



# La tormenta de Citoquinas en la enfermedad COVID-19 de pacientes críticos.

## The cytokine storm in critically ill COVID-19 patients.

---

ELENA BUSTAMANTE MUNGUITA  
HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE VALLADOLID  
AVDA/ RAMON Y CAJAL, 3-47003- VALLADOLID  
[EBUSTAMANTE@SALUDCASTILLAYLEON.ES](mailto:EBUSTAMANTE@SALUDCASTILLAYLEON.ES)  
[HTTPS://ORCID.ORG/0000-0002-5657-9547](https://ORCID.ORG/0000-0002-5657-9547)

MARIANO SÁNCHEZ CRESPO  
IBGM (INSTITUTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR)  
C/ SANZ Y FORES, 3-47003-VALLADOLID  
[MSCRES@IBGM.UVA.ES](mailto:MSCRES@IBGM.UVA.ES)  
[HTTPS://ORCID.ORG/0000-0002-6149-154X](https://ORCID.ORG/0000-0002-6149-154X)

MARÍA BUSTAMANTE MUNGUITA  
HOSPITAL CLINICO UNIVERSITARIO DE VALLADOLID  
AVDA/ RAMON Y CAJAL, 3-47003-VALLADOLID  
[EBUSTAMANTE@SALUDCASTILLAYLEON.ES](mailto:EBUSTAMANTE@SALUDCASTILLAYLEON.ES)

Bustamante Munguira, Elena; Sánchez Crespo, Mariano; Bustamante Munguira, María (2024). *Anales de la Real Academia de Medicina y Cirugía de Valladolid*, volumen 58: 71-87. DOI: <https://doi.org/10.24197/pky00829>

Artículo de acceso abierto distribuido bajo una [Licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional \(CC-BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). / Open access article under a [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC-BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

---

**Resumen:** La pandemia por SARS-CoV-2 es un problema sanitario a nivel mundial. El virus cursa con cuadros clínicos variables, desde pacientes asintomáticos hasta neumonía con distrés respiratorio del adulto y fallo multiorgánico.

Este estudio pretende analizar mediante mecanismos moleculares, si los factores de transcripción activados durante la respuesta a proteínas mal plegadas, SXPB1, mantienen la transcripción de genes que codifican las citoquinas que intervienen en la hiperinflamación asociada a la tormenta de citoquinas.

Estudiamos en muestras nasofaríngeas y aspirados bronquiales de pacientes con (60) y sin (59) Covid-19 ingresados en una unidad de críticos, la presencia o ausencia de infección activa y sXPB1. El SARS-CoV-2 presenta mecanismos patogénicos, así como manejo diagnóstico y terapéutico no

conocido, pretendemos estudiar la implicación de TLR 7/8 y SxBP 1 en la sepsis viral perfilar el paisaje transcripcional y controlar la cascada inflamatoria, identificando un factor patogénico proporcionando un biomarcador pronóstico temprano.

**Palabras clave:** COVID-19; citocinas; hiperinflamación; ssRNA; TLR8.

**Abstract:** The SARS-CoV-2 pandemic is a global health problem. The virus manifests with variable clinical outcomes, ranging from asymptomatic patients to pneumonia with adult respiratory distress and multi-organ failure. This study aims to analyze, through molecular mechanisms, whether the transcription factors activated during the response to misfolded proteins, SxBP1, maintain the transcription of genes encoding cytokines involved in the hyperinflammation associated with the cytokine storm. We studied, in nasopharyngeal samples and bronchial aspirates from patients

**Keywords:** COVID-19; citocinas; hiperinflamación; ssRNA; TLR8.

---

## INTRODUCCIÓN

El coronavirus SARS-CoV-2 apareció a finales de 2019 en Asia, desde dónde se extendió rápidamente por todo el mundo causando una pandemia

Al igual que otros integrantes de la familia de los coronavirus, este virus causa diversas manifestaciones clínicas englobadas bajo el término COVID-19, incluyendo cuadros respiratorios que varían desde el resfriado común hasta episodios de neumonía grave con síndrome de distrés respiratorio, shock séptico y fallo multiorgánico <sup>(1)</sup>.

La incidencia de neumonía grave y síndrome distrés respiratorio del adulto (SDRA) entre pacientes que precisan de ingreso hospitalario por neumonía asociada a COVID-19 alcanza en algunas series el 41.8%, con tasas de mortalidad de aproximadamente el 50%. Los factores que se asocian a un mayor riesgo de mortalidad son la edad, la neutrofilia y la concurrencia de disfunción orgánica y coagulopatía <sup>(2)</sup>.

La patogénesis del COVID-19 es, en su mayoría, desconocida. La síntesis y liberación exagerada de citoquinas y la activación de la respuesta celular inmune parece jugar un papel relevante en el desarrollo de lesión en órganos diana. La formación y liberación excesiva de citoquinas resulta del aumento brusco en los niveles circulantes de varias citoquinas proinflamatorias como interleukina-6 (IL6), IL1, IL18, TNF- $\alpha$  e interferón

gamma (IFN- $\gamma$ ). Este pico en la concentración circulante de citoquinas induce la llegada al lugar de la infección de macrófagos, neutrófilos y células T, causando extenso daño tisular a través de la lesión directa del endotelio vascular, daño capilar y alveolar y disrupción de la barrera vascular, precipitando el desarrollo de disfunción multiorgánica. A nivel respiratorio, la tormenta de citoquinas induce lesión pulmonar aguda y SDRA en los casos más severos.

