



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *SERPINA1*
EN LA INFECCIÓN POR SARS-COV-2: ESTUDIO DE
UN NUEVO BIOMARCADOR

ANALYSIS OF *SERPINA1* GENE EXPRESSION IN
SARS-COV-2 INFECTION: STUDY OF A NEW
BIOMARKER

Autor/es

MARTA PINTANEL RAYMUNDO

Director/es

MIGUEL ANGEL TORRALBA CABEZA

SEBASTIÁN MENAO GUILLÉN

Facultad de medicina

2022/2023

INDICE

1.	RESUMEN.....	3
2.	GLOSARIO DE ABREVIATURAS.....	5
3.	INTRODUCCIÓN.....	6
3.1.	ANTECEDENTES Y SITUACIÓN ACTUAL.....	6
3.2.	LA ALFA-1 ANTITRIPSINA Y EL GEN <i>SERPINA1</i>	8
3.3.	IMPACTO DE LA ENFERMEDAD	9
4.	HIPOTESIS DE TRABAJO	10
5.	MATERIAL Y MÉTODOS	10
5.1.	DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA	10
5.2.	MATERIAL LABORATORIO.....	11
5.3.	DETERMINACIÓN ALFA-1 ANTITRIPSINA	12
5.4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	13
6.	RESULTADOS	13
6.1.	ESTUDIO ESTADÍSTICO DESCRIPTIVO.....	13
6.2.	ESTUDIO ESTADISTICO DE LAS VARIABLES CUANTITATIVAS.....	15
7.	DISCUSIÓN.....	19
7.1.	APLICABILIDAD DE LA METODOLOGÍA USADA	19
7.2.	UTILIDAD DE LA DETERMINACIÓN DE AAT EN LA COVID-19 GRAVE.....	19
7.3.	LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	20
7.4.	CONSIDERACIONES FINALES.....	20
8.	CONCLUSIONES	21
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	22
10.	ANEXOS.....	25

1. RESUMEN

INTRODUCCIÓN. El gen *SERPINA1* condiciona la síntesis de Alfa-1 Antitripsina (AAT). La AAT es un inhibidor de las proteasas de serina, especialmente de la elastasa neutrofílica. Los posibles desequilibrios entre las concentraciones de proteasas y antiproteasas (AAT) puede hacer que se desarrollen patologías pulmonares y extrapulmonares. En este trabajo se pretende estudiar la importancia de este posible desequilibrio, en los pacientes con COVID-19.

OBJETIVOS. Correlacionar la gravedad de la clínica de una cohorte de pacientes con infección por SARS-COV-2 con las concentraciones de AAT al diagnóstico de la enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODOS. Se ha llevado a cabo un estudio observacional, prospectivo, transversal, no intervencionista con carácter analítico, donde se seleccionaron 181 casos con COVID-19, perfectamente caracterizados desde el punto de vista clínico e ingresados en los servicios de Medicina Interna y Urgencias del Hospital Clínico Universitario “Lozano Blesa” de Zaragoza. A todos ellos se les realizó el estudio de la expresión del gen *SERPINA1* y éste se correlacionó con los aspectos clínicos y parámetros bioquímicos al ingreso hospitalario.

RESULTADOS. 141 casos correspondían a pacientes con COVID grave y 40 pacientes con COVID leve. El estudio de la AAT se correlacionó positivamente con los días de estancia, la gravedad, la Proteína C Reactiva, la ferritina, el ingreso en Cuidados Intensivos y el fallecimiento y presentó una correlación negativa con el número de linfocitos/mm³. Las concentraciones de AAT superiores a 237,5 mg/dL permitieron catalogar al paciente como “grave” (S72%; E78%) y de 311,5 mg/dL se asociaron con el riesgo de ingreso en Cuidados Intensivos o Exitus (S67%; E79%).

CONCLUSIONES. El gen *SERPINA1* se encuentra muy activado en la infección grave por SARS-COV2 y su producto de expresión, la AAT, se correlaciona con la gravedad de los pacientes COVID-19 al diagnóstico de la enfermedad siendo útil como biomarcador pronóstico. De confirmarse nuestros hallazgos en otras poblaciones se debería investigar si la administración de AAT podría ser una diana terapéutica.

Palabras clave: *COVID-19, SARS-COV2, SERPINA1, Alfa-1 Antitripsina*

ABSTRACT

INTRODUCTION. The *SERPINA1* gene determines the synthesis of Alpha-1 Antitrypsin (AAT). AAT is an inhibitor of serine proteases, specifically neutrophil elastase. Possible imbalances between protease and antiprotease (AAT) concentrations can lead to the development of pulmonary and extrapulmonary pathologies. This paper aims to study the importance of this possible imbalance in patients with COVID-19.

OBJECTIVES. To correlate the clinical severity of a cohort of patients with SARS-COV-2 infection with the AAT concentrations at diagnosis of the disease.

MATERIAL AND METHODS. An observational, prospective, cross-sectional, non-interventional, analytical study has been carried out, where 181 cases with COVID-19, perfectly characterized from the clinical point of view, and admitted to the Internal Medicine and Emergency Departments of the "Lozano Blesa" University Hospital in Zaragoza, were selected. All of them underwent a study of the expression of the *SERPINA1* gene and this was correlated with the clinical aspects and biochemical parameters at hospital admission.

RESULTS. 141 cases corresponded to patients with severe COVID and 40 patients with mild COVID. The AAT study was positively correlated with the days of stay, severity, C-Reactive Protein, ferritin, admission to Intensive Care, and death, and it presented a negative correlation with the number of lymphocytes/mm³. AAT concentrations higher than 237.5 mg/dL allowed the patient to be classified as "severe" (S72%; E78%) and 311.5 mg/dL were associated with the risk of admission to Intensive Care or Exitus (S67%; E79%).

CONCLUSIONS. The *SERPINA1* gene is highly activated in severe SARS-COV2 infection and its expression product, AAT, correlates with the severity of COVID-19 patients at diagnosis of the disease, being useful as a prognostic biomarker. If our findings are confirmed in other populations, it should be investigated whether the administration of AAT could be a therapeutic target.

Keywords: *COVID-19, SARS-COV2, SERPINA1, Alpha-1 Antitrypsin*

2. GLOSARIO DE ABREVIATURAS

SARS-CoV-2: Coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo
RNA: Ácido ribonucleico
DNA: Ácido desoxirribonucleico
ACE2: Enzima convertidora de angiotensina 2
IL-6: Interleucina 6
AAT: Alfa-1 Antitripsina
TNF- α : Factor de necrosis tumoral-alfa
OMS: Organización Mundial de la Salud
mRNA: Ácido ribonucleico mensajero
PCR: Proteína C reactiva
VSG: Velocidad de sedimentación globular
PCT: Procalcitonina
CK: Creatina quinasa
AST: Aspartato amino transferasa
CID: Coagulación intravascular diseminada
SDRA: Síndrome de distres respiratorio del adulto
UCI: Unidad de cuidados intensivos
APN: Amino peptidasa N humana
DPP4: Dipeptidil-peptidasa-4
DNTP: Desoxinucleótidos trifosfato
IL-1: Interleucina-1
IL-1 β : Interleucina-1-beta
IP-10: Proteína inducible 10
GM-CSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos-granulocitos
IFN- γ : Interferón-gamma
DM2: Diabetes Mellitus de tipo 2
ADMA: Dimetilarginina asimétrica
DATP: Desoxiadenosina trifosfato
DTTP: Desoxitimidina trifosfato
DGTP: Desoxiguanosina trifosfato
DCTP: Desoxicitosina trifosfato
DdATP: Didesoxiadenosina trifofato
DdTTP: Didesoxitimidina trifosfato
DdGTP: Didesoxiguanosina trifosfato
DdCTP: Didesoxicitosina trifosfato

3. INTRODUCCIÓN

3.1. ANTECEDENTES Y SITUACIÓN ACTUAL

En diciembre de 2019, se detectó un grupo de pacientes con neumonía de causa desconocida vinculado a un mercado mayorista de mariscos en Wuhan, China. Un desconocido betacoronavirus se descubrió mediante el uso de secuenciación imparcial en muestras de pacientes con neumonía. Se utilizaron células epiteliales de las vías respiratorias humanas para aislar un nuevo coronavirus, llamado 2019-nCoV (1,2).

Los doctores Fan Wu et. Al (3) abordaron el diagnóstico y la evolución de la enfermedad en el denominado “Paciente 0” a partir de su ingreso en el Hospital Central de Wuhan el 26 de diciembre de 2019 mientras experimentaba un grave síndrome respiratorio que incluía fiebre, mareos y tos. A partir de una muestra de líquido de lavado broncoalveolar del paciente se identificó una nueva cepa de virus de RNA de la familia Coronaviridae, que se denominó Coronavirus 'WH-Human 1' ('2019-nCoV'). El análisis filogenético del genoma viral completo (29.903 nucleótidos) reveló que el virus estaba más estrechamente relacionado (89,1% de similitud de nucleótidos) con un grupo de Coronavirus similares al SARS (género Betacoronavirus, subgénero Sarbecovirus) que habían previamente encontrado en murciélagos en China. Así como otros de la familia de los coronavirus, este virus causa diversas manifestaciones clínicas englobadas bajo el término COVID-19.

