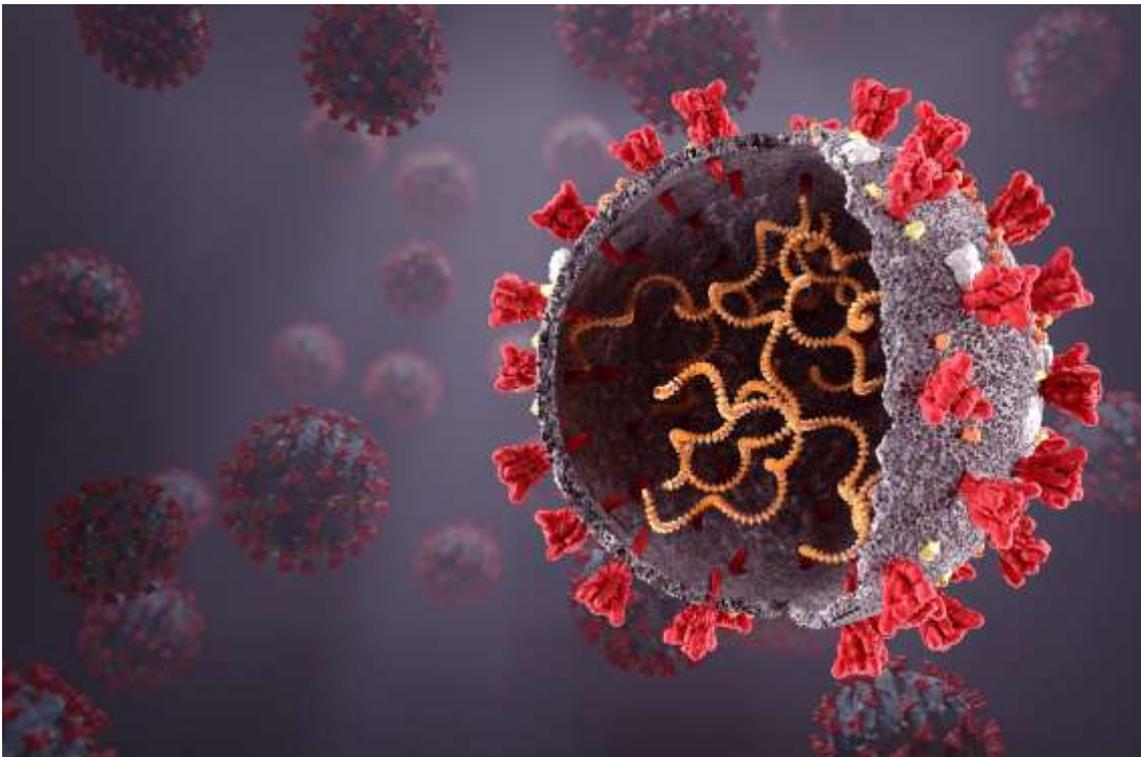


MicroRNAs CIRCULANTES: POSIBLES BIOMARCADORES DE GRAVEDAD EN PACIENTES DE COVID-19

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER



En Cádiz, a 30 de noviembre de 2021

Autora: Eva Lucía Trejo Gutiérrez

Máster en Biomedicina 2020-2021

En Cádiz, a 30 de noviembre de 2021.

Las profesoras D^a María Calderón Domínguez, Profesora Sustituta Interina del Área de Bioquímica y Biología Molecular, así como D^a M^a del Carmen Durán Ruiz, Profesora Titular del Área de Bioquímica y Biología Molecular en la Universidad de Cádiz, ambas integrantes del grupo de investigación "Terapia Regenerativa Cardiovascular y Proteómica aplicada (CTS-1076)",

Certifican que el Trabajo de Fin de Máster titulado LOS MIRNAS COMO POSIBLES BIOMARCADORES CIRCULANTES DE GRAVEDAD EN PACIENTES DE COVID-19, que presenta Eva Lucía Trejo Gutiérrez, con D.N.I. nº 31255216X, ha sido realizado en nuestro (laboratorio/servicio) bajo nuestra dirección, y tiene nuestro visto bueno para ser presentado.



Fdo. María Calderón Domínguez.



