



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ



Facultad de Ciencias Químicas  
Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas  
Maestría en Ciencias Farmacobiológicas.

“Participación de receptores de DNA citosólicos en  
individuos infectados con SARS-CoV-2”

Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias  
Farmacobiológicas

Presenta:  
Q.F.B. Estefanía Juárez Carrillo

El programa de Maestría en Ciencias Farmacobiologicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, registro 003382, en el Nivel Maestría. Número de registro de la beca otorgada por CONACyT: 782267 y el número de CVU: 1078859. Esta tesis se llevó a cabo en la Unidad de Investigación Biomédica de Zacatecas del Instituto Mexicano del Seguro Social, el Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina (CICSaB) de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí y el Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”, de San Luis Potosí, San Luis Potosí.



Participación de receptores de DNA citosólicos en individuos infectados con SARS-CoV-2 por Estefania Juárez Carrillo se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

## **JURADO**

---

**Director de tesis**

**Dra. Diana Patricia Portales Pérez**

---

**Co-director de tesis**

**Dra. Mariana Haydee García Hernández**

---

**Asesor**

**Dra. Edith Elena Uresti Rivera**

## **SUBCOMITE**

---

**Director de tesis**

**Dra. Diana Patricia Portales Pérez**

---

**Co-director de tesis**

**Dra. Mariana Haydee García Hernández**

---

**Asesor**

**Dra. Edith Elena Uresti Rivera**

## **DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer primeramente a Dios por permitirme llegar hasta este momento en el que culmino mi maestría, a mis padres por ser ese impulso para mi cada día aunque debí estar lejos de ellos siempre los lleve y llevaré en el corazón, en especial a mi madre que es mi gran ejemplo y siempre me motivó a nunca darme por vencida por más difíciles que fueran las circunstancias, a mis hermanas Karla y Marisol que han estado apoyándome a lo largo de este camino, a cada uno de mis familiares que estuvieron al pendiente de mi trayecto.

A la Dra. Mariana por aceptarme y darme la confianza para formar parte de su grupo de investigación, gracias por todas esas enseñanzas y consejos a lo largo de mi estancia en la UIBMZ, siempre los recordare.

A mi comité tutorial, Dra. Diana y Dra. Edith por sus asesorías y apoyo en todo este trayecto de dos años.

A la persona que tanto me ayudo en mi estancia en San Luis, Lau fuiste la primera amiga que tuve, me apoyaste y cuidaste de mi en todo momento, gracias por todos esos consejos y frases de motivación que me diste, fuiste, eres y serás una de las personas que agradeceré siempre por haber conocido.

A mis amigos en la UIBMZ Gwendo, Flor, Abraham y Andrea por estar ahí conmigo en todas esas horas en la unidad, momentos felices, estresantes y cansados que pasamos, pero al final todo vale la pena.

A mis amigas de la maestría Mariana, Abi y Laura que juntas terminaremos una etapa mas en nuestras vidas y agradezco el haberlas conocido.

Finalmente quiero agradecer al posgrado en Ciencias Farmacobiológicas de la UASLP y a CONACYT por brindarme la oportunidad de llevar a acabo mi maestría de manera satisfactoriamente.

## RESUMEN

**Introducción.** El COVID19 se caracteriza por presentar diferentes grados de severidad probablemente asociados a una disminución de la respuesta de interferón, así como un aumento de los marcadores proinflamatorios y de muerte celular. El objetivo de este estudio fue evaluar la expresión de los receptores de ADN IFI16, AIM2, vía cGAS-STING y NLRP3 en pacientes con COVID19 por qPCR. **Resultados.** Se contó con 13 pacientes de con síntomas y prueba para SARS-CoV-2 positiva y 12 sujetos aparentemente sanos. Se observó un aumento en la expresión de NLRP3, IFI16, NF-κB y la relación IFI16 / AIM2 en pacientes con COVID19 leve en comparación con controles sanos, mientras que los que presentaban síntomas graves mostraron una expresión disminuida de AIM2, STING, IFI16, NF-κB y la relación IFI16/AIM2 en comparación con los pacientes con COVID19 leve. Se encontró una correlación directa entre AIM2 y cGAS y ASC, una correlación directa de IFI16 y NLRP3, STING, NF-κB y LDH, así como una correlación directa de STING y NF-κB en el grupo de control. En pacientes COVID19 con síntomas leves, una correlación directa de IFI16 y cGAS con NF-κB, y se detectó una correlación directa entre AIM2 y STING. En pacientes con COVID19 severo, una correlación directa entre IFI16 con AIM2, cGAS, STING y NF-κB, así como IFI16, STING y NF-κB se correlacionaron inversamente con ASC. **Conclusiones.** En pacientes con COVID19 con síntomas leves, una mayor expresión de NLRP3, IFI16 y NF-κB podría implicar una adecuada respuesta del sistema inmunológico, mientras que la expresión disminuida de AIM2, IFI16, STING y NF-κB en pacientes con COVID19 con los síntomas severos podrían resultar en respuestas antivirales y antiinflamatorias inadecuadas.

**Palabras clave:** COVID19, Receptores de DNA, severidad, IFI16, AIM2

## ABSTRACT

**Introduction.** COVID19 is characterized by presenting different degrees of severity likely associated with a decreased interferon response, as well as increased markers of pro-inflammatory and cell death. The purpose of this study was to evaluate the expression of the DNA receptors IFI16, AIM2, cGAS-STING pathway and NLRP3 in patients with COVID19. The expression of IFI16, AIM2, cGAS-STING, NLRP3, ASC, and NF-kB was determined by qPCR. **Results.** A higher expression of NLRP3, IFI16, NF-kB, and the IFI16/AIM2 ratio in patients with mild COVID19 compared to healthy controls, while those with severe symptoms showed a diminished expression of AIM2, STING, IFI16, NF-kB and the IFI16/AIM2 ratio compared to patients with mild COVID19 disease. COVID19. We observed a direct correlation between AIM2 and cGAS and ASC, a direct correlation of IFI16 and NLRP3, STING, NF-kB and LDH, as well as a direct correlation of STING and NF-kB in the control group. In COVID19 patients with mild symptoms, a direct correlation of IFI16 and cGAS with NF-kB, and a direct correlation between AIM2 and STING was detected. In severe COVID19 patients, a direct correlation between IFI16 with AIM2, cGAS, STING and NF-kB as well as IFI16, STING and NF-kB were inversely correlated with ASC. **Conclusions** In COVID19 patients with mild symptoms, increased expression of NLRP3, IFI16, and NF-kB could imply the appearance of an adequate immune response, while the diminished expression of AIM2, IFI16, STING, and NF-kB in COVID19 patients with severe symptoms could result in inadequate antiviral and anti-inflammatory responses.

**Keywords:** COVID19, DNA-receptors, severity, IFI16, AIM2

## INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. JUSTIFICACIÓN .....	3
3. HIPÓTESIS.....	4
4. OBJETIVO GENERAL.....	4
4.1 . OBJETIVOS PARTICULARES.....	4
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	5
5.1 Criterios de inclusión.....	5
5.2 Criterios de exclusión (no inclusión).....	5
5.3 Criterios de eliminación. ....	5
5.4 Purificación de células mononucleares de sangre venosa periférica (PBMC).....	5
5.5 Extracción del ARN por la técnica de Trizol. ....	5
5.6 PCR cuantitativa en tiempo real. ....	6
5.7 Análisis estadístico. ....	7
6. RESULTADOS .....	7
6.1 Características de los sujetos en estudios .....	7
6.2 Expresión relativa de AIM2, NLRP3, cGAS, STING, IFI16, ASC y NF-κB en pacientes con COVID19 leve.....	9
6.3 Expresión relativa de AIM2, NLRP3, cGAS, STING, IFI16, ASC y NF-κB en pacientes graves con COVID19.....	10
7. DISCUSIÓN .....	12
8. CONCLUSIONES.....	15
9. BIBLIOGRAFÍA.....	15
10. ANEXOS .....	21
11. GLOSARIO.....	34



# 1. INTRODUCCIÓN

El coronavirus del tipo 2, causante del síndrome respiratorio agudo severo coronavirus tipo 2 (SARS-CoV-2) es el agente causal de la enfermedad del coronavirus 2019 (COVID19) [1]. La ruta de entrada del SARS-CoV-2 a la célula huésped es mediante el uso del receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) presente en la superficie de la membrana de distintos tipos de células [2]. En la mayoría de los casos, las manifestaciones clínicas de la enfermedad de COVID19 se presenta en formas leves o asintomáticas, mientras que algunos pacientes llegan a desarrollar síntomas moderados y severos [3]. Actualmente, los factores inmunológicos que predisponen el desarrollo de las formas clínicas graves de la infección por SARS-CoV-2 no se conocen en su totalidad. Sin embargo, se ha observado una mayor concentración de citocinas pro-inflamatorias en pacientes con enfermedad grave y moderada en comparación a controles sanos [4]. En los casos graves presentan niveles elevados de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 e IL-8 en suero en comparación con pacientes con enfermedad leve [5]. Además, la expresión de IFN- $\gamma$  se observó considerablemente más baja en células T CD4+ de pacientes con enfermedad grave que en pacientes con enfermedad moderada. Los marcadores específicos de piroptosis, como Gasdermina D (GSDMD), lactato deshidrogenasa (LDH), IL-1RA e IL-18, se pudieron observar elevados en muestras de pacientes con COVID19 grave en comparación con aquellos con enfermedad leve o moderada. Además, los niveles de LDH, un marcador de muerte celular se correlacionó con la gravedad de la enfermedad de COVID19 [6]. Además, se ha informado que la respuesta del interferón tipo I (IFN) aumenta en pacientes con infección leve por SARS-CoV-2, mientras que disminuye en pacientes con infección grave [7, 8]. Del mismo modo, los pacientes con enfermedad grave mostraron una disminución en la transcripción de genes estimulados por interferón (ISG) y su estado clínico se asoció con la intensidad y cinética de respuesta a IFN tipo I [9]. Además, los pacientes con COVID19 que presentan enfermedad leve a moderada tienen un mayor grado de expresión de genes que codifican proteínas implicadas en las respuestas de tipo I y tipo II a IFN en comparación con los pacientes con enfermedad grave [9]. El aumento de los marcadores de inflamación y muerte celular, así como la disminución de la respuesta de IFN en

