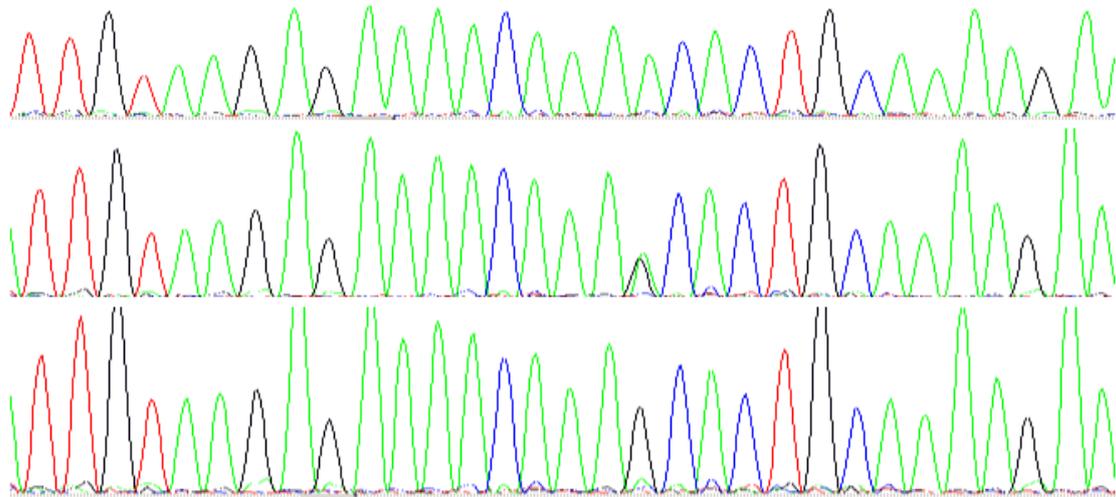


TRABAJO FIN DE GRADO

BIOTECNOLOGÍA

**Genética de la inmunidad innata en la infección
por SARS-CoV-2 y en la COVID-19:**

**el gen *MDA5/IFIH1* como factor de riesgo para enfermedad
severa**



María Gertrudis Muñiz Banciella

**Laboratorio de Genética Molecular – Hospital Universitario Central
de Asturias (HUCA)**

Mayo 2022



**UNIVERSIDAD DE OVIEDO
FACULTAD DE BIOLOGÍA**



Resumen

La inmunidad innata está implicada en la susceptibilidad a la infección por SARS-CoV-2 y en la progresión de la COVID-19 hacia una forma leve de la enfermedad o hacia una neumonía severa. El sensor de ARN MDA5 es un componente de esta inmunidad, importante en la respuesta frente a infecciones virales. El gen que codifica al MDA5 (*IFIH1*) es polimórfico y algunas variables se han asociado a la respuesta antiviral. En concreto, el polimorfismo rs1990760 de este gen podría estar asociado al riesgo de desarrollar una forma severa de la COVID-19. En este trabajo, se analizaron 478 pacientes de Asturias que habían sido ingresados en la UCI del HUCA por neumonía bilateral severa debida al SARS-CoV-2. Las variables demográficas, clínicas y analíticas se obtuvieron de las historias. Tras obtener el ADN de los pacientes, se genotipó el polimorfismo rs1990760 C/T mediante PCR en tiempo real con sonda TaqMan. Todas las variables se recogieron en una base Excel y las diferencias entre grupos se analizaron estadísticamente con el software R. La mortalidad por COVID-19 se relacionó con una edad avanzada ($p < 10^{-9}$) y con niveles elevados de IL-6 ($p = 0,009$). El polimorfismo rs1990760 no se asoció significativamente al riesgo de fallecimiento. Los pacientes portadores del alelo C (CC+CT) tenían una edad media dos años menor que los TT (64 vs. 66 años) y los genotipos CC y CT eran significativamente más frecuentes en los menores de 65 años (52,9% vs. 40,6%; $p = 0,01$). Además, los pacientes portadores del alelo C tenían también niveles de IL-6 más elevados al ingreso en UCI ($p = 0,008$). Con todo, el alelo *IFIH1* rs1990760 C es un modificador de la edad de ingreso en UCI por COVID-19, determinando así la severidad de la enfermedad. Este efecto podría explicarse por una mayor actividad proinflamatoria, característica de esta enfermedad a través de la tormenta de citocinas.

Abstract

Innate immunity is involved in susceptibility to SARS-CoV-2 infection and in the progression of COVID-19 to an illness mild form or to severe pneumonia. The RNA sensor MDA5 is an important component of this immunity, and it is responsible for the response against viral infections. The gene that codes for the MDA5 (*IFIH1*) is polymorphic and some of its variants have been associated with an antiviral response. Specifically, the rs1990760 could be associated with the risk of developing a severe form of COVID-19. In this study, 478 patients from Asturias who had been admitted to the HUCA ICU for severe bilateral pneumonia due to SARS-CoV-2 were analyzed. Demographic, clinical and laboratory variables were obtained from the medical records. After the DNA extraction, the rs1990760 C/T polymorphism was genotyped using real-time PCR with a TaqMan probe. All the data were collected in an Excel database and the differences between groups were statistically analyzed with the R software. Mortality from COVID-19 was related to advanced age ($p < 10^{-9}$) and to high levels of IL-6 ($p = 0.009$). The rs1990760 polymorphism was not significantly associated with the risk of death. The patients carrying the C allele (CC+CT) had an average age two years lower than the ones with the TT genotype (64 vs. 66 years) and the CC and CT genotypes were significantly more frequent in those under 65 years (52.9% vs. 40.6%, $p = 0.01$). In addition, patients carrying the C allele also had higher IL-6 levels on ICU admission ($p = 0.008$). All in all, the *IFIH1* rs1990760 C allele is a modifier of the age at admission to the ICU for COVID-19, thus determining illness severity. This effect could be explained by a greater proinflammatory activity, characteristic of this disease through the cytokine storm.

Declaración de originalidad

Yo, María Gertrudis Muñiz Banciella, con DNI 71736359A, estudiante del Grado en Biotecnología de la Facultad de Biología de la Universidad de Oviedo, declaro que el Trabajo Fin de Grado que presento para su exposición y defensa es original y que todas las fuentes utilizadas para su realización han sido debidamente citadas en el mismo.

En Oviedo, a 2 de junio de 2022

Abreviaturas

ACE2 (*angiotensin converting enzyme 2*): enzima convertidora de angiotensina 2

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARDS (*acute respiratory distress syndrome*): síndrome de dificultad respiratoria aguda

ARN: ácido ribonucleico

CARD (*caspase-recruitment domain*): dominio de reclutamiento y activación de caspasa

DHX58 (*DExH-box helicase 58*): proteína codificada por el gen DExH-box helicasa 58

DLP: dislipemia

GWAS (*genome-wide association study*): estudio de asociación del genoma completo

HTA: hipertensión arterial

HUCA: Hospital Universitario Central de Asturias

IC: intervalo de confianza

IFIH1 (*interferon induced with helicase C domain 1*): gen codificante del dominio 1 de la helicasa C inducida por interferón

IFN: interferón

IQ: intercuartílico

María Gertrudis Muñiz Banciella

IL: interleucina

IMC: índice de masa corporal

ISGs (interferon-stimulated genes): genes estimulados por interferón

MAVS (mitochondrial antiviral-signaling protein): proteína de señalización antiviral mitocondrial

MDA5 (melanoma differentiation-associated gene 5): proteína codificada por el gen asociado a la diferenciación del melanoma 5

Me: mediana

NLRs (nucleotide oligomerization domain (NOD)-like receptors): receptores tipo dominio de oligomerización de nucleótido (DON)

OMS: Organización Mundial de la Salud

OR: odds ratio

PAMPs (pathogen-associated molecular patterns): patrones moleculares asociados a patógenos

PaO₂/FiO₂: presión parcial de oxígeno/fracción inspiratoria de oxígeno

PCR (polymerase chain reaction): reacción en cadena de la polimerasa

PRRs (pattern-recognition receptors): receptores de reconocimiento de patrones

qPCR (quantitative polymerase chain reaction): PCR cuantitativa o en tiempo real

RD (repressor domain): dominio represor

RIG-I (retinoic acid inducible gene I): proteína codificada por el gen I inducible por ácido retinoico (GIR-I)

RLRs (retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptors): receptores tipo GIR-I

SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2): coronavirus de tipo 2 del síndrome respiratorio agudo severo

SESPA: Servicio de Salud del Principado de Asturias

SNP (single nucleotide polymorphism): polimorfismo de nucleótido simple

TLRs (toll-like receptors): receptores tipo toll

TMPRSS2 (transmembrane protease serine 2): proteasa transmembrana serina 2

Índice

1. Introducción.....	1
1.1. Generalidades del SARS-CoV-2 y de la COVID-19.....	1
1.2. Inmunidad innata antiviral en la COVID-19.....	2
1.3. Genética de la COVID-19: MDA5 y polimorfismo rs1990760.....	4
2. Objetivo.....	8
3. Materiales y métodos.....	9
3.1. Cohorte de pacientes y recopilación de datos.....	9
3.2. Procesamiento y genotipado de muestras.....	10
3.3. Análisis estadístico.....	11
4. Resultados y Discusión.....	12
4.1. Características de los pacientes con COVID-19 crítico (ingresados en UCI).....	12
4.2. Relación de las variables con el polimorfismo rs1990760.....	17
4.3. Diferencias entre oleadas pandémicas.....	19
5. Limitaciones del estudio.....	21
6. Conclusiones.....	21
7. Bibliografía.....	22

1. Introducción

1.1. Generalidades del SARS-CoV-2 y de la COVID-19

El coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo, o SARS-CoV-2, fue identificado, en diciembre de 2019, como el agente causante de la pandemia de la COVID-19, que actualmente sigue siendo una emergencia sanitaria a nivel mundial (Yin et al., 2021). Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en España, desde enero de 2020, se han contabilizado casi 12 millones de casos y se han producido más de 100 mil muertes. En Asturias, según datos del Servicio de Salud del Principado de Asturias (SESPA), se han contabilizado 218 mil casos positivos y unos 2700 fallecidos.

La COVID-19 es una enfermedad muy heterogénea y su gravedad puede estar relacionada con múltiples factores socioeconómicos (atención médica, efectividad de las cuarentenas, políticas gubernamentales...) y también con factores asociados al paciente individualmente. Entre los factores que contribuyen a la susceptibilidad, la gravedad y el desarrollo individual de la COVID-19 se encuentran la edad avanzada, el estado de salud basal y las enfermedades preexistentes, así como la base genética de cada paciente (Deng et al., 2021).

Los síntomas clínicos típicos de la COVID-19 son fiebre, dolor de cabeza, dolor muscular, tos seca, dificultad para respirar y, en los casos más avanzados, una neumonía bilateral (Chen et al., 2020; Zhou et al., 2020c). En la mayoría de los casos, el SARS-CoV-2 causa una manifestación de la enfermedad asintomática o leve, con síntomas poco específicos (Deng et al., 2021; Yin et al., 2021). Pero en los casos graves, generalmente en pacientes de edad avanzada y con comorbilidades, la insuficiencia respiratoria puede derivar en lesiones pulmonares agudas y/o fallos multiorgánicos en los casos más severos (Deng et al., 2021; Zhou et al., 2020b, 2020c).

