



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**  
**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS**



**“LA EMERGENCIA HEMATOPOYÉTICA Y EL ESPECTRO  
INMUNOLÓGICO EN EL PRONÓSTICO CLÍNICO DE COVID-19”**

**TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTORA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

**M. en C. Rubí Esmeralda Romo Rodríguez**

**DIRECTOR DE TESIS:    CO-DIRECTORA DE    ASESORES DE TESIS:**  
**TESIS:**

**Dr. Eduardo Monjaraz  
Guzmán**

**Dra. Rosana Pelayo  
Camacho**

**Dra. Bertha Alicia León  
Chávez**

**Dr. Martín Pérez Santos**

**Dra. María Antonieta  
Chávez González**

**Dra. Maricruz Anaya Ruiz**

Puebla, Puebla, enero de 2023

## Contenido

LISTA DE ABREVIATURAS .....	4
RESUMEN .....	6
MARCO TEÓRICO .....	7
Introducción.....	7
Enfermedad: COVID-19.....	10
Epidemiología de la COVID-19 .....	10
ANTECEDENTES .....	13
Hematopoyesis de emergencia .....	13
Inmunidad innata anti-viral.....	16
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	19
HIPÓTESIS .....	19
OBJETIVO GENERAL.....	20
OBJETIVOS PARTICULARES.....	20
METODOLOGÍA.....	21
Diagrama de flujo de la metodología general .....	21
Características de los pacientes con COVID-19.....	21
Recolección de muestras de pacientes con COVID-19.....	22
Traslado y procesamiento de muestras .....	24
Parámetros de laboratorio clínico y escalas de severidad .....	25
Evaluación de poblaciones celulares hematopoyéticas .....	26
Determinación de factores solubles inflamatorios .....	28
Análisis estadístico.....	29
RESULTADOS .....	30
Demografía y espectro clínico de los pacientes con COVID-19 .....	30
Parámetros de laboratorio en los pacientes con COVID-19 y la búsqueda de perfiles asociados a pronóstico .....	32
El riesgo de letalidad por COVID-19 y su asociación con condiciones metabólicas preexistentes .....	43
Combinaciones de riesgo en pacientes con COVID-19: presencia de enfermedades metabólicas preexistentes y perfiles hematológicos de mal pronóstico.....	46
Un microambiente proinflamatorio en pacientes <65 años con COVID-19.....	48
Panorama inmunológico en pacientes con COVID-19.....	50

Perfil para estratificación de pacientes <65 años con COVID-19 .....	52
DISCUSIÓN .....	54
CONCLUSIONES .....	64
BIBLIOGRAFÍA.....	66
FINANCIAMIENTOS .....	75
Anexo 1. Carta de consentimiento informado para participación en el estudio. ....	76
Anexo 2. Instrumento de recolección. ....	79
Anexo 3. Frecuencia, tasa de letalidad (CFR) y riesgo relativo de muerte (RR <sub>d</sub> ) por COVID-19 en la cohorte por género, rango de edad, número y tipo de comorbilidades.....	82
Anexo 5. Subpoblaciones de monocitos .....	90
PUBLICACIONES .....	91

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>CALL</b>	<i>Comorbidity, Age, Lymphocyte and LDH</i>
<b>CD</b>	Grupos de diferenciación, <i>cluster of differentiation</i>
<b>cDC</b>	Células dendríticas convencionales
<b>CFR</b>	Tasa de letalidad, <i>case-fatality rate</i>
<b>CMHC</b>	Concentración de hemoglobina corpuscular media
<b>COVID-19</b>	Enfermedad por coronavirus 2019
<b>CRP</b>	Proteína C reactiva, <i>C-reactive protein</i>
<b>CTH</b>	Células troncales hematopoyéticas
<b>CTPHs</b>	Células troncales y progenitoras hematopoyéticas
<b>CURB-65</b>	<i>Confusion, Urea, Respiratory rate, Blood pressure and age ≥65</i>
<b>CXCL-12</b>	Ligando 12 de quimiocinas con motivo C-X-C
<b>DALY</b>	Años vividos con discapacidad
<b>DAMPs</b>	Patrones moleculares asociados a daño
<b>DM2</b>	Diabetes mellitus tipo 2
<b>ECA2</b>	Enzima convertidora de angiotensina 2
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>FGF-2</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos-2
<b>FiO<sub>2</sub></b>	Fracción de oxígeno inspirado
<b>FLT-3L</b>	Ligando 3 de tirosinasa relacionado a Fms
<b>G-CSF</b>	Factor estimulante de colonia de granulocitos
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulante de colonia de granulocitos y monocitos
<b>HBV</b>	Virus de la hepatitis B
<b>HCM</b>	Hemoglobina corpuscular media
<b>HCO<sub>3</sub></b>	Bicarbonato
<b>HCV</b>	Virus de la hepatitis C
<b>HGZ</b>	Hospital General de Zona
<b>HSV-1</b>	Virus del herpes simple 1
<b>HTA</b>	Hipertensión arterial
<b>IFN</b>	Interferón
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IMSS</b>	Instituto Mexicano del Seguro Social
<b>IP-10/CXCL10</b>	Proteína inducida por interferón gamma/Ligando 10 de quimiocinas con motivo C-X-C
<b>IRC</b>	Insuficiencia renal crónica
<b>ITAC/CXCL11</b>	Quimioatrayente alfa de células T inducible por interferón/Ligando 11 de quimiocinas con motivo C-X-C
<b>LAMPs</b>	Patrones moleculares asociados a estilos de vida
<b>LDH</b>	Lactato deshidrogenasa
<b>MAMPs</b>	Patrones moleculares asociados a microbios
<b>MCP-1</b>	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
<b>MERS-CoV</b>	Coronavirus causante del síndrome respiratorio de Oriente Medio

<b>MFI</b>	<i>Mediana de intensidad de fluorescencia</i>
<b>MIG/CXCL-9</b>	Monoquina inducida por interferón gamma/Ligando 9 de quimiocinas con motivo C-X-C
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	Proteína inflamatoria de macrófagos 1-alfa
<b>NCR</b>	Receptores de citotoxicidad natural
<b>NEWS2</b>	<i>National Early Warning Score</i>
<b>NK</b>	Células asesinas naturales, <i>natural killer</i>
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PaCO<sub>2</sub></b>	Presión parcial de dióxido de carbono
<b>PAMPs</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos
<b>PaO<sub>2</sub></b>	Presión parcial de oxígeno
<b>PBS</b>	Solución de fosatos salinos
<b>pDC</b>	Células dendríticas plasmacitoides
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>PL</b>	Progenitor linfoide
<b>PML</b>	Progenitor multilinfoide
<b>PMP</b>	Progenitor multipotente
<b>PRR</b>	Receptores de reconocimiento de patrones
<b>RR<sub>d</sub></b>	Riesgo relativo de muerte
<b>RT-PCR</b>	Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real
<b>SaO<sub>2</sub></b>	Saturación de oxígeno
<b>SARS-CoV-2</b>	Coronavirus de síndrome respiratorio agudo 2
<b>SCF</b>	Factor de células troncales
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>SOFA</b>	<i>Sequential Organ Failure Assessment</i>
<b>TCR</b>	Receptor de células T
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante-beta
<b>TLR</b>	Receptores tipo Toll
<b>TMPRSS2</b>	Serín proteasa transmembranal 2
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>tSNE</b>	<i>t-distributed stochastic neighbor embedding</i>
<b>UCI</b>	Unidad de cuidados intensivos
<b>VCM</b>	Volumen corpuscular medio
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento vascular-endotelial
<b>VPM</b>	Volumen plaquetario medio
<b>YLL</b>	Años de vida perdidos debido a muerte prematura

## RESUMEN

México se encuentra entre los países con mayores tasas de letalidad debido a la pandemia por COVID-19, con más de la mitad de las defunciones ocurridas en adultos de mediana edad. La alta prevalencia de enfermedades metabólicas crónicas en la población favorece el desarrollo de formas severas de la infección por SARS-CoV-2. Sin embargo, los mecanismos biológicos involucrados no han sido determinados, particularmente en adultos <65 años. Nuestro estudio prospectivo comprende 245 pacientes adultos con ingreso hospitalario por COVID-19, donde el contenido celular e inflamatorio fue evaluado en muestras de sangre periférica, tanto en la etapa aguda como en la convalecencia.

Encontramos que el 55.2% de las defunciones se registraron en adultos entre 21-64 años. A los 7 días de hospitalización, es posible identificar un perfil pronóstico combinando datos clínicos, parámetros de laboratorio y el panorama inflamatorio e inmunohematológico.

En individuos <65 años con COVID-19 se identificó un incremento del riesgo de desenlaces desfavorables con los siguientes parámetros clínicos: elevación en la frecuencia de neutrófilos, del valor de NLR, de los niveles de dímero D, proteína C reactiva y lactato deshidrogenasa; y una disminución en la frecuencia de linfocitos. Además, se observó que los pacientes supervivientes mostraron una linfopoyesis de emergencia, constituida por células NK y células dendríticas (pDCs y cDC2) capaces de eliminar al agente patógeno, al contrario, pacientes con desenlace fatal desarrollaron una mielopoyesis de emergencia, constituida por neutrófilos inmaduros y monocitos HLA-DR<sup>lo</sup>, incapaces de resolver la infección, fenómeno que se agrava más en pacientes con enfermedades metabólicas preexistentes.

Identificamos que los pacientes con insuficiencia renal crónica, como única o en combinación con otras comorbilidades, confiere el mayor riesgo de fatalidad por COVID-19.

## MARCO TEÓRICO

### Introducción

México fue severamente afectado por COVID-19, con más de 5.1 veces exceso de defunciones por todas las causas y 2.5 muertes confirmadas por COVID-19 por cada 1,000 habitantes en dos años, cifras similares a las registradas por otros países como Estados Unidos de América, Brasil, Perú o Rusia, posicionándolo entre los primeros 5 países con mayor exceso de defunciones (1).

La enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19), la cual es causada por el coronavirus de síndrome respiratorio agudo dos (SARS-CoV-2), fue declarada pandemia por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en marzo 11 del 2020 (2). Al 18 de noviembre del 2022, se han reportado mundialmente a la OMS más de 622 millones de casos confirmados y 6,548,492 muertes por COVID-19 (<https://covid19.who.int/>). Ante esta emergencia sanitaria, la comunidad científica internacional multiplicó sus esfuerzos para identificar la patobiología de la enfermedad y desarrollar estrategias para su tratamiento y control, logrando a la fecha la administración de más de 12,860 millones de dosis de vacunas.

A pesar de las estrategias para prevenir presentaciones severas de la enfermedad por COVID-19, la reducción en las tasas de letalidad en algunas regiones vulnerables del mundo no sólo requiere del conocimiento a detalle entre la biología de la infección y los perfiles inmuno-hematológicos de la población, ya que de estos dependerá en gran medida, los desenlaces clínicos de los pacientes. La edad avanzada, ser del género masculino y padecer comorbilidades, como obesidad, diabetes o insuficiencia renal crónica (IRC), han sido identificados como factores de riesgo de COVID-19 severo (3).

México cuenta con una población cuya media de edad es más joven que la mundial (29.3 años); sin embargo, el desafío para la población mexicana es alarmante, ya que ocupa los primeros lugares de prevalencia de sobrepeso/obesidad, diabetes e IRC (4–6). Además, otro gran desafío durante la pandemia ha sido la estratificación de pacientes, ya que la enfermedad cuenta con un amplio espectro clínico, dificultando la identificación de aquellos casos que

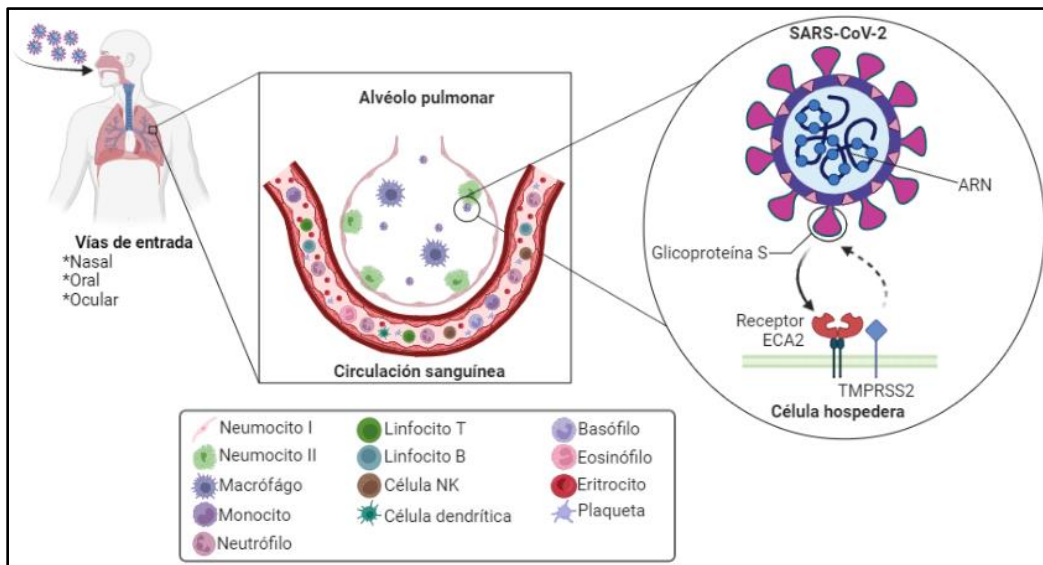
tendrán una infección leve de aquellos que progresarán a estados críticos. Para la toma de decisiones médicas durante la pandemia por COVID-19 se han empleado diferentes puntuaciones para la predicción del riesgo de muerte de pacientes hospitalizados, cuya finalidad es la detección temprana y aplicación de tratamientos adecuados y así evitar su deterioro clínico. La necesidad de hospitalizaciones en unidades de cuidado intensivo (UCIs) hace imposible para cualquier sistema de salud atender un número ilimitado de pacientes con condición crítica y es absolutamente necesario establecer medidas para contener la propagación de la infección.

Durante procesos infecciosos agudos sistémicos originados por agentes bacterianos o virales, el sistema hematopoyético es capaz de responder de manera inmediata ante la urgencia de contener al agente patógeno mediante la producción de células inmunológicas innatas. Este fenómeno de rescate se denomina hematopoyesis de emergencia, y se desencadena una vez que las células troncales y progenitoras hematopoyéticas sienten elementos proinflamatorios, resultando en la inducción de su proliferación, diferenciación y movilización, redirigiendo su compromiso de linaje favoreciendo la proliferación de células NK, células dendríticas, tanto plasmacitoides (pDCs) como convencionales (cDCs), y células de origen mieloide con el objetivo de combatir al agente patógeno. Sin embargo, en un escenario proinflamatorio previamente establecido, como ocurre en diversas enfermedades metabólicas crónicas, este mecanismo puede resultar en una catástrofe inmunológica resultando en complicaciones que derivan en síndrome respiratorio agudo severo y falla multiorgánica (7).

### **Agente causal: SARS-CoV-2**

SARS-CoV-2 pertenece a la familia *Coronaviridae*, es un  $\beta$ -coronavirus envuelto de ARN no segmentado de sentido positivo, cuyo diámetro va de 60 a 140 nm y que bajo el microscopio electrónico tiene el aspecto de corona debido a las proyecciones en su superficie, que corresponden a la glicoproteína S (Figura 1). Los coronavirus  $\beta$  son capaces de infectar mamíferos, en los humanos la mayoría

de las infecciones resultan en infecciones respiratorias moderadas y pueden ser responsables del 20-30% de los resfriados comunes (8). La transmisión humano-humano ocurre a través de gotas respiratorias generadas al toser o estornudar o tocando superficies contaminadas con estas y posteriormente tocar nariz, boca u ojos. En promedio el período de incubación es de 5 días, con un rango que va desde 1 a 14 días (9–11). SARS-CoV-2 requiere dos proteínas para infectar células: ECA2 (enzima convertidora de angiotensina 2) y TMPRSS2 (serin proteasa transmembranal 2) (12). El primer paso en la infección es la unión del virus gracias a la glicoproteína S, la cual permite unirse a las células blanco a través de la ECA2, proteína que se encuentra expresada en diferentes tipos celulares, incluyendo células del corazón, riñón, vasos sanguíneos, enterocitos, páncreas, y especialmente en los neumocitos tipo II del epitelio alveolar (13). Las células epiteliales que recubren las membranas mucosas y el moco secretado por las células caliciformes forman una primera barrera efectiva. Cuando el virus logra superarlo, la rápida liberación de señales de peligro activa reacciones de la inmunidad innata. Por lo que la severidad de la enfermedad en los pacientes no se debe solamente a la infección viral sino también a la respuesta inmunitaria (13).



**Figura 1. Mecanismo de infección de SARS-CoV-2.** La transmisión de SARS-CoV-2 puede ocurrir de forma directa o indirecta, ya sea a través de la inhalación de gotas generadas al toser, estornudar o hablar de personas tanto sintomáticas como asintomáticas, o al tocar superficies contaminadas. La vía de entrada es a través de nariz, boca u ojos. Para infectar una célula blanco el virus emplea su proteína S para unirse a aquellas células que expresen ECA2 y TMPRSS2, y así ingresar e iniciar la replicación viral.

## **Enfermedad: COVID-19**

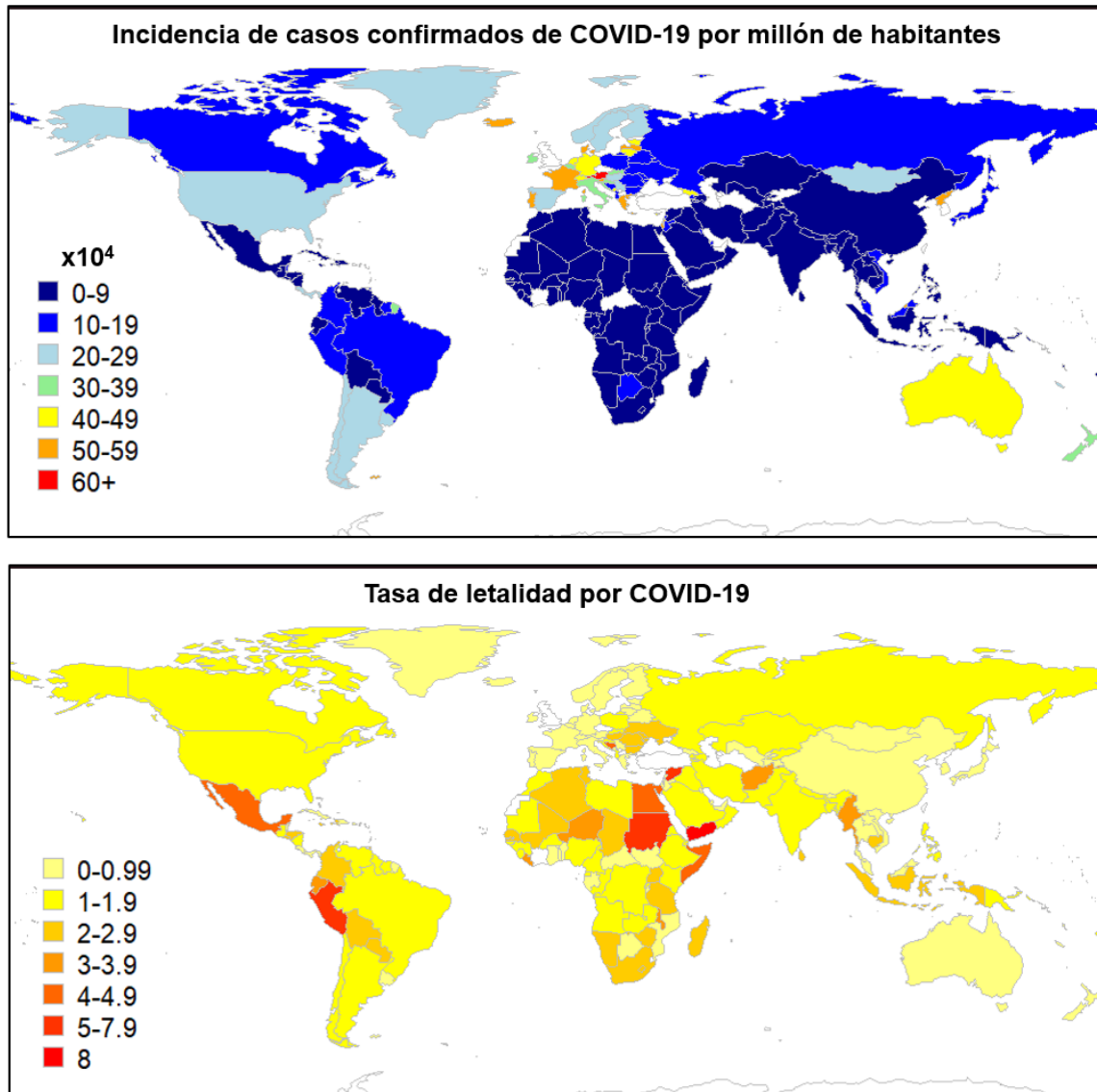
La infección por SARS-CoV-2 presenta un amplio espectro de manifestaciones clínicas, desde infecciones asintomáticas hasta neumonía severa. Esta última condición comprende alrededor del 15% de los casos y frecuentemente requieren hospitalización en una UCI debido al requerimiento de soporte ventilatorio y otros tratamientos médicos hasta la recuperación o posiblemente la muerte del paciente (9). Las manifestaciones clínicas más comunes son fiebre (88.7%), tos (67.8%), fatiga (38.1%); algunos pacientes muestran síntomas gastrointestinales como diarrea (3.8%) y vómito (5.06%). Adultos mayores y aquellos con enfermedades preexistentes (diabetes, hipertensión, enfermedades cardiovasculares, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, entre otras) progresan rápidamente con síndrome de dificultad respiratoria aguda, choque séptico, problemas coagulativos, lo cual puede conducir a falla multiorgánica y posteriormente a un desenlace fatídico (14).

## **Epidemiología de la COVID-19**

Entender las características de los epicentros y la dinámica de las poblaciones humanas, virales y celulares, ha sido una tarea difícil durante la pandemia por COVID-19, debido a su intensidad variable de acuerdo con las regiones, a la alta transmisibilidad y a su relación con comorbilidades. Tanto la morbilidad, como la tasa de letalidad, varían significativamente en países de todo el mundo y de acuerdo con grupos de edad. Individuos de todas las edades son susceptibles a la infección por SARS-CoV-2, observándose una baja proporción de casos en edades pediátricas, según un estudio que analizó casos de COVID-19 en China a mediados de febrero de 2020 reveló que los niños menores de 18 años comprendían el 2.4% de todos los casos reportados (15), en tanto que en Estados Unidos solo el 1.7% de los pacientes infectados fueron niños menores de 18 años (16). Un modelo matemático realizado por Davies y colaboradores estimó que la susceptibilidad a la infección en menores de 20 años es aproximadamente la mitad que en los adultos mayores de 20 años, y que los síntomas clínicos se manifiestan en 21% de las infecciones en el grupo de 10 a 19 años,

incrementándose a 69% las infecciones en individuos mayores de 70 años. Por ello, en países con una distribución poblacional más joven, como algunos países de bajo-mediano ingreso, la incidencia de casos clínicos per cápita esperada podrían ser menores que los países con poblaciones más longevas, sin embargo, las altas tasas de prevalencia de comorbilidades influyen en la severidad de la enfermedad (17). Un estudio de meta-análisis estimó que la tasa de letalidad (CFR) de COVID-19 global fue del 10%. Los valores de CFR en la población general fue del 1%, del 15% en el caso de pacientes con ingreso hospitalario y del 29% de aquellos que requirieron de una unidad de cuidados intensivos (UCI) (18).

América Latina fue un área profundamente afectada en cuanto al número de casos y defunciones por la pandemia de COVID-19 (Figura 2) (19). Actualmente, México ocupa el noveno lugar con una tasa de letalidad de 4.65% (<https://coronavirus.jhu.edu/map.html>). Más de la mitad de las defunciones en nuestro país han ocurrido en adultos menores de 65 años. En un estudio donde se aborda el papel de las enfermedades metabólicas crónicas en la letalidad de los casos por COVID-19 en la población mexicana, se encontró que 74% de las defunciones presentaban al menos una comorbilidad, siendo las más comunes hipertensión (43%), diabetes (38%) y obesidad (25%). Además, se observó que el riesgo contribuido por las comorbilidades disminuye con la edad, debido a que los adultos mayores de 60 años tienen altas tasas de letalidad incluso en ausencia de enfermedades preexistentes. También identificaron a la IRC como la comorbilidad con el mayor riesgo para deceso en pacientes con COVID-19 (5).



**Figura 2. Epidemiología de COVID-19 en el mundo.** Distribución de la incidencia de casos confirmados de COVID-19 por 1,000,000 de habitantes. La escala de colores indica *Número de casos x10<sup>4</sup>*. Tasa de letalidad (CFR) de COVID-19. Datos al 11 de noviembre del 2022 disponibles: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html> y [https://www.worldometers.info/coronavirus/?utm\\_oi=785490798715211776&from=singlemessage](https://www.worldometers.info/coronavirus/?utm_oi=785490798715211776&from=singlemessage)

## **ANTECEDENTES**

### **Hematopoyesis de emergencia**

La hematopoyesis es un proceso complejo mediante el cual las células de la sangre y del sistema inmunológico son formadas a partir de células troncales hematopoyéticas (CTHs), las cuales van adquiriendo gradualmente potenciales de linaje restringido para generar la progenie madura de todas las estirpes. Las CTHs se localizan en microambientes especializados dentro de la médula ósea, denominados nichos hematopoyéticos, donde se mantienen quiescentes para su autorrenovación la mayor parte del tiempo y se activan para proliferar y renovar el tejido, y/o repararlo después de un daño (20–23). La hematopoyesis exhibe altas tasas de recambio, permitiendo la altamente regulada diferenciación hacia linajes linfoides y mieloides, que proveen al organismo de los elementos celulares para el transporte de oxígeno, reparación de tejido y respuesta inmune efectora, innata y adaptativa (20). Anteriormente se pensaba que, la respuesta hematopoyética inducida por la infección u otros estímulos inflamatorios se presentaba solo en el sitio local de reacción por las células del sistema inmunológico terminalmente diferenciadas mediante la señalización directa, las cuales producían factores que actuaban directamente sobre las poblaciones primitivas, incluyendo las indiferenciadas y las comprometidas a linaje, estimulándolas a reconstituir el sistema hematopoyético. Sin embargo, estudios recientes revelan que las poblaciones troncales y progenitoras hematopoyéticas (CTPHs), son capaces de detectar y responder sistemáticamente a señales de estrés y responder a ellos orquestando la diferenciación a demanda a través de mecanismos directos e indirectos. La identificación directa es mediada por diversos receptores de reconocimiento de patrones (PRR) como TLRs, receptores parecidos a NOD y estimuladores de genes de interferones (STING), capaces de detectar patrones moleculares asociados a microbios (MAMPs), patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) y patrones moleculares asociados a estilos de vida (LAMPs); mientras que por una segunda vía, mediante receptores de citocinas que crean escenarios epigenéticos que activan programas de diferenciación tempranos (7). Durante infecciones virales, un gran número de células T efectoras entran al

parénquima de la médula ósea modulando el destino de los progenitores hematopoyéticos, ya sea mediante contacto directo célula-célula o por la secreción de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  o IFN- $\gamma$  (24). Las CTHs en la médula ósea expresan TLR4 y TLR2, que al ser activados, favorece la diferenciación hacia linajes mieloides de manera dependiente a MyD88. Se ha observado que, en enfermedades metabólicas como la obesidad, la presencia de ácidos grasos y glucosa pueden activar macrófagos a través de la interacción con TLR2 y TLR4 (25). En un modelo murino del virus del herpes simple (HSV-1) se reveló que la expansión e infiltración de neutrófilos resistentes a la apoptosis hacia el bulbo raquídeo resulta de la ausencia de IFN- $\gamma$  y de los altos niveles de G-CSF. El G-CSF es un mediador de la homeostasis mieloide, permitiendo la salida de neutrófilos de la médula ósea debido a la disminución de la expresión de CXCR4. Las concentraciones altas de G-CSF inducen células supresoras derivadas de granulocitos, inhiben la proliferación de células T y bloquean la producción de IL-10 de las células T reguladoras. La señalización de G-CSF es suprimida por IFN- $\gamma$  mediante el incremento de la expresión de SOCS3 en los neutrófilos lo que provoca su apoptosis, limitando de esta manera la hematopoyesis de emergencia y los desenlaces fatales (26). De manera similar, durante la infección por el HSV-1 los progenitores linfoides comunes redirigen la producción de células B hacia células NK, pDCs y cDCs vía estimulación del TLR9 (27). En un modelo de infección de malaria en ratón, se identificó a la IL-27 como una importante citocina que hace sinergia con el factor de células troncales (SCF) promoviendo la mielopoyesis de emergencia. Durante la etapa aguda de la infección se presenta un incremento en la expresión de IL-27, la cual actúa sobre células primitivas, linaje (Lin) Sca-1<sup>c</sup>-Kit<sup>+</sup> (LSK) en la médula ósea, incrementando su expansión, diferenciación hacia progenitores mieloides y movilizándolos hacia el bazo, resultando en la producción incrementada de neutrófilos para controlar la infección. Contrariamente, durante la etapa tardía de la infección, la IL-27 tiene una participación importante en la limitación de la producción de citocinas proinflamatorias como IFN- $\gamma$  (28). En un modelo murino de infección de coriomeningitis linfocítica se demostró que el IFN- $\gamma$  controla la diferenciación de los

progenitores mieloides de monocitos sobre neutrófilos, incrementando la expresión de factores de transcripción monocíticos como IRF8 y PU.1, mientras reduce la diferenciación neutrofílica mediada por G-CSF (24). Por otro lado, en la enfermedad por el virus de Ébola se sugiere una hematopoyesis de emergencia de linaje mieloides caracterizada por un incremento de la frecuencia de una población mieloides con inmunofenotipo CD11b<sup>+</sup>Ki-67<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> que asemeja a las células supresoras mieloides (MDSCs) y una disminución de monocitos intermedios y no clásicos durante la fase aguda, seguido por un incremento en la proliferación de los monocitos clásicos y la recuperación de las otras dos subpoblaciones monocíticas en la fase tardía. Además, se observó una pérdida de mDCs durante la fase aguda y recuperación de los niveles normales después del control de la enfermedad. En cuanto a las pDCs, permanecen activas y no disminuyen marcadamente en cuanto a su número (29).