En varios estudios observacionales publicados hasta el momento se ha observado una correlación significativa entre los niveles plasmáticos de estas citoquinas proinflamatorias como IL6, IL10 y TNF- $\alpha$  y una mayor mortalidad en pacientes con neumonía asociada a COVID-19. Adicionalmente, la severidad del daño pulmonar se ha visto asociada también al incremento de neutrófilos, células encargadas de la producción de citoquinas, en síndromes similares como el Síndrome Respiratoria de Oriente Medio (Middle-East Respiratory Syndrome, MERS).

Esta respuesta inflamatoria exagerada se perpetua por la persistencia de la colonización por SARS-CoV-2. Un reciente estudio ha revelado que el sexo masculino, el retraso en el ingreso hospitalario tras el inicio de la clínica y el uso de ventilación mecánica invasiva son factores asociados con la persistencia prolongada de RNA de SARS-CoV-2. Tanto el sexo masculino como la necesidad de ventilación mecánica son dos factores especialmente frecuentes en pacientes con SDRA asociado a COVID-19, exponiendo a esta población a una tormenta de citoquinas prolongada en el tiempo debido a un aclaramiento reducido de la carga viral.

El uso que hacen los virus de la maquinaria de traducción del huésped para producir sus materiales sobrecarga muchas funciones celulares, incluido el plegamiento de proteínas y la secreción en el retículo endoplásmico (RE). Dado que solo las proteínas correctamente plegadas deben salir del RE para mantener la homeostasis, las células organizan una respuesta dirigida a retener y degradar las proteínas defectuosas. Esto implica una vía de señalización intracelular denominada respuesta de proteína desplegada (UPR) (3-5). La UPR incluye una regulación a la baja de la síntesis global de proteínas, la degradación de algunas proteínas y la inducción transcripcional de genes específicos asociados con la actividad de sus tres ramas. El más conservado depende de la actividad dual de la enzima 1 $\alpha$  (IRE1 $\alpha$ ) que muestra actividades de proteína quinasa y

ribonucleasa (RNasa) (6). La actividad de la RNasa escinde un fragmento de 26 bases del ARNm de la transcripción preformada de la proteína de unión a X-box-1 (XBP1), que es seguido por la ligadura de los exones resultantes para producir sXBP1. Esto impulsa la traducción del factor funcionalmente activo sXBP1 que transactiva los genes que codifican las proteínas proinflamatorias (7), el modificador similar a la ubiquitina ISG15 y las citoquinas IFN $\beta$ , IL-6, IL-23 y TNF $\alpha$  (8-11).

Aunque el objetivo de la UPR es aliviar el estrés del RE, la rama IRE1 $\alpha$ -XBP1 contribuye a la patogénesis de muchas dolencias, es decir, cáncer, aterosclerosis, infecciones y enfermedades autoinmunes (12-15). Investigaciones recientes han revelado que la rama IRE1 $\alpha$ -XBP1 mejora la transcripción viral y contribuye a mantener los genomas virales latentes en una gran cantidad de infecciones (16, 17).

La noción de que las ramas UPR pueden mediar en el reconocimiento inmunológico de los virus e impulsar la lesión pulmonar a través de la inflamación mediada por el estrés del RE fue revelada por Hrincius et al. (18), quienes reportaron la activación de la UPR por infección con cepas pandémicas del virus de influenza A.

Se ha encontrado evidencia de actividad de sXBP1 en monocitos de pacientes con COVID-19 (19, 20), lo que sugiere una activación selectiva de la rama IRE1 $\alpha$ -XBP1 en un marco de tiempo diferente al asociado con la rama PERK-eIF2 $\alpha$ -ATF4-CHOP. En cambio, sXBP1 sostiene la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-6, IFN $\beta$  y TNF $\alpha$  (8). Se han reportado resultados similares sobre la inducción de IL23A, el gen que codifica la cadena p19 de la citocina proinflamatoria IL-23, tras la activación de TLR2 y dectina-1 por el sustituto fúngico zymosan (10). El agonista de TLR7 imiquimod también indujo la expresión de Il23a en células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón en presencia de palmitato mediante un mecanismo que involucra estrés mitocondrial y sXBP1 (11).

Estos hallazgos indican que la señalización de TLR podría impulsar la activación de IRE1 $\alpha$ -XBP1 durante la infección por SARS-CoV-2 y exacerbar la hiperinflamación (21). El papel de la tormenta de citoquinas en la enfermedad de COVID-19 está respaldado por el efecto beneficioso de tocilizumab, un anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano humanizado (22). Esto es notable dada la dependencia de la producción de

IL-6 en la rama IRE1 $\alpha$ -XBP1 (8) y la presencia en el promotor proximal de IL6 de al menos seis secuencias de unión a sXBP1 (23).

