease severity in patients infected with SARS-CoV-2 is difficult. Soluble angiotensin-converting enzyme 2 (sACE2) arises from the shedding of membrane ACE2 (mACE2), which is a receptor for SARS-CoV-2 spike protein. We evaluated the predictive value of sACE2 compared with known biomarkers of inflammation and tissue damage (CRP, GDF-15, IL-6, and sFlt-1) in 850 patients with and without SARS-CoV-2 with different clinical outcomes. For univariate analyses, median differences between biomarker levels were calculated for the following patient groups (classified by clinical outcome): RT-PCR-confirmed SARS-CoV-2 positive (Groups 1–4); RT-PCR-confirmed SARS-CoV-2 negative following previous SARS-CoV-2 infection (Groups 5 and 6); and ‘SARS-CoV-2 unexposed’ patients (Group 7). Median levels of CRP, GDF-15, IL-6, and sFlt-1 were significantly higher in hospitalized patients with SARS-CoV-2 compared with discharged patients (all  $p < 0.001$ ), whereas levels of sACE2 were significantly lower ( $p < 0.001$ ). ROC curve analysis of sACE2 provided cut-offs for predicting hospital admission ( $\leq 0.05$  ng/mL (positive predictive value: 89.1%) and  $\geq 0.42$  ng/mL (negative predictive value: 84.0%)). These findings support further investigation of sACE2, as a single biomarker or as part of a panel, to predict hospitalization risk and disease severity in patients with SARS-CoV-2 infection.

#### 4.1.1. Descripción de variables clínicas y bioquímicas

Se recogieron las siguientes variables clínicas para todos los pacientes: datos demográficos (edad, sexo, PA a e IMC), datos de la historia médica (posibles enfermedades hepáticas, pulmonares, renales...) y perfil bioquímico. Las características de cada grupo pueden verse en la tabla 2, solo se consideraron aquellas variables en la que el número de muestra era lo suficientemente representativo para realizar cálculos estadísticos.

Variable	GRUPO							Valor <i>p</i>
	RT-PCR SARS-CoV-2 Positiva				RT-PCR SARS-CoV-2 Negativa			
	1	2	3	4	5	6	7	
<b>Edad (años), media (SD)</b>	59,1 (20,9)	60,7 (15,4)	55,4 (11,7)	71,6 (11,1)	48,2 (17,3)	55,2 (11,8)	61,4 (15,8)	<b>&lt;0,001</b>
<b>Sexo masculino, n (%)</b>	50 (44,6)	114 (52,1)	116 (60,4)	35 (51,5)	28 (48,3)	69 (61,1)	87 (43,3)	<b>0,006</b>
<b>ERC, n (%)</b>	23 (20,5)	34 (15,6)	25 (13,1)	22 (32,4)	2 (3,6)	12 (10,6)	10 (5,0)	<b>&lt;0,001</b>
<b>PA (mmHg), media (SD)</b>	96,4 (14,2)	93,7 (12,9)	91,7 (13,4)	90,3 (14,9)	84,6 (11,6)	92,7 (12,0)	ND	<b>0,426</b>
<b>HTA, n (%)</b>	53 (47,3)	115 (52,5)	73 (38,0)	52 (76,5)	14 (24,1)	44 (38,9)	81 (40,3)	<b>&lt;0,001</b>
<b>DM2, n (%)</b>	22 (19,6)	55 (25,1)	42 (21,9)	23 (33,8)	9 (15,5)	22 (19,5)	73 (36,3)	<b>0,001</b>
<b>DIS, n (%)</b>	48 (42,9)	108 (49,3)	64 (33,3)	33 (48,5)	16 (27,6)	37 (32,7)	79 (39,3)	<b>0,003</b>
<b>OBE, n (%)</b>	28 (25,0)	79 (36,1)	64 (33,3)	18 (26,5)	5 (8,6)	38 (33,6)	37 (18,4)	<b>&lt;0,001</b>
<b>ALT (UI/L), mediana (IQR)</b>	20,0 (13,0; 30,0)	27,0 (19,0; 50,0)	40,5 (23,0; 65,5)	24,0 (16,0; 36,0)	19,0 (13,0; 28,0)	45,0 (25,0; 60,0)	18,0 (13,0; 24,0)	<b>&lt;0,001</b>
<b>AST (UI/L), mediana (IQR)</b>	26,0 (13,0; 30,0)	38,0 (29,0; 52,0)	49,5 (31,0; 70,5)	40,0 (28,0; 63,5)	22,0 (19,0; 27,0)	28,0 (22,0; 41,0)	21,0 (18,0; 24,0)	<b>&lt;0,001</b>



<b>TP (INR),</b>	1,0	1,1	1,1	1,1	1,0	1,1	0,9	
<b>mediana</b>	(1,0;	(1,0;	(1,0;	(1,0;	(0,9;	(1,0;	(0,9;	<b>&lt;0,001</b>
<b>(IQR)</b>	1,1)	1,1)	1,2)	1,2)	1,1)	1,2)	1,0)	
<b>DD (ng/mL),</b>	297,0	265,0	391,0	543,0	109,0	719,0		
<b>mediana</b>	(155,0;	(171,0;	(225,0;	(216,0;	(50,0;	(307,0;	ND	<b>&lt;0,001</b>
<b>(IQR)</b>	536,0)	432,0)	760,0)	1653,0)	151,0)	1567,0)		

**Tabla 2.** Características demográficas, clínicas y bioquímicas de los grupos de pacientes. ERC: enfermedad renal crónica, definida con una TFG <60 mL/min/m<sup>2</sup>; PA: presión arterial; HTA: hipertensión arterial, definida por una PA >90/140 mmHg. Definidas en la historia clínica, apoyado con las medidas de glucosa (para la diabetes mellitus tipo 2 (DM2)), colesterol y triglicéridos (para la dislipemia (DIS)); OBE: Obesidad definida como un IMC >30 kg/m<sup>2</sup>; n: número de pacientes; SD: desviación estándar; IQR: rango intercuartílico; UI: unidades internacionales; INR: ratio internacional normalizado; ND: No datos: no se recogió esta variable en el grupo no expuesto. Los valores *p* fueron calculados utilizando el test  $\chi^2$  (sexo masculino, ERC, HTA, DM2, DIS e IMC), análisis de la variancia para un factor (ANOVA *one-way* para la edad y la PAM) y comparación de *Kruskal-Wallis* (ALT, AST, PT, DD).

#### 4.1.2. Análisis de las comparaciones entre los distintos grupos de pacientes

En todas las comparaciones entre resultados clínicos, las variables bioquímicas no mostraron diferencias estadísticamente significativas en sus resultados entre la cohorte completa y la cohorte con exclusión de las comorbilidades (HTA, DM2 y DIS). Excepto para el GDF-15, en el que la AUC era significativamente mayor si se excluían las comorbilidades.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos del análisis realizado para cada grupo, así como las comparaciones estadísticas realizadas entre ellos, para las variables bioquímicas: PCR, GDF-15, IL-6, sACE2 y sFlt-1. En la figura 10, 11, 12, 13 y 14, podemos observar cómo varían las medianas de cada uno de estos marcadores en función del grupo de pacientes. La mediana para las concentraciones de PCR, GDF-15, IL-6 y sFlt-1 se incrementan con la severidad de la enfermedad COVID-19; en cambio la mediana de sACE2 decrece con la severidad de la enfermedad.

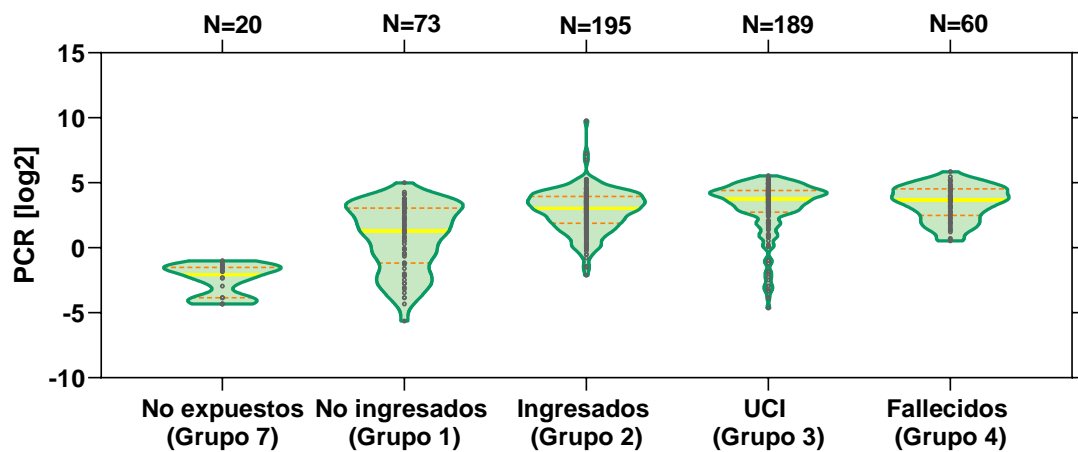


Figura 10. Concentración de PCR en log2 para cada uno de los grupos de pacientes. Línea amarilla gruesa (mediana); línea discontinua naranja (IQR: rango intercuartílico). Excluyendo valores aberrantes.

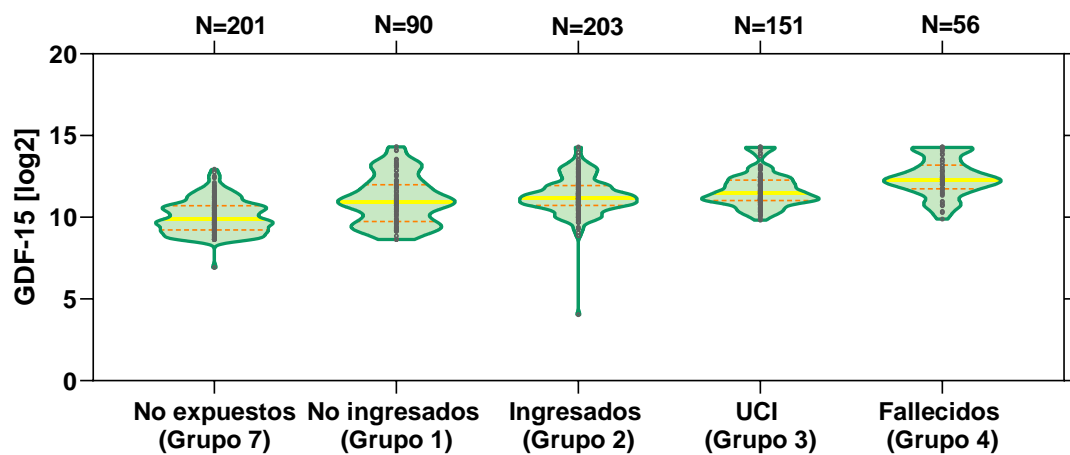


Figura 11. Concentración de GDF-15 en log2 para cada uno de los grupos de pacientes. Línea amarilla gruesa (mediana); línea discontinua naranja (IQR: rango intercuartílico). Excluyendo valores aberrantes.

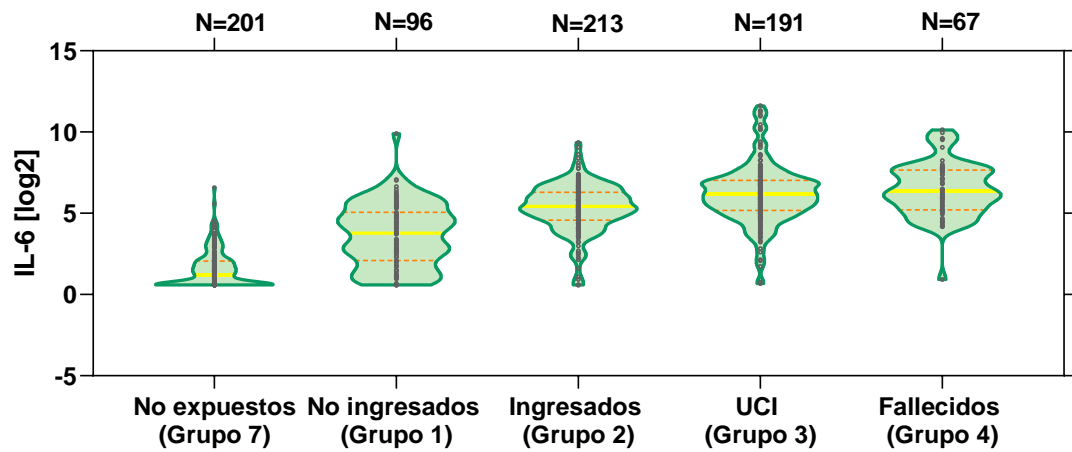


Figura 12. Concentración de IL-6 en log2 para cada uno de los grupos de pacientes. Línea amarilla gruesa (mediana); línea discontinua naranja (IQR: rango intercuartílico). Excluyendo valores aberrantes.

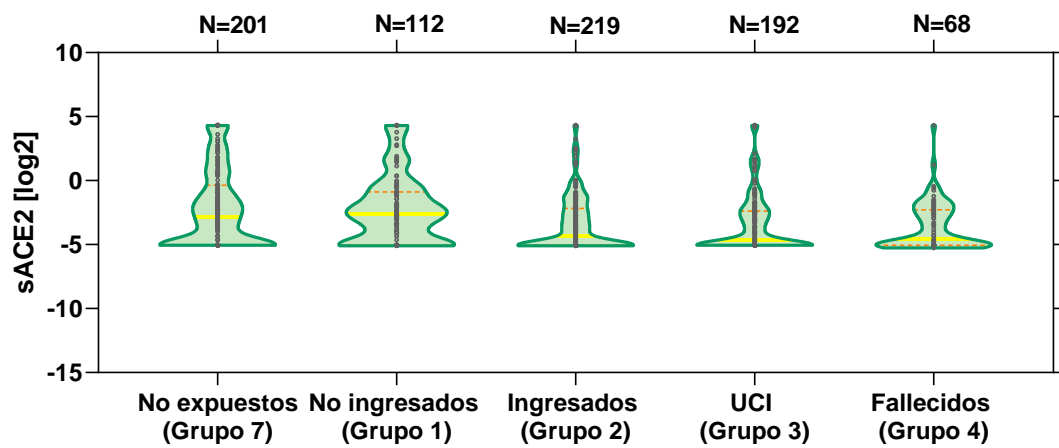


Figura 13. Concentración de sACE2 en log2 para cada uno de los grupos de pacientes. Línea amarilla gruesa (mediana); línea discontinua naranja (IQR: rango intercuartílico). Excluyendo valores aberrantes.

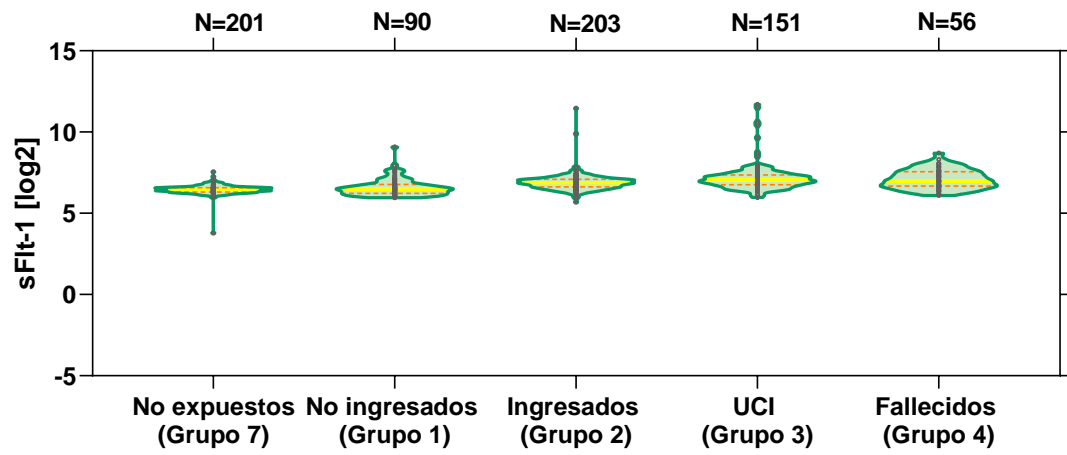


Figura 14. Concentración de sFlt-1 en log<sub>2</sub> para cada uno de los grupos de pacientes. Línea amarilla gruesa (mediana); línea discontinua naranja (IQR: rango intercuartílico). Excluyendo valores aberrantes.

4.1.2.1. Pacientes infectados con SARS-CoV-2 (Grupos 1-4) frente a pacientes no expuestos a SARS-CoV-2 (Grupo 7)

Variable	Número de muestras			Concentración de la variable (log <sub>2</sub> ), mediana (IQR)			Valor <i>p</i>	AUC (95%IC)
	Grupo (1 al 4)	Grupo 7	Total	Grupo (1 al 4)	Grupo 7	Total		
PCR	517	20	537	3,26 (1,85; 4,14)	-2,08 (-3,84; -1,51)	3,19 (1,55; 4,13)	<0,001	0,964 (0,948; 0,980)
GDF-15	500	201	701	11,39 (10,78; 12,25)	9,90 (9,24; 10,70)	11,07 (10,17; 11,94)	<0,001	0,830 (0,797; 0,863)
IL-6	567	201	768	5,56 (4,51; 6,64)	1,21 (0,58; 2,06)	4,90 (2,10; 6,22)	<0,001	0,949 (0,933; 0,64)
sACE2	591	201	792	-4,06 (-5,06; -2,00)	-2,84 (-5,06; -0,40)	-3,64 (-5,06; -1,69)	<0,001	0,585 (0,539; 0,632)
sFlt-1	500	201	701	6,88 (6,56; 7,18)	6,453 (6,31; 6,58)	6,69 (6,44; 7,05)	<0,001	0,797 (0,764; 0,829)

**Tabla 3.** Resumen de las diferencias entre las concentraciones de las variables bioquímicas entre pacientes con infección por SARS-CoV-2 (Grupo 1 al 4) y pacientes no expuestos a SARS-CoV-2 (Grupo 7). AUC: *area under the curve*; IC: intervalo de confianza; IQR: rango intercuartílico; PCR: proteína C reactiva; GDF-15: factor 15 de crecimiento/diferenciación; IL-6: interleucina 6; sACE2: fracción soluble de ACE2; sFlt-1: forma soluble de *fms-like tyrosine kinase-1*.

Como se observa en la tabla 3, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para las variables PCR, GDF-15, IL-6, sACE2 y sFlt-1, todas ellas con un valor  $p < 0,001$  en pacientes infectados con SARS-CoV-2 (Grupo 1 al 4) comparado con pacientes no expuestos a SARS-CoV-2 (Grupo 7). En cuanto al análisis mediante curvas ROC en la tabla puede verse  $AUC > 0,750$  en todos los casos, excepto para la variable sACE2. También se realizó el análisis univariante para el GDF-15 excluyendo comorbilidades, se encontraron diferencias estadísticamente significativas (AUC: 0,894 [0,856: 0,933],  $p = 0,008$ ).