La evolución típica hacia formas severas de la COVID-19 comienza con una presentación leve/moderada seguida de un empeoramiento respiratorio. Esta evolución bifásica sugiere una respuesta inflamatoria desregulada en el paciente, produciéndose un desequilibrio entre los mediadores pro y antiinflamatorios. Esto conduce al reclutamiento y acumulación de leucocitos en los tejidos, lo que puede provocar el síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS) (Hadjadj et al., 2020). Es decir, en pacientes críticos con COVID-19 habría no sólo una menor eficacia de la respuesta antiviral (eliminación del virus), sino también una mayor respuesta inflamatoria que exacerba el daño en el tejido infectado, perdiendo la homeostasis (Amado-Rodríguez et al., 2022).

El SARS-CoV-2 es un betacoronavirus de ARN monocatenario y de sentido positivo, envuelto por una bicapa lipídica esférica y no segmentado (Deng et al., 2021; Rebendenne et al., 2021; Yin et al., 2021). La transmisión de este virus entre personas puede darse mediante aerosoles, contacto

directo, contacto fecal-oral o transmisión transplacentaria (Deng et al., 2021). Infecta principalmente a las células epiteliales respiratorias y se propaga a través del tracto respiratorio, aunque también puede replicarse en otros órganos y sistemas, como el tracto gastrointestinal, los vasos sanguíneos, la piel o el sistema nervioso (Deng et al., 2021; Rebendenne et al., 2021).

Su entrada en las células diana está mediada por el receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) y por la proteasa transmembrana serina 2 (TMPRSS2), que modifica la proteína S e induce la fusión de la membrana del virus con la de la célula (Rebendenne et al., 2021). Una vez que la partícula viral entra en la célula, pierde su recubrimiento y el ARN viral se traduce, generando las proteínas necesarias para la replicación de su genoma y la producción de los viriones (Yin et al., 2021). La proteína ACE2 es esencial para la infección, característica que comparte con el SARS-CoV-1 y con otros coronavirus (Rebendenne et al., 2021).

1.2. Inmunidad innata antiviral en la COVID-19

El control de la infección por SARS-CoV-2, en la mayoría de los casos, se debe principalmente a la activación de la respuesta innata. Las células epiteliales pulmonares inducen un estado antiviral en respuesta al SARS-CoV-2, limitando la replicación viral (Yin et al., 2021; Zhou et al., 2020c).

La inmunidad innata es la primera línea de defensa contra los patógenos, y constituye una respuesta sistémica crucial para la prevención de infecciones y el mantenimiento de la homeostasis (Riera Romo et al., 2016). Los mecanismos de defensa innatos promueven una respuesta inmediata tras el contacto con el patógeno y generan condiciones inflamatorias independientes de la exposición previa, y características de la inmunidad adquirida mediada por anticuerpos y linfocitos T (Riera Romo et al., 2016; Robertson, 1998). Esta respuesta es específica, ya que en la superficie celular se expresan receptores que reconocen diferentes complejos (Riera Romo et al., 2016). Además, la inmunidad innata también tiene un papel fundamental en la activación y la regulación de la inmunidad adaptativa o adquirida, muy importante en la respuesta a las reinfecciones víricas y a la inmunización por las vacunas (Kaur and Secord, 2021; Riera Romo et al., 2016; Takeuchi and Akira, 2009).

El sistema inmunitario innato abarca prácticamente todos los tejidos e involucra células tanto de origen hematopoyético como no hematopoyético (Kaur and Secord, 2021). Los componentes no hematopoyéticos incluyen la piel y las células epiteliales que recubren los tractos gastrointestinal, genitourinario y respiratorio (Kaur and Secord, 2021). Estas estructuras externas son el principal mecanismo de la inmunidad innata, y sirven de barreras protectoras que aíslan el medio interno de factores externos, evitando la infección y propagación de microorganismos patógenos. Además, tanto la piel como las membranas mucosas exhiben defensas bioquímicas básicas contra los microorganismos patógenos (Riera Romo et al., 2016).

Las células hematopoyéticas incluyen macrófagos, mastocitos, neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas y células *natural killer* (Kaur and Secord, 2021). Estas células poseen receptores de reconocimiento, se activan durante la respuesta inflamatoria, se diferencian en células efectoras y secretan mediadores inflamatorios para eliminar la infección (Deng et al., 2021; Kaur and Secord, 2021). Entre los mediadores secretados destacan las citocinas, proteínas que se encargan de mediar la comunicación entre las células y son esenciales para la respuesta inmune. Se subdividen en: interferones, interleucinas, factores de necrosis tumoral y factores de crecimiento (Riera Romo et al., 2016).

Dentro de los componentes de la inmunidad innata hay también proteínas que pueden reconocer secuencias de ARN o ADN microbiano. Este sistema se basa en reconocer, dentro de estas secuencias que no se presentan libres en el organismo de forma habitual, motivos invariables específicos (Kaur and Secord, 2021). Unos de los receptores que utiliza el sistema inmunitario para reconocer los microorganismos infecciosos son los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), que son activados por los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), altamente conservados (Dias Junior et al., 2019; Kaur and Secord, 2021). Los PAMPs son exclusivos de los microbios y son necesarios para su supervivencia y patogenicidad, por lo que generalmente son secuencias que no admiten mutaciones y se detectan por el sistema inmunitario (Kaur and Secord, 2021). Sin embargo, se ha visto que los PAMPs del SARS-CoV-2 pueden escapar eficazmente de la detección de los PRRs citosólicos, perturbando el sistema inmunitario (Deng et al., 2021).

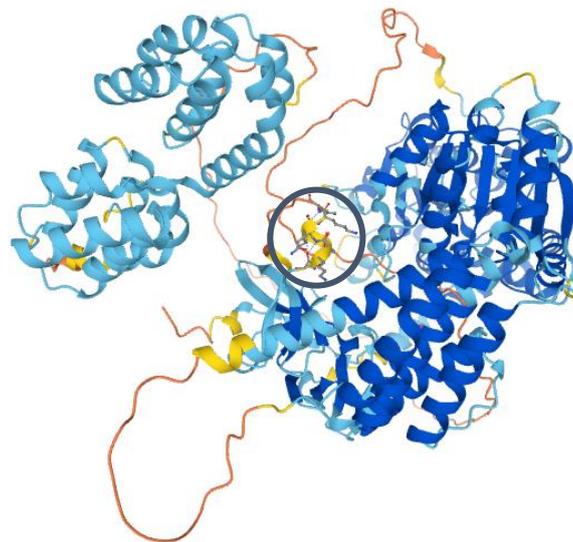
Dentro de los PRRs se incluyen los receptores tipo toll (TLRs), los receptores tipo gen I inducible por ácido retinoico (RLRs) y los receptores tipo dominio de oligomerización de nucleótido (NLRs) (Takeuchi and Akira, 2009). La activación de los receptores PRR, especialmente los TLRs y RLRs, lleva a la producción de interferones (IFNs) de tipo I y III y citocinas proinflamatorias, que pueden actuar de manera tanto paracrina como autocrina (Rebendenne et al., 2021; Takeuchi and Akira, 2009). En particular, los interferones constituyen una de las primeras líneas de defensa contra las infecciones virales a través de la regulación de los genes estimulados por interferón (*ISGs*) que, en definitiva, inducen un estado antiviral en las células infectadas y vecinas (Rebendenne et al., 2021).

A su vez, la familia de los RLRs está compuesta por tres miembros: la proteína codificada por el gen I inducible por ácido retinoico (RIG-I), la proteína codificada por el gen 5 asociado a la diferenciación del melanoma (MDA5) y la proteína codificada por el gen DExH-box helicasa 58 (DHX58). Estas proteínas se expresan ubicuamente a niveles bajos mientras las células están en reposo, pero su expresión aumenta considerablemente tras la infección vírica. Los RLRs son esenciales para el reconocimiento de patógenos y la posterior activación del interferón y de genes

antivirales e inmunomoduladores, que controlan la replicación y propagación del virus y sirven para regular la respuesta inmune adaptativa (Dias Junior et al., 2019; Loo and Gale, 2011).

1.3. Genética de la COVID-19: MDA5 y polimorfismo rs1990760

La proteína MDA5 (también conocida como *helicard* o IFIH1), perteneciente a la familia de los RLRs, está codificada por el gen *IFIH1*, que se encuentra en el cromosoma 2. Presenta una función protectora contra las infecciones víricas, ya que puede reconocer los virus con genomas de cadena sencilla o doble de ARN (reconoce principalmente los de doble cadena larga, >2 kb) e induce una respuesta del interferón tipo I (Dias Junior et al., 2019; Liu et al., 2021a; Loo and Gale, 2011; Takeuchi and Akira, 2009). Además, esta proteína también se ha visto implicada en varias enfermedades autoinmunes y autoinflamatorias, así como en la respuesta a algunas formas del tratamiento del cáncer (Dias Junior et al., 2019).



A.



B.

Figura 1. A. Estructura tridimensional de la proteína MDA5. En el centro de la imagen, redondeado, puede verse el polimorfismo rs1990760, que provoca el cambio aminoacídico que corresponde a A946T. Figura obtenida de: <https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q9BYX4>. B. Esquema de la representación estructural de la proteína MDA5 con los dominios implicados en la señalización. Figura modificada de Loo and Gale (2011).

Su estructura (Figura 1) está formada por un dominio central helicasa de ARN DExD/H-box y un dominio C terminal represor (RD), ambos responsables del reconocimiento y la unión al ARN, junto con dos dominios N terminales de reclutamiento y activación de caspasa (CARDs),

indispensables para desencadenar las cascadas de señalización intracelular (Dias Junior et al., 2019; Loo and Gale, 2011; Takeuchi and Akira, 2009).

En relación con la infección por SARS-CoV-2, durante su replicación se producen intermediarios de ARN de doble cadena que son reconocidos por PRRs. Se ha visto que tanto MDA5 como DHX58 son necesarios para el reconocimiento del SARS-CoV-2, pero no lo es RIG-I. Además, como DHX58 carece del dominio CARD, necesario para inducir IFN en las células infectadas, se cree que funciona como amplificador de la respuesta de IFN mediada por MDA5 (Yin et al., 2021). Asimismo, se demostró que el MDA5 es el detector principal del SARS-CoV-2 en las células epiteliales pulmonares Calu-3, ya que su ausencia afectó drásticamente a las cantidades de IFN I y III producidas (Rebendenne et al., 2021).