Si bien la inflamación tiene muchas funciones que benefician la activación del sistema inmune como defensa o reparación, también muestra efectos perjudiciales si se mantiene de forma crónica, es decir, podría provocar daño por falla medular o leucemia. Por lo tanto, tanto la inflamación, como la hematopoyesis de emergencia, requieren un control estricto de su iniciación y su terminación, en forma dependiente del tiempo y el espacio para garantizar que los mecanismos asociados tengan un destino favorable al organismo (30). Dependiendo del grado o tipo de inflamación, la jerarquía hematopoyética hace frente a los desafíos exógenos y endógenos a través de una reconfiguración organizacional diferente al estado estacionario, como lo indican los potenciales inducidos de diferenciación de células mieloides, células dendríticas convencionales y plasmacitoides dendríticas, NK y megacariocitos. El hallazgo de señales de TLR7/8 inductoras de una respuesta anti-viral protectora contra SARS-coronavirus, a través de interferones de tipo I producidos por DC y pDC, sugiere enfáticamente la contribución de hematopoyesis de emergencia en respuesta a la infección por esta familia de virus (30,31). Más aún, el creciente número de reportes de complicaciones que derivan en síndrome respiratorio agudo severo por COVID-19, con niveles elevados de IL-1, IL-6 e IL-8, CXCL10 y MCP-1, son indicativos de una potencial perturbación de dicho mecanismo en el contexto de una hiperinflamación.

### **Inmunidad innata anti-viral**

La inmunidad innata, como primera línea de defensa contra los agentes patógenos bacterianos y virales, es capaz de resolver más del 90% de los encuentros con ellos y bloquear la transición a estados graves, sin embargo, en aquellas excepciones la infección puede progresar (32). En el caso de COVID-19, una vez que el virus SARS-CoV-2 ha ingresado a la célula blanco, el ARN viral es traducido inmediatamente por la célula huésped, la cual muere al liberar millones de virus nuevos. Una vez establecida la infección, el número de linfocitos disminuye causando linfopenia en varios grados, mientras que el compartimiento periférico de neutrófilos aumenta (33). El inicio temprano de la replicación viral puede causar apoptosis masiva de células epiteliales, endoteliales y fuga vascular, lo que desencadena la liberación de citocinas proinflamatorias y quimiocinas (34). Los pacientes con enfermedad severa presentan niveles plasmáticos más altos de IL-2, IL-6, IL-7, IL-10, G-CSF, IP-10, MCP-1, MIP-1A y TNF- $\alpha$ , lo que sugiere una posible tormenta de citocinas asociada con la gravedad de la enfermedad y un microambiente proinflamatorio, tanto local como sistémico, que puede exacerbarse hasta contribuir con la falla multiorgánica (34,35). Además, como mecanismo de evasión, dichos virus suprimen la producción de interferones, un grupo de citocinas antivirales de crucial importancia (36).

De los linajes celulares con mayor contribución inmediata a la resolución de infecciones virales, las células asesinas naturales (NK) ocupan un lugar especial, como ha sido demostrado que ocurre para el virus del herpes simple-1 (HSV-1), el virus de la influenza, el virus de ectromelia pox, virus de la hepatitis B y C (HBV, HCV) (37). Tras su activación, la producción de IFN- $\gamma$  y su capacidad citotóxica se asocian con la eliminación espontánea de los viriones, aunque la infección crónica a menudo es acompañada por su agotamiento, lo que limita la actividad antiviral. Las células NK pueden lisar directamente a las células infectadas y su función citolítica se inicia a través de la desgranulación por granzimas y perforinas y la activación de los receptores de muerte (Fas/FasL y NCRs) para la eliminación celular. Además, son muy eficientes en la producción de citocinas inflamatorias como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y GM-CSF, que modulan la actividad de células dendríticas,

macrófagos, células T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y T<sub>γδ</sub>, creando un enlace inductivo muy poderoso entre la inmunidad innata y la adaptativa. Adicional a los principales receptores responsables del reconocimiento de células en daño por las células NK, como son NKp46, NKp30, NKp44, DNAM1 y NKG2D, la expresión de receptores tipo Toll (TLRs) puede mediar su fuerte activación (38). Los defectos en la función o el número de células NK están asociados con una mayor susceptibilidad a desarrollar infecciones virales y cáncer, donde la cronicidad se ve facilitada por diversos mecanismos de subversión inmunológica. La comunicación dinámica y estrecha con el microambiente tumoral y las células supresoras que lo componen, proporciona las señales necesarias para la disfuncionalidad y agotamiento de las células NK, principalmente por la disminución de receptores activadores o la producción de ligando solubles para su inactivación, la expresión de ligandos inhibidores en el tumor, hipoxia, la exposición a metabolitos como adenosina y lactato, la producción de citocinas y enzimas supresoras como IL-10, TGF-β e IDO, así como la expresión de moléculas de control inmune (39–41). Los estudios de Zhang han descrito que la infección por el virus de la hepatitis C promueve el agotamiento de las células NK hepáticas mediante la expresión de NKG2A. El bloqueo de este punto de control inmune permite la reactivación de las células NK y la producción de IFN-γ, lo que ayuda a recuperar la respuesta de las células T CD8<sup>+</sup> agotadas y por tanto la eliminación del HCV32. Notablemente, la infección por SARS-CoV-2 con complicaciones clínicas, ocurre con mayor frecuencia en individuos de edad avanzada con comorbilidades y sistema inmune comprometido (42), lo que sitúa las respuestas efectoras como esenciales para la eliminación viral temprana. Un reporte indica la disminución significativa del número de linfocitos B, T y NK, concomitante a niveles elevados de marcadores de inflamación, especialmente en los casos severos de COVID-19 (43). Esta observación ha sido confirmada por Zheng y colaboradores para células citotóxicas NK y T CD8<sup>+</sup>, y correlaciona con un aumento de NKG2A y un fenotipo agotado deficiente en la producción de CD107a, IFN-γ, IL-2, granzima B y TNF-α. Se destaca que la terapia (antiviral, cloroquina o interferón) restablece el número celular y disminuye la expresión de NKG2A, lo que sugiere el relevante papel de la

competencia innata en las etapas tempranas de la infección (44) y el fenómeno de agotamiento de las funciones linfocitarias (innatas y adaptativas) concomitante a la severidad de la enfermedad (45).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La infección por SARS-CoV-2 ha causado un gran número de casos y defunciones a nivel mundial. La enfermedad de COVID-19 presenta un amplio espectro clínico, lo que dificulta la identificación temprana de casos con progresión severa de la enfermedad.

¿Es posible la generación de una huella de predicción de pronósticos mediante la combinación de los datos clínicos y los compartimientos inmunológicos e inflamatorios que permita identificar a los individuos con COVID-19 con evolución hacia pronósticos desfavorables y así aplicar estrategias terapéuticas para evitar la rápida evolución de la enfermedad reduciendo el índice de fatalidad y maximizando el control de nuevas oleadas de infección?

## **HIPÓTESIS**

El fenómeno inflamatorio asociado a la infección por SARS-CoV-2, aunado a condiciones de excesiva y crónica producción de elementos inflamatorios, asociadas a condiciones metabólicas preexistentes y/o envejecimiento, pondrá en riesgo la funcionalidad de la hematopoyesis de emergencia contribuyendo a la progresión hacia cuadros severos y fatales de la enfermedad.

## **OBJETIVO GENERAL**

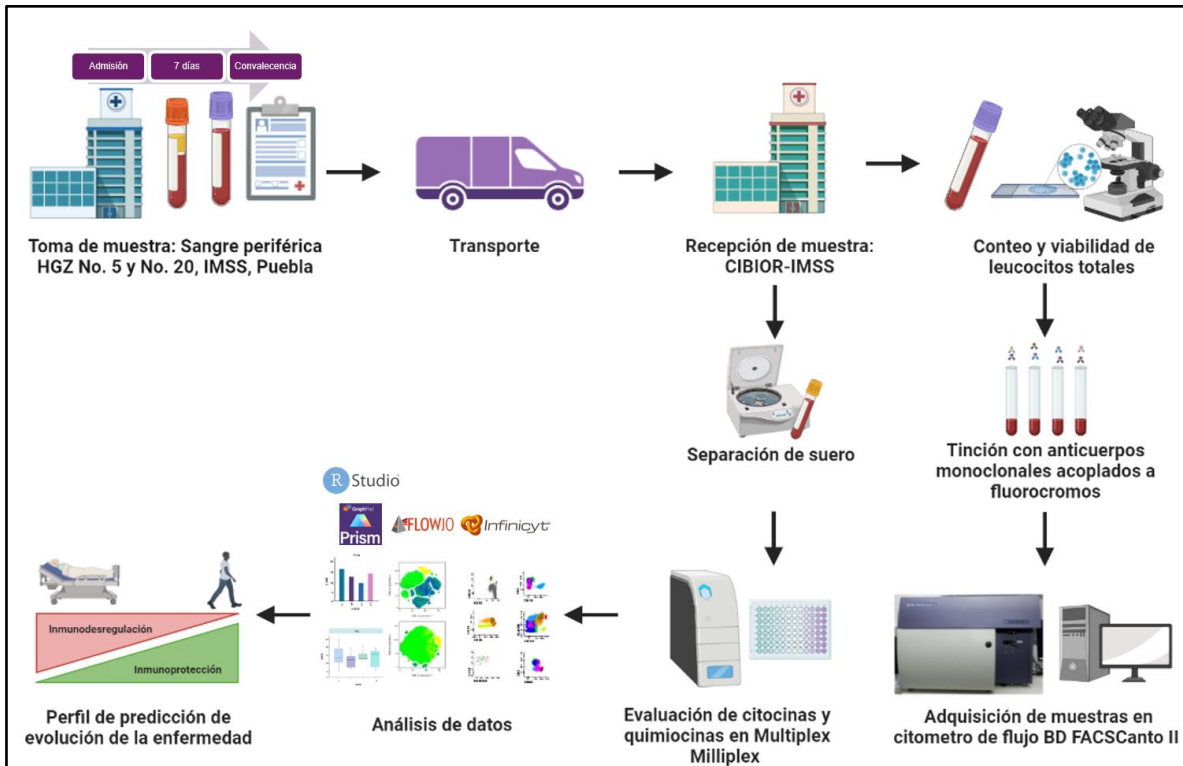
Evaluar la hematopoyesis de emergencia activada por SARS-CoV-2 mediante la capacidad de generación de células maduras y su correlación con datos clínicos para la generación de una huella de predicción de pronósticos clínicos.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Determinar las características clínicas y parámetros de laboratorio de los pacientes con COVID-19.
2. Identificar factores de riesgo asociados a severidad en pacientes con COVID-19.
3. Investigar el estado de quimiocinas esenciales para la hematopoyesis medular.
4. Estratificar a los pacientes de acuerdo con su capacidad de establecer hematopoyesis de emergencia funcional efectora (antiviral), a través de la diferenciación de células innatas, dendríticas (pDC y cDC2) y NK.
5. Generar un perfil predictivo de riesgo de evolución de la enfermedad por COVID-19.

## METODOLOGÍA

### Diagrama de flujo de la metodología general



**Figura 3. Flujo de trabajo de los especímenes colectados de pacientes adultos con COVID-19.** En los hospitales colaboradores, hospitales generales de zona (HGZ) No. 5 y 20 (IMSS, Puebla), se llevó a cabo la recolección del historial clínico y de los especímenes de estudio, sangre periférica de los pacientes positivos a SARS-CoV-2, una muestra con EDTA como anticoagulante y otra sin anticoagulante. Las muestras se procesaron en el laboratorio de contención de Virología médica (nivel BSL-2+) del CIBIOR. Por un lado, el contenido de las diferentes poblaciones inmunohematopoyéticas fueron evaluadas en las muestras sanguíneas anticoaguladas, mientras que, los factores solubles inflamatorios fueron evaluados en los sueros obtenidos de las muestras sin anticoagulantes posterior a centrifugación. El conjunto de los datos clínicos junto con las variables experimentales de los pacientes permitió identificar un perfil de predicción de riesgo de severidad a COVID-19.

### Características de los pacientes con COVID-19

Estudio experimental biomédico sobre población de pacientes adultos que ingresaron con sintomatología asociada a COVID-19 (fiebre  $\geq 38$  °C, tos, fatiga, cefalea, disnea, dolor torácico, artralgias, mialgias, astenia, ataque al estado general, entre otros) y con diagnóstico confirmado mediante una prueba de reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (RT-PCR) o prueba rápida de antígeno positiva a SARS-CoV-2 en exudado nasofaríngeo, quienes fueron

atendidos en alguno de los hospitales participantes, Hospitales Generales de Zona No. 5 y 20 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en Puebla durante el período comprendido entre octubre 2020 a septiembre 2021.

Este estudio fue realizado de acuerdo con la Declaración de Helsinki y aprobado por los comités de Ética, Investigación y Bioseguridad del Comité Nacional de Investigación Científica del IMSS (R-2020-785-134). Todo el historial clínico y las muestras fueron colectadas bajo consentimiento informado oral o escrito firmado por un familiar del paciente (Anexo 1), debido a las implicaciones sanitarias. Para este estudio se emplearon las muestras remanentes posteriores a los estudios clínicos solicitados por los médicos, ninguna muestra fue tomada para uso exclusivo de este proyecto. Las instituciones colaboradoras contaron con las instalaciones y equipo apropiados para asegurar la adecuada toma de muestras. Todos los procedimientos se apegaron a las normas de los Comités de Ética, Investigación y Bioseguridad de los hospitales y del CIBIOR.

Al ingreso hospitalario, en el triage respiratorio y antes de recibir cualquier tratamiento farmacológico, más de 140 parámetros clínicos fueron investigados exhaustivamente mediante una encuesta epidemiológica y exámenes de laboratorio, estos datos fueron recabados por los médicos colaboradores y depositados en el instrumento de recolección (Anexo 2).

### **Recolección de muestras de pacientes con COVID-19**

Muestreo no probabilístico de casos consecutivos. Los especímenes empleados fueron sangre periférica sin y con EDTA como anticoagulante, los cuales fueron analizados en tres tiempos diferentes: a la admisión previo a la terapia, a los 7 días de hospitalización y 4 semanas posteriores al alta hospitalaria (etapa convaleciente). Para el grupo control se obtuvo sangre periférica de individuos sanos de ambos sexos, mayores de 18 años, que no presentaban síntomas asociados a COVID-19 y que no hayan estado en contacto con pacientes sospechosos o confirmados. Se consideró una  $n$  por conveniencia y se incluyeron a todos los pacientes que cumplieron con los siguientes criterios:

#### Criterios de inclusión:

- Sangre periférica de pacientes adultos de ambos sexos, que ingresaron a alguno de los hospitales participantes con diagnóstico confirmado de COVID-19, corroborado mediante la prueba de RT-PCR en el Laboratorio Central de Epidemiología del IMSS o mediante prueba rápida de antígeno.
- Volumen adecuado de muestra (2 mL).
- Aceptación de participación en el estudio.

#### Criterios de exclusión:

- Sangre periférica de pacientes con diagnóstico negativo a COVID-19.
- Pacientes portadores de enfermedades virales: virus de inmunodeficiencia humana, virus de hepatitis B o C, virus de influenza A o B.
- Pacientes con enfermedades inmunosupresoras: inmunodeficiencias primarias, artritis reumatoide, lupus eritematoso y bajo tratamiento con inmunosupresores.
- Pacientes que requirieron asistencia respiratoria con ventilación mecánica.
- Pacientes que recibieron vacunación contra SARS-CoV-2 o que tuvieron infección previa con este agente.
- Muestras con número celular o volumen insuficiente para los ensayos.

#### Criterios de no inclusión:

- Pacientes o representantes legales que no aceptaron participar en el estudio.

Las tomas de muestras fueron efectuadas por personal sanitario capacitado dentro de las instalaciones hospitalarias, posterior a los exámenes clínicos, los tubos con las muestras remanentes fueron enviadas al CIBIOR.

- *Sangre periférica.* Es un procedimiento invasivo que consiste en la recolección de sangre venosa, la mayoría de las veces se extrae de una vena localizada en la parte interior del codo. En primer lugar, se coloca una banda elástica alrededor de la parte superior del brazo y se desinfecta el sitio de punción con alcohol al 70%, se introduce una aguja en la vena y se colecta la muestra en tubos con o sin anticoagulante. Al finalizar la toma, se retira la banda elástica, se saca la aguja y se coloca un algodón para detener el sangrado.

La sangre periférica con EDTA se empleó para la evaluación del contenido de poblaciones hematopoyéticas mediante citometría de flujo multiparamétrica. Mientras que, alícuotas de suero fueron almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis para la determinación de los componentes solubles inflamatorios.

#### **Traslado y procesamiento de muestras**

Las muestras biológicas colectadas en los hospitales colaboradores fueron trasladadas mediante el sistema de transporte del IMSS al CIBIOR, a temperatura ambiente ( $16$  a  $25^{\circ}\text{C}$ ). Las muestras de sangre periférica fueron manejadas como si fueran muestras clínicas con presencia de virus infeccioso. Las muestras clínicas y los instrumentos de recolección correctamente etiquetados fueron enviados con triple embalaje. Los procedimientos que involucraron el manejo de muestras se llevaron a cabo en el área de contención del laboratorio de Virología Médica (nivel de bioseguridad BSL-2+) y en el laboratorio de Citómica del Cáncer Infantil del CIBIOR. No se realizó diagnóstico ni se manejaron especímenes provenientes de aspirados bronquio-alveolares ni tejidos blanco de infección viral. Sin embargo, el procesamiento de las muestras se condujo con apego estricto a los procedimientos para el diagnóstico del agente patógeno (SARS-CoV-2), todo el material y las muestras ingresaron y salieron del laboratorio de contención a través de la ventana de doble puerta, durante la manipulación el personal portó el equipo de protección personal (EPP) constituido por: respiradores NIOSH N95, lentes con protección lateral (googles), careta, bata desechable de manga larga,

cofia, dos pares de guantes de nitrilo y cubrezapatos. Al finalizar, las muestras procesadas y residuos (por ejemplo, puntas de micropipetas) fueron descontaminados con una solución de hipoclorito de sodio al 0.5%. Las hojas de recolección de datos antes de ser manipulados fuera del área de contención fueron irradiadas por ambos lados con luz ultravioleta por 15 minutos, y posteriormente, pasaron por una segunda esterilización en calor seco a 75°C por 30 minutos. Los laboratorios, con énfasis en el de Virología Médica del CIBIOR, contaron con las instalaciones y el equipo apropiado para la realización de los ensayos bajo condiciones seguras (gabinete de bioseguridad nivel II, centrifuga con portamuestras provistas con tapas de rosca, vórtex, refrigerador, microscopio y equipo de cómputo) para la estudiante quien recibió la capacitación necesaria para ingresar al área, como se establece en los manuales y guías de bioseguridad (Manual de Bioseguridad para Laboratorios Microbiológicos y Biomédicos; U. S. Department of Health and Human Services), así como a los procedimientos de bioseguridad y biocustodia emitidos por la Coordinación de Gestión del Riesgo Biológico (InDRE, SS y OMS).

### **Parámetros de laboratorio clínico y escalas de severidad**

Los siguientes parámetros de laboratorio fueron obtenidos del expediente clínico analizados en los tres tiempos diferentes (Anexo 2):

- Componentes celulares: leucocitos totales, neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos, eritrocitos, hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración de hemoglobina corpuscular media (CMHC), plaquetas y volumen plaquetario medio (VPM).
- Marcadores bioquímicos: creatinina, glucosa, bilirrubinas totales, lactato deshidrogenasa (LDH), proteína C reactiva (CRP) y ferritina.
- Marcadores de la coagulación: dímero D y fibrinógeno.
- Gasometría: pH, PaCO<sub>2</sub>, PaO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub>, saturación de O<sub>2</sub> (Sa O<sub>2</sub>) y fracción de oxígeno inspirado (FiO<sub>2</sub>).

Con algunos parámetros clínicos y de laboratorio se calcularon diferentes escalas de severidad para orientación clínica: CURB-65 (del inglés, Confusión, Urea, Respiratory rate, Blood pressure and age  $\geq 65$ ), SOFA (del inglés, Sequential Organ Failure Assessment), CALL (del inglés, Comorbidity, Age, Lymphocyte and LDH) y NEWS2 (del inglés, National Early Warning Score).

### Evaluación de poblaciones celulares hematopoyéticas

Se determinó la cuenta de leucocitos totales en las muestras de sangre periférica anticoaguladas empleando cámara de Nuebauer y solución de Turk, se colocaron al menos  $2 \times 10^6$  leucocitos por tubo. Los leucocitos fueron incubados con suero fetal bovino 50% (SFB) durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente, las células fueron lavadas con solución de fosfatos salinos (PBS) para enseguida ser incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente y protegidos de la luz con un coctel de anticuerpos monoclonales acoplados a fluorocromos (de BioLegend):

Tubo 1: CD38-FITC (clona HB-7), CD42b-PE (clona HIP1), CD41-PerCP (clona HIP8), CD61-PE/Cy7 (clona VI-PL2), CD34-APC (clona 581), CD45RA-APC/Cy7 (clona -HI100), CD47-Pacific Blue™ (clona CC2C6), CD45-Brilliant Violet 510™ (clona HI30). Tubo 2: CD45-FITC (clona HI30), CD33-PE (clona P67.6), CD3-PerCP (clona HIT3a), CD123-PE/Cy7 (clona 6H6), CD19-APC (clona HIB19), CD4-APC/Cy7 (clona OKT4), HLA-DR-Pacific Blue™ (clona L243), CD56-Brilliant Violet 510™ (clona HCD56). Tubo 3: CD45-FITC (clona HI30), CD3-PerCP (clona HIT3a), HLA-DR-Pacific Blue™ (clona L243), TCR $\gamma\delta$ -PE (clona B1), CD8-PE/Cy7 (clona HIT8a), CD11c-APC (clona 3.9), CD16-APC/Cy7 (clona 3G8), CD14-Brilliant Violet 510™ (clona 63D3); (Tabla 1).

**Tabla 1. Panel de anticuerpos para el análisis del contenido de células hematopoyéticas.**

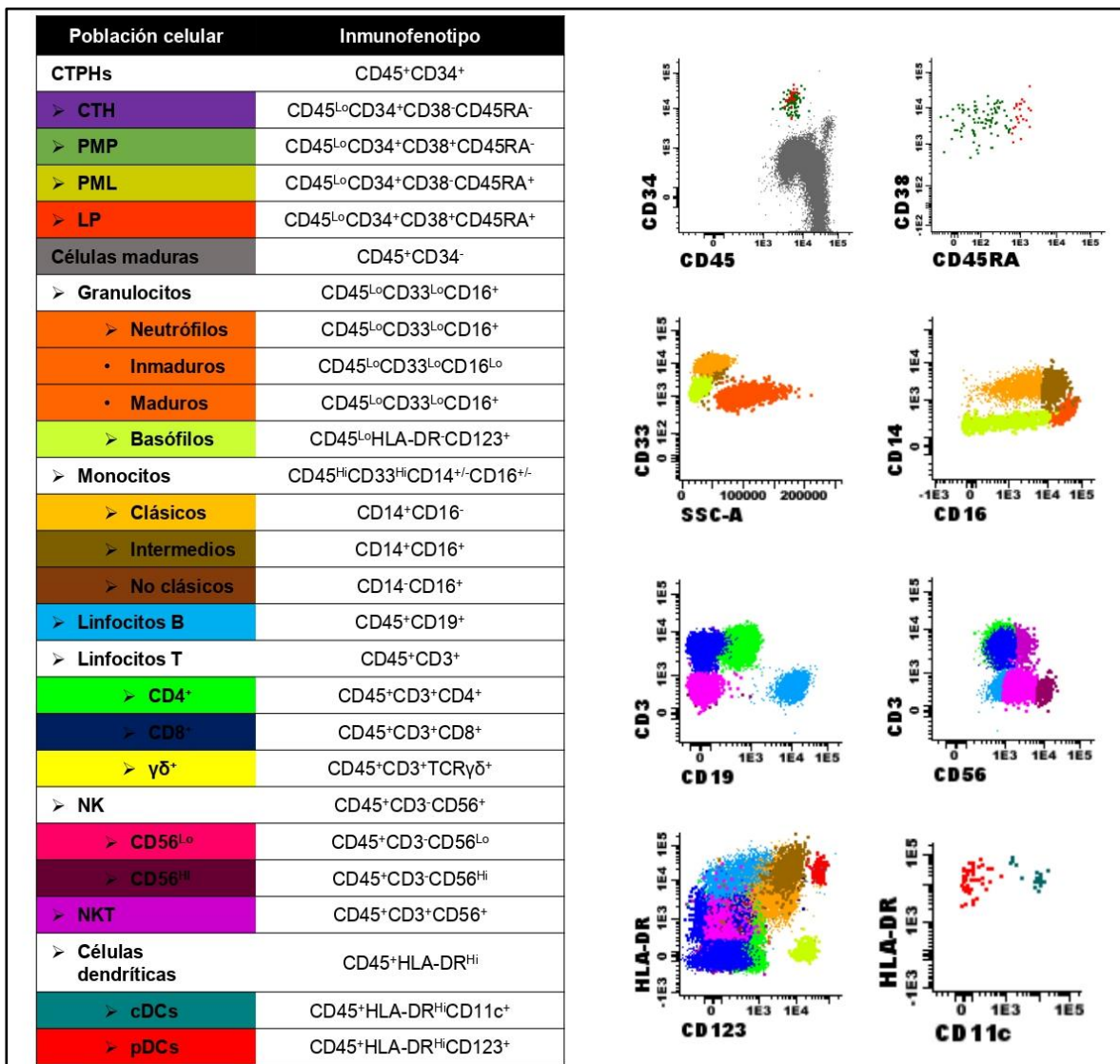
	FITC	PE	PerCP	PE/Cy7	APC	APC/Cy7	Pacific Blue™	Brilliant Violet 510™
T1	CD38	CD42b	CD41	CD61	CD34	CD45RA	CD47	CD45
T2	CD45	CD33	CD3	CD123	CD19	CD4	HLA-DR	CD56
T3	CD45	TCR $\delta\gamma$	CD3	CD8	CD11c	CD16	HLA-DR	CD14

Se llevó a cabo la lisis de eritrocitos mediante la adición de 3 mL de una solución amortiguadora de lisis de células rojas (BioLegend # 420301) durante 10 minutos. Las células fueron lavadas nuevamente con PBS. Finalmente, las células fueron resuspendidas en 200  $\mu$ L de PBS y fueron adquiridas para su inmunofenotipificación en un citómetro de flujo BD FACSCanto II. Los archivos citométricos fueron analizados con los softwares: Infinicyt versión 1.8, para evaluar la frecuencia de poblaciones celulares y niveles de expresión de marcadores (mediana de intensidad de fluorescencia, MFI) de interés; mientras que, FlowJo versión 10.8.1 permitió la visualización de los datos a través de la generación de gráficos tSNEs.