Fdo. M^a del Carmen Durán Ruiz

Quiero expresar mi sincero agradecimiento a mis tutoras, M^a Carmen Durán Gómez, por la oportunidad que me ha brindado de poder trabajar con SARS-CoV-2 y confiar en mí y a María Calderón Domínguez, por todo lo que me ha enseñado, su paciencia y su dedicación, dos grandes mujeres científicas.

Este trabajo se lo dedico a mi madre, por el apoyo prestado, siempre; a Luis, por su paciencia, apoyo y comprensión; a mi hijo Pablo y a Keko, por el tiempo robado; a Rafa, por su cobertura y sus ánimos y a mi padre, que allá donde esté, se sentirá orgulloso.

Por último, quiero dedicar también esta pequeña contribución a la ciencia a todas las científicas y científicos que, desde el principio de esta pandemia e incluso antes, están “dejándose la piel” para descubrir y entender cómo funciona este virus y qué efectos produce en los humanos, a fin de diseñar métodos diagnósticos, tratamientos y vacunas: Biólogos, inmunólogos, microbiólogos, epidemiólogos, bioquímicos, biotecnólogos, Gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	LOS CORONAVIRUS	1
1.2.	EL SARS-CoV-2	3
1.2.1.	Origen del SARS-CoV-2	3
1.2.2.	Formas de transmisión del SARS-CoV-2	5
1.2.3.	Estructura y genoma del SARS-CoV-2	6
1.2.4.	El ciclo de vida del SARS-CoV-2	10
1.2.4.1.	Adhesión y entrada en la célula humana	11
1.2.4.2.	Replicación, transcripción y traducción genómica	16
1.2.4.3.	Maduración de proteínas estructurales y ensamblaje y liberación de nuevos virus	20
1.2.5.	Patogénesis del SARS-COV-2	23
1.3.	LA COVID-19	35
1.4.	TERAPIAS Y VACUNAS CONTRA LA COVID-19	37
1.4.1.	Terapias contra la COVID-19	37
1.4.1.1.	Agentes bloqueantes de la entrada del virus	38
1.4.1.2.	Transfusión de plasma convaleciente	39
1.4.1.3.	Tratamientos con anticuerpos monoclonales	39
1.4.1.4.	Medicamentos antivirales	40
1.4.1.5.	Agentes activadores de la respuesta inmune innata	41
1.4.1.6.	Inhibidores de estrés oxidativo	42
1.4.2.	Vacunación frente al SARS-COV-CoV-2	43
1.4.3.	Eficacia de las vacunas	48
1.5.	NUEVAS DIANAS TERAPÉUTICAS	50
1.5.4.	Biogénesis y silenciamiento post-transcripcional de los miRNAs	51
1.5.5.	MiRNAs extracelulares	54
1.5.6.	MiRNAs extracelulares como biomarcadores de enfermedades	56
1.5.7.	MiRNAs como biomarcadores en enfermedades patogénicas	56
1.5.8.	MiRNAs y la COVID-19	58
1.5.9.	Terapias basadas en MiRNA	59
2.	HIPÓTESIS DE TRABAJO	62

3.	OBJETIVOS	62
4.	MATERIAL Y MÉTODOS	63
4.1.	Análisis bioinformático para predecir miRNAs que se dirigen a ACE2, TMPRSS2 y RAB14	63
4.2.	Población de estudio	63
4.3.	Colección de suero	64
4.4.	Aislamiento de RNA	64
4.5.	Reacción de transcriptasa inversa	64
4.6.	Análisis de los niveles de expresión de miRNAs	65
4.7.	Análisis estadístico	66
4.8.	Análisis de enriquecimiento funcional	66
5.	RESULTADOS	67
5.1.	Selección de los miRNAs candidatos	67
5.2.	Identificación de miRNAs expresados diferencialmente en pacientes graves con COVID-19	71
5.3.	Potencial diagnóstico de los miRNAs séricos evaluados por análisis ROC	72
5.4.	Análisis de enriquecimiento de funciones y vías	74
6.	DISCUSIÓN	78
7.	CONCLUSIONES	80
8.	PERSPECTIVAS FUTURAS	81
9.	BIBLIOGRAFÍA	83