4.1.2.2. Pacientes infectados con SARS-CoV-2 ingresados en hospital independientemente de la gravedad (Grupo 2 al 4) frente a pacientes infectados con SARS-CoV-2 que no fueron ingresados (Grupo 1)

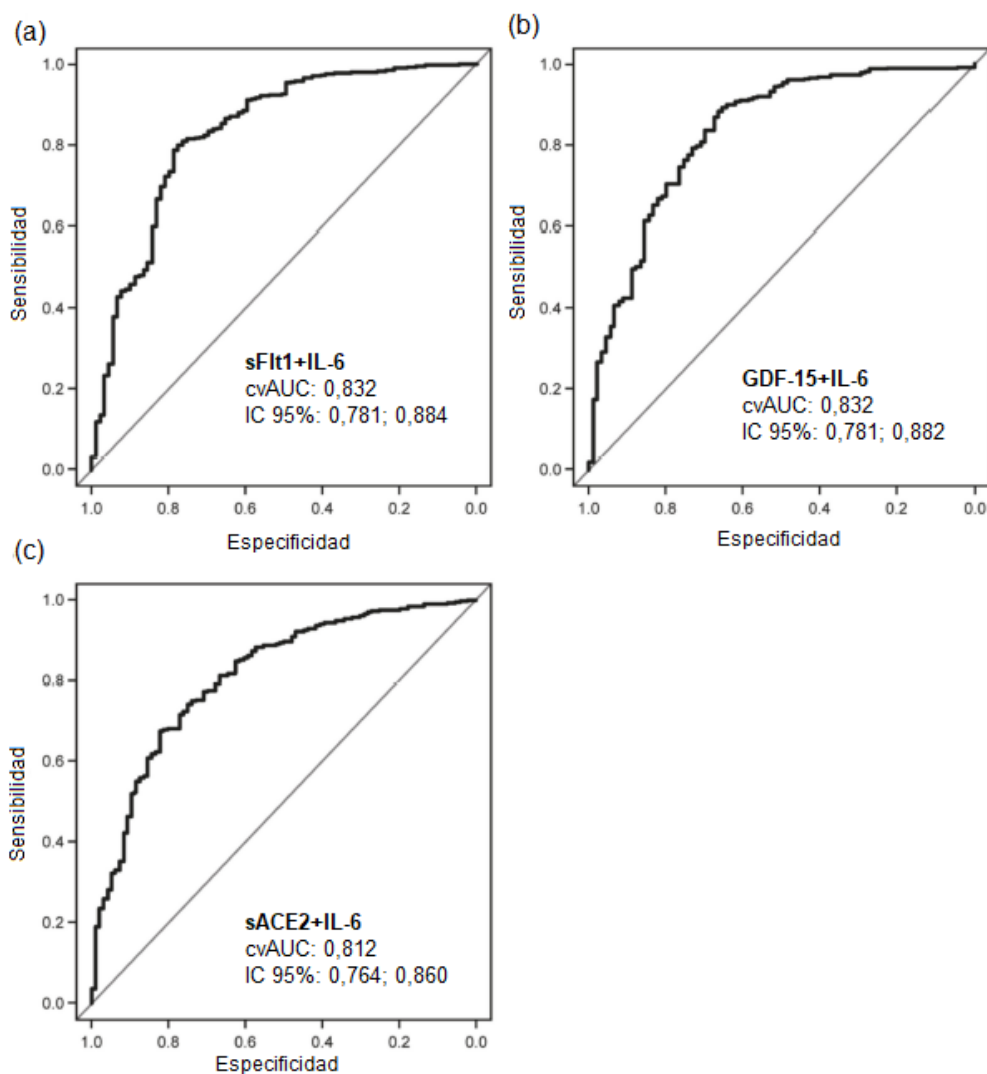
Variable	Número de muestras			Concentración de la variable (log <sub>2</sub> ), mediana (IQR)			Valor <i>p</i>	AUC (95%IC)
	Grupo (2 al 4)	Grupo 1	Total	Grupo (2 al 4)	Grupo 1	Total		
PCR	444	73	517	3,46 (2,21; 4,23)	1,33 (-1,15; 3,03)	3,26 (1,85; 4,14)	<0,001	0,775 (0,718; 0,832)
GDF-15	410	90	500	11,45 (10,90; 12,30)	10,97 (9,76; 12,02)	11,39 (10,78; 12,25)	<0,001	0,625 (0,551; 0,699)
IL-6	471	96	567	5,85 (4,93; 6,78)	3,79 (2,24; 5,12)	5,56 (4,51; 6,64)	<0,001	0,800 (0,750; 0,851)
sACE2	479	112	591	-4,64 (-5,06; -2,32)	-2,64 (-4,73; -0,91)	-4,06 (-5,06; -2,00)	<0,001	0,648 (0,592; 0,704)
sFlt-1	410	90	500	6,96 (6,66; 7,24)	6,50 (6,23; 6,78)	6,88 (6,56; 7,18)	<0,001	0,751 (0,689; 0,813)

Tabla 4. Resumen de las diferencias entre las concentraciones de las variables bioquímicas entre pacientes ingresados en el hospital independientemente de la gravedad (Grupo 2 al 4) y pacientes que no fueron ingresados (Grupo 1). AUC: *area under the curve*; IC: intervalo de confianza; IQR: rango intercuartílico; PCR: proteína C reactiva; GDF-15: factor 15 de crecimiento/diferenciación; IL-6: interleucina 6; sACE2: fracción soluble de ACE2; sFlt-1: forma soluble de *fms-like tyrosine kinase-1*.

En la tabla 4, se evidencia diferencias estadísticamente significativas para las variables PCR, GDF-15, IL-6, sACE2 y sFlt-1, todas ellas con un valor  $p < 0,001$  en pacientes ingresados en el hospital independientemente de la gravedad (Grupo 2 al 4) comparado con pacientes que no fueron ingresados (Grupo 1). En cuanto al análisis de curvas ROC, las AUC fueron más elevadas para la IL-6, seguido de PCR, sFlt-1, sACE2 y GDF-15. También se realizó el análisis univariante para el GDF-15 excluyendo comorbilidades, se encontraron diferencias estadísticamente significativas (AUC: 0,795 [0,696; 0,894],  $p=0,012$ ).

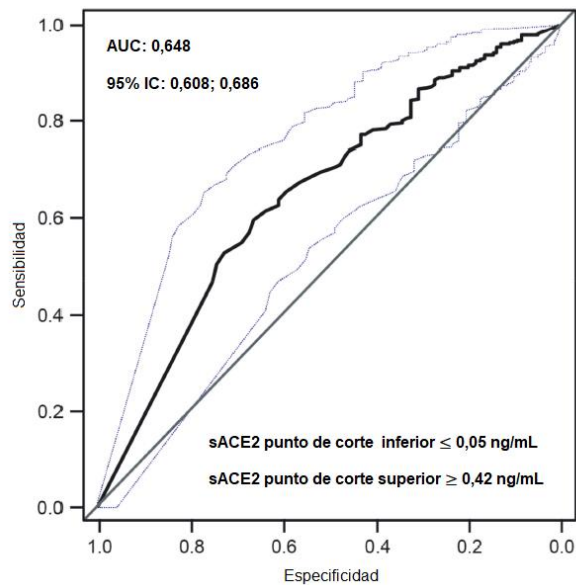
Variable	cvAUC	IC 95%
sFlt-1 + IL-6	0,832	0,781; 0,884
GDF-15 + IL-6	0,832	0,781; 0,882
sACE2 + IL-6	0,812	0,764; 0,860

**Tabla 5.** Resumen del análisis bivalente realizado en pacientes infectados por SARS-CoV-2 que fueron ingresados en el hospital (Grupo 2 al 4) frente a pacientes con infección por SARS-CoV-2 que no fueron ingresados (Grupo 1). cvAUC: validación cruzada AUC. IC: intervalo de confianza.



**Figura 15.** Análisis bivalente realizado en pacientes infectados por SARS-CoV-2 que fueron ingresados en el hospital (Grupo 2 al 4) frente a pacientes con infección por SARS-CoV-2 que no fueron ingresados (Grupo 1). Los datos se observan como curvas ROC para sFlt-1+IL-6 (a); GDF-15+IL-6 (b); sACE2+IL-6 (c).

Respecto al análisis bivariante, en la tabla 5 y en la figura 15 se observa que la combinación de sFlt-1 (validación cruzada (cv)AUC: 0,832), GDF-15 (cvAUC: 0,832) o sACE2 (cvAUC: 0,812) con la IL-6 proporcionó una mejora en el valor de AUC comparado con la IL-6 por sí sola (cvAUC: 0,800) en pacientes con SARS-CoV-2 que fueron ingresados en el hospital (Grupo 2 al 4) frente a los pacientes con SARS-CoV-2 que no fueron ingresados (Grupo 1).



**Figura 16.** Análisis mediante curva ROC, utilizándose dos puntos de corte. Un punto de corte superior y otro inferior para la predicción de ingreso de pacientes con SARS-CoV-2. La línea de puntos azules representa los límites superior e inferior del IC 95% para la AUC.

Por último, se proponen dos puntos de corte para el sACE2 basados en el análisis de curvas ROC (AUC: 0,648 [0,608; 0,686]) para poder predecir el ingreso frente al no ingreso en los pacientes infectados por SARS-CoV-2 (Figura 16). Se considera un punto de corte inferior de  $\leq 0,05$  ng/mL con un valor predictivo positivo (VPP) de 89,1% (IC 95%: 84,9; 92,5) y otro punto de corte superior de  $\geq 0,42$  ng/mL con un valor predictivo negativo (VPN) de 84,0% (IC 95%: 80,4; 87,1).



4.1.2.3. Pacientes infectados con SARS-CoV-2 que fueron admitidos en UCI o fallecidos (Grupo 3 y 4) frente a pacientes infectados con SARS-CoV-2 no ingresados o ingresados por enfermedad moderada (Grupo 1 y 2)

Variable	Número de muestras			Concentración de la variable (log <sub>2</sub> ), mediana (IQR)			Valor <i>p</i>	AUC (95%IC)
	Grupo (3 y 4)	Grupo (1 y 2)	Total	Grupo (3 y 4)	Grupo (1 y 2)	Total		
PCR	249	268	517	3,74 (2,70; 4,42)	2,77 (1,32; 3,71)	3,26 (1,85; 4,14)	<0,001	0,670 (0,623; 0,716)
GDF-15	207	293	500	11,74 (11,09; 12,46)	11,15 (10,54; 11,94)	11,39 (10,78; 12,25)	<0,001	0,650 (0,602; 0,698)
IL-6	258	309	567	6,19 (5,21; 7,10)	5,12 (3,85; 6,05)	5,56 (4,51; 6,64)	<0,001	0,715 (0,673; 0,757)
sACE2	260	331	591	-4,64 (-5,06; -2,40)	-3,64 (-5,06; -1,71)	-4,06 (-5,06; -2,00)	0,015	0,556 (0,511; 0,600)
sFlt-1	207	293	500	7,20 (6,71; 7,38)	6,77 (6,49; 7,05)	6,88 (6,56; 7,18)	<0,001	0,672 (0,624; 0,720)

Tabla 6. Resumen de las diferencias entre las concentraciones de las variables bioquímicas entre pacientes ingresados en UCI o fallecidos (Grupo 3 y 4) y pacientes que ingresados o no ingresados (Grupo 1 y 2). AUC: *area under the curve*; IC: intervalo de confianza; IQR: rango intercuartílico; PCR: proteína C reactiva; GDF-15: factor 15 de crecimiento/diferenciación; IL-6: interleucina 6; sACE2: fracción soluble de ACE2; sFlt-1: forma soluble de *fms-like tyrosine kinase-1*.

Como se observa en la tabla 6, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para las variables PCR, GDF-15, IL-6 y sFlt-1, todas ellas con un valor  $p < 0,001$  y excepto para sACE2 ( $p = 0,015$ ) en pacientes infectados con SARS-CoV-2 que fueron admitidos en UCI o fallecidos (Grupo 3 y 4) comparado con pacientes fueron ingresados o no ingresados (Grupo 1 y 2). En cuanto al análisis de curvas ROC, las AUC fueron discretas para la IL-6, seguido de PCR, sFlt-1, GDF-15 y sACE2. También se realizó el análisis univariante para el GDF-15 excluyendo comorbilidades, se encontraron diferencias estadísticamente significativas (AUC: 0,748 [0,680; 0,816],  $p = 0,022$ ).

4.1.2.4. Pacientes que tuvieron una RT-PCR negativa para SARS-CoV-2, aunque previamente tuvieron una RT-PCR positiva para SARS-CoV-2 (Grupos 5 y 6)

Grupo	Número de muestras	Concentración de sACE2 (ng/mL), mediana (IQR)
Grupo 1	112	0,160 (0,033; 0,538)
Grupo 3	192	0,040 (0,030; 0,190)
Grupo 5	58	0,235 (0,030; 2,370)
Grupo 6	113	0,130 (0,03; 0,385)

**Tabla 7.** Concentraciones de sACE2 para los grupos con RT-PCR para SARS-CoV-2 negativa, aunque previamente tuvieron una RT-PCR positiva para SARS-CoV-2 (Grupos 5 y 6) y para los grupos con RT-PCR positiva no ingresados (Grupo 1) e ingresados en UCI (Grupo 3).

En cuanto a los resultados de la tabla 7, la mediana de la concentración de sACE2 fue similar ( $p=0,273$ ) entre las muestras de pacientes que tuvieron una RT-PCR positiva para SARS-CoV-2 y no fueron ingresados (Grupo 1: 0,160 ng/mL) y las muestras de un grupo de pacientes diferente que recibieron una atención sanitaria similar y además tuvieron una RT-PCR negativa para SARS-CoV-2 (Grupo 5: 0,235 ng/mL). En cambio, la mediana de la concentración de sACE2 fue significativamente elevada ( $p=0,003$ ) en muestras de pacientes que tuvieron una RT-PCR negativa para SARS-CoV-2 y que previamente habían estado ingresados en la UCI por la COVID-19 (Grupo 6: 0,130 ng/mL) cuando se comparó con muestras de estos mismos pacientes cuando estuvieron ingresados en UCI y tenían una RT-PCR positiva para SARS-CoV-2 (Grupo 3: 0,040 ng/mL).

En los pacientes que tuvieron una RT-PCR negativa para SARS-CoV-2 pero que habían cursado la COVID-19, ya que tenía una RT-PCR positiva previa para SARS-CoV-2 (Grupos 5 y 6) se obtuvo diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,049$ ) para la mediana de la concentración de sACE2 de los pacientes no ingresados (Grupo 5: 0,235 ng/mL) comparado con los pacientes ingresados en UCI (Grupo 6: 0,130 ng/mL).

## 4.2. Pacientes en seguimiento 1 año después de la infección

### 4.2.1. Descripción de las variables clínicas y bioquímicas

Variable	Pacientes
Edad (años), media (SD)	58,4 (10,6)
Sexo masculino, n (%)	18 (58,1)
HTA, n (%)	17 (54,8)
ERC, n (%)	9 (29,0)
DM2, n (%)	6 (19,4)
DIS, n (%)	13 (41,9)
OBE, n (%)	9 (29,0)

**Tabla 8.** Variables clínicas de los pacientes. HTA: hipertensión arterial, definida por PA>90/140 mmHg; ERC: enfermedad renal crónica, definida con una TFG<60 mL/min/m<sup>2</sup>; Definidas en la historia clínica, apoyado con las medidas de glucosa (para la diabetes mellitus tipo 2 (DM2)), colesterol y triglicéridos (para la dislipemia (DIS)); OBE: Obesidad definida como un IMC>30 kg/m<sup>2</sup>; n: número de pacientes; SD: desviación estándar.

Variable	Resultado de RT-PCR para SARS-CoV-2			Valor <i>P</i>
	Positivo (Ingreso)	Negativo (Alta)	Negativo (Post-COVID)	
Glc (mg/dL), mediana (IQR)	110,0 (39,0)	93,0 (23,0)	92,5 (25,0)	<b>0,006</b>
ALT (UI/L), mediana (IQR)	33,0 (43,0)	39,0 (60,0)	23,0 (17,0)	<b>0,003</b>
AST (UI/L), mediana (IQR)	54,0 (36,0)	28,0 (26,0)	23,0 (14,0)	<b>&lt;0,001</b>

<b>ALP (UI/L), mediana (IQR)</b>	69,0 (57,0)	103,5 (49,0)	84,0 (42,0)	0,089
<b>GGT (UI/L), mediana (IQR)</b>	86,0 (98,5)	116,0 (172,5)	35,0 (38,0)	<b>&lt;0,001</b>
<b>BiliT (mg/dL), mediana (IQR)</b>	0,64 (0,50)	0,56 (0,29)	0,63 (0,24)	0,827
<b>TFG (mL/min/m<sup>2</sup>), mediana (IQR)</b>	85,0 (33,0)	90 (1,0)	90 (21,0)	<b>0,017</b>
<b>Crea (mg/dL), mediana (IQR)</b>	0,91 (0,64)	0,85 (0,42)	0,85 (0,42)	<b>&lt;0,001</b>
<b>Urea (mg/dL), mediana (IQR)</b>	31,0 (28,0)	38,0 (17,0)	38,0 (17,0)	0,520
<b>ColT (mg/dL), mediana (IQR)</b>	126,0 (48,0)	187,5 (68,5)	197,5 (68,0)	<b>0,008</b>
<b>sACE2 (ng/mL), mediana (IQR)</b>	0,03 (0,05)	0,04 (0,13)	0,11 (0,23)	<b>0,034</b>
<b>Ferritina (ng/mL), mediana (IQR)</b>	841,0 (1118)	402,0 (286,0)	107,0 (127,5)	<b>&lt;0,001</b>
<b>Hb (g/L), mediana (IQR)</b>	13,9 (2,0)	10,6 (1,9)	14,5 (2,1)	<b>&lt;0,001</b>
<b>Hem (10<sup>9</sup>/L), mediana (IQR)</b>	4,78 (0,70)	3,63 (0,72)	4,97 (0,61)	<b>&lt;0,001</b>
<b>Leucos (10<sup>9</sup>/L), mediana (IQR)</b>	7,62 (5,53)	7,81 (6,24)	6,73 (2,81)	0,437

<b>Linfos (10<sup>9</sup>/L), mediana (IQR)</b>	0,80 (0,30)	1,6 (0,90)	2,20 (1,20)	<b>&lt;0,001</b>
<b>PLT (10<sup>9</sup>/L), mediana (IQR)</b>	175,0 (135,0)	366,0 (214,0)	243,0 (54,0)	<b>&lt;0,001</b>
<b>TP (ratio), mediana (IQR)</b>	1,07 (0,20)	1,10 (0,15)	0,95 (0,40)	0,111
<b>TTPA (ratio), mediana (IQR)</b>	0,95 (0,10)	1,05 (0,12)	1,02 (0,23)	<b>0,014</b>
<b>FIB (g/L), mediana (IQR)</b>	5,50 (1,55)	3,97 (1,22)	4,13 (0,75)	<b>&lt;0,001</b>

**Tabla 9.** Concentraciones séricas de los marcadores bioquímicos, de coagulación y de hematología para los grupos RT-PCR con resultados positivo (Ingresado), negativo (Alta y Post-COVID). Glc: glucosa; ALT: alanina aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa; ALP: fosfatasa alcalina. GGT: gamma-glutamyltransferasa. BilT: bilirrubina total; TFG: tasa de filtración glomerular; Crea: creatinina; ColT: colesterol total; sACE2: forma soluble de ACE2; Hem: recuento de hematías; Hb: hemoglobina; Leucos: recuento de leucocitos; Linfos: recuento de linfocitos; PLT: recuento de plaquetas; TP: tiempo de protrombina; TTPA: tiempo de trombolastina parcial activado; FIB: fibrinógeno; SD: desviación estándar. IQR: intervalo intercuartílico.

Las características clínicas de los pacientes pueden verse en la tabla 8 y 9, solo se consideraron aquellas variables en la que el número de datos era representativo para realizar cálculos estadísticos. Respecto a los datos de la tabla 8, se puede observar que hay un 58,1% de hombres y la media de edad de los pacientes es de 58,4 años. Se destaca los porcentajes de HTA, 54,8%, y de DIS 41,9%. Por otro lado, en la tabla 9, se pueden observar que se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de seguimiento RT-PCR para SARS-CoV-2 con resultado positivo (Ingreso), resultado negativo (Alta y Post-COVID) para las siguientes variables Glc, ALT, AST, GGT, TFG, Crea, ColT, sACE2, Ferritina, Hem, Hb, Linfos, PLT, TTPA y FIB.

#### 4.2.2. *Análisis de las comparaciones en función del resultado RT-PCR para el virus SARS-CoV-2*

Se realiza el análisis de las variables cuantitativas estadísticamente significativas, para saber entre que grupo de seguimiento hay diferencias. En las figuras 17 a 31, vistas a continuación, puede observarse la distribución para cada uno de los grupos de las variables estadísticamente significativas.

En la figura 17, podemos ver como la Glc tiene una mediana mayor en los pacientes con resultado positivo en la RT-PCR para SARS-CoV-2 (Ingreso) respecto a los pacientes negativos (Alta y Post-COVID). En las figuras 18 a 20, están representadas la ALT, la AST y la GGT, es decir indica cómo evoluciona la enfermedad hepática en estos pacientes: la AST sigue el mismo patrón que la Glc, en cambio, la ALT y la GGT no muestran diferencias estadísticamente significativas entre el Ingreso y el Alta. En cuanto a la función renal, vistas en las figuras 21 y 22, se observa una alta dispersión de los datos de Crea en los pacientes del grupo Ingreso, siendo el resultado en el Alta y Post-COVID similares para la TFG. En la figura 23, se puede ver que las concentraciones de CoIT son menores en Ingreso, estas concentraciones se recuperan en Alta y Post-COVID, se obtienen diferencias estadísticamente significativas entre el Ingreso y Alta; también entre Ingreso y Post-COVID. Para la concentración de sACE2, figura 24, se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre el Ingreso y el Post-COVID. La concentración de Ferritina, vista en la figura 25, es estadísticamente significativa en todas las posibles comparaciones.

En cuanto a las variables hematológicas (Hb y Hem), vistas en las figuras 26 y 27, se observan diferencias estadísticamente significativas entre Ingreso y el Alta, además de diferencias entre los dos negativos (Alta y Post-COVID). En la figura 28 y 29, se observan diferencias estadísticamente significativas para todas las comparaciones en el recuento de Linfos y PLT. Por último, en las variables de coagulación, vistas en las figuras 30 y 31, se observan diferencias estadísticamente significativas. Para el TTPA se observan entre el Ingreso y el Alta. En cambio, para la concentración de FIB, se observan diferencias entre estos y, además, con el Post-COVID.

Las figuras 17 a 31 se muestran en las siguientes páginas.