La identificación de las poblaciones celulares hematopoyéticas se llevó a cabo mediante el siguiente algoritmo (Figura 4): de acuerdo con la expresión de CD34, se identificaron las poblaciones de CTPHs como CD45<sup>Lo</sup>CD34<sup>+</sup> y las células maduras como CD45<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>. El compartimiento de CTPHs fue subclasificado como células troncales hematopoyéticas (CTH) CD45<sup>Lo</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>; progenitor multipotente (PMP) CD45<sup>Lo</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>; progenitor multilinfoide (PML) CD45<sup>Lo</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup> y progenitor linfoide (PL) CD45<sup>Lo</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>. Mientras que las poblaciones hematopoyéticas maduras se identificaron de acuerdo al siguiente perfil: los neutrófilos como CD45<sup>+</sup>CD33<sup>lo</sup>CD16<sup>-/+</sup>, basófilos como CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>; monocitos como CD45<sup>+</sup>CD33<sup>hi</sup>CD14<sup>+/-</sup>CD16<sup>+/-</sup>, subclasificados a su vez de acuerdo a la expresión de CD14 y CD16 en: monocitos clásicos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>, monocitos intermedios CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> y monocitos no clásicos CD14<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>; linfocitos B como CD45<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>, linfocitos T como CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> y subclasificados de acuerdo a la expresión de CD4, CD8 y TCR $\gamma\delta$ ; las células asesinas naturales (NK) como CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>, las células NKT como CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, las células dendríticas plasmacitoides (pDC) como CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>hi</sup>CD123<sup>+</sup> y las células dendríticas convencionales 2 (cDC2) como CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>hi</sup>CD11c<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>.

## Determinación de factores solubles inflamatorios

El contenido de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento fueron analizados en suero mediante inmunoensayo de detección multiplex (Merck Millipore) a partir de sueros de pacientes con COVID-19 así como de controles sanos. El panel incluyó los siguientes analitos: TGF- $\beta$ , FGF-2, FLT-3L, G-CSF, IFN- $\alpha$ , IP-10/CXCL10, MCP-1, MIG/CXCL-9, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-2, ITAC/CXCL11, MIP-1 $\alpha$ , SCF, CXCL-12, IL-6, IL-8, MIF, TNF- $\alpha$  y VEGF.



**Figura 4. Estrategia de análisis para la inmunofenotipificación de las poblaciones celulares hematopoyéticas.** Gráficos de puntos que muestran las diferentes poblaciones hematopoyéticas, tanto CTPHs como las del sistema inmune innato y adaptativo, identificables en las muestras de sangre periférica de pacientes adultos con COVID-19. Los colores de las poblaciones celulares se indican en la tabla.

### **Análisis estadístico.**

Las variables cuantitativas se presentan como medianas (rangos intercuartiles [IQR]) y las variables nominales como cuentas absolutas y proporciones (N, %). Pruebas de Kruskal-Wallis con prueba post hoc de Dunn o X<sup>2</sup> fueron empleadas para comparar variables continuas y categóricas, respectivamente. Las tasas de letalidad (CFR, *case fatality rate*) fueron calculadas como el porcentaje de casos que murieron con COVID-19. Los riesgos relativos de muerte (RR<sub>d</sub>), cociente entre el grupo con el factor de riesgo y el grupo sano, y sus intervalos de confianza (CI) fueron calculados con la escala asintótica de Koopman. Los valores de  $p < 0.05$  fueron considerados como estadísticamente significativos. Los análisis fueron realizados con el software GraphPad Prism versión 9.3.0 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA). Para la visualización de datos en los gráficos de aluvial se emplearon las paqueterías: dplyr, ggplot2, ggalluvial, tidyr y RColorBrewer de RStudio versión 2021.09.0.

## RESULTADOS

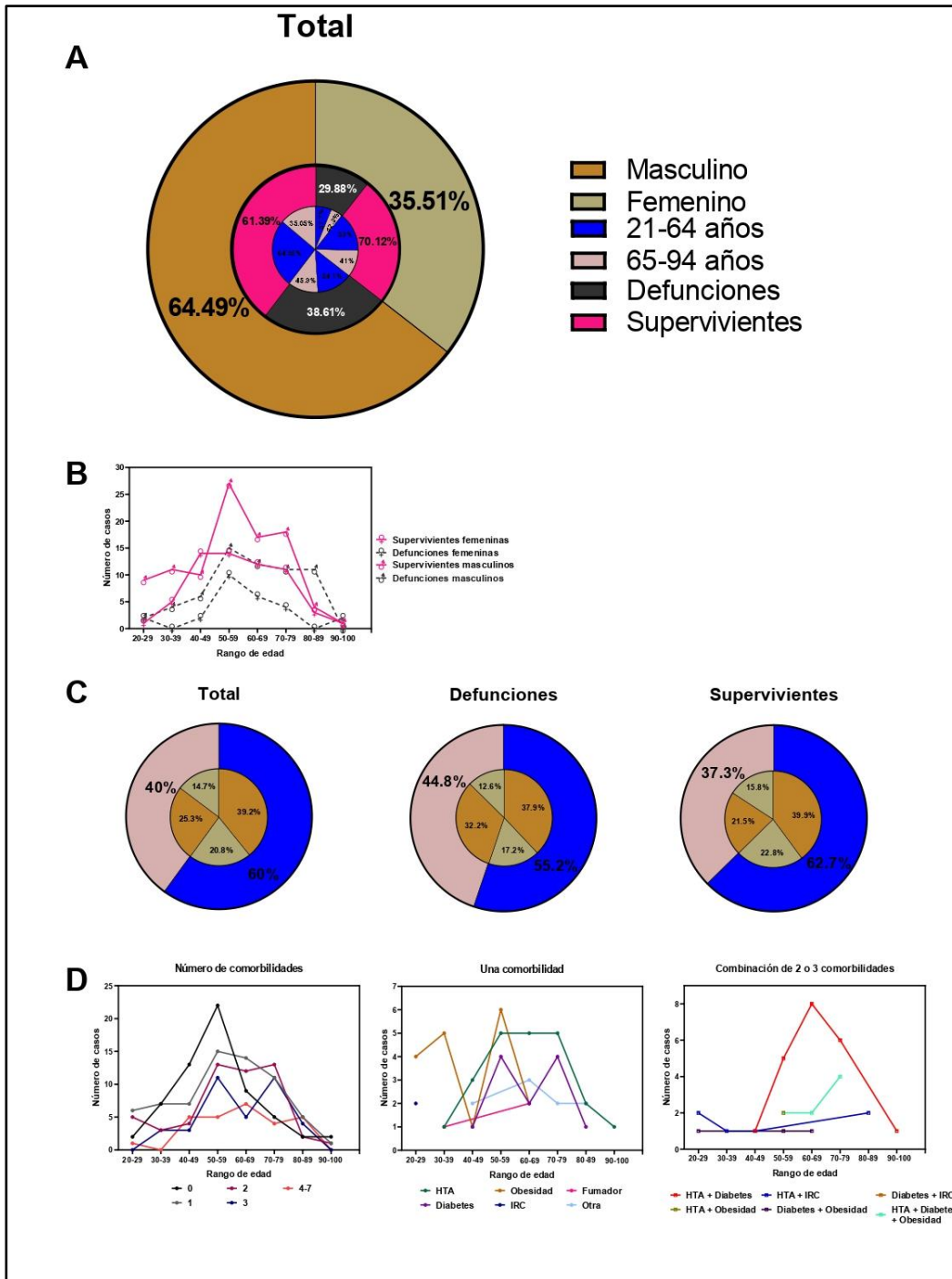
### Demografía y espectro clínico de los pacientes con COVID-19

La cohorte de estudio comprendió un total de 245 casos, pacientes adultos de 21-94 años con COVID-19 que fueron ingresados en los dos hospitales participantes, pacientes ambulatorios no fueron incluidos.

La mediana de edad fue de 58 años (IQR 48-71 años), 64.49 % fueron hombres. La tasa de letalidad global fue de 35.51%, mientras que, de acuerdo con el género los hombres mostraron valores más altos (38.61%) en comparación con las mujeres (29.88%) (Fig. 5A), así como una tendencia más elevada de riesgo relativo de muerte ( $RR_d$ ) por COVID-19 en comparación con las mujeres, 1.29 (95% CI: 0.90-1.90,  $p=0.21$ ) (Anexo 3).

Se observó que la mayor incidencia de defunciones y altas hospitalarias se registró en el rango de edad de 50-59 años en ambos géneros (Figura 5B). Gracias a esta observación y debido a que la edad se ha asociado como un factor de riesgo con la progresión de la severidad en pacientes con COVID-19, la cohorte fue dividida en dos grupos para su análisis: pacientes de 21-64 años, que denominaremos “menores de 65” o “pacientes de mediana edad”, y pacientes de 65-94 años o “mayores de 65” o “adultos de edad avanzada”. Notablemente, 60% de las admisiones hospitalarias correspondieron a adultos menores de 65 años y alarmantemente el 55.2% de las muertes fueron registradas en este grupo etario (Fig. 5C) similar a las frecuencias nacionales. Además, se investigó la presencia de enfermedades preexistentes en los pacientes con COVID-19 observándose que la mayor incidencia de una o la combinación de dos o tres se reportó en el rango de 50-59 años (Figura 5D).

En nuestra cohorte los síntomas más frecuentes a la admisión fueron: tos (77.55%), fiebre (75.51%), disnea (70.61%), mialgia (69.80%) y artralgia (68.57%). En cuanto a las condiciones preexistentes, las principalmente reportadas fueron: hipertensión arterial (HTA, 43.27%), diabetes (35.92%), obesidad (23.67%), dislipidemia (8.98%) e insuficiencia renal crónica (IRC, 8.57%). Una cuarta parte de los pacientes con COVID-19 no reportó una comorbilidad (25.3%) (Tabla 2).



**Figura 5. Demografía de la cohorte de pacientes con COVID-19.** **A)** Frecuencia de casos de pacientes con COVID-19 incluidos en este estudio de acuerdo con el género (círculo externo), se detalla la tasa de letalidad por género (círculo intermedio, en color negro) y finalmente, se indica la frecuencia de defunciones y supervivientes por grupos de edad (círculo interno, grupos menor y mayor de 65 años). **B)** Distribución del número de defunciones y supervivientes por género y rango de edad. **C)** Frecuencias de casos totales, defunciones y supervivientes de los pacientes con COVID-19 por grupo de edad y género. **D)** Distribución de la presencia de enfermedades preexistentes reportadas por rango de edad de acuerdo con el número de comorbilidades y tipo, ya sea única o en combinación con otras.

### **Parámetros de laboratorio en los pacientes con COVID-19 y la búsqueda de perfiles asociados a pronóstico**

La cohorte fue subdividida en 4 de acuerdo con el grupo de edad y el desenlace clínico: supervivientes <65 años (A), defunciones <65 años (B), supervivientes ≥65 años (C) y defunciones ≥ 65 años (D). Observándose que al ingreso hospitalario el grupo D presentó los valores más elevados de: creatinina, glucosa, proteína C reactiva, CALL, CURB-65 y SOFA, así como del número de enfermedades preexistentes; y, al contrario, los valores más bajos en cuanto a la cuenta de eritrocitos y de hematocrito, en estos últimos dentro de los valores de referencia de laboratorio (Tabla 2).

**Tabla 2. Características clínicas y parámetros de laboratorio de los pacientes con COVID-19.**

<i>Variable</i>	<i>Total (n=245)</i>	<i>A (n=99)</i> <i>Supervivientes &lt;65</i>	<i>B (n=48)</i> <i>Defunciones &lt;65</i>	<i>C (n=59)</i> <i>Supervivientes ≥65</i>	<i>D (n=39)</i> <i>Defunciones ≥65</i>	<i>Valor de p</i>
<b>Características</b>						
<b>Femenino</b>	87 (35.51%)	36 (36.36%)	15 (31.25%)	25 (42.37%)	11 (28.21%)	0.9086
<b>Masculino</b>	158 (64.49%)	63 (63.64%)	33 (68.75%)	34 (57.63%)	28 (71.79%)	0.1739
<b>Edad</b>	58 (48-71)	49 (38-55)	52.5 (45.25-58)	72 (67-78)	74 (69-82)	<b>&lt;0.0001</b>
<b>Defunciones</b>	87 (35.51%)	-	48 (100%)	-	39 (100%)	-
<b>Síntomas a la admisión hospitalaria</b>						
<b>Tos</b>	190 (77.55%)	79 (79.80%)	43 (89.58%)	45 (76.27%)	23 (58.97%)	0.8435
<b>Fiebre</b>	185 (75.51%)	75 (75.76%)	38 (79.17%)	45 (76.27%)	27 (69.23%)	0.5907
<b>Fatiga</b>	136 (55.51%)	58 (58.59%)	30 (62.50%)	25 (42.37%)	23 (58.97%)	0.1141
<b>Disnea</b>	173 (70.61%)	70 (70.71%)	32 (66.67%)	25 (42.37%)	29 (74.36%)	0.1996
<b>Artralgias</b>	168 (68.57%)	73 (73.74%)	33 (68.75%)	38 (64.41%)	24 (61.54%)	0.3168
<b>Cefalea</b>	157 (64.08%)	64 (64.65%)	37 (77.08%)	34 (57.63%)	22 (56.41%)	0.7424
<b>Mialgias</b>	171 (69.80%)	72 (72.73%)	37 (77.08%)	39 (66.10%)	23 (58.97%)	0.6780
<b>Dolor torácico</b>	109 (44.49%)	44 (44.44%)	23 (47.92%)	25 (42.37%)	17 (43.59%)	0.5169
<b>Expectoración</b>	41 (16.80%)	19 (19.39%)	12 (25.00%)	6 (10.17%)	4 (10.26%)	0.9420
<b>Rinorrea</b>	81 (33.20%)	38 (38.78%)	19 (39.58%)	12 (20.34%)	12 (30.77%)	0.1588

<b>Mareos</b>	47 (19.18%)	15 (15.15%)	13 (27.08%)	9 (15.25%)	10 (25.64%)	0.6763
<b>Disgeusia</b>	53 (21.72%)	24 (24.24%)	14 (29.17%)	10 (16.95%)	5 (13.16%)	0.8104
<b>Hiposmia/Anosmia</b>	57 (23.27%)	25 (25.25%)	14 (29.17%)	8 (13.56%)	10 (25.64%)	0.1623
<b>Diarrea</b>	60 (24.49%)	22 (22.22%)	12 (25.00%)	16 (27.12%)	10 (25.64%)	0.8008
<b>Comorbilidades</b>						
<b>Número de comorbilidades</b>	1 (0-3)	1 (0-2)	1 (0-2)	2 (1-3)	2 (1-3)	<b>0.0002</b>
<b>Obesidad</b>	58 (23.67%)	29 (29.29%)	16 (33.33%)	9 (15.25%)	4 (10.26%)	0.7491
<b>Diabetes</b>	88 (35.92%)	31 (31.31%)	10 (20.83%)	27 (45.76%)	20 (51.28%)	0.0730
<b>Hipertensión arterial</b>	106 (43.27%)	33 (33.33%)	13 (27.08%)	33 (55.93%)	27 (69.23%)	0.0780
<b>Dislipidemia</b>	22 (8.98%)	10 (10.10%)	4 (8.33%)	4 (6.78%)	4 (10.26%)	0.3149
<b>Enfermedad arterial periférica</b>	4 (5.71%)	4 (4.04%)	2 (4.17%)	2 (3.39%)	6 (15.38%)	0.1190
<b>Fumador</b>	18 (7.35%)	6 (6.06%)	5 (10.42%)	4 (6.78%)	3 (7.69%)	0.9139
<b>Epilepsia</b>	7 (2.86%)	5 (5.05%)	0	2 (3.39%)	0	-
<b>Complicación de diabetes</b>	13 (5.31%)	5 (5.05%)	1 (2.08%)	2 (3.39%)	5 (12.82%)	<b>0.0483</b>
<b>Insuficiencia renal crónica</b>	21 (8.57%)	9 (9.09%)	6 (12.50%)	1 (1.69%)	5 (12.82%)	0.0725
<b>Enfermedad pulmonar obstructiva crónica</b>	7 (2.86%)	1 (1.01%)	1 (2.08%)	4 (6.78%)	1 (2.56%)	0.4274
<b>Cirrosis hepática</b>	3 (1.22%)	0	0	0	3 (7.69%)	-
<b>Hipotiroidismo</b>	5 (2.04%)	2 (2.02%)	1 (2.08%)	2 (3.39%)	0	0.3613
<b>Exposición a humo</b>	10 (4.08%)	3 (3.03%)	1 (2.08%)	4 (6.78%)	2 (5.13%)	0.7782

Úlcera gastroduodenal	2 (0.82%)	0	0	0	2 (5.13%)	-
Cáncer	3 (1.22%)	0	1 (2.08%)	0	2 (5.13%)	-
Insuficiencia hepática aguda	1 (0.41%)	0	0	0	1 (2.56%)	-
Enfermedad de tejido conectivo	1 (0.41%)	1 (1.01%)	0	0	0	-
Enfermedad cardíaca	8 (3.27%)	3 (3.03%)	0	4 (6.78%)	1 (2.56%)	0.4076
Enfermedad cerebro-vascular	1 (0.41%)	0	0	1 (1.69%)	0	-
Linfoma	1 (0.41%)	0	0	0	1 (2.56%)	-
Sin comorbilidad	62 (25.30%)	32 (32.32%)	15 (31.25%)	11 (18.64%)	4 (10.25%)	0.7011
<b>Componentes celulares a la admisión hospitalaria</b>						
<b>Leucocitos totales (n=198)</b>	9.79 (7.07-13.33)	9.42 (6.15-12.39)	10.07 (6.89-14.75)	9.61 (7.23-12.01)	10.93 (7.54-15.25)	0.3317
<b>Neutrófilos (n=198)</b>	86 (79.68-91)	86 (79-91)	88.65 (82.28-91.9)	83.5 (75.25-88.48)	84.2 (81-92)	0.1317
<b>Linfocitos(n=198)</b>	8 (5-13.25)	8 (5.4-13)	7 (4.1-12.5)	10 (5.85-17.63)	6.8 (4-12)	0.1646
<b>Monocitos (n=198)</b>	4 (2.07-6)	4 (2-6)	3.1 (2.05-5)	4.75 (3.25-7)	4 (3-6)	0.1518
<b>Eosinófilos (n=198)</b>	0 (0-0)	0 (0-0.1)	0 (0-0)	0 (0-0.07)	0 (0-0)	0.8920
<b>Basófilos (n=198)</b>	0 (0-1.12)	0 (0-1)	0.3 (0-1.675)	0.2 (0-1)	0 (0-1.6)	0.9196
<b>NLR (n=198)</b>	10.88 (5.89-18.2)	10.5 (6-16.85)	12.81 (6.43-21.81)	8.55 (4.31-15.1)	12.25 (6.92-23)	0.1479
<b>Eritrocitos (n=198)</b>	4.96 (4.51-5.52)	5.11 (4.69-5.57)	5.28 (4.80-5.70)	4.91 (4.4-5.19)	4.72 (4.4-4.94)	<b>0.0022</b>
<b>Hemoglobina (n=198)</b>	14.95 (13.6-16.4)	15.1 (13.7-16.6)	15.4 (13.93-17.33)	14.7 (13.33-15.38)	14.6 (13.3-16)	0.1392
<b>Hematocrito (n=198)</b>	45.45 (41.73-49.13)	46.5 (42.6-49.2)	46.8 (41.63-51.85)	44.75 (40.28-46.2)	43.8 (40.2-46.3)	<b>0.0498</b>

<b>Plaquetas (n=198)</b>	246.2 (182.8-319.4)	238 (183.3-321.9)	225.8 (166.3-305.4)	282.5 (227.1-334.4)	252.4 (155.9-312.3)	0.0775
<b>Marcadores bioquímicos a la admisión hospitalaria</b>						
<b>Creatinina (n=197)</b>	0.9 (0.7-1.25)	0.8 (0.675-1.1)	0.9 (0.7-1.37)	0.85 (0.6-1.2)	1.2 (0.9-1.9)	<b>0.0070</b>
<b>Glucosa (n=198)</b>	128.5 (106.9-171)	126.1 (100-170)	123.9 (105.5-143.8)	124.2 (106.2-177)	167.1 (115-215)	<b>0.0142</b>
<b>Bilirrubinas totales (n=180)</b>	0.6 (0.4-0.8)	0.6 (0.4-0.8)	0.6 (0.4-0.9)	0.65 (0.5-0.9)	0.6 (0.5-0.8)	0.4189
<b>LDH (n=182)</b>	442.1 (331.7-605.8)	447.1 (319-609.3)	502.1 (389.8-671.3)	397.2 (305-550.5)	455 (331.5-613.4)	0.0588
<b>Proteína C reactiva (n=161)</b>	91 (70.25-191.5)	91 (76.8-163.7)	99.6 (79.2-294)	90 (48.65-91)	115 (86.63-248.3)	<b>0.0328</b>
<b>Dímero D (n=167)</b>	462.8 (268-1150)	377.2 (258.5-836)	632 (315-1370)	488 (281-2446)	470.5 (250.2-2618)	0.1263
<b>Fibrinógeno (n=161)</b>	890 (745-1172)	944.5 (762.9-1113)	906.5 (693-1497)	829.5 (761.8.-1027)	877.6 (669.5-1181)	0.4955
<b>Gasometría a la admisión hospitalaria</b>						
<b>pH (n=74)</b>	7.45 (7.42-7.49)	7.45 (7.42- 7.5)	7.44 (7.41-7.47)	7.47 (7.46- 7.62)	7.43 (7.29-7.45)	<b>0.0080</b>
<b>PaCO2 (n=73)</b>	28 (24-32)	28 (24-31.25)	31.5 (27.25-34.25)	27.5 (24-31.75)	26 (20-32)	0.2717
<b>PaO2 (n=73)</b>	66 (52-80)	65.5 (49.25-82.25)	54 (45.25-68.25)	67.5 (61-88.25)	68 (54-96)	0.1203
<b>HCO<sub>3</sub> (n=73)</b>	20.2 (17.2-22.45)	19.85 (17.48-21.73)	21.5 (20.28-24.23)	19.8 (17.5 23.6)	15.9 (13-22.2)	<b>0.0497</b>
<b>SaO2 (n=95)</b>	93 (86-95)	94 (90.25-96)	87 (74.5-94.5)	94 (84.25-94.75)	92 (86.75-96.5)	0.0958
<b>FiO<sub>2</sub> (n=50)</b>	31.5 (21-47.25)	21 (21-42.5)	40 (30-78)	40.5 (31.5-45.75)	35.5 (23.25-62.5)	<b>0.0435</b>
<b>Escalas de severidad de neumonía a la admisión hospitalaria</b>						
<b>CALL (n=244)</b>	10 (8-11)	9 (7-10)	10 (8-11)	11 (10-12)	12 (11-13)	<b>&lt;0.0001</b>
<b>CURB-65 (n=244)</b>	1 (0-2)	0 (0-1)	1 (0-1)	2 (1-2)	2 (1-2)	<b>&lt;0.0001</b>

<b>NEWS2 (n=244)</b>	7 (5-9)	7 (4-9)	8 (6-9)	7 (5-8)	7 (5-9)	0.0592
<b>SOFA (n=235)</b>	1 (1-3)	1 (1-3)	2 (1-4)	1 (1-3)	3 (1-4)	<b>0.0236</b>

*n=245 a menos que se indique lo contrario (). Subdivisión de grupos en: supervivientes <65 años (A), defunciones <65 años (B), supervivientes ≥65 años (C) y defunciones ≥ 65 años (D). Las variables continuas se compararon con la prueba Kruskal-Wallis, mientras que, las variables categóricas con la prueba de  $\chi^2$ , valores de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos y se identifican en negritas.*

Se realizó la búsqueda a través del tiempo de un perfil potencial que nos permita la estratificación por progresión de la enfermedad por COVID-19 entre supervivientes (S) y defunciones (D), en menores y mayores de 65 años. Para esto, iniciamos con los parámetros de laboratorio, específicamente componentes celulares y marcadores bioquímicos, obtenidos a los tres diferentes tiempos (a la admisión, a los 7 días de hospitalización y en la etapa de convalecencia) (Figura 6).

Al ingreso, las medianas de las cuentas de los leucocitos totales se encontraban altas en todos los grupos con respecto a la mediana de referencia, e incrementaron a los 7 días en aquellos que fallecieron (D), siendo mayor en <65. La frecuencia de neutrófilos, así como del cociente neutrófilos/linfocitos (NLR) se encontraron altos tanto en los grupos supervivientes y de defunciones durante los primeros 7 días hospitalizados, observándose hasta la convalecencia el retorno a valores normales en ambos grupos de edad. Al contrario, los linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos se encontraban disminuidos en todos los grupos, tanto a la admisión como a los 7 días, observándose la recuperación de valores normales de linfocitos posterior al alta hospitalaria. Las cuentas de eritrocitos se encontraban por encima de los valores de referencia desde la admisión en pacientes menores de 65, siendo mayor a los 7 días, especialmente en aquellos que fallecieron; mientras que, en el grupo de adultos de edad avanzada mantuvieron una mediana entre los límites de referencia, observándose los valores cercanos al límite inferior a los 7 días en aquellos que no sobrevivieron. Los valores de hematocrito siguieron la misma tendencia que las cuentas eritrocitarias; sin embargo, siempre se mantuvieron dentro de los intervalos de referencia. En cuanto a las cuentas plaquetarias se observó un incremento en las medianas a los 7 días de hospitalización en el grupo <65 años con respecto a sus valores de admisión, tanto en supervivientes y defunciones; mientras que, en el grupo >65 años no se apreciaron cambios importantes entre los valores de admisión y a los 7 días entre los supervivientes y defunciones.

Durante la etapa convaleciente, casi todos los parámetros regresaron a valores normales, a excepción de las poblaciones de eosinófilos y basófilos que no

alcanzaron los valores de referencia al menos dentro de las primeras 4 semanas posteriores al alta hospitalaria (Figura 6A).