pacientes con COVID19 grave, sugiere que existe una alteración de receptores implicados en la activación del inflamasoma y la respuesta antiviral de IFN como IFI16, NLRP3, la vía c-GAS-STING y AIM2 en este tipo de pacientes durante la infección por SARS-CoV-2. Ausente en el melanoma 2 (AIM2) pertenece a los receptores similares a Aim2 (ALR), que son proteínas inducibles por IFN tipo I [10]. AIM2 reconoce dsDNA de distinto origen. Después de la detección del dsDNA, AIM2 se activa e inicia el montaje del inflamasoma AIM2, donde es de destacar que la señalización de IFN tipo I es esencial para su ensamblaje adecuado de este inflamasoma [11]. La activación del inflamasoma provoca la activación de caspasa-1 dependiente de ASC y la liberación de IL-1 $\beta$  e IL-18, y la muerte celular dependiente de Gasdermina D (GSDMD) en un proceso conocido como piroptosis [11-13]. Aunque, se ha informado el mecanismo de la activación de AIM2 por el virus de ARN [14, 15], el mecanismo preciso no está claro, sin embargo, se sabe que AIM2 no está directamente involucrado - en la detección de virus, sino más bien en la modulación de la actividad pulmonar inducida por lesión a causa de virus [14]. NLRP3 pertenece a la familia de receptores tipo NOD (NLR), que detecta una variedad de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y alarmas endógenas como ATP [16, 17]. Aunque la activación de NLRP3 también conduce a la activación del inflamasoma, así como AIM2, su actividad es inhibida por IFN tipo I [18, 19]. El virus SARS-CoV-2 induce la activación del inflamasoma NLRP3, a través de la acción de viroporinas virales, que son codificadas por el genoma del SARS-CoV-2 [20]. Se ha descrito que los monocitos de pacientes con COVID19 expresan tanto AIM2 y NLRP3 y que esta expresión se co-localiza con motas de ASC [20]. La activación excesiva de AIM2 es impedida por una isoforma de IFI16 denominada IFI16- $\beta$  que interactúa con AIM2 evitando la interacción AIM2-ASC o puede competir con AIM2 por su ligando. Una vez que IFI16 detecta, el ADN induce la producción de IFN tipo I a través de STING en cooperación con cGAS [21]. Además, la detección directa de ADN endógeno por la vía cGAS-STING promueve la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B e IFR3 y esto induce la secreción de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IFN, respectivamente [22, 23]. La infección por SARS-CoV-2 puede activar la vía cGAS-STING mediante la detección del ADN citoplasmático por parte del receptor cGAS [24, 25] o por la acumulación de angiotensina II debido a la baja expresión o ACE2 [26 - 28]. La sobreactivación de STING en pacientes

con COVID19 se relacionó con la hipercoagulación [29]. Finalmente, se sabe que los pacientes con COVID19 muestran una respuesta antiviral IFN tipo I reducida, y que en los pacientes con COVID-19 grave se encuentran niveles elevados de ADN libre en suero que se asocian con marcadores de muerte celular e inflamación [30]. Todos estos datos en conjunto sugieren que los receptores de ADN juegan un papel fundamental en el desarrollo de la gravedad de COVID19. Por lo que en este estudio exploramos la expresión de AIM2, IFI16, NLRP3, cGAS, STING, NF-kB y ASC en pacientes COVID19 con síntomas leves o graves en comparación con controles sanos para determinar la contribución de estas moléculas en la progresión de la COVID19.

## **2. JUSTIFICACIÓN**

La enfermedad de COVID19 provocada por el virus SARS-CoV-2 presenta diferentes grados de severidad, por lo que se ha sugerido que existen factores de susceptibilidad en los pacientes que contribuyen con una mayor patología pulmonar o multiorgánica y una mayor letalidad de la infección. El receptor de reconocimiento de patrones (RRP) AIM2 reconoce DNA de doble cadena (dsDNA) de diferentes orígenes, bacteriano, viral o endógeno. La activación de AIM2 induce el ensamblaje de una plataforma de proteínas que guía a la activación de la Caspasa-1 y a la maduración y secreción de IL-1 $\beta$  e IL-18, asimismo, a la muerte programada de las células por piroptosis. Sin embargo, también se ha descrito un papel antiinflamatorio de AIM2 debido a que inhibe la activación del factor NF-kB inducida por la activación de otros receptores de DNA como los implicados en la vía cGAS-STING y la activación de NF-kB se ha asociado con la severidad de la COVID19. En pacientes con COVID19 existe un aumento de DNA libre en circulación, así como una disminución de la respuesta a IFN en casos severos. Se ha observado que la activación de NF-kB, a su vez producto de la activación de receptores de DNA como los implicados en la vía cGAS-STING, se asocia con la severidad de la COVID19. De manera importante, AIM2 juega un papel antiinflamatorio debido a que inhibe la activación del factor NF-kB. Debido a que la expresión y activación de AIM2 depende de la señalización de IFN, en este estudio se determinará si la expresión relativa de AIM2,

así como de otros receptores de DNA citosólicos como IFI16, cGAS STING, NLRP3, la proteína ASC y el factor de transcripción NF- $\kappa$ B en células mononucleares de individuos control y pacientes con COVID19; varía con respecto a la severidad de la enfermedad. Este estudio nos permitirá entender los posibles mecanismos patogénicos relacionados con respuesta inflamatoria durante la infección por el virus SARS-CoV-2.

### **3. HIPÓTESIS**

La expresión relativa de AIM2 se encuentra disminuida en pacientes COVID19 grave.

La expresión relativa de IFI16, cGAS, STING, NLRP3, ASC y NF- $\kappa$ B se encuentra elevada en pacientes COVID19 leve.

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la expresión relativa de AIM2, IFI16, cGAS, STING, NLRP3, ASC y NF- $\kappa$ B en pacientes con COVID19 leve y grave e individuos control.

#### **4.1. OBJETIVOS PARTICULARES**

**4.1.1** Seleccionar un grupo de pacientes que sean positivos para COVID19 mediante la prueba de PCR para SARS-CoV-2.

**4.1.2** Aislar RNAm de muestra de sangre de pacientes positivos y sujetos control.

**4.1.3** Determinar la expresión relativa de AIM2, cGAS, STING, IFI16, NLRP3, ASC y NF- $\kappa$ B mediante PCR en tiempo real.

**4.1.4** Análisis de asociación de parámetros antropométricos y genes relacionados con inflamación y la síntesis de IFN.

**4.1.5** Análisis de asociación de Lactato Deshidrogenasa (LDH) y Proteína C Reactiva (PCR) y genes relacionados con inflamación y la síntesis de IFN.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Criterios de inclusión.**

Personas con prueba para SARS-CoV-2 positiva, sexo indistinto edad entre 18 a 65 años. Sin diagnóstico de Lupus Eritematoso Generalizado (LEG), Artritis Reumatoide (AR), influenza, dengue y/o cáncer. Las personas con prueba para SARS-CoV-2 positivas se clasificaron en dos grupos, con enfermedad leve y grave por los médicos especialistas de acuerdo con los criterios del Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto.

### **5.2 Criterios de exclusión (no inclusión).**

Mujeres que presenten embarazo, fumadores, que padezcan alcoholismo, que no firmen el consentimiento informado y la imposibilidad de obtener la muestra por punción venosa.

### **5.3 Criterios de eliminación.**

Contaminación de la muestra durante el transporte y/o procesamiento, retiro de la carta de consentimiento a participar en el estudio.

### **5.4 Purificación de células mononucleares de sangre venosa periférica (PBMC).**

Se realizó una dilución de la sangre venosa periférica (1:1) con solución salina de fosfatos (PBS), después se colocó esta sangre sobre 3mL de Ficoll-Hypaque, se centrifugó a 2500rpm por 20 minutos.

Posteriormente se realizó la extracción de la capa de células mononucleares (PBMC), se lavó con PBS dos veces, y se centrifugó a 1500rpm por 7 minutos. Se contaron las células mononucleares en una cámara de Neubauer utilizando azul de tripano.

### **5.5 Extracción del ARN por la técnica de Trizol.**

El ARN total de PBMC se aisló utilizando el reactivo Trizol (Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts; EE. UU.), las células PBMC obtenidas de la purificación se les agregó 1ml de Trizol y se agitaron vigorosamente en el vortex.

Se incubó durante 15 segundos a temperatura ambiente, se agregó cloroformo grado biología molecular, se agitó durante 15 segundos en el vortex, se incubó 7 minutos a

temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 11300 rpm por 15 minutos a una temperatura de 4°C.

Se obtuvo la fase acuosa, se agregó isopropanol frío y se mezcló por inversión 7 veces y se incubó a una temperatura de -20°C durante 24 horas, se centrifugó a 11300 rpm durante 15 minutos a una temperatura de 4°C, se eliminó el sobrenadante por decantación y al pellet obtenido se le agregó etanol al 75 por ciento. Se centrifugó a 8300 rpm durante 12 minutos a una temperatura de 4°C, se eliminó el sobrenadante con pipetas y se procedió a secar el poco etanol en el aparato Savant 10 minutos para eliminar el etanol restante el pellet obtenido fue resuspendido en 30 uL de agua libre de DNAsas y RNAsas.

Finalmente se evaluó la concentración y la pureza del RNA obtenido en un espectrofotómetro Nanodrop ND 10000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EE. UU.), tomando en cuenta una relación de absorbancia 260/280. Un valor mayor a 1.8 se consideró aceptable. La integridad del ARN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa.

### **5.6 PCR cuantitativa en tiempo real.**

Se utilizó 1 ug de ARN total para sintetizar ADNc usando Superscript II reverse transcriptasa (Invitrogen, Carlsbad, CA; EE. UU.) y cebador de hexámero aleatorio (Invitrogen, Carlsbad, CA; EE. UU.).