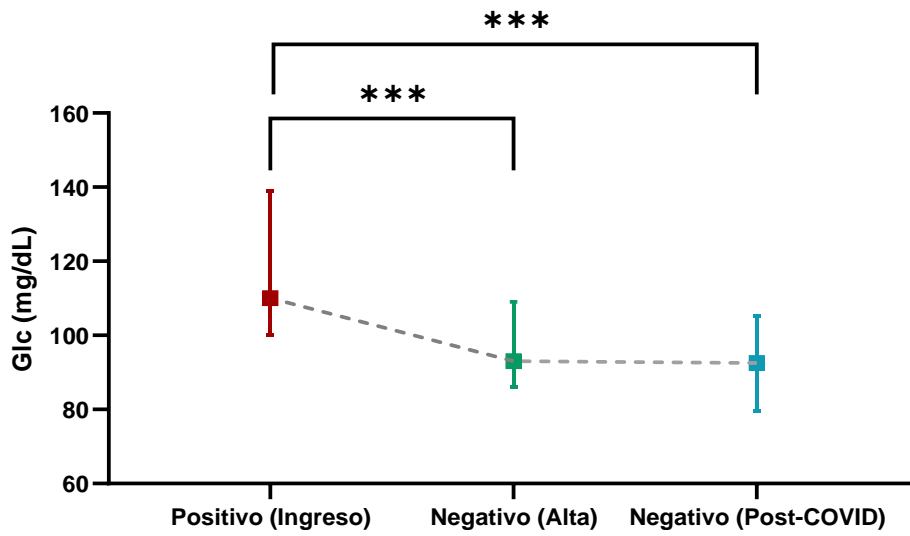


Figura 17. Concentración de Glc (glucosa) en mg/dL. Cuadrados (mediana); límite superior/inferior y bigotes (IQR: rango intercuartílico). Significación estadística  $p < 0,05$

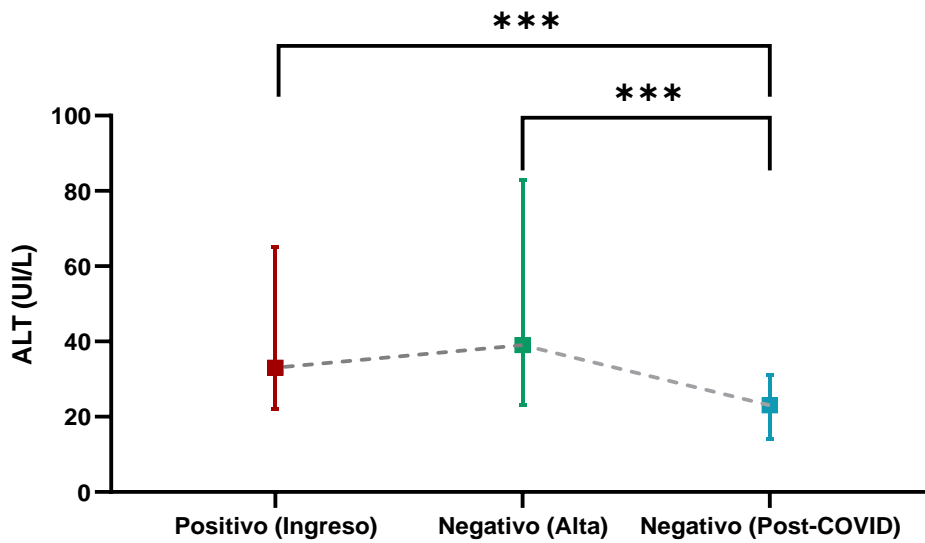


Figura 18. Concentración de ALT (alanina aminotransferasa) en UI/L. Cuadrados (mediana); límite superior/inferior y bigotes (IQR: rango intercuartílico). Significación estadística  $p < 0,05$

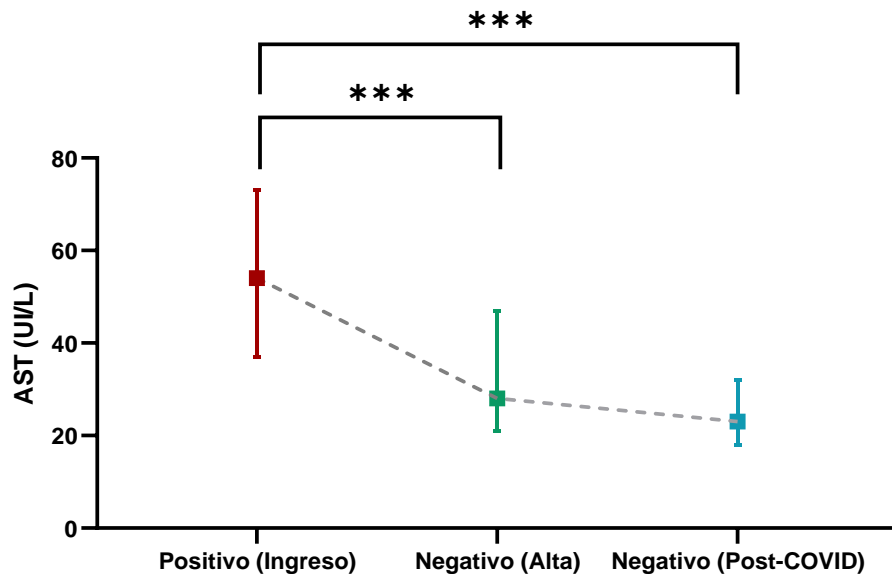


Figura 19. Concentración de AST (aspartato aminotransferasa) en UI/L. Cuadrados (mediana); límite superior/inferior y bigotes (IQR: rango intercuartílico). Significación estadística  $p < 0,05$ .

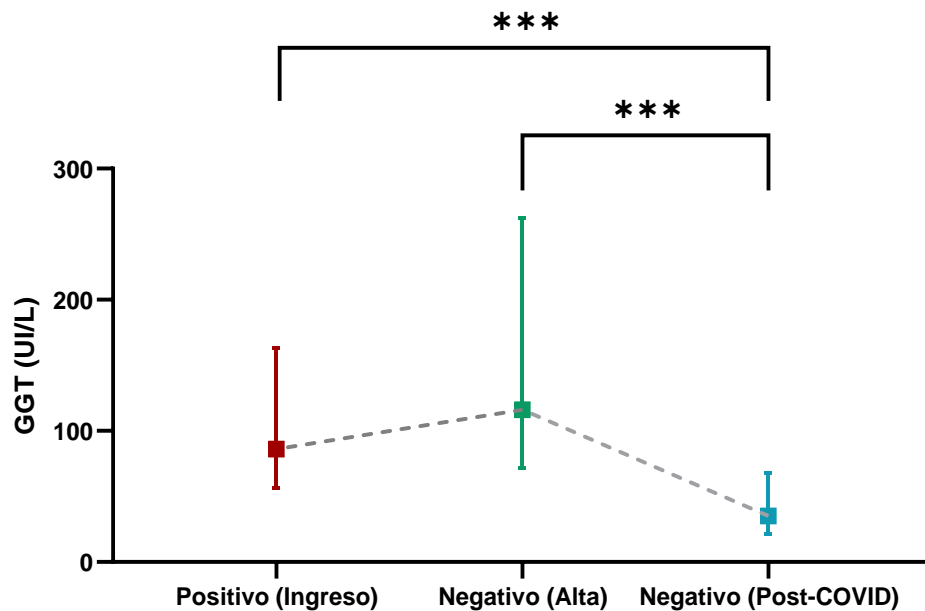


Figura 20. Concentración de GGT (gamma-glutamilttransferasa) en UI/L. Cuadrados (mediana); límite superior/inferior y bigotes (IQR: rango intercuartílico). Significación estadística  $p < 0,05$ .



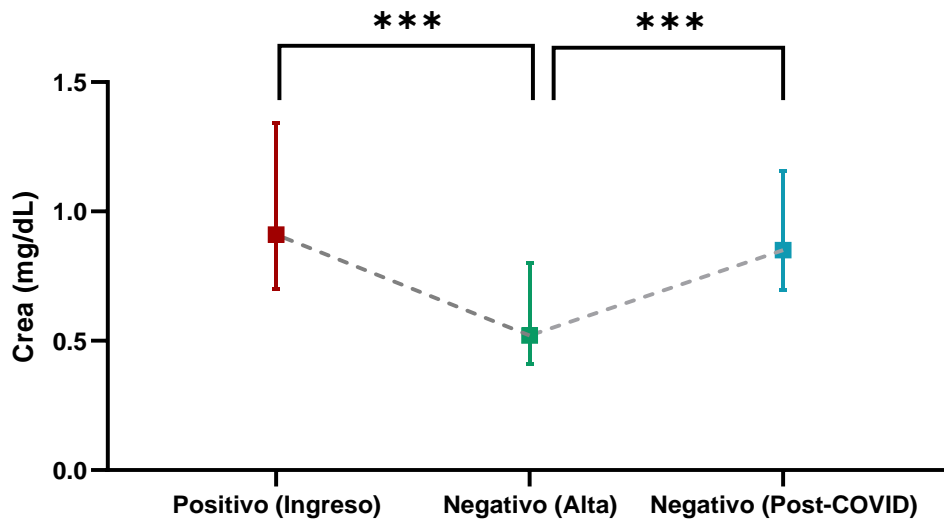


Figura 21. Concentración de Crea (creatinina) en mg/dL. Cuadrados (mediana); límite superior/inferior y bigotes (IQR: rango intercuartílico). Significación estadística  $p < 0,05$ .

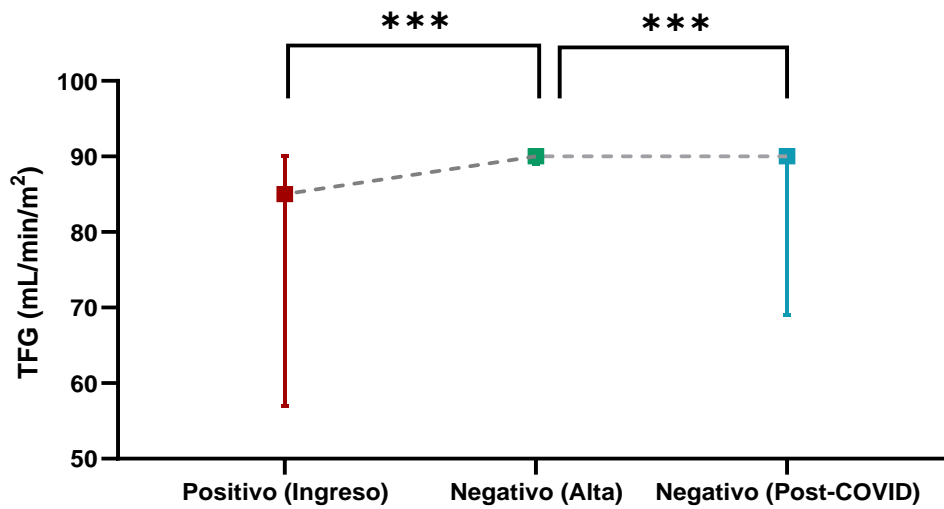


Figura 22. TFG (tasa de filtración glomerular) en mL/min/m². Cuadrados (mediana); límite superior/inferior y bigotes (IQR: rango intercuartílico). Significación estadística  $p < 0,05$ .

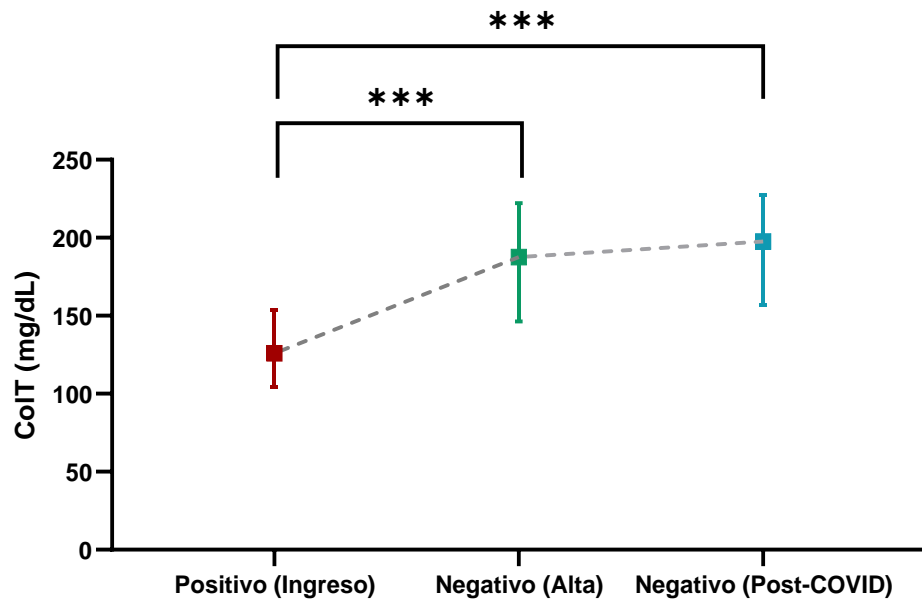


Figura 23. Concentración de CoIT (colesterol total) en mg/dL. Cuadrados (mediana); límite superior/inferior y bigotes (IQR: rango intercuartílico). Significación estadística  $p < 0,05$ .

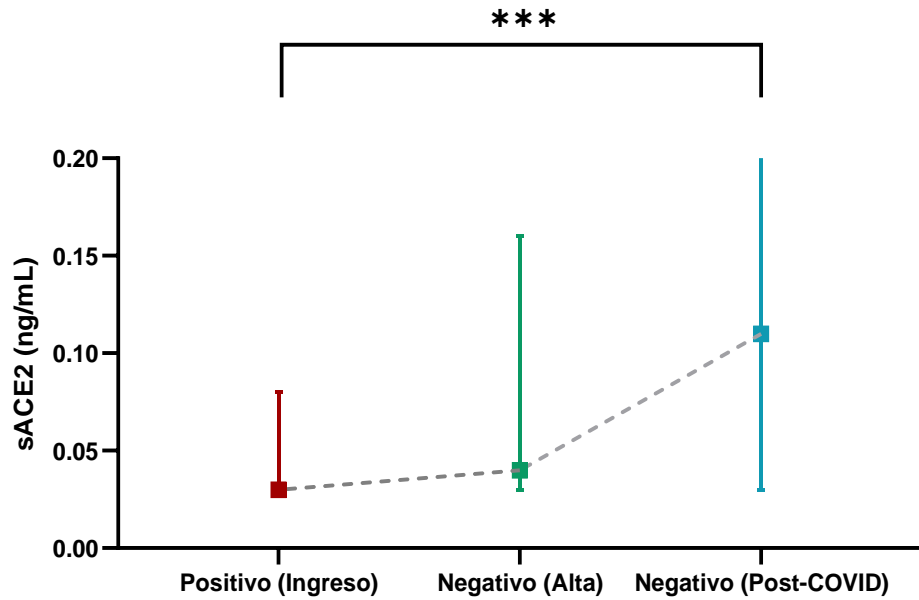


Figura 24. Concentración de sACE2 (forma soluble de ACE2) en ng/mL. Cuadrados (mediana); límite superior/inferior y bigotes (IQR: rango intercuartílico). Se excluye un paciente *outlier* con un sACE2 > 15 ng/mL en todos los estados de la enfermedad. Significación estadística  $p < 0,05$ .

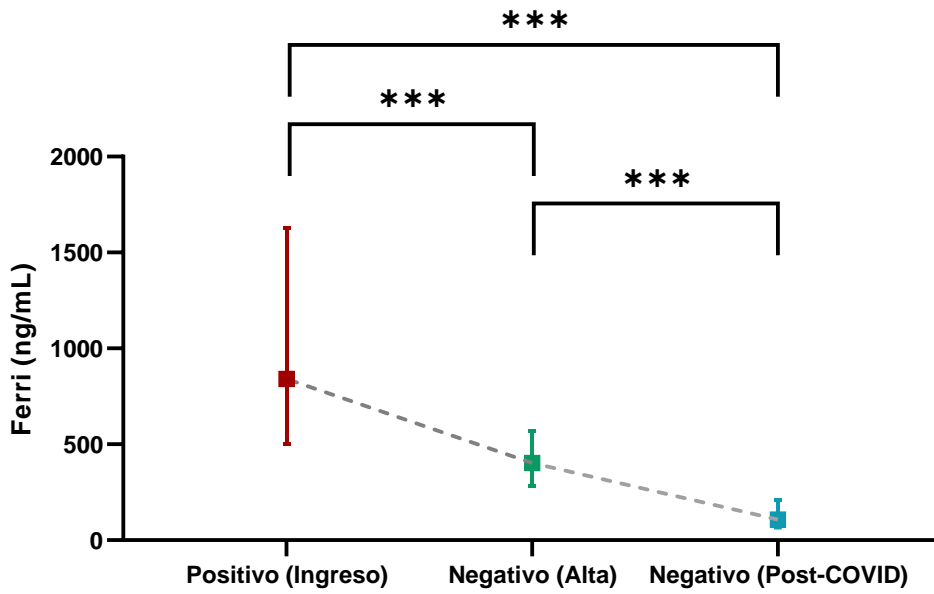


Figura 25. Concentración de Ferritina en ng/mL. Cuadrados (mediana); límite superior/inferior y bigotes (IQR: rango intercuartílico). Significación estadística  $p < 0,05$ .

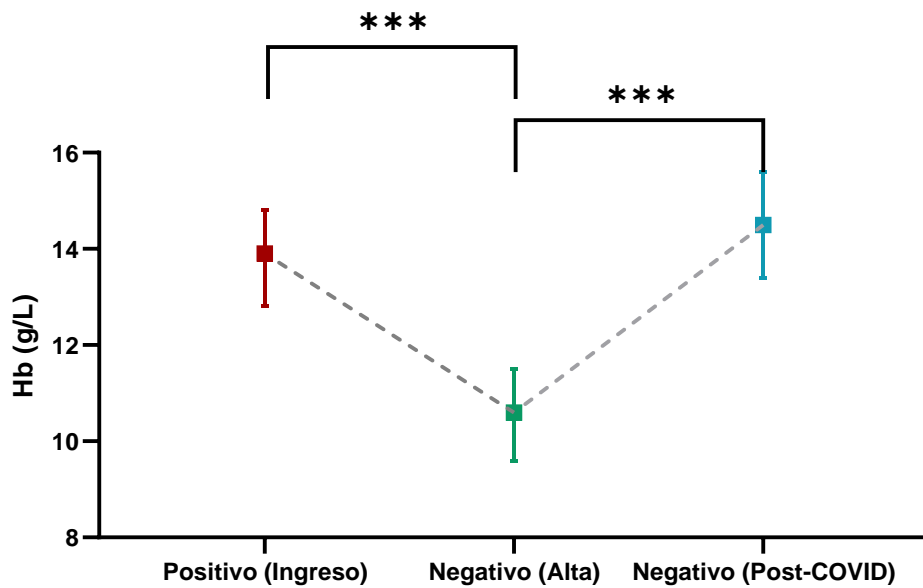


Figura 26. Concentración de Hb (hemoglobina) en g/L. Cuadrados (mediana); límite superior/inferior y bigotes (IQR: rango intercuartílico). Significación estadística  $p < 0,05$ .

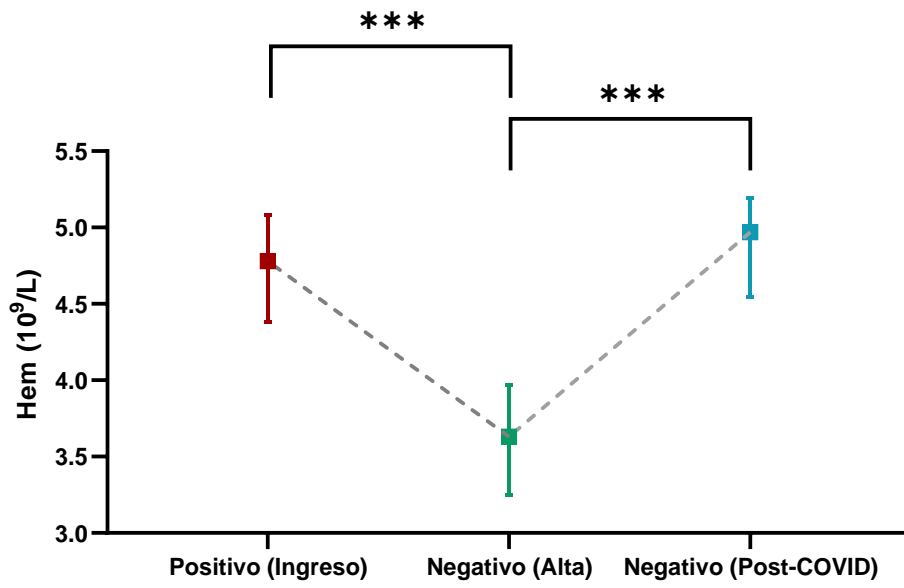


Figura 27. Hem (recuento de hemáties) en 10<sup>9</sup>/L. Cuadrados (mediana); límite superior/inferior y bigotes (IQR: rango intercuartílico). Significación estadística  $p < 0,05$ .

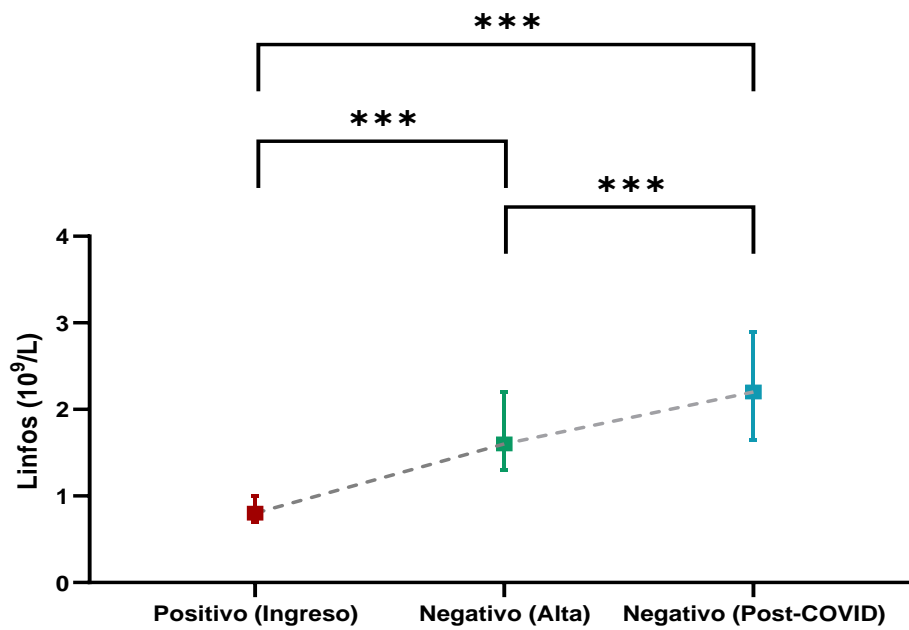


Figura 28. Linfos (recuento de linfocitos) en 10<sup>9</sup>/L. Cuadrados (mediana); límite superior/inferior y bigotes (IQR: rango intercuartílico). Significación estadística  $p < 0,05$ .