Por otro lado, al observar los parámetros bioquímicos a través del tiempo (Figura 6C) identificamos que los pacientes que fallecieron en ambos grupos de edad mostraban los valores más altos de LDH, proteína C reactiva, dímero D y fibrinógeno, pronunciándose aún más los niveles elevados de LDH y dímero D a los 7 días de hospitalización en ellos. Notablemente, en la etapa convaleciente los niveles de LDH alcanzan valores por debajo de los niveles de referencia en los pacientes <65 años; contrariamente, los niveles de dímero D y fibrinógeno se mantienen por encima de los límites superiores en los pacientes >65 años. Los niveles de proteína C reactiva y fibrinógeno se mantuvieron muy por encima de los límites superiores de referencia, tanto en supervivientes como en no supervivientes, en ambos grupos de edad durante la estancia hospitalaria, observándose una disminución más importante en el grupo S a los 7 días; sin embargo, hasta la etapa convaleciente se alcanzan niveles normales de proteína C reactiva en ambos grupos de edad, y en cuanto al fibrinógeno solo en los adultos <65 años. Los niveles de bilirrubinas totales no mostraron valores fuera de los de referencia durante la presentación de la enfermedad. Finalmente, los valores de creatinina solo se encontraron en el límite superior de referencia a la admisión en los adultos de edad avanzada que fallecieron, lo que permite sugerirlo como un marcador de mal pronóstico en este grupo.

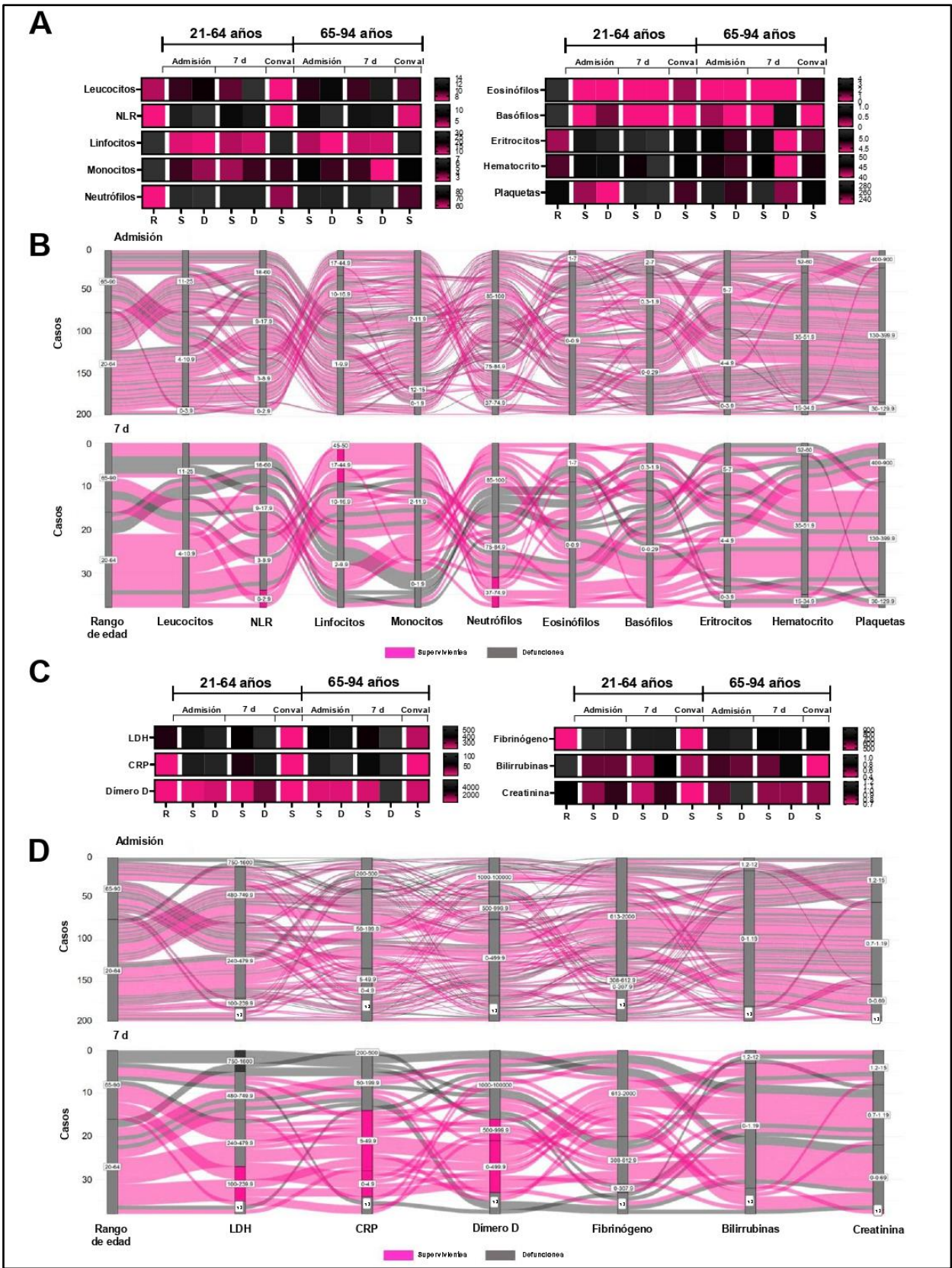
Adicionalmente, para la identificación de potenciales perfiles clínicos de riesgo en nuestra cohorte de pacientes con COVID-19, llevamos a cabo la visualización de los parámetros de laboratorio de los componentes celulares (Figura 6B) y marcadores bioquímicos (Figura 6D) mediante gráficos de aluvial a la admisión y a los 7 días de hospitalización. Este tipo de representación permite una comparación integrativa de los diferentes parámetros, los cuales se muestran simultáneamente asignados cada uno en ejes verticales y sus valores en estratos o niveles, cuyo tamaño varía de acuerdo con la proporción de casos que pasan a través, estos últimos son representados mediante líneas, en color rosa se muestran los

pacientes supervivientes y en color negro aquellos que fallecieron. Los estratos fueron definidos empleando los valores de referencia, limitados por estratos inferiores o superiores, dependiendo del comportamiento de la población.

Al ingreso hospitalario, no se detectó una relación aparente entre los parámetros celulares y los desenlaces, mientras que, a los 7 días, una tendencia hacia el progreso de la enfermedad es observada, los supervivientes mostraron una mayor afluencia hacia conteos de leucocitos totales normales (estrato 4-10.9 células/ $\mu$ L), valores de NLR más bajos, mayor frecuencia de linfocitos y valores normales de monocitos (estrato 2-11.9%). Sorprendentemente, a los 7 días, tres parámetros celulares, independiente o en combinación, se asociaron con una progresión favorable (estratos en rosa): valores de NLR  $<3$ , linfocitos  $\geq 17\%$  y/o neutrófilos  $<75\%$ .

En cuanto a los parámetros bioquímicos, de igual forma un patrón de predicción de desenlaces no es obvio a la admisión, siendo posible hasta el día 7 de hospitalización la identificación de 3 parámetros, independientes o en combinación, que parecen definir el progreso de la severidad. Todos los pacientes que presentaban valores de LDH  $<240$  U/L, proteína C reactiva  $<50$  mg/L y/o dímero-D  $<1000$  ng/mL (estratos en rosa) tuvieron un desenlace favorable; contrariamente, pacientes con niveles de LDH  $>750$  U/L (estrato en negro) fallecieron.

De esta manera, un perfil pronóstico en pacientes con COVID-19 que podría ayudar a la estratificación y manejo clínico se compone de 6 parámetros de laboratorio: NLR, linfocitos, neutrófilos, LDH, proteína C reactiva y dímero D.



**Figura 6. Asociación entre parámetros de laboratorio clínicos en pacientes con COVID-19 y su progresión con la enfermedad. A)** Representación en gráficos de calor que muestran las medianas de las cuentas absolutas de leucocitos, eritrocitos y plaquetas, frecuencias de linfocitos, monocitos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos, así como el valor del hematocrito y del cociente neutrófilos/linfocitos (NLR) a lo largo del tiempo (admisión, a los 7 días y convalecencia) en comparación con los valores de referencia (R) indicados en la primera columna de cada parámetro. Análisis realizado por grupos de edad, menores y mayores de 65 años, y desenlace, supervivientes (S) y defunciones (D). **B)** Representación en gráficos de aluviales a la admisión y a los 7 días que muestran los componentes celulares anteriormente mencionados, localizados en los ejes verticales divididos en diferentes estratos, de cada uno de los pacientes representados por líneas en color rosa (supervivientes) o negras (defunciones). El tamaño y color de los estratos varía de acuerdo con el número de casos y con el tipo de desenlace que lo atraviesan, respectivamente, en caso o de que coincida un tipo de desenlace se indica con el color asociado (rosa o negro), en caso contrario permanece en color gris. **C)** Representación en gráficos de calor que muestran las medianas de los niveles de LDH, proteína C reactiva, dímero D, fibrinógeno, bilirrubinas totales y creatinina a lo largo del tiempo (admisión, a los 7 días y convalecencia) en comparación con los valores de referencia (R) indicados en la primera columna de cada parámetro. Análisis realizado por grupos de edad, menores y mayores de 65 años, y desenlace, supervivientes (S) y defunciones (D). **D)** Representación en gráficos de aluviales a la admisión y a los 7 días que muestran los componentes bioquímicos mencionados en el inciso anterior. Se identificaron 6 parámetros de laboratorio asociados a un perfil pronóstico en pacientes con COVID-19: NLR, linfocitos, neutrófilos, LDH, proteína C reactiva y dímero D. Valores de referencia: leucocitos totales;  $4-11 \times 10^3$  células/ $\mu\text{L}$ , Cociente neutrófilos/linfocitos (NLR): 1-3, Linfocitos: 17-45%, Monocitos: 2-12%, Neutrófilos: 37-75%, Eosinófilos: 1-7%, Basófilos: 0.3-2%, Eritrocitos:  $4-5 \times 10^6$  células/ $\mu\text{L}$ , Hematocrito: 35-52%, Plaquetas:  $130-400 \times 10^3$  células/ $\mu\text{L}$ , lactato deshidrogenasa (LDH): 240-480 U/L, Proteína C reactiva (CRP): 0-5 mg/L, Dímero D: 0-500 U/L, Fibrinógeno: 308-613 mg/dL, Bilirrubinas totales: 1-1.2 mg/dL, Creatinina: 0.7-1.2 mg/dL. Conval, convalecencia; R, referencia; S, supervivientes; D, defunciones; ND, sin dato.

## **El riesgo de letalidad por COVID-19 y su asociación con condiciones metabólicas preexistentes**

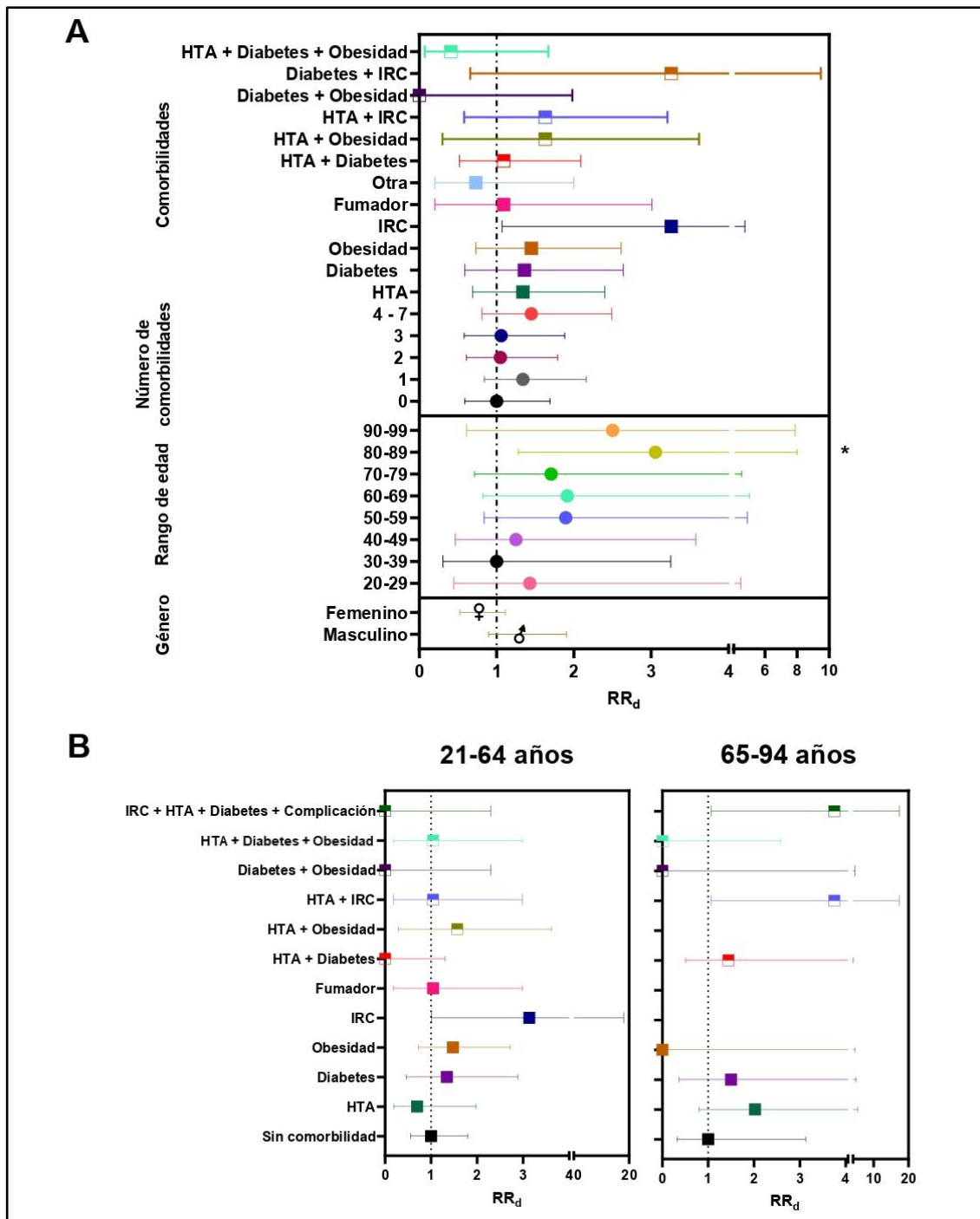
Investigamos la asociación del género, la edad, así como de la presencia de enfermedades preexistentes (comorbilidades) con el desenlace clínico en la cohorte de pacientes con COVID-19 mediante la medida estadística del riesgo relativo (RR). El RR es la probabilidad de que un evento ocurra en un grupo expuesto o que presenta algún factor de riesgo en comparación con un grupo control, se expresa en valores absolutos resultado del cociente de la comparación entre ambos grupos. Valores de RR igual a 1 indican que no hay diferencia entre el grupo expuesto y el control, mientras que un valor  $>1$  indica que hay un riesgo incrementado en el grupo expuesto (46).

Al igual que en otros reportes, el nuestro confirma la tendencia a un riesgo relativo de muerte ( $RR_d$ ) mayor en los pacientes hombres ( $RR_d$  1.29, 95% IC: 0.90 – 1.90,  $p= 0.21$ ) en comparación con las mujeres (0.77, 95% IC:0.53 – 1.11,  $p=0.21$ ) (Figura 7A y Anexo 3). Al calcular el  $RR_d$  por COVID-19 observamos que su valor incrementa con la edad y con algunas comorbilidades. Los valores de la tasa de letalidad (CFR) y el de  $RR_d$  incrementan después de los 40 años, con un riesgo de muerte estadísticamente significativo en el rango de edad de 80-89 años ( $RR_d =3.06$ , 95% CI: 1.28-8.00,  $p= 0.02$ ). En cuanto al rango de 50-59 años, grupo que registró más de un cuarto de las defunciones (26.94%), el  $RR_d$  fue 1.89 (95% CI: 0.84 – 4.90,  $p= 0.18$ ), sin embargo, no hay significancia estadística. El rango de edad de 20-29 años es un punto de interés ya que el  $RR_d$  fue 1.43 (95% CI: 0.45 – 4.49,  $p= 0.69$ ), sin embargo, de igual forma no alcanza significancia estadística.

En nuestra cohorte, 74.69% de los pacientes y 78.16% de las defunciones reportó al menos una comorbilidad ( $RR_d=1.34$ , 95% CI:0.84 – 2.16,  $p= 0.27$ ), observándose el mayor riesgo de letalidad en aquellos pacientes con más de 4 condiciones preexistentes ( $RR_d=1.45$ , 95% CI: 0.81 – 2.49,  $p=0.23$ ). Posteriormente, evaluamos el  $RR_d$  de acuerdo con el tipo de enfermedad preexistente en los pacientes que presentaron solo una e identificamos que la insuficiencia renal crónica (IRC) presentó el riesgo más alto para COVID-19

( $RR_d=3.26$ , 95% CI: 1.07 – 4.75,  $p = 0.10$ ). Obesidad, diabetes e hipertensión arterial (HTA) también presentaron un valor mayor a 1 de  $RR_d$ , 1.45, 1.36 y 1.34, respectivamente. El hábito de fumar tabaco no agregó riesgo en nuestra cohorte ( $RR_d=1.09$ , 95% CI: 0.20 – 3.01,  $p= >0.99$ ). En aquellos pacientes que reportaron más de una comorbilidad, la combinación de IRC con diabetes confiere un mayor  $RR_d$  (3.26, 95% CI: 0.66 – 9.49,  $p= 0.32$ ), seguido de la combinación HTA ya sea con obesidad o IRC ( $RR_d=1.63$ ). En los adultos de mediana edad la insuficiencia renal crónica resultó un importante factor de riesgo, aunque sin significancia estadística, incrementando el riesgo de letalidad por COVID-19 hasta 3 veces ( $RR_d= 3.13$ , 95% CI: 1.02 – 19.03,  $p= 0.12$ ), seguido por la presencia de las combinaciones HTA más obesidad, seguido de obesidad y diabetes (Figura 7B y Anexo 3). En cuanto a los adultos de edad avanzada dos combinaciones son las que proveen un mal pronóstico: HTA+IRC e IRC+HTA+Diabetes+Complicación de diabetes ( $RR_d= 3.75$ , 95% IC: 1.06 – 17.36,  $p= 0.11$ ), seguido de HTA y diabetes, como únicas comorbilidades (Figura 7B y Anexo 3).

La identificación de que no hay un mayor riesgo adquirido por la presencia de más de una comorbilidad en adultos <65 años se puede deber a la baja frecuencia de casos con las combinaciones de comorbilidades, quienes pueden tener una menor prevalencia de complicaciones por diabetes ya que no las han desarrollado o no se les ha diagnosticado. Sin embargo, en ellos se observa una tendencia de riesgo incrementado debido a la presencia de enfermedades metabólicas crónicas (IRC, HTA, obesidad y diabetes), lo que sugiere un envejecimiento inducido del sistema hematopoyético favorecido por las comorbilidades o por el estilo de vida, el cual incrementa con la edad y genera catástrofes inflamatorias. Al investigar las defunciones en el rango de 20-29 años identificamos que el 75% presentaban IRC como única comorbilidad. Por lo que, la insuficiencia renal crónica es un importante factor de riesgo que requiere atención desde edades tempranas en nuestra población.



**Figura 7. Morbimortalidad en la cohorte de estudio. A)** Riesgo relativo de muerte ( $RR_d$ ) por COVID-19 por género, rango de edad, número y tipo de comorbilidades. **B)**  $RR_d$  por comorbilidad única o en combinación por grupo de edad, menores y mayores de 65 años. La línea vertical punteada indica  $RR_d=1$ . Los valores de  $RR_d$  fueron calculados por género masculinos vs femeninas, rango de edad vs rango de 30-39 (rango con menor CFR), número y tipo de comorbilidades vs el grupo sin comorbilidades, en cuanto a comorbilidad o combinaciones vs grupo sin comorbilidad en el mismo grupo de edad. \*  $p < 0.5$ .

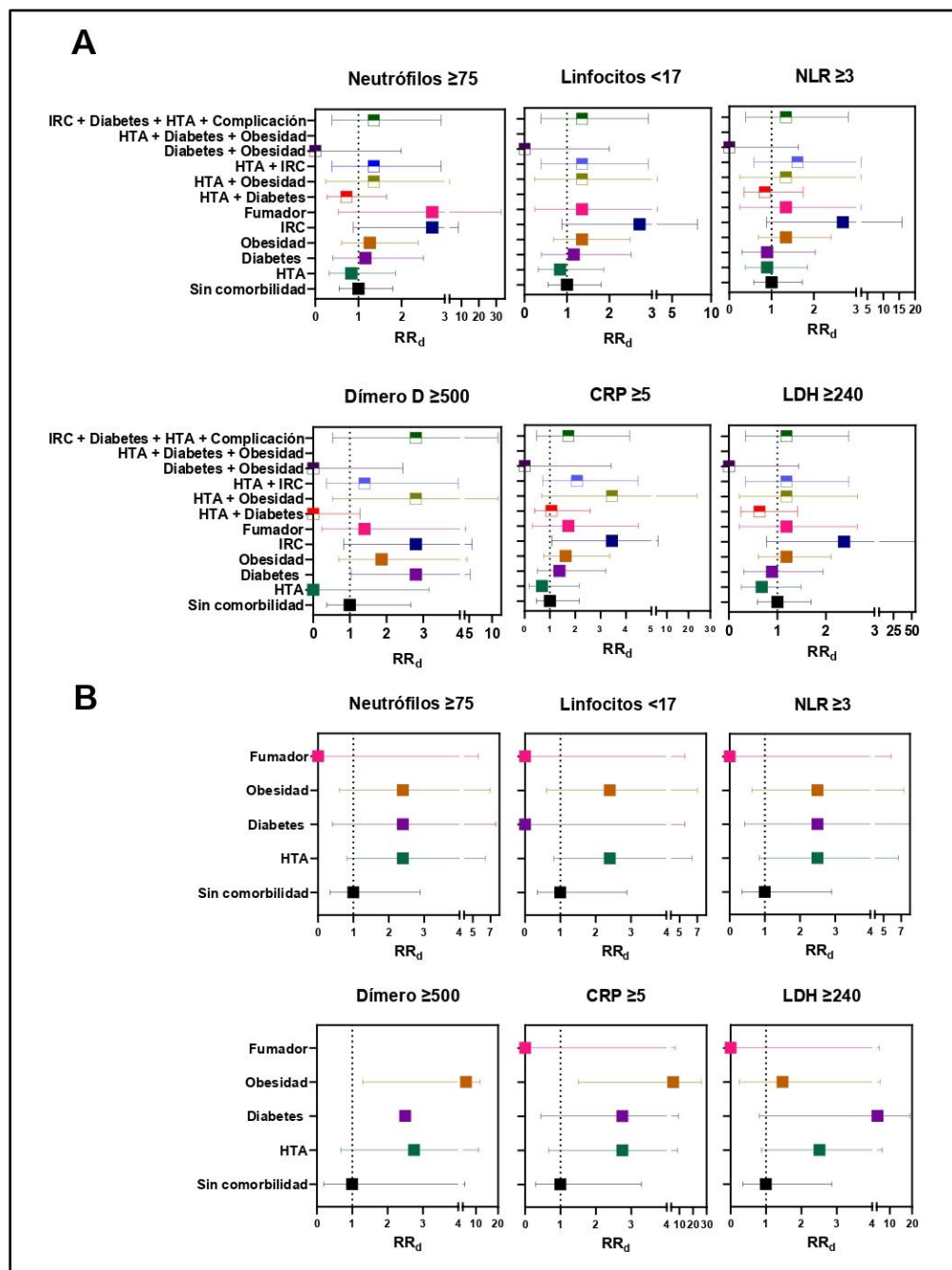
## **Combinaciones de riesgo en pacientes con COVID-19: presencia de enfermedades metabólicas preexistentes y perfiles hematológicos de mal pronóstico**

Para extender el perfil de mal pronóstico en pacientes con COVID-19 investigamos si las comorbilidades se asociaban con los parámetros anormales de laboratorio (neutrófilos, linfocitos, NLR, dímero D, proteína C reactiva y LDH) permitiendo una mejor identificación de casos severos a la admisión y a los 7 días de hospitalización (Figura 8 y Anexo 4).

A la admisión (Figura 8A), encontramos que pacientes fumadores o con IRC y con una frecuencia de neutrófilos  $\geq 75\%$  presentaron 2.71 veces mayor riesgo de muerte en comparación con pacientes con el mismo valor de neutrófilos, pero sin comorbilidades. De igual forma, la combinación de pacientes que padecían IRC y con linfocitos  $< 17\%$  o NLR  $> 3$ , presentaban un RR<sub>d</sub> de 2.71 y 2.69, respectivamente. El riesgo de muerte incrementó 2.8 veces en aquellos pacientes que presentaron niveles superiores a 500 ng/mL de dímero D en presencia de diabetes, IRC, HTA + obesidad o la combinación de IRC/HTA/Diabetes/Complicación de diabetes. El riesgo de muerte incrementó 3.44 veces en pacientes con niveles de proteína C reactiva  $\geq 5$  mg/L y que padecían IRC o la combinación HTA + Obesidad. En cuanto a los niveles de LDH  $\geq 240$  U/L, pacientes con IRC presentaron 2.38 veces mayor riesgo de defunción que su contraparte control.

A los 7 días de hospitalización (Figura 8B), pacientes que reportaron obesidad, diabetes o hipertensión y que presentaron neutrófilos  $\geq 75\%$  o NLR  $\geq 3$ , incrementaron el valor de RR<sub>d</sub> 2.4 y 2.5, respectivamente. Mientras que, niveles de dímero D superiores a 500 ng/mL incrementaron 5.5 y 2.75 veces el riesgo en pacientes con obesidad o hipertensión, respectivamente. La combinación de valores de proteína C reactiva  $\geq 5$  mg/L y la presencia de obesidad aumentó 5.5 veces significativamente el riesgo de muerte por COVID-19 (95% CI: 1.51 – 26.27,  $p = 0.05$ ). Finalmente, pacientes con valores de LDH superiores al límite de referencia y con diabetes o HTA presentaron 4.4 y 2.51 mayor riesgo de muerte.

Empleando el conjunto de parámetros anormales de laboratorio y el historial clínico de condiciones preexistentes de los pacientes permitió complementar el perfil de mal pronóstico de pacientes con COVID-19.



**Figura 8. Incremento del riesgo de muerte en pacientes con COVID-19 debido a la presencia de comorbilidades y parámetros anormales de laboratorio.**  $RR_d$  fueron calculados en los pacientes que presentaban los niveles anormales de los parámetros de laboratorios indicados entre casos con la comorbilidad o combinación de comorbilidades vs casos sin comorbilidad, tanto a la **A)** admisión y **B)** 7 días de hospitalización. La línea vertical punteada indica  $RR_d=1$ .