Desde el primer contagio la enfermedad se extendió rápidamente por la región de Wuhan, contabilizándose el 25 de enero de 2020 al menos 1.975 ingresos con patologías similares a las del Paciente 0 en el Hospital central de Wuhan (3). La Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró una emergencia de salud pública de importancia internacional debido a la rápida difusión del COVID-19 el 30 de enero de 2020 (4).

El 18 de febrero de 2020, el número de casos confirmados por el Ministerio de Salud Pública de la República de China alcanzó la cifra de 75.199 (5). La enfermedad siguió expandiéndose por prácticamente todos los países del mundo y finalmente, la OMS reconoció la enfermedad causada por el virus SARS-CoV-2 como una pandemia (4).

En pocos días el número de casos aumentó exponencialmente, lo que supuso un colapso y desbordamiento de los sistemas sanitarios. Por lo cual, los gobiernos de diferentes países, incluido España, se vieron obligados a tomar medidas urgentes para luchar contra la propagación del virus; imponiendo estrictas restricciones como el confinamiento o el autoaislamiento (6).

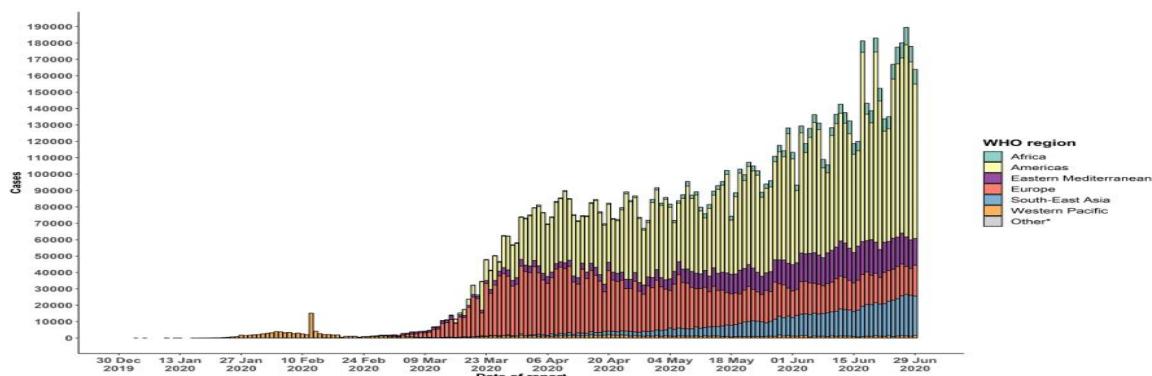


FIGURA 1. Número de casos confirmados de COVID-19, ordenados por fecha de informe y región de la OMS, desde el 30 de diciembre de 2019 a 30 de junio de 2020.

La enfermedad por coronavirus fue la causante de un alto número de muertes en los primeros meses de su aparición. Según cifras oficiales, la pandemia de COVID-19 ha causado 120.715 muertes y el número de personas que han sido casos confirmados de COVID-19 en España es de 13.825.052 (7).

El diagnóstico rápido fue importante para el aislamiento temprano, el rastreo de contactos, las medidas preventivas y control de infecciones. Aunque la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue y sigue siendo la prueba “patrón oro” para el diagnóstico, hubo que buscar otros medios diagnósticos, más baratos, rápidos y simples. Por este motivo se propuso un diagnóstico rápido a través de la detección de antígenos; prueba de gran utilidad, ya que puede detectar la presencia del SARS-CoV2 virus en muestras respiratorias en 20 min, e incluso sin necesidad de enviar muestras a laboratorio (8–10).

En la comunidad científica no hay un consenso acerca de la fisiopatología de esta enfermedad. En el momento actual el modelo fisiopatológico más aceptado es el que distingue 3 fases en función del tiempo de evolución de la enfermedad: fase 1 o de infección viral, fase 2 o de infección pulmonar y, fase 3 o de actividad inflamatoria. Pero aún después de prácticamente acabada la pandemia se sigue estudiando la patología del SARS-CoV-2, ya que el citado modelo deja sin responder cuestiones importantes de la evolución de la enfermedad.

Desde un punto de vista fisiopatológico se sabe que (11):

- El SARS-CoV-2 es un virus RNA.
- Interacciona con el receptor ACE2 para poder introducirse dentro de la célula a la que infecta.
- Produce una importante activación de reactantes de fase aguda como la Proteína C reactiva, la Ferritina y la IL-6.
- Ocasiona un grave estado protrombótico.

De lo anteriormente expuesto podemos deducir que una de las células diana íntimamente implicadas en este modelo es el macrófago, que se encuentra íntimamente relacionado no solo con la IL-6 sino con el metabolismo férrico (12,13).

En este sentido, la activación macrofágica a gran escala puede explicar que, aunque el órgano afectado fundamentalmente es el aparato respiratorio, la COVID-19 puede cursar con: hepatitis, miositis y miocarditis, debiéndose estas manifestaciones o bien al efecto agudo del virus o bien a la respuesta inmune que desencadenada. Se sabe que los macrófagos están involucrados en muchos procesos biológicos que incluyen la respuesta al estrés, inflamación, enfermedades cardíacas, autofagia, apoptosis, cáncer y enfermedades neurológicas (14).

Clínicamente, los pacientes presentan inicialmente fiebre, tos no productiva, odinofagia y mialgia. La disnea habitualmente no se convierte en una característica prominente hasta los días 7 a 14 de la enfermedad. Durante la segunda fase de la enfermedad, la disnea, la hipoxia y la fiebre continua se hacen habituales en los pacientes, y frecuentemente acompañadas de diarrea. En algún paciente, el estado respiratorio continúa deteriorándose y desarrollando neumonía grave con síndrome de distrés respiratorio, shock séptico y fallo multiorgánico, que a menudo requiere ventilación mecánica (15, 16).

A día de hoy, esta enfermedad convive en la sociedad de una forma más controlada, a pesar de que el manejo y tratamiento de estos pacientes continúa siendo todo un reto; pues

no existe un modelo fisiopatológico ni un buen biomarcador que prediga la evolución en los pacientes.

3.2. LA ALFA-1 ANTITRIPSINA Y EL GEN SERPINA1

La Alfa-1ntitripsina (AAT) es una glucoproteína de fase aguda, hidrosoluble y difusible en tejidos. Tiene un peso molecular de 52-kDa y una vida media en sangre de unos 5 días (17). En situación basal, el organismo produce 34 mg/ Kg/ día, actividad que se traduce por concentraciones plasmáticas de alrededor de 100-200 mg/dL (18); es la antiproteinasa más abundante en suero (19).

La AAT está codificada por el gen *SERPINA1*, que se encuentra en el cromosoma 14q32.1 y comprende cuatro exones de codificación (II–V), tres exones no traducidos (Ia–Ic) y seis intrones (20).

La molécula madura está constituida por una cadena central de 394 aminoácidos y tres cadenas laterales de carbohidratos ramificadas, unidas a la proteína en tres residuos de asparagina (Asn), en posiciones 46, 83 y 247. De su contorno globular sobresale el sitio o centro activo, constituido por metionina y serina en posición 358 y 359, respectivamente (Figura 2) (21). Los carbohidratos contribuyen significativamente a la prolongación de la vida media de la molécula, y confieren a la misma una marcada heterogeneidad electroforética (17).