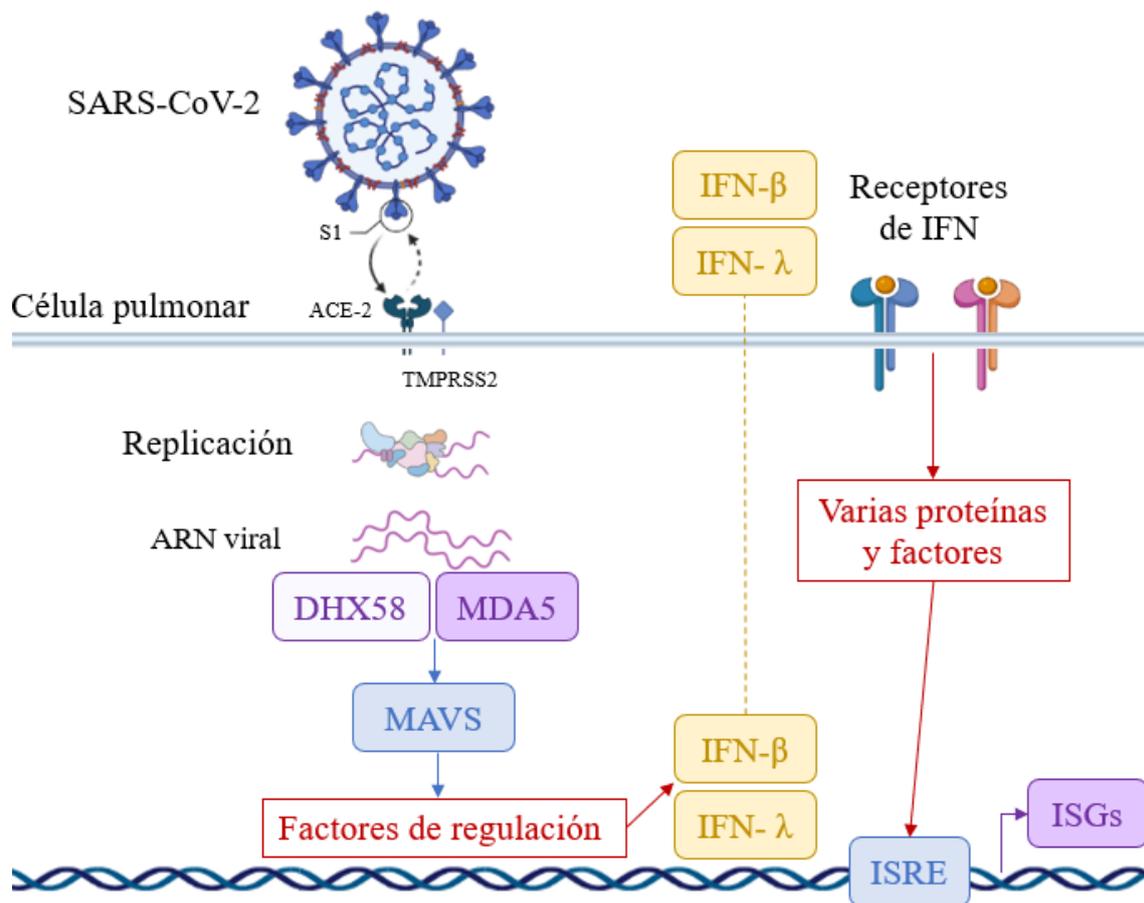


Figura 2. Esquema en el que se muestra el reconocimiento del ARN del SARS-CoV-2 por el sensor de ARN MDA5, lo que induce la respuesta del interferón y la regulación positiva de los ISGs. Esquema modificado de Yin et al (2021).

Tras la activación del receptor MDA5 mediante su unión al ARN, los CARDS interactúan con las proteínas de señalización antiviral mitocondrial (MAVS), lo que en último término conduce a la transcripción de los genes que codifican los interferones tipo I, imprescindibles para la inmunidad antiviral, y que seguidamente regulan positivamente los ISGs (Figura 2) (Dias Junior et al., 2019;

Gorman et al., 2017; Liu et al., 2021a). Las proteínas codificadas por los *ISGs* están involucradas en la eliminación de componentes virales de las células infectadas, induciendo su apoptosis y confiriendo además resistencia a la infección viral en las células que no han sido infectadas (Dias Junior et al., 2019; Takeuchi and Akira, 2009).

La expresión elevada de varios *ISGs* en los fluidos pulmonares de pacientes con COVID-19, apoya la hipótesis de que el control de la infección por SARS-CoV-2, en la mayoría de los casos, se debe principalmente a la activación de la respuesta innata (Yin et al., 2021).

Por una parte, la respuesta inicial de IFN parece ser mayor en pacientes con niveles leves y moderados de la enfermedad, mientras que está reducida en aquellos pacientes en estado crítico (Hadjadj et al., 2020). Pero por otro lado, los IFN parecen estar elevados en pacientes con COVID-19 moderado y grave durante el curso de la enfermedad (Lucas et al., 2020). Es decir, una vez se ha producido la infección, la carga viral parece estar altamente correlacionada con los niveles de IFN (Lucas et al., 2020). Así, tras la infección con SARS-Cov-2 se inducen potentes respuestas innatas en las células epiteliales de pulmón, con una inducción retardada de los IFNs (Rebendenne et al., 2021; Yin et al., 2021).

La respuesta por parte del paciente a la infección por SARS-CoV-2 puede afectar a la gravedad con la que se desarrolle la enfermedad (Yin et al., 2021). La respuesta inadecuada por parte de IFN I parece caracterizar los casos más graves (Rebendenne et al., 2021), y se ha visto que la baja producción de IFNs (Liu et al., 2021a), o limitar su función en la defensa contra el SARS-CoV-2, conduce al desarrollo de una forma severa de COVID-19 (Yin et al., 2021).

Además, que la respuesta de los IFNs no sea adecuada, puede suponer un aumento de la carga viral en los pacientes con COVID-19 que, en último lugar, produce hipercitocinemia, o tormenta de citocinas, una desregulación inmunitaria en la que se elevan los niveles de citocinas circulantes y que se asocia al daño sistémico (Deng et al., 2021; Rebendenne et al., 2021; Zhou et al., 2020c). Entre las citocinas inflamatorias, se ha visto que la interleucina 6, que activa los linfocitos y aumenta la producción de anticuerpos (Robertson, 1998), desempeña un papel clave en el desarrollo de esta tormenta de citocinas de la COVID-19 (Deng et al., 2021). Mayores niveles iniciales de citocinas están asociados a un peor pronóstico de la enfermedad (Lucas et al., 2020). Tras estudiar el transcriptoma de ocho pacientes con COVID-19, se detectaron niveles elevados de expresión de genes proinflamatorios, como las citocinas. Sin embargo, estos niveles parecían disminuir con el tiempo, lo que sugería que la inflamación exuberante podría resolverse progresivamente (Zhou et al., 2020c).

Con todo, la respuesta de las células epiteliales de pulmón a la infección por SARS-CoV-2 está mediada principalmente por el sensor de ARN MDA5, y se ha puesto de manifiesto la importancia

de la señalización de IFN en la restricción de la replicación viral y en el control de la gravedad de la COVID-19 (Yin et al., 2021).

El polimorfismo de nucleótido simple (SNP) rs1990760 (c.3213C>T) del gen *IFIH1* está descrito en www.ensembl.org como una variante con cambio aminoacídico de alanina por treonina (p.A946T) dentro del dominio C terminal de la proteína MDA5, dominio responsable del reconocimiento y la unión al ARN viral.

Varios estudios describen al alelo T como el alelo de riesgo para algunas de las enfermedades autoinmunes (Wawrusiewicz-Kurylonek et al., 2020). Tras realizarse un metaanálisis para estudiar la relación entre este polimorfismo y algunas de las enfermedades autoinmunes mayoritarias, se demostró que el alelo T confería susceptibilidad a padecer diabetes de tipo 1 (Bouças et al., 2013), lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple y artritis reumatoide, mientras que el polimorfismo podría no tener efecto sobre la enfermedad de Graves y la enfermedad de Addison (Cen et al., 2013). Por otro lado, también se encontraron asociaciones significativas del alelo T en el polimorfismo rs1990760 con la esclerosis múltiple, la diabetes LADA y la enfermedad de Graves (Wawrusiewicz-Kurylonek et al., 2020).

Si bien han sido varios los estudios que demuestran la asociación del alelo T de este polimorfismo con enfermedades autoinmunes, hay poca información sobre el efecto de esta variable en la funcionalidad de la proteína MDA5 y en cómo afectaría al control viral. El papel de este alelo está definido como una variante protectora frente a infecciones virales específicas, ya que favorece una mayor producción de IFN I, aunque al mismo tiempo también promueve el riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmune a través de una señalización basal (Gorman et al., 2017). Además, en modelos experimentales de infección por el virus Coxsackie, el genotipo TT da como resultado niveles más bajos de citoquinas proinflamatorias sin una reducción importante en la eliminación viral (Domsgen et al., 2016).

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente mencionado, parece que el alelo T en este polimorfismo protege a los pacientes de una infección viral a costa de un mayor riesgo de padecer enfermedades autoinmunes. Sin embargo, estas enfermedades son muy complejas e involucran múltiples interacciones entre mutaciones genéticas y factores ambientales. Además, en la mayoría de los casos, aunque un solo polimorfismo pudiera aumentar el riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmune, los síntomas no se llegarían a manifestar (Maiti, 2020).

Por lo tanto, como el alelo T en el polimorfismo rs1990760 desempeña un papel importante en la resistencia a la infección viral, se esperaría que las personas portadoras de este alelo tuvieran niveles más altos de IFN y un menor riesgo de infección por SARS-CoV-2 (Maiti, 2020).

Por otro lado, este polimorfismo también podría estar implicado en el desarrollo de una forma menos severa del COVID-19. En pacientes críticos, y homocigotos para el alelo T, se ha visto reducida la expresión de *IFIH1*. Estos pacientes mostraron una respuesta inflamatoria atenuada a la infección, una buena producción de células antiinflamatorias y menores concentraciones de mediadores proinflamatorios, lo que en conjunto condujo a una mejor evolución de la enfermedad y una disminución de la mortalidad (Amado-Rodríguez et al., 2022). Además, también se ha descrito una menor expresión génica ligada al alelo T en leucocitos circulantes de pacientes con diabetes tipo I (Liu et al., 2009). Este y otros estudios representarían evidencias funcionales para explicar la asociación entre el polimorfismo rs1990760 y la enfermedad vírica.

Apenas seis meses después de la declaración de la pandemia, se publicaron los primeros estudios sobre las bases genéticas de la susceptibilidad a desarrollar COVID-19. Entre ellos, un estudio de asociación del genoma completo (GWAS) describió un locus en el brazo corto del cromosoma 3 (Severe Covid-19 GWAS Group et al., 2020). Además, varios estudios han relacionado variantes en genes de entrada del SARS-CoV-2 (*ACE2*), en genes implicados en su procesamiento (*furina* o *TMPRSS2*) y, especialmente, en genes implicados en las respuestas inmune innata y adaptativa, en la susceptibilidad a la COVID-19. En definitiva, se ha visto que la variación genética de cada paciente afecta a la susceptibilidad de la infección por SARS-CoV-2 y a la gravedad en el desarrollo de la COVID-19.