La participación plausible del tandem TLR7/8 en la enfermedad de COVID-19 se deriva de su capacidad para unirse al ARN monocatenario de sentido positivo (+ssRNA) como el ARN del SARS-CoV-2, y de los informes clínicos que muestran que la pérdida de las variantes de función en el TLR7 cromosómico X conducen a respuestas de IFN de tipo I y II alteradas asociadas con la enfermedad grave por COVID-19 en pacientes jóvenes (29).

## 1. JUSTIFICACION.

El propósito de este estudio ha sido determinar si el compromiso de TLR7/8 y sXBP1 pueden contribuir a la sepsis viral en la enfermedad de COVID-19. Con este fin, se estudiaron hisopos nasofaríngeos y aspirados broncoalveolares (BAS) en los pacientes ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) de Hospital Universitario. Durante la tercera y cuarta ola pandémica, 60 pacientes con covid 19 y 59 pacientes con infección bacteriana y sin covid, para abordar la presencia de sXBP1, la firma de citoquinas y la expresión de marcadores de células de linaje monocítico y enzimas involucradas en el metabolismo energético. Después de perfilar el paisaje transcripcional.

Todo ello se realizó con fines terapéuticos, tanto para el control de la cascada inflamatoria, poder ser capaces con ello de frenar la progresión de la inflamación / infección viral, así como identificar un factor patogénico que pudiera proporcionar un biomarcador pronóstico temprano.

Se postula identificar el desencadenante de la activación de la tormenta de citoquinas, en las muestras faríngeas y alveolares de pacientes críticos, a causa del covid-19, Tratando con ello de mejorar su manejo y pronóstico, identificando un factor patogénico que pueda proporcionar un biomarcador pronóstico temprano desde la activación de TC a través del receptor TLR8 y el sistema IRE1L-XBP1.

## 2.OBJETIVOS.

Estudiar e identificar los pasos involucrados en el desencadenante / activación de la tormenta de citoquinas, para poder intervenir, amortiguar

y/o evitar dicha respuesta con el consiguiente efecto deletéreo que sobre el paciente tiene.

El principal objetivo de este estudio es analizar, mediante estudios de mecanismos moleculares, si los factores de transcripción activados durante la UPR, en particular sXBP1, mantienen la transcripción de genes que codifican las citoquinas que intervienen en la hiperinflamación asociada a la TC.

### **3. OBJETIVOS SECUNDARIOS.**

- Identificar perfil de pacientes con viremia elevada en plasma subsidiarios de optimización terapéutica, medicina personalizada que sea capaz de mejorar la morbilidad de dichos pacientes.
- Identificación y caracterización de factores de riesgo y pronóstico de la enfermedad COVID-19.
- Definir abordajes terapéuticos en los que se bloquee de forma combinada el efecto de varias citoquinas.
- Respuesta inmunológica al virus SARS\_Cov-2 durante la respuesta inmunitaria, umbral protector.
- caracterización de enzimas involucradas en el metabolismo y la identificación de huellas de diferenciación de linaje mieloide.

### **4. MATERIAL Y MÉTODO.**

Los pacientes a estudio fueron aquellos pacientes ingresados en la UCI del Hospital Universitario, durante la tercera y cuarta ola pandémica. (Desde Julio -Noviembre 2020), en total se incluyeron 60 pacientes con covid (26 mujeres y 34 varones) y 59 pacientes sin covid (36 mujeres y 23 varones).

Se obtuvieron muestras de nasofaringe de pacientes con síntomas compatibles con infección por SARS-CoV-2 así como broncoaspiados traqueales (BAS) en pacientes en ventilación mecánica invasiva. Las muestras se obtuvieron tan pronto como los pacientes fueron intubados y se aspiraron las secreciones pulmonares, Tanto en los pacientes con covid como sin covid. Esto permite la obtención de material a nivel alveolar y bronquiolo respiratorio. Los BAS se transfirieron directamente al kit de

extracción de ADN/ARN MagMAX Pathogen RNA/DNA (Applied Biosystems) para la máquina de extracción automatizada Kingfisher Flex (Thermo Fisher Scientific).

El diagnóstico de la infección se realizó mediante el TaqPath<sup>TM</sup> COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit de Applied Biosystems, que se dirige a regiones de ORF-1ab, proteína de pico (S) y proteína de nucleocápside (N) seleccionadas con el fin de mantener la especificidad y reducir el riesgo de mutación

([https://aslm.org/wpcontent/uploads/2020/05/ThermoFisher\\_TaqPathCOVID19\\_CEIVD\\_KIT.pdf](https://aslm.org/wpcontent/uploads/2020/05/ThermoFisher_TaqPathCOVID19_CEIVD_KIT.pdf)).

El diagnóstico de la infección se confirmó mediante el análisis de muestras recogidas cuatro días después de una prueba positiva, se obtuvieron broncoaspirados de pacientes sin COVID-19 a partir de muestras recogidas para diagnóstico microbiológico en pacientes que sufrián neumonía bacteriana que requerían soporte ventilatorio invasivo e intubación en la UCI.