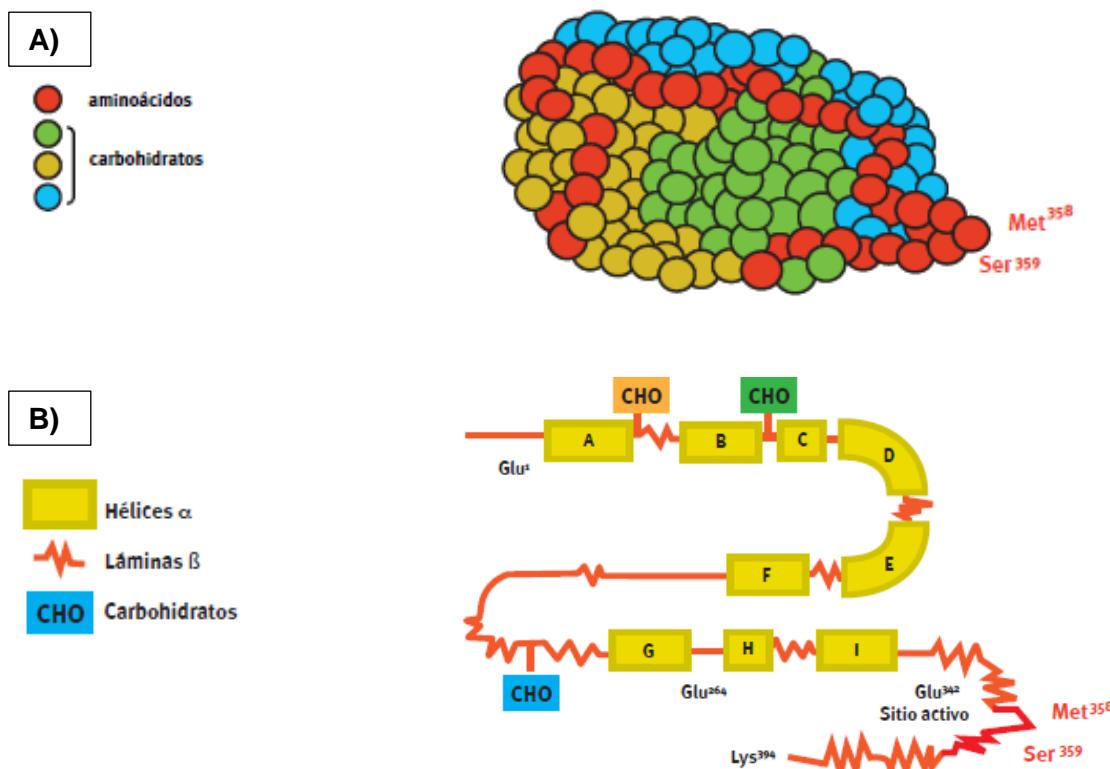


FIGURA 2. A) Representación de la superficial de AAT. B) Estructura secundaria.

La síntesis de la AAT se lleva a cabo fundamentalmente en los hepatocitos ($\approx 80\%$), y en cantidades adicionales por monocitos, macrófagos, células alfa y delta del páncreas, células

epiteliales alveolares tipo II del pulmón, enterocitos, queratinocitos de la córnea y células cancerosas de adenocarcinomas, sarcomas, glioblastomas y cordomas. En cualquier caso, el hepatocito expresa alrededor de 200 veces más ARNm de AAT que el resto de las células mencionadas (19,21–23).

Es una proteína multifactorial, con una importante propiedad inhibitoria de la serina proteasa en el suero humano. El sustrato específico de la AAT es la elastasa del neutrófilo (sinónimos: elastasa 2, ELA2), con la que reacciona con una constante de asociación de las más altas conocidas en fisiología. El mecanismo de acción de la AAT se basa en los aminoácidos metionina y serina, localizados en la zona móvil de la AAT; estos forman enlaces covalentes con la elastasa neutrofílica, inhibiéndola y facilitando su fagocitosis por los macrófagos, para su posterior degradación en el hepatocito (24–26).

El sitio principal de actividad de la AAT está en el pulmón, protegiendo el frágil tejido conectivo de la parte inferior del tracto respiratorio de la proteólisis descontrolada provocada por los neutrófilos durante la inflamación (27).

El gen de la AAT es activado fundamentalmente por productos generados en procesos inflamatorios. Los más conocidos son la endotoxina bacteriana o lipopolisacárido (LPS); el interferón- α ; las citoquinas IL-1, IL-6 y TNF- α ; y diversos productos finales del estrés nitrooxidativo denominados genéricamente AGEs (Advanced Glycation End products). También se conocen mecanismos de activación del gen que funcionan como autoreguladores del equilibrio proteasa-antiproteasa, como las serinproteinasas, los complejos AAT-elastasa y los fragmentos peptídicos cortos carboxi-terminales desprendidos de complejos AAT-elastasa tras ser hidrolizados. Además, la AAT tiene otras propiedades secundarias antinflamatorias, inmunomoduladoras, antimicrobianas y reparadoras de tejidos (27–29).

Al ser un reactante de fase aguda, en respuesta a estímulos inflamatorios o infecciosos se incrementan rápidamente sus niveles plasmáticos, entre 2-4 veces; acompañando a la proteína C reactiva (PCR) y al amiloide A, y este incremento se mantiene entre 7 y 15 días.

La concentración local de AAT en tejidos inflamados puede elevarse hasta 11 veces, por aumento de su síntesis por parte de las células residentes y por la aportación de los leucocitos emigrados desde la sangre al foco inflamatorio, en respuesta a citoquinas, leucotrienos o endotoxinas liberadas por gérmenes invasores o los propios tejidos inflamados (30).

3.3. IMPACTO DE LA ENFERMEDAD

La gravedad de la infección hace necesario tomar decisiones terapéuticas en un contexto de gran incertidumbre. Esto, unido a la gran fragilidad de muchos de los pacientes afectados por esta entidad hace necesario que la toma de decisiones se base en un adecuado balance beneficio/riesgo, que pasa por considerar de forma equilibrada no solo los beneficios deseados sino también los perjuicios posibles. Esto es todavía más importante cuando se debe tener en cuenta que no existe un modelo fisiopatológico ni un buen biomarcador que prediga qué sujetos evolucionan de modo favorable y cuáles no.

En la Infección por SARS-COV-2 está demostrada la hipoxia, la inflamación y la elevación de la PCR, la Ferritina y la IL-6 en los pacientes graves. Debido a la íntima relación del macrófago y neutrófilo con la PCR y el metabolismo férrico, que se encuentran altamente alterados en los pacientes graves afectados por COVID-19, deducimos que la activación neutrofílica contribuye a la fisiopatología de esta entidad (31). Por esta razón la actividad

de la Alfa-1 Antitripsina podría ser un excelente marcador del proceso inflamatorio tan grave que acontece (32).

Los biomarcadores son proteínas que surgen en determinadas enfermedades, y sus niveles plasmáticos ofrecen una visión de la carga total de la enfermedad, poseyendo valor diagnóstico, pronóstico y de la respuesta al tratamiento. Surge por lo tanto la necesidad de investigar si el gen *SERPINA1* y su expresión se encuentran alterados en esta grave entidad.

4. HIPOTESIS DE TRABAJO

El producto de la expresión del gen *SERPINA1*, la Alfa-1 Antitripsina, se correlaciona con la gravedad de los pacientes COVID-19 al diagnóstico de la enfermedad.

OBJETIVOS

- Objetivo principal: investigar la activación o represión del gen *SERPINA1* en los pacientes afectados por SARS-COV-2.
- Objetivos secundarios:
 - Determinar si el estudio de las concentraciones de AAT pueden ser útil como marcador pronóstico en pacientes graves afectados por SARS-COV-2.
 - Establecer si el fenotipo de los pacientes con SARS-COV-2 se correlaciona con las concentraciones de AAT detectadas.
 - Investigar si la normalización de AAT podría ser una diana terapéutica en la enfermedad por SARS-COV-2.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha llevado a cabo un estudio observacional, prospectivo, transversal, no intervencionista con carácter analítico.

5.1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

Como objeto de este estudio se seleccionaron 181 casos con SARS-COV-2 durante los meses de septiembre de 2020 a enero de 2021. Todos ellos perfectamente caracterizados desde el punto de vista clínico, procedentes de los Servicios de Medicina Interna y Urgencias del Hospital Clínico Universitario “Lozano Blesa” de Zaragoza (Aragón)(HCULBZ).

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Edad mayor a 18 años.
- Paciente con diagnóstico de infección por SARS-COV-2 en el momento de la extracción de sangre que será usada como material para el estudio.
- Confirmación diagnóstica de la infección por SARS-COV-2 mediante pruebas de reacción en cadena de la polimerasa y/o test de antígenos.
- Firma del consentimiento informado.
- Estar de acuerdo con la realización y la finalidad del estudio.
- No presentar ningún criterio de exclusión.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- Edad menor a 18 años.
- Paciente sin diagnóstico de infección por SARS-COV-2.
- Negativa a firmar el consentimiento informado.
- No estar de acuerdo con la realización y la finalidad del estudio.
- Estar en situación basal de salud en el momento de la extracción de sangre que será usada como material para el estudio genético.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación de Aragón (CEICA) (Anexo 1) y se desarrolló acorde a los principios de la Declaración de Helsinki.

Tras la firma del Consentimiento Informado se recopilaron una serie de parámetros clínicos y analíticos elaborando un documento Excel con los datos de cada paciente en el momento de ingreso hospitalario y en los días sucesivos, que fueron estudiados desde un punto de vista Bioquímico y Genético por el Laboratorio de Bioquímica del HCULBZ. Las variables recogidas fueron las siguientes:

- Edad, género, gravedad (Anexo 2) y número de días de estancia hospitalaria.
- Datos análisis bioquímico: ferritina, interleucina 6, linfocitos y proteína C reactiva al diagnóstico de la enfermedad o al ingreso hospitalario en su caso.
- Signos radiológicos: Score radiológico tórax: infiltrado pulmonar (Anexo 3).
- Ingreso en unidad de cuidados intensivos y exitus.
- Concentración sérica de Alfa-1 Antitripsina al diagnóstico de la enfermedad o al ingreso hospitalario en su caso.