Las variantes asociadas pueden ser raras, funcionalmente muy activas (por ejemplo, codones de parada prematuros), o polimorfismos frecuentes con cambios funcionales laxos, que actúan como factores de susceptibilidad (Stertz and Hale, 2021). Pero en la mayoría de los estudios se ha descrito una correlación entre el riesgo genético y la edad a la que se desarrolla la enfermedad, lo que también explicaría la menor prevalencia de algunas comorbilidades, como la hipertensión, en los pacientes más jóvenes (Azcárraga et al., 2019; Lobos Bejarano and Brotons Cuixart, 2011; Menéndez et al., 2016; Nakanishi et al., 2021). En este sentido, la COVID-19 es una enfermedad multifactorial típica, con factores de riesgo heredados y adquiridos, y con efectos divergentes según la edad del paciente: mayor relevancia de los factores genéticos a edad precoz y de los adquiridos a edad avanzada (Gao et al., 2021; Nakanishi et al., 2021). Por tanto, es necesario estudiar e identificar los genes que pudieran estar relacionados con la enfermedad, para poder utilizarlos como biomarcadores que ayuden a identificar a las personas de alto riesgo, y a controlar en ellas eficazmente el desarrollo de la COVID-19 (Deng et al., 2021).

2. Objetivo

Teniendo en cuenta todos los estudios previamente mencionados, el gen *IFIH1* podría estar implicado en la evolución de la COVID-19, y su variación podría condicionar el desarrollo de

una forma severa de la enfermedad. El polimorfismo rs1990760 de este gen podría servir como marcador genético, indicando el riesgo que tendría cada paciente de desarrollar una forma severa de la COVID-19. Con todo, el objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de este polimorfismo en pacientes que han desarrollado una forma severa de la COVID-19, precisando ingreso en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), y analizar su relación con la evolución de la enfermedad. Además, también se estudió la relación de esta, y otras variables demográficas y clínicas, con el riesgo de mortalidad por COVID-19 severo. Asimismo, se analizó la evolución de las variables en las tres oleadas pandémicas que ocurrieron en Asturias entre marzo de 2020 y enero de 2021.

3. Materiales y métodos

3.1. Cohorte de pacientes y recopilación de datos

Este estudio forma parte de un proyecto, desarrollado en el Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), en el que se analiza la inmunogenética de la COVID-19. El estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética de Investigación del Principado de Asturias, y todos los pacientes, o sus familiares, han dado su consentimiento informado para participar en el estudio.

Todos los pacientes estudiados eran étnicamente europeos (caucásicos) y residentes en Asturias, con edades comprendidas entre 19 y 95 años. Ingresaron por una forma severa de la COVID-19 en la UCI del HUCA, entre marzo de 2020 y enero de 2021, a lo largo de tres oleadas pandémicas. La primera oleada tuvo lugar en marzo de 2020, la segunda en septiembre de 2020 y la tercera en enero de 2021. En las dos primeras oleadas predominaba la variante original del SARS-CoV-2, mientras que en la tercera dominó la variante alfa, o inglesa.

Se estudiaron 478 pacientes con COVID-19 (infección por SARS-CoV-2 confirmado por PCR nasofaríngea) que requirieron ingreso hospitalario por neumonía bilateral en la UCI del HUCA. Por tanto, todos presentaban una forma severa de la enfermedad, y una de las limitaciones de este estudio es que no se incluye un grupo control que presente casos más leves de la COVID-19. Se excluyeron del estudio pacientes con inmunodeficiencias severas.

Todas las variables demográficas (edad y sexo), clínicas y analíticas se recogieron de las historias de los pacientes por el personal médico, y se incorporaron a una base de datos Excel. Los 65 años es la edad por encima de la cual se incrementa significativamente el riesgo de mortalidad en pacientes con COVID-19 severo, además de ser la empleada en otros estudios genéticos para diferenciar la COVID-19 precoz, y la utilizada por las autoridades sanitarias para priorizar el seguimiento de los pacientes infectados y las políticas de vacunación (Li et al., 2020). Por todo ello, los 65 años fue la edad de corte que se utilizó en este estudio para considerar COVID-19 precoz.

Las variables hipertensión (HTA), dislipemia (DLP), diabetes y tratamiento con corticoides fueron clasificadas por los clínicos como sí o no en base a las historias de los pacientes. El valor del índice de masa corporal (IMC) (kg/m^2) a partir del cual se considera obesidad fue $30 \text{ kg}/\text{m}^2$. Los valores de IL-6 (pg/mL), dímero D (ng/mL), ferritina ($\mu\text{g}/\text{L}$) y presión parcial de oxígeno/fracción inspiratoria de oxígeno ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) (mmHg) fueron medidos al ingreso en la UCI. En base a publicaciones previas que indican cuáles son los límites de mal pronóstico para estos parámetros, se establecieron los cortes en $70 \text{ pg}/\text{mL}$ (Del Valle et al., 2020), $2000 \text{ ng}/\text{mL}$ (Berger et al., 2020), $1000 \mu\text{g}/\text{L}$ (Del Valle et al., 2020) y 300 mmHg (Huang et al., 2020), respectivamente. El periodo de seguimiento del paciente fue desde su ingreso en UCI hasta su alta o fallecimiento. Todos estos datos están a disposición para replicación de los resultados, o elaboración de metaanálisis, a través del investigador principal del proyecto “Inmunogenética de la COVID-19” (Dr. Eliecer Coto, Genética Molecular HUCA; proyecto ISCIII 21/00819).

3.2. Procesamiento y genotipado de muestras

El ADN se obtuvo de los leucocitos de la sangre de los pacientes y se almacenó a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$, como una colección de muestras, en el Laboratorio de Genética Molecular del HUCA. La extracción se realizó automáticamente con el equipo *Maxwell® 16 System*.

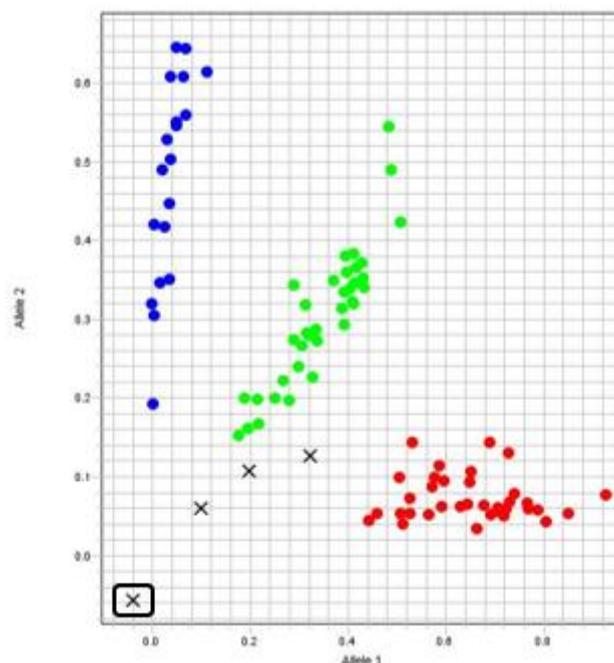


Figura 3. Representación de la discriminación alélica con la sonda TaqMan utilizada, siendo los puntos verdes los individuos heterocigotos CT, los azules homocigotos TT y los rojos homocigotos CC para el SNP rs1990760. Los pacientes marcados con una X son aquellos a los que no se les ha podido determinar su genotipo. La X recuadrada en negro se corresponde con el control negativo (se lleva a cabo la reacción sin añadir ningún ADN).

El polimorfismo rs1990760 C/T del gen *IFIH1* se determinó mediante PCR en tiempo real (qPCR) con una sonda TaqMan (referencia [C 2780299 30](#); Applied Biosystems™), en el dispositivo 7500 Real-Time PCR System. Las sondas están marcadas con un fluorocromo en 5': con FAM para el alelo T y con VIC para el alelo C (Figura 3). La qPCR se llevó a cabo en las condiciones especificadas por el proveedor, con una desnaturalización a 95 °C durante 10 minutos, seguida de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C y un minuto a 60 °C.

Para confirmar que el protocolo permitía genotipar a los pacientes correctamente, se secuenciaron muestras de los tres genotipos (CC, CT y TT) mediante Sanger capilar de fragmentos de PCR, cuyo resultado puede verse en la Figura 4.

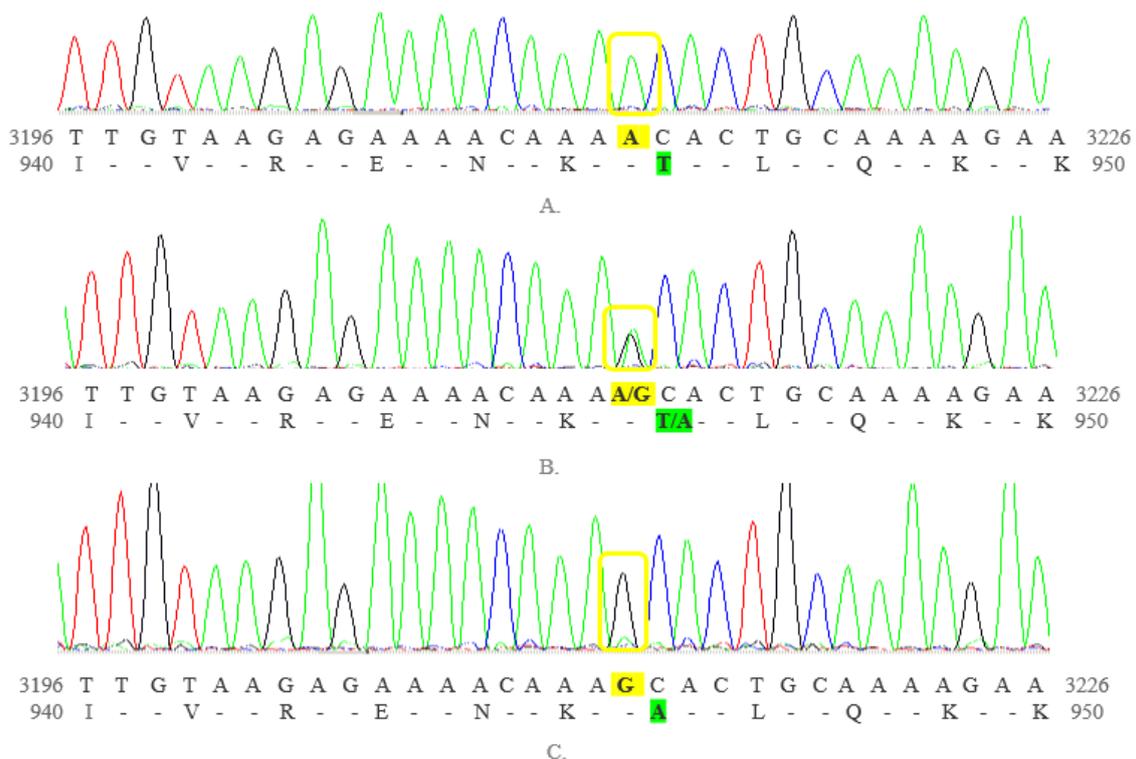


Figura 4. Secuencias de fragmentos de PCR de pacientes con distinto genotipo para el SNP rs1990760 (A946T), obtenidas mediante secuenciación Sanger. Se muestra la secuencia de la cadena complementaria. Subrayado en amarillo se muestra el cambio de nucleótido y, subrayado en verde, el cambio de aminoácido. (A) Genotipo T homocigoto (A en la secuencia). (B) Genotipo heterocigoto CT (AG en la secuencia). (C) Genotipo C homocigoto (G en la secuencia).