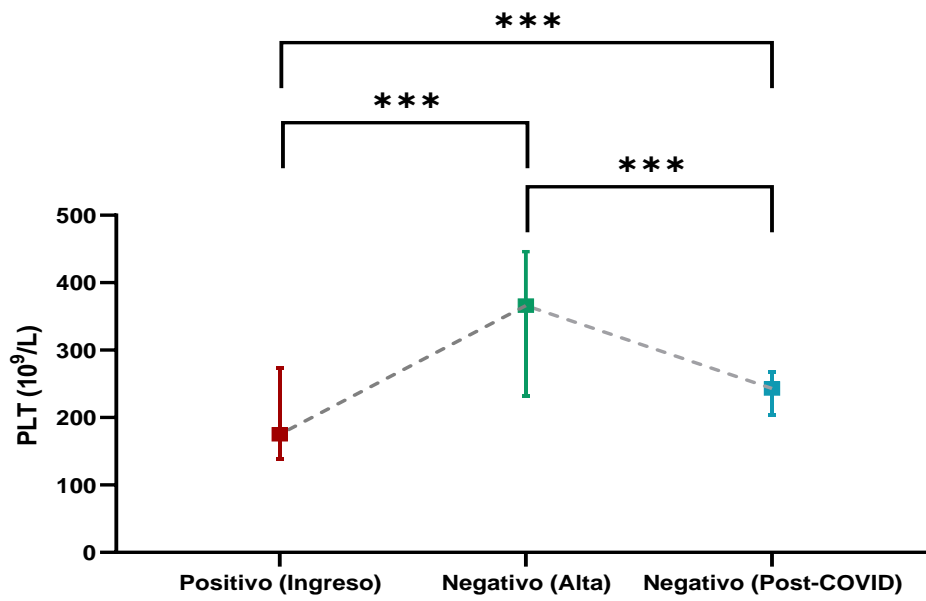


Figura 29. PLT (recuento de plaquetas) en  $10^9/L$ . Cuadrados (mediana); límite superior/inferior y bigotes (IQR: rango intercuartílico). Significación estadística  $p < 0,05$ .

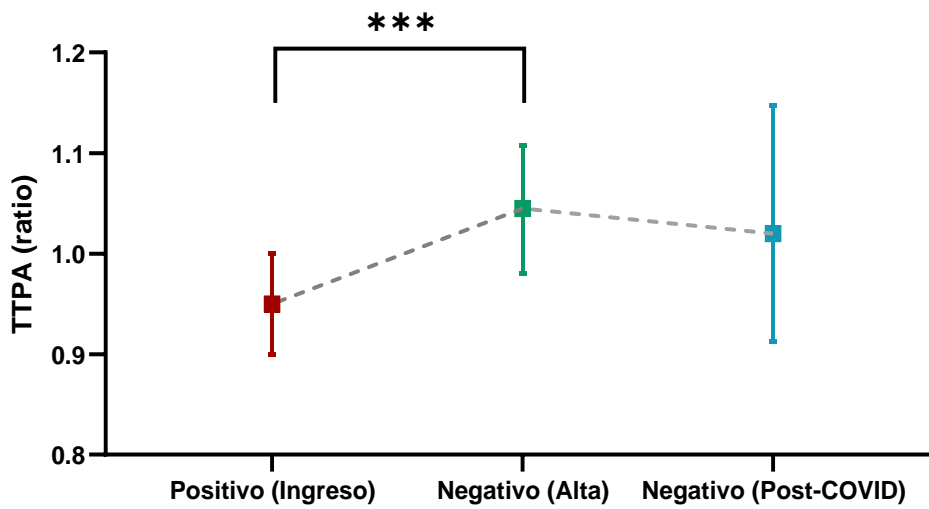


Figura 30. TTPA (tiempo de tromboplastina parcial activado) en ratio. Cuadrados (mediana); límite superior/inferior y bigotes (IQR: rango intercuartílico). Significación estadística  $p < 0,05$ .

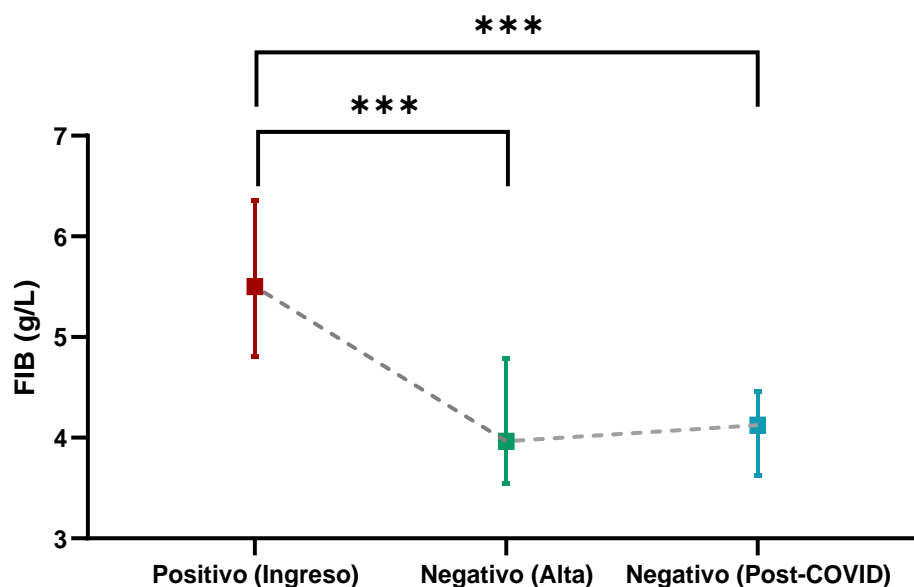


Figura 31. Concentración de FIB (fibrinógeno) en g/L. Cuadrados (mediana); límite superior/inferior y bigotes (IQR: rango intercuartílico). Significación estadística  $p < 0,05$ .

### 4.3. Pacientes con estudio del polimorfismo rs2106809 de *ACE2*

#### 4.3.1. Descripción de las variables clínicas y bioquímicas

A continuación, se exponen los resultados del estudio del polimorfismo rs2106809 del gen *ACE2*. En los estudios consultados se separan a las pacientes mujeres en CC o CT, por un lado, y por otro a las mujeres TT, dado que la expresión de las mujeres heterocigotas (CT) se parecen más a las mujeres homocigotas para C (CC) que para T (TT) (58,62). Considerando esto, se categoriza a la variable polimorfismo rs2106809 de *ACE2*: presencia de alelo C (mujeres CC o mujeres CT) y presencia de alelo T (mujeres TT). Por otro lado, los hombres al ser hemocigotas para este gen, debido a la localización de del gen *ACE2* en el cromosoma X, solo tienen una copia para el alelo C (hombres C) o para el alelo T (hombres T). Como se indicó en el apartado en el que se describe la cohorte de pacientes de esta parte del estudio (apartado 5.2.3) se selecciona un grupo control de 50 pacientes, con una distribución equitativa para el sexo y con una media de edad similar a los 50 pacientes que habían sobrevivido a la enfermedad COVID-19 tras su ingreso en UCI.

En la tabla 11 vista a continuación, se observan diferencias estadísticamente significativas entre la tener alelo C o alelo T para la variable COVID-19. Los 58,9% de los pacientes con COVID-19 tienen el alelo T para el polimorfismo de ACE2 rs2106809.

Variable	Polimorfismo ACE2		Valor <i>p</i>
	Alelo C	Alelo T	
<b>Edad (años), media (SD)</b>	57,5 (14,5)	58,9 (14,8)	0,523
<b>COVID-19, n (%)</b>	17 (38,6)	33 (58,9)	<b>0,044</b>
<b>HTA, n (%)</b>	16 (36,4)	30 (53,6)	0,087
<b>DM2, n (%)</b>	9 (20,5)	9 (16,7)	0,571
<b>DIS, n (%)</b>	17 (38,6)	23 (41,1)	0,805
<b>OBE, n (%)</b>	17 (38,6)	17 (30,4)	0,386
<b>FUM, n (%)</b>	17 (38,6)	27 (48,2)	0,629
<b>EPOC, n (%)</b>	1 (2,3)	3 (5,4)	0,435
<b>EHC, n (%)</b>	2 (4,6)	2 (3,6)	0,805
<b>ERC, n (%)</b>	3 (6,8)	3 (5,4)	0,760
<b>UCI, n (%)</b>	13 (29,6)	24 (42,9)	0,171
<b>ECMO, n (%)</b>	12 (27,3)	22 (39,3)	0,452
<b>Exitus, n (%)</b>	5 (11,4)	9 (16,1)	0,501

**Tabla 11.** Variables clínicas de los pacientes. HTA: hipertensión arterial, definida por PA>90/140 mmHg. Definidas en la historia clínica, apoyado con las medidas de glucosa (para la diabetes mellitus tipo 2 (DM2)), colesterol y triglicéridos (para la dislipemia (DIS)); OBE: Obesidad definida como un IMC>30 kg/m<sup>2</sup>; FUM: fumador actual; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; EHC: enfermedad hepática crónica; ERC: enfermedad renal crónica, definida con una TFG<60 mL/min/m<sup>2</sup>; UCI: unidad de cuidados intensivos; ECMO: *Extracorporeal Membrane Oxygen*; Polimorfismo rs2106809 del gen *ACE2*: alelo C (CC o CT o C) y alelo T (TT o T); n: número de pacientes; SD: desviación estándar.

4.3.2. *Análisis de las comparaciones en función del alelo para el polimorfismo rs2106809 de ACE2*

Dado que se han observado diferencias estadísticamente significativas en la variable COVID-19. Se analizan las variables bioquímicas, hematológicas y de coagulación para el polimorfismo rs2106809 de ACE2: alelo C (CC o CT o C) y alelo T (TT o T) en los pacientes COVID-19. Los resultados obtenidos se observan en la tabla 12, muestran el hallazgo de diferencias estadísticamente significativas entre el alelo C y el alelo T para las variables GGT, sACE2 y DD.

Variable	Polimorfismo ACE2		Valor <i>p</i>
	Alelo C	Alelo T	
Glc (mg/dL), mediana (IQR)	91,0 (24,0)	98,5 (25,5)	0,418
ALT (UI/L), mediana (IQR)	20,0 (14,5)	20,0 (18,0)	0,058
AST (UI/L), mediana (IQR)	22,5 (22,0)	33,0 (37,0)	0,063
ALP (UI/L), mediana (IQR)	64,0 (33,0)	74,5 (37,0)	0,437
GGT (UI/L), mediana (IQR)	23 (24,5)	30,0 (84,5)	<b>0,034</b>
BiliT (mg/dL), mediana (IQR)	0,59 (0,37)	0,54 (0,39)	0,575
TFG (mL/min/m <sup>2</sup> ), mediana (IQR)	90, (10,0)	89,0 (12,0)	0,346
Crea (mg/dL), mediana (IQR)	0,75 (0,19)	0,82 (0,23)	0,060
Urea (mg/dL), mediana (IQR)	31,0 (23,0)	34,5 (16,0)	0,535
sACE2 (ng/mL), mediana (IQR)	0,03 (0,0)	0,04 (0,13)	<b>0,008</b>
Ferritina (ng/mL), mediana (IQR)	266 (532)	477 (1115)	0,112
Hb (g/L), mediana (IQR)	13,7 (1,95)	14,0 (2,75)	0,697
Hem (10 <sup>9</sup> /L), mediana (IQR)	4,70 (0,74)	4,64 (0,76)	0,845
Leucos (10 <sup>9</sup> /L), mediana (IQR)	6,91 (2,69)	7,14 (1,92)	0,789



<b>Linfos (10<sup>9</sup>/L), mediana (IQR)</b>	1,80 (1,80)	1,60 (1,65)	0,651
<b>PLT (10<sup>9</sup>/L), mediana (IQR)</b>	234 (99,5)	228 (139,5)	0,784
<b>TP (ratio), mediana (IQR)</b>	1,07 (0,24)	1,07 (0,15)	0,750
<b>TTPA (ratio), mediana (IQR)</b>	0,97 (0,14)	0,99 (0,18)	0,931
<b>FIB (g/L), mediana (IQR)</b>	5,51 (0,91)	5,34 (1,87)	0,312
<b>DD (ng/mL), mediana (IQR)</b>	627 (642)	279 (440)	<b>0,041</b>
<b>sFLT-1 (pg/mL), mediana (IQR)</b>	119 (83,0)	139,6 (80,2)	0,176
<b>GDF-15 (pg/mL), mediana (IQR)</b>	2308 (4012)	4131 (3557)	0,105

**Tabla 12.** Concentraciones séricas de los marcadores bioquímicos, hematológicos y de coagulación en los pacientes COVID-19. Glc: glucosa; ALT: alanina aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa; ALP: fosfatasa alcalina. GGT: gamma-glutamilttransferasa. BilirT: bilirrubina total; TFG: tasa de filtración glomerular; Crea: creatinina; sACE2: forma soluble de ACE2; Hem: recuento de hematíes; Hb: hemoglobina; Leucos: recuento de leucocitos; Linfos: recuento de linfocitos; PLT: recuento de plaquetas; TP: tiempo de protrombina; TTPA: tiempo de tromboplastina parcial activado; FIB: fibrinógeno; DD: dímero D; GDF-15: Factor 15 de crecimiento/diferenciación; sFlt-1: forma soluble de *fms-like tyrosine kinase-1*. SD: desviación estándar. IQR: intervalo intercuartílico. n: número de pacientes; SD: desviación estándar.

## 5. Discusión

### 5.1. Pacientes de las primeras “olas” COVID-19

A continuación, se analizarán los resultados y las conclusiones obtenidas a partir de la cohorte de pacientes con infección por SARS-CoV-2 que presentaron un desarrollo clínico diferente para la enfermedad COVID-19, frente a una cohorte de pacientes no expuestos.

En la tabla 2 se evidencia que en relación con la variable Edad se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos, siendo la media de los fallecidos (71,6 años) mayor que la de los pacientes que sobrevivían (<60 años); esto indica que es un factor que influye en la enfermedad, probablemente por ser personas más vulnerables debido a la presencia de un mayor número de comorbilidades y la menor eficacia del sistema inmunológico, característico en los pacientes de edad avanzada. Respecto a la variable sexo, en todos los grupos el porcentaje de individuos de sexo masculino es mayor, destacando el grupo 3 (pacientes ingresados en UCI) con un 60,4% de hombres, es conocido que el SARS-CoV-2 tiene una mayor influencia sobre los hombres. Swärd et al.(93), indica que la COVID-19 grave es más común en adultos que en niños y en el sexo masculino que en el femenino, esto podría estar relacionado con diferencias en la expresión de ACE2 y alteraciones relacionadas con la edad que se producen en el SRAA. Además en el estudio de Viveiros et al.(30), se ha observado que existen diferencias en la regulación de ACE2 en función del órgano, el sexo y la edad, denotándose un aumento de ACE2 en corazón y pulmón en los varones de edad avanzada. Esto podría contribuir a que el curso de la enfermedad sea más grave en estos pacientes.

En cuanto a la variable ERC, a pesar de encontrar diferencias estadísticamente significativas, en esta cohorte de pacientes los problemas renales fueron minoritarios, aunque los datos indican que hay un mayor porcentaje en los grupos de pacientes con RT-PCR para SARS-CoV-2 positiva. Ha sido ampliamente estudiada la relación entre la actividad del ACE2 en pacientes con enfermedad renal. Anguiano et al.(129), en una cohorte de 2572 pacientes pertenecientes al estudio NEFRONA, llegaron a la conclusión de que la actividad de ACE2 en pacientes con ERC sin historia de ECV, estaría relacionada con los factores de riesgo cardiovascular como son la edad, la diabetes o el sexo masculino. En relación con la COVID-19, Pan et al.(76), vieron que la presencia de ACE2 en podocitos y en células del túbulo contorneado proximal podrían causar Insuficiencia Renal Aguda (IRA). Por ello, es

interesante tener en cuenta a los pacientes con ERC ante una infección por SARS-CoV-2 o virus que utilicen el mismo receptor.

En relación con la PAM, las diferencias encontradas no fueron estadísticamente significativas, las medias obtenidas fueron similares y del grupo no expuesto a SARS-CoV-2 no dispusimos de este dato. Sí que se observaron diferencias estadísticamente significativas para la HTA, sobretodo destaca el grupo de pacientes que fallecieron (76,5% con HTA), en los que el porcentaje de HTA está por encima del resto de los grupos. También es conocida la relación entre SARS-CoV-2 e HTA, como ya se ha descrito, el receptor para la entrada del virus en la célula, ACE2, es un importante regulador de SRAA pudiendo dar lugar a la exacerbación de la fisiopatología de la HTA. El estudio de Chirinos et al.(55), con 2248 pacientes con fallo cardiaco les realizaron la medida de sACE2 y encontraron concentraciones de sACE2 más bajas en pacientes con HTA, de edad elevada, hombres, diabéticos y con baja TFG. Otro hecho importante es que no encontraron asociación entre la sACE2 y fármacos inhibidores de enzima convertidora de angiotensina (IECA) o antagonistas de los receptores de angiotensina-II (ARA-II). Asimismo, en la revisión realizada por Beyerstedt et al.(130), se indica que el desbalance entre ACE/ACE2 ocasionado por la presencia de SARS-CoV-2 daría lugar a la activación del SRAA permitiendo la progresión de la COVID-19, sobretodo en pacientes con HTA y enfermedades cardiovasculares. Por otro lado, en la revisión llevada a cabo por Gallo et al.(131), concluyen que la evidencia actual es que la HTA suele estar presente en los enfermos de COVID-19, por lo que no tendría un papel independiente en la infección por SARS-CoV-2, aunque también indica que aún se desconocen las secuelas a largo plazo en estos pacientes.

Con respecto al análisis de la DIS y la DM2, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ambos. Para la DIS, a pesar de observar diferencias, los porcentajes entre los diferentes grupos fueron similares, lo que no permite sacar conclusiones relevantes. En el metanálisis realizado por Liu et al.(132), se concluye que hay relación entre la severidad de la COVID-19 y la presencia de DIS. Esto estaría relacionado con el desarrollo de enfermedad metabólica grave, diabetes y obesidad.

En cuanto a la DM2, se observa que el porcentaje de diabéticos aumenta con la gravedad de la COVID-19. En el estudio de Müller et al.(125), en el que analizan tejido de los islotes pancreáticos indican que las células  $\beta$  expresan todas las proteínas necesarias para la entrada viral y que la morfología de estas células se ve alterada en presencia del virus. Esto podría

tener consecuencias como indican algunos estudios, en los que el SARS-CoV-2 altera el metabolismo de la glucosa. Como es el caso de la revisión realizada por Gupta et al.(68), en la cual explican que la unión entre el virus y las células  $\beta$  contribuirían a la deficiencia de la insulina y a la hiperglicemia al igual que lo hacía el SARS-CoV. Por otro lado, Rubino et al.(133), indica que la relación entre la COVID-19 y la diabetes posiblemente sea bidireccional, la COVID-19 afectaría al páncreas destruyendo a las células productoras de la insulina y el ambiente de estrés metabólico en los pacientes diabéticos favorecería el desarrollo de una enfermedad grave.

Por último, en cuanto al porcentaje de pacientes obesos, aunque se encontraron diferencias estadísticamente significativas, no se encontraron porcentajes elevados en nuestra cohorte de muestras. Los mayores porcentajes para OBE se encontraron en los pacientes ingresados y en los pacientes de UCI (36,1% y 33,3% respectivamente), la relación entre el SARS-CoV-2 y la OBE ha sido ampliamente discutida; posiblemente el estado proinflamatorio que se ve facilitado por la OBE ayudaría a que el SARS-CoV-2 desate su virulencia. En el artículo de Cummings et al.(82), destacan que, aunque la mitad de sus pacientes ingresados en la UCI fuesen obesos, y esto está relacionado con una mayor gravedad y mortalidad, no se identificó a la OBE como un factor de riesgo independiente, aunque cabe destacar que la mecánica y fisiología pulmonar se ve afectada en presencia de OBE, por lo que facilitaría una progresión hacia una enfermedad grave en pacientes infectados(134). Además, hay estudios que indican que las altas concentraciones de leptina en pacientes obesos junto con una menor expresión de ACE2 en el epitelio pulmonar debido a la presencia de SARS-CoV-2, induciría a un agravamiento de la enfermedad porque tendrían una menor respuesta antiinflamatoria frente al virus(135,136).

En la revisión llevada a cabo por Zhou et al.(134), concluyen que tanto la DM2 como la OBE provocan un ambiente metabólico anómalo y proinflamatorio que acaba afectando al sistema inmunitario, lo que daría lugar a un mayor riesgo de mal pronóstico. Por ello, la COVID-19 podría promover la resistencia a la insulina y la obesidad empeorar una diabetes preexistente o incluso inducir a una diabetes de nueva aparición en un espiral negativa.

Cabe destacar que el grupo de pacientes no expuestos también tiene un porcentaje considerable de diabéticos (36,3%), hay que tener en cuenta que no son controles sanos, ya que son pacientes que acuden al centro sanitario para un chequeo de su patología de base. Para una edad mayor a 60 años, la prevalencia de esta enfermedad en España es de 20 casos

por 1000 personas al año(137). Esto también lo podemos ver en el porcentaje de HTA (40,3%), siendo la prevalencia en la población general del 44,4%(138).