Los datos obtenidos de los diferentes pacientes se analizaron de manera integrada en íntima colaboración con la responsable de estadística del Grupo de Investigación Básica en Medicina Interna del IIS de Aragón. Se compararon los patrones fenotípicos observados y se correlacionaron con los niveles de expresión del gen *SERPINA1*.

En este estudio hemos considerado pacientes con “COVID leve” a aquellos que acudieron al servicio de Urgencias, fueron diagnosticados y tratados y recibieron el alta a domicilio ese mismo día. Por otro lado, denominamos “COVID grave” a la enfermedad que padecieron aquellos pacientes que requirieron ingreso hospitalario. Dentro de los pacientes con COVID grave diferenciamos a aquellos que fueron ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos (COVID “crítico”) y los que permanecieron en la hospitalización convencional.

5.2. MATERIAL LABORATORIO

- Productos químicos:
 - Reactivos para AAT humana (BN ProSpec®)
 - Suero humano control (Sebia).
- Equipos básicos:
 - Centrifuga Centronic BL (JP Selecta).
 - Autoanalizador por inmunoensayo BN*II/ BN ProSpec® de Siemens ®.
 - Congelador -20°C / -80°C (Forma Scientific).
 - Nevera 4°C (Zanussi)
 - Gradillas para Eppendorf.
 - Pipetas graduables (Oxford).
- Material desechable:
 - Agujas IV calibre 21
 - Guantes no estériles
 - Cinta adhesiva.
 - Jeringuillas.
 - Papel secante.
 - Pipetas Pasteur.
 - Placas para PCR
 - Tubos para PCR
 - Tubos tapón amarillo

- Tubos tapón morado
- Tubos tapón azul

5.3. DETERMINACIÓN ALFA-1 ANTITRIPPSINA

La concentración de AAT en suero se determina mediante inmunonefelometría en sistemas la BN*II y BN ProSpec®.

Esta técnica se basa en la medición de la intensidad de la dispersión frontal que sufre la luz incidente en una cubeta de reacción, provocada por la presencia de inmunocomplejos antígeno-anticuerpo formados por reacción inmunoquímica entre un antígeno (alfa 1 antitripsina) contenido en la muestra y los anticuerpos específicos contra el mismo (reactivos anti-alfa 1 antitripsina).

La intensidad de la luz dispersada, medida en un ángulo entre 13 y 24º respecto de la luz incidente, es proporcional a la concentración de la proteína a determinar (alfa 1 antitripsina). El resultado se evalúa en comparación con un estándar de concentración conocida.

Método:

- Se prepara el antisuero de origen animal producido mediante la inmunización de conejos con alfa-1 antitripsina humana purificada siendo la concentración de anticuerpos activos de <2,4 g/L
- La muestra de suero debe estar conservada en nevera a entre 2 y 10 °C y haber sido extraída en menos de 7 días o bien estar congelada a temperatura inferior a -20°C pudiendo ser utilizada hasta un máximo de 3 meses tras su congelación.
- La muestra de suero se revisa para comprobar que no contenga fibrina tras la centrifugación.
- Se diluye la muestra en una proporción de 1:20 con el antisuero manteniendo una temperatura de entre 18 y 30 °C.
- La curva de referencia se genera por calibración multipunto. Las diluciones sucesivas de la muestra son preparadas automáticamente por el equipo BN-II.
- Las muestras diluidas han de ser analizadas en un plazo máximo de 4 horas.
- La reacción se efectúa en cubetas ópticas a las cuales se les leyó previamente la luz refractada por la cubeta vacía, este valor se resta al resultado de la lectura de la reacción.
- Se hace incidir la luz sobre la reacción cuando esta está incubada a la temperatura seleccionada y se realizan las lecturas nefelométricas.

•Separación del suero

- Se elige para la extracción un tubo con gel y sin anticoagulante.
- Después de la extracción se permite que la sangre se coagule durante 15-30 minutos a temperatura ambiente en posición vertical para evitar la formación de fibrina y sin agitar para prevenir la hemólisis.
- Se retira el tapón de cada tubo y usando una pipeta Pasteur larga se anilla el coágulo separándolo de los lados del tubo de ensayo y del líquido restante en el fondo.
- Se transfiere ese líquido desecharando el coágulo a un tubo para la centrifugación.
- Se centrifugan los tubos con un margen de tiempo de hasta 24 horas tras la extracción haciéndolo preferentemente en las 2 primeras horas para evitar el intercambio de compuestos entre las células y el suero y por lo tanto su deterioro.
- Se centrifuga a 3000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente reduciendo la contaminación por plaquetas.

- Se recoge el suero que corresponde a la parte superior del tubo centrifugado sin coger coágulo ni gel con una pipeta Pasteur transfiriéndolo a tubos de almacenamiento conservándolos en nevera a una temperatura de entre 2 y 10 °C.

5.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el paquete estadístico SPSS-PC 29.0. En primer lugar, se realizó un estudio descriptivo obteniendo media, mediana, desviación estándar, y rango en cuanto a las variables cuantitativas, y frecuencias, en el caso de las variables cualitativas.

Posteriormente se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar si las variables cuantitativas se ajustaban a la normalidad. En las variables cualitativas el contraste de hipótesis se realizó mediante el test de chi-cuadrado o test de Fisher, en función del número de categorías de las variables.

En cuanto a la comparación entre variables cuantitativas y cualitativas, dado de ninguna de las variables cuantitativas se ajustaba a la normalidad, se realizó el estudio mediante las pruebas no paramétricas U de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis. En el último caso, los valores de significación se han ajustado por la corrección de Bonferroni para test múltiples.

Por último, el análisis de las correlaciones entre las variables cuantitativas se realizó mediante el coeficiente de correlación de Spearman, por su ausencia de ajuste a la distribución normal.

Se consideró que existía una relación estadísticamente significativa con un valor de $p<0.05$.

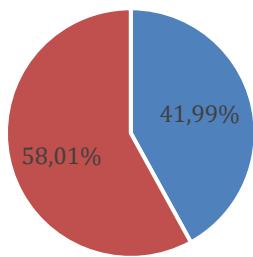
6. RESULTADOS

6.1. ESTUDIO ESTADÍSTICO DESCRIPTIVO

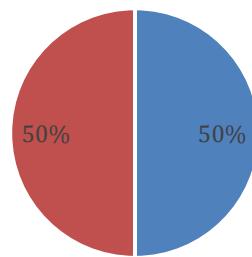
El estudio se ha basado en datos de 181 pacientes que fueron seleccionados en base a los criterios anteriormente descritos, de los cuales 141 casos correspondían a pacientes con COVID grave y 40 pacientes con COVID leve.

Tras la clasificación de los pacientes en función de su gravedad, previamente explicada en el apartado de Material y Métodos, se observó que de los casos con COVID leve el 50% fueron hombres y 50% mujeres. El COVID grave tuvo una mayor prevalencia en hombres suponiendo un 60'28% del total de casos analizados. De los pacientes ingresados un 41'13% requirieron atención en la UCI, de los cuales el 67'24% fueron hombres y 32'76% mujeres.

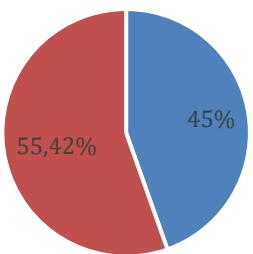
La media de las concentraciones séricas de AAT fue de 286'31 mg/dL (291'37mg/dL en varones y 297'99 mg/dL en mujeres). Los pacientes con ingreso en planta convencional tuvieron unas concentraciones medias de 270'76 mg/dL y los que ingresaron en UCI 359'92 mg/dL.



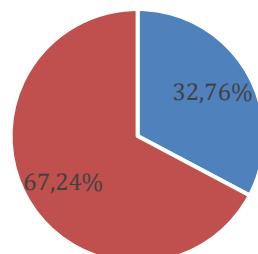
(a) Distribución total de la muestra



(b) Distribución de los pacientes leves



(c) Distribución de los pacientes graves



(d) Distribución de los pacientes críticos

FIGURA 3. Distribución de los pacientes en función del sexo.

	MUJER	HOMBRE	TOTAL
LEVE	20	20	40
GRAVE	37	46	83
	19	39	58
TOTAL	76	105	181

TABLA 1. Distribución de los pacientes según sexo en función de la gravedad.