3.3. Análisis estadístico

Todo el análisis estadístico se realizó sobre los datos de la base Excel con el software libre R (www.r-project.org). En la estadística descriptiva se determinó la distribución de todas las variables (edad, sexo, HTA, diabetes, DLP, IMC, IL-6, dímero D, ferritina, PaO₂/FiO₂ y tratamiento con corticoides) frente a la mortalidad. Para comparar la diferencia entre fallecidos/no fallecidos se empleó la regresión logística simple. Puesto que la edad es la variable “no

modificable” más determinante de la mortalidad, se valoró mediante regresión logística la correlación del resto de variables con la edad y con una edad menor de 65 años. Para determinar la independencia entre las variables se empleó la regresión logística múltiple con el modelo lineal generalizado de R. Las diferencias se expresaron como p valores y Odds Ratios (ORs) con intervalos de confianza (IC) al 95%.

En cuanto al polimorfismo rs1990760, se analizó su relación con las variables de ingreso en UCI, además de con la mortalidad, el sexo y la edad. Estudios previos muestran que la respuesta inmune de los pacientes con un genotipo TT difiere de la de los pacientes con genotipos CC y CT (Wawrusiewicz-Kurylonek et al., 2020). Por tanto, el análisis estadístico se realizó comparando los pacientes portadores del alelo C (genotipos CC y CT) frente a los homocigóticos para el alelo T (genotipo TT). La distribución de las frecuencias alélicas para el polimorfismo rs1990760 entre la población española es de 0,36/0,64 para C/T, respectivamente (www.ensembl.org). Estos valores, tomados como controles, sólo se utilizaron para compararlos con los hallados en nuestros pacientes, sin otro propósito que el de conocer los valores de estas frecuencias en nuestra población. En la Figura 5 puede verse la distribución de las frecuencias alélicas para la población europea y sus subpoblaciones.

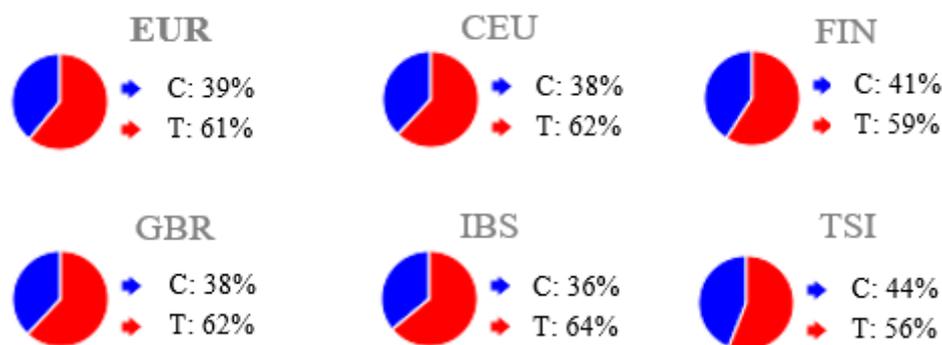


Figura 5. Distribución de las frecuencias alélicas del SNP rs1990760 entre la población europea (EUR) y las distintas subpoblaciones: residentes de Utah con ascendencia del norte y oeste de Europa (CEU), finlandeses (FIN), británicos (GBR), ibéricos (IBS) e italianos (TSI). Imagen obtenida y modificada de: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=2:162267041-162268041;v=rs1990760;vdb=variation;vf=183064627

Por último, para las tres oleadas pandémicas se analizó la relación con la edad y el sexo de los pacientes, con la mortalidad y con el genotipo.

4. Resultados y Discusión

4.1. Características de los pacientes con COVID-19 crítico (ingresados en UCI)

En la Tabla 1 se resumen las variables estudiadas en los pacientes con COVID-19 ingresados en la UCI, y su relación con la mortalidad. Tras hacer la comparativa univariante, el riesgo de fallecer

se pudo asociar estadísticamente con la edad avanzada ($p < 10^{-9}$), con tener hipertensión arterial ($p = 0,008$) y dislipemia ($p = 0,04$), y con presentar valores elevados de la IL-6 ($p = 0,004$).

Tabla 1. Características de los pacientes ingresados en UCI ($n = 478$) según mortalidad. Regresión logística univariante.

		Fallecidos		
		Sí ($n = 106$)	No ($n = 372$)	p valor
Edad	> 65	82 (77,4 %)	162 (43,5 %)	8,1 · 10 ⁻¹⁰
	Media	71,2 ± 10,5	62,2 ± 11,8	
	Me (rango IQ)	73 (66 - 78)	64 (56 - 71)	
Sexo varón ($n = 345$)		75 (70,8 %)	270 (72,6 %)	0,71
HTA ($n = 343$)		56 (69,1 %)	137 (52,3 %)	0,0076
Diabetes ($n = 333$)		19 (24,4 %)	55 (21,6 %)	0,60
DLP ($n = 334$)		45 (57,7 %)	113 (44,4 %)	0,036
IMC ($n = 290$)	Me (rango IQ)	29,9 (26,1 - 32,0)	30,3 (27,2 - 33,6)	0,56
	> 30	29 (50,0 %)	126 (54,3 %)	
IL-6 ($n = 324$)	Me (rango IQ)	78,0 (33,3 - 144,3)	38,5 (12,0 - 101,3)	0,0039
	> 70	35 (53,0 %)	87 (33,7 %)	
Dímero D ($n = 297$)	Me (rango IQ)	1297,0 (790,8 - 1706,0)	963,0 (602,5 - 1704,0)	0,38
	> 2000	18 (27,3 %)	51 (22,1 %)	
Ferritina ($n = 199$)	Me (rango IQ)	1268,5 (635,5 - 1706,0)	1087 (706,5 - 1703,0)	0,92
	> 1000	23 (57,5 %)	90 (56,6 %)	
PaO₂/FiO₂ ($n = 309$)	Me (rango IQ)	207,3 (146,7 - 269,0)	213,9 (166,0 - 266,9)	0,50
	< 300	56 (81,2 %)	203 (84,6 %)	

Como era de esperar, la edad avanzada (mayores de 65 años), es el factor más asociado con el riesgo de fallecer, siendo la edad media de los pacientes fallecidos casi diez años superior a la de los no fallecidos. Se sabe que la edad avanzada está asociada con una función inmunológica debilitada y con mayor número comorbilidades, lo que contribuye a la gravedad en el desarrollo de la COVID-19 en estos pacientes (Ebinger et al., 2020; Gao et al., 2021; Grasselli et al., 2020; Li et al., 2020; Zhang et al., 2021; Zhou et al., 2020a).

Como la edad avanzada es la variable que más relacionada está con el riesgo de fallecer, se realizó un análisis estadístico multivariante para corregir los resultados en base a la edad. Sólo la IL-6 ($p = 0,009$; OR = 0,5; 95%IC = 0,3 - 0,8) sigue saliendo estadísticamente significativa tras la corrección, lo que indica que valores elevados de este marcador sí están relacionados con el riesgo de fallecer, independientemente de la edad del paciente (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis univariante y multivariante (edad y sexo) de la asociación con la mortalidad. Se muestran los Odds Ratio (ORs) y los intervalos de confianza (IC) al 95%.

	OR (95% IC)	
	Univariante	Multivariante
Edad (>65 años)	4,4 (2,6 – 7,6)	
Sexo varón	0,9 (0,6 – 1,5)	
Hipertensión	2,0 (1,2 – 3,6)	1,6 (0,9 – 2,9)
Diabetes	1,2 (0,6 – 2,2)	0,9 (0,5 – 1,6)
Dislipemia	1,7 (1,0 – 3,0)	1,5 (0,9 – 2,5)
IL-6 <70	0,5 (0,3 – 0,8)	0,5 (0,3 – 0,8)
Dímero D <2000	0,8 (0,4 – 1,5)	0,9 (0,5 – 1,7)
Ferritina <1000	1,0 (0,4 – 2,1)	0,7 (0,3 – 1,7)

La IL-6 juega un papel clave en la respuesta inflamatoria exacerbada durante el desarrollo de la COVID-19 (Hadjadj et al., 2020; López-Martínez et al., 2022). Que los elevados niveles de IL-6 estén significativamente asociados al riesgo de fallecimiento en los pacientes de la UCI, independientemente de la edad, concuerda con lo descrito en la bibliografía. Los niveles séricos de IL-6 están elevados en una forma grave de la COVID-19, y estos altos niveles se asocian a su vez con un avance hacia formas más severas de la enfermedad, pudiendo conducir al desarrollo de la tormenta de citocinas (Coomes and Haghbayan, 2020; Del Valle et al., 2020; Henry et al., 2020; López-Martínez et al., 2022; Lucas et al., 2020; Rebendenne et al., 2021).

Por otro lado, se ha descrito que la infección por el SARS-CoV-2 produce en los pacientes una inducción de IFN, acompañada de una débil inducción de los niveles de IL-6. Que no se produzcan niveles elevados de IL-6 sugiere que las células epiteliales pulmonares podrían no ser los principales contribuyentes a la respuesta inflamatoria tras la infección (Yin et al., 2021).

La IL-6 parece ser uno de los marcadores de supervivencia más robustos y podría utilizarse como un parámetro para monitorizar el pronóstico de los pacientes, pues permanece asociado a la gravedad con la que se desarrolla la enfermedad y con el riesgo de fallecimiento, independientemente de las características demográficas o comorbilidades (Del Valle et al., 2020; Henry et al., 2020). Además, estos resultados respaldan la necesidad de nuevos estudios para dilucidar el papel de la inmunomodulación, específicamente a través de la inhibición de IL-6, en el contexto de la COVID-19 severa (Coomes and Haghbayan, 2020). En este estudio sólo se analizaron los niveles de IL-6 en sangre medidos al ingreso en la UCI, pero no se valoraron medidas posteriores que podrían informar de la evolución de la enfermedad hacia una mayor mortalidad.

Si bien el resto de los parámetros estudiados perdieron su significación estadística tras realizar la comparativa multivariante, sí muestran una tendencia a estar más elevados en los pacientes fallecidos, lo que concuerda con los datos encontrados en la literatura.

Aunque el sexo de los pacientes no se asoció a mayor mortalidad, se ha descrito que los hombres tienen mayor riesgo de desarrollar COVID-19 severo (Chen et al., 2020; Ebinger et al., 2020; Gao et al., 2021; Li et al., 2020; Zhang et al., 2020), lo que coincide con los resultados obtenidos en este trabajo ya que, de todos los pacientes analizados, un 72% fueron varones y un 28% mujeres. La diferencia en la gravedad de la enfermedad según el sexo puede atribuirse a las diferencias en las hormonas sexuales involucradas en los procesos inflamatorios, que juegan un papel importante en la inmunidad innata y adaptativa (Chen et al., 2020; Ebinger et al., 2020; Gao et al., 2021). Pero también puede atribuirse a una mayor prevalencia de comorbilidades pulmonares y cardiovasculares entre los hombres que, entre otras cosas, tienen mayor prevalencia de consumo de alcohol y tabaco (Gao et al., 2021; Lobos Bejarano and Brotons Cuixart, 2011), dos variables no incluidas en nuestro estudio.