Por otro lado, mediante el análisis univariante, bivariante y de curvas ROC se estudia el valor de sACE2 como nuevo marcador bioquímico de severidad para la enfermedad COVID-19 dentro del marco de otros marcadores de inflamación y daño tisular (PCR, GDF-15, IL-6 y sFlt-1) en una cohorte de pacientes dividida en diferentes grupos. Debe tenerse en cuenta que los análisis bivarantes realizados, no se ajustaron para posibles factores de confusión, pero los hallazgos descritos a continuación son coherentes con otros estudios publicados anteriormente, en la que estos marcadores de inflamación y daño tisular, estarían implicados en la gravedad de la COVID-19(100,102,103,139).

1. Pacientes infectados con SARS-CoV-2 (Grupos 1-4) frente a pacientes no expuestos a SARS-CoV-2 (Grupo 7).

Respecto a los resultados vistos en la tabla 3, se observaron que las concentraciones para las variables PCR, GDF-15, IL-6, sACE2 y sFlt-1 variaban significativamente, lo que permitiría diferenciar entre los pacientes infectados por SARS-CoV-2, sea cual sea la gravedad de este ya que se han incluido todos los grupos positivos para SARS-CoV-2, frente a un grupo de pacientes no expuestos a SARS-CoV-2. Por lo tanto, se puede concluir que estos marcadores de inflamación (PCR e IL-6) de daño cardíaco (GDF-15) y daño endotelial (sFlt-1) serían adecuados para evaluar el daño causado por la COVID-19 en esta cohorte de pacientes. Además, la fracción soluble del receptor del SARS-CoV-2 (sACE2) sería un marcador bioquímico nuevo, que podría estar implicado de forma directa en la infección y en el desarrollo de la COVID-19(94).

2. Pacientes infectados con SARS-CoV-2 ingresados en hospital independientemente de la gravedad (Grupo 2 al 4) frente a pacientes infectados con SARS-CoV-2 que fueron dados de alta (Grupo 1).

En cuanto a los resultados vistos en la tabla 4, se observaron que las concentraciones para las variables PCR, GDF-15, IL-6, sACE2 y sFlt-1 variaban significativamente, lo que permitiría diferenciar entre pacientes infectados por SARS-CoV-2. Estas diferencias obtenidas entre los pacientes no ingresados (Grupo 1) y los pacientes

ingresados (Grupo 2 al 4), nos permitiría clasificar a los pacientes en un grupo más leve, con menor inflamación (PCR e IL-6), menor daño cardíaco (GDF-15) y daño endotelial (sFlt-1), por lo que sería adecuado para distinguir entre pacientes que tendrán un curso leve de la COVID-19, frente a los que tendrán un curso más grave de la enfermedad. En relación a las diferencias obtenidas para el sACE2, en la figura 13 podemos ver como la mediana decrece con la severidad de la enfermedad, que nos indicaría que la infección no se comporta de igual forma en los grupos de pacientes. Respecto al análisis bivariante, se puede observar en la tabla 5 y en la figura 15 que la combinación de los marcadores sFlt-1, GDF-15 y sACE2 con la IL-6 tiene mejor eficiencia diagnóstica que la utilización del marcador de la IL-6 por sí solo. Por lo tanto, esta combinación de marcadores permitiría diferenciar entre pacientes ingresados por SARS-CoV-2 frente a pacientes infectados por SARS-CoV-2 que no fueron ingresados. Por otro lado, en la curva ROC para sACE2 vista en la figura 16, se seleccionan dos puntos de corte para el sACE2, el punto de corte inferior de  $\leq 0,05$  ng/mL (VPP: 89,1%) podría utilizarse para indicar riesgo de enfermedad grave cuando los marcadores de inflamación (PCR e IL-6) no estén lo suficientemente elevados porque el paciente tiene una infección muy reciente por SARS-CoV-2. Respecto al punto de corte superior de  $\geq 0,42$  ng/mL (VPN: 84,0%) podría ayudar a identificar a la mayoría de los pacientes que desarrollan una enfermedad leve.

3. Pacientes infectados con SARS-CoV-2 que fueron admitidos en UCI o fallecidos (Grupo 3 y 4) frente a pacientes infectados con SARS-CoV-2 no ingresados o ingresados con enfermedad moderada (Grupo 1 y 2).

Respecto a los resultados vistos en la tabla 6, se observaron que las concentraciones para las variables PCR, GDF-15, IL-6, sACE2 y sFlt-1 variaban significativamente, lo que permitiría diferenciar entre los pacientes infectados por SARS-CoV-2 graves (Grupos 3 y 4), frente a un grupo de pacientes no ingresados o ingresados por enfermedad moderada (Grupos 1 y 2). Se podría concluir que estos marcadores permitirían diferenciar entre dos grupos de pacientes, uno de ellos muy grave (Grupos 3 y 4) y otro grupo de pacientes con una enfermedad leve o moderada (Grupo 1 y 2). Aunque las diferencias obtenidas son más discretas que las de los análisis anteriores.

4. Pacientes que tuvieron una RT-PCR negativa para SARS-CoV-2, aunque previamente tuvieron una RT-PCR positiva para SARS-CoV-2 (Grupos 5 y 6).

Solo se realizó el análisis de la variable sACE2 para estos grupos, los resultados pueden verse en la tabla 7. Se observa que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con una RT-PCR positiva para SARS-CoV-2 que no fueron ingresado (Grupo 1) y los pacientes que tuvieron una RT-PCR negativa para SARS-CoV-2 pero que había pasado la COVID-19 sin ser ingresados, es decir, que realizaron aislamiento domiciliario (Grupo 5). Esto nos hace pensar que los pacientes que cursaban una COVID-19 con poca repercusión clínica sus concentraciones de sACE2 no variaban en gran medida. Por lo que, concentraciones elevadas de sACE2 sugerirían una enfermedad leve. En cambio, al comparar los mismos pacientes de UCI, pero en momentos diferentes de la enfermedad, ingresados en UCI con una RT-PCR positiva para SARS-CoV-2 (Grupo 3) frente a un mes después de su ingreso en UCI con una RT-PCR negativa para SARS-CoV-2 (Grupo 6), se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas y puede observarse como la mediana para la concentración de sACE2 es mayor en el Grupo 6 (0,130 ng/mL) respecto al Grupo 3 (0,040 ng/mL). Esto podría sugerir que las concentraciones de sACE2 se recuperan volviendo a su estado basal, es decir, al estado previo a la enfermedad por COVID-19. Además, también se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para la concentración de sACE2 cuando se compararon los grupos de pacientes con una RT-PCR negativa para SARS-CoV-2 (Grupos 5 y 6) lo que indicaría que a pesar de que ambos grupos están libres de SARS-CoV-2 la gravedad de la COVID-19 fue diferente y esto se vería reflejado en la concentración del receptor soluble.

## **5.2. Pacientes en seguimiento 1 año después de la infección**

En este apartado se analizan los resultados obtenidos en los pacientes de UCI (RT-PCR para SARS-CoV-2 positiva (Ingreso)) que se les realizó dos seguimientos ambos con resultado de RT-PCR para SARS-CoV-2 negativa (Alta y Post-COVID). Los datos clínicos recogidos en la tabla 8 evidencian la relación que hay entre la media de edad (58,4 años) y la COVID-19, ya comentada en el apartado anterior. También ha sido discutida la relación con la HTA, el porcentaje de personas hipertensas obtenido (54,8%) es similar a la prevalencia de la

población general 44,4%(138). En cuanto a las variables bioquímicas estadísticamente significativas pueden verse en la tabla 9 y representadas en las figuras 17 a 31.

Se evidencia que la variable Glc, vista en la figura 17, es más elevada (110,0 mg/dL) durante el Ingreso (RT-PCR para SARS-CoV-2 positiva) que al Alta (93,0 mg/dL) y Post-COVID (92,5 mg/dL), RT-PCR para SARS-CoV-2 negativa en ambos casos. La presencia de SARS-CoV-2 en el páncreas y la tormenta de citoquinas presente en la mayoría de los pacientes de la UCI podrían facilitar la resistencia a la insulina y la destrucción de las células  $\beta$  pancreáticas, alterando su función y produciendo su muerte(68,125).

En las figuras 18 a 20 observamos cómo evoluciona el proceso infeccioso a lo largo del tiempo en relación a la función hepática. Las concentraciones elevadas de AST (54 UI/L) indicarían que durante la fase aguda de la enfermedad se produce la destrucción de hepatocitos, pero a medida que se va resolviendo la infección las concentraciones disminuyen, siendo muy similares en los pacientes al Alta (28 UI/L) y Post-COVID (23 UI/L), RT-PCR para SARS-CoV-2 negativa para ambos. En cambio, para la ALT y la GGT la mediana es más elevada en los pacientes al Alta (39 UI/L y 116 UI/L, respectivamente), RT-PCR para SARS-CoV-2 negativa, esto podría indicar que se elevan de forma más tardía y que el daño hepático ocasionado por el SARS-CoV-2 no se resuelve al alta, aunque si al cabo de un año, Post-COVID (RT-PCR para SARS-CoV-2 negativa), ya que se observa una disminución de la mediana de la concentración en ambos casos (23 UI/L y 35 UI/L, respectivamente). Ha sido reportado que el virus infecta también a los hepatocitos y colangocitos(68,140). La función hepática puede ser un indicador de la gravedad y la progresión de la enfermedad, se han registrado concentraciones elevadas de AST en pacientes con COVID-19, incluso se ha reportado que su concentración elevada estaba con más frecuencia en pacientes infectados que en el resto de pacientes de UCI, en cuanto al daño en las vías biliares el porcentaje de la GGT también era mayor en los pacientes con COVID-19(123,141–143). No obstante, no se puede descartar que la isquemia por la patología pulmonar severa no sea un factor asociado a este daño hepático, conocido como síndrome hepatopulmonar causada por la dilatación de los vasos pulmonares que provoca que el transporte de sangre oxigenada al hígado sea menor(144).

En la evaluación de la función renal se observa en las figuras 21 y 22, se presenta una alta dispersión de los datos y unas TFG conservadas, esto es debido probablemente a la administración de diuréticos en los pacientes en UCI, por lo que no es útil para valorar la



función renal. Ninguno de los valores de creatinina está fuera del intervalo de referencia poblacional, además, las medianas de la TFG son superiores a 60 mL/min/m<sup>2</sup> por lo que indicaría que no hay insuficiencia renal. La elevación puntual de la creatinina podría justificarse como un IRA en pacientes que han estado en UCI debido a la aplicación de terapias de soporte y fármacos auxiliares, aunque esta insuficiencia desaparece cuando se soluciona el proceso infeccioso.

En la figura 23, se observa la distribución del ColT, la mediana de la concentración de ColT es más baja en el Ingreso (126 mg/dL), RT-PCR para SARS-CoV-2 positiva, que en los pacientes al Alta (187,5 mg/dL) y Post-COVID (197,5 mg/dL), RT-PCR para SARS-CoV-2 negativa para ambos, esto podría indicar que el ciclo de vida del virus utiliza alguna vía en la que está implicada el ColT, posiblemente para la envuelta viral, por lo que los requerimientos de las células infectadas son mayores. En la revisión llevada a cabo por Barrantes(145), expone que la utilización del colesterol por el virus es necesaria para su transmisión, de hecho necesita estructuras concretas de la bicapa lipídica ricas en colesterol para poder anclar las proteínas virales y desarrollar nuevos viriones por vía endosomal, dando lugar a profundos cambios en el metabolismo de la célula huésped. En otra revisión, Palacios-Rápalo et al.(146), también apoya el hecho de que las partículas virales necesitan dominios de membrana ricos en colesterol y esfingolípidos tanto para la entrada como para la transmisión viral. De aquí que podamos observar una disminución durante el proceso infeccioso que no se observa en los pacientes al Alta y Post-COVID (RT-PCR para SARS-CoV-2 negativa para ambos).

Respecto a la concentración de sACE2 vista en la figura 24, se observan diferencias significativas entre Ingreso (0,03 ng/mL), RT-PCR para SARS-CoV-2 positiva, y el Post-COVID (0,11 ng/mL), con RT-PCR para SARS-CoV-2 negativa. Se puede observar que la concentración de sACE2 aumenta a medida que se resuelve la enfermedad, posiblemente debido a la viremia, la inflamación y todos los cambios en el organismo que conllevan una enfermedad como la COVID-19 afectan a su concentración. En este sentido, la presencia de la infección disminuiría el ACE2 de la membrana plasmática lo que reduciría también la concentración de sACE2, ocasionado por la interacción con las partículas virales que produciría el consumo de ACE2. Con la resolución de la enfermedad y tras un tiempo de recuperación, la presencia de ACE2 volvería a su estado basal al igual que se restauraría el equilibrio ACE2, unido a membrana y sACE2, forma soluble, debido a la ausencia de la

interacción con el virus. Robertson et al.(147), realizaron la medida de sACE2 en pacientes ingresados en el hospital, pacientes ingresados en UCI y controles sanos, en su estudio indican que las concentraciones de sACE2 disminuyen con la gravedad de la COVID-19. La medida de sACE2 podrían tener interés en la recuperación progresiva de la infección, sobre todo en las viremias que tienen la ACE2 como principal receptor.

Otros virus de la familia *Coronaviridae*, tienen el ACE2 como receptor, es el caso del SARS-CoV, de hecho, la presencia de sACE2 impediría la unión de estos coronavirus a ACE2 unido a membrana y por tanto la entrada viral(148). Sería interesante la realización de estudios con rnsACE2 para demostrar si esta proteína recombinante limita o combate la infección causada por estos virus. Como se ha descrito al comienzo de esta tesis doctoral, en la historia de los coronavirus se han observado casos de entidades virales que han infectado a animales y han dado el salto a humanos, como las zoonosis llevadas a cabo por el SARS-CoV y el MERS-CoV, además del SARS-CoV-2. Respecto a este último, se han descrito numerosas variantes, lo que da idea de la gran adaptabilidad del virus para aumentar su potencial de transmisión sin perder la especificidad por el receptor ACE2. El impacto de las diferentes mutaciones en la proteína *spike* podrían tener implicación directa sobre la diversidad antigénica, las interacciones con los anticuerpos, la accesibilidad al receptor ACE2 e incluso la efectividad de las vacunas(15,149).

Algunas de las mutaciones han sido mencionadas en la introducción, como la D614G que contribuye a aumentar la infectividad viral, la transmisión y la replicación en el tracto respiratorio superior; o la mutación N501Y cuyo papel es crítico en la transmisión viral. Otras mutaciones en la proteína *spike*, como la N439K y la Y453F podrían ayudar al virus a escapar de la neutralización mediada por anticuerpos(15). La rápida adaptación y evolución de los coronavirus hace necesario anticiparse en el desarrollo de nuevas terapias, o centrarse en dominios altamente conservados; ya que, a pesar de la diversidad de variantes, gracias a los mecanismos de rectificación de errores durante la replicación, las variantes no tienen una alta divergencia con la primera variante. Ejemplo de ello son algunas de las variantes más recientes como *Omicron XBB1.5* y *Omicron EG.5.1* que se diferencian en 43 y 45 mutaciones con respecto a las proteínas *spike* de las primeras cepas del virus(150).

Si los comparamos con otros coronavirus que utilizan ACE2 como receptor en la célula huésped, las proteínas *spike* de SARS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-NL63 contienen aminoácidos distintos pero el dominio RBD de la proteína *spike*, es similar entre ellos y

diferente al de otros coronavirus, lo que permite la interacción tan precisa con ACE2(151). Por ello, el estudio de ACE2 y de su forma soluble, sACE2, podría ser un marcador en las infecciones mediadas por coronavirus humanos o nuevos coronavirus zoonóticos, lo que podría permitir la mejora de estrategias preventivas y terapéuticas contra la posibilidad de una nueva epidemia mediada por coronavirus.

Por último, la concentración de ferritina decrece a medida que se resuelve la infección, como puede verse en la figura 25. Los pacientes al año de la infección, Post-COVID (RT-PCR para SARS-CoV-2 negativa) tienen resultados dentro de los valores de referencia poblacionales (107,0 ng/dL) a diferencia de los pacientes al Alta (402,0 ng/dL), RT-PCR para SARS-CoV-2 negativa y los pacientes en el Ingreso (841,0 ng/dL), RT-PCR para SARS-CoV-2 positiva, lo que concuerda con el hecho de que la ferritina es un reactante de fase aguda. La revisión sistemática de Kaushal et al.(152), relaciona la ferritina con la gravedad de la COVID-19. Además, concentraciones elevadas de ferritina que interaccionan con glóbulos rojos y plaquetas sugeriría que ayudan al efecto protrombótico visto en los pacientes(153). No obstante, debe tenerse en cuenta que la ferritina es un reactante de fase aguda, por lo que su elevación podría estar relacionado por el proceso inflamatorio desencadenado por la infección.

En cuanto a las variables hematológicas Hb y Hem vistas en las figuras 26 y 27, se observan diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes al Ingreso (RT-PCR para SARS-CoV-2 positiva) y al Alta (RT-PCR para SARS-CoV-2 negativa), también se encuentran diferencias significativas entre estos últimos y los Post-COVID (RT-PCR para SARS-CoV-2 negativa) esto podría indicar que la síntesis de nuevos hematíes y de hemoglobina está comprometida por el daño multiorgánico y sistémico que causa la enfermedad COVID-19, la conocida anemia por enfermedad crónica, común en pacientes con enfermedades en las que hay una inflamación crónica mantenida(154,155). En el estudio de Russo et al.(155), en el que analiza alteraciones en la funcionalidad de los Hem, se indica que la presencia del virus provoca cambios en su tamaño y rigidez, lo que sugeriría una progresión de la gravedad de la enfermedad. La disminución de la flexibilidad y elasticidad de los Hem daría lugar a una mayor fragilidad de estos, con la liberación de Hb a la sangre, lo que induciría a la activación de PLT(156). Una mayor fragilidad de los Hem sumado a un menor recambio en la médula ósea produciría una anemia que no sería visible de forma inmediata sino transcurrido un

tiempo de la infección. Así ocurre en los resultados encontrados, en los pacientes al Alta tienen menores concentraciones de Hem y Hb que en Ingreso y Post-COVID.

Por otro lado, se observan diferencias estadísticamente significativas entre todos los seguimientos: Ingreso (RT-PCR para SARS-CoV-2 positiva), Alta y Post-COVID (RT-PCR para SARS-CoV-2 negativa para ambos) en los Linfos y PLT, vistos en las figuras 28 y 29. En cuanto a nuestros datos, se observa linfopenia en los pacientes Ingresados ( $0,8 \cdot 10^9/L$ ) y una recuperación de los Linfos al Alta y Post-COVID ( $1,6 \cdot 10^9/L$  y  $2,2 \cdot 10^9/L$ , respectivamente). Respecto a las PLT, en ninguno de los grupos se obtuvo plaquetopenia, pero la mediana del grupo Ingreso era más baja de  $175 \cdot 10^9/L$ .

Es conocida la linfopenia ocasionada por la enfermedad COVID-19, de hecho, puede observarse como las concentraciones se recuperan a medida que se resuelve la enfermedad, al igual que las alteraciones vistas en el recuento de plaquetas que también está asociado a la infección por SARS-CoV-2. De hecho, los Linfos y las PLT expresan ACE2 en su membrana por lo que son susceptibles a la infección directa por el SARS-CoV-2(157,158). Esto es sustentado por diferentes artículos como el metanálisis de 32 estudios llevado a cabo de Malik et al.(99), en los que se encuentra la disminución de Linfos y PLT en los pacientes COVID-19, asociándose con un peor pronóstico en los pacientes hospitalizados. También en la revisión de Terpos et al.(159), se relaciona la gravedad de la enfermedad con la disminución de Linfos y PLT; además indica que el ratio PLT/Linfos podría ser un buen marcador del pronóstico de los pacientes. Una ratio elevada indicaría una SLC más pronunciada debido a una mayor activación de PLT(160).

En el análisis de las variables de coagulación, en la figura 30 se observan diferencias estadísticamente significativas para la variable TTPA entre Ingreso (RT-PCR para SARS-CoV-2 positiva) y al Alta (RT-PCR para SARS-CoV-2 negativa), parece ser que esta variable solo tendría utilidad en el proceso de infección aguda, el alargamiento del TTPA se ha visto en pacientes con infección aguda de COVID-19 pero hay otras magnitudes que se alteran de forma más común como el FIB(161). En la figura 31, en la que está representada el FIB, se observan diferencias entre Ingreso (RT-PCR para SARS-CoV-2 positiva) y al Alta (RT-PCR para SARS-CoV-2 negativa), y además entre Ingreso (RT-PCR para SARS-CoV-2 positiva) y Post-COVID (RT-PCR para SARS-CoV-2 negativa). Durante la enfermedad de la COVID-19, se producen aumentos de los procesos trombóticos y esto se refleja en los cambios de su concentración entre Ingreso, Alta y Post-COVID(161). Esto ha sido señalado

en la revisión llevada a cabo por Gupta et al.(68), indican que el FIB junto con otros reactantes de fase aguda como la ferritina, son predictores de mortalidad y se aconseja su monitorización en la guía de la Sociedad Internacional de Hemostasia y Trombosis(162). Además, el FIB junto con concentraciones elevadas de IL-6 se han correlacionado con un peor pronóstico de la enfermedad(163).

En la revisión sistemática llevada a cabo por Wrona et al.(164), se analizan las posibles secuelas de la COVID-19 en el desarrollo de enfermedades comunes como son la dislipemia, la diabetes y la hipertensión. En la revisión realizada concluyen, que sí existe un mayor riesgo de desarrollar estas enfermedades transcurridos varios meses de la infección aguda. En otra revisión llevada a cabo por Lechuga et al.(165), que habla del Long COVID-19, condición clínica en la que persiste sintomatología después de la fase aguda de la enfermedad, esta ha sido asociada a enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares, diabetes y al síndrome de fatiga crónica(166).