Una de las variables importantes que hemos querido reflejar ha sido la mortalidad en los pacientes con COVID grave, observando que un 26'42% fallecieron; siendo hombres el 64'86% y mujeres el 35'14%.

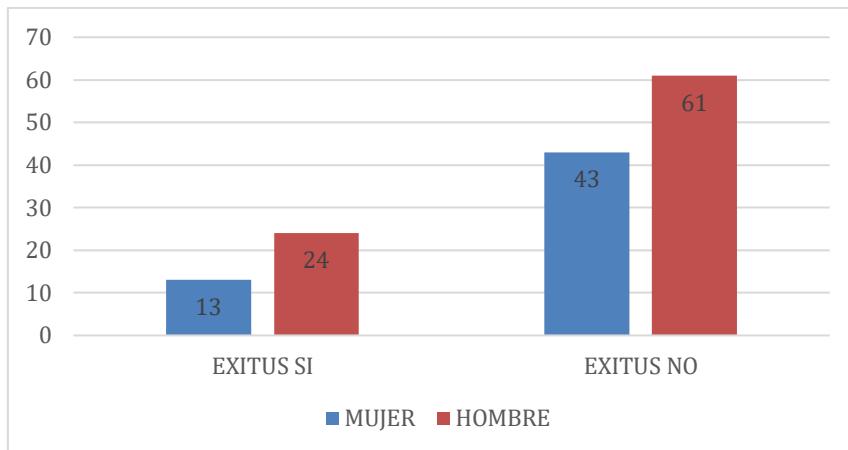


FIGURA 4. Distribución según la mortalidad y el sexo de los pacientes con enfermedad COVID grave.

6.2. ESTUDIO ESTADISTICO DE LAS VARIABLES CUANTITATIVAS

Tras la realización del análisis de regresión lineal entre las distintas variables cuantitativas, solamente se encontró una correlación moderada ($r=0.49$, $p<0.05$) entre las concentraciones de AAT al ingreso y los días de estancia, siendo el resto de correlaciones débiles o muy débiles ($p<0.05$)

Posteriormente se llevó a cabo el análisis mediante el test Chi-cuadrado de la relación entre las variables cualitativas, siendo estadísticamente significativa ($p<0.05$) la correlación entre la gravedad del paciente (haciendo relación al paciente que precisa ingreso hospitalario), el ingreso en UCI (siendo por definición el paciente “muy grave”) y el posible fallecimiento del paciente. Ninguna de estas variables tuvo relación con el sexo del paciente.

A continuación, se analizó la correlación entre los distintos biomarcadores y la gravedad de cada paciente, el sexo, y el riesgo de ingreso en UCI o de fallecer. Se encontraron relaciones estadísticamente significativas entre las concentraciones al ingreso hospitalario de AAT con el número de linfocitos (en este caso la correlación fue negativa), los valores de Proteína C Reactiva y ferritina, y la gravedad, ingreso en UCI, o fallecimiento del paciente. La IL-6 no tuvo correlación con ninguna de las anteriores variables cualitativas comentadas.

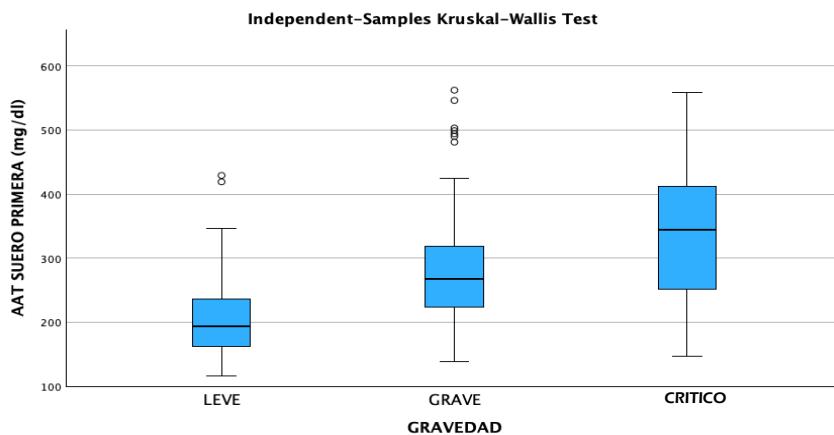


FIGURA 5. Representación gráfica de la relación entre AAT y la gravedad.

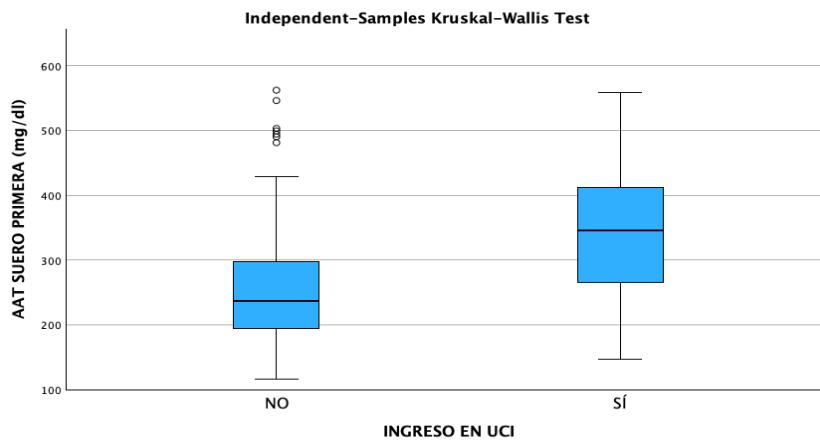


FIGURA 6. Representación gráfica de la relación entre AAT y el riesgo de ingreso en UCI.

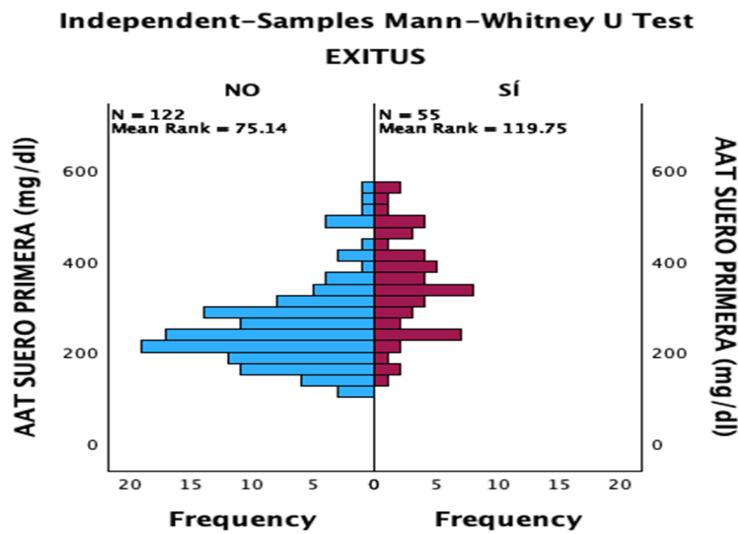


FIGURA 7. Representación gráfica de la relación entre AAT y el riesgo de exitus.

En ninguno de los análisis realizados se encontró correlación entre las variables analizadas y el sexo de cada paciente.

Tampoco se encontró una correlación clara de los biomarcadores con el score radiológico.

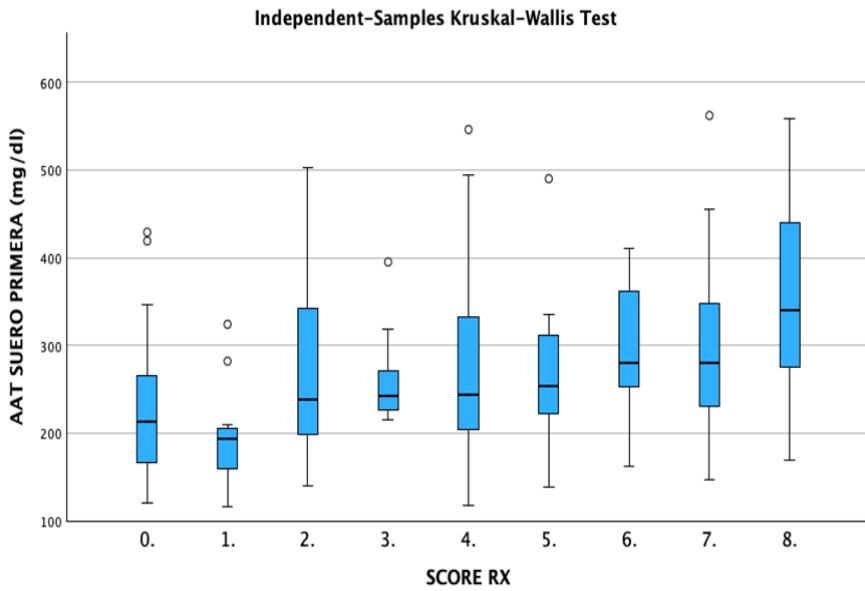


FIGURA 8. Representación gráfica de la relación entre AAT y el Score radiológico.