La hipertensión, la diabetes y la dislipemia son parámetros desregulados por la infección del SARS-CoV-2, por lo que sus valores no se midieron al ingreso, sino que se tomaron de la historia clínica de los pacientes. Por esta razón, en este trabajo se estudió la relación de estos parámetros con el desarrollo de una forma severa de la COVID-19, pero no se estudió su desregulación por la infección. La prevalencia de la hipertensión, la diabetes y la dislipemia aumenta con la edad del paciente. Además, todos estos parámetros son más altos en los pacientes con una forma severa de la COVID-19, que requieren ingreso en UCI, que en aquellos que permanecen en planta con una forma menos severa de la enfermedad (Azcárraga et al., 2019; Gao et al., 2021; Lobos Bejarano and Brotons Cuixart, 2011).

La hipertensión arterial es una de las comorbilidades más comunes en pacientes con COVID-19, principalmente en los ancianos (Gao et al., 2021; Zhou et al., 2020a). Además, presentar HTA se ha visto asociado a la severidad de la COVID-19, pero no al riesgo de mortalidad (Gao et al., 2021; Li et al., 2020; Zhang et al., 2021). Esto concuerda con los resultados obtenidos, ya que la HTA se asocia con la edad avanzada tras el análisis multivariable, pero no con el riesgo de mortalidad. Asimismo, más de un 56% de los pacientes estudiados presentaban HTA, lo que corrobora su relación con padecer una forma severa de la COVID-19.

La diabetes también es una comorbilidad que se ha relacionado con la COVID-19, y se considera un factor de riesgo en el desarrollo de los casos graves (Gao et al., 2021; Huang et al., 2020; Li et al., 2020) y/o fatales (Gao et al., 2021; Zhou et al., 2020a). Sin embargo, en esta cohorte de pacientes no hay asociación significativa con el riesgo de fallecimiento, si bien la frecuencia de diabéticos es algo mayor entre los pacientes fallecidos que entre los supervivientes.

La dislipemia, una alteración de los niveles de lípidos y proteínas en la sangre, es una complicación común en pacientes con COVID-19, que aumenta el riesgo de desarrollar una forma grave de la enfermedad, y aumenta también el riesgo de muerte (Hariyanto and Kurniawan, 2020; Liu et al., 2021b). Los resultados obtenidos muestran que la dislipemia es común en los pacientes con una forma severa de la COVID-19 y que está relacionada con la edad, pero no con la mortalidad.

En cuanto al índice de masa corporal, no se han observado relaciones estadísticamente significativas entre la obesidad ($IMC > 30 \text{ kg/m}^2$) y el riesgo de fallecer. Sin embargo, el IMC sí que previamente se ha correlacionado con la mayor gravedad en el desarrollo de la COVID-19 (Gao et al., 2021). Por otro lado, la obesidad sí que se ha visto correlacionada en esta cohorte de manera significativa con la edad ($p=0,02$; $OR = 1,7$; $95\%IC = 1,1 - 2,8$), teniendo un $IMC > 30 \text{ kg/m}^2$ un 60,6% de los pacientes menores de 65 años frente al 47,1% de los mayores de esta edad.

El dímero D es un producto de la degradación de la fibrina y es común en pacientes con COVID-19, pues la desregulación en la coagulación está asociada con la progresión de la enfermedad, y sus valores son significativamente más altos en pacientes con una forma severa de la misma (Gao et al., 2021; López-Martínez et al., 2022; Yu et al., 2020). Se considera un marcador de trombosis, evento frecuente en pacientes graves y fallecidos. Además, se ha visto que presentar valores de dímero D superiores a 2000 ng/mL al ingreso es un factor de alto riesgo, estando asociado a una mayor probabilidad de mortalidad, independientemente de la edad (Berger et al., 2020; Yao et al., 2020). En este estudio, valores del dímero D por encima de 2000 ng/mL no se relacionan estadísticamente con el riesgo de fallecer. Sin embargo, en ambos grupos los valores de las medianas y los rangos intercuartílicos están bastante por encima de 500 ng/mL (82% de los pacientes totales), valor que está asociado a una peor progresión de la enfermedad (Berger et al., 2020; Yao et al., 2020; Yu et al., 2020).

La ferritina sérica es una proteína de almacenamiento del hierro y también es un marcador inflamatorio (Lin et al., 2020; López-Martínez et al., 2022). Los niveles elevados de ferritina sérica son un factor de riesgo para la gravedad de la COVID-19 (Gandini et al., 2020; Gao et al., 2021; Lin et al., 2020). Además, la hiperferritinemia ($> 500 \text{ } \mu\text{g/L}$) al ingreso es común en los pacientes con una forma grave de la enfermedad (Gandini et al., 2020). Esto concuerda con los resultados obtenidos para esta cohorte, ya que los valores de las medianas y los rangos intercuartílicos están bastante por encima de $500 \text{ } \mu\text{g/L}$, lo que demuestra que el alto nivel de ferritina se correlaciona con la gravedad de la COVID-19, aunque no se relacione de modo significativo con la mortalidad.

La variable PaO_2/FiO_2 representa el cociente entre la presión arterial de oxígeno y la fracción inspirada de oxígeno, y se utiliza para medir el intercambio gaseoso en los pacientes. Valores

bajos de este ratio (<300 mmHg), medidos a la admisión, se han descrito como factores de riesgo independientes asociados a la mortalidad (Grasselli et al., 2020; Huang et al., 2020; Zhang et al., 2021). Sin embargo, aunque los pacientes fallecidos y no fallecidos presenten valores inferiores a 300 mmHg en el rango intercuartílico, este marcador no se relaciona significativamente con el riesgo de fallecer.

Por último, se compararon estadísticamente los pacientes que habían sido tratados con corticoides al ingreso en la UCI, y los que no, frente al riesgo de mortalidad. Los corticoides se usan para intentar disminuir la hiperinflamación producida por la COVID-19 y se ha visto que, efectivamente, su uso reduce la mortalidad, tanto en pacientes con COVID-19 severo (desarrollo de ARDS) como en pacientes con COVID-19 no severo (Chaudhuri et al., 2021). En este caso, la mayoría de los pacientes se habían tratado con corticoides ($n=436$), frente a una minoría que no ($n=30$), siendo estos últimos de la primera oleada pandémica (el uso de corticoides se generalizó tras los primeros ingresos). Tras hacer el análisis, no hay evidencia estadísticamente significativa ($p=0,62$) de que el uso de corticoides redujese la mortalidad en esta cohorte.

4.2. Relación de las variables con el polimorfismo rs1990760

La distribución de las frecuencias alélicas descrita para el polimorfismo rs1990760 del gen *IFIH1* entre la población española es de un 36% para el alelo C y de un 64% para el alelo T. La distribución alélica en la cohorte de pacientes estudiada es de un 44% para el alelo C y de un 55% para el alelo T (102 pacientes son CC, 221 son CT y 155 son TT). Es decir, el alelo C está notablemente elevado (con respecto a la frecuencia poblacional de la península ibérica) entre los pacientes que desarrollan una forma severa de la COVID-19 y que precisan de ingreso en UCI. Esta tendencia coincide con lo ya publicado, pues se identificó el genotipo CC del polimorfismo rs1990760 como un factor de riesgo para el desarrollo de una forma severa de la COVID-19 en la población rusa (Minashkin et al., 2022).

En la Tabla 3 se muestra la distribución de los genotipos del polimorfismo rs1990760 del gen *IFIH1* en los pacientes ingresados en la UCI.

Tabla 3. Distribución de los genotipos (CC, CT y TT) del polimorfismo rs1990760 del gen *IFIH1* de los pacientes ingresados en UCI (n=478). Los p valores se obtuvieron comparando los pacientes portadores del alelo C (genotipos CC+CT) frente a los homocigóticos para el alelo T (genotipo TT).

		rs1990760			
		CC (n=102)	CT (n=221)	TT (n=155)	p valor
Edad	< 65	56 (54,9%)	115 (52,0%)	63 (40,6%)	0,012
	Media	62,8 ± 11,7	63,7 ± 12,7	65,8 ± 11,4	
	Me (rango IQ)	64,0 (57,0 – 71,0)	65,0 (56,0 – 75,0)	68,0 (60 - 72,5)	
Fallecidos (n=106)		21 (20,6%)	55 (24,9%)	30 (19,4%)	0,30
Sexo varón (n=345)		77 (75,5%)	171 (77,4%)	97 (62,6%)	0,0012
HTA (n=343)		45 (56,2%)	88 (56,4%)	60 (56,1%)	0,96
Diabetes (n=333)		21 (27,6%)	30 (19,4%)	23 (22,5%)	0,92
DLP (n=334)		37 (48,7%)	72 (46,5%)	49 (47,6%)	0,95
IMC (n=290)	Me (rango IQ)	30,3 (27,2 - 32,7)	29,8 (27,1 – 33,2)	30,9 (25,6 - 34,0)	0,17
	> 30	35 (55,6%)	67 (48,6%)	53 (59,6%)	
IL-6 (n=324)	Me (rango IQ)	54,0 (17,5 – 144,5)	44,0 (15,0 – 131)	37 (12,5 - 46,5)	0,0079
	> 70	32 (45,7%)	62 (41,1%)	28 (27,2%)	
Dímero D (n=297)	Me (rango IQ)	968 (550 – 1582)	1009 (638 – 2114)	1089 (631 - 1790)	0,73
	> 2000	13 (19,1%)	36 (26,1%)	20 (22%)	
Ferritina (n=199)	Me (rango IQ)	1047 (539 - 1378)	1201 (728 – 2191)	1067 (712 - 1612)	0,98
	> 1000	26 (57,8%)	53 (56,4%)	34 (56,7%)	
PaO₂/FiO₂ (n=309)	Me (rango IQ)	244 (187 – 302)	210 (160 – 255)	200 (158 - 245)	0,28
	< 300	51 (73,9%)	126 (86,3%)	82 (87,2%)	

Tras una primera comparativa univariante, los sujetos menores de 65 años ($p=0,01$), el sexo masculino ($p=0,001$) y los niveles elevados de IL-6 ($p=0,008$) estaban significativamente asociados con el alelo de riesgo C del polimorfismo estudiado. Por tanto, aunque no se haya encontrado una diferencia significativa para los genotipos CC y CT entre fallecidos y supervivientes ($p=0,3$), el alelo C sí actuaría como modificador de la edad de ingreso en UCI, por lo que se podría considerar un marcador de COVID-19 crítico precoz. La relación entre el genotipo y el sexo desaparece en el análisis multivariante, permaneciendo el alelo C como marcador de riesgo ($p=0,009$) pero no el sexo ($p=0,3$). Es decir, el genotipo sería un marcador de enfermedad precoz (ingreso en UCI a edades menores de 65 años) independiente del sexo. El análisis multivariante, incluyendo el genotipo y los niveles elevados de IL-6, mostró ausencia de significación para las dos variables ($p=0,2$ y $p=0,09$; respectivamente), lo que sugiere una dependencia entre ambas. Es decir, la relación entre el genotipo y la edad precoz podría explicarse por una frecuencia mayor de IL-6 elevada entre los pacientes portadores del alelo C.