Los cebadores de PCR utilizados se diseñaron utilizando la herramienta bioinformática, PrimerQuest™ Tool de Integrated DNA Technologies IDT (Coralville, IA, EE. UU.) por Integrated DNA Technologies IDT, la secuencia de cada primer diseñado se encuentra en la tabla 2. La PCR cuantitativa en tiempo real se realizó utilizando iQ SYBR Green Master Mix (BioRad) en un termociclador LightCycler 480 II de Roche (Indianápolis, EE. UU.).

<b>Gen</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
GAPDH	5'-CTTTGGTATCGTGGAAGGACTC-3'	5'-AGTAGAGGCAGGGATGATGT-3'
AIM2	5'-TCGGCACAGTGGTTTCTTAG-3'	5'-GCTGAGTTTGAAGCGTGTTG-3'

cGAS	5'-GTATGTACCCAGAACCCTCAAG-3'	5'-GTCCTGAGGCACTGAAGAAA-3'
STING	5'-GGTGCCTGATAACCTGAGTATG -3'	5'-CTGTAAACCCGATCCTTGA-3'
NLRP3	5'-GAAGTGGACTGCGAGAAGTT-3'	5'-CGTTCGTCCTTCCTTCCTTT -3'
IFI16	5'-GGATGCAGATACTGAAGGAAGG-3'	5'-GAAACTGCTGCTTGGTGTTG-3'
ASC	5'- CAGCTTCTACCTGGAGACCTA-3'	5'- CCGGTGCTGGTCTATAAAGTG-3'
NF-κB	5'-GAGACATCCTTCCGCAAACCT-3'	5'-GGTCCTTCCTGCCATAATC-3'

**Tabla 2.** Secuencia de primers

El programa del ciclo de reacción. Las condiciones consistieron en un paso de precalentamiento a 95°C por 3 min, 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 15 seg, extensión a 60°C durante 60 seg. Cada muestra se analizó utilizando la versión de software LightCycler 480 1.5.0. La expresión relativa de cada gen se calculó utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  y se normalizó a GAPDH.

### 5.7 Análisis estadístico.

Los datos se analizaron utilizando Graph Pad Prism Software 5.0 (San Diego, California, EE. UU.). Se realizó la prueba de Shapiro-Wilk para determinar la normalidad de los datos. Se utilizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para comparar las diferencias entre dos grupos y las correlaciones entre variables (AIM2, IFI16, cGAS-STING, NLRP3, NF-κB y ASC) en cada grupo se evaluó mediante el análisis de correlación de matriz de Spearman. Se crearon gráficos de correlación con los paquetes corrplot para R. Cuando se obtuvo un valor de  $p < 0.05$  se consideró significativo.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Características de los sujetos en estudios

Se incluyeron a 13 personas mayores de 18 años con síntomas clínicos sugestivos de infección por COVID19 en este estudio. Firmaron un consentimiento informado antes de su ingreso a urgencias del Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto. Se recolectó una muestra de sangre en aquellos individuos con resultados positivos en la prueba RT-PCR de hisopado nasofaríngeo SARS-CoV-2 (Coronavirus 2019 Logix-Smart kit, Co-

Diagnostics Inc.), además se incluyeron a 12 personas aparentemente sanas que son negativos a la infección por SARS-CoV2 ( $40,6 \pm 13,4$  años, 6 mujeres y 6 hombres) firmaron un consentimiento informado y se inscribieron en este estudio (grupo control).

Los pacientes con COVID19 se clasificaron según sus manifestaciones clínicas en leves ( $n = 7$ ) y moderado ( $n = 6$ ). Los pacientes con síntomas leves ( $47,17 \pm 11,89$  años, 6 mujeres y 1 hombre) fueron ambulatorio y presentaban congestión nasal, dolor de cabeza, mialgia, anosmia, pero sin manifestaciones de neumonía, oxígeno saturación en reposo de  $96,00 \pm 0,30\%$  y frecuencia respiratoria de  $21,57 \pm 0,33$  respiraciones por minuto. Los individuos con síntomas graves ( $38,71 \pm 12,07$  años, 4 mujeres y 2 hombres) fueron hospitalizados, tuvieron neumonía y necesitaba oxígeno adicional a través de puntas nasales (una cánula de oxígeno) o una máscara. Además, mostraron saturación de oxígeno en reposo de  $91,33 \pm 0,8165\%$  y frecuencia respiratoria de  $26,33 \pm 1.211$  respiraciones por minuto y una Relación PaO<sub>2</sub> / FiO<sub>2</sub> igual a  $106,5 \pm 9,44$ . Los parámetros antropométricos y bioquímicos de todos los participantes se describe en la Tabla 1. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación del Hospital Central Ignacio Protocolo Morones Prieto (proyecto número 28-20).

Característica	Control (n=12)		Leve (n=7)		Grave (n=6)	
<b>Sexo</b>	Femenino 6 (50%)	Masculino 6 (50%)	Femenino 6 (86%)	Masculino 1 (14%)	Femenino 2 (33%)	Masculino 4 (67%)
<b>Edad (años)</b>	$35 \pm 3.22$		$31 \pm 4.56$		$42.5 \pm 4.85$	
<b>Parámetros Bioquímicos</b>						
Proteína C Reactiva (mg/L)	$6.8 \pm 26.68$		$5.6 \pm 8.641$		$32.48 \pm 37.38$	
Lactato Deshidrogenasa (U/L)	$205.5 \pm 106.3$		$474 \pm 54.33$		$356 \pm 65.27$	

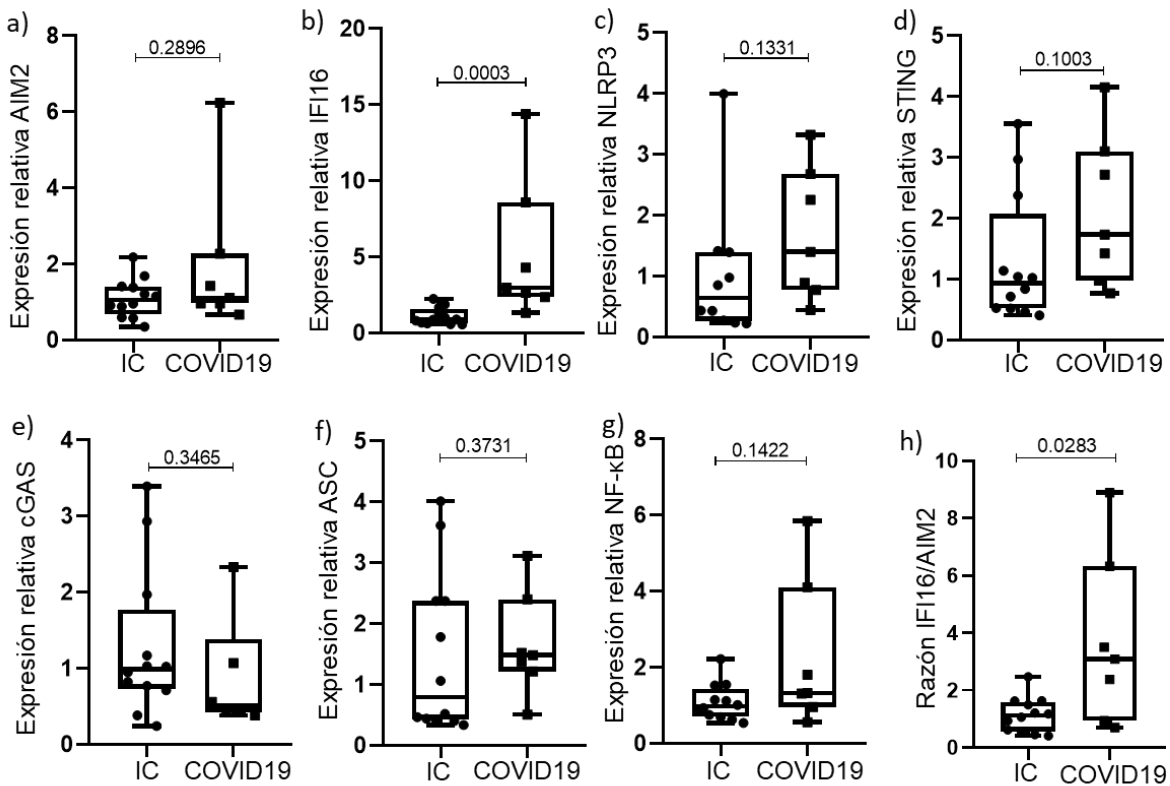
**Tabla 1.** Parámetros antropométricos y bioquímicos

Las muestras de sangre se procesaron usando las precauciones de seguridad recomendada en una instalación BSL-2 de la Unidad de Investigación Biomédica del Instituto Mexicano del Seguro Social, IMSS



## 6.2 Expresión relativa de AIM2, NLRP3, cGAS, STING, IFI16, ASC y NF-κB en pacientes con COVID19 leve.

Se observó un aumento en la expresión relativa de IFI16 y NLRP3 en pacientes con COVID19 con leves síntomas en comparación con controles sanos (Fig. 1b y 1c respectivamente). Además, la expresión de NF-κB fue aumentado en pacientes con COVID19 con manifestaciones leves; sin embargo, los datos no fueron estadísticamente significativos (Figura 1g). Por el contrario, la expresión de AIM2, STING, cGAS y ASC en pacientes con COVID19 fue como en los controles sanos (Fig. 1a, 1d, 1e y 1f, respectivamente). Finalmente, observamos un aumento en el IFI16/AIM2 proporción en pacientes con COVID19 con enfermedad leve (Fig. 1h)



**Figura 1.** Expresión relativa de AIM2, IFI16, NLRP3, STING, cGAS, ASC, NF-κB en pacientes con COVID19 leve vs individuos control (IC). La expresión relativa de a) AIM2, b) IFI16, c) NLRP3, d) STING, e) cGAS, f) ASC, g) NF-κB se determinó en PBMC del grupo control sano y pacientes con enfermedad leve de COVID19 por qPCR como se muestra en la sección de material y métodos. h) Se muestra la relación de expresión relativa IFI16/AIM2. En a) - h) los datos se presentan como un diagrama de caja y bigotes, en el que la caja consta de la mediana y la parte superior y el cuartil inferior y los bigotes representan los datos del extremo inferior y del extremo superior. La prueba U de Mann-Whitney se utilizó