Posteriormente se realizó un análisis de la AAT mediante curva ROC como prueba pronóstica al ingreso hospitalario en relación con la gravedad del paciente, el riesgo de ingreso en UCI y el riesgo de fallecer obteniendo los siguientes resultados en forma de gráficas y de punto de corte para cada uno de los eventos o gravedad.

- De esta manera el área bajo la curva relacionando la concentración de AAT al ingreso con la gravedad del paciente fue de 0.806 (IC 95% 0.73-0.88), obteniendo un punto de corte para la AAT en lo concerniente al concepto “paciente grave” de 237.5 mg/dl, con una S del 71.9% y una E del 78%.

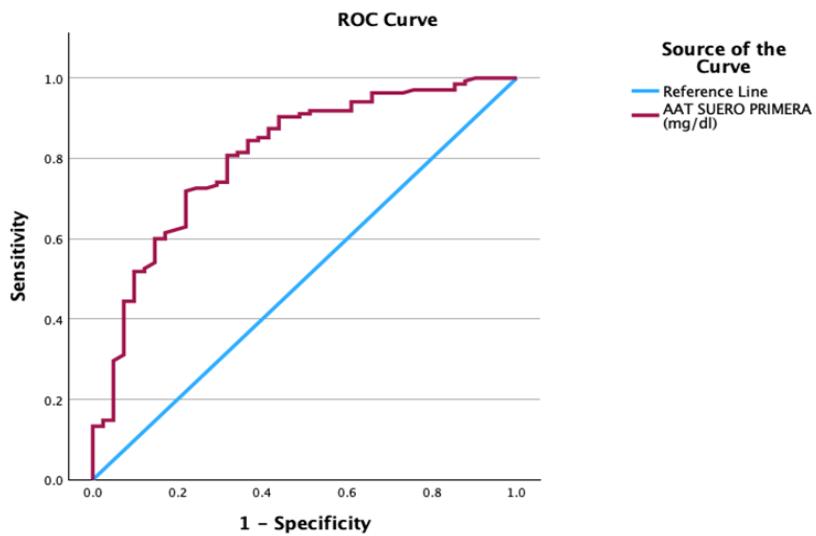


FIGURA 9. Gráfica curva de ROC relacionando nivel de AAT y gravedad del paciente.

- En lo concerniente a la curva ROC obtenida relacionando la actividad de AAT al ingreso hospitalario y riesgo de admisión en UCI o exitus, el área bajo la curva fue de 0.75 (IC 95% 0.67-0.83), obteniendo un punto de corte para la AAT de 311.5 mg/dl, con una S del 67.3% y una E del 78.7%.

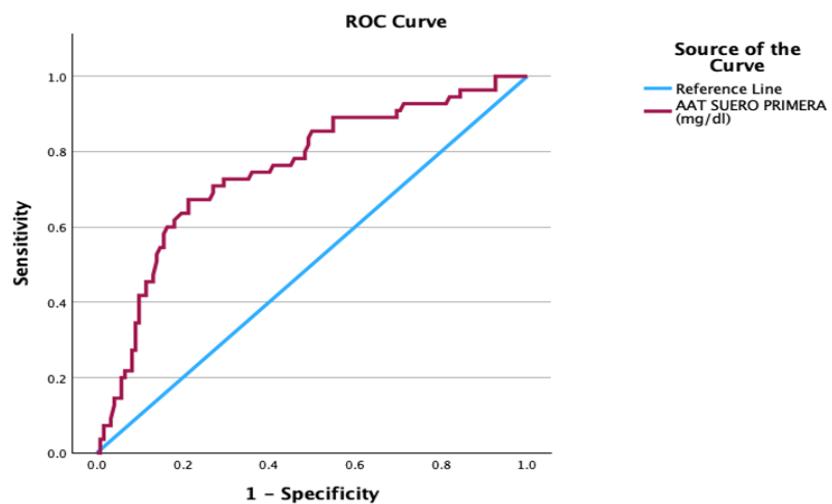


FIGURA 10. Gráfica curva de ROC relacionando nivel de AAT y riesgo de ingreso en UCI.

7. DISCUSIÓN

7.1. APPLICABILIDAD DE LA METODOLOGÍA USADA

Se presenta aquí un exhaustivo trabajo de búsqueda de otros aspectos fisiopatológicos presentes en los pacientes con COVID-19 y que no han sido prácticamente estudiados hasta la fecha, al menos en la población española y en fase aguda de la enfermedad. Nuestro estudio ha concluido con la identificación de un gen cuya expresión está íntimamente implicada en la fisiopatología de la disfunción orgánica que acontece en este síndrome. El estudio de la expresión del gen *SERPINA1* en nuestra cohorte ha aportado gran cantidad de información que no han generado otras moléculas como la IL-6, la cual es una de las más estudiadas en esta entidad (33).

En lo concerniente a nuestra estrategia, creemos que ésta es la más lógica y efectiva, si bien queda mucho por realizar ya que el tamaño de la muestra es relativamente pequeño y se debería llevar a cabo un estudio con una población mucho más amplia que además determinara la correlación de los hallazgos clínicos con la evolución de las concentraciones de la AAT, así como la posible fibrosis pulmonar o el daño tisular (o la ausencia del mismo) existente de modo residual en algunos pacientes que fueron infectados por el SARS-COV2 y desarrollaron COVID-19.

El gen *SERPINA1* se encuentra muy activado en este síndrome y el estudio del producto de su expresión es sencillo, rápido, barato y probablemente se demostrará muy eficaz, - además de reproducible- en cualquier laboratorio de cualquier centro hospitalario, especialmente al pie de la cama del paciente ingresado en la Unidad de Cuidados Intensivos.

7.2. UTILIDAD DE LA DETERMINACIÓN DE AAT EN LA COVID-19 GRAVE

En COVID-19, las enfermedades subyacentes y los trastornos físicos y mentales, como las enfermedades cardiovasculares, hipertensión, diabetes, enfermedad pulmonar crónica, enfermedad renal crónica, el cáncer y la obesidad, así como factores como el envejecimiento y el tabaquismo, han sido reportados como factores de riesgo de agravamiento. Tanto los factores genéticos como los ambientales pueden estar involucrados en la etiología de muchas de estas comorbilidades (34). Las predisposiciones genéticas descritas en genes como el *ACE1* o en el gen *SERPINA1* pueden estar relacionados con estas comorbilidades y curiosamente, los polimorfismos en estos genes muestran frecuencias que difieren significativamente entre occidentales y asiáticos orientales (35). Por otro lado, los mecanismos patogénicos de las mencionadas comorbilidades están estrechamente relacionados con la inflamación crónica y la COVID-19 grave se caracteriza por una respuesta inflamatoria excesiva. En este sentido, algunas variantes genéticas, como aquellas que pueden acontecer en el gen *SERPINA1*, pueden contribuir a las disparidades geográficas encontradas en lo concerniente a la gravedad y mortalidad de la infección por el virus SARS-COV2.

Por todo ello, queremos destacar que los resultados obtenidos en nuestro medio proporcionan datos muy importantes para el conocimiento de la biopatología de la COVID-19 y constituyen la base para el desarrollo de próximas líneas de investigación. Por este motivo, de confirmarse nuestros resultados en otras poblaciones se establecerán las bases para conocer los puntos de corte a partir de los cuales podemos afirmar que un paciente tiene una infección grave o muy grave, o inclusive si padece alto riesgo de fallecer. No cabe duda que esto condicionaría un manejo mucho más fácil y estricto del paciente con ingreso hospitalario que probablemente redunde en una reducción de la mortalidad y la optimización de los recursos. Es decir, habremos encontrado en el estudio de la concentración de AAT un excelente biomarcador.

A día de hoy pocos trabajos (36) se han llevado a cabo en la población COVID-19 que comprometan al gen *SERPINA1*, pero éstos han implicado a la AAT en 1) la inhibición de

la IL-1B (que induce daño pulmonar mediante el estímulo de la producción de IL-6 y TNF- α), 2) antagoniza las complicaciones trombóticas condicionadas por el aumento de la trombina y plasmina, 3) inhibe las concentraciones de IL-6, 4) inhibe la IL-8 (íntimamente relacionada con la activación neutrofílica y el daño pulmonar agudo, 5) inactiva la proteasa trasmembrana serina 2 de los receptores de la célula huésped (TMPRSS2), 6) limita la captación de partícula vírica de SARS-COV2, 7) favorece la diferenciación de los linfocitos T y los macrófagos activados M2, 8) protege de la activación de la vía de las caspasas 3 (y por lo tanto del estrés oxidativo), 9) suprime la producción de TGF-B (íntimamente relacionado con la fibrosis irreversible) y 10) reduce la producción de radicales superóxido liberado por los neutrófilos activados, así como la migración neutrofílica. Es por ello que nuestros resultados son realmente relevantes ya que implican a la AAT con la gravedad y el fenotipo de los pacientes, de tal forma que a mayor AAT peor pronóstico y mayor probabilidad de ingreso en UCI o morir.