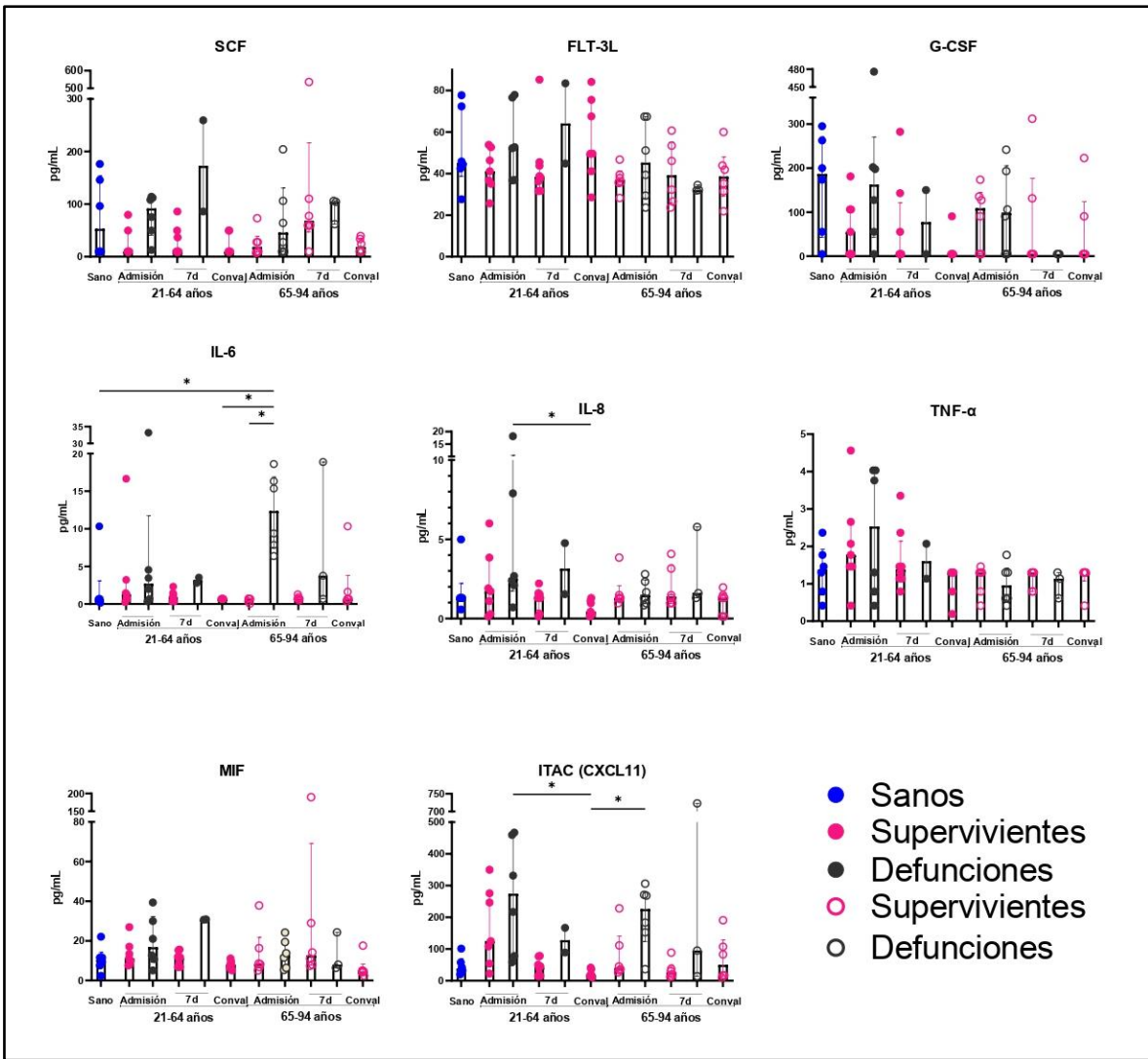
### **Un microambiente proinflamatorio en pacientes <65 años con COVID-19**

Llevamos a cabo la medición de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en los sueros de los pacientes con COVID-19 a lo largo de los 3 diferentes puntos del transcurso de la enfermedad y los comparamos con respecto a individuos sanos (Figura 9).

Al ingreso hospitalario, los pacientes <65 años mostraron una tendencia hacia valores más altos de los mediadores proinflamatorios e inflamatorios IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , MIF y CXCL11 con respecto al grupo de individuos sanos. Además, se observaron niveles más altos de SCF, FLT-3L, G-CSF, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , MIF y CXCL11 en los pacientes con desenlace fatal con respecto a los supervivientes en este grupo etario. En cuanto a la admisión de los pacientes  $\geq 65$  años, se observó un incremento estadísticamente significativo en los niveles de IL-6 en aquellos que fallecieron con respecto a los individuos sanos y supervivientes. También se observó un comportamiento similar en cuanto a los niveles de CXCL11, aunque sin significancia estadística.

A los 7 días de hospitalización, en las defunciones de los pacientes <65 años se observaron dos comportamientos distintos en los componentes inflamatorios solubles, por un lado, un incremento en los valores de SCF, FLT-3L, IL-6, IL-8 y MIF; mientras que, una disminución se observó en los niveles de G-CSF, TNF- $\alpha$  y CXCL11. Por otro lado, a los 7 días se observó un incremento en los niveles de SCF y una disminución en los de CXCL11 en las defunciones de los pacientes  $\geq 65$  años.

Un ambiente inflamatorio es sugestivo con los datos obtenidos en las defunciones de los pacientes de mediana edad.



**Figura 9. Ambiente inflamatorio en pacientes de mediana edad con COVID-19.** Concentraciones séricas de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en individuos sanos y en la cohorte de estudio a la admisión, 7 días y convalecencia.

## **Panorama inmunológico en pacientes con COVID-19**

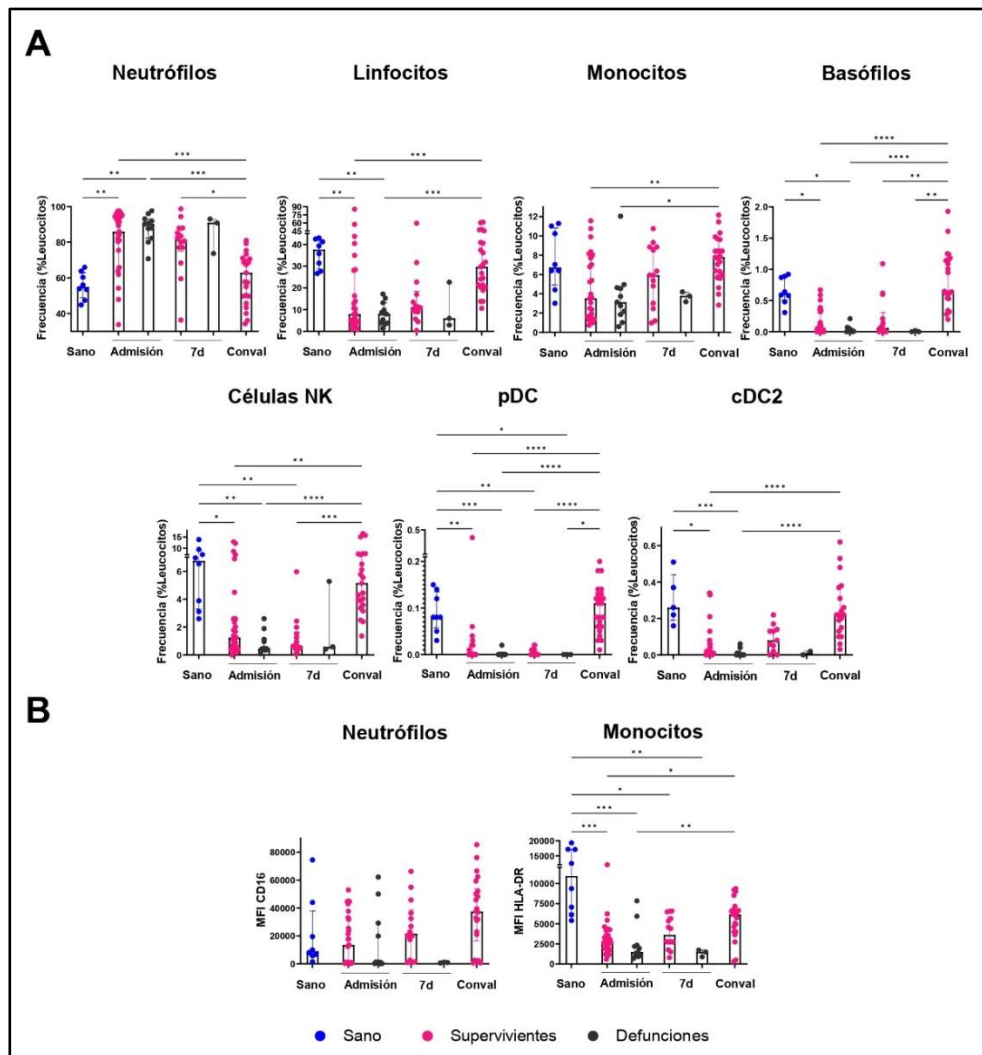
Se llevó a cabo la evaluación del contenido de las poblaciones celulares hematopoyéticas por citometría de flujo en las muestras de sangre periférica al ingreso, 7 días de hospitalización y convalecencia de pacientes adultos con COVID-19, así como de adultos sanos. Las poblaciones celulares en los pacientes de mediana edad con COVID-19 se presentan como frecuencias con respecto a leucocitos totales (Figura 10).

A la admisión, se observa que el compartimento de neutrófilos se encuentra significativamente incrementado provocando una reducción significativa en las frecuencias de linfocitos, basófilos, células NK y células dendríticas, tanto plasmacitoides (pDC) como CD11c<sup>+</sup> (cDC2), en los pacientes con COVID-19 con respecto a los individuos sanos. Además, se encontraron valores más reducidos de células NK, pDCs y cDC2 en aquellos pacientes con desenlace fatal, lo que sugiere que no se estableció efectivamente una linfopoyesis de emergencia en respuesta a SARS-CoV-2.

A los 7 días, se observan dinámicas inmunológicas diferentes entre los pacientes que fallecieron y supervivientes, en los primeros la neutrofilia persiste y provoca una disminución más pronunciada en el resto de las poblaciones celulares; mientras que, en los supervivientes el contenido de neutrófilos empieza a disminuir y se acompaña con el incremento de los demás compartimientos leucocitarios. Notablemente, en la convalecencia todas las poblaciones alcanzan valores normales, observándose una tendencia a valores más altos de monocitos, pDCs y cDC2s con respecto al grupo control, lo que sugiere la importancia de estas poblaciones para la recuperación (Figura 10A).

En cuanto a las subpoblaciones de monocitos se observa una disminución significativa en las fracciones de intermedios y no clásicos en pacientes <65 años con COVID-19 con respecto a los sanos, tanto al ingreso como a los 7 días, alcanzando valores normales hasta la etapa convaleciente (Anexo 5A).

Para investigar la presencia de células mieloides inmaduras y disfuncionales evaluamos la expresión de CD16 y HLA-DR en los neutrófilos y en los monocitos, respectivamente (Figura 10B). Observándose en los no supervivientes una nula expresión de CD16 en los neutrófilos y reducción significativa de la expresión de HLA-DR en los monocitos, tanto a la admisión como a los 7 días. Con estos resultados se sugiere que una hematopoyesis de emergencia de linaje mielode se encuentra asociada con la inmunopatogénesis de COVID-19 en los pacientes adultos <65 años con mal pronóstico.

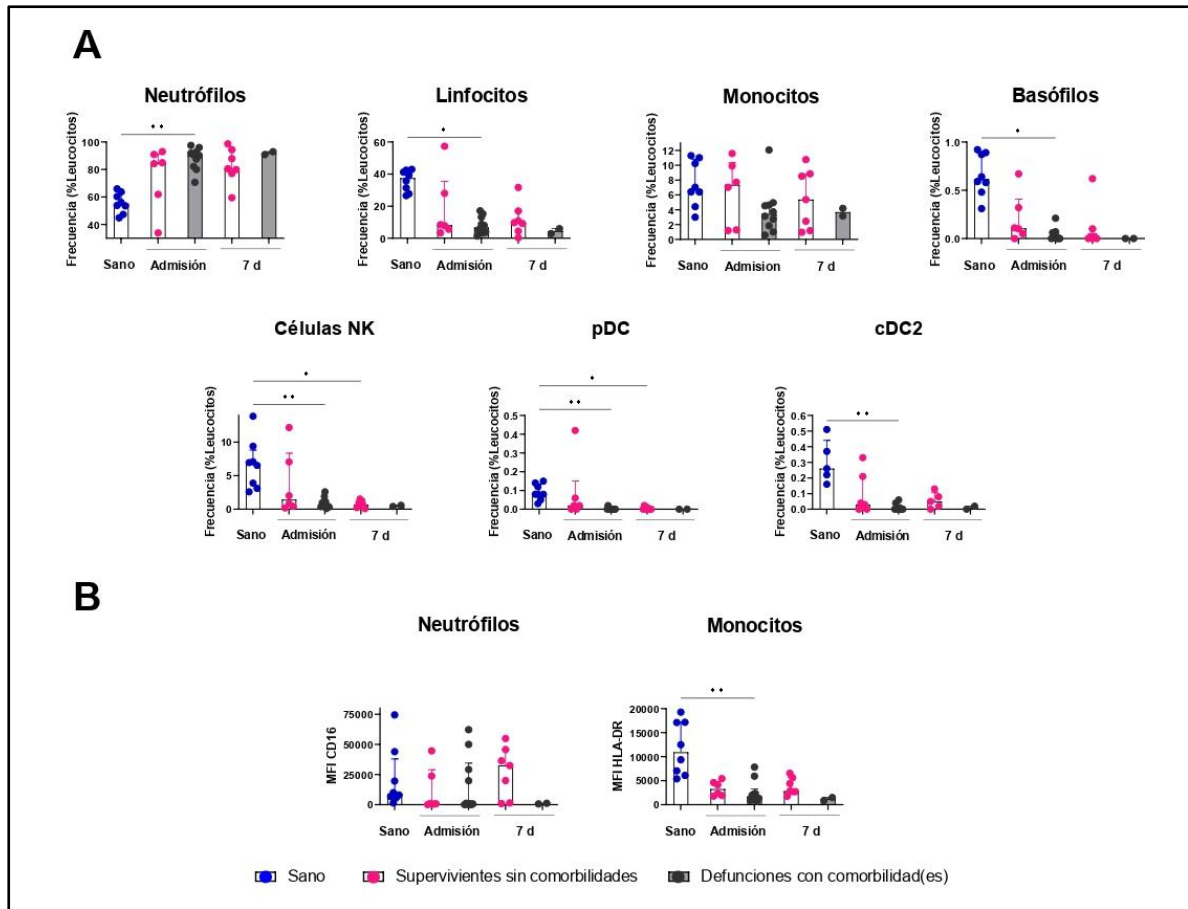


**Figura 10. Panorama inmunológico en pacientes de mediana edad con COVID-19. A)** Comparación de las frecuencias celulares de las diferentes poblaciones immuno-hematopoyéticas entre individuos sanos y pacientes adultos <65 años a la admisión, 7 días y en la convalecencia. **B)** Niveles de expresión de las moléculas CD16 y HLA-DR en neutrófilos y monocitos, respectivamente.

### **Perfil para estratificación de pacientes <65 años con COVID-19**

Investigamos la influencia de las comorbilidades con respecto al contenido de las diferentes poblaciones celulares hematopoyéticas. Las frecuencias celulares en pacientes con COVID-19 <65 años, supervivientes sin comorbilidades y defunciones con comorbilidades, se comparan con individuos sanos (Figura 11).

Al ingreso hospitalario, los pacientes de mediana edad con enfermedades preexistentes que enfermaron con COVID-19 y tuvieron un mal pronóstico se caracterizaron por una frecuencia significativamente elevada de neutrófilos con baja expresión de CD16 en paralelo con una reducción significativa en el contenido de linfocitos, basófilos, células NK, pDCs y cDC2s. Se observa una tendencia a valores disminuidos en la frecuencia de monocitos totales, caracterizados por una baja expresión de HLA-DR; sin embargo, solo en la frecuencia de los monocitos no clásicos se identifica una disminución significativa (Anexo 5B).



**Figura 11. Perfil de riesgo en pacientes de mediana edad con COVID-19. A)** Comparación de las frecuencias celulares de las diferentes poblaciones inmuno-hematopoyéticas entre individuos sanos y pacientes adultos <65 años, supervivientes sin comorbilidades y defunciones con comorbilidades, a la admisión, 7 días y en la convalecencia. **B)** Niveles de expresión de las moléculas CD16 y HLA-DR en neutrófilos y monocitos, respectivamente.

## DISCUSIÓN

Durante la pandemia por COVID-19, México resultó severamente afectado ubicándose dentro de los primeros 5 países con exceso de mortalidad y entre los primeros 30 en mortalidad por COVID-19. La incidencia de casos nacionales, previo a la vacunación, siguieron la tendencia de la pirámide poblacional, sin embargo, más de la mitad de las defunciones por COVID-19 han ocurrido en adultos <65 años (1,5).

Diferentes estudios han identificado factores de riesgo asociados a mortalidad en pacientes adultos con COVID-19, entre ellos: ser del género masculino, mayor edad, presentar obesidad, diabetes, hipertensión, enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares o renales (3).

Nuestra cohorte de estudio constituida principalmente por pacientes masculinos (64.49%) coincide con diferentes reportes acerca de la vulnerabilidad de los hombres a desarrollar una forma severa de la enfermedad por COVID-19 (47). La diferencia en las tasas de letalidad de COVID-19 entre hombres y mujeres, se podría explicar debido a que ECA2 se localiza en el cromosoma X, por lo que podrían encontrarse alelos confiriendo resistencia a la infección, resultando en un menor número de decesos en las pacientes femeninas. También se podría deber a los estrógenos y testosterona que tienen funciones inmunorreguladoras, los cuales podrían influir en la inmunoprotección o en la severidad de la enfermedad (13).

La edad avanzada es uno de los principales factores de riesgo asociados a formas severas de COVID-19. A principios de la emergencia sanitaria, la expectativa era que países constituidos por poblaciones jóvenes, como el nuestro, con una población con una edad promedio menor que la mundial (29.3 años) iban a tener control de la pandemia por COVID-19, desafortunadamente una alta prevalencia de condiciones metabólicas preexistentes impactó con altas tasas de mortalidad (4,5). México, así como algunos países latinos como: Perú, Ecuador y Bolivia, son algunos de los países que han sobrepasado más del 50% de los decesos estimados durante la pandemia (48). En nuestro estudio, la mayor frecuencia de

casos y defunciones se encuentran afectando adultos entre 21-64 años comprendiendo el 60% y 55.2%, respectivamente. Esto concuerda con lo reportado en el análisis nacional de Domínguez-Ramírez donde más de la mitad de las defunciones con COVID-19 ocurrieron en adultos de 20-64 años (52.7%), mientras que los adultos mayores de 65 años y los pacientes pediátricos comprendieron 46.9% y 0.4%, respectivamente (5).

La expectativa que poblaciones jóvenes iban a desencadenar una respuesta efectiva contra SARS-CoV-2, se basa en la suposición de la capacidad de responder de un sistema inmune y hematológico no envejecido. Sin embargo, una hematopoyesis de emergencia de linaje mieloide, favorecida por las condiciones de salud preexistentes en la población, pueden impactar los desenlaces de COVID-19 incluso en pacientes jóvenes y de mediana edad (4).

De acuerdo con la OMS, América Latina cuenta con altas tasas de enfermedades metabólicas crónicas: 62.8% de los hombres y 59.8% de las mujeres presentan sobrepeso/obesidad y 40% de los adultos >34 años padecen hipertensión arterial (31.1% en comparación con la incidencia global). Mientras que, 79% de los casos de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) que afectan individuos de 20-79 años se registran en países de bajo y mediano ingreso (incidencia mundial 8.8%). Sorprendentemente, alrededor de 10 millones de individuos con DM2 en Centro- y Sudamérica no están conscientes de su estado. HTA y diabetes son las causas más comunes de insuficiencia renal crónica (IRC), la cual afecta al 9.1% de la población mundial, con una mayor incidencia de casos que los esperados por el nivel de desarrollo en Oceanía, África subsahariana y América Latina (49–51). México ocupa los primeros lugares de prevalencia de sobrepeso/obesidad (75.2% adultos >20 años) y diabetes (13.7%); mientras que, 22% de los adultos han sido diagnosticados con hipertensión arterial (4,5). Además, ocupa el sexto lugar en las tasas de mortalidad más altas de IRC, resultando Puebla como el estado con las mayores tasas de mortalidad, de años de vida perdidos debido a muerte prematura (YLL) y de años vividos con discapacidad (DALY) por IRC (6).

Estudios previos han indicado que a la admisión hospitalaria 20-51% de los pacientes con COVID-19 presentaban al menos una comorbilidad (52). En nuestra cohorte 74.69% de los casos reportaron al menos una enfermedad preexistente diagnosticada siendo HTA, diabetes y obesidad las de mayor frecuencia.

El incremento de desarrollar una forma severa y fatal de COVID-19 en pacientes que padecen hipertensión o diabetes tipo 1 o 2 se debe a un incremento de ECA2 debido a que el tratamiento para estas condiciones provoca la sobreexpresión de este (53).

Las personas con obesidad presentan un mayor riesgo de complicaciones por COVID-19 debido no solo al riesgo incrementado de padecer alguna enfermedad crónica originada por la condición, susceptibilidad a infecciones, o tener un incremento de citocinas inflamatorias sino también a que está asociada con una disminución del volumen de reserva respiratoria, la capacidad funcional y la distensibilidad respiratoria (54,55).

Por otro lado, la insuficiencia renal crónica con una incidencia de 8.57% en nuestros casos, resultó ser la única comorbilidad que provee el mayor riesgo de letalidad en pacientes con COVID-19 menores de 65 años. Comorbilidad que resultó ser la de mayor riesgo de fatalidad por COVID-19 en un estudio realizado en la población mexicana (5).

Nuestra cohorte de pacientes con COVID-19 constituye una muestra óptima para explorar como influyen las condiciones metabólicas crónicas e inflamatorias en la hematopoyesis de emergencia durante la presentación severa de la infección por SARS-CoV-2 a diferentes edades. Importantemente, permite identificar el estado de la respuesta inmunológica ante COVID-19 en adultos de mediana edad con comorbilidades, la cual no ha sido determinada en detalle.

Para la toma de decisiones médicas durante la pandemia por COVID-19 se han empleado diferentes puntuaciones para la predicción del riesgo de progresión a estados severos y desenlaces fatales de pacientes hospitalizados, cuya finalidad es tanto para la detección temprana y aplicación de tratamientos adecuados y así

evitar su deterioro clínico, como para la administración adecuada de recursos e infraestructura (en el caso de equipo de soporte ventilatorio).

Diferentes parámetros de laboratorio clínico han permitido monitorear el estatus inmune e inflamatorio de los pacientes con COVID-19 y se han asociado a severidad: neutrofilia, linfopenia, trombocitopenia, elevación de proteína C reactiva, elevación del tiempo de protrombina, creatinina, dímero D, lactato deshidrogenasa, ALT/AST (9,56–58). En nuestro estudio identificamos el incremento del riesgo de desenlaces desfavorables debido a enfermedades crónicas preexistentes y 6 parámetros clínicos: elevación en la frecuencia de neutrófilos, del valor de NLR, de los niveles de dímero D, proteína C reactiva y lactato deshidrogenasa; y una disminución en la frecuencia de linfocitos.

En un estudio realizado por Dawei y colaboradores reportaron que los pacientes con ingreso a una UCI presentaron una cuenta más alta de neutrófilos, niveles más altos de dímero D, urea sanguínea y creatinina, y la cuenta de linfocitos continuó disminuyendo hasta el deceso con respecto a los pacientes que no requirieron de cuidados intensivos (59). Un incremento de neutrófilos representa la respuesta inflamatoria activada y debido a que los linfocitos poseen un papel importante en la defensa inmunitaria, una disminución en esta población se considera de mal pronóstico. El NLR (*Neutrophil to Lymphocyte Ratio*) refleja esta dinámica entre ambas poblaciones (60), y ha sido útil para la estratificación de mortalidad en eventos cardíacos, un fuerte factor pronóstico en diversos tipos de cáncer, así como un marcador de inflamación (61,62). En un estudio realizado por Yang y colaboradores identificaron un valor elevado de NLR como un biomarcador independiente para identificar a pacientes con COVID-19 de mal pronóstico. Determinaron que pacientes con COVID-19 y con un valor de NLR  $\geq 3.3$  y con una edad  $\geq 49.5$  años el 46.1 % de los pacientes con enfermedad moderada progresaban a un estado severo en aproximadamente 6.3 días (63).

La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima intracelular que se localiza en las células de casi todos los órganos, cataliza la interconversión del piruvato a lactato. Aunque la LDH se ha empleado tradicionalmente como un marcador de

daño cardíaco, valores anormales pueden resultar de daño a múltiples órganos y oxigenación disminuida con sobrerregulación de la vía glucolítica. Infecciones severas pueden ocasionar daño tisular mediado por citocinas y liberación de LDH. El daño en el tejido pulmonar en pacientes con COVID-19 severo incrementa los valores de LDH (64).

La proteína C reactiva, es un biomarcador con alta sensibilidad a la inflamación y a la respuesta del hospedero a la producción de citocinas, particularmente TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP1 e IL-8 secretadas por los linfocitos T (65).

Anormalidades en los parámetros de la coagulación, entre ellos valores elevados de fibrinógeno y de dímero D, se han reportado en pacientes con COVID-19 y con un estado de hipercoagulación e inflamación severos lo que incrementa el riesgo de complicaciones tromboembólicas (66,67).

La inflamación ejerce un profundo efecto en el sistema hematopoyético, activando y movilizand o células efectoras, al momento de promover el desarrollo de las células troncales y progenitoras hematopoyéticas para reconstituir los linajes agotados (68). Sin embargo, la inflamación junto con las funciones alteradas de las células inmunes, son características de algunas enfermedades crónicas. Por ejemplo, la diabetes y la obesidad son condiciones proinflamatorias que agravan las infecciones, favorecen conteos celulares de sangre anormales y promueven niveles altos de IL-6, CRP y ferritina en pacientes con COVID-19 (69).

En nuestra cohorte, los pacientes adultos con COVID-19 <65 años y con un desenlace desfavorable se caracterizaron por un perfil inflamatorio con concentraciones séricas más altas de IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , MIF y CXCL11 en comparación con individuos sanos. Diferentes estudios han reportado perfiles de citocinas inflamatorias con niveles más altos de IL-5, IL-6, IL-8, IL-10 y TNF- $\alpha$  en grupos severos/críticos o en el grupo de decesos en comparación con el grupo leve o superviviente con COVID-19. Este panorama inflamatorio se ha denominado “tormenta de citocinas”. Notablemente, los niveles elevados de citocinas sin coordinación entre citocinas por días o semanas de la respuesta

inflamatoria en pacientes con COVID-19 es diferente de la tradicional tormenta de citocinas asociada a sepsis o células CAR-T. En pacientes con COVID-19, se han identificado diferentes correlaciones: positivas entre edad e IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$ ; mientras que ninguna asociación entre IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  con el índice de masa corporal, cáncer activo, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, infección por el virus de la inmunodeficiencia humana y apnea del sueño; niveles altos de IL-1RA, IL-6, CCL2, CXCL1, CXCL9, CXCL10 y EGF en pacientes severos <60 años; niveles altos de CXCL8, IL-10, IL-15, IL-27 y TNF- $\alpha$  en pacientes >60 años; niveles más altos de IL-6 en pacientes masculinos en comparación con las pacientes femeninas. Pacientes con insuficiencia renal crónica, diabetes o HTA presentan niveles significativamente más altos de TNF- $\alpha$  e IL-8 (57,70–73). Desafortunadamente, en nuestro estudio no fue posible realizar comparaciones de los perfiles inflamatorios entre pacientes con condiciones preexistentes y sin ellas.

El inflamasoma participa en la inmunidad innata en respuesta a diferentes estímulos asociados con el estrés y daño. El inflamasoma NLRP3 promueve la inflamación vía escisión y activación de moléculas inflamatorias clave como caspasa-1 activa (Casp1p20), IL-1 $\beta$ , e IL-18. La activación aberrante del inflamasoma NLRP3 está implicado en varias condiciones, entre ellas: diabetes, aterosclerosis, síndrome metabólico, síndrome cardiovascular y enfermedades neurodegenerativas. En un estudio se detectó la expresión del inflamasoma en células mononucleares de sangre periférica y dentro de muestras de pulmón de casos fatales con COVID-19, principalmente en los leucocitos. Niveles más altos de Casp1p20 e IL18 en el suero correlacionaron con IL-6 y LDH (74–76).