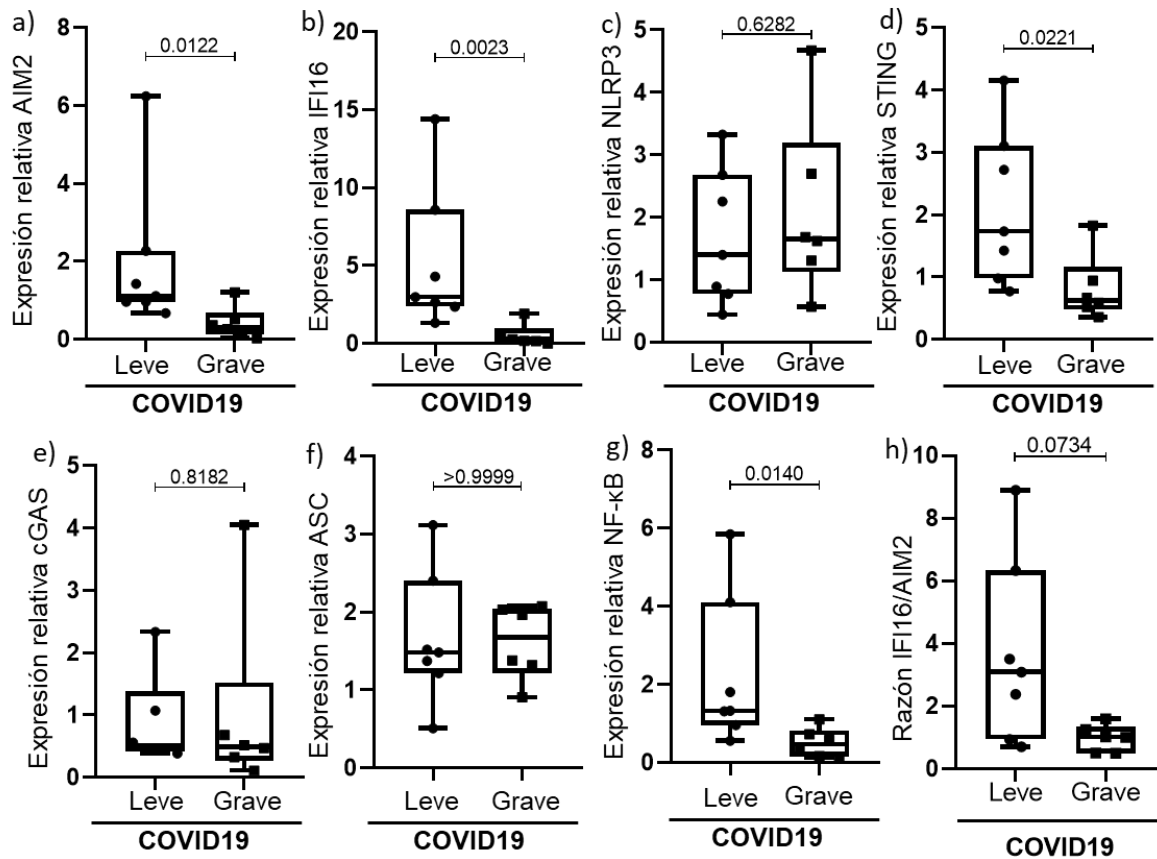
para el análisis estadístico. \* P <0,05 se consideró significativo. Los valores de p se presentan en líneas horizontales; un asterisco indica diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados.

### **6.3 Expresión relativa de AIM2, NLRP3, cGAS, STING, IFI16, ASC y NF-κB en pacientes graves con COVID19.**

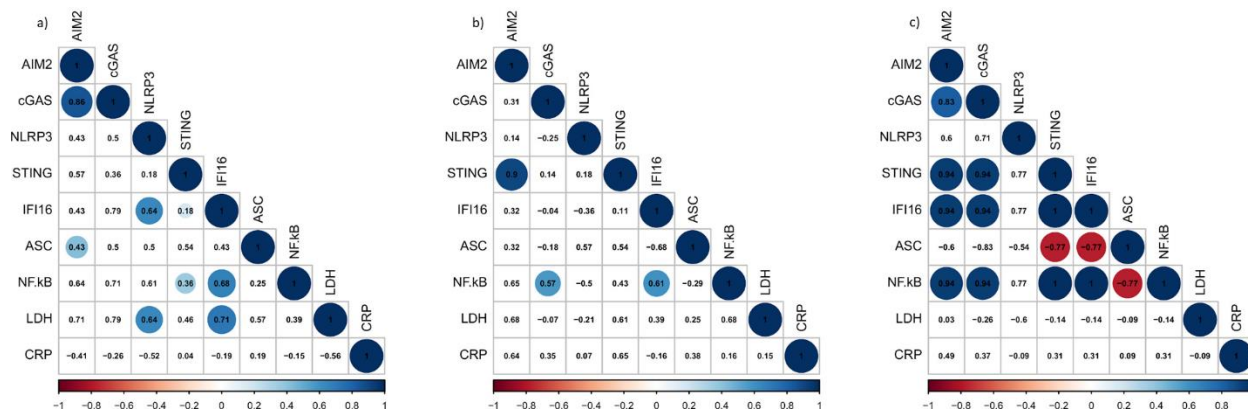
Se observó una disminución de la expresión relativa de AIM2, IFI16, STING y NF-κB en pacientes con COVID19 grave en comparación con aquellos pacientes con COVID19 leve (Fig. 2a, 2b, 2d y 2g, respectivamente). Por otro lado, la expresión relativa de NLRP3, cGAS y ASC fue similar entre los pacientes con COVID19 con síntomas leves y graves (Fig. 2c, 2e y 2f, respectivamente). Se observó una disminución en la relación IFI16 / AIM2 en pacientes con COVID19 grave (Fig. 2h).

*Análisis de matriz de correlación.* Para explorar las posibles interacciones entre las moléculas evaluadas en este estudio y así poder crear una hipótesis sobre la contribución del mecanismo de inflamación a la manifestación de COVID-19 leve o grave, se realizó un análisis de matriz de correlación de cada grupo. Nuestro análisis mostró que en el grupo control la expresión relativa de AIM2 se correlacionó directamente con cGAS, y la expresión relativa de NLRP3 se asoció con la expresión relativa de STING, IFI16 ASC, NF-κB y LDH. Encontramos una asociación directa entre la expresión relativa de STING e IFI16 y NF-κB. Además, la expresión relativa de STING se relacionó con ASC, y encontramos una correlación directa entre IFI16 y NF-κB y LDH. Finalmente, la expresión relativa de ASC se asoció directamente con la expresión relativa de LDH (Fig. 3a). En cuanto al grupo de pacientes COVID19 con síntomas leves observamos una asociación directa entre la expresión relativa de AIM2 y STING y una correlación directa entre la expresión relativa de NF-κB y cGAS e IFI16 (Figura 3b). Por otro lado, en pacientes COVID19 con síntomas severos encontramos una correlación positiva entre la expresión relativa de AIM2 y cGAS, STING, IFI16 y NF-κB. Además, la expresión relativa de cGAS se asoció directamente con STING, IFI16 y NF-κB; mientras que la expresión relativa de STING se asoció positivamente con IFI16 y NF-κB y se relacionó inversamente con ASC.

Finalmente, IFI16 fue directamente relacionado con NF- $\kappa$ B e inversamente relacionado con ASC (Fig. 3c).



**Figura 2.** Expresión relativa de AIM2, IFI16, NLRP3, STING, cGAS, ASC, NF- $\kappa$ B en pacientes con COVID-19. La expresión relativa de a) AIM2, b) IFI16, c) NLRP3, d) STING, e) cGAS, f) ASC, g) NF- $\kappa$ B se determinó en PBMC de pacientes con COVID19 con síntomas leves y graves por qPCR como se muestra en la sección de material y métodos. h) La razón de la expresión relativa de IFI16 y la expresión relativa de AIM2. En a) - h) los datos se presentan como un diagrama de caja y bigotes, en el que la caja consta de la mediana y el cuartil superior e inferior y los bigotes representan los datos del extremo inferior y del extremo superior. Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para el análisis estadístico. \* P <0,05 se consideró como significativo. Los valores de p se presentan en líneas horizontales; un asterisco indica estadísticamente significativas diferencias entre los grupos estudiados.



**Figura 3.** El Análisis de Correlación de la Matriz de Spearman para las variables incluidas en este estudio. a) Correlación de variables en el grupo de control. b) Correlación de variables en pacientes con COVID19 con síntomas leves. c) Correlación de variables en pacientes con COVID19 con síntomas graves. El número dentro de los círculos (rojo o azul) representan el valor del coeficiente de correlación (r) para cada par de variables. Si la correlación entre dos variables fue estadísticamente significativa, los círculos (rojo o azul) se colocan en la intersección entre las dos variables. Los círculos rojos representan una asociación inversa/negativa. Los círculos azules representan una asociación directa/positiva. La escala horizontal y la barra de color en la parte inferior indican la dirección (negativa o positiva) de los valores de correlación.