Se llevó a cabo mediante RT-PCR utilizando cebadores fuera de la región empalmada. Las condiciones de PCR fueron 5 min a 95°C (hot start), 45 ciclos de desnaturalización a 95°C por 15 s, hibridación a 60°C por 20 s y elongación a 72°C por 1 min. La extensión final se llevó a cabo a 72°C durante 5 min. La electroforesis en gel se llevó a cabo en agarosa al 3 % y las bandas sXBP1 y uXBP1 se visualizaron mediante tinción con GelRed y se cuantificaron con GelDoc Go Image System (Bio-Rad).

El ARN total obtenido por extracción automática se utilizó para las reacciones de RT. El ADNc resultante se amplificó en un equipo LightCycler 480 utilizando una mezcla SYBR Green I que contenía polimerasa Hot Start. Las condiciones de ciclo se adaptaron a cada conjunto de cebadores. ACTB se usó como un gen doméstico para evaluar la abundancia relativa de los diferentes ARNm usando el método de umbral de ciclo comparativo. El procedimiento se utilizó para analizar XBP1, DDIT3, ERDJ4, EDEM1, HERPUD1, HSPA5, ASNS, CTH, IL1B, IL6, IL10, IL23A, TNF, SLC25A11, GLUT1, HK2, PFKB3, PDK4, IDH2, SDHA, MDH2, HIF1A, TLR7, TLR8, HLA-DRB1, CD300E, CCR2, MMP9.

## 5. RESULTADOS.

Los ensayos iniciales se realizaron en muestras nasofaríngeas de pacientes que recibieron asistencia médica por síntomas compatibles con la enfermedad COVID-19. El análisis demográfico de los pacientes con SARS-CoV-2 RT-PCR positivo mostró que eran mayores que aquello que tenían una prueba negativa (Figura 1A).

Se observaron signos radiológicos de neumonía en 31 de los 60 pacientes con una prueba positiva de RT-PCR para la infección por SARS-CoV-2, mientras que solo 5 de los 59 mostraron neumonía en la cohorte negativa de COVID-19 (Tabla complementaria 1) ... El ARN extraído se usó principalmente para el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 y el material residual se usó para el ensayo de sXBP1 mediante ensayos de RT-PCR.

Esto implica la separación de los productos de la PCR por electroforesis en gel de agarosa y análisis densitométrico de las bandas teñidas. sXBP1 se distingue de XBP1 no empalmado (uXBP1) por su migración más rápida. La posición de los cebadores y la región empalmada se muestran en la Figura 1B. Estos corresponden a la secuencia de GenBank NM\_001079539.2, que se diferencia de la secuencia de uXBP1 NM\_005080.4 por la delección de 26 nucleótidos. La secuenciación separada de las bandas confirmó el empalme (Figura 1C).

Una matriz seleccionada al azar de muestras positivas y negativas de RT-PCR muestra la presencia de uXBP1 y sXBP1 (Figura 1D).

La presencia de tres bandas en algunos casos se explica por la formación de heterodúplex (30). sXBP1 se detectó en el 17,91 % de los pacientes con SARS-CoV-2 negativo y en el 40,32 % de los pacientes con SARS-CoV-2 positivo (Figura 1E).

La cuantificación de sXBP1 mostró valores más altos en pacientes positivos para COVID-19 en comparación con los negativos (Figura 1F). La incidencia de sXBP1 fue similar en hombres y mujeres (Figura 1G) y aumentó con la edad (Figura 1H). Se observó mortalidad en cuatro pacientes que presentaron un grado de empalme superior al 10% del total de XBP1 (Figura 1I).

Estos hallazgos muestran que sXBP1 exhibe una mayor frecuencia y extensión en los exudados nasofaríngeos de pacientes con infección activa por SARS-CoV-2, particularmente en pacientes moribundos.

La incidencia de sXBP1 fue similar en hombres y mujeres (Figura 1G) y aumentó con la edad (Figura 1H).

Se observó mortalidad en cuatro pacientes que presentaron un grado de empalme superior al 10% del total de XBP1 (Figura 1I). incidencia de sXBP1 fue similar en hombres y mujeres (Figura 1G) y aumentó con la edad (Figura 1H). Se observó mortalidad en cuatro pacientes que presentaron un grado de empalme superior al 10%.

## 6. DISCUSIÓN.

Los puntos de vista patogénicos actuales sobre la neumonía por COVID-19 se centran tanto en la hiperinflamación como en la respuesta adaptativa deficiente estudio de las secreciones respiratorias permiten la identificación de patógenos y también pueden dar pistas sobre la patogenia. Este enfoque se ha aplicado a la enfermedad de COVID-19 después de los estudios fundamentales de Zhou et al. (25), quienes utilizaron la broncoscopia y el lavado para identificar los tipos de células inmunitarias en el tracto respiratorio. Nuestro estudio se centró en pacientes con soporte ventilatorio mecánico cuyas muestras se obtuvieron durante la atención habitual por parte del personal asistencial Estudio de los BAS para evaluar el perfil transcripcional del tracto respiratorio inferior en pacientes con COVID-19 en estado crítico. Nuestros resultados mostraron grados más altos de sXBP1 en la enfermedad por COVID-19 que en pacientes con infección sin SARS-CoV-2, aunque los niveles de ARNm de citoquinas proinflamatorias fueron más altos en pacientes con neumonía bacteriana. Esto no fue del todo inesperado, ya que la sepsis viral depende de la genética y las condiciones fisiológicas y los pacientes con COVID-19 recibieron esteroides en un horario regular. Además, los pacientes con COVID-19 mostraron una mortalidad global inferior a la observada en la neumonía bacteriana. En particular, la inhibición de la RNasa IRE1 $\alpha$  a través de la activación de S1R por fluvoxamina protegió a los ratones de la mortalidad durante la endotoxemia y la producción de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-12 p40 por parte de los leucocitos humanos (14). De acuerdo con los resultados experimentales, el tratamiento temprano con fluvoxamina en personas con enfermedad leve de COVID-19 se asoció con una reducción de los signos de deterioro clínico.