### **5.3. Pacientes con estudio del polimorfismo rs2106809 de *ACE2***

En relación al polimorfismo rs2106809 de *ACE2* podemos ver en la tabla 11 que se observan diferencias estadísticamente significativas entre tener el alelo C o el alelo T para la variable COVID-19. El 58,9% de los pacientes con COVID-19 tienen el alelo T para este polimorfismo. En este estudio se seleccionó una cohorte de muestras en la que se escogieron al azar 50 hombres y 50 mujeres, por lo que no se pudo establecer si había diferencias entre sexo. El alelo T está asociado a una menor concentración de Ang-(1-7)(64), a mayor riesgo de HTA(167,168) y posiblemente podría contribuir a la severidad de la infección(62,169) por SARS-CoV-2.

Por otro lado, dado que se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el alelo C y T en el polimorfismo rs2106809 de *ACE2*. Se realiza el análisis de las variables bioquímicas, hematológicas y de coagulación solo para los pacientes COVID-19. Este análisis puede observarse en la tabla 12, donde se observan diferencias estadísticamente significativas entre el alelo C y el alelo T, para las variables GGT, sACE2 y DD.

Las diferencias encontradas en la variable GGT cuyas medianas son mayores en el alelo T podría reflejar el estado de estrés oxidativo al que está sometido el sistema hepático, debido a que es el mayor depurador del organismo junto con el sistema renal. En cambio, para el

DD, las concentraciones son mayores en los pacientes con alelo C (627 ng/mL) que con alelo T (279 ng/mL), son conocidos los procesos trombóticos que ocurren durante la enfermedad, aunque parece ser que tener el alelo C favorecería el estado procoagulante.

No se han encontrado estudios que relacionen el polimorfismo rs2106809 con estas variables, pero sí con otras entidades clínicas como la HTA, como se ha visto en los estudios de Christian et al.(167) y Chen et al(168). Aunque en nuestro estudio no se encuentren diferencias estadísticamente significativas, el porcentaje de individuos con alelo T en HTA es mayor (53,6%) que en los individuos con alelo C (36,4%) como puede verse en la tabla 11, lo que estaría en consonancia con estos estudios. Además, esto podría estar relacionado con los resultados de GDF-15, a pesar de no encontrarse diferencias estadísticamente significativas, si se observan los resultados obtenidos en la tabla 12, los pacientes COVID-19 con alelo C tienen una concentración de 2308 pg/mL frente a los que tienen alelo T (4131 pg/mL). El GDF-15 se ha postulado como un marcador de severidad en la miocardiopatía hipertrófica y de elevación del segmento ST(170).

Para finalizar, a pesar de hallar diferencias estadísticamente significativas entre el polimorfismo rs2106809 y la variable sACE2, las medianas son muy similares entre el alelo C (0,03 ng/mL) y el alelo T (0,04 ng/mL) por lo que no se pueden establecer una relación clara entre ambas variables. Esto va en consonancia con la bibliografía, Karakaş et al.(63), no encontraron asociación entre la COVID-19 y dicho polimorfismo en su cohorte de 150 pacientes. En cambio, Sabater et al.(62), sí que pudieron establecer esta relación en su cohorte de 318 pacientes. Esto parece indicar que es necesario más estudios para poder establecer la verdadera relación entre el polimorfismo rs2106809 y la COVID-19.

#### **5.4. Síntesis de la discusión del estudio**

Para sintetizar la discusión, a continuación, se presenta un resumen de los aspectos más importantes encontrados en esta investigación.

1. En el análisis univariante realizado se observa que la mediana de la concentración de sACE2 fue significativamente menor en pacientes infectados por SARS-CoV-2 (Grupo 1 a 4) comparados con los pacientes no expuestos a SARS-CoV-2 (Grupo 7), así como en pacientes infectados por SARS-CoV-2 que fueron ingresados en el

hospital (Grupo 2) frente a pacientes infectados por SARS-CoV-2 que no fueron ingresados (Grupo 1).

Esto mismo se observó cuando se comparó pacientes infectados por SARS-CoV-2 que no fueron ingresados o fueron ingresados en el hospital (Grupos 1 y 2, considerados pacientes con una enfermedad leve o moderada) frente a pacientes infectados por SARS-CoV-2 que fueron ingresados en UCI o que fallecieron (Grupos 3 y 4, considerados pacientes con una enfermedad grave).

2. Se obtuvieron dos puntos de corte para sACE2 uno  $\leq 0,05$  ng/mL con un VPP del 89,1% y otro  $\geq 0,42$  ng/mL con un VPN del 84,0%. Aunque se necesitan investigaciones más amplias y extensas, el punto de corte  $\leq 0,05$  ng/mL podría ser usado para indicar riesgo de enfermedad grave cuando las concentraciones de IL-6 o PCR no sean lo suficientemente elevadas, debido a una infección reciente por SARS-CoV-2. Mientras que el punto de corte  $\geq 0,42$  ng/mL, podría ayudar a identificar a la mayoría de los pacientes que desarrollan una enfermedad leve.

3. La PCR presenta el valor AUC más alto cuando se comparó a los pacientes infectados por SARS-CoV-2 (Grupo 1 a 4) frente a los pacientes no expuestos a SARS-CoV-2 (Grupo 7).

Además, la IL-6 obtiene el valor AUC más alto en dos comparaciones: cuando se contrasta los pacientes infectados por SARS-CoV-2 ingresados en el hospital (Grupo 2) frente a los no ingresados (Grupo 1) y en el análisis de comparación entre los pacientes infectados por SARS-CoV-2 ingresados en UCI o fallecidos (Grupo 3 a 4, pacientes con enfermedad grave) frente a aquellos que no fueron ingresados o que fueron ingresados en el hospital (Grupos 1 y 2, pacientes con enfermedad leve o moderada).

En general, las medianas de las concentraciones de PCR, GDF-15, IL-6 y sFlt-1 fueron significativamente superiores en los pacientes con infección por SARS-CoV-2 que presentaron un desenlace clínico más grave.

4. En todas las comparaciones entre los diferentes estadios clínicos, solo GDF-15 exhibió un AUC elevado en una subcohorte excluyendo comorbilidades (HTA, DIS y DM2) en comparación con el resto de la cohorte. El resto de marcadores parecen

ser independientes para estas comorbilidades, aunque se requieren otras investigaciones que respalden estos hallazgos.

5. En todos los pacientes infectados por SARS-CoV-2 (Grupo 1 a 4) las concentraciones de sACE2 fueron significativamente más bajas que en los pacientes no expuestos a SARS-CoV-2 (Grupo 7). Esto podría indicar que habría una menor cantidad de ACE2 susceptible a ser escindida por ADAM-17. Además, la mediana de la concentración de sACE2 fue significativamente más baja en los pacientes infectados por SARS-CoV-2 con una clínica más grave.

En pacientes infectados por SARS-CoV-2 que fueron ingresados en UCI, las concentraciones de sACE2 fueron significativamente más altas en los pacientes cuyas muestras fueron obtenidas tras la resolución de la enfermedad (Grupo 6: 0,130 ng/mL) comparado con las muestras de los mismos pacientes obtenidas durante su ingreso en la UCI (Grupo 3: 0,040 ng/mL).

Esto podría indicar que las concentraciones de sACE2 pueden incrementarse tras la resolución de la infección. Respaldando este hecho, de un papel protector de sACE2, los pacientes que no fueron ingresados y cuya muestra fue extraída después de la resolución de la infección viral (Grupo 5: 0,235 ng/mL) obtuvieron aproximadamente el doble de concentración de sACE2.

6. Se ha podido observar una recuperación de la concentración del sACE2 en los pacientes al año de la resolución de la enfermedad (RT-PCR para SARS-CoV-2 negativa, Post-COVID); esto sugiere que este marcador bioquímico podría tener valor pronóstico. Se observan que las concentraciones de sACE2 para el grupo Ingresado (RT-PCR para SARS-CoV-2 positiva) son bajas en comparación con los grupos Alta y Post-COVID.

Podría sugerir que los pacientes recuperan sus concentraciones basales, es decir los valores previos a la enfermedad, y que estos valores tardan en recuperarse ya que la concentración al Alta (RT-PCR para SARS-CoV-2 negativa) son más bajas que la concentración Post-COVID (RT-PCR para SARS-CoV-2 negativa). Este hecho podría ser interesante en la infección llevada a cabo por otros coronavirus que utilicen el ACE2 como receptor, como el SARS-CoV(148).



7. Se han observado diferencias para algunas variables entre tener el alelo C y T en los pacientes COVID-19, aunque las medianas de la concentración de sACE2 son muy similares y no nos permiten establecer conclusiones inequívocas, sí que podríamos decir que podría existir una relación entre este polimorfismo y la enfermedad COVID-19. Este hallazgo es respaldado por la reciente revisión llevada a cabo por Ren et al.(171), aunque el número de estudios con este polimorfismo es pequeño, por lo que sería necesario una investigación más exhaustiva para establecer una conexión precisa.

Finalmente, en la bibliografía pueden encontrarse algunos estudios que discrepan de los resultados encontrados en el este proyecto de tesis doctoral. El estudio de Kragstrup et al.(172) indica que concentraciones elevadas de sACE2 se han asociado con un incremento de la gravedad a los 28 días. Sin embargo, la población descrita en este estudio no examina seguimientos de los mismos pacientes durante la hospitalización. Además, la medida de sACE2 se realiza con una metodología diferente (*Olink® Explore 1536 platform*), que no permite realizar la comparación entre valores discriminantes para la predicción de la enfermedad grave. Otro estudio, con un número pequeño de pacientes también encuentran un incremento de sACE2 en pacientes con COVID-19 grave, pero lo justifican como un aumento transitorio y local debido a una mayor liberación desde células infectadas(173,174). Las concentraciones locales de sACE2 podrían ser un indicador más preciso de la enfermedad de la gravedad de la COVID-19, lo que explicaría las diferencias encontradas en la respuesta a la infección, el grado de gravedad de la enfermedad y el periodo de recuperación de los pacientes.

También hay estudios que indican diferencias en función de la edad y el sexo por lo que es importante que, al comparar los estudios, las poblaciones sean similares(23,93). En el estudio de Wang et al.(47) se observó que el sACE2, junto con otras moléculas de la vía RAS como Ang-(1-7) y los receptores unidos a membrana y solubles de TNF-I y TNF-II, serían marcadores indirectos de la actividad de ADAM-17. Por tanto, esto sugiere que la activación de ADAM-17 y la escisión del ACE2, disminuirían la protección tisular frente a la activación exacerbada del SRAA tisular y estarían implicados en la fisiopatología del SARS-CoV-2.

Por otro lado, utilizando una línea celular de riñón humano sensible a la infección, Yeung et al.(52) muestran que el receptor ACE2 se escinde y libera de la superficie de la célula huésped como sACE2 mediando la unión y captación de SARS-CoV-2 por receptores implicados en la señalización del SRAA. Esto podría explicar por una parte por qué encontramos concentraciones bajas en nuestros pacientes de UCI y fallecidos. Pero no explica que ocurre en otros tejidos, ni con los pacientes leves y asintomáticos que parecen tener un comportamiento diferente respecto a sACE2, cuyas concentraciones son elevadas y no mediarían la internalización de SARS-CoV-2(147,148). Como los diferentes estudios indican, las investigaciones se han centrado en el estudio del ACE2 como receptor de membrana, pero se desconoce en gran medida el impacto del sACE2 circulante en la entrada del SARS-CoV-2 y las consecuencias que puede desencadenar.

Para finalizar, respecto al polimorfismo rs2106809, los estudios son discrepantes entre sí, como se ha comentado anteriormente. Aunque el metanálisis llevado a cabo por Ren et al.(171) en el que se analizan diferentes polimorfismos de ACE2, incluido el polimorfismo que nos ocupa, indica que podría estar relacionado con la severidad de la COVID-19.

## 6. Conclusiones

### 6.1. Principales hallazgos

A continuación, se presentan las principales conclusiones de este estudio.

1. La concentración de sACE2 en plasma es útil como marcador bioquímico en pacientes con SARS-CoV-2.
  - 1.1. La concentración de sACE2 permite establecer la relación con la gravedad en estos pacientes.
  - 1.2. La concentración de sACE2 tiene valor como predictor de riesgo de gravedad en pacientes con SARS-CoV-2.
2. La concentración de GDF-15 y sFlt-1 en plasma, junto con la medida de la concentración de PCR, IL-6 y sACE2 plasmática, tienen valor para estudiar y evaluar el daño ocasionado por el virus en los pacientes con la enfermedad COVID-19.
3. El aumento de las concentraciones de sACE2 en los seguimientos de pacientes ingresados en UCI indica que es un marcador bioquímico pronóstico en pacientes infectados por SARS-CoV-2.
4. El polimorfismo rs2106809 del gen *ACE2* es un marcador genético relacionado con la enfermedad COVID-19.

### 6.2. Limitaciones del estudio

A pesar de los datos de este estudio y las conclusiones basadas en un gran número de muestras analizadas en diferentes grupos de pacientes y estudiándolos a lo largo del tiempo con seguimientos al mes y al año de la infección, esta investigación también presenta algunas limitaciones.

1. Diseño realizado en un único centro, con baja representación de algunos grupos de pacientes, como el Grupo 5, pacientes con RT-PCR para SARS-CoV-2 negativa que no fueron ingresados que tuvieron previamente una RT-PCR para SARS-CoV-2 positiva, es decir, que habían pasado la infección.

2. Debido a que la recomendación de los Departamentos de Salud Pública era permanecer en casa durante el periodo del estudio de las primeras “olas”, no fue posible obtener muestras de pacientes muy leves o asintomáticos. Además, la gravedad y el momento de aparición de las manifestaciones clínicas era variable entre los pacientes.
3. Como se ha comentado en la introducción, el sACE2 se expresa en otros tejidos además de los pulmones, por ello la presencia de sACE2 representa las concentraciones circulantes de todo el organismo, no solo el expresado en los pulmones.
4. En los pacientes de las primeras “olas” no se registró medicación habitual en la base de datos del estudio, por lo que no se pudo tener en cuenta el efecto concomitante de la medicación (ejemplos: IECA, ARA-II, estatinas, y metformina) sobre las mediciones de los marcadores bioquímicos.
5. Durante los seguimientos, solo 17 pacientes tenían HTA, 11 hombres y 7 mujeres. La medicación para la HTA pautada fue la misma durante todo el estudio. Algunos de ellos, tomaban combinación de fármacos entre los que se encontraban: IECA ARA-II, bloqueadores de calcio y anti-receptores  $\beta$ . Por ello, se hace difícil establecer una relación entre el tipo de fármaco y la concentración de sACE2, debido al bajo número de pacientes con HTA y a la variabilidad de fármacos pautados. Aunque dado que la medicación no varió durante el estudio, podríamos intuir que el tipo de fármaco no afecta en la concentración de sACE2, al menos en su evolución durante los seguimientos. Respecto a la infección por SARS-CoV-2, como indica la revisión realizada por Caravaca et al., en la que recogen diferentes estudios observacionales y de casos-controles, estos tratamientos no se asocian a un mayor riesgo de infección por SARS-CoV-2(175).
6. A diferencia de la medida de los otros marcadores bioquímicos, la medida de la concentración de sACE2 se realizó con un reactivo sin marcado CE-IVD, al no estar disponible todavía ningún reactivo bajo el amparo de esta regulación en el mercado. Por este motivo hay que tener en cuenta que sus características metrológicas no son

tan robustas. Aunque de forma independiente de si es un reactivo implementado en la práctica clínica o no, para realizar la transferibilidad de los valores discriminantes, y poder ser utilizados en una población diferente, siempre deberán de ser verificados previamente.

7. El estudio del polimorfismo rs2106809 se ha realizado en una cohorte de pacientes pequeña, por lo que no se pueden hacer extrapolación a la población general.

### 6.3. Futuras líneas de investigación

Entre las posibles futuras líneas de investigación derivadas de este estudio podemos destacar:

1. Receptores solubles como tratamiento en infecciones víricas.

Respecto al papel protector que podría realizar la sACE2, una de las hipótesis podría ser que, a pesar que el ACE2 esté escindido como sACE2, conservaría cierta función residual realizando una retroalimentación negativa en la activación de la vía RAS. En apoyo a esto, la utilización de la proteína rhsACE2 ha sido estudiada como una alternativa de tratamiento en pacientes infectados con SARS-CoV-2. Hay estudios como los de Zoufaly et al.(96) y Krishnamurthy et al.(176) en los que se asoció esta rhsACE2 con la disminución de la concentración de citoquinas implicadas en la fisiopatología de la COVID-19, la reducción de la carga viral y la neutralización de las partículas virales. Aunque estos hechos pueden deberse a la evolución natural de una infección viral, no habría que descartar esta línea de investigación frente a otras infecciones víricas que tienen ACE2 como receptor.

2. Validación de la medida de la concentración de sACE2.

Parece necesario la validación de un reactivo de sACE2 para la práctica clínica, sobretodo en una cohorte independiente de pacientes, teniendo en cuenta el estado de la vacunación para la COVID-19, las nuevas variantes de SARS-CoV-2 y las reinfecciones en la población que podrían afectar a la concentración de sACE2. Existen estudios que indican que diferentes polimorfismos de *ACE2* podrían estar implicados en la variabilidad a la susceptibilidad de infección por SARS-CoV-2. En el estudio de Benetti et al.(177), analizaron el *Whole-Exome Sequencing* (WES) de 131 pacientes COVID-19 frente a 258 controles y encontraron diferencias estadísticamente significativas; además encontraron

tres variantes implicadas en la estructura y estabilidad de la proteína ACE2 y en dos variantes implicadas en el proceso de internalización.

### 3. Estudio de las concentraciones de sACE2 en otras cohortes de pacientes.

Como se ha comentado anteriormente, el ACE2 está distribuido por todo el organismo, teniendo una elevada expresión no solo en los pulmones, si no en el sistema renal y cardiaco. Parece necesario evaluar el ACE2 o el sACE2 en enfermedades con alta prevalencia como son la ECV y la ERC. En la revisión de Anguiano et al.(27), encontraron que las concentraciones de sACE2 circulantes estaban incrementadas en pacientes con ECV y esto también lo encontraron en pacientes con ERC.

Para finalizar, aunque los hallazgos de esta tesis doctoral tienen limitaciones, los resultados obtenidos proporcionan la base para futuros estudios sobre la sACE2 en poblaciones independientes y a largo plazo. No parece descabellado pensar que otros coronavirus puedan ser zoonosis y que den el salto a humanos, dando lugar a un “*novo* coronavirus” que utilice ACE2 como receptor. Ha sido ampliamente documentado que los coronavirus zoonóticos pueden generar una epidemia, como SARS-CoV en 2003, y pandemias, como SARS-CoV-2 en 2019. Dando la casualidad de que ambos utilizan su proteína *spike* como llaves que abren la puerta de entrada a la célula a través de una única cerradura, el receptor ACE2. Parece ser que este es solo un episodio de una historia aún no terminada.