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Proteínas virales, función y efectos patogénicos.	24
Tabla 2. Medicamentos contra la COVID-19. EMA.	43
Tabla 3. Estado del procedimiento de autorización de vacunas contra COVID-19. EMA.	44
Tabla 4. Datos de vacunación COVID-19 en España.	45
Tabla 5. Principales variantes de SARS-CO-2.	47
Tabla 6. Papel de distintos miRNAs en infecciones virales.	56
Tabla 7. Principales terapias basadas en miRNAs en fase de desarrollo (2020).	59
Tabla 8. Preparación de la RT-PCR por reacción.	64
Tabla 9. Reacción de la RT-PCR.	65
Tabla 10. Preparación de la qPCR por reacción.	65
Tabla 11. Reacción de la qPCR.	65
Tabla 12. Referencias bibliográficas encontradas para los miRNAs seleccionados.	67
Tabla 13. Posición de sitios de unión de los miRNAs candidatos al extremo 3'UTR del RNAm.	69
Tabla 14. Niveles sanguíneos de miRNAs en los grupos de estudio.	71
Tabla 15. Comparaciones de miRNAs individuales como predictores de pacientes con COVID-19.	73
Tabla 16. Análisis de enriquecimiento de genes.	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología general de coronavirus.	2
Figura 2. Representación de la estructura del SARS-CoV-2 e imagen de tomograma de viriones.	7
Figura 3. Arquitectura genómica del SARS-CoV-2.	7
Figura 4. Estructura del genoma y potenciales de codificación del SARS-COV-CoV-2.	8
Figura 5. Estructura genómica del SARS-CoV-2.	9
Figura 6. Ciclo de vida del SARS-COV-CoV-2.	11
Figura 7. Comparación de las proteínas espiga (S) del SARS-CoV y del SARS-CoV-2.	12
Figura 8. Estructura, dominios y sitios de escisión de la proteína S.	13
Figura 9. Resumen de los mecanismos de entrada celular del SARS-CoV-2.	14
Figura 10. Procesamiento propuesto de la proteína espiga S del SARS-CoV-2 por TMPRSS2 y furina.	16
Figura 11. Diagrama de formación de vesículas de doble membrana de replicación.	17
Figura 12. Replicación y transcripción del genoma del coronavirus.	17
Figura 13. Representación de las distintas fases del ciclo de vida del SARS-CoV-2.	19
Figura 14. Rab GTPasas Rab y tráfico intracelular de vesículas.	21
Figura 15. Red de interactomas organizada por proteína del virus de mayor a menor número de interactores putativos.	21
Figura 16. Esquema del proceso de exocitosis del SARS-CoV-2.	23
Figura 17. Red de interacción proteína-proteína SARS-CoV-2.	26
Figura 18. Funciones celulares y sistémicas de ACE y ACE2.	28
Figura 19. Inducción de la tormenta de citoquinas y el SDRA.	29
Figura 20. Evasión del SARS-CoV-2 de las vías del interferón (IFN).	31
Figura 21. Activación de las vías inmunitarias innatas por el SARS-CoV-2.	32
Figura 22. Respuesta inmune y fisiopatología ante la infección por SARS-CoV-2.	33
Figura 23. Activación de la apoptosis por HCoV.	34
Figura 24. Síntomas asociados a la COVID persistente.	37
Figura 25. Estrategias terapéuticas contra la COVID-19.	38
Figura 28. Población mundial vacunada contra COVID-19 a 26/11/2021.	45
Figura 29. Algunos miRNAs relacionados con enfermedades humanas.	51
Figura 30. La biogénesis de los microRNA.	52

Figura 31. Descripción general del silenciamiento génico mediado por miRNA en animales.	53
Figura 32. Vías de secreción de miRNA.	54
Figura 33. Selección de miRNAs.	68
Figura 34. Predicción del sitio de unión de los miRNAs seleccionados al extremo 3'UTR del RNAm de ACE2, TMPRSS2 y RAB14 realizado con STarMiR.	70
Figura 35. Niveles de expresión diferencial de los miRNAs en suero, normalizados a has-miR-103a-3p, en controles sanos, sujetos leves con IgG COVID-19 positivo y pacientes graves hospitalizados con COVID-19 (A-D).	72
Figura 36. Análisis del ROC de los miRNAs en pacientes graves con COVID19 (A-D) con AUC.	76
Figura 37. Diagrama de Venn de los genes diana de los 4 miRNAs cuyos niveles aumentan en pacientes graves.	74
Figura 38. Procesos biológicos en los que intervienen las proteínas encontradas a través del análisis de enriquecimiento cuya expresión sería regulada por alguno de los 4 miRNAs.