Los objetivos secundarios del estudio fueron la caracterización de enzimas involucradas en el metabolismo y la identificación de huellas de diferenciación de linaje mieloide. El cribado metabólico sugirió una glucólisis activa durante la infección por SARS-CoV-2 respaldada por HIF1 y elementos de la lanzadera de malato-aspartato. Sin embargo, el predominio de las enzimas glucolíticas no puede interpretarse directamente como una prueba de la glucólisis aeróbica o del efecto Warburg dado el compromiso del suministro de O<sub>2</sub> asociado con la neumonía. La fuerte inducción de ARNm de IRG1/ACOD1 concuerda con los efectos de IFN<sup>(26,27)</sup>. En particular, el itaconato del producto ACOD1 ejerce actividad antiviral y se considera un objetivo farmacológico para contrarrestar la hiperinflamación.

Las células epiteliales de pulmón muestran una producción limitada de citocinas en respuesta al SARS-CoV-2, aunque pueden participar en las vías antivirales de oligoadenilato sintetasa-ribonucleasa L y proteína cinasa R. Esto explica por qué las células de linaje monocítico se consideran actores clave de la respuesta inmune innata. Los BAS de pacientes con infección activa mostraron una baja expresión de marcadores asociados con la presentación de antígenos, señales de supervivencia y MX1 durante la infección activa.

Fue notable la baja expresión de ARNm de HLA-DRB1, el gen que codifica la subunidad  $\beta$  más prevalente de HLA-DR. Esto concuerda con la disminución de la expresión de HLA-DR en monocitos de sangre periférica de pacientes con COVID-19, lo que provoca hiperinflamación y presentación defectuosa del antígeno mediada por IL-6.

Por el contrario, el aumento de la expresión de ARNm de TMPRSS2 concuerda con el papel facilitador de esta proteasa transmembrana en la infección viral al escindir la glicoproteína S viral. De manera reveladora, los polimorfismos de un solo nucleótido en el locus 21q22.3 dentro de TMPRSS2 y cerca de los genes MX1 se han asociado con la enfermedad grave por COVID-19. El mecanismo por el cual los patrones virales activan las células monocíticas es objeto de una intensa investigación. Las células inmunes no expresan ACE2 o TMPRSS2, aunque pueden contener incluso más secuencias de ARN viral que las células epiteliales<sup>(20)</sup>. Del mismo modo, los monocitos pueden ser inducidos durante la infección por SARS-CoV-2 para que expresen

citocinas proinflamatorias mediante un mecanismo indirecto iniciado por la unión de la proteína del pico del SARS-CoV-2 a la plaqueta CD42b que implica la activación de la P-selectina y CD40L e impulsa la señalización de los monocitos a través de la P- ligando-1 de glicoproteína de selectina y CD40.

La interacción directa de las células dendríticas convencionales con el SARS-CoV-2 regula a la baja la expresión de los genes implicados en la presentación de antígenos y aumenta la respuesta proinflamatoria, imitando así el agotamiento inmunitario y la hiperinflamación observados en los pacientes. Además de los informes clínicos sobre el papel de TLR7, los estudios experimentales respaldan la participación de los TLR. TLR7 y TLR8 son genes duplicados en tandem en el cromosoma X, cuya función muestra similitudes y especificidades. TLR8 no es funcional en ratones, y TLR7 expresado en pDC y monocitos produce una tormenta de citoquinas impulsada por IFN tipo I en la influenza murina grave. Mientras que TLR7 está presente en monocitos, macrófagos y pDC, la expresión de TLR8 es un sello distintivo de las MDDC humanas.

El ARN rico en GU de la proteína espiga del SARS-CoV-2 desencadenó la mayor respuesta inflamatoria en los macrófagos humanos a través de TLR8 en comparación con el ssRNA40 derivado del VIH. En particular, el ssRNA derivado del SARS-CoV-2 activó el inflamasoma y produjo la secreción de IL-1 $\beta$ .

Nuestros estudios BAS e in vitro muestran a TLR8 como un elemento central en el reconocimiento del virus +ssRNA y sugiere una participación única de MDDC y TLR8 en el empalme y la hiperinflamación de XBP1.