## Bibliografia

1. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020 [Internet]. [cited 2024 May 27]. Available from: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>
2. Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2024 May 10];17(3):181–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30531947/>
3. Wang N, Shang J, Jiang S, Du L. Subunit Vaccines Against Emerging Pathogenic Human Coronaviruses. *Front Microbiol* [Internet]. 2020 Feb 28 [cited 2024 May 10];11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32265848/>
4. Helmy YA, Fawzy M, Elasad A, Sobieh A, Kenney SP, Shehata AA. The COVID-19 Pandemic: A Comprehensive Review of Taxonomy, Genetics, Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Control. *J Clin Med* [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2024 May 10];9(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32344679/>
5. Current ICTV Taxonomy Release | ICTV [Internet]. [cited 2024 May 27]. Available from: <https://ictv.global/taxonomy>
6. Corman VM, Lienau J, Witzentrath M. [Coronaviruses as the cause of respiratory infections]. *Internist (Berl)* [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2024 May 10];60(11):1136–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31455974/>
7. Human Coronavirus Types | CDC Archive [Internet]. [cited 2024 May 27]. Available from: <https://archive.cdc.gov/#/details?url=https://www.cdc.gov/coronavirus/types.html>
8. De Wit E, Van Doremalen N, Falzarano D, Munster VJ. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2016 Aug 1 [cited 2024 May 10];14(8):523–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27344959/>

9. Coronavirus causante del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) - Arabia Saudita [Internet]. [cited 2024 May 27]. Available from: <https://www.who.int/es/emergencies/disease-outbreak-news/item/2022-DON422>
10. Fehr AR, Channappanavar R, Perlman S. Middle East Respiratory Syndrome: Emergence of a Pathogenic Human Coronavirus. *Annu Rev Med* [Internet]. 2017 Jan 14 [cited 2024 May 10];68:387–99. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27576010/>
11. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2024 May 10];19(3):141–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33024307/>
12. Chen Y, Liu Q, Guo D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *J Med Virol* [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2024 May 10];92(4):418–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31967327/>
13. 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* [Internet]. 2020 Mar 12 [cited 2024 May 10];579(7798):265–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32015508/>
14. Yang H, Rao Z. Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2021 Nov 1 [cited 2024 May 10];19(11):685–700. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34535791/>
15. Kumar R, Srivastava Y, Muthuramalingam P, Singh SK, Verma G, Tiwari S, et al. Understanding Mutations in Human SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein: A Systematic Review & Meta-Analysis. *Viruses* [Internet]. 2023 Apr 1 [cited 2024 May 13];15(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37112836/>
16. Sparks MA, Crowley SD, Gurley SB, Mirotsoy M, Coffman TM. Classical Renin-Angiotensin system in kidney physiology. *Compr Physiol* [Internet]. 2014 [cited 2024 May 10];4(3):1201–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24944035/>
17. Atlas SA. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J Manag Care Pharm* [Internet]. 2007 [cited 2024 May 8];13(8 Suppl B). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17970613/>



18. Fournier D, Luft FC, Bader M, Ganten D, Andrade-Navarro MA. Emergence and evolution of the renin-angiotensin-aldosterone system. *J Mol Med (Berl)* [Internet]. 2012 May [cited 2024 May 10];90(5):495–508. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22527880/>
19. Zhuo JL, Ferrao FM, Zheng Y, Li XC. New frontiers in the intrarenal Renin-Angiotensin system: a critical review of classical and new paradigms. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 2013 [cited 2024 May 10];4(NOV). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24273531/>
20. Boehm M, Nabel EG. Angiotensin-converting enzyme 2--a new cardiac regulator. *N Engl J Med* [Internet]. 2002 Nov 28 [cited 2024 Jun 17];347(22):1795–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12456857/>
21. Haug G, Eapen MS, Sohal SS. Renin-Angiotensin-Aldosterone System Inhibitors in Covid-19. *N Engl J Med* [Internet]. 2020 Jun 11 [cited 2024 May 10];382(24):e92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32427429>
22. Ferrario CM, Chappell MC, Tallant EA, Brosnihan KB, Diz DI. Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). *Hypertension* [Internet]. 1997 [cited 2024 May 8];30(3 Pt 2):535–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9322978/>
23. Burrell LM, Johnston CI, Tikellis C, Cooper ME. ACE2, a new regulator of the renin-angiotensin system. *Trends in Endocrinology and Metabolism* [Internet]. 2004 May [cited 2024 May 8];15(4):166–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15109615/>
24. Bitker L, Burrell LM. Classic and Nonclassic Renin-Angiotensin Systems in the Critically Ill. *Crit Care Clin* [Internet]. 2019 Apr 1 [cited 2024 May 10];35(2):213–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30784605/>
25. Turner AJ. ACE2 Cell Biology, Regulation, and Physiological Functions. The Protective Arm of the Renin Angiotensin System (RAS) [Internet]. 2015 Apr 22 [cited 2024 May 10];185. Available from: </pmc/articles/PMC7149539/>
26. Chen L, Hao G. The role of angiotensin-converting enzyme 2 in coronaviruses/influenza viruses and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2024 May 10];116(12):1932–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32267499/>

27. Anguiano L, Riera M, Pascual J, Soler MJ. Circulating ACE2 in Cardiovascular and Kidney Diseases. *Curr Med Chem* [Internet]. 2017 Oct 26 [cited 2024 May 10];24(30). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28413960/>
28. Gheblawi M, Wang K, Viveiros A, Nguyen Q, Zhong JC, Turner AJ, et al. Angiotensin-Converting Enzyme 2: SARS-CoV-2 Receptor and Regulator of the Renin-Angiotensin System: Celebrating the 20th Anniversary of the Discovery of ACE2. *Circ Res* [Internet]. 2020 May 8 [cited 2024 May 10];126(10):1456–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32264791/>
29. MA C, R S, GY O, C Y, I K, SE S, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* [Internet]. 2002 Jun 20 [cited 2024 May 27];417(6891):822–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12075344/>
30. Viveiros A, Gheblawi M, Aujla PK, Sosnowski DK, Seubert JM, Kassiri Z, et al. Sex- and age-specific regulation of ACE2: Insights into severe COVID-19 susceptibility. *J Mol Cell Cardiol* [Internet]. 2022 Mar 1 [cited 2024 May 13];164:13–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34774871/>
31. Muus C, Luecken MD, Eraslan G, Sikkema L, Waghray A, Heimberg G, et al. Single-cell meta-analysis of SARS-CoV-2 entry genes across tissues and demographics. *Nat Med* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2024 May 10];27(3):546–59. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33654293/>
32. Kuba K, Imai Y, Rao S, Gao H, Guo F, Guan B, et al. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat Med* [Internet]. 2005 Aug [cited 2024 May 8];11(8):875–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16007097/>
33. 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* [Internet]. 2020 Apr 16 [cited 2024 May 10];181(2):271-280.e8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32142651/>
34. Monteil V, Kwon H, Prado P, Hagelkrüys A, Wimmer RA, Stahl M, et al. Inhibition of SARS-CoV-2 Infections in Engineered Human Tissues Using Clinical-Grade Soluble Human ACE2. *Cell* [Internet]. 2020 May 14 [cited 2024 May 10];181(4):905-913.e7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32333836/>

35. Raghav S, Ghosh A, Turuk J, Kumar S, Jha A, Madhulika S, et al. Analysis of Indian SARS-CoV-2 Genomes Reveals Prevalence of D614G Mutation in Spike Protein Predicting an Increase in Interaction With TMPRSS2 and Virus Infectivity. *Front Microbiol* [Internet]. 2020 Nov 23 [cited 2024 May 10];11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33329480/>
36. Singh HO, Choudhari R, Nema V, Khan AA. ACE2 and TMPRSS2 polymorphisms in various diseases with special reference to its impact on COVID-19 disease. *Microb Pathog* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2024 May 10];150. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33278516/>
37. Heurich A, Hofmann-Winkler H, Gierer S, Liepold T, Jahn O, Pöhlmann S. TMPRSS2 and ADAM17 cleave ACE2 differentially and only proteolysis by TMPRSS2 augments entry driven by the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein. *J Virol* [Internet]. 2014 Jan 15 [cited 2024 May 10];88(2):1293–307. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24227843/>
38. Qiao Y, Wang XM, Mannan R, Pitchiaya S, Zhang Y, Wotring JW, et al. Targeting transcriptional regulation of SARS-CoV-2 entry factors ACE2 and TMPRSS2. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2021 [cited 2024 May 10];118(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33310900/>
39. Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2024 May 13];23(1):3–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34611326/>
40. Zhang Y, Feng M, He Y, Liu F, Ma R. A bibliometric analysis of the 100 most cited articles describing SARS-CoV-2 variants. *Front Public Health* [Internet]. 2022 Aug 26 [cited 2024 May 14];10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36091553/>
41. Hattab D, Amer MFA, Al-Alami ZM, Bakhtiar A. SARS-CoV-2 journey: from alpha variant to omicron and its sub-variants. *Infection* [Internet]. 2024 [cited 2024 May 27]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38554253/>
42. Li W, Zhang C, Sui J, Kuhn JH, Moore MJ, Luo S, et al. Receptor and viral determinants of SARS-coronavirus adaptation to human ACE2. *EMBO J* [Internet].

- 2005 Apr 20 [cited 2024 May 8];24(8):1634–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15791205/>
43. Damas J, Hughes GM, Keough KC, Painter CA, Persky NS, Corbo M, et al. Broad host range of SARS-CoV-2 predicted by comparative and structural analysis of ACE2 in vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2020 Sep 8 [cited 2024 May 10];117(36):22311–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32826334/>
  44. Shi J, Wen Z, Zhong G, Yang H, Wang C, Huang B, et al. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. *Science* [Internet]. 2020 May 29 [cited 2024 May 10];368(6494):1016–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32269068/>
  45. Halfmann PJ, Iida S, Iwatsuki-Horimoto K, Maemura T, Kiso M, Scheaffer SM, et al. SARS-CoV-2 Omicron virus causes attenuated disease in mice and hamsters. *Nature* [Internet]. 2022 Mar 24 [cited 2024 May 13];603(7902):687–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35062015/>
  46. Oudit GY, Wang K, Viveiros A, Kellner MJ, Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme 2-at the heart of the COVID-19 pandemic. *Cell* [Internet]. 2023 Mar 2 [cited 2024 May 13];186(5):906–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36787743/>
  47. Wang K, Gheblawi M, Nikhanj A, Munan M, MacIntyre E, O’Neil C, et al. Dysregulation of ACE (Angiotensin-Converting Enzyme)-2 and Renin-Angiotensin Peptides in SARS-CoV-2 Mediated Mortality and End-Organ Injuries. *Hypertension* [Internet]. 2022 Feb 1 [cited 2024 May 13];79(2):365–78. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/HYPERTENSIONAHA.121.18295>
  48. Sungnak W, Huang N, Bécavin C, Berg M, HCA Lung Biological Network. SARS-CoV-2 Entry Genes Are Most Highly Expressed in Nasal Goblet and Ciliated Cells within Human Airways. *ArXiv* [Internet]. 2020 Mar 13 [cited 2024 May 10];26(5):681–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32550242>
  49. Hou YJ, Okuda K, Edwards CE, Martinez DR, Asakura T, Dinnon KH, et al. SARS-CoV-2 Reverse Genetics Reveals a Variable Infection Gradient in the Respiratory

- Tract. Cell [Internet]. 2020 Jul 23 [cited 2024 May 10];182(2):429-446.e14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32526206/>
50. Meng B, Abdullahi A, Ferreira IATM, Goonawardane N, Saito A, Kimura I, et al. Altered TMPRSS2 usage by SARS-CoV-2 Omicron impacts infectivity and fusogenicity. *Nature* [Internet]. 2022 Mar 24 [cited 2024 May 13];603(7902):706–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35104837/>
  51. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res* [Internet]. 2000 [cited 2024 May 8];87(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10969042/>
  52. Yeung ML, Teng JLL, Jia L, Zhang C, Huang C, Cai JP, et al. Soluble ACE2-mediated cell entry of SARS-CoV-2 via interaction with proteins related to the renin-angiotensin system. *Cell* [Internet]. 2021 Apr 15 [cited 2024 May 10];184(8):2212-2228.e12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33713620/>
  53. Haga S, Yamamoto N, Nakai-Murakami C, Osawa Y, Tokunaga K, Sata T, et al. Modulation of TNF-alpha-converting enzyme by the spike protein of SARS-CoV and ACE2 induces TNF-alpha production and facilitates viral entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2008 Jun 3 [cited 2024 May 8];105(22):7809–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18490652/>
  54. Patel VB, Clarke N, Wang Z, Fan D, Parajuli N, Basu R, et al. Angiotensin II induced proteolytic cleavage of myocardial ACE2 is mediated by TACE/ADAM-17: a positive feedback mechanism in the RAS. *J Mol Cell Cardiol* [Internet]. 2014 [cited 2024 May 10];66:167–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24332999/>
  55. Chirinos JA, Cohen JB, Zhao L, Hanff T, Sweitzer N, Fang J, et al. Clinical and proteomic correlates of Plasma Angiotensin-converting Enzyme 2 in Human Heart Failure. *Hypertension* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2024 May 10];76(5):1526. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33012888/>
  56. Wallentin L, Lindbäck J, Eriksson N, Hijazi Z, Eikelboom JW, Ezekowitz MD, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) levels in relation to risk factors for COVID-19 in two large cohorts of patients with atrial fibrillation. *Eur Heart J*

- [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2024 May 10];41(41):4037–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32984892/>
57. Narula S, Yusuf S, Chong M, Ramasundarahettige C, Rangarajan S, Bangdiwala SI, et al. Plasma ACE2 and risk of death or cardiometabolic diseases: a case-cohort analysis. *Lancet* [Internet]. 2020 Oct 3 [cited 2024 May 10];396(10256):968–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33010842/>
  58. Pan Y, Wang T, Li Y, Guan T, Lai Y, Shen Y, et al. Association of ACE2 polymorphisms with susceptibility to essential hypertension and dyslipidemia in Xinjiang, China. *Lipids Health Dis* [Internet]. 2018 Oct 20 [cited 2024 May 27];17(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30342552/>
  59. Zhang Q, Cong M, Wang N, Li X, Zhang H, Zhang K, et al. Association of angiotensin-converting enzyme 2 gene polymorphism and enzymatic activity with essential hypertension in different gender: A case-control study. *Medicine* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2024 May 10];97(42). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30335025/>
  60. Cao Y, Li L, Feng Z, Wan S, Huang P, Sun X, et al. Comparative genetic analysis of the novel coronavirus (2019-nCoV/SARS-CoV-2) receptor ACE2 in different populations. *Cell Discov* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2024 May 10];6(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32133153/>
  61. rs2106809 RefSNP Report - dbSNP - NCBI [Internet]. [cited 2024 May 27]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs2106809/>
  62. Sabater Molina M, Nicolás Rocamora E, Bendicho AI, Vázquez EG, Zorio E, Rodriguez FD, et al. Polymorphisms in ACE, ACE2, AGTR1 genes and severity of COVID-19 disease. *PLoS One* [Internet]. 2022 [cited 2024 May 13];17(2):e0263140. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35120165/>
  63. Karakaş Çelik S, Çakmak Genç G, Pişkin N, Açıkgöz B, Altınsoy B, Kurucu İşsiz B, et al. Polymorphisms of ACE (I/D) and ACE2 receptor gene (Rs2106809, Rs2285666) are not related to the clinical course of COVID-19: A case study. *J Med Virol* [Internet]. 2021 Oct 1 [cited 2024 May 10];93(10):5947. Available from: [/pmc/articles/PMC8426884/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35120165/)

64. Liu D, Chen Y, Zhang P, Zhong J, Jin L, Zhang C, et al. Association between circulating levels of ACE2-Ang-(1-7)-MAS axis and ACE2 gene polymorphisms in hypertensive patients. *Medicine (United States)* [Internet]. 2016 Jun 21 [cited 2024 May 28];95(24). Available from: [https://journals.lww.com/md-journal/fulltext/2016/06140/association\\_between\\_circulating\\_levels\\_of.34.aspx](https://journals.lww.com/md-journal/fulltext/2016/06140/association_between_circulating_levels_of.34.aspx)
65. Fan X, Wang Y, Sun K, Zhang W, Yang X, Wang S, et al. Polymorphisms of ACE2 gene are associated with essential hypertension and antihypertensive effects of Captopril in women. *Clin Pharmacol Ther* [Internet]. 2007 Aug [cited 2024 May 8];82(2):187–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17473847/>
66. Hou Y, Zhao J, Martin W, Kallianpur A, Chung MK, Jehi L, et al. New insights into genetic susceptibility of COVID-19: an ACE2 and TMPRSS2 polymorphism analysis. *BMC Med* [Internet]. 2020 Jul 15 [cited 2024 May 10];18(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32664879/>
67. Öztürk R, Taşova Y, Ayaz A. COVID-19: pathogenesis, genetic polymorphism, clinical features and laboratory findings. *Turk J Med Sci* [Internet]. 2020 [cited 2024 May 10];50(SI-1):638–57. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32512673/>
68. Gupta A, Madhavan M V., Sehgal K, Nair N, Mahajan S, Sehrawat TS, et al. Extrapulmonary manifestations of COVID-19. *Nat Med* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2024 May 10];26(7):1017–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32651579/>
69. Caricchio R, Gallucci M, Dass C, Zhang X, Gallucci S, Fleece D, et al. Preliminary predictive criteria for COVID-19 cytokine storm. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2024 May 28];80(1):88–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32978237/>
70. Teuwen LA, Geldhof V, Pasut A, Carmeliet P. COVID-19: the vasculature unleashed. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2024 May 10];20(7):389–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32439870/>
71. 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* [Internet]. 2020 Jul 13 [cited 2024 May 28];24(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32660650/>

72. Cao W, Li T. COVID-19: towards understanding of pathogenesis. *Cell Res* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2024 May 28];30(5):367–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32346073/>
73. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Müller MA, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature* [Internet]. 2020 May 28 [cited 2024 May 10];581(7809):465–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32235945/>
74. Puelles VG, Lütgehetmann M, Lindenmeyer MT, Sperhake JP, Wong MN, Allweiss L, et al. Multiorgan and Renal Tropism of SARS-CoV-2. *N Engl J Med* [Internet]. 2020 Aug 6 [cited 2024 May 28];383(6):590–2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32402155/>
75. Qi F, Qian S, Zhang S, Zhang Z. Single cell RNA sequencing of 13 human tissues identify cell types and receptors of human coronaviruses. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2020 May 21 [cited 2024 May 10];526(1):135–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32199615/>
76. Pan X wu, Xu D, Zhang H, Zhou W, Wang L hui, Cui X gang. Identification of a potential mechanism of acute kidney injury during the COVID-19 outbreak: a study based on single-cell transcriptome analysis. *Intensive Care Med* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2024 May 10];46(6):1114–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32236644/>
77. Ziegler CGK, Allon SJ, Nyquist SK, Mbanjo IM, Miao VN, Tzouanas CN, et al. SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Is an Interferon-Stimulated Gene in Human Airway Epithelial Cells and Is Detected in Specific Cell Subsets across Tissues. *Cell* [Internet]. 2020 May 28 [cited 2024 May 10];181(5):1016-1035.e19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32413319/>
78. Varga Z, Flammer AJ, Steiger P, Haberecker M, Andermatt R, Zinkernagel AS, et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet* [Internet]. 2020 May 2 [cited 2024 May 10];395(10234):1417–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32325026/>
79. Bikdeli B, Madhavan M V., Gupta A, Jimenez D, Burton JR, Der Nigoghossian C, et al. Pharmacological Agents Targeting Thromboinflammation in COVID-19: Review



- and Implications for Future Research. *Thromb Haemost* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2024 May 10];120(7):1004–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32473596/>
80. Merad M, Martin JC. Author Correction: Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2024 May 10];20(7):448. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32488203>
81. Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet* [Internet]. 2020 Mar 28 [cited 2024 May 10];395(10229):1033–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32192578/>
82. Cummings MJ, Baldwin MR, Abrams D, Jacobson SD, Meyer BJ, Balough EM, et al. Epidemiology, clinical course, and outcomes of critically ill adults with COVID-19 in New York City: a prospective cohort study. *Lancet* [Internet]. 2020 Jun 6 [cited 2024 May 10];395(10239):1763–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32442528/>
83. 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* [Internet]. 2020 Mar 28 [cited 2024 May 10];395(10229):1054–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32171076/>
84. Rice GI, Jones AL, Grant PJ, Carter AM, Turner AJ, Hooper NM. Circulating activities of angiotensin-converting enzyme, its homolog, angiotensin-converting enzyme 2, and neprilysin in a family study. *Hypertension* [Internet]. 2006 Nov [cited 2024 May 8];48(5):914–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17000927/>
85. Úri K, Fagyas M, Kertész A, Borbély A, Jenei C, Bene O, et al. Circulating ACE2 activity correlates with cardiovascular disease development. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2024 May 10];17(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27965422/>

86. Palau V, Riera M, Soler MJ. ADAM17 inhibition may exert a protective effect on COVID-19. *Nephrol Dial Transplant* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2024 May 10];35(6):1071–2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32291449/>
87. Prabakaran P, Xiao X, Dimitrov DS. A model of the ACE2 structure and function as a SARS-CoV receptor. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2004 Jan 1 [cited 2024 May 8];314(1):235. Available from: </pmc/articles/PMC7117316/>
88. Li Y, Zhou W, Yang L, You R. Physiological and pathological regulation of ACE2, the SARS-CoV-2 receptor. *Pharmacol Res* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2024 May 10];157. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32302706/>
89. Peetre C, Thysell H, Grubb A, Olsson I. A tumor necrosis factor binding protein is present in human biological fluids. *Eur J Haematol* [Internet]. 1988 [cited 2024 May 8];41(5):414–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2850215/>
90. Diamantstein T, Osawa H, Mouzaki A, Josimovic-Alasevic O. Regulation of interleukin-2 receptor expression and receptor release. *Mol Immunol* [Internet]. 1986 [cited 2024 May 8];23(11):1165–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3102950/>
91. Martínez EL, Martínez RS, Balsa EDM, Rincon JMR. Soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) as a prognostic marker in COVID-19 patients: a systematic review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* [Internet]. 2024 Jan 1 [cited 2024 May 13];28(2):852–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38305628/>
92. Lambert DW, Yarski M, Warner FJ, Thornhill P, Parkin ET, Smith AI, et al. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Convertase (ADAM17) Mediates Regulated Ectodomain Shedding of the Severe-acute Respiratory Syndrome-Coronavirus (SARS-CoV) Receptor, Angiotensin-converting Enzyme-2 (ACE2). *J Biol Chem* [Internet]. 2005 Aug 8 [cited 2024 May 28];280(34):30113. Available from: </pmc/articles/PMC8062222/>
93. Swärd P, Edsfeldt A, Reepalu A, Jehpsson L, Rosengren BE, Karlsson MK. Age and sex differences in soluble ACE2 may give insights for COVID-19. *Crit Care* [Internet]. 2020 May 14 [cited 2024 May 10];24(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32410690/>

94. Leow MKS. Clarifying the controversial risk-benefit profile of soluble ACE2 in COVID-19. *Crit Care* [Internet]. 2020 Jul 6 [cited 2024 May 28];24(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32631373/>
95. Cocozza F, Névo N, Piovesana E, Lahaye X, Buchrieser J, Schwartz O, et al. Extracellular vesicles containing ACE2 efficiently prevent infection by SARS-CoV-2 Spike protein-containing virus. *J Extracell Vesicles* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2024 May 10];10(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33391636/>
96. Zoufaly A, Poglitsch M, Aberle JH, Hoepler W, Seitz T, Traugott M, et al. Human recombinant soluble ACE2 in severe COVID-19. *Lancet Respir Med* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2024 May 10];8(11):1154–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33131609/>
97. Zhang L, Guo H. Biomarkers of COVID-19 and technologies to combat SARS-CoV-2. *Adv Biomark Sci Technol* [Internet]. 2020 [cited 2024 May 28];2:1–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33511330/>
98. Hodges G, Pallisgaard J, Schjerning Olsen AM, McGettigan P, Andersen M, Krogager M, et al. Association between biomarkers and COVID-19 severity and mortality: a nationwide Danish cohort study. *BMJ Open* [Internet]. 2020 Dec 2 [cited 2024 May 28];10(12). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33268425/>
99. Malik P, Patel U, Mehta D, Patel N, Kelkar R, Akrmah M, et al. Biomarkers and outcomes of COVID-19 hospitalisations: systematic review and meta-analysis. *BMJ Evid Based Med* [Internet]. 2021 Jun 1 [cited 2024 May 10];26(3):107–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32934000/>
100. Sadeghi-Haddad-Zavareh M, Bayani M, Shokri M, Ebrahimpour S, Babazadeh A, Mehraeen R, et al. C-Reactive Protein as a Prognostic Indicator in COVID-19 Patients. *Interdiscip Perspect Infect Dis* [Internet]. 2021 [cited 2024 May 28];2021. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33968148/>
101. Santa Cruz A, Mendes-Frias A, Oliveira AI, Dias L, Matos AR, Carvalho A, et al. Interleukin-6 Is a Biomarker for the Development of Fatal Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Pneumonia. *Front Immunol* [Internet]. 2021 Feb 18 [cited 2024 May 28];12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33679753/>