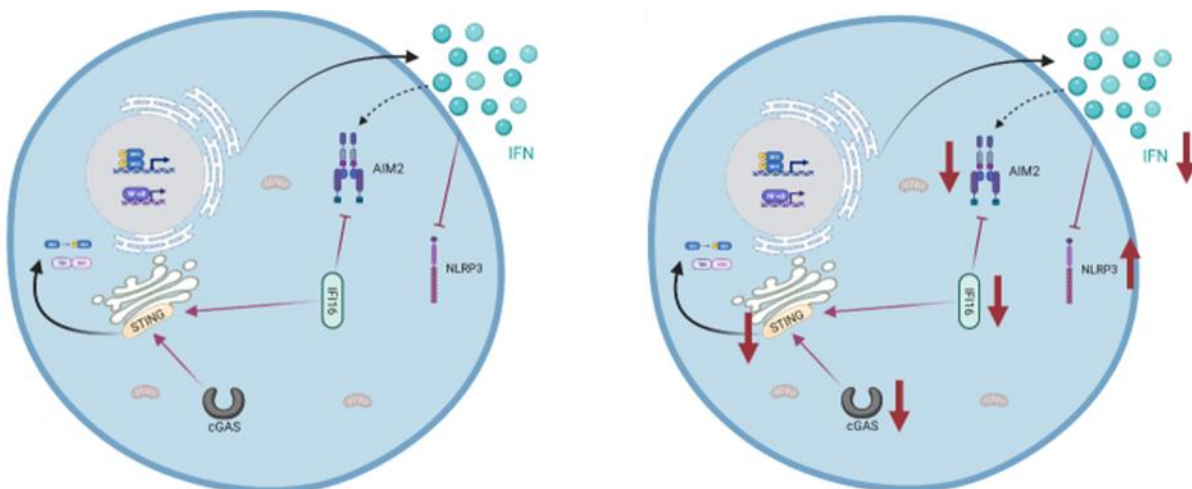
## 7. DISCUSIÓN

En este estudio, investigamos el patrón de expresión de diferentes receptores de ADN en pacientes con COVID19 leve y grave. Observamos que la expresión de IFI16, NLRP3 y NF- $\kappa$ B aumentó en pacientes con COVID19 con enfermedad leve mientras que en pacientes con síntomas severos la expresión relativa de AIM2, IFI16, STING y NF-kB se observó disminuida. En este sentido, se ha demostrado que la activación de IFI16 desencadena la activación de STING mediada por IRF3, que conduce a la producción de IFN- $\beta$ , que es fundamental para una correcta respuesta antiviral [31]. Se reportó previamente una regulación positiva de IFI16 en células sanguíneas en infecciones agudas por SARS-CoV-2 [32].

Aunque no se ha informado la detección directa de SARS-CoV2 por el receptor IFI16, la superposición entre los mecanismos de detección de ARN y ADN en la respuesta antiviral podrían ser cruciales para la infección por SARS-CoV2. Estudios previos

describieron niveles elevados de ADN libre en suero de pacientes con COVID19, probablemente debido a células muertas [30], que a su vez podría ser responsable de la activación del receptor IFI16. Además, La proteína nuclear (N), de la envoltura (E) y de la espiga (S) del SARS-CoV-2 promueven la activación del inflamasoma NLRP3 [33 - 35]. De hecho, se ha observado la expresión de NLRP3 co-localizada con cúmulos de ASC en monocitos de pacientes con COVID19 [20]. En este estudio, nuestros resultados muestran una correlación directa de NF- $\kappa$ B e IFI16 en pacientes con COVID19 con síntomas leves, así como una asociación positiva entre cGAS y NF- $\kappa$ B. Estos hallazgos son consistentes con estudios previos en los que se ha descrito la activación de cGAS [21] y NF- $\kappa$ B [22, 23] después de la activación de IFI16.

Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la enfermedad de COVID19 con síntomas leves se caracteriza por la activación de NLRP3, IFI16 que podría, a su vez, inducir la expresión de NF- $\kappa$ B y citocinas proinflamatorias. Por lo tanto, se sugiere que la inflamación durante la enfermedad de COVID19 es a inducida por NF- $\kappa$ B [9]. Además, el aumento de IFI16, NLRP3, NF- $\kappa$ B y la relación IFI16 / AIM2 y la ausencia de alteración de la expresión de AIM2, ASC cGAS-STING en pacientes con COVID19 leve sugieren que tanto el mecanismo antiviral (proinflamatorio) como el antiinflamatorio están activados (Fig. 4a)



**Figura 4.** Posible interacción y activación de receptores relacionados con los mecanismos antivirales (proinflamatorios) y antiinflamatorios en pacientes COVID19, a) se observa un esquema de la célula donde

se muestra de manera normal como interactúan las vías que se activan después del reconocimiento del DNA por parte de los receptores de DNA citosólicos y como influyen en la síntesis y liberación de citocinas pro-inflamatorias y antiinflamatorias, b) se observa un esquema de la célula donde se muestra de manera normal como interactúan las vías que se activan después del reconocimiento del DNA por parte de los receptores de DNA citosólicos y como influyen en la síntesis y liberación de citocinas pro-inflamatorias y antiinflamatorias en pacientes COVID19 graves.

Por el contrario, nuestro estudio mostró que la expresión de AIM2, IFI16, STING y NF-kB disminuyó en pacientes con síntomas graves de COVID19. En este sentido, se ha demostrado que los genes que codifican proteínas involucradas en las respuestas de IFN están regulados a la baja en pacientes con COVID19 con enfermedad grave, lo que resulta en una respuesta de IFN tipo I deteriorada [9].

Dado que el SARS-CoV-2 tiene una mayor susceptibilidad al tratamiento con interferón tipo I que la cepa SARS-CoV original, la alteración en la respuesta de IFN-tipo I durante COVID19 podría representar una estrategia de evasión de este virus [36]. De hecho, el SARS-CoV-2 expresa una variante truncada del gen ORF3b que muestra actividad anti-interferón [37]. Por lo tanto, la disminución de AIM2, IFI16, STING y NF-kB que se observa en pacientes con COVID19 con síntomas graves en este estudio podría ser una consecuencia de la reducción en la respuesta de IFN. Además, se encontró niveles más altos de marcador de inflamación (PCR) y del marcador de muerte celular (LDH) en pacientes con COVID19 con enfermedad grave, aunque no se observó una correlación significativa entre la expresión relativa de los receptores de ADN y los niveles de LDH, fenómeno que se presenta en el grupo de control. En este sentido, la activación de los receptores de ADN puede conducir a la liberación de LDH [38], la falta de correlación de los receptores de ADN con este marcador de muerte podría resultar de la disminución de su expresión. Se ha descrito que la expresión de AIM2 se asocia con un menor riesgo de hospitalización por COVID19 [20]. De manera similar, AIM2 se identificó como una molécula reguladora para modular respuestas inmunes exageradas en IAV [15]. Nuestros resultados muestran una asociación inversa entre IFI16, NF-kB y STING con ASC en pacientes con COVID19 grave. Esto es consistente con hallazgos previos en los que los autores revelaron que, aunque IFI16 y la expresión de AIM2 fue inducida por IFN,

IFI16 suprime la activación de caspasa-1 por AIM2-ASC y el inflamasoma NLRP3 [39]. De hecho, se ha sugerido que la relación entre la expresión de IFI16 y AIM2 podría definir la decisión entre la producción de IFN tipo I e IL-1 $\beta$  después de detectar dsDNA citosólico. En este sentido, observamos un aumento de la actividad de IFI16 en pacientes con COVID19 con síntomas leves, pero una reducción en pacientes con COVID19 grave. En este sentido, las actividades antiinflamatorias de IFI16 son dependientes sobre la liberación de IL-10 e IFN- $\beta$  [18]. La falta de un mecanismo antiviral de por parte del IFN y una retroalimentación negativa por parte de IL-10 aumente la gravedad de COVID19. Finalmente, es importante señalar que la expresión relativa de IFI16 y AIM2 fue baja en pacientes con COVID19 grave, y dado que ambos exhiben propiedades antiinflamatorias, podemos sugerir que los pacientes con COVID19 grave se caracterizan por niveles bajos de respuestas antivirales y antiinflamatorias (Figura 4b).

## **8. CONCLUSIONES**

En este estudio se demostró que en pacientes con COVID19 existe una alteración en la expresión de varios receptores de ADN, por lo que se sugiere que estos receptores se expresan de manera diferencial según los grados de severidad de la enfermedad. El aumento de la expresión de NLRP3, IFI16 y NF-kB en pacientes con COVID19 con síntomas leves podría implicar una respuesta inmune adecuada. Por otro lado, en pacientes de COVID19 con síntomas severos la disminución de la expresión de AIM2, IFI16, STING y NF-kB podría resultar en una respuesta antiviral inadecuada, así como una respuesta antiinflamatoria alterada, finalmente estos podrían participar en el mecanismo implicado en la gravedad de la enfermedad.

## **9. BIBLIOGRAFÍA**

1. Zhang T, Wu Q, Zhang Z. Probable Pangolin Origin of SARS-CoV-2 Associated with the COVID-19 Outbreak. *Curr Biol.* 2020;30(8):1578. doi:10.1016/j.cub.2020.03.063.
2. Xu H, Zhong L, Deng J, Peng J, Dan H, Zeng X et al. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *Int J Oral Sci.* 2020;12(1):8. doi:10.1038/s41368-020-0074-x.

3. Rabaan AA, Al-Ahmed SH, Haque S, Sah R, Tiwari R, Malik YS et al. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-COV: A comparative overview. *Infez Med.* 2020;28(2):174-84.
4. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020;395(10223):497-506. doi:10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
5. Qin C, Zhou L, Hu Z, Zhang S, Yang S, Tao Y et al. Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clin Infect Dis.* 2020;71(15):762-8. doi:10.1093/cid/ciaa248.
6. Wu C, Chen X, Cai Y, Xia J, Zhou X, Xu S et al. Risk Factors Associated With Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients With Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern Med.* 2020;180(7):934-43. doi:10.1001/jamainternmed.2020.0994.
7. Blanco-Melo D, Nilsson-Payant BE, Liu WC, Uhl S, Hoagland D, Moller R et al. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell.* 2020;181(5):1036-45 e9. doi:10.1016/j.cell.2020.04.026.
8. Chen G, Wu D, Guo W, Cao Y, Huang D, Wang H et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *J Clin Invest.* 2020;130(5):2620-9. doi:10.1172/JCI137244.
9. Hadjadj J, Yatim N, Barnabei L, Corneau A, Boussier J, Smith N et al. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science.* 2020;369(6504):718-24. doi:10.1126/science.abc6027.
10. Choubey D, Duan X, Dickerson E, Ponomareva L, Panchanathan R, Shen H et al. Interferon-inducible p200-family proteins as novel sensors of cytoplasmic DNA: role in inflammation and autoimmunity. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research.* 2010;30(6):371-80. doi:10.1089/jir.2009.0096.



11. Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, Bauernfeind F, Horvath G, Caffrey DR et al. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature*. 2009;458(7237):514-8. doi:10.1038/nature07725.
12. Broz P, von Moltke J, Jones JW, Vance RE, Monack DM. Differential requirement for Caspase-1 autoproteolysis in pathogen-induced cell death and cytokine processing. *Cell Host Microbe*. 2010;8(6):471-83. doi:10.1016/j.chom.2010.11.007.
13. Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7(2):99-109. doi:10.1038/nrmicro2070.
14. Zhang H, Luo J, Alcorn JF, Chen K, Fan S, Pilewski J et al. AIM2 Inflammasome Is Critical for Influenza-Induced Lung Injury and Mortality. *Journal of immunology*. 2017;198(11):4383-93. doi:10.4049/jimmunol.1600714.
15. Schattgen SA, Gao G, Kurt-Jones EA, Fitzgerald KA. Cutting Edge: DNA in the Lung Microenvironment during Influenza Virus Infection Tempers Inflammation by Engaging the DNA Sensor AIM2. *Journal of immunology*. 2016;196(1):29-33. doi:10.4049/jimmunol.1501048.
16. Dostert C, Pettrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science*. 2008;320(5876):674-7. doi:10.1126/science.1156995.
17. Zhao C, Zhao W. NLRP3 Inflammasome-A Key Player in Antiviral Responses. *Frontiers in immunology*. 2020;11:211. doi:10.3389/fimmu.2020.00211.
18. Guarda G, Braun M, Staehli F, Tardivel A, Mattmann C, Forster I et al. Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation. *Immunity*. 2011;34(2):213-23. doi:10.1016/j.immuni.2011.02.006.
19. Mishra BB, Rathinam VA, Martens GW, Martinot AJ, Kornfeld H, Fitzgerald KA et al. Nitric oxide controls the immunopathology of tuberculosis by inhibiting NLRP3 inflammasome-dependent processing of IL-1beta. *Nat Immunol*. 2013;14(1):52-60. doi:10.1038/ni.2474.

20. Junqueira C CA, Ranjbar S, Ingber J, Parry B, Ravid S, de Lacerda B, Lewandrowski M, Clark S, Ho F, Vora SM, Leger M, Beakes C, Margolin J, Russell N, Gehrke L, Das Adhikari U, Henderson L, Janssen E, Kwon D, Sander C, Abraham J, Filbin M, Marcia B. Goldberg, Hao Wu, Gautam Mehta, Steven Bell, Anne E. Goldfeld, Judy Lieberman. SARS-CoV-2 infects blood monocytes to activate NLRP3 and AIM2 inflammasomes, pyroptosis and cytokine release. medRxiv preprint. 2021. doi:<https://doi.org/10.1101/2021.03.06.21252796>.
21. Wang PH, Ye ZW, Deng JJ, Siu KL, Gao WW, Chaudhary V et al. Inhibition of AIM2 inflammasome activation by a novel transcript isoform of IFI16. EMBO Rep. 2018;19(10). doi:[10.15252/embr.201845737](https://doi.org/10.15252/embr.201845737).
22. Ablasser A, Chen ZJ. cGAS in action: Expanding roles in immunity and inflammation. Science. 2019;363(6431). doi:[10.1126/science.aat8657](https://doi.org/10.1126/science.aat8657).
23. Woo SR, Corrales L, Gajewski TF. The STING pathway and the T cell-inflamed tumor microenvironment. Trends Immunol. 2015;36(4):250-6. doi:[10.1016/j.it.2015.02.003](https://doi.org/10.1016/j.it.2015.02.003).
24. Zhou Z, Zhang X, Lei X, Xiao X, Jiao T, Ma R et al. Sensing of cytoplasmic chromatin by cGAS activates innate immune response in SARS-CoV-2 infection. Signal Transduct Target Ther. 2021;6(1):382. doi:[10.1038/s41392-021-00800-3](https://doi.org/10.1038/s41392-021-00800-3).
25. Zhang Y, Chen W, Wang Y. STING is an essential regulator of heart inflammation and fibrosis in mice with pathological cardiac hypertrophy via endoplasmic reticulum (ER) stress. Biomed Pharmacother. 2020;125:110022. doi:[10.1016/j.biopha.2020.110022](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110022).
26. Imai Y, Kuba K, Penninger JM. The discovery of angiotensin-converting enzyme 2 and its role in acute lung injury in mice. Exp Physiol. 2008;93(5):543-8. doi:[10.1113/expphysiol.2007.040048](https://doi.org/10.1113/expphysiol.2007.040048).
27. Haga S, Yamamoto N, Nakai-Murakami C, Osawa Y, Tokunaga K, Sata T et al. Modulation of TNF-alpha-converting enzyme by the spike protein of SARS-CoV and ACE2 induces TNF-alpha production and facilitates viral entry. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(22):7809-14. doi:[10.1073/pnas.0711241105](https://doi.org/10.1073/pnas.0711241105).

28. Berthelot JM, Liote F. COVID-19 as a STING disorder with delayed over-secretion of interferon-beta. *EBioMedicine*. 2020;56:102801. doi:10.1016/j.ebiom.2020.102801.
29. Berthelot JM, Drouet L, Liote F. Kawasaki-like diseases and thrombotic coagulopathy in COVID-19: delayed over-activation of the STING pathway? *Emerg Microbes Infect*. 2020;9(1):1514-22. doi:10.1080/22221751.2020.1785336.
30. Zuo Y, Yalavarthi S, Shi H, Gockman K, Zuo M, Madison JA et al. Neutrophil extracellular traps in COVID-19. *JCI Insight*. 2020;5(11). doi:10.1172/jci.insight.138999.
31. Dell'Oste V, Gatti D, Giorgio AG, Gariglio M, Landolfo S, De Andrea M. The interferon-inducible DNA-sensor protein IFI16: a key player in the antiviral response. *New Microbiol*. 2015;38(1):5-20.
32. Yang CA, Huang YL, Chiang BL. Innate immune response analysis in COVID-19 and kawasaki disease reveals MIS-C predictors. *J Formos Med Assoc*. 2021. doi:10.1016/j.jfma.2021.06.009.
33. Pan P, Shen M, Yu Z, Ge W, Chen K, Tian M et al. SARS-CoV-2 N protein promotes NLRP3 inflammasome activation to induce hyperinflammation. *Nature communications*. 2021;12(1):4664. doi:10.1038/s41467-021-25015-6.
34. Ratajczak MZ, Bujko K, Ciechanowicz A, Sielatycka K, Cymer M, Marlicz W et al. SARS-CoV-2 Entry Receptor ACE2 Is Expressed on Very Small CD45(-) Precursors of Hematopoietic and Endothelial Cells and in Response to Virus Spike Protein Activates the Nlrp3 Inflammasome. *Stem Cell Rev Rep*. 2021;17(1):266-77. doi:10.1007/s12015-020-10010-z.
35. Yalcinkaya M, Liu W, Islam MN, Kotini AG, Gusarova GA, Fidler TP et al. Modulation of the NLRP3 inflammasome by Sars-CoV-2 Envelope protein. *Scientific reports*. 2021;11(1):24432. doi:10.1038/s41598-021-04133-7.
36. Lokugamage KG, Hage A, de Vries M, Valero-Jimenez AM, Schindewolf C, Dittmann M et al. SARS-CoV-2 is sensitive to type I interferon pretreatment. *bioRxiv*. 2020. doi:10.1101/2020.03.07.982264.

37. Konno Y, Kimura I, Uriu K, Fukushi M, Irie T, Koyanagi Y et al. SARS-CoV-2 ORF3b Is a Potent Interferon Antagonist Whose Activity Is Increased by a Naturally Occurring Elongation Variant. *Cell Rep.* 2020;32(12):108185. doi:10.1016/j.celrep.2020.108185.
38. Wang S, Liu D, Ning W, Xu A. Cytosolic dsDNA triggers apoptosis and pro-inflammatory cytokine production in normal human melanocytes. *Exp Dermatol.* 2015;24(4):298-300. doi:10.1111/exd.12621.
39. Veeranki S, Duan X, Panchanathan R, Liu H, Choubey D. IFI16 protein mediates the anti-inflammatory actions of the type-I interferons through suppression of activation of caspase-1 by inflammasomes. *PloS one.* 2011;6(10):e27040. doi:10.1371/journal.pone.0027040.

## 10. ANEXOS

### 1. Carta de consentimiento o carta de confidencialidad

#### DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL PACIENTE HOSPITAL CENTRAL “DR. IGNACIO MORONES PRIETO”

DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA

PACIENTE ADULTO

TÍTULO DEL PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN	
Participación del inflammasoma AIM2 en el estado clínico de individuos infectados con SARS-CoV-2	
Nº REGISTRO DEL PROTOCOLO AUTORIZADO ANTE EL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN	PERIODO DE EJECUCIÓN DEL PROTOCOLO AUTORIZADO
28-20	01/09/2020 - 02/09/2021
INVESTIGADORES RESPONSABLES EN EL HOSPITAL	ADSCRIPCIÓN DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL
Dr. Martín Magaña Aquino Dr. Emmanuel Rivera López	División de Medicina Interna Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”
CO-INVESTIGADORES	ADSCRIPCIÓN DEL INVESTIGADOR RESPONSABLE
Dra. Diana Patricia Portales Pérez Q.F.B. Estefanía Juárez Carrillo	Facultad de Ciencias Químicas Universidad Autónoma de San Luis Potosí
FECHA DE LA PRESENTACIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO	
Nº DE IDENTIFICACIÓN DEL PACIENTE	

#### Objetivos y justificación del estudio.

La División de Medicina Interna del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” realiza un protocolo o estudio de investigación para estudiar la participación del inflammasoma AIM2 en la gravedad de los síntomas de individuos infectados con SARS-CoV-2.