7.3. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

En este trabajo fin de grado nos hemos centrado en responder a la hipótesis nula y hemos sido contundentes en esto y en cumplir los objetivos marcados. Sin embargo, metodológicamente hemos de mencionar que existen limitaciones. Por ejemplo, desde un punto de vista de la biología molecular no hemos estudiado el genotipo del gen *SERPINA1*. El otro aspecto a tener en cuenta es que no se han clasificado los pacientes según determinados factores de riesgo en el COVID-19 que pueden influir en la gravedad o incluso en la mortalidad como son la presencia de obesidad, el tabaquismo, la presencia de diabetes mellitus, la presencia de una enfermedad autoinmune o la toma previa de determinados fármacos como los corticoides o los inmunosupresores. Estos factores influyen no sólo en la fase aguda de la enfermedad si no en la situación funcional respiratoria y calidad de vida residuales una vez superada la fase aguda (37).

Por otro lado, y dado que las concentraciones de IL-6 no correlacionaron con ninguna de las variables estudiadas al ingreso hospitalario, tampoco hemos tenido en cuenta el ratio AAT/IL-6, cuyo valor incrementado protege a los pacientes COVID-19 del desarrollo de enfermedad grave y de trombosis tal y como se demostró en el estudio publicado por Philippe A y cols (38). Comparando este trabajo francés con el nuestro encontramos diferencias significativas en los puntos de corte para pacientes graves (157 mg/dL) y pacientes críticos (230 mg/dL), siendo nuestros valores sensiblemente más elevados 237,5 y 311,5 mg/dL respectivamente.

Otra limitación que debemos mencionar es la ausencia de determinaciones seriadas de AAT en plasma, cuyos resultados no presentamos en este trabajo y que están siendo estudiadas en otro proyecto mucho más amplio cuyas conclusiones serán publicadas próximamente.

7.4. CONSIDERACIONES FINALES

De la ingente cantidad de trabajos publicados desde el inicio de la pandemia COVID-19 hemos de destacar que muy pocos se diseñaron para analizar la correlación del genotipo y el fenotipo, pero si bien estos trabajos no han logrado explicar el 100% del fenotipo final, sí han permitido que se mejore en el conocimiento de algunos aspectos fisiopatológicos de esta entidad e incluso se avance en el diagnóstico o pronóstico de la misma. Está claro que en esta enfermedad existen factores modificadores que vienen establecidos por el medio ambiente, por los diferentes umbrales de expresión de la proteína AAT, por las variantes mutantes del virus SARS-COV2 o por el genotipo de otros genes reguladores.

Cobra por ello importancia cualquier artículo original, ya que la comunidad científica debe felicitarse de que se siga trabajando en un problema todavía no resuelto como es el estudio de la correlación entre el genotipo y las alteraciones bioquímicas de nuestros pacientes. Desafortunadamente, el estudio del gen *SERPINA1* en la COVID.19 no resuelve el problema de la correlación genotipo/fenotipo. Sin embargo, sí que permite acotar más la expresión genotípica y fenotípica y, probablemente, permita seleccionar al conjunto de pacientes que teniendo fenotipos "graves, críticos o imprevistos" deban ser minuciosamente evaluados con las implicaciones desde el punto de vista asistencial que esto conlleva. Por último, hemos de mencionar que, a partir de nuestro estudio, y en apoyo a la bibliografía aquí consultada y comentada, cabe la posibilidad de encontrarnos ante una futura diana terapéutica en los pacientes con COVID-19 grave o crítico: la administración exógena de AAT (39, 40).

8. CONCLUSIONES

1. En la infección por SARS-COV-2, el gen *SERPINA1* se muestra hiperactivado en el desarrollo de la COVID-19 grave.
2. El estudio de la concentración de AAT se ha mostrado útil como biomarcador pronóstico en pacientes graves afectados por SARS-COV-2.
3. El fenotipo de los pacientes con SARS-COV-2 se correlaciona con las concentraciones de AAT detectadas.
4. Deberían llevarse a cabo ensayos que planteen la normalización de AAT como diana terapéutica en la enfermedad grave y crítica por SARS-COV-2.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*. 2020; 382(8): 727-33.
2. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*. 2020; 395 (10224): 565-74.
3. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020; 579 (7798): 265-9.
4. Organización Mundial de la Salud [Internet]. [citado 8 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/es>
5. Deng SQ, Peng HJ. Characteristics of and public health responses to the coronavirus disease 2019 outbreak in China. *Journal of Clinical Medicine*. 2020; 9(2): 575.
6. Ren X, Huang W, Pan H, Huang T, Wang X, and Ma Y. Mental Health During the Covid-19 Outbreak in China: a Meta-Analysis. *Psychiatr Q*. 2020; 91(4): 1033-45.
7. Ministerio de Sanidad - Profesionales - Situación actual Coronavirus [Internet]. [citado 8 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://www.sanidad.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/situacionActual.htm>
8. Lippi G, and Plebani M. The critical role of laboratory medicine during coronavirus disease 2019 (COVID-19) and other viral outbreaks. *Clin Chem Lab Med*. 2020; 58 (7): 1063-9.
9. Lai CC, Wang CY, Ko WC, and Hsueh PR. In vitro diagnostics of coronavirus disease 2019: Technologies and application. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2021; 54(2): 164-74.
10. Yüce M, Filiztekin E, and Özkaya KG. COVID-19 diagnosis - A review of current methods. *Biosens Bioelectron*. 2021; 172: 112752.
11. Sanders JM, Monogue ML, Jodlowski TZ, and Cutrell JB. Pharmacologic Treatments for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. *JAMA* 2020; 323 (18): 1824-36.
12. Mallappa S, Khatri A, BN G, and Kulkarni P. A Retrospective Analysis of the Importance of Biochemical and Hematological Parameters for Mortality Prediction in COVID-19 Cases. *Cureus*. 2022; 14 (10): e30129.
13. Weiss SR, and Leibowitz JL. Coronavirus pathogenesis. *Adv Virus Res*. 2011; 81: 85-164.
14. Zheng YY, Ma YT, Zhang JY, and Xie X. COVID-19 and the cardiovascular system. *Nat Rev Cardiol*. 2020; 17(5): 259-60.
15. Coperchini F, Chiovato L, Croce L, Magri F, and Rotondi M. The cytokine storm in COVID-19: An overview of the involvement of the chemokine/chemokine-receptor system. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2020; 53: 25-32.

16. Desai AD, Lavelle M, Boursiquot BC, and Wan EY. Long-term complications of COVID-19. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2022; 322(1): 1-11.
17. Kueppers F, and Christopherson MJ. Alpha1-antitrypsin: further genetic heterogeneity revealed by isoelectric focusing. *Am J Hum Genet.* 1978; 30(4): 359-65.
18. Sinden NJ, Koura F, and Stockley RA. The significance of the F variant of alpha-1-antitrypsin and unique case report of a PiFF homozygote. *BMC Pulm Med.* 2014; 14: 132
19. Teckman JH, and Mangalat N. Alpha-1 antitrypsin and liver disease: mechanisms of injury and novel interventions. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2015; 9(2): 261-8.
20. Carrell RW, Lomas DA, Sidhar S, and Foreman R. Alpha 1-antitrypsin deficiency. A conformational disease. *Chest.* 1996; 110(6): 243-7.
21. Lomas DA, and Mahadeva R. Alpha1-antitrypsin polymerization and the serpinopathies: pathobiology and prospects for therapy. *J Clin Invest.* 2002; 110 (11): 1585-90.
22. Lee JH, and Brantly M. Molecular mechanisms of alpha1-antitrypsin null alleles. *Respir Med* 2000; 94: 7-11.
23. Ogushi F, Fells GA, Hubbard RC, Straus SD, and Crystal RG. Z-type alpha 1-antitrypsin is less competent than M1-type alpha 1-antitrypsin as an inhibitor of neutrophil elastase. *J Clin Invest.* 1987; 80(5):1366-74.
24. Pini L, Tiberio L, Venkatesan N, Bezzi M, Corda L, Luisetti M, et al. The role of bronchial epithelial cells in the pathogenesis of COPD in Z-alpha-1 antitrypsin deficiency. *Respir Res.* 2014;15(1): 112.
25. Bergin DA, Reeves EP, Hurley K, Wolfe R, Jameel R, Fitzgerald S, et al. The circulating proteinase inhibitor α -1 antitrypsin regulates neutrophil degranulation and autoimmunity. *Sci Transl Med.* 2014; 6(217).
26. Baraldo S, Turato G, Lunardi F, Bazzan E, Schiavon M, Ferrarotti I, et al. Immune activation in α 1-antitrypsin-deficiency emphysema. Beyond the protease-antiprotease paradigm. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015; 191(4): 402-9.
27. Jonigk D, Al-Omari M, Maegel L, Müller M, Izykowski N, Hong J, et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory properties of α 1-antitrypsin without inhibition of elastase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 ;110(37): 15007-12.
28. Strnad P, McElvaney NG, and Lomas DA. Alpha1-Antitrypsin Deficiency. *N Engl J Med.* 2020; 382(15): 1443-55.
29. Kalsheker NA, and Morgan K. Regulation of the alpha 1-antitrypsin gene and a disease-associated mutation in a related enhancer sequence. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994; 150 (6): 183-9.
30. Salahuddin P. Genetic variants of alpha1-antitrypsin. *Curr Protein Pept Sci.* 2010; 11(2):101-17.
31. Wong CK, Lam CWK, Wu AKL, Ip WK, Lee NLS, Chan IHS, et al. Plasma inflammatory cytokines and chemokines in severe acute respiratory syndrome. *Clin Exp Immunol.* 2004; 136(1): 95-103.