Ante infecciones agudas severas el sistema hematopoyético es capaz de adaptarse rápidamente para controlar patógenos, este fenómeno es denominado hematopoyesis de emergencia. A través de este mecanismo, poblaciones primitivas indiferenciadas pueden responder a señales agonistas de ligandos de TLRs y elementos proinflamatorios, las cuales incrementan su proliferación y se diferencian hacia células innatas mieloides y linfoideas que salen a la circulación

(7). En edades avanzadas y en individuos con obesidad, la hematopoyesis en *steady-state* muestra una tendencia de la diferenciación hacia poblaciones mieloides. En la medula ósea, se observa una asociación positiva entre el contenido de adipocitos y la edad, resultando en el incremento de la frecuencia de células mieloides y la reducción de células linfoides en adultos de edad avanzada, reflejándose esta dinámica en la sangre periférica (77).

Los receptores tipo Toll pueden sensar diferentes componentes del virus SARS-CoV-2: TLR7 y TLR8 pueden reconocer ssARN, mientras TLR3, receptores parecidos a RIG y MDA-5 pueden sensar dsARN, y TLR2, TLR4 y TLR6 pueden sensar la proteína S. La infección severa por SARS-CoV-2 induce mielopoyesis de emergencia caracterizada por la movilización de células mieloides inmaduras en sangre periférica con respuesta inmune alterada y con alta expresión de genes de TLR2 y TLR4, los cuales pueden relacionarse con la capacidad de sensar SARS-CoV-2. La granulopoyesis y la monopoyesis son inducidas en las poblaciones hematopoyéticas primitivas bajo la estimulación de TLR7, TLR8, TLR2, TLR3 y TLR4 (25). TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y M-CSF inducen la diferenciación mieloides vía subregulación de Pu.1, mientras que los IFNs estimulan la expresión de Batf2 y Cebpb $\beta$ , dos factores de transcripción claves los cuales también promueven la diferenciación mieloides. IL-6 actúa al nivel de los MPP4s, redirigiendo su destino de linaje linfoides a mieloides (68). La mielopoyesis de emergencia en casos severos de COVID-19 está constituida por neutrófilos inmaduros y disfuncionales (expresan CD64 y PD-L1, perfil asociado a la supresión de células T y exhiben una respuesta alterada del estallido oxidativo) y monocitos CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>lo</sup> disfuncionales (expresan altos niveles de MAFB, PLBD1 y CD163, asociados con funciones antiinflamatorias de macrófagos) (78). La baja expresión de HLA-DR en los monocitos es considerado como un marcador subrogado de inmunosupresión en sepsis. Los monocitos con una reducción en la expresión de HLA-DR y con una producción disminuida de TNF- $\alpha$  posterior a la estimulación con un ligando de TLR resulta en una capacidad disminuida de eliminar patógenos durante sepsis (79). En cuanto a las subpoblaciones de monocitos, en todos los pacientes con COVID-19 se observa una completa eliminación de los monocitos no clásicos durante la

fase aguda (78). Además, los monocitos derivados en COVID-19 severo presentan una regulación al alza de transcritos relacionados a las respuestas de TLRs como CEBP $\beta$ , IRF1 y FOSL2 lo que sugiere la adquisición de inmunidad entrenada (80).

La obesidad se caracteriza por un perfil inflamatorio crónico de bajo grado. Se ha reportado que los monocitos en individuos con obesidad muestran cuentas totales más altas y con un perfil proinflamatorio e inmunosupresivo que puede contribuir al desarrollo de inflamación de bajo grado y a la susceptibilidad de cáncer e infecciones (81). En los individuos con obesidad se observa un incremento en la frecuencia de células mieloides supresoras (MDSCs), definidas como CD33<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>HLADR<sup>low/-</sup>, y una reducción en la expresión del TCR $\zeta$  de los linfocitos T en reposo. La cadena  $\zeta$  del TCR participa en la iniciación de la respuesta inmune mediada por células T y células NK (82). Las células mieloides supresoras polimorfonucleares (PMN-MDSCs), definidas como Lin<sup>-</sup>HLA<sup>-</sup>DR<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>, incrementan durante la enfermedad por COVID-19, actúan suprimiendo la producción de IFN- $\gamma$  de las células T a través de las vías TGF- $\beta$  e iNOS, y se asocian con desenlaces fatales. Las PMN-MDSCs correlacionan con los niveles plasmáticos de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, y TNF- $\alpha$  (83). Por otro lado, un incremento transitorio en monocitos CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>hi</sup>CD11c<sup>hi</sup>CD83<sup>hi</sup> con una fuerte expresión de IFN se identifican en casos leves de COVID-19 (78).

Diferentes estudios reportaron la disminución de las subpoblaciones linfocitarias (células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, células B y células NK) en pacientes con COVID-19, encontrándose valores aún menores en pacientes con mayor severidad (84). En casos fatales observaron un fenotipo de agotamiento-inactividad caracterizado por un incremento en la expresión de TIM3, ICOS y PD1 en células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, un incremento en el número de células NKT y de la expansión de un subconjunto de células granulocíticas (CD11b<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>low</sup>/CD14<sup>-</sup>/CD15<sup>+</sup>/CD66b<sup>+</sup>) similar a las células polimorfonucleares de baja densidad (LDPMN) (73).

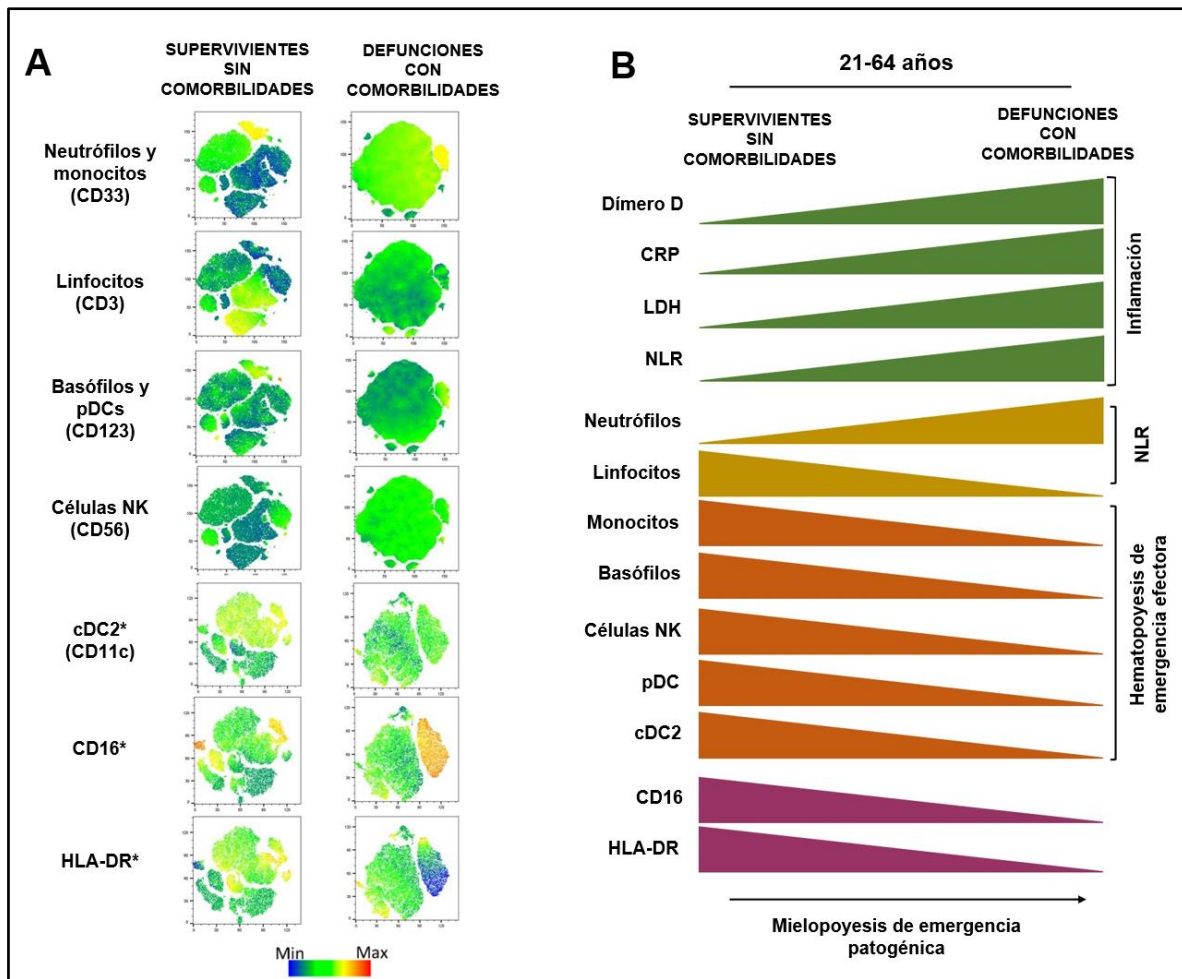
Las células NK tienen una participación importante en la inmunidad antitumoral y antiviral a través de la producción de perforinas, granzimas, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 y GM-CSF. Sin embargo, una reducción en la frecuencia de células NK y de sus

capacidades citotóxicas se han identificado en individuos con obesidad (85). Además, la proliferación y producción de células NK se reduce con el envejecimiento, observándose también un cambio en la proporción de células NK CD56<sup>DIM</sup>:CD56<sup>BRIGHT</sup>, donde una disminución de la fracción CD56<sup>BRIGHT</sup> conduce a una reducción en la capacidad regulatoria inmune a través de la disminución de la producción de IFN- $\gamma$ , MIP-1a e IL-18. En la infección con SARS-CoV-2 se ha observado además de la reducción en el número de células NK, un fenotipo de agotamiento con expresión de NKG2A, LAG3, PDCD1 y HAVCR2 (86).

En cuanto a los basófilos, un estudio encontró que estos se encuentran disminuidos durante la fase aguda en pacientes con COVID-19, y después se recuperan durante la convalecencia, correlacionando significativamente los niveles de basófilos con los títulos de anticuerpos de IgG para SARS-CoV-2 producidos por las células B (87).

La funcionalidad de las células dendríticas declina con la edad, afectando su capacidad de migrar, fagocitar antígenos y de presentar antígenos a las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Pacientes con COVID-19 presentan números más bajos de CD1c<sup>+</sup> mDC y pDC que donadores sanos durante la fase aguda e incluso 7 meses después de la infección. La disminución a largo plazo en el número de DC se puede explicar por la migración de estas células a los sitios inflamatorios provocados por la infección persistente por SARS-CoV-2 contribuyendo al COVID-19 prolongado (88).

En nuestro estudio, demostramos que la infección por SARS-CoV-2 en adultos menores de 65 años con un estado proinflamatorio promovido por condiciones crónicas preexistentes favorecen la hematopoyesis de emergencia mieloide, fenómeno observado en nuestros desenlaces fatales con neutrófilos con baja expresión de CD16 y monocitos con baja expresión de HLA-DR; esto a expensas del compartimiento de células linfoides como NK, pDCs y cDC2s (Figura 12).



**Figura 12. Perfil para estratificación de pacientes de mediana edad con COVID-19 con enfermedades preexistentes. A)** Gráficos representativos de t-SNEs (*t-distributed stochastic neighborhood embedding*) para la exploración multidimensional del panorama inmunohematológico en pacientes <65 años, comparativo entre supervivientes sin comorbilidad y defunciones con comorbilidad. Expresión de CD33 (neutrófilos y monocitos), de CD3 (linfocitos), de CD123 (basófilos y pDCs), de CD56 (células NK) y de CD11c (cDC2s). **B)** Perfil de estratificación propuesto para la estratificación de pacientes <65 años resultado de la combinación de los datos clínicos y de citometría de flujo multiparamétrica a los 7 días de evolución.

## CONCLUSIONES

La cohorte de estudio representó una muestra óptima para explorar como influyen las condiciones metabólicas crónicas e inflamatorias en la hematopoyesis de emergencia durante la presentación severa de la infección por SARS-CoV-2 en los adultos.

El grupo de adultos entre 21-64 años es el más afectado por COVID-19 comprendiendo el 60% y el 55.2% de los casos y defunciones, respectivamente.

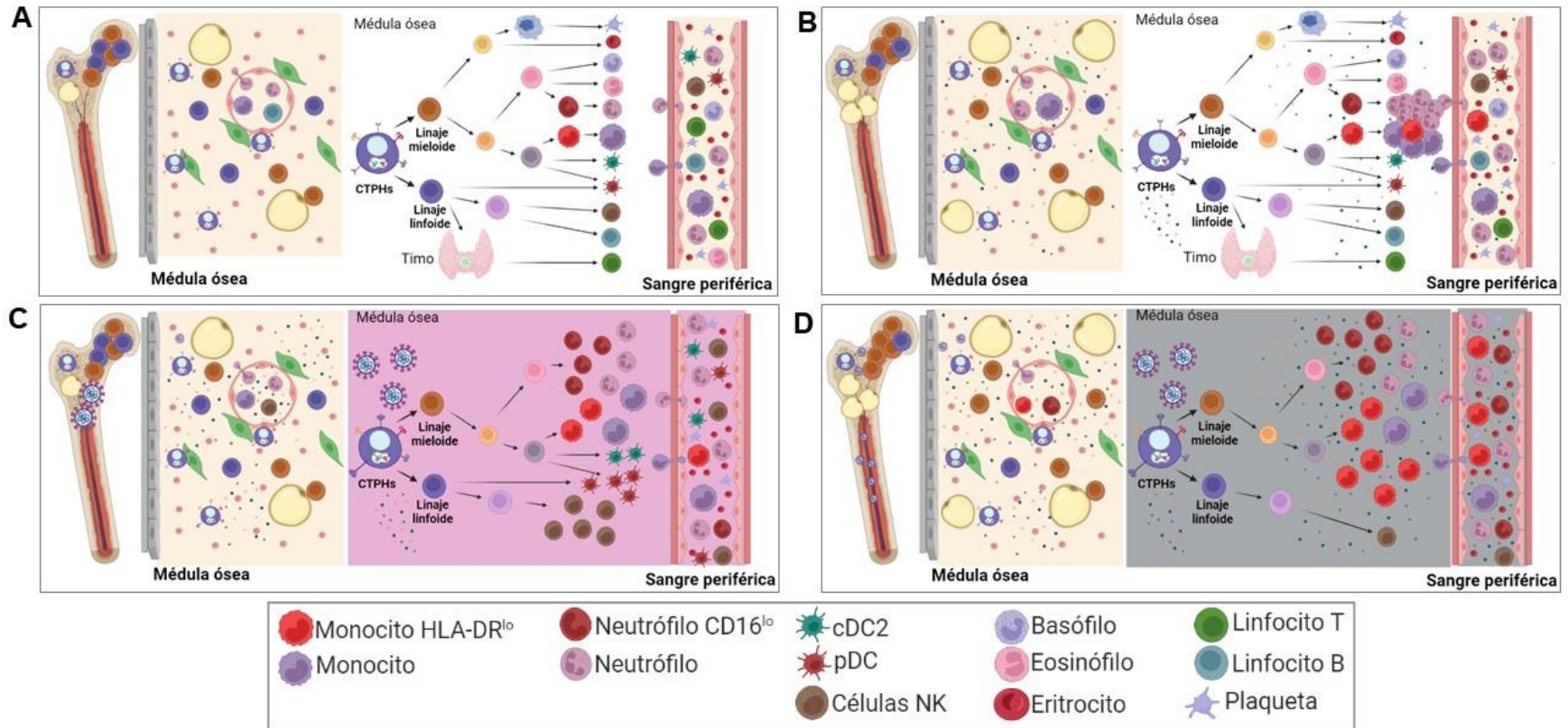
En nuestro estudio, el espectro inmuno-hematológico del paciente incide en la presentación y progresión de severidad de la enfermedad por la COVID-19, haciendo posible la identificación de perfiles pronóstico a los 7 días de hospitalización combinando datos clínicos, parámetros de laboratorio y el panorama inflamatorio e inmunohematológico.

Individuos <65 años con COVID-19 con un incremento del riesgo de desenlaces desfavorables presentaron: elevación en la frecuencia de neutrófilos, del valor de NLR, de los niveles de dímero D, proteína C reactiva y lactato deshidrogenasa, en paralelo con una disminución en la frecuencia de linfocitos.

Las defunciones en pacientes de mediana edad con COVID-19 presentaron un perfil inflamatorio con concentraciones séricas más altas de IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , MIF y CXCL11 en comparación con individuos sanos.

Los pacientes supervivientes a COVID-19 mostraron una linfopoyesis de emergencia, constituida por células NK y células dendríticas (pDCs y cDC2) capaces de eliminar al agente patógeno, al contrario, pacientes con desenlace fatal desarrollaron una mielopoyesis de emergencia, constituida por neutrófilos inmaduros con baja expresión de CD16 y monocitos HLA-DR<sup>lo</sup>, incapaces de resolver la infección, fenómeno que se agrava más en pacientes con enfermedades metabólicas preexistentes (Figura 13).

Los pacientes con insuficiencia renal crónica, como única o en combinación con otras comorbilidades, confiere el mayor riesgo de fatalidad por COVID-19.



**Figura 13. Hematopoyesis estacionaria y de emergencia ante SARS-CoV-2.** Hematopoyesis estacionaria en condiciones normales en **A)** individuos sanos y en **B)** individuos con condiciones inflamatorias. La hematopoyesis es un proceso altamente regulado que da lugar a todas las estirpes celulares inmuno-hematológicas a partir de la diferenciación de células troncales hematopoyéticas. Éstas últimas, son capaces de detectar y responder a señales de estrés a través de mecanismos directos e indirectos y redirigir el compromiso de linaje a demanda. En condiciones inflamatorias, como en enfermedades metabólicas crónicas y durante el envejecimiento, se observa un incremento en las poblaciones del linaje mieloide a expensas del linaje linfoide. En pacientes con COVID-19, se observó que **C)** los pacientes supervivientes muestran una linfopoyesis de emergencia, constituida por células NK y células dendríticas (pDCs y cDC2) capaces de eliminar al agente patógeno, al contrario, **D)** pacientes con desenlace fatal muestran una mielopoyesis de emergencia, constituida por neutrófilos inmaduros y monocitos HLA-DR<sup>lo</sup>.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Domínguez-Ramírez L, Solís-Tejeda I, Ayon-Aguilar J, Mayoral-Ortiz A, Sosa-Jurado F, Pelayo R, et al. Decrease in COVID-19 adverse outcomes in adults during the Delta and Omicron SARS-CoV-2 waves, after vaccination in Mexico. *Front. Public Health.* 2022 10:1010256. DOI: 10.3389/fpubh.2022.1010256.
2. Hasan A, Mehmood N, Fergie J. Coronavirus Disease (COVID-19) and Pediatric Patients: A Review of Epidemiology, Symptomatology, Laboratory and Imaging Results to Guide the Development of a Management Algorithm. *Cureus.* 2020 12(3). DOI: 10.7759/cureus.7485.
3. Cao Y, Hiyoshi A, Montgomery S. COVID-19 case-fatality rate and demographic and socioeconomic influencers: Worldwide spatial regression analysis based on country-level data. *BMJ Open.* 2020 10(11):1–12. DOI:10.1136/bmjopen-2020-043560.
4. Shuchman M. Low- and middle-income countries face up to COVID-19. *Nature medicine.* 2020 26(7):986–8. DOI: 10.1038/d41591-020-00020-2.
5. Domínguez-Ramírez L, Rodríguez-Pérez F, Sosa-Jurado F, Santos-López G, Cortes-Hernández P. The role of metabolic comorbidity in COVID-19 mortality of middle-aged adults. The case of Mexico. *medRxiv* 2020.12.15.20244160. DOI: 10.1101/2020.12.15.20244160.
6. Agudelo-Botero M, Valdez-Ortiz R, Giraldo-Rodríguez L, González-Robledo MC, Mino-León D, Rosales-Herrera MF, et al. Overview of the burden of chronic kidney disease in Mexico: Secondary data analysis based on the Global Burden of Disease Study 2017. *BMJ Open.* 2020 Mar 25;10(3). DOI: 10.1136/bmjopen-2019-035285.
7. Balandrán JC, Zamora-Herrera G, Romo-Rodríguez R, Pelayo R. Emergency Hematopoiesis in the Pathobiology of COVID-19: The Dark Side of an Early Innate Protective Mechanism. *Journal of Interferon and Cytokine Research.* 2022 Aug 1;42(8):393–405. DOI: 10.1089/jir.2022.0028.
8. Guo YR, Cao QD, Hong ZS, Tan YY, Chen SD, Jin HJ, et al. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak - an update on the status. *Mil Med Res.* 2020;7(1):11. DOI: 10.1186/s40779-020-00240-0.
9. Singhal T. A Review of Coronavirus Disease-2019 (COVID-19). *Indian J Pediatr.* 2020;87(4):281–6. DOI: 10.1007/s12098-020-03263-6.

10. Khoury M, Cuenca J, Cruz FF, Figueroa FE, Rocco PRM, Weiss DJ. Current Status of Cell-Based Therapies for Respiratory Virus Infections: Applicability to COVID-19. *Eur Respir J*. 2020. DOI: 10.1183/13993003.00858-2020.
11. Santos-López G, Cortés-Hernández P, Vallejo-Ruiz V, Reyes-Leyva J. SARS-CoV-2: generalidades, origen y avances en el tratamiento. *Gaceta de México*. 2021 Feb 25;157(1). DOI: 10.24875/gmm.20000505.
12. Ropa J, Cooper S, Capitano ML, Van't Hof W, Broxmeyer HE. Human Hematopoietic Stem, Progenitor, and Immune Cells Respond Ex Vivo to SARS-CoV-2 Spike Protein. *Stem Cell Rev Rep*. 2021 Feb 1;17(1):253–65. DOI: 10.1007/s12015-020-10056-z.
13. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, Macary PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nature Reviews Immunology*. 2020;20:363–74. DOI: 10.1038/s41577-020-0311-8.
14. García LF. Immune Response, Inflammation, and the Clinical Spectrum of COVID-19. *Front Immunol*. 2020;11(June):4–8. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01441.
15. She J, Liu L, Liu W. COVID-19 epidemic: Disease characteristics in children. *J Med Virol*. 2020;0–2. DOI: 10.1002/jmv.25807.
16. Bialek S, Gierke R, Hughes M, McNamara LA, Pilishvili T, Skoff T. Coronavirus disease 2019 in children: Current status - Morbidity and Mortality Weekly Report. *CDC COVID-19 Response Team*. 2020;69(14):422–6. Disponible: <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/69/wr/pdfs/mm6914e4-H.pdf>.
17. Davies NG, Klepac P, Liu Y, Prem K, Jit M, Pearson CAB, et al. Age-dependent effects in the transmission and control of COVID-19 epidemics. *Nat Med*. 2020;26(8):1205–11. DOI: 10.1038/s41591-020-0962-9.
18. Alimohamadi Y, Tola HH, Abbasi-Ghahramanloo A, Janani M, Sepandi M. Case fatality rate of COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*. 2021; 62(2):E311–20. DOI: 10.15167/2421-4248/jpmh2021.62.2.1627.
19. Cifuentes-Faura J. COVID-19 Mortality Rate and Its Incidence in Latin America: Dependence on Demographic and Economic Variables. *Int J Environ Res Public Health*. 2021 Jun 27;18(13):6900. DOI: 10.3390/ijerph18136900.

20. Rieger MA, Schroeder T. Hematopoiesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012. DOI: 10.1101/cshperspect.a008250.
21. van Pel M, Fibbe WE, Schepers K. The human and murine hematopoietic stem cell niches: are they comparable? *Ann N Y Acad Sci.* 2016;1370(1):55–64. DOI: 10.1111/nyas.12994.
22. Li Z, Li L. Understanding hematopoietic stem-cell microenvironments. *Trends Biochem Sci.* 2006;31(10):589–95. DOI: 10.1016/j.tibs.2006.08.001.
23. Crane GM, Jeffery E, Morrison SJ. Adult haematopoietic stem cell niches. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(9):573–90. DOI: 10.1038/nri.2017.53.
24. de Bruin AM, Libregts SF, Valkhof M, Boon L, Touw IP, Nolte MA. IFN $\gamma$  induces monopoiesis and inhibits neutrophil development during inflammation. *Blood.* 2012; 119 (6). DOI: 10.1182/blood-2011-07-367706.
25. Resende DP, da Costa AC, de Souza Rosa LP, Rodrigues AP, Santos AS e. A, Cardoso CK, et al. Non-classical circulating monocytes in severe obesity and obesity with uncontrolled diabetes: A comparison with tuberculosis and healthy individuals. *Tuberculosis.* 2019 Jan 1; 114:30–41. DOI: 10.1016/j.tube.2018.11.003.
26. Ramakrishna C, Cantin EM. IFN $\gamma$  inhibits G-CSF induced neutrophil expansion and invasion of the CNS to prevent viral encephalitis. *PLoS Pathog.* 2018 Jan 1;14(1). DOI: 10.1371/journal.ppat.1006822.
27. Nagai Y, Garrett KP, Ohta S, Bahrn U, Kouro T, Takatsu K, et al. Toll-Like Receptors on Hematopoietic Progenitor Cells Stimulate Innate Immune System Replenishment. *Immunity.* 2006;24(6):801–12. DOI: 10.1016/j.immuni.2006.04.008.
28. Furusawa JI, Mizoguchi I, Chiba Y, Hisada M, Kobayashi F, Yoshida H, et al. Promotion of Expansion and Differentiation of Hematopoietic Stem Cells by Interleukin-27 into Myeloid Progenitors to Control Infection in Emergency Myelopoiesis. *PLoS Pathog.* 2016 Mar 1;12(3). DOI: 10.1371/journal.ppat.1005507.
29. McElroy AK, Akondy RS, Mcllwain DR, Chen H, Bjornson-Hooper Z, Mukherjee N, et al. Immunologic timeline of Ebola virus disease and recovery in humans. *JCI Insight.* 2020 May 1;5(10). DOI: 10.1172/JCI.INSIGHT.137260.

30. Esplin BL, Shimazu T, Welner RS, Garrett KP, Nie L, Zhang Q, et al. Chronic exposure to a TLR ligand injures hematopoietic stem cells. *The Journal of Immunology*. 2011;186:5367–75. DOI: 10.4049/jimmunol.1003438.
31. Cervantes-Barragan L, Züst R, Weber F, Spiegel M, Lang KS, Akira S, et al. Control of coronavirus infection through plasmacytoid dendritic-cell- derived type I interferon. *Blood*. 2007;109(3):1131–7. DOI: 10.1182/blood-2006-05-023770.
32. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nature Immunology*. 2008. DOI: 10.1038/ni1582.
33. Cossarizza A, De Biasi S, Guaraldi G, Girardis M, Mussini C. SARS-CoV-2, the Virus that Causes COVID-19: Cytometry and the New Challenge for Global Health. *Cytometry A*. 2020 Apr;97(4):340-343. DOI: 10.1002/cyto.a.24002.
34. Fu Y, Cheng Y, Wu Y. Understanding SARS-CoV-2-Mediated Inflammatory Responses: From Mechanisms to Potential Therapeutic Tools. *Viral Sin*. 2020;35(3):266–71. DOI: 10.1007/s12250-020-00207-4.
35. Wu D, Yang XO. TH17 responses in cytokine storm of COVID-19: An emerging target of JAK2 inhibitor Fedratinib. *J Microbiol Immunol Infect*. 2020;53(3):368–70. DOI: 10.1016/j.jmii.2020.03.005.
36. García-Sastre A. Ten Strategies of Interferon Evasion by Viruses. *Cell Host Microbe*. 2017 Aug 9;22(2):176-184. DOI: 10.1016/j.chom.2017.07.012.
37. Pelletier S, Drouin C, Bédard N, Khakoo SI, Bruneau J, Shoukry NH. Increased degranulation of natural killer cells during acute HCV correlates with the magnitude of virus-specific T cell responses. *J Hepatol*. 2010 Nov;53(5):805-16. DOI: 10.1016/j.jhep.2010.05.013.
38. Adib-Conquy M, Scott-Algara D, Cavillon JM, Souza-Fonseca-Guimaraes F. TLR-mediated activation of NK cells and their role in bacterial/viral immune responses in mammals. *Immunology and Cell Biology*. 2014; 92(3) p 256-262. DOI: 10.1038/icb.2013.99.
39. Lindau D, Gielen P, Kroesen M, Wesseling P, Adema GJ. The immunosuppressive tumour network: Myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells. *Immunology*. 2013; 138(2) p 105-115. DOI: 10.1111/imm.12036.