Por otro lado, en estudios previos se encontró que la expresión del gen *IFIH1* es significativamente menor en pacientes homocigóticos para el alelo T del polimorfismo rs1990760. Además, predicciones *in silico* sugieren una menor expresión de las vías proinflamatorias (incluidas las reguladas por IL-6) en pacientes con menor expresión de *IFIH1*, como los de genotipo TT (Amado-Rodríguez et al., 2022). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en este estudio, ya que los pacientes TT presentan niveles significativamente menores de IL-6, acompañados de una tendencia en la disminución de la mortalidad, aunque sin diferencia significativa.

Por otro lado, ninguna de las demás variantes estudiadas muestra una relación estadísticamente significativa con el polimorfismo. Los pacientes que padecen hipertensión, diabetes o dislipemia y/o que presentan altos niveles de dímero D o ferritina, no mostraban diferencias entre genotipos. Sin embargo, los pacientes con un IMC >30 kg/m² y con una PaO₂/FiO₂ <300 mmHg eran mayoritariamente de genotipo TT, aunque no se detectó asociación significativa.

Con todo, los resultados obtenidos muestran que el polimorfismo rs1990760 del gen *IFIH1* está asociado al progreso de la COVID-19 en pacientes críticos, siendo el genotipo TT indicador de una buena evolución de la enfermedad: presentan menores cantidades de IL-6 debido a una respuesta inflamatoria mejorada que no compromete a la eliminación viral.

4.3. Diferencias entre oleadas pandémicas

Por último, también se analizaron las diferencias entre las tres primeras oleadas pandémicas con picos de ingreso hospitalario en Asturias. El primer pico tuvo lugar en marzo de 2020, el segundo en septiembre de 2020 y el tercero en enero de 2021. Los tres son previos a la campaña de vacunación, que redujo drásticamente los ingresos en UCI. En la Tabla 4 se resumen las edades, el porcentaje de fallecidos y los genotipos para el polimorfismo rs1990760 en las tres oleadas.

En primer lugar, la edad media de los pacientes ingresados en UCI disminuyó progresivamente en cada una de las oleadas pandémicas. La edad media de la primera oleada (67 años) es la más elevada, ya que durante este periodo ingresaron en el hospital pacientes de todas las edades, principalmente de edades avanzadas. Sin embargo, las edades medias de la segunda y la tercera oleada (65 y 62 años, respectivamente) van disminuyendo, lo que podría explicarse por el colapso hospitalario, que limitó el ingreso de los pacientes críticos de mayor edad que fueron tratados en las residencias geriátricas. Este aspecto debe considerarse una limitación del estudio en lo referente al sesgo de los casos de mayor edad. El mismo argumento se puede aplicar para la mortalidad, con tasas que disminuyen progresivamente en las oleadas. La disminución del número de muertes en la segunda y tercera oleada pudo deberse a una mejoría en la detección de las infecciones por SARS-CoV-2 y en la aplicación de tratamientos más eficaces a los pacientes que

presentaban una forma severa de la COVID-19, así como una disminución en la edad media de los pacientes ingresados.

Tabla 4. Análisis univariable de la edad, los fallecidos y el genotipo frente a las tres oleadas pandémicas (n=478). El p valor para el genotipo se obtuvo comparando los pacientes portadores del alelo C (genotipos CC+CT) frente a los homocigóticos para el alelo T (genotipo TT).

		Edad		Fallecidos (n=106)	rs1990760		
		> 65	Media		CC (n=102)	CT (n=221)	TT (n=155)
Oleadas	Primera (n=116)	74 (63,8%)	66,8 ± 11,0	36 (31,0%)	25 (21,6%)	57 (49,1%)	34 (29,3%)
	Segunda (n=197)	101 (51,3%)	64,6 ± 12,0	45 (22,8%)	44 (22,3%)	86 (43,7%)	67 (34,0%)
	Tercera (n=165)	69 (41,8%)	61,9 ± 12,6	25 (15,2%)	33 (20,0%)	78 (47,3%)	54 (32,7%)
	p valor	0,0014		0,0066	0,67		

Por otro lado, no se ha encontrado ninguna relación entre el genotipo del polimorfismo rs1990760 y las tres oleadas. En todos los casos, los individuos homocigóticos para el alelo T son aproximadamente el 30% de los pacientes y su número no aumenta según disminuye la mortalidad. Esto pone de manifiesto que la disminución en la mortalidad observada en esta cohorte se debe principalmente a una mejora en la detección y los tratamientos de la COVID-19 severa.

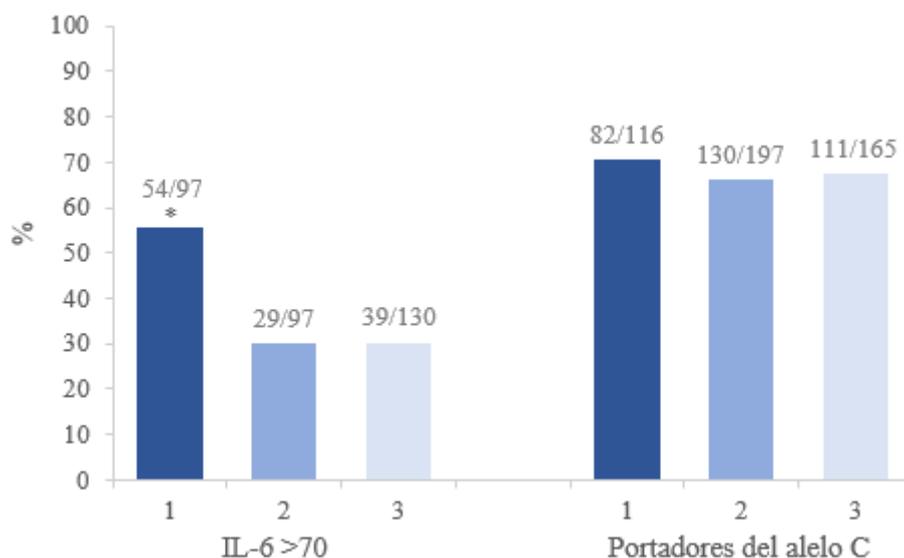


Figura 6. Representación gráfica del porcentaje de pacientes con niveles elevados de IL-6 y de los portadores del alelo C (genotipos CC+CT) en las tres oleadas pandémicas.

Por último, como los niveles elevados de IL-6 y los genotipos CC y CT son variables determinantes de la severidad de la COVID-19, se analizó su distribución en las tres oleadas. En

la Figura 6 se muestra el porcentaje de pacientes que presentaban niveles elevados de IL-6 y que eran portadores del alelo C a lo largo de los tres picos pandémicos. En la primera oleada, los valores de IL-6 son significativamente mayores que los de las otras dos oleadas. Esta disminución del número de pacientes con valores de IL-6 elevados pudo deberse a los cambios y la mejora en los tratamientos, así como a las políticas de aislamiento. Por otra parte, el número de pacientes portadores del alelo C es ligeramente mayor en la primera oleada, pero sin significación estadística.

5. Limitaciones del estudio

Este estudio sugiere que el alelo C del polimorfismo rs1990760 es un modificador para el desarrollo precoz (edades menores de 65 años) de una forma crítica de la COVID-19 (ingreso en UCI), y que estaría relacionado con mayores niveles de IL-6 al ingreso. Esto proporciona un argumento funcional para explicar el efecto sobre la edad, aunque la relación con otras variables, como la mortalidad, sólo se puede mostrar como tendencia que requiere muestras mayores, particularmente de fallecidos. Por otro lado, este trabajo no puede responder a la cuestión de si este genotipo está relacionado con mayor predisposición a desarrollar COVID-19 severa, ya que no se han estudiado controles sanos de la misma población. Tampoco se han podido comparar los pacientes críticos con un grupo que presenten casos menos severos de la enfermedad. Otras limitaciones del estudio ya se han expuesto anteriormente, como los criterios de valoración de la hipertensión, diabetes o dislipemia a través de lo declarado en la historia clínica, que no permite determinar la desregulación de estos parámetros provocada por la enfermedad.

6. Conclusiones

1. En la cohorte de pacientes estudiada, todos presentaban una forma crítica de la COVID-19. Una edad mayor de 65 años y niveles elevados de IL-6 fueron las dos variables independientemente asociadas a la mortalidad por una forma grave de la COVID-19.
2. Otras variables individualmente asociadas a la severidad, como la hipertensión o la dislipemia, pierden su asociación al incluir la edad como covariable.
3. El polimorfismo rs1990760 del gen *IFIH1* está relacionado con la edad de ingreso en UCI. En concreto, el alelo C es un factor de riesgo para la enfermedad crítica precoz (<65 años).
4. El polimorfismo rs1990760 también está relacionado con mayores niveles de IL-6 al ingreso en UCI, por lo que el efecto adverso del genotipo puede explicarse por su relación con los niveles de este (y otros) marcadores proinflamatorios.

5. La edad media de los pacientes y el número de fallecidos decrecen progresivamente en las tres oleadas, si bien no hay una relación significativa entre los tres picos pandémicos y el polimorfismo rs1990760.

6. Con todo, se ha comprobado que la base genética de cada paciente, en particular el polimorfismo rs1990760 del gen *IFIH1*, afecta a la gravedad en el desarrollo de la COVID-19. Este polimorfismo es un marcador genético que define la predisposición a desarrollar una forma severa de la COVID-19 de manera temprana. Este efecto puede explicarse por una mayor actividad proinflamatoria, característica de esta enfermedad, a través de la tormenta de citocinas. Por tanto, el estudio en profundidad de este y otros marcadores podría ofrecer nuevas formas de controlar la infección por SARS-CoV-2 y nuevos tratamientos para pacientes con una forma severa de la enfermedad.

7. Bibliografía

Amado-Rodríguez L, Salgado Del Riego E, Gomez de Ona J, et al. Effects of IFIH1 Rs1990760 Variants on Systemic Inflammation and Outcome in Critically Ill COVID-19 Patients in an Observational Translational Study. *eLife* 2022;11:e73012; doi: 10.7554/eLife.73012.

Azcárraga PA, Latorre MA, Montalvo JFM, et al. Base de Datos Clínicos de Atención Primaria – BDCAP Sistema Nacional de Salud. 2019;60.

Berger JS, Kunichoff D, Adhikari S, et al. Prevalence and Outcomes of D-Dimer Elevation in Hospitalized Patients With COVID-19. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2020;40(10):2539–2547; doi: 10.1161/ATVBAHA.120.314872.

Bouças AP, Brondani LA, Souza BM, et al. The A Allele of the Rs1990760 Polymorphism in the IFIH1 Gene Is Associated with Protection for Arterial Hypertension in Type 1 Diabetic Patients and with Expression of This Gene in Human Mononuclear Cells. *PloS One* 2013;8(12):e83451; doi: 10.1371/journal.pone.0083451.

Cen H, Wang W, Leng R-X, et al. Association of IFIH1 Rs1990760 Polymorphism with Susceptibility to Autoimmune Diseases: A Meta-Analysis. *Autoimmunity* 2013;46(7):455–462; doi: 10.3109/08916934.2013.796937.