102. Dupont V, Kanagaratnam L, Goury A, Poitevin G, Bard M, Julien G, et al. Excess Soluble fms-like Tyrosine Kinase 1 Correlates With Endothelial Dysfunction and Organ Failure in Critically Ill Coronavirus Disease 2019 Patients. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2021 May 15 [cited 2024 May 28];72(10):1834–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32672790/>
103. Myhre PL, Prebensen C, Strand H, Røysland R, Jonassen CM, Rangberg A, et al. Growth Differentiation Factor 15 Provides Prognostic Information Superior to Established Cardiovascular and Inflammatory Biomarkers in Unselected Patients Hospitalized With COVID-19. *Circulation* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2024 May 10];142(22):2128–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33058695/>
104. Wischhusen J, Melero I, Fridman WH. Growth/Differentiation Factor-15 (GDF-15): From Biomarker to Novel Targetable Immune Checkpoint. *Front Immunol* [Internet]. 2020 May 19 [cited 2024 May 28];11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32508832/>
105. Wollert KC, Kempf T, Wallentin L. Growth Differentiation Factor 15 as a Biomarker in Cardiovascular Disease. *Clin Chem* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2024 May 10];63(1):140–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28062617/>
106. Kato ET, Morrow DA, Guo J, Berg DD, Blazing MA, Bohula EA, et al. Growth differentiation factor 15 and cardiovascular risk: individual patient meta-analysis. *Eur Heart J* [Internet]. 2023 Jan 21 [cited 2024 May 28];44(4):293–300. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36303404/>
107. Kirchhof P, Benussi S, Kotecha D, Ahlsson A, Atar D, Casadei B, et al. 2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS. *Eur Heart J* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2024 May 28];37(38). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27567408/>
108. Rochette L, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. GDF15: an emerging modulator of immunity and a strategy in COVID-19 in association with iron metabolism. *Trends Endocrinol Metab* [Internet]. 2021 Nov 1 [cited 2024 May 28];32(11):875–89. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34593305/>
109. Babalghith AO, Al-kuraishy HM, Al-Gareeb AI, De Waard M, Sabatier JM, Saad HM, et al. The Potential Role of Growth Differentiation Factor 15 in COVID-19: A

- Corollary Subjective Effect or Not? Diagnostics (Basel) [Internet]. 2022 Sep 1 [cited 2024 May 28];12(9). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36140453/>
110. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *Journal of Clinical Investigation* [Internet]. 2003 Mar 3 [cited 2024 May 28];111(5):649. Available from: </pmc/articles/PMC151901/>
  111. Greco M, Palumbo C, Sicuro F, Lobreglio G. Soluble Fms-Like Tyrosine Kinase-1 Is A Marker of Endothelial Dysfunction During Sepsis. *J Clin Med Res* [Internet]. 2018 [cited 2024 May 28];10(9):700–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30116440/>
  112. Negro A, Fama A, Penna D, Belloni L, Zerbini A, Giuri PG. SFLT-1 levels in COVID-19 patients: Association with outcome and thrombosis. *Am J Hematol* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2024 May 10];96(2):E41–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33108012/>
  113. 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* [Internet]. 2020 Feb 15 [cited 2024 May 10];395(10223):497–506. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31986264/>
  114. Zhang J jin, Dong X, Cao Y yuan, Yuan Y dong, Yang Y bin, Yan Y qin, et al. Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China. *Allergy* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2024 May 28];75(7):1730–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32077115/>
  115. Weiss P, Murdoch DR. Clinical course and mortality risk of severe COVID-19. *Lancet* [Internet]. 2020 Mar 28 [cited 2024 May 10];395(10229):1014–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32197108/>
  116. Jordan RE, Adab P, Cheng KK. Covid-19: risk factors for severe disease and death. *BMJ* [Internet]. 2020 Mar 26 [cited 2024 May 28];368. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32217618/>
  117. South AM, Diz DI, Chappell MC. COVID-19, ACE2, and the cardiovascular consequences. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2024

- May 10];318(5):H1084–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32228252/>
118. Hamming I, Timens W, Bulthuis MLC, Lely AT, Navis GJ, van Goor H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J Pathol* [Internet]. 2004 Jun [cited 2024 May 8];203(2):631–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15141377/>
  119. Stelzig KE, Canepa-Escaro F, Schiliro M, Berdnikovs S, Prakash YS, Chiarella SE. Estrogen regulates the expression of SARS-CoV-2 receptor ACE2 in differentiated airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2024 May 28];318(6):1280–1. Available from: [www.ajplung.org](http://www.ajplung.org)
  120. Baratchian M, McManus JM, Berk MP, Nakamura F, Mukhopadhyay S, Xu W, et al. Androgen regulation of pulmonary AR, TMPRSS2 and ACE2 with implications for sex-discordant COVID-19 outcomes. *Sci Rep* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2024 May 10];11(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34045511/>
  121. Ciaglia E, Vecchione C, Puca AA. COVID-19 Infection and Circulating ACE2 Levels: Protective Role in Women and Children. *Front Pediatr* [Internet]. 2020 Apr 23 [cited 2024 May 10];8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32391299/>
  122. Ludvigsson JF. Systematic review of COVID-19 in children shows milder cases and a better prognosis than adults. *Acta Paediatr* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2024 May 15];109(6):1088–95. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/apa.15270>
  123. 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* [Internet]. 2020 Apr 30 [cited 2024 May 10];382(18):1708–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32109013/>
  124. Obukhov AG, Stevens BR, Prasad R, Calzi SL, Boulton ME, Raizada MK, et al. SARS-CoV-2 Infections and ACE2: Clinical Outcomes Linked With Increased Morbidity and Mortality in Individuals With Diabetes. *Diabetes* [Internet]. 2020 [cited 2024 May 10];69(9):1875. Available from: [/pmc/articles/PMC7458035/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32109013/)
  125. Müller JA, Groß R, Conzelmann C, Krüger J, Merle U, Steinhart J, et al. SARS-CoV-2 infects and replicates in cells of the human endocrine and exocrine pancreas. *Nat*

- Metab [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2024 May 10];3(2):149–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33536639/>
126. Reiterer M, Rajan M, Gómez-Banoy N, Lau JD, Gomez-Escobar LG, Ma L, et al. Hyperglycemia in acute COVID-19 is characterized by insulin resistance and adipose tissue infectivity by SARS-CoV-2. *Cell Metab* [Internet]. 2021 Nov 2 [cited 2024 May 10];33(11):2174–2188.e5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34599884/>
  127. Lucijanić M, Živković NP, Režić T, Durlen I, Stojić J, Jurin I, et al. The performance of the WHO COVID-19 severity classification, COVID-GRAM, VACO Index, 4C Mortality, and CURB-65 prognostic scores in hospitalized COVID-19 patients: data on 4014 patients from a tertiary center registry. *Croat Med J* [Internet]. 2023 Feb 1 [cited 2024 May 13];64(1):13–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36864814/>
  128. Díaz-Troyano N, Gabriel-Medina P, Weber S, Klammer M, Barquín-Delpino R, Castillo-Ribelles L, et al. Soluble Angiotensin-Converting Enzyme 2 as a Prognostic Biomarker for Disease Progression in Patients Infected with SARS-CoV-2. *Diagnostics (Basel)* [Internet]. 2022 Apr 1 [cited 2024 May 10];12(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35453934/>
  129. Anguiano L, Riera M, Pascual J, Valdivielso JM, Barrios C, Betriu A, et al. Circulating angiotensin-converting enzyme 2 activity in patients with chronic kidney disease without previous history of cardiovascular disease. *Nephrol Dial Transplant* [Internet]. 2015 Jul 1 [cited 2024 May 10];30(7):1176–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25813276/>
  130. Beyerstedt S, Casaro EB, Rangel ÉB. COVID-19: angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) expression and tissue susceptibility to SARS-CoV-2 infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2024 May 10];40(5):905–19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33389262/>
  131. Gallo G, Calvez V, Savoia C. Hypertension and COVID-19: Current Evidence and Perspectives. *High Blood Press Cardiovasc Prev* [Internet]. 2022 Mar 1 [cited 2024 May 13];29(2):115–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35184271/>

132. Liu Y, Pan Y, Yin Y, Chen W, Li X. Association of dyslipidemia with the severity and mortality of coronavirus disease 2019 (COVID-19): a meta-analysis. *Virology* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2024 May 10];18(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34315474/>
133. Rubino F, Amiel SA, Zimmet P, Alberti G, Bornstein S, Eckel RH, et al. New-Onset Diabetes in Covid-19. *N Engl J Med* [Internet]. 2020 Aug 20 [cited 2024 May 28];383(8):789–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32530585/>
134. Zhou Y, Chi J, Lv W, Wang Y. Obesity and diabetes as high-risk factors for severe coronavirus disease 2019 (Covid-19). *Diabetes Metab Res Rev* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2024 May 10];37(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32588943/>
135. de Leeuw AJM, Oude Luttikhuis MAM, Wellen AC, Müller C, Calkhoven CF. Obesity and its impact on COVID-19. *J Mol Med (Berl)* [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2024 May 13];99(7):899–915. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33824998/>
136. Demeulemeester F, de Punder K, van Heijningen M, van Doesburg F. Obesity as a Risk Factor for Severe COVID-19 and Complications: A Review. *Cells* [Internet]. 2021 [cited 2024 May 10];10(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33920604/>
137. Rojo-Martínez G, Valdés S, Soriguer F, Vendrell J, Urrutia I, Pérez V, et al. Incidence of diabetes mellitus in Spain as results of the nation-wide cohort di@bet.es study. *Sci Rep* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2024 May 10];10(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32066839/>
138. Menéndez E, Delgado E, Fernández-Vega F, Prieto MA, Bordiú E, Calle A, et al. Prevalencia, diagnóstico, tratamiento y control de la hipertensión arterial en España. Resultados del estudio Di@bet.es. *Rev Esp Cardiol* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2024 May 10];69(6):572–8. Available from: <http://www.revespcardiol.org/es-prevalencia-diagnostico-tratamiento-control-hipertension-articulo-S030089321600035X>
139. Sabaka P, Koščálová A, Straka I, Hodosy J, Lipták R, Kmotorková B, et al. Role of interleukin 6 as a predictive factor for a severe course of Covid-19: retrospective data analysis of patients from a long-term care facility during Covid-19 outbreak. *BMC*



- Infect Dis [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2024 May 28];21(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33781216/>
140. Mokhtari T, Hassani F, Ghaffari N, Ebrahimi B, Yarahmadi A, Hassanzadeh G. COVID-19 and multiorgan failure: A narrative review on potential mechanisms. *J Mol Histol* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2024 May 10];51(6):613. Available from: </pmc/articles/PMC7533045/>
  141. Garrido I, Liberal R, Macedo G. Review article: COVID-19 and liver disease-what we know on 1st May 2020. *Aliment Pharmacol Ther* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2024 May 10];52(2):267–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32402090/>
  142. Lei F, Liu YM, Zhou F, Qin JJ, Zhang P, Zhu L, et al. Longitudinal Association Between Markers of Liver Injury and Mortality in COVID-19 in China. *Hepatology* [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2024 May 10];72(2):389–98. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32359177/>
  143. Zhang C, Shi L, Wang FS. Liver injury in COVID-19: management and challenges. *Lancet Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2024 May 10];5(5):428–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32145190/>
  144. Younis I, Sarwar S, Butt Z, Tanveer S, Qaadir A, Jadoon NA. Clinical characteristics, predictors, and survival among patients with hepatopulmonary syndrome. *Ann Hepatol*. 2015 May 1;14(3):354–60.
  145. Barrantes FJ. The constellation of cholesterol-dependent processes associated with SARS-CoV-2 infection. *Prog Lipid Res* [Internet]. 2022 Jul 1 [cited 2024 May 13];87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35513161/>
  146. Palacios-Rápalo SN, De Jesús-González LA, Cordero-Rivera CD, Farfan-Morales CN, Osuna-Ramos JF, Martínez-Mier G, et al. Cholesterol-Rich Lipid Rafts as Platforms for SARS-CoV-2 Entry. *Front Immunol* [Internet]. 2021 Dec 16 [cited 2024 May 10];12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34975904/>
  147. Robertson J, Nellgård B, Hultén LM, Nilsson S, Dalla K, Börjesson M, et al. Sex difference in circulating soluble form of ACE2 protein in moderate and severe COVID-19 and healthy controls. *Front Med (Lausanne)* [Internet]. 2022 Dec 8 [cited 2024 May 13];9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36569121/>

148. Davidson AM, Wysocki J, Battle D. Interaction of SARS-CoV-2 and Other Coronavirus With ACE (Angiotensin-Converting Enzyme)-2 as Their Main Receptor: Therapeutic Implications. *Hypertension* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2024 May 28];76(5):1339–49. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32851855/>
149. Bernal JL, Andrews N, Gower C, Robertson C, Stowe J, Tessier E, et al. Effectiveness of the Pfizer-BioNTech and Oxford-AstraZeneca vaccines on covid-19 related symptoms, hospital admissions, and mortality in older adults in England: test negative case-control study. *BMJ* [Internet]. 2021 May 13 [cited 2024 May 10];373. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33985964/>
150. Zech F, Jung C, Jacob T, Kirchhoff F. Causes and Consequences of Coronavirus Spike Protein Variability. *Viruses* [Internet]. 2024 Feb 1 [cited 2024 May 13];16(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38399953/>
151. Shum MHH, Lee Y, Tam L, Xia H, Chung OLW, Guo Z, et al. Binding affinity between coronavirus spike protein and human ACE2 receptor. *Comput Struct Biotechnol J* [Internet]. 2024 Dec 1 [cited 2024 May 13];23:759–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38304547/>
152. Kaushal K, Kaur H, Sarma P, Bhattacharyya A, Sharma DJ, Prajapat M, et al. Serum ferritin as a predictive biomarker in COVID-19. A systematic review, meta-analysis and meta-regression analysis. *J Crit Care* [Internet]. 2022 Feb 1 [cited 2024 May 13];67:172–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34808527/>
153. Venter C, Bezuidenhout JA, Laubscher GJ, Lourens PJ, Steenkamp J, Kell DB, et al. Erythrocyte, Platelet, Serum Ferritin, and P-Selectin Pathophysiology Implicated in Severe Hypercoagulation and Vascular Complications in COVID-19. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2024 May 10];21(21):1–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33153161/>
154. Weiss G, Ganz T, Goodnough LT. Anemia of inflammation. *Blood* [Internet]. 2019 Jan 3 [cited 2024 May 28];133(1):40–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30401705/>
155. Russo A, Tellone E, Barreca D, Ficarra S, Laganà G. Implication of COVID-19 on Erythrocytes Functionality: Red Blood Cell Biochemical Implications and Morpho-

- Functional Aspects. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022 Feb 1 [cited 2024 May 13];23(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35216286/>
156. Diederich L, Suvorava T, Sansone R, Keller TCS, Barbarino F, Sutton TR, et al. On the Effects of Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide on Red Blood Cell Deformability. *Front Physiol* [Internet]. 2018 May 11 [cited 2024 May 10];9(MAY). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29867516/>
157. 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* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2024 May 10];12(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32094336/>
158. Zhang S, Liu Y, Wang X, Yang L, Li H, Wang Y, et al. SARS-CoV-2 binds platelet ACE2 to enhance thrombosis in COVID-19. *J Hematol Oncol* [Internet]. 2020 Sep 4 [cited 2024 May 10];13(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32887634/>
159. Terpos E, Ntanasis-Stathopoulos I, Elalamy I, Kastritis E, Sergentanis TN, Politou M, et al. Hematological findings and complications of COVID-19. *Am J Hematol* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2024 May 10];95(7):834–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32282949/>
160. Qu R, Ling Y, Zhang Y hui zhi, Wei L ya, Chen X, Li X mian, et al. Platelet-to-lymphocyte ratio is associated with prognosis in patients with coronavirus disease-19. *J Med Virol* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2024 May 10];92(9):1533–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32181903/>
161. Connors JM, Levy JH. COVID-19 and its implications for thrombosis and anticoagulation. *Blood* [Internet]. 2020 Jun 4 [cited 2024 May 10];135(23):2033–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32339221/>
162. Thachil J, Tang N, Gando S, Falanga A, Cattaneo M, Levi M, et al. ISTH interim guidance on recognition and management of coagulopathy in COVID-19. *J Thromb Haemost* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2024 May 10];18(5):1023–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32338827/>
163. Ranucci M, Ballotta A, Di Dedda U, Bayshnikova E, Dei Poli M, Resta M, et al. The procoagulant pattern of patients with COVID-19 acute respiratory distress syndrome.

- J Thromb Haemost [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2024 May 10];18(7):1747–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32302448/>
164. Wrona M, Skrypnik D. New-Onset Diabetes Mellitus, Hypertension, Dyslipidaemia as Sequelae of COVID-19 Infection-Systematic Review. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 2022 Oct 1 [cited 2024 May 13];19(20). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36293857/>
  165. Lechuga GC, Morel CM, De-Simone SG. Hematological alterations associated with long COVID-19. *Front Physiol* [Internet]. 2023 [cited 2024 May 28];14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37565145/>
  166. Davis HE, McCorkell L, Vogel JM, Topol EJ. Long COVID: major findings, mechanisms and recommendations. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2023 Mar 1 [cited 2024 May 13];21(3):133–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36639608/>
  167. Devaux CA, Rolain JM, Raoult D. ACE2 receptor polymorphism: Susceptibility to SARS-CoV-2, hypertension, multi-organ failure, and COVID-19 disease outcome. *J Microbiol Immunol Infect* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2024 May 10];53(3):425–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32414646/>
  168. Chen YY, Zhang P, Zhou XM, Liu D, Zhong JC, Zhang CJ, et al. Relationship between genetic variants of ACE2 gene and circulating levels of ACE2 and its metabolites. *J Clin Pharm Ther* [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2024 May 10];43(2):189–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28895159/>
  169. Suleiman A, Rafea T, Alrawi A, Dawood M. The impact of ACE2 genetic polymorphisms (rs2106809 and rs2074192) on gender susceptibility to COVID-19 infection and recovery: A systematic review. *Baghdad Journal of Biochemistry and Applied Biological Sciences*. 2021 Sep 23;2(03):167–80.
  170. Rueda F, Lupón J, García-García C, Cediél G, Aranda Nevado MC, Serra Gregori J, et al. Acute-phase dynamics and prognostic value of growth differentiation factor-15 in ST-elevation myocardial infarction. *Clin Chem Lab Med* [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2024 May 19];57(7):1093–101. Available from: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/cclm-2018-1189/html>

171. Ren H, Lin Y, Huang L, Xu W, Luo D, Zhang C. Association of genetic polymorphisms with COVID-19 infection and outcomes: An updated meta-analysis based on 62 studies. *Heliyon* [Internet]. 2023 Jan 15 [cited 2024 May 13];10(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38187247/>
172. Kragstrup TW, Singh HS, Grundberg I, Nielsen ALL, Rivellesse F, Mehta A, et al. Plasma ACE2 predicts outcome of COVID-19 in hospitalized patients. *PLoS One* [Internet]. 2021 Jun 1 [cited 2024 May 10];16(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34086837/>
173. van Lier D, Kox M, Santos K, van der Hoeven H, Pillay J, Pickkers P. Increased blood angiotensin converting enzyme 2 activity in critically ill COVID-19 patients. *ERJ Open Res* [Internet]. 2021 [cited 2024 May 10];7(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33738305/>
174. Lundström A, Ziegler L, Havervall S, Rudberg AS, von Meijenfeldt F, Lisman T, et al. Soluble angiotensin-converting enzyme 2 is transiently elevated in COVID-19 and correlates with specific inflammatory and endothelial markers. *J Med Virol* [Internet]. 2021 Oct 1 [cited 2024 May 10];93(10):5908–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34138483/>
175. Pérez PC, Fernández LM, García-Cosío MD, Delgado JF. Sistema renina-angiotensina-aldosterona y COVID19. Implicaciones clínicas. *Revista Española de Cardiología Suplementos*. 2020 Jan 1;20(SE):27–32.
176. Krishnamurthy S, Lockey RF, Kolliputi N. Soluble ACE2 as a potential therapy for COVID-19. *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2024 May 28];320(3):C279–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33502950/>
177. Benetti E, Tita R, Spiga O, Ciolfi A, Birolo G, Bruselles A, et al. ACE2 gene variants may underlie interindividual variability and susceptibility to COVID-19 in the Italian population. *Eur J Hum Genet* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2024 May 10];28(11):1602–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32681121/>

*Siendo uno mismo en cualquier parte* 🎵🎵🎵