40. Barrow AD, Colonna M. Tailoring Natural Killer cell immunotherapy to the tumour microenvironment. *Semin Immunol.* 2017;31(September):30–6. DOI: 10.1016/j.smim.2017.09.001.
41. Ramírez-Ramírez D, Padilla-Castañeda S, Galán-Enríquez CS, Vadillo E, Prieto-Chávez JL, Jiménez-Hernández E, et al. CRTAM + NK cells endowed with suppressor properties arise in leukemic bone marrow. *J Leukoc Biol.* 2019 May;105(5):999-1013. DOI: 10.1002/JLB.MA0618-231R.
42. Huang C, Wang Y, Li X. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020;395(10223):497-506. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
43. Chuan Qin, Zhou L, Hu Z, Zhang S. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. *Clin Infect Dis.* 2020 Jul 28;71(15):762-768. DOI: 10.1093/cid/ciaa248.
44. Zheng M, Gao Y, Wang G, Song G, Liu S, Sun D, et al. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol.* 2020 May;17(5):533-535. DOI: 10.1038/s41423-020-0402-2.
45. Diao B, Wang C, Tan Y, Chen X, Liu Y, Ning L, et al. Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Front Immunol.* 2020 May 1;11:827. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00827.
46. Andrade C. Understanding relative risk, odds ratio, and related terms: As simple as it can get. *J Clin Psychiatry.* 2015 Jul;76(7):e857-61. DOI: 10.4088/JCP.15f10150.
47. Wambier CG, Goren A. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection is likely to be androgen mediated. *J Am Acad Dermatol.* 2020 Jul;83(1):308-309. DOI: 10.1016/j.jaad.2020.04.032.
48. Karlinsky A, Kobak D. Tracking excess mortality across countries during the COVID-19 pandemic with the World Mortality Dataset. *Elife.* 2021 Jun 30;10:e69336. DOI: 10.7554/eLife.69336.
49. Avilés-Santa ML, Monroig-Rivera A, Soto-Soto A, Lindberg NM. Current State of Diabetes Mellitus Prevalence, Awareness, Treatment, and Control in Latin America: Challenges and Innovative Solutions to Improve Health Outcomes Across the Continent. *Curr Diab Rep.* 2020 Oct 10;20(11):62. DOI: 10.1007/s11892-020-01341-9.

50. Lopez-Jaramillo P, Lopez-Lopez J, Cohen D, Alarcon-Ariza N, Mogollon-Zehr M. Epidemiology of Hypertension and Diabetes Mellitus in Latin America. *Curr Hypertens Rev.* 2020 Oct 2;17(2):112–20. DOI: 10.2174/1573402116999200917152952.
51. Bikbov B, Purcell CA, Levey AS, Smith M, Abdoli A, Abebe M, et al. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet.* 2020 Feb 29;395(10225):709–33. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30045-3.
52. Gok M, Cetinkaya H, Kandemir T, Karahan E, Tuncer İB, Bukrek C, et al. Chronic kidney disease predicts poor outcomes of COVID-19 patients. *Int Urol Nephrol.* 2021 Sep 1;53(9):1891–8. DOI: 10.1007/s11255-020-02758-7.
53. Fang L, Karakiulakis G, Roth M. Are patients with hypertension and diabetes mellitus at increases risk for COVID-19 infection? *Lancet Respir Med.* 2020 Apr;8(4):e21. DOI: 10.1016/S2213-2600(20)30116-8.
54. Dietz W, Santos-Burgoa C. Obesity and its Implications for COVID-19 Mortality. *Obesity (Silver Spring).* 2020 28(6):1005. DOI: 10.1002/oby.22818.
55. Ryan DH, Ravussin E, Heymsfield S. COVID 19 and the Patient with Obesity - The Editors Speak Out. *Obesity (Silver Spring).* 2020 May;28(5):847. DOI: 10.1002/oby.22808.
56. Kollias A, Kyriakoulis KG, Dimakakos E, Poulakou G, Stergiou GS, Syrigos K. Thromboembolic risk and anticoagulant therapy in COVID-19 patients: Emerging evidence and call for action. *Br J Haematol.* 2020 Jun;189(5):846-847. DOI: 10.1111/bjh.16727.
57. Liu D, Zhang T, Wang Y, Xia L. The Centrality of Obesity in the Course of Severe COVID-19. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021 Mar 11;12:620566. DOI: 10.3389/fendo.2021.620566.
58. Lippi G, Plebani M, Michael Henry B. Thrombocytopenia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections: A meta-analysis. *Clin Chim Acta.* 2020 Jul;506:145-148. DOI: 10.1016/j.cca.2020.03.022.
59. Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J, et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients with 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA.* 2020 Mar 17;323(11):1061-1069. DOI: 10.1001/jama.2020.1585.

60. Zhao Z, Zhao X, Lu J, Xue J, Liu P, Mao H. Prognostic roles of neutrophil to lymphocyte ratio and platelet to lymphocyte ratio in ovarian cancer: a meta-analysis of retrospective studies. *Arch Gynecol Obstet*. 2018 Apr;297(4):849-857. DOI: 10.1007/s00404-018-4678-8.
61. Afari ME, Bhat T. Neutrophil to lymphocyte ratio (NLR) and cardiovascular diseases: an update. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2016;14(5):573-7. DOI: 10.1586/14779072.2016.1154788.
62. Forget P, Khalifa C, Defour JP, Latinne D, van Pel MC, de Kock M. What is the normal value of the neutrophil-to-lymphocyte ratio? *BMC Res Notes*. 2017 Jan 3;10(1):12. DOI: 10.1186/s13104-016-2335-5.
63. Yang A ping, Liu J ping, Tao W qiang, Li H ming. The diagnostic and predictive role of NLR,d-NLR and PLR in COVID-19 patients. *Int Immunopharmacol*. 2020 Jul;84:106504. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.106504.
64. Henry BM, Aggarwal G, Wong J, Benoit S, Vikse J, Plebani M, et al. Lactate dehydrogenase levels predict coronavirus disease 2019 (COVID-19) severity and mortality: A pooled analysis. *Am J Emerg Med*. 2020 Sep;38(9):1722-1726. DOI: 10.1016/j.ajem.2020.05.073.
65. Leng Z, Zhu R, Hou W, Feng Y, Yang Y, Han Q, et al. Transplantation of ACE2- Mesenchymal Stem Cells Improves the Outcome of Patients with COVID-19 Pneumonia. *Aging Dis*. 2020 Mar 9;11(2):216-228. DOI: 10.14336/AD.2020.0228.
66. Fuss C, Palmaz JC, Sprague EA. Fibrinogen: Structure, Function, and Surface Interactions. *J Vasc Interv Radiol*. 2001 Jun;12(6):677-82. DOI: 10.1016/s1051-0443(07)61437-7.
67. Panigada M, Bottino N, Tagliabue P, Grasselli G, Novembrino C, Chantarangkul V, et al. Hypercoagulability of COVID-19 patients in Intensive Care Unit. A Report of Thromboelastography Findings and other Parameters of Hemostasis. *J Thromb Haemost*. 2020 Jul;18(7):1738-1742. DOI: 10.1111/jth.14850.
68. Collins A, Mitchell CA, Passegue E. Inflammatory signaling regulates hematopoietic stem and progenitor cell development and homeostasis. *J Exp Med*. 2021 Jul 5;218(7):e20201545. DOI: 10.1084/jem.20201545.
69. Ahmadpoor P, Rostaing L. Why the immune system fails to mount an adaptive immune response to a Covid -19 infection. *Transplant International*. 2020;0–2. DOI: 10.1111/tri.13611.

70. del Valle DM, Kim-Schulze S, Huang HH, Beckmann ND, Nirenberg S, Wang B, et al. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nat Med.* 2020 Oct 1;26(10):1636–43. DOI: 10.1038/s41591-020-1051-9.
71. Li Q, Xu W, Li W, Huang C, Chen L. Dynamics of cytokines and lymphocyte subsets associated with the poor prognosis of severe COVID-19. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2020;24(23):12536–44. DOI: 10.26355/eurrev\_202012\_24051.
72. Yin SW, Zhou Z, Wang JL, Deng YF, Jing H, Qiu Y. Viral loads, lymphocyte subsets and cytokines in asymptomatic, mildly and critical symptomatic patients with SARS-CoV-2 infection: a retrospective study. *Virology J.* 2021 Dec 1;18(1). DOI: 10.1186/s12985-021-01597-x.
73. Angioni R, Sánchez-Rodríguez R, Munari F, Bertoldi N, Arcidiacono D, Cavinato S, et al. Age-severity matched cytokine profiling reveals specific signatures in Covid-19 patients. *Cell Death Dis.* 2020 Nov 1;11(11). DOI: 10.1038/s41419-020-03151-z.
74. Toldo S, Bussani R, Nuzzi V, Bonaventura A, Mauro AG, Cannatà A, et al. Inflammasome formation in the lungs of patients with fatal COVID-19. *Inflammation Research.* 2021 Jan 1;70(1):7–10. DOI: 10.1007/s00011-020-01413-2.
75. Rodrigues TS, de Sá KSG, Ishimoto AY, Becerra A, Oliveira S, Almeida L, et al. Inflammasomes are activated in response to SARS-cov-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients. *Journal of Experimental Medicine.* 2020;218(3). DOI: 10.1084/JEM.20201707
76. Zahid A, Li B, Kombe AJK, Jin T, Tao J. Pharmacological inhibitors of the nlrp3 inflammasome. *Front Immunol.* 2019 Oct 25;10:2538. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02538.
77. Aguilar-Navarro AG, Meza-León B, Gratzinger D, Juárez-Aguilar FG, Chang Q, Ornatsky O, et al. Human Aging Alters the Spatial Organization between CD34+ Hematopoietic Cells and Adipocytes in Bone Marrow. *Stem Cell Reports.* 2020 Aug 11;15(2):317–25. DOI: 10.1016/j.stemcr.2020.06.011.
78. Schulte-Schrepping J, Reusch N, Paclik D, Baßler K, Schlickeiser S, Zhang B, et al. Severe COVID-19 Is Marked by a Dysregulated Myeloid Cell Compartment. *Cell.* 2020 Sep 17;182(6):1419-1440.e23. DOI: 10.1016/j.cell.2020.08.001.

79. Cruz-Zárate D, Cabrera-Rivera GL, Ruiz-Sánchez BP, Serafín-López J, Chacón-Salinas R, López-Macías C, et al. Innate Lymphoid Cells Have Decreased HLA-DR Expression but Retain Their Responsiveness to TLR Ligands during Sepsis. *The Journal of Immunology*. 2018 Dec 1;201(11):3401–10. DOI: 10.4049/jimmunol.1800735.
80. Vadillo E, Taniguchi-Ponciano K, Lopez-Macias C, Carvente-Garcia R, Mayani H, Ferat-Osorio E, et al. A Shift Towards an Immature Myeloid Profile in Peripheral Blood of Critically Ill COVID-19 Patients. *Arch Med Res*. 2021 Apr 1;52(3):311–23. DOI: 10.1016/j.arcmed.2020.11.005.
81. Friedrich K, Sommer M, Strobel S, Thrum S, Blüher M, Wagner U, et al. Perturbation of the monocyte compartment in human obesity. *Front Immunol*. 10:1874. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01874.
82. Bao Y, Mo J, Ruan L, Li G. Increased monocytic CD14+HLADRlow/-myeloid-derived suppressor cells in obesity. *Mol Med Rep*. 2015 Mar 1;11(3):2322–8. DOI: 10.3892/mmr.2014.2927.
83. Sacchi A, Grassi G, Bordoni V, Lorenzini P, Cimini E, Casetti R, et al. Early expansion of myeloid-derived suppressor cells inhibits SARS-CoV-2 specific T-cell response and may predict fatal COVID-19 outcome. *Cell Death Dis*. 2020 Oct 1;11(10). DOI: 10.1038/s41419-020-03125-1.
84. Wang F, Nie J, Wang H. Characteristics of peripheral lymphocyte subset alteration in COVID-19 pneumonia. *J Infect Dis*. 2020 May 11;221(11):1762-1769. DOI: 10.1093/infdis/jiaa150.
85. O’Shea D, Hogan AE. Dysregulation of natural killer cells in obesity. *Cancers (Basel)*. 2019 Apr 23;11(4):573. DOI: 10.3390/cancers11040573.
86. van Eeden C, Khan L, Osman MS, Tervaert JWC. Natural killer cell dysfunction and its role in COVID-19. *Int J Mol Sci*. 2020 Sep 1;21(17):6351. DOI: 10.3390/ijms21176351.
87. Rodriguez L, Pekkarinen PT, Lakshmikanth T, Tan Z, Consiglio CR, Pou C, et al. Systems-Level Immunomonitoring from Acute to Recovery Phase of Severe COVID-19. *Cell Rep Med*. 2020 Aug 25;1(5):100078. DOI: 10.1016/j.xcrm.2020.100078.
88. Sumi T, Harada K. Immune response to SARS-CoV-2 in severe disease and long COVID-19. *iScience*. 2022 Aug 19;25(8):104723. DOI: 10.1016/j.isci.2022.104723.

## **FINANCIAMIENTOS**

Este proyecto no recibió apoyo financiero. Rubí Romo agradece la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

**Anexo 1. Carta de consentimiento informado para participación en el estudio.**



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN Y POLÍTICAS DE SALUD  
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD**

**Carta de consentimiento informado para participación en protocolos de  
Investigación  
(Adultos)**

**Nombre del estudio: "LA HEMATOPOYESIS DE EMERGENCIA EN LA RESOLUCIÓN TEMPRANA DE COVID-19 Y EL ESTABLECIMIENTO DE INMUNIDAD COLECTIVA"**

**Lugar y Fecha: Hospital General de Zona No. 5, IMSS, Metepec, Puebla, a \_\_\_\_\_ del mes \_\_\_\_\_ del año \_\_\_\_\_.**

**Número de registro Institucional: R-2020-785-134.**

**Propósito del estudio:** A usted se le invita a participar en este estudio por que cumple con los criterios de inclusión, que dentro de ellos es presentar la enfermedad COVID-19, generada por el virus SARS-CoV2 (Coronavirus). Nuestro objetivo es medir la cantidad de células madre y progenitoras capaces de producir las células de la sangre encargadas de combatir la infección por coronavirus y recuperar la salud de forma rápida. También serán analizados algunos elementos inflamatorios y anticuerpos que ayudan a defendernos, para conocer el comportamiento de la enfermedad y poder ayudar al médico en la elección del mejor tratamiento.

Al igual que usted, otras personas más serán invitadas a participar. Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Por favor lea la información que le proporcionamos, y haga las preguntas que desee antes de decidir si desea o no participar.

**Procedimientos.** Si usted acepta participar ocurrirá lo siguiente:

Le pediremos que nos permita tomarle de su brazo dos muestras de sangre en diferentes momentos: una al inicio de su evaluación y otra, cuatro semanas después del diagnóstico. La cantidad de sangre que le tomaremos equivale a tres cucharadas soperas. También requerimos que nos dé autorización para consultar con su médico algunos datos de su expediente clínico que nos permitan saber detalles clínicos del proceso infeccioso. De cada una las muestras de sangre obtendremos sus células y/o el suero y los analizaremos.

**Posibles riesgos y molestias:** Existe la posibilidad de que se genere dolor o moretón en el brazo donde entra la aguja para tomar la sangre. La información obtenida de su expediente clínico será tomada bajo absoluta reserva y no se manipularán sus datos personales ya que no son necesarios para el análisis.

**Disponibilidad de tratamiento médico:** Usted recibirá el tratamiento adecuado para resolver la infección de COVID-19, en el remoto caso de presentarse complicaciones asociadas a su participación en el presente estudio, el IMSS otorgará y cubrirá todas las atenciones requeridas.

**Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio:** Aunque directamente no obtendrá ningún beneficio de los datos obtenidos, estos permitirán comprender la capacidad del sistema de defensas del organismo durante la infección COVID-19.

**Participación o retiro:** Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Si usted decide no participar, seguirá recibiendo la atención médica brindada por el IMSS, se le ofrecerán los procedimientos establecidos dentro de los servicios de atención médica del IMSS. Es decir, que, si usted no desea participar en el estudio, su decisión no afectará su relación con el IMSS y su derecho a obtener los servicios de salud u otros servicios que recibe del IMSS. Si en un principio desea participar y posteriormente cambia de opinión, usted puede abandonar el estudio en cualquier momento. El abandonar el estudio en momento que quiera no modificará de ninguna manera los beneficios que usted tiene como derechohabiente del IMSS. Para los fines de esta investigación sólo utilizaremos la información que usted nos ha brindado desde el momento en que aceptó participar y hasta el momento en el cual nos haga saber que ya no desea participar. También queremos solicitar a través de este documento de autorización, que nos autorice a guardar las muestras que obtenemos al momento de tomar su sangre para poder realizar en un futuro los análisis complementarios a los que hoy estamos proponiendo. Lo anterior preservando la privacidad y confidencialidad.

**Privacidad y confidencialidad:** La información que obtengamos de su expediente clínico será guardada de manera confidencial, para garantizar su privacidad. Cuando los resultados de este estudio sean publicados o presentados en conferencias no se dará información que pudiera revelar su identidad. Su identidad será protegida y ocultada. Para proteger su identidad le asignaremos un número que utilizaremos para identificar sus datos, y usaremos ese número en lugar de su nombre en nuestras bases de datos.

**Personal de contacto para dudas y aclaraciones sobre el estudio:** Si tiene preguntas o quiere hablar con alguien sobre este estudio de investigación puede comunicarse de 8:00 a 14:00 horas, de lunes a viernes con el Dr. Jorge Bayrán Flores. Matrícula 99321842, o con la Dra. Karla Victoria Gutiérrez de Anda, quienes son investigadores colaboradores y responsables ante el hospital, o bien con la Dra. Rosana Pelayo, quien es responsable del proyecto, al teléfono 01 (244) 444 1173.


**Personal de contacto para dudas sobre sus derechos como participante en un estudio de investigación.**

Si usted tiene dudas o preguntas sobre sus derechos al participar en un estudio de investigación, puede comunicarse con los responsables de la Comisión de Ética en Investigación del IMSS, a los Tel. 56276900 extensión 21230, de 9 a 16:00 horas; o si así lo prefiere al correo electrónico: [comiteeticainv.imss@gmail.com](mailto:comiteeticainv.imss@gmail.com).

La Comisión de Ética se encuentra ubicada en el Edificio del Bloque B, Unidad de Congresos piso 4, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Av. Cuauhtémoc 330 Colonia Doctores, C.P. 06725, Ciudad de México.



## Anexo 2. Instrumento de recolección.

 <b>INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL</b> <small>Centro de Investigación Biomédica de Oriente. Puebla</small>		
<b>La hematopoyesis de emergencia en la resolución temprana de COVID-19 y el establecimiento de Inmunidad colectiva</b>		
<small>No. de registro: R-2020-785-134</small>		
<b>Hoja de recolección de DATOS CLÍNICOS</b>		
<small>(Autor: Biol. J. A. López Blanco)</small>		
<b>ID protocolo</b> <small>(No contestar)</small>	<input type="text"/>	
<b>Número de registro institucional</b>	<input type="text"/>	
<b>Nombre de la persona que realizó el registro</b>	<input type="text"/>	
<b>Procedencia del paciente</b> <small>(Favor de seleccionar una)</small>	<input type="checkbox"/> UIMFG <input type="checkbox"/> HGZ20 <input type="checkbox"/> UMAE Puebla <input type="checkbox"/> HGZ1 <input type="checkbox"/> UIMIQ <input type="checkbox"/> HGZ5 <input type="checkbox"/> Lab. Juárez	
<b>Nombres paciente</b>	<input type="text"/>	
<b>Apellidos paciente</b>	<input type="text"/>	
<b>Sexo</b> <small>(Favor de seleccionar una)</small>	<input type="checkbox"/> Femenino <input type="checkbox"/> Masculino	
<b>Edad</b>	<input type="text"/>	
<b>Peso</b>	<input type="text"/> kg	
<b>Talla</b>	<input type="text"/> m	
<b>IMC</b>	<input type="text"/>	
<b>Prueba PCR</b>	Fecha 1a prueba PCR: <input type="text"/> RT-PCR/LAMP: <input type="text"/> Fecha 2a prueba PCR: <input type="text"/> RT-PCR/LAMP: <input type="text"/> Carga viral: <input type="text"/>	
<b>Medicación crónica</b>	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Desconocida	
<b>Describe los medicamentos</b>	<input type="text"/>	
<b>Ingreso hospitalario</b> <small>(Favor de seleccionar una)</small>	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	
<b>Fecha de ingreso a TRIAGE</b>	<input type="text"/>	
<b>Diagnóstico al ingreso</b>	<input type="text"/>	
<b>Fecha de ingreso a unidad COVID</b>	<input type="text"/>	
<b>Frecuencia cardíaca</b>	<input type="text"/>	
<b>Frecuencia respiratoria</b>	<input type="text"/>	
<b>Temperatura</b>	<input type="text"/> °C	
<b>Presión</b>	<input type="text"/>	
<b>Fecha de inicio de síntomas</b>	<input type="text"/>	
<b>Síntomas (Favor de seleccionar las que correspondan)</b>		
Fiebre: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Mialgias: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Náuseas: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
Disnea: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Artralgias: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Hiposmia/anosmia: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
Tos: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Disgeusia: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Cefalea: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
Rinorrea: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Fatiga: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Dolor Torácico: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
Expectorcación: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Diarrea: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Otro (especifique): <input type="text"/>
Asintomático: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No		
<b>Comorbilidades (Favor de seleccionar las que correspondan)</b>		
Diabetes: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Hipotiroidismo: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Dislipidemia: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
Complicación crónica de DM: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Inmunosupresión: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Insuficiencia cardíaca IV: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
Enf. arterial periférica: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	RCP previo ingreso: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Cardiopatía isquémica/IAM: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
Enf. vascular cerebral: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Linfoma: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Insuficiencia renal crónica: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
Demencia: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Tumor sólido: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Insuficiencia hepática aguda: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
Epilepsia: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Tabaquismo: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Cirrosis hepática: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
Enf. tejido conectivo: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Hipertensión arterial: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Lupus: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
Obesidad: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Síndrome de Down: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	EPOC: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
Leucemia: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Úlcera gastroduodenal: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Exposición humo: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
Otros (especifique): <input type="text"/>		
<b>Co-Infecciones (Favor de seleccionar las que correspondan)</b>		
Influenza tipo A: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Hepatitis C: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Infección VIH-SIDA: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
Influenza tipo B: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Hepatitis B: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Otro (especifique): <input type="text"/>



IMSS

# INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

Centro de Investigación Biomédica de Oriente, Puebla

La hematopoyesis de emergencia en la resolución temprana de COVID-19 y el establecimiento de inmunidad colectiva

No. de registro: R-2020-785-134

## Hoja de recolección de BIOMETRÍA HEMÁTICA

Héctor Raúl J. A. López Blanco

ID protocolo (No conteste)

Número de registro institucional  Nombre de la persona que realizó el registro

Procedencia del paciente (Favor de seleccionar una)  UIMFG  HQZ20  UMAE Puebla  HQZ1  UIMQ  HQZ5  Lab. Juárez

Nombre paciente  Apellidos paciente

	Laboratorio					
	Ingreso		Seguimiento		Recuperado	
Leucocitos totales	<input type="text"/>		<input type="text"/>		<input type="text"/>	
Neutrófilos segmentados	<input type="text"/> %	<input type="text"/> 10 <sup>9</sup> /mL	<input type="text"/> %	<input type="text"/> 10 <sup>9</sup> /mL	<input type="text"/> %	<input type="text"/> 10 <sup>9</sup> /mL
Neutrófilos bandas	<input type="text"/> %	<input type="text"/> 10 <sup>9</sup> /mL	<input type="text"/> %	<input type="text"/> 10 <sup>9</sup> /mL	<input type="text"/> %	<input type="text"/> 10 <sup>9</sup> /mL
Neutrófilos juveniles	<input type="text"/> %	<input type="text"/> 10 <sup>9</sup> /mL	<input type="text"/> %	<input type="text"/> 10 <sup>9</sup> /mL	<input type="text"/> %	<input type="text"/> 10 <sup>9</sup> /mL
Neutrófilos mielocitos	<input type="text"/> %	<input type="text"/> 10 <sup>9</sup> /mL	<input type="text"/> %	<input type="text"/> 10 <sup>9</sup> /mL	<input type="text"/> %	<input type="text"/> 10 <sup>9</sup> /mL
Linfocitos	<input type="text"/> %	<input type="text"/> 10 <sup>9</sup> /mL	<input type="text"/> %	<input type="text"/> 10 <sup>9</sup> /mL	<input type="text"/> %	<input type="text"/> 10 <sup>9</sup> /mL
Monocitos	<input type="text"/> %	<input type="text"/> 10 <sup>9</sup> /mL	<input type="text"/> %	<input type="text"/> 10 <sup>9</sup> /mL	<input type="text"/> %	<input type="text"/> 10 <sup>9</sup> /mL
Eosinófilos	<input type="text"/> %	<input type="text"/> 10 <sup>9</sup> /mL	<input type="text"/> %	<input type="text"/> 10 <sup>9</sup> /mL	<input type="text"/> %	<input type="text"/> 10 <sup>9</sup> /mL
Basófilos	<input type="text"/> %	<input type="text"/> 10 <sup>9</sup> /mL	<input type="text"/> %	<input type="text"/> 10 <sup>9</sup> /mL	<input type="text"/> %	<input type="text"/> 10 <sup>9</sup> /mL
Eritrocitos	<input type="text"/> 10 <sup>12</sup> /mL		<input type="text"/> 10 <sup>12</sup> /mL		<input type="text"/> 10 <sup>12</sup> /mL	
Hemoglobina	<input type="text"/> g/dL		<input type="text"/> g/dL		<input type="text"/> g/dL	
Hematocrito	<input type="text"/> %		<input type="text"/> %		<input type="text"/> %	
VCM	<input type="text"/> fL		<input type="text"/> fL		<input type="text"/> fL	
HCM	<input type="text"/> pg		<input type="text"/> pg		<input type="text"/> pg	
CMHC	<input type="text"/> g/dL		<input type="text"/> g/dL		<input type="text"/> g/dL	
Plaquetas	<input type="text"/> 10 <sup>9</sup> /mL		<input type="text"/> 10 <sup>9</sup> /mL		<input type="text"/> 10 <sup>9</sup> /mL	
VPM	<input type="text"/> fL		<input type="text"/> fL		<input type="text"/> fL	
Creatinina	<input type="text"/> mg/dL		<input type="text"/> mg/dL		<input type="text"/> mg/dL	
Glucosa	<input type="text"/> mg/dL		<input type="text"/> mg/dL		<input type="text"/> mg/dL	
Bilirrubinas totales	<input type="text"/> mg/dL		<input type="text"/> mg/dL		<input type="text"/> mg/dL	
DRL	<input type="text"/>		<input type="text"/>		<input type="text"/>	
Proteína C reactiva	<input type="text"/>		<input type="text"/>		<input type="text"/>	
Procalcitonina	<input type="text"/>		<input type="text"/>		<input type="text"/>	
Dímero D	<input type="text"/>		<input type="text"/>		<input type="text"/>	
Fibrinógeno	<input type="text"/>		<input type="text"/>		<input type="text"/>	
Cl total	<input type="text"/>		<input type="text"/>		<input type="text"/>	
Urea	<input type="text"/>		<input type="text"/>		<input type="text"/>	
Lactato	<input type="text"/>		<input type="text"/>		<input type="text"/>	
pH	<input type="text"/>		<input type="text"/>		<input type="text"/>	
pCO <sub>2</sub>	<input type="text"/>		<input type="text"/>		<input type="text"/>	
pO <sub>2</sub>	<input type="text"/>		<input type="text"/>		<input type="text"/>	
HCO <sub>3</sub>	<input type="text"/>		<input type="text"/>		<input type="text"/>	
Saturación O <sub>2</sub>	<input type="text"/>		<input type="text"/>		<input type="text"/>	
FIO <sub>2</sub>	<input type="text"/>		<input type="text"/>		<input type="text"/>	
Femina	<input type="text"/>		<input type="text"/>		<input type="text"/>	