Imiquimod indujo un conjunto limitado de respuestas MDDC. Sin embargo, fue notable su efecto sobre el metabolismo energético, que mimetizaba el efecto del LPS. El efecto sobre las citoquinas proinflamatorias y sXBP1 fue insignificante y solo alcanzó valores significativos en presencia de palmitato. Cabe destacar que la combinación con IXA4 indujo sXBP1 pero no aumentó la expresión de citoquinas.

Desafortunadamente, nuestro estudio no responde preguntas abiertas sobre el papel real de TLR7 en la inmunopatología y la defensa del SARS-CoV-2. Un estudio reciente mostró que, si bien algunas variantes de TLR7 exhiben una fuerte pérdida de función en la producción de IFN tipo I, otras

variantes solo tienen un efecto marginal, lo que sugiere que TLR7 da forma a la respuesta antiviral a través de mecanismos adicionales (28). Nuestros datos concuerdan con Ito et al. hallazgos (29), quien fue el primero en revelar que el agonista de TLR7/TLR8 R848 era 100 veces más potente que el imiquimod en MDDC humanos.

La unión de sXBP1 a los promotores IL1B, IL6 y TNF inducida por ssRNA40, junto con el efecto sólido de la modulación farmacológica de la actividad de la RNasa IRE1 $\alpha$  en la expresión de citoquinas, indica además que la rama IRE1 $\alpha$ -XBP1 sustenta la producción de citoquinas a través de TLR8. Estos resultados se asignan a las capacidades de TLR8 informadas anteriormente para TLR2 y TLR4, donde se requiere sXBP1 para la producción sostenida de citocinas proinflamatorias.

## 7. CONCLUSIONES.

Se trata de una enfermedad nueva, desconocida y con gran repercusión a nivel mundial, que debe ser más estudiada.

La implicación de TLR7/8 y SXBP1 contribuyen a la sepsis viral, perfilar el paisaje transcripcional, nos ayuda a controlar la cascada inflamatoria, identificar un factor patogénico y proporcionar un biomarcador pronóstico temprano.

Durante la infección viral, los niveles de ARNm de ILB e IL6 fueron significativamente más bajos que los detectados en la neumonía relacionada con covid-19.

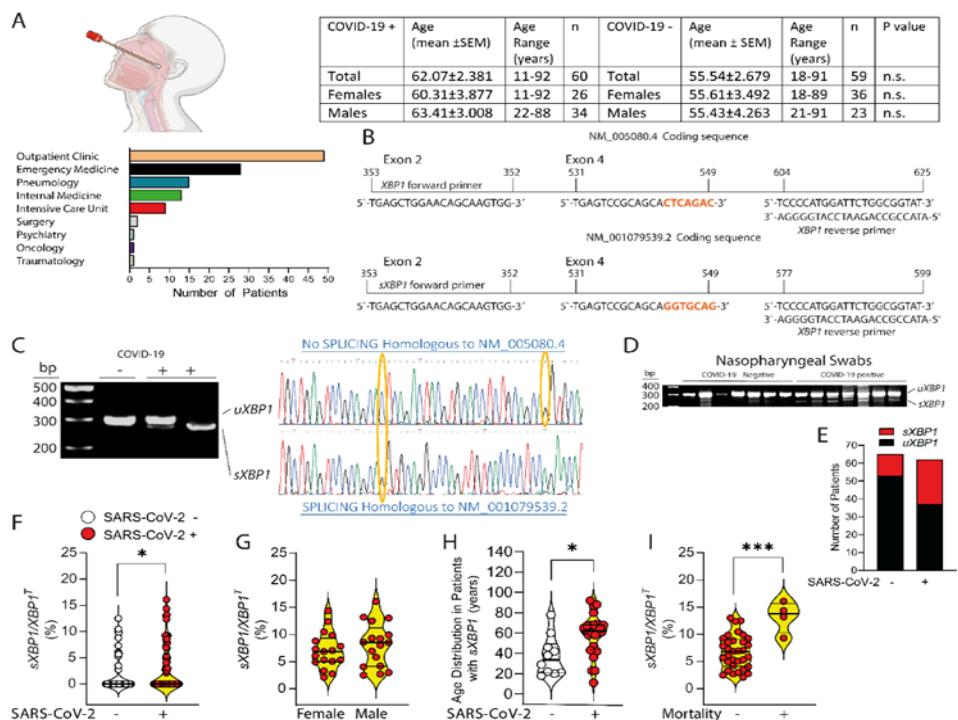
Se han detectado altas cantidades de PGE2 en pulmones de pacientes con neumonía por SARS-CoV-2 parece probable la participación del sistema PGE2/AMP cíclico/CREB en una ruta dirigida a contrarrestar la hiperinflamación. Se confirma el papel informado de SXBP1 en la activación transcripcional de COX2, TNF, IL-1B e IL-6.

La activación de TLR8 induce una firma de citoquinas como la observada en los BAS y apunta a la participación central de los MDDC en la respuesta innata al SARS-CoV-2.

La señalización de TLR podría impulsar la activación de IRE-1L-XBP1 durante la infección por SARS-CoV-2 y exacerbar la inflamación.

¿Podría ser la inhibición de la actividad RNAs IREL1 un enfoque terapéutico para la enfermedad grave por covid?.