Chaudhuri D, Sasaki K, Karkar A, et al. Corticosteroids in COVID-19 and Non-COVID-19 ARDS: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Intensive Care Med* 2021;47(5):521–537; doi: 10.1007/s00134-021-06394-2.

Chen N, Zhou M, Dong X, et al. Epidemiological and Clinical Characteristics of 99 Cases of 2019 Novel Coronavirus Pneumonia in Wuhan, China: A Descriptive Study. *The Lancet* 2020;395(10223):507–513; doi: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7.

Coomes EA and Haghighyan H. Interleukin-6 in Covid-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Rev Med Virol* 2020;30(6):1–9; doi: 10.1002/rmv.2141.

Del Valle DM, Kim-Schulze S, Huang H-H, et al. An Inflammatory Cytokine Signature Predicts COVID-19 Severity and Survival. *Nat Med* 2020;26(10):1636–1643; doi: 10.1038/s41591-020-1051-9.

Deng H, Yan X and Yuan L. Human Genetic Basis of Coronavirus Disease 2019. *Signal Transduct Target Ther* 2021;6(1):344; doi: 10.1038/s41392-021-00736-8.

Dias Junior AG, Sampaio NG and Rehwinkel J. A Balancing Act: MDA5 in Antiviral Immunity and Autoinflammation. *Trends Microbiol* 2019;27(1):75–85; doi: 10.1016/j.tim.2018.08.007.

Domsgen E, Lind K, Kong L, et al. An IFIH1 Gene Polymorphism Associated with Risk for Autoimmunity Regulates Canonical Antiviral Defence Pathways in Coxsackievirus Infected Human Pancreatic Islets. *Sci Rep* 2016;6(1):39378; doi: 10.1038/srep39378.

Ebinger JE, Achamallah N, Ji H, et al. Pre-Existing Traits Associated with Covid-19 Illness Severity. *PloS One* 2020;15(7):e0236240; doi: 10.1371/journal.pone.0236240.

Gandini O, Criniti A, Ballesio L, et al. Serum Ferritin Is an Independent Risk Factor for Acute Respiratory Distress Syndrome in COVID-19. *J Infect* 2020;81(6):979–997; doi: 10.1016/j.jinf.2020.09.006.

Gao Y, Ding M, Dong X, et al. Risk Factors for Severe and Critically Ill COVID-19 Patients: A Review. *Allergy* 2021;76(2):428–455; doi: 10.1111/all.14657.

Gorman JA, Hundhausen C, Errett JS, et al. The A946T Variant of the RNA Sensor IFIH1 Mediates an Interferon Program That Limits Viral Infection but Increases the Risk for Autoimmunity. *Nat Immunol* 2017;18(7):744–752; doi: 10.1038/ni.3766.

Grasselli G, Greco M, Zanella A, et al. Risk Factors Associated With Mortality Among Patients With COVID-19 in Intensive Care Units in Lombardy, Italy. *JAMA Intern Med* 2020;180(10):1345–1355; doi: 10.1001/jamainternmed.2020.3539.

Hadjadj J, Yatim N, Barnabei L, et al. Impaired Type I Interferon Activity and Inflammatory Responses in Severe COVID-19 Patients. *Science* 2020;369(6504):718–724; doi: 10.1126/science.abc6027.

Hariyanto TI and Kurniawan A. Dyslipidemia Is Associated with Severe Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Infection. *Diabetes Metab Syndr* 2020;14(5):1463–1465; doi: 10.1016/j.dsx.2020.07.054.

Henry BM, de Oliveira MHS, Benoit S, et al. Hematologic, Biochemical and Immune Biomarker Abnormalities Associated with Severe Illness and Mortality in Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Meta-Analysis. *Clin Chem Lab Med* 2020;58(7):1021–1028; doi: 10.1515/cclm-2020-0369.

Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical Features of Patients Infected with 2019 Novel Coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet* 2020;395(10223):497–506; doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.

Kaur BP and Secord E. Innate Immunity. *Immunol Allergy Clin North Am* 2021;41(4):535–541; doi: 10.1016/j.iac.2021.07.003.

Li X, Xu S, Yu M, et al. Risk Factors for Severity and Mortality in Adult COVID-19 Inpatients in Wuhan. *J Allergy Clin Immunol* 2020;146(1):110–118; doi: 10.1016/j.jaci.2020.04.006.

- Lin Z, Long F, Yang Y, et al. Serum Ferritin as an Independent Risk Factor for Severity in COVID-19 Patients. *J Infect* 2020;81(4):647–679; doi: 10.1016/j.jinf.2020.06.053.
- Liu G, Lee J-H, Parker ZM, et al. ISG15-Dependent Activation of the Sensor MDA5 Is Antagonized by the SARS-CoV-2 Papain-like Protease to Evade Host Innate Immunity. *Nat Microbiol* 2021a;6(4):467–478; doi: 10.1038/s41564-021-00884-1.
- Liu S, Wang H, Jin Y, et al. IFIH1 Polymorphisms Are Significantly Associated with Type 1 Diabetes and IFIH1 Gene Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Hum Mol Genet* 2009;18(2):358–365; doi: 10.1093/hmg/ddn342.
- Liu Y, Pan Y, Yin Y, et al. Association of Dyslipidemia with the Severity and Mortality of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Meta-Analysis. *Viol J* 2021b;18(1):157; doi: 10.1186/s12985-021-01604-1.
- Lobos Bejarano JM and Brotons Cuixart C. Factores de riesgo cardiovascular y atención primaria: evaluación e intervención. *Aten Primaria* 2011;43(12):668–677; doi: 10.1016/j.aprim.2011.10.002.
- Loo Y-M and Gale M. Immune Signaling by RIG-I-like Receptors. *Immunity* 2011;34(5):680–692; doi: 10.1016/j.immuni.2011.05.003.
- López-Martínez R, Albaiceta GM, Amado-Rodríguez L, et al. The FCGR2A Rs1801274 Polymorphism Was Associated with the Risk of Death among COVID-19 Patients. *Clin Immunol Orlando Fla* 2022;236:108954; doi: 10.1016/j.clim.2022.108954.
- Lucas C, Wong P, Klein J, et al. Longitudinal Analyses Reveal Immunological Misfiring in Severe COVID-19. *Nature* 2020;584(7821):463–469; doi: 10.1038/s41586-020-2588-y.
- Maiti AK. The African-American Population with a Low Allele Frequency of SNP Rs1990760 (T Allele) in IFIH1 Predicts Less IFN-Beta Expression and Potential Vulnerability to COVID-19 Infection. *Immunogenetics* 2020;72(6–7):387–391; doi: 10.1007/s00251-020-01174-6.
- Menéndez E, Delgado E, Fernández-Vega F, et al. Prevalencia, diagnóstico, tratamiento y control de la hipertensión arterial en España. Resultados del estudio Di@bet.es. *Rev Esp Cardiol* 2016;69(6):572–578; doi: 10.1016/j.recesp.2015.11.036.
- Minashkin MM, Grigortsevich NY, Kamaeva AS, et al. The Role of Genetic Factors in the Development of Acute Respiratory Viral Infection COVID-19: Predicting Severe Course and Outcomes. *Biomedicines* 2022;10(3):549; doi: 10.3390/biomedicines10030549.
- Nakanishi T, Pigazzini S, Degenhardt F, et al. Age-Dependent Impact of the Major Common Genetic Risk Factor for COVID-19 on Severity and Mortality. *J Clin Invest* 2021;131(23):e152386; doi: 10.1172/JCI152386.
- Rebendenne A, Valadão ALC, Tauziet M, et al. SARS-CoV-2 Triggers an MDA-5-Dependent Interferon Response Which Is Unable to Control Replication in Lung Epithelial Cells. *J Virol* 2021;JVI.02415-20; doi: 10.1128/JVI.02415-20.
- Riera Romo M, Pérez-Martínez D and Castillo Ferrer C. Innate Immunity in Vertebrates: An Overview. *Immunology* 2016;148(2):125–139; doi: 10.1111/imm.12597.
- Robertson M. Innate Immunity. *Curr Biol CB* 1998;8(17):R595-597; doi: 10.1016/s0960-9822(98)70384-7.

Severe Covid-19 GWAS Group, Ellinghaus D, Degenhardt F, et al. Genomewide Association Study of Severe Covid-19 with Respiratory Failure. *N Engl J Med* 2020;383(16):1522–1534; doi: 10.1056/NEJMoa2020283.

Stertz S and Hale BG. Interferon System Deficiencies Exacerbating Severe Pandemic Virus Infections. *Trends Microbiol* 2021;29(11):973–982; doi: 10.1016/j.tim.2021.03.001.

Takeuchi O and Akira S. Innate Immunity to Virus Infection. *Immunol Rev* 2009;227(1):75–86; doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00737.x.

Wawrusiewicz-Kurylonek N, Gościak J, Chorąży M, et al. The Interferon-Induced Helicase C Domain-Containing Protein 1 Gene Variant (Rs1990760) as an Autoimmune-Based Pathology Susceptibility Factor. *Immunobiology* 2020;225(1):151864; doi: 10.1016/j.imbio.2019.10.013.

Yao Y, Cao J, Wang Q, et al. D-Dimer as a Biomarker for Disease Severity and Mortality in COVID-19 Patients: A Case Control Study. *J Intensive Care* 2020;8:49; doi: 10.1186/s40560-020-00466-z.

Yin X, Riva L, Pu Y, et al. MDA5 Governs the Innate Immune Response to SARS-CoV-2 in Lung Epithelial Cells. *Cell Rep* 2021;34(2):108628; doi: 10.1016/j.celrep.2020.108628.

Yu H-H, Qin C, Chen M, et al. D-Dimer Level Is Associated with the Severity of COVID-19. *Thromb Res* 2020;195:219–225; doi: 10.1016/j.thromres.2020.07.047.

Zhang J, Wang X, Jia X, et al. Risk Factors for Disease Severity, Unimprovement, and Mortality in COVID-19 Patients in Wuhan, China. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 2020;26(6):767–772; doi: 10.1016/j.cmi.2020.04.012.

Zhang J-J, Cao Y-Y, Tan G, et al. Clinical, Radiological, and Laboratory Characteristics and Risk Factors for Severity and Mortality of 289 Hospitalized COVID-19 Patients. *Allergy* 2021;76(2):533–550; doi: 10.1111/all.14496.

Zhou F, Yu T, Du R, et al. Clinical Course and Risk Factors for Mortality of Adult Inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: A Retrospective Cohort Study. *Lancet Lond Engl* 2020a;395(10229):1054–1062; doi: 10.1016/S0140-6736(20)30566-3.

Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, et al. A Pneumonia Outbreak Associated with a New Coronavirus of Probable Bat Origin. *Nature* 2020b;579(7798):270–273; doi: 10.1038/s41586-020-2012-7.

Zhou Z, Ren L, Zhang L, et al. Heightened Innate Immune Responses in the Respiratory Tract of COVID-19 Patients. *Cell Host Microbe* 2020c;27(6):883-890.e2; doi: 10.1016/j.chom.2020.04.017.