El objetivo del estudio es el medir el nivel en que se expresa la molécula AIM2 en sangre, y si tiene relación con la gravedad de la enfermedad COVID-19, causada por el virus SARS-CoV-2. En este estudio de investigación se determinará si la presencia de AIM2 contribuye con la severidad de la COVID-19. Ayudará a poder establecer porque la COVID-19 presenta diferentes grados de severidad, presentándose en algunas personas con síntomas leves, en otras con síntomas moderados o graves.

Los resultados de este proyecto pueden ayudar a comprender de mejor manera su enfermedad y en un futuro contribuir para realizar un mejor diagnóstico acerca de la severidad de la COVID-19 de manera más rápida y que el médico pueda actuar oportunamente.

### **Información para el paciente.**

La enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) es una enfermedad que afecta principalmente a las vías respiratorias y puede provocar distintos síntomas, entre ellos: fiebre, tos seca, dificultad para respirar, dolor de cabeza, dolor de garganta, dolor muscular, confusión, y en algunos casos diarrea. Esta enfermedad es causada por un virus llamado SARS-Cov-2. Actualmente esta enfermedad se encuentra con transmisión activa en nuestro país, así como en gran parte del mundo.

La molécula AIM2 es un receptor que reconoce DNA de diferentes orígenes. El DNA es una molécula que contiene la información genética de un organismo, y se encuentra en todas las células, bacterias o virus. En un estudio previo se observó que durante la infección por influenza A, la ausencia del receptor AIM2 incremento el paso de células inflamatorias al pulmón y aumentó la gravedad de la infección. La contribución de AIM2 en las formas graves de la COVID-19 no ha sido identificada.

Debido a que las personas con infección por SARS-Cov-2 pueden cursar con diferentes etapas de gravedad de la COVID-19, se sugiere que existen pacientes que presentan susceptibilidad a desarrollar problemas de una inflamación exacerbada en su cuerpo, que se caracteriza por elevación de proteínas de inflamación en sangre que llevan a la falla de todos los órganos del cuerpo.

## **¿Por qué ha sido invitado a participar en este estudio?**

Usted ha sido invitado a participar en este estudio porque hay sospecha de tener la COVID-19 en base a sus síntomas clínicos y la valoración médica, tiene edad de 18 años o más, no padece enfermedades del sistema de defensa del organismo (inmunológico) y no usa tratamientos que alteren la respuesta del sistema inmunológico. Además, como parte de su atención médica, se le ha tomado una muestra confirmatoria para la detección del SARS-Cov-2 mediante PCR.

En este estudio se incluirán 90 pacientes y se realizará por parte de la División de Medicina Interna del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” en las áreas de “Triage Respiratorio”, “UCRIN”, “UCRA” y salas de Medicina Interna. Se incluirán 30 pacientes con síntomas leves, 30 con síntomas moderados y 30 graves.

### **Participación voluntaria y retiro del estudio.**

Su participación en este estudio es absolutamente voluntaria y usted ha sido invitado a participar debido a las características de su enfermedad, es decir, de los síntomas y resultados de la revisión que realizó su médico y de los análisis y/o estudios que se le han realizado para diagnosticar su enfermedad que es la COVID- 19.

Usted está en la libertad de negarse a participar en este estudio de investigación; pero si decide participar, en cualquier momento y sin necesidad de dar ninguna explicación, usted puede revocar o anular el consentimiento que ahora firma. Su decisión de participar o no, no afectará de ninguna forma el trato médico que reciba en la institución para su enfermedad.

Si decide terminar su participación en este estudio, deberá comunicarlo al Dr. Martín Magaña Aquino o el Dr. Emmanuel Rivera López, quienes le proporcionarán un documento (formato) muy sencillo en el que usted pondrá algunos de sus datos e indicará que ya no desea participar en el estudio.

Procedimientos a los que se someterá durante su participación en el estudio. Si usted acepta participar le pediremos que lea cuidadosamente el presente documento de consentimiento informado y que haga todas las preguntas necesarias al médico

investigador responsable el Dr. Martín Magaña Aquino, al co-investigador el Dr. Emmanuel Rivera López o al colaborador que le explique este consentimiento informado, para que pueda resolver sus dudas. Cuando ya no tenga alguna duda con respecto a lo que se hará en este estudio, le pediremos autorización para que firme su aceptación de participar al final de este documento.

Le pediremos autorización para realizar una entrevista y revisar su expediente clínico a usted o su familiar responsable, para obtener información sobre sintomatología de la COVID-19; antecedentes de otras enfermedades (enfermedades autoinmunes, cáncer, diabetes, hipertensión, enfermedades respiratorias, enfermedades del corazón); uso de tabaco o alcohol y actividad física; signos vitales (presión arterial, frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, saturación de oxígeno, peso, estatura, circunferencia de la cintura); y estudios de laboratorio realizados (colesterol HDL, triglicéridos, hemoglobina glucosilada A1c, insulina y glucosa en ayuno).

Antes de que su médico le haya dado el tratamiento para controlar los síntomas de la COVID-19 se le tomará una muestra de sangre venosa adicional a la que el médico necesite para su atención médica, la cual será usada para este estudio. En este sentido, usted solamente sentirá una presión suave sobre el brazo. Este procedimiento no pone en riesgo su salud.

Para mantener sus datos anónimos, se le asignará un código con el que únicamente los médicos investigadores que participan en este estudio podrán saber su identidad.

### **Procesamiento que tendrá la muestra de sangre.**

Una vez tomada la muestra esta será trasladada al Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina (CICSaB), para llevar a cabo un proceso de separación de los glóbulos blancos y se almacenará a una temperatura de -80 grados centígrados. En caso de que la prueba salga negativa, su muestra de sangre será destruida y no se seguirá con el proceso.



En caso de que se confirme la presencia de SARS-Cov-2 mediante la prueba de PCR, se seguirá con el procesamiento de la muestra. Las células blancas obtenidas serán tratadas para poder identificar la molécula AIM2 en la Unidad de Investigación Biomédica de Zacatecas (UIBMZ) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

Es importante mencionar que este estudio sólo identificará la presencia de la molécula AIM2 y no se realizará ningún estudio o manipulación de la muestra diferente a la antes mencionada.

### **Beneficios para el paciente y/o sociedad por participar en el estudio.**

El paciente no recibirá ningún beneficio directo o inmediato cuando se realice esta evaluación. Sin embargo, estará colaborando con el área de investigación de la División de Medicina Interna del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” en colaboración del CICSaB y la UIBMZ. Este estudio busca una posible explicación del porque la COVID19 presenta diferentes grados de severidad, presentándose en algunas personas síntomas leves, en otras con síntomas moderados y graves. Esto podría beneficiar a identificar tempranamente a los pacientes que desarrollarán una enfermedad grave.

### **Potenciales riesgos y/o molestias previstas para el paciente.**

Los peligros potenciales que implican su participan en este estudio son mínimos. Si alguna de las preguntas que le realizarán la hicieran sentir incómoda, tiene el derecho de no responderla. No se han reportado efectos secundarios graves de dar una muestra de sangre. Usted puede experimentar dolor leve, moretones, irritación o enrojecimiento en el sitio de la punción o en casos extremos si se pone muy nervioso/a sentir que se desmaya. En casos muy raros puede desarrollarse una infección. El personal que realizará este procedimiento está capacitado para realizarlo adecuadamente, para responder cualquier duda que tuviera y para atender cualquier molestia o posible complicación.

En el remoto caso de que sintiera alguna otra molestia generada por la investigación, es necesario notificarla inmediatamente al Dr. Martín Magaña Aquino, quien se encargará de proporcionarle la atención necesaria, la cual no generará ningún costo adicional a la que requiera la atención médica por esta enfermedad.

### **Costos y pagos por su participación en el estudio.**

El material necesario para la toma, resguardo, transporte y procesamiento de su muestra para la medición de AIM2 no generarán ningún costo adicional para usted ni para el Hospital. De igual manera, usted no recibirá ningún pago por participar en el estudio.

### **Consideraciones Éticas.**

Este estudio se considera de riesgo mínimo debido a que los investigadores responsables de este estudio no tomarán decisiones referentes a su tratamiento y únicamente le solicitarán los autorice a realizar la toma de sangre venosa de su brazo en una ocasión, que será en el momento en se realice la valoración médica y se establezca la sospecha de tener la COVID-19. Su muestra se mantendrá en resguardo y se procesará después de que se haya confirmado el resultado positivo por PCR para SARS-Cov-2. Le solicitamos también su autorización para revisar su expediente clínico, únicamente tomaremos la información que le mencionamos previamente.

Existen instituciones u organismos mexicanos como la Secretaría de Salud, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos sanitarios (COFEPRIS), la Comisión Nacional de Bioética (CONBIOETICA) o incluso el Comité de Ética en Investigación (CEI) de este hospital, que se encargan de vigilar el buen manejo de los datos personales y médicos que usted y los demás pacientes han autorizado para que sean utilizados en la realización de estudios de investigación como el presente. Estas instituciones u organismos pueden solicitar en cualquier momento a los investigadores de este estudio, la revisión de los procedimientos que se realizan con su información y con sus mediciones, con la finalidad de verificar que se haga un uso correcto y ético de los mismos; por lo que podrán tener acceso a esta información que ha sido previamente asignada con un código de identificación, cuando así lo requieran.

### **Privacidad o Confidencialidad.**

La información personal y médica obtenida de usted en este estudio es de carácter confidencial y será utilizada únicamente por el equipo de investigación de este proyecto

para analizar y complementar los resultados obtenidos y no estará disponible para ningún otro propósito. Esta información se conjuntará con la de otros participantes para realizar el presente estudio. Con la finalidad de mantener el anonimato, se le asignará un código para el uso de sus datos.

Si usted así lo decide, los investigadores responsables de este estudio le podrán informar a su médico tratante que usted ha aceptado participar en este estudio, para que la información que se obtenga sea incluida en su expediente clínico. Con esta finalidad, le pediremos que indique al final de este documento si está o no de acuerdo en lo anterior.