La aplicabilidad del conocimiento derivado del estudio se dirige a la posible utilización de fármacos activos sobre la rama IREL-XBP1 como moduladores de la respuesta inmune innata y de la tormenta de citoquinas en la enfermedad covid-19.



**FIGURA 1.** Secuencias de los trascritos del mRNA de XBP1 en muestras nasofaríngeas. (A) Departamentos médicos implicados en la obtención de muestras y datos demográficos. (B) El splicing de 26 nucleótidos en la secuencia NM\_005080.4 genera la secuencia 531-549 en NM\_001079539.2. La posición de los primers se muestra incluyendo el primer inverso que abarca la secuencia eliminada. (C) Gel de electroforesis en agarosa y secuenciación de los amplicones obtenidos en las reacciones de RT-PCR con primers de XBP1 mostrando la migración de los productos con splicing (sXBP1) y sin splicing (uXBP1). (D) Patrón electroforético de XBP1 en una serie de muestras de pacientes COVID-19 negativos y positivos. La presencia de tres bandas en algunos casos se debe a la formación de heterodíplexos. (E) Distribución de pacientes de acuerdo con la presencia o ausencia de sXBP1 en pacientes SARS-CoV-2 negativos y positivos. (F) Cuantificación de sXBP1 frente al XBP1 total (XBP1-T) en muestras de pacientes COVID-19 positivos y negativos. (G) Cuantificación de sXBP1 frente a XBP1 T en varones y mujeres SARS-CoV-2 positivos con splicing de XBP1. (H) Distribución por edades de pacientes con sXBP1. (I) Cuantificación de sXBP1 frente a XBP1 total en pacientes SARS-CoV-2 positivos de acuerdo con su evolución. \*p < 0.05, \*\*\*p<0.005, pareado o no pareado (dos-cola).

## BIBLIOGRAFÍA

### 1. Consultado

[https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov-China /documentos/Protocolo\\_manejo\\_clinico\\_uci\\_COVID-19.pdf](https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov-China/documentos/Protocolo_manejo_clinico_uci_COVID-19.pdf). Accedido el: 15 de abril de 2020.

2. Wu C 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); doi:10.1001/jamainternmed.2020.0994.

3. Hetz C, Zhang K, Kaufman RJ. Mechanisms, Regulation and Functions of the Unfolded Protein Response. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2020) 21(8):421-38. doi: 10.1038/s41580-020-0250-z

4. Bettigole SE, Glimcher LH. Endoplasmic Reticulum Stress in Immunity. *Annu Rev Immunol* (2015) 33:107-38. doi: 10.1146/annurev-immunol-032414-112116

5. Chen X, Cubillos-Ruiz JR. Endoplasmic Reticulum Stress Signals in The tumour and its Microenvironment. *Nat Rev Cancer* (2021) 21(2):71-88. doi: 10.1038/s41568-020-00312-2

6. Calfon M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, et al. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* (2002) 415(6867):92-6. doi: 10.1038/415092a.

7. Chopra S, Giovanelli P, Alvarado-Vazquez PA, Alonso S, Song M, Sandoval TA, et al. 2019. IRE1 $\alpha$ -XBPI Signaling in Leukocytes Controls Prostaglandin Biosynthesis and Pain. *Science* (2019) 365(6450):eaau6499. doi: 10.1126/science.aaau6499

8. Martinon F, Chen X, Lee AH, Glimcher LH. 2011. TLR Activation of the Transcription Factor XBP1 Regulates Innate Immune Responses in Macrophages. *Nat Immunol* (2011) 11(5):411-18. doi: 10.1038/ni.1857
9. Zeng L, Liu YP, Sha H, Chen H, Qi L, Smith JA. 2010. XBP-1 Couples Endoplasmic Reticulum Stress to Augmented IFN- $\beta$  Induction via a cis-Acting Enhancer in Macrophages. *J Immunol* (2010) 185(4):2324-30. doi: 10.4049/jimmunol.0903052
10. Márquez S, Fernández JJ, Terán-Cabanillas E, Herrero C, Alonso S, Azogil A, et al. Endoplasmic Reticulum Stress Sensor IRE1 $\alpha$  Enhances IL-23 Expression by Human Dendritic Cells. *Front Immunol* (2017) 8:639. doi: 10.3389/fimmu.2017.00639
11. Mogilenko DA, Haas JT, L'homme L, Fleur S, Quemener S, Levavasseur C, et al. Metabolic and Innate Immune Cues Merge into a Specific Inflammatory Response via the UPR. *Cell* (2019) 177(5):1201-16. doi: 10.1016/j.cell.2019.03.018
12. Keestra-Gounder AM, Byndloss MX, Seyffert N, Young BM, Chávez-Arroyo A, Tsai AY, et al. NOD1 and NOD2 Signalling Links ER Stress with Inflammation. *Nature* (2016) 532(7599):394-7. doi: 10.1038/nature17631
13. Qiu Q, Zheng Z, Chang L, Zhao YS, Tan C, Dandekar A, et al. Toll-like Receptor-Mediated IRE1 $\alpha$  Activation as a Therapeutic Target for Inflammatory Arthritis. *EMBO J* (2013) 32(18):2477-90. doi: 10.1038/embj.2013.183
14. Rosen DA, Seki SN, Fernández-Castañeda A, Beiter RM, Eccles JD, Woodfolk JA, et al. Modulation of the Sigma-1 Receptor-IRE1 Pathway is Beneficial in Preclinical Models of Inflammation and Sepsis. *Sci Transl Med* (2019) 11(478):eaau5266. doi: 10.1126/scitranslmed.aau5266
15. Sule G, Abuaita BH, Steffes PA, Fernandes AT, Estes SK, Dobry C, et al. Endoplasmic Reticulum Stress Sensor IRE1 $\alpha$  Propels Neutrophil