32. Lascano J, Oshins R, Eagan C, Wadood Z, Qiang X, Flagg T, et al. Correlation of alpha-1 antitrypsin levels and exosome associated neutrophil elastase endothelial injury in subjects with SARS-CoV2 infection. *PLoS One*. 2022; 17.
33. Chen LY, Hoiland RL, Stukas S, Wellington CL, and Sekhon MS. Confronting the controversy: interleukin-6 and the COVID-19 cytokine storm syndrome. *Eur Respiratory Soc*. 2020; 56: 2003006.
34. Yamamoto N, and Bauer G. Apparent difference in fatalities between Central Europe and East Asia due to SARS-COV-2 and COVID-19: Four hypotheses for possible explanation. *Med. Hypotheses* 2020; 144: 110160.
35. Yoshikura, H. Epidemiological correlation between COVID-19 epidemic and prevalence of alpha-1 antitrypsin deficiency in the world. *Glob. Health Med.* 2021; 3: 73–81.
36. Marzouk S, Attia N, and Mashal M. Insights into the potential role of alpha1-antitrypsin in COVID-19 patients: Mechanisms, current update, and future perspectives. *Clin Respir J*. 2021; 15: 1019–24.
37. Jiménez-Rodríguez BM, Triviño-Ibáñez EM, Gutiérrez-Fernández J, Romero-Ortiz AD, Ramos-Urbina EM, and Morado-García C. Abnormal Alpha-1 Antitrypsin levels and other risk factors associated with lung function impairment at 6 and 12 months after hospitalization due to COVID-19: A Cohort Study. *Healthcare* 2022; 10: 2341.
38. Philippe A, Puel M, Narjoz C, Gendron N, Durey-Dragon MA, Vedie B, et al. Imbalance between alpha-1-antitrypsin and interleukin 6 is associated with in-hospital mortality and thrombosis during COVID-19. *Biochimie*. 2022; 202: 206-11.
39. Martini F, De Mattei M, Contini C, and Tognon MG. Potential Use of Alpha-1 Anti-trypsin in the Covid-19 Treatment. *Front Cell Dev Biol*. 2020; 8: 577528.
40. Bai X, Hippensteel J, Leavitt A, Maloney JP, Beckham D, Garcia C, et al. Hypothesis: Alpha-1-antitrypsin is a promising treatment option for COVID-19. *Med Hypotheses*. 2021; 146: 110394.

10. ANEXOS

Anexo 1: CERTIFICADO de APROBACIÓN por el Comité de Ética e Investigación de Aragón.

Informe Dictamen Favorable



C.P. - C.I. PI20/219
13 de mayo de 2020

Dña. María González Hinjos, Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

CERTIFICA

1º. Que el CEIC Aragón (CEICA) en su reunión del día 13/05/2020, Acta N° 11/2020 ha evaluado la propuesta del investigador referida al estudio:

Título: Análisis de las Quitinasas y Hepcidina Plasmáticas en el SARS-COV-2: estudio de nuevos biomarcadores

Investigador Principal: Miguel Ángel Torralba Cabeza, HCU Lozano Blesa

Versión protocolo: v1, 20/04/2020

Versión documento de información y consentimiento: v3, 14/05/2020

2º. Considera que

- El proyecto se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Es adecuada la utilización de los datos y ha obtenido los permisos necesarios para su uso.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad de los Investigadores y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

3º. Por lo que este CEIC emite **DICTAMEN FAVORABLE** a la realización del estudio.

Lo que firmo en Zaragoza

GONZALEZ Firmado digitalmente
HINJOS por GONZALEZ
MARIA - DNI HINJOS MARIA - DNI
03857456B 03857456B
03857456B Fecha: 2020.05.15
11:48:55 +0200

María González Hinjos
Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

COMPROMISO DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL.

Don/Doña MIGUEL ÁNGEL TORRALBA CABEZA, con NIF 25152930:
Del Servicio de MEDICINA INTERNA _____
Del Centro HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO LOZANO BLESÁ _____

Don/Doña SEBASTIÁN MENAO GUILLÉN, con NIF 25175304X:
Del Servicio de BIOQUÍMICA _____
Del Centro HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO LOZANO BLESÁ _____

CERTIFICA

Que conoce y acepta participar como Investigador Principal en el estudio de investigación titulado ----

Análisis de las Quininas y Hepcidina Plasmáticas en el SARS-CoV-2: estudio de nuevos biomarcadores.

Código de proyecto (si lo tiene): -----

Que se compromete a que cada sujeto sea tratado y controlado siguiendo lo establecido en el protocolo evaluado por el Comité de Ética de la Investigación de la Comunidad de Aragón y autorizado por la autoridad competente (si procede).

Que respetará las normas éticas y legales aplicables a este tipo de estudios.

Que garantizará la confidencialidad de los datos recogidos, cumpliendo con la LO 3/2018 de protección de datos de carácter personal.

Que informará anualmente al CEICA de la marcha del estudio, así como si se introducen modificaciones en el protocolo o se interrumpe.

Que, una vez terminado el estudio, aportará copia de informe final y de las publicaciones derivadas.

Que dicho estudio se realizará contando con la participación de los siguientes investigadores colaboradores:

Nombre y apellidos	NIF	Firma
SUSANA OLIVERA GONZALEZ	25458942D	
ANA MARÍA CAMÓN LAHUERTA	18057971G	
JOSE LUIS SIERRA MONZÓN	29127661K	
INMACULADA MORENO GAZQUEZ	48899682Z	
MÓNICA RAMOS ALVAREZ	12362563P	
MARÍA ÁNGEL JULIAN ANSON	17716885W	
ISABEL GUTIÉRREZ CIA	29102047D	

Siendo aceptada por el Jefe de Servicio/ Director de Atención Primaria del Sector.

Nombre y Apellidos JESÚS CEBOLLADA DEL HOYO Firma

ZARAGOZA, a 21 de ABRIL de 2020

El investigador principal,

POR FAVOR, RELLENE EL NOMBRE Y APELLIDOS CON LETRA LEGIBLE

Los datos de carácter personal que pudieran constar en esta comunicación serán incorporados al sistema de tratamiento dN que es responsable el Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS). Los datos serán tratados para la gestión y seguimiento de los estudios evaluados por el CEICA. Los datos serán suprimidos cuando se haga dado respuesta a la gestión y/o tramitación de la solicitud y no sean útiles para sus necesidades. Tiene derecho a acceder, rectificar y suprimir los datos, así como los demás derechos que le otorga la normativa de protección de datos ante el IACS, con domicilio en el Centro de Investigación Biomédica de Aragón, Aula, San Juan Bosco, nº 13, 500009 Zaragoza o solicitándolo a través del mail proteccióndedatos.iacs@aragon.es.

Anexo 2: Criterios de gravedad según la correlación clínica y hallazgos patológicos en las pruebas de imagen.

LEVE	Síntomas leves Sin alteraciones en Rx
COMÚN	Fiebre o signos de infección respiratoria Con cambios de sospecha RX
GRAVE	Cumple algunos de los siguientes criterios: -Distres respiratorio, frecuencia respiratoria $\geq 30/\text{min}$ -Saturación de oxígeno en dedo $\leq 93\%$ en reposo -PaO ₂ /FiO ₂ $\leq 300\text{mmHg}$
CRÍTICO	Cumple al menos uno de los siguientes criterios: -Fallo respiratorio, que precisa de ventilación mecánica -Shock -Fallo multiorgánico

Anexo 3: Score real. Determinación por puntaje asignado 1 punto por cada 25% de cada pulmón.