Los resultados de este estudio podrán ser publicados con fines científicos en revistas especiales dirigidas al personal médico, de enfermería químicos e investigadores relacionados con el área de la salud con la finalidad de que conozcan la participación de AIM2 en la severidad de la COVID-19 y utilizar esta medición como parte del diagnóstico oportuno y temprano de posibles alteraciones y complicaciones durante el tratamiento de la COVID-19. Los resultados de este estudio también podrán ser presentados en reuniones científicas en las que se discuten los nuevos hallazgos que se han obtenido de este y otros estudios relacionados con la salud y el tratamiento de pacientes con su mismo diagnóstico. Los datos clínicos de todas las participantes se presentarán de forma anónima y de tal manera que usted o cualquiera de las pacientes que participen en este estudio no podrán ser identificadas.

De acuerdo a la Ley General de Protección de Datos Personales en Posesión de Sujetos Obligados y a Ley de Protección de Datos Personales del estado de San Luis Potosí, sus datos personales no podrán tratarse, transferirse o utilizarse para fines no descritos expresamente en este documento, a menos que sea estrictamente necesario para el ejercicio y cumplimiento de las atribuciones y obligaciones expresamente previstas en las normas que regulan la actuación de los investigadores responsables del estudio; se dé cumplimiento a un mandato legal; sea necesarios por razones de seguridad pública, orden público, salud pública o salvaguarda de derechos de terceros.

Cualquier otro uso que se requiera para el uso de sus datos o análisis o manejo de sus muestras y/o resultados de los análisis que se describen en este documento, deberá ser informado y solicitado con la debida justificación al Comité de Ética en Investigación de

este Hospital, quien determinará la pertinencia de la solicitud y en su caso, autorizará un uso diferente para sus datos, muestras y/o productos derivados de sus muestras y/o resultados. Siempre en apego a los lineamientos y normas legislativos nacionales e internacionales y en beneficio y protección de la integridad de los actores participantes.

**Disponibilidad de la información y compromiso de respuesta a preguntas y dudas.**

Usted tiene derecho a realizar cualquier pregunta, duda o aclaración sobre su participación en este estudio o sobre alguna reacción adversa relacionada con la toma de muestra que se le realizó, en cualquier momento del estudio.

Se le entregará una copia del presente documento de consentimiento informado firmado por los investigadores, donde se incluyen los datos de contacto de los investigadores responsables y del Comité de Ética en Investigación de este hospital para aclarar cualquier duda que pudiese surgir.

En caso de cualquier duda referente a su participación en el estudio usted puede comunicarse con:

Dr. Martín Magaña Aquino

División de Medicina Interna

Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”

Av. Venustiano Carranza 2395, Zona Universitaria, San Luis Potosí, S.L.P., C.P. 78290,

Tel. 8342763 ext. 1490

Dr. Emmanuel Rivera López

División de Medicina Interna

Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”

Av. Venustiano Carranza 2395, Zona Universitaria, San Luis Potosí, S.L.P., C.P. 78290,

Tel. 8342763 ext. 1490

Dra. Diana Patricia Portales Pérez

Facultad de Ciencias Químicas Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Av. Dr. Manuel Nava 6, Zona Universitaria, C.P. 78210. Tel. 8262440 ext. 6465

Q.F.B. Estefanía Juárez Carrillo

Facultad de Ciencias Químicas Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Av. Dr. Manuel Nava No.6 - Zona Universitaria, C.P. 78210. Tel. 4931365523

Si usted tiene alguna pregunta con respecto a sus derechos como participante en el estudio de investigación, también puede ponerse en contacto con una persona no involucrada con el equipo de investigadores de este estudio:

Dr. Juan José Ortiz Zamudio

Presidente del Comité de Ética en Investigación Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto" Av. Venustiano Carranza 2395, Col. Zona Universitaria, San Luis Potosí, S.L.P., C.P. 78290, Tel (52-444) 8 34 27 01, Ext. 1710

### **Aceptación del documento de Consentimiento Informado**

Si usted desea participar de manera voluntaria en esta investigación, por favor proporcione su nombre, firma y fecha este documento en los espacios proporcionados en la parte inferior. Su firma significa que usted acepta lo siguiente:

1. Se me ha dado la información completa y adecuada en forma verbal y por escrito sobre el objetivo del estudio y me han explicado los riesgos y beneficios de participar en lenguaje claro.
2. Se me ha informado que puedo retirar mi consentimiento y terminar mi participación en este estudio en cualquier momento sin afectar mi derecho a recibir atención médica.
3. Es mi responsabilidad preguntar para aclarar cualquier punto que no entienda en relación a mi participación en este estudio. He hecho todas las preguntas a la persona que realiza el proceso de consentimiento y he recibido respuestas satisfactorias.
4. No he ocultado o distorsionado cualquier condición médica actual o cualquier antecedente médico relacionado con mi salud. He respondido todas las preguntas en relación a mi salud en forma precisa y verdadera.
5. Soy mayor de edad y legalmente capaz de dar este consentimiento.
6. Acepto participar en este estudio de manera voluntaria sin que me haya presionado u obligado. Entiendo que mi negación a participar o la discontinuación de mi participación en cualquier momento, no implicará penalidad o pérdida de beneficios a los que de otra forma tengo derecho.
7. Entiendo y estoy de acuerdo en que la información obtenida a partir del presente estudio puede ser utilizada para la publicación de estos resultados con fines académicos como parte de la divulgación científica y como apoyo a la práctica clínica, pero que en todo momento se utilizará un código asignado para mantener mi anonimato y la confidencialidad de mis datos.
8. Me han explicado que la información personal y clínica que he consentido en proporcionar, conservará mi privacidad y que se utilizará solo para los fines que deriven de este estudio.
9. Los investigadores que participan en este proyecto se han comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio en el

momento en el que lo solicite y me entregarán una copia de este documento de consentimiento informado.

Por medio del presente documento de consentimiento informado acepto participar en el estudio de investigación denominado “Participación del inflammasoma AIM2 en el estado clínico de individuos infectados con SARS-CoV-2”, de manera libre y voluntaria.

<b>NOMBRE DEL PACIENTE</b>		<b>FIRMA DE ACEPTACIÓN DEL PACIENTE</b>	
<b>FECHA DE LA OBTENCIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO</b>			
<b>NOMBRE DEL REPRESENTANTE LEGAL (si es necesario)</b>		<b>FIRMA DE ACEPTACIÓN DEL REPRESENTANTE LEGAL</b>	
<b>FECHA DE LA OBTENCIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO</b>		<b>PARENTESCO</b>	
<b>DIRECCIÓN / TELÉFONO DE CONTACTO DEL TESTIGO 1</b>			
<b>NOMBRE DEL TESTIGO 1</b>		<b>FIRMA DEL TESTIGO 1</b>	
<b>FECHA</b>		<b>PARENTESCO</b>	
<b>DIRECCIÓN / TELÉFONO DE CONTACTO DEL TESTIGO 1</b>			

<b>NOMBRE DEL TESTIGO 2</b>		<b>FIRMA DEL TESTIGO 2</b>	
<b>FECHA</b>		<b>PARENTESCO</b>	
<b>DIRECCION / TELÉFONO DE CONTACTO DEL TESTIGO 2</b>			

(nombre y firma de quien obtiene el consentimiento informado) <b>COLABORADOR</b>	

<b>Dr. Martín Magaña Aquino</b>		<b>Dr. Emmanuel Rivera López</b>	
<b>INVESTIGADOR PRINCIPAL</b> División de Medicina Interna Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto Cédula profesional: 3278788		<b>CO-INVESTIGADOR EN EL HOSPITAL</b> División de Medicina Interna Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto Cédula profesional: 4320011	

<b>Dra. Diana Patricia Portales Pérez</b>		<b>Q.F.B. Estefanía Juárez Carrillo</b>	
<b>CO-INVESTIGADORA</b> Facultad de Ciencias Químicas Universidad Autónoma de San Luis Potosí Cédula profesional: 5063111		<b>CO-INVESTIGADORA</b> Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas Facultad de Ciencias Químicas Universidad Autónoma de San Luis Potosí Cédula profesional: 12142946	



## REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO

Manifiesto al Investigador Principal, el Dr. Martín Magaña Aquino que es mi voluntad revocar el consentimiento informado que he aceptado el día, para participar en el protocolo de Investigación titulado “Participación del inflammasoma AIM2 en el estado clínico de individuos infectados con SARS-CoV-2”.

Es mi derecho solicitar que mis datos clínicos y personales, así como los resultados de las pruebas que me han realizado hasta el momento sean eliminadas de esta investigación y ya no sean incluidas en los resultados finales y los reportes o publicaciones que se generarán de este estudio de investigación.

<b>NOMBRE DEL PACIENTE</b>	<b>FIRMA DEL PACIENTE</b>
<b>FECHA DE LA REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO</b>	

<b>NOMBRE DEL TESTIGO 1</b>	<b>FIRMA DEL TESTIGO 1</b>
<b>FECHA DE LA REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO</b>	
<b>NOMBRE DEL TESTIGO 2</b>	<b>FIRMA DEL TESTIGO 2</b>
<b>FECHA DE LA REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO</b>	

<b>Dr. Martín Magaña Aquino</b> <b>INVESTIGADOR PRINCIPAL EN EL HOSPITAL</b> División de Medicina Interna Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” Cédula profesional: 3278788
---

## **11. GLOSARIO**

**AIM2.-** Ausente en el melanoma 2.

**IFI16.-** Proteína inducible por interferón gamma 16.

**cGAS.-** GMP-AMP sintasa cíclica.

**STING.-** Proteína estimulador de genes de interferón.

**NLRP3.-** Proteína receptores tipo NOD 3.

**ASC.-** Proteína adaptadora asociada a la apoptosis.

**NF-κB.-** Complejo proteico que controla la transcripción del ADN.

**IFN.-** Interferón

**GSDMD.-** Gasdermina D.

**COVID19.-** Enfermedad de coronavirus 19

**SARS-CoV-2.-** Síndrome Respiratorio Agudo Severo Coronavirus 2