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**

Centro de Investigación Biomédica de Oriente, Puebla

La hematopoyesis de emergencia en la resolución temprana de COVID-19 y el establecimiento de inmunidad colectiva

No. de registro: R-2020-785-134

Hoja de recolección de HISTORIAL CLINICO

Modelo Rev. 1.4. 14/04/2020

ID protocolo   
(No contacta)

Número de registro  Nombre de la persona que   
Institucional realizó el registro

Procedencia del paciente  UIMPQ  HGOZO  UMAC Puebla  HGOZ  UEMIO  HGOZ  Lab. Juárez

Nombre paciente  Apellidos paciente

Muestras			
Estado del paciente al momento de la muestra	Activo	Seguimiento	Recuperado
Fecha toma de muestra	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Fecha procesamiento de muestra (No contacta)	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Observaciones	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

CLASIFICACIONES CLINICAS							
Severidad SOFA (Favor de seleccionar uno)	0	+1	+2	+3	+4		
<b>NEWS 2 (Favor de seleccionar las que correspondan)</b>							
Parámetro fisiológico	Escala						
	3	2	1	0	1	2	3
Frecuencia respiratoria	≥35		9-11	12-20		21-24	≥25
Saturación de Oxígeno (SpO <sub>2</sub> )	≤90	90-93	94-95	≥96			
SpO <sub>2</sub> en caso de EPOC	≤83	84-85	86-87	88-92 con 40% O <sub>2</sub>	88-94 con O <sub>2</sub>	95-96 con O <sub>2</sub>	≥97 con O <sub>2</sub>
Oxígeno suplementario		SI		Alta ambiente			≥200
Tensión arterial sistólica	≤90	91-100	101-110	111-119			
Frecuencia Cardíaca	≥90		40-50	51-90	91-110	111-130	≥131
Nivel conciencia			Alerta				C, V, D, J
Temperatura	≤35		35.1-36	36.1-38	38.1-39	≥39.1	
TOTAL <input type="text"/>							

Escala CURB-65 (Favor de seleccionar uno)	
Si enfermo presenta confusión	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> No
Nitrogeno Urinico >19 mg/dL (7 mmol/L)	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> No
Frecuencia respiratoria mayor o igual a 30/min	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> No
TA sistólica <90 mm Hg o el TA diastólica menor o igual a 60	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> No
Edad es igual o mayor a 65	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> No
TOTAL <input type="text"/>	

GMS score (Favor de seleccionar uno)	
Comorbilidad	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> No
Edad	≤ 50 años <input type="checkbox"/> > 60 años <input type="checkbox"/>
Unidades (10 <sup>3</sup> /L)	> 1.0 <input type="checkbox"/> ≤ 1.0 <input type="checkbox"/>
LDH (U/L)	≤ 250 <input type="checkbox"/> 251-500 <input type="checkbox"/> > 500 <input type="checkbox"/>
TOTAL <input type="text"/>	

Tonografía

Uso de ventilador

Ventilación mecánica  SI  No  Días

Tratamientos al momento de la muestra						
	Aplicación	Dosis	Fecha Inicio	Fecha Final	Reacción del paciente	
Gloropina	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> No	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Responde favorablemente al fármaco	Reacción adversa <input type="checkbox"/> Sin cambios <input type="checkbox"/>
Lopiravir/ritonavir	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> No	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Responde favorablemente al fármaco	Reacción adversa <input type="checkbox"/> Sin cambios <input type="checkbox"/>
Clatromicina	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> No	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Responde favorablemente al fármaco	Reacción adversa <input type="checkbox"/> Sin cambios <input type="checkbox"/>
Asitromicina	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> No	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Responde favorablemente al fármaco	Reacción adversa <input type="checkbox"/> Sin cambios <input type="checkbox"/>
Esteroides	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> No	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Responde favorablemente al fármaco	Reacción adversa <input type="checkbox"/> Sin cambios <input type="checkbox"/>
Enoxaparina	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> No	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Responde favorablemente al fármaco	Reacción adversa <input type="checkbox"/> Sin cambios <input type="checkbox"/>
Tedizumab	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> No	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Responde favorablemente al fármaco	Reacción adversa <input type="checkbox"/> Sin cambios <input type="checkbox"/>
Rituximab	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> No	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Responde favorablemente al fármaco	Reacción adversa <input type="checkbox"/> Sin cambios <input type="checkbox"/>
Oxeltarivir	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> No	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Responde favorablemente al fármaco	Reacción adversa <input type="checkbox"/> Sin cambios <input type="checkbox"/>
Heparina	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> No	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Responde favorablemente al fármaco	Reacción adversa <input type="checkbox"/> Sin cambios <input type="checkbox"/>
Caftazina	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> No	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Responde favorablemente al fármaco	Reacción adversa <input type="checkbox"/> Sin cambios <input type="checkbox"/>
Ronidivir	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> No	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Responde favorablemente al fármaco	Reacción adversa <input type="checkbox"/> Sin cambios <input type="checkbox"/>
Transplante hematopoyético	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> No	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Responde favorablemente al fármaco	Reacción adversa <input type="checkbox"/> Sin cambios <input type="checkbox"/>
Otros (especificar)	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> No	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Responde favorablemente al fármaco	Reacción adversa <input type="checkbox"/> Sin cambios <input type="checkbox"/>

**Anexo 3. Frecuencia, tasa de letalidad (CFR) y riesgo relativo de muerte (RR<sub>d</sub>) por COVID-19 en la cohorte por género, rango de edad, número y tipo de comorbilidades.**

	<b>Casos n (%)</b>	<b>Defunciones n (%)</b>	<b>%CFR</b>	<b>RR<sub>d</sub> [95% CI]</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Género</b>					
<b>Masculino</b>	158 (64.49)	61 (70.11)	38.61	1.29 [0.90- 1.90]	0.21
<b>Femenino</b>	87 (35.51)	26 (29.89)	29.89	0.77 [0.53 - 1.11]	0.21
<b>Total</b>	245 (100)	87 (100)	35.51	-	-
<b>Rango de edad (años)</b>					
<b>20-29</b>	14 (4.60)	4 (5.71)	28.57	1.43 [0.45 - 4.49]	0.69
<b>30-39</b>	20 (4.60)	4 (8.16)	20.00	1.00 [0.31 - 3.25]	>0.99
<b>40-49</b>	32 (9.20)	8 (13.06)	25.00	1.25 [0.47 - 3.58]	0.75
<b>50-59</b>	66 (28.74)	25 (26.94)	37.88	1.89 [0.84 - 4.90]	0.18
<b>60-69</b>	47 (20.69)	18 (19.18)	38.30	1.92 [0.82 - 5.03]	0.17
<b>70-79</b>	44 (17.24)	15 (17.96)	34.09	1.71 [0.71 - 4.54]	0.38
<b>80-89</b>	18 (12.64)	11 (7.35)	61.11	3.06 [1.28 – 8.00]	0.02 *
<b>90-99</b>	4 (2.30)	2 (1.63)	50.00	2.50 [0.61 - 7.88]	0.25
<b>Total</b>	245 (100)	87 (100)	35.51	-	-
<b>Número de comorbilidades</b>					
<b>0</b>	62 (25.31)	19 (21.84)	30.65	1.00 [ 0.59 – 1.69]	>0.99
<b>1</b>	66 (26.94)	27 (31.03)	40.91	1.34 [0.84 – 2.16]	0.27
<b>2</b>	53 (21.63)	17 (19.54)	32.08	1.05 [0.61 – 1.79]	>0.99
<b>3</b>	37 (15.10)	12 (13.79)	32.43	1.06 [0.58 – 1.88]	>0.99
<b>4-7</b>	27 (11.02)	12 (13.79)	44.44	1.45 [0.81 – 2.49]	0.23
<b>Total</b>	245 (100)	87 (100)	35.51	-	-
<b>Una comorbilidad</b>					
<b>Sin comorbilidad</b>	62	19	30.65	1.00 [0.59 – 1.69]	>0.99
<b>HTA</b>	22 (33.33)	9 (33.33)	40.91	1.34 [0.69 – 2.40]	0.43

<b>Diabetes</b>	12 (18.18)	5 (18.52)	41.67	1.36 [0.59 – 2.64]	0.51
<b>Obesidad</b>	18 (27.27)	8 (29.63)	44.44	1.45 [0.73 – 2.61]	0.40
<b>IRC</b>	2 (3.03)	2 (7.41)	100.00	3.26 [1.07 – 4.75]	0.10
<b>Fumador</b>	3 (4.55)	1 (3.70)	33.33	1.09 [0.20 – 3.01]	>0.99
<b>Otra</b>	9 (13.64)	2 (7.41)	22.22	0.73 [0.20-2.00]	0.72
<b>Total</b>	66 (100)~	27 (100)~	40.91~	-	-
<b>Combinación de 2 o 3 comorbilidades</b>					
<b>HTA + Diabetes</b>	21 (51.22)	7 (53.85)	33.33	1.09 [0.52 – 2.09]	0.79
<b>HTA + Obesidad</b>	2 (4.88)	1 (7.69)	50.00	1.63 [0.30 – 3.62]	0.53
<b>HTA + IRC</b>	6 (14.63)	3 (23.08)	50.00	1.63 [0.58 – 3.21]	0.38
<b>Diabetes + Obesidad</b>	3 (7.32)	0 (0.00)	0.00	0.00 [0.00 – 1.98]	0.55
<b>Diabetes + IRC</b>	1 (2.44)	1 (7.69)	100.00	3.26 [0.66 – 9.49]	0.32
<b>HTA + Diabetes + Obesidad</b>	8 (19.51)	1 (7.69)	12.50	0.41 [0.07 – 1.67]	0.42
<b>Total</b>	41 (100)	13 (100)	31.71	-	-
<b>21-64 años</b>					
<b>Sin comorbilidad</b>	47	15	31.91	1.00 (0.56 – 1.80) ^	>0.99
<b>HTA</b>	9	2	22.22	0.70 (0.19 – 1.97) ^	0.71
<b>Diabetes</b>	7	3	42.86	1.34 (0.46 – 2.89) ^	0.67
<b>Obesidad</b>	17	8	47.06	1.48 (0.73 – 2.72) ^	0.38
<b>IRC</b>	2	2	100	3.13 (1.02 – 19.03) ^	0.12
<b>Fumador</b>	3	1	33.33	1.04 (0.19 – 2.99) ^	>0.99
<b>HTA + Diabetes</b>	6	0	0	0 (0 – 1.30) ^	0.17
<b>HTA + Obesidad</b>	2	1	50.00	1.57 (0.29 – 3.62) ^	>0.99
<b>HTA+ IRC</b>	3	1	33.33	1.04 (0.19 – 2.99) ^	>0.99

<b>Diabetes + Obesidad</b>	2	0	0	0 (0 – 2.30) ^	>0.99
<b>HTA + Diabetes + Obesidad</b>	3	1	33.33	1.04 (0.19 – 2.99) ^	>0.99
<b>IRC + HTA + Diabetes + Complicación de diabetes</b>	2	0	0	0 (0 – 2.30) ^	0.99
<b>65-94 años</b>					
<b>Sin comorbilidad</b>	15	4	26.67	1.00 (0.32 – 3.13) ^	>0.99
<b>HTA</b>	13	7	53.85	2.02 (0.80 – 5.43) ^	0.25
<b>Diabetes</b>	5	4	40.00	1.50 (0.37 – 4.97) ^	0.61
<b>Obesidad</b>	1	0	0	0 (0 – 4.63) ^	>0.99
<b>IRC</b>	0	0	-	-	-
<b>Fumador</b>	0	0	-	-	-
<b>HTA + Diabetes</b>	13	5	38.46	1.44 (0.51 – 4.18) ^	0.69
<b>HTA + Obesidad</b>	0	0	-	-	-
<b>HTA+ IRC</b>	2	2	100	3.75 (1.06 – 17.36) ^	0.11
<b>Diabetes + Obesidad</b>	1	0	0	0 (0 – 4.63) ^	>0.99
<b>HTA + Diabetes + Obesidad</b>	5	0	0	0 (0 – 2.58) ^	0.54
<b>IRC + HTA + Diabetes + Complicación de diabetes</b>	2	2	100	3.75 (1.06 – 17.36) ^	0.11

CFR, la tasa de letalidad fue calculada como el porcentaje de casos que falleció en el mismo grupo.

RR<sub>d</sub> e IC, El riesgo relativo de muerte y el intervalo de confianza fueron calculados por género entre grupo masculino vs grupo femenino; por rango de edad donde cada rango de edad fue comparado vs el grupo de 30-39 años (ya que fue el que presentó menor CFR); por el número y tipo de comorbilidades entre el grupo con comorbilidades y el grupo sin comorbilidades, ^RR<sub>d</sub> fueron calculados por grupo con comorbilidades vs grupo sin comorbilidades en el mismo grupo de edad.

~ El total de casos y defunciones fue calculado en el grupo con una comorbilidad. \* p<0.05.

**Anexo 4. Tasa de letalidad (CFR) y riesgo relativo de muerte (RR<sub>d</sub>) por COVID-19 en la cohorte por presencia de enfermedades metabólicas preexistentes y perfiles hematológicos de mal pronóstico.**

	<b>Casos n</b>	<b>Defunciones n</b>	<b>%CFR</b>	<b>RR<sub>d</sub> [95% CI]</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Admisión Neutrófilos ≥75%</b>					
<b>Sin comorbilidad</b>	38	14	36.84	1.00 (0.56 – 1.80) #	>0.99
<b>HTA</b>	13	4	30.77	0.84 (0.32 – 1.86) #	0.75
<b>Diabetes</b>	7	3	42.86	1.16 (0.40 – 2.51) #	>0.99
<b>Obesidad</b>	15	7	46.67	1.27 (0.61 -2.39) #	0.55
<b>IRC</b>	2	2	100	2.71 (0.88 – 8.23) #	0.15
<b>Fumador</b>	1	1	100	2.71 (0.54 – 32.93) #	0.38
<b>HTA+ Diabetes</b>	15	4	26.67	0.72 (0.27 – 1.66) #	0.54
<b>HTA + Obesidad</b>	2	1	50	1.36 (0.25 -3.14) #	>0.99
<b>HTA + IRC</b>	4	2	50	1.36 (0.39 – 2.92) #	0.63
<b>Diabetes + Obesidad</b>	2	0	0	0 (0 – 1.99) #	0.53
<b>HTA + Diabetes + Obesidad</b>	0	0	-	-	-
<b>IRC + HTA + Diabetes + Complicación de diabetes</b>	4	2	50	1.36 (0.39 – 2.92) #	0.63
<b>Admisión- Linfocitos &lt;17%</b>					
<b>Sin comorbilidad</b>	38	14	36.84	1.00 (0.56 – 1.80) #	>0.99
<b>HTA</b>	13	4	30.77	0.84 (0.32 – 1.86) #	0.75
<b>Diabetes</b>	7	3	42.86	1.16 (0.40 – 2.51) #	>0.99
<b>Obesidad</b>	16	8	50	1.36 (0.68 – 2.49) #	0.38
<b>IRC</b>	2	2	100	2.71 (0.88 – 8.23) #	0.15
<b>Fumador</b>	2	1	50	1.36 (0.25 – 3.14) #	>0.99

HTA+ Diabetes	0	0	-	-	-
HTA + Obesidad	2	1	50	1.36 (0.25 – 3.14) #	>0.99
HTA + IRC	4	2	50	1.36 (0.39 – 2.92) #	0.63
Diabetes + Obesidad	2	0	0	0 (0 – 1.99) #	0.53
HTA + Diabetes + Obesidad	0	0	-	-	-
IRC + HTA+ Diabetes + Complicación de diabetes	4	2	50	1.36 (0.39 – 2.92) #	0.63
<b>Admisión- NLR ≥3</b>					
Sin comorbilidad	43	16	37.21	1.00 (0.58 – 1.73) #	>0.99
HTA	15	5	33.33	0.90 (0.38 – 1.85) #	>0.99
Diabetes	9	3	33.33	0.90 (0.31 – 2.03) #	>0.99
Obesidad	16	8	50	1.34 (0.68 – 2.41) #	0.39
IRC	2	2	100	2.69 (0.88 – 15.85) #	0.15
Fumador	2	1	50	1.34 (0.25 – 3.03) #	>0.99
HTA + Diabetes	16	5	31.25	0.84 (0.35 – 1.75) #	0.77
HTA + Obesidad	2	1	50	1.34 (0.25 – 3.03) #	>0.99
HTA+ IRC	5	3	60	1.61 (0.58 – 3.02) #	0.37
Diabetes + Obesidad	3	0	0	0 (0 – 1.64) #	0.54
HTA + Diabetes + Obesidad	0	0	-	-	-
IRC+ HTA + Diabetes + Complicación de diabetes	4	2	50	1.34 (0.39 – 2.82) #	0.63
<b>Admisión- Dímero D ≥500 ng/mL</b>					
Sin comorbilidad	14	5	35.71	1.00 (0.38 – 2.66) #	>0.99
HTA	1	0	0	0 (0 – 3.16) #	>0.99

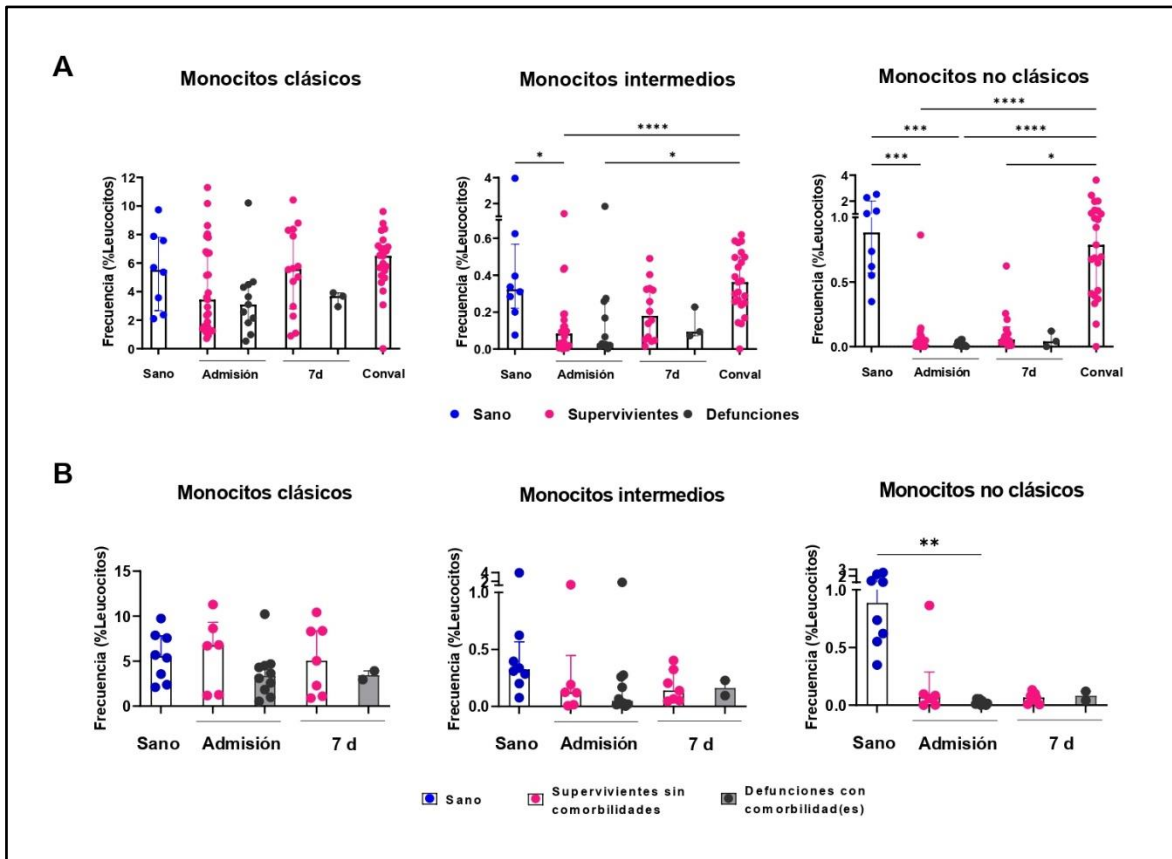
Diabetes	3	3	100	2.80 (1.04 - 5.30) #	0.08
Obesidad	6	4	66.67	1.87 (0.70 - 4.55) #	0.34
IRC	2	2	100	2.80 (0.84 - 5.65) #	0.18
Fumador	2	1	50	1.40 (0.24 - 4.31) #	>0.99
HTA + Diabetes	6	0	0	0 (0 - 1.28) #	0.26
HTA + Obesidad	1	1	100	2.80 (0.53 - 11.31) #	0.40
HTA+ IRC	4	2	50	1.40 (0.37 - 3.95) #	>0.99
Diabetes + Obesidad	2	0	0	0 (0 - 2.44) #	>0.99
HTA + Diabetes + Obesidad	0	0	-	-	-
IRC+ HTA + Diabetes + Complicación de diabetes	1	1	100	2.80 (0.53 - 11.31) #	0.40
<b>Admisión- CRP ≥5 mg/L</b>					
Sin comorbilidad	31	9	29.03	1.00 (0.46 - 2.15) #	>0.99
HTA	10	2	20	0.69 (0.18 - 2.17) #	0.70
Diabetes	10	4	40	1.38 (0.51 - 3.21) #	0.70
Obesidad	17	8	47.06	1.62 (0.76 - 3.36) #	0.23
IRC	2	2	100	3.44 (1.08 - 5.97) #	0.10
Fumador	2	1	50	1.72 (0.31 - 4.49) #	0.52
HTA + Diabetes	13	4	30.77	1.06 (0.39 - 2.59) #	>0.99
HTA + Obesidad	1	1	100	3.44 (0.67 - 23.89) #	0.31
HTA+ IRC	5	3	60	2.07 (0.71 - 4.47) #	0.31
Diabetes + Obesidad	1	0	0	0 (0 - 3.41) #	>0.99
HTA + Diabetes + Obesidad	0	0	-	-	-
IRC+ HTA + Diabetes + Complicación de diabetes	4	2	50	1.72 (0.47 - 4.15) #	0.57

Admisión- LDH $\geq 240$ U/L					
Sin comorbilidad	38	16	42.11	1.00 (0.59 – 1.70) #	>0.99
HTA	14	4	28.57	0.68 (0.26 – 1.50) #	0.52
Diabetes	8	3	37.50	0.89 (0.31 – 1.94) #	>0.99
Obesidad	16	8	50	1.19 (0.61 – 2.11) #	0.77
IRC	2	2	100	2.38 (0.78 – 54.95) #	0.20
Fumador	2	1	50	1.19 (0.22 – 2.65) #	>0.99
HTA + Diabetes	15	4	26.67	0.63 (0.24 – 1.41) #	0.36
HTA + Obesidad	2	1	50	1.19 (0.22 – 2.65) #	>0.99
HTA+ IRC	4	2	50	1.19 (0.34 – 2.47) #	>0.99
Diabetes + Obesidad	3	0	0	0 (0 – 1.44) #	0.27
HTA + Diabetes + Obesidad	0	0	-	-	-
IRC+ HTA + Diabetes + Complicación de diabetes	4	2	50	1.19 (0.34 – 2.47) #	>0.99
7 d- Neutrófilos $\geq 75\%$					
Sin comorbilidad	24	5	20.83	1.00 (0.35 – 2.89) #	>0.99
HTA	8	4	50	2.40 (0.82 – 6.41) #	0.18
Diabetes	2	1	50	2.40 (0.41 – 7.62) #	0.42
Obesidad	4	2	50	2.40 (0.61 – 6.98) #	0.25
Fumador	1	0	0	0 (0 – 5.59) #	>0.99
7 d- Linfocitos $< 17\%$					
Sin comorbilidad	24	5	20.83	1.00 (0.35 - 2.89) #	>0.99
HTA	8	4	50	2.40 (0.82 – 6.41) #	0.18
Diabetes	1	0	0	0 (0 – 5.59) #	>0.99
Obesidad	4	2	50	2.40 (0.61 – 6.98) #	0.25

Fumador	1	0	0	0 (0 – 5.59) #	>0.99
<b>7 d- NLR ≥3</b>					
Sin comorbilidad	25	5	20	1.00 (0.34 – 2.90) #	>0.99
HTA	8	4	50	2.50 (0.85 – 6.68) #	0.17
Diabetes	2	1	50	2.50 (0.42 – 7.95) #	0.40
Obesidad	4	2	50	2.50 (0.63 – 7.28) #	0.24
Fumador	1	0	0	0 (0 – 5.84) #	>0.99
<b>7 d- Dímero D ≥500 ng/mL</b>					
Sin comorbilidad	11	2	18.18	1 (0.2 – 5.0) #	>0.99
HTA	6	3	50	2.75 (0.68 – 11.24) #	0.28
Diabetes	0	0	-	-	-
Obesidad	2	2	100	5.50 (1.29 – 11.95) #	0.08
Fumador	0	0	-	-	-
<b>7 d- CRP ≥5 mg/L</b>					
Sin comorbilidad	22	4	18.18	1 (0.30 – 3.29) #	>0.99
HTA	4	2	50	2.75 (0.67 – 8.70) #	0.22
Diabetes	2	1	50	2.75 (0.45 – 9.53) #	0.38
Obesidad	2	2	100	5.50 (1.51 – 26.27) #	0.05 *
Fumador	1	0	0	0 (0 – 6.91) #	>0.99
<b>7 d- LDH ≥240 U/L</b>					
Sin comorbilidad	22	5	22.73	1.00 (0.35 – 2.86) #	>0.99
HTA	7	4	57.14	2.51 (0.88 – 6.51) #	0.16
Diabetes	1	1	100	4.40 (0.81 – 19.02) #	0.26
Obesidad	3	1	33.33	1.47 (0.24 – 5.51) #	>0.99
Fumador	1	0	0	0 (0 – 5.11) #	>0.99

CFR, la tasa de letalidad fue calculada como el porcentaje de casos que falleció en el mismo grupo #RR<sub>d</sub> fueron calculados en los pacientes que presentaban los niveles anormales de los parámetros de laboratorios indicados entre casos con la comorbilidad o combinación de comorbilidades vs casos sin comorbilidad, tanto a la admisión y 7 días. \* p <0.05.

## Anexo 5. Subpoblaciones de monocitos



Comparación de las frecuencias celulares de las diferentes subpoblaciones de monocitos entre **A)** individuos sanos y pacientes adultos <65 años, y **B)** entre individuos sanos y pacientes adultos <65 años, supervivientes sin comorbilidades y defunciones con comorbilidades, a la admisión, 7 días y en la convalecencia.

## PUBLICACIONES

1. Balandrán JC, Zamora-Herrera G, **Romo-Rodríguez R**, Pelayo R. Emergency Hematopoiesis in the Pathobiology of COVID-19: The Dark Side of an Early Innate Protective Mechanism. *J Interferon Cytokine Res.* 2022 Aug;42(8):393-405. doi: 10.1089/jir.2022.0028. Epub 2022 Jun 8. PMID: 35675647.
2. **Rubí Romo-Rodríguez†**, Karla Gutiérrez-de Anda†, Jebea A López-Blanco, Gabriela Zamora-Herrera, et al. Ineffective emergency hematopoiesis is associated to COVID-19 in fatal outcomes of middle-aged Mexican patients with chronic comorbidities. *Arch Med Res.* Sometido 28 de septiembre de 2022.