Hyperactivity in Lupus. *J Clin Invest* (2021) 31(7):e137866. doi: 10.1172/JCI137866

16. Prasad V, Suomalainen M, Jasiqi Y, Hemmi S, Hearing P, Hosie L, et al. 2020. The UPR Sensor IRE1 $\alpha$  and the Adenovirus E3-19K Glycoprotein Sustain Persistent and Lytic Infections. *Nat Commun* (2011) 11(1):1997. doi: 10.1038/s41467-020-15844-2
17. Prasad V, Greber UF. 2021. The Endoplasmic Reticulum Unfolded Protein Response - Homeostasis, Cell Death and Evolution in Virus Infections. *FEMS Microbiol Rev* (2021) 45(5):fuab016. doi: 10.1093/femsre/fuab016
18. Hrincius ER, Liedmann S, Finkelstein D, Vogel P, Gansebom S, Samarasinghe AE, et al. Acute Lung Injury Results from Innate Sensing of Viruses by an ER Stress Pathway. *Cell Rep* (2015) 11(10):1591-603. doi: 10.1016/j.celrep.2015.05.012
19. Liu N, Jiang C, Cai P, Shen Z, Sun W, Xu HM, et al. Single-Cell Analysis of COVID-19, Sepsis, and HIV Infection Reveals Hyperinflammatory and Immunosuppressive Signatures in Monocytes. *Cell Rep* (2021) 37(1):109793. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109793
20. Ren X, Wen W, Fan X, Hou W, Su B, Cai P, et al. 2021. COVID-19 Immune Features Revealed by a Large-Scale Single-Cell Transcriptome Atlas. *Cell* (2021) 184(7):1895-1913.e19. doi: 10.1016/j.cell.2021.01.053
21. Blanco-Melo D, Nilsson-Payant BE, Liu WC, Uhl S, Hoagland D, Møller 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
22. Xu X, Han M, Li T, Sun W, Wang D, Fu B, et al. Effective Treatment of Severe COVID-19 Patients with Tocilizumab. *Proc Natl Acad Sci USA* (2020) 117(20):10970-5. doi: 10.1073/pnas.2005615117

23. Acosta-Alvear D, Zhou Y, Blais A, Tsikitis M, Lents NH, Arias C, et al. XBP1 Controls Diverse Cell-Type and Condition-Specific Transcriptional Regulatory Networks. *Mol Cell* (2007) 27(1):53-66. doi: 10.1016/j.molcel.2007.06.011
24. van der Made CI, Simons A, Schuurs-Hoeijmakers J, van den Heuvel G, Mantere T, Kersten S, et al. Presence of Genetic Variants among Young Men with Severe COVID-19. *JAMA* (2020) 324(7):663-73. doi: 10.1001/jama.2020.13719
25. Zhou Z, Ren L, Zhang L, Zhong J, Xiao Y, Jia Z, et al. Heightened Innate Immune Responses in the Respiratory Tract of COVID-19 Patients. *Cell Host Microbe* (2020) 27(6):883-90. doi: 10.1016/j.chom.2020.04.017
26. Shi S, Blumenthal A, Hickey CM, Gandotra S, Levy D, Ehrt S. Expression of Many Immunologically Important Genes in Mycobacterium tuberculosis-Infected Macrophages Is Independent of both TLR2 and TLR4 but Dependent on IFN- $\alpha\beta$  Receptor and STAT1. *J Immunol* (2005) 175(5):3318-28. doi: 10.4049/jimmunol.175.5.3318
27. Michelucci A, Cordes T, Ghelfi J, Pailot A, Reiling N, Goldmann O, et al. Immune-Responsive Gene 1 Protein Links Metabolism to Immunity by Catalyzing Itaconic Acid Production. *Proc Natl Acad Sci USA* (2013) 110(19):7820-5. doi: 10.1073/pnas.1218599110
28. Fallerini C, Daga S, Mantovani S, Benetti E, Picchiotti N, Francisci D, et al. Association of Toll-like Receptor 7 Variants with Life-Threatening COVID-19 Disease in Males: Findings from a Nested Case-Control Study. *eLife* (2021)10:e67569. doi: 10.7554/eLife.67569.
29. Ito T, Amakawa R, Kaisho T, Hemmi H, Tajima K, Uehira K, et al. Interferon- $\alpha$  and Interleukin-12 Are Induced Differentially by Toll-like Receptor 7 Ligands in Human Blood Dendritic Cell Subsets. *J Exp Med* (2002)195(11):1507-12. doi: 10.1084/jem.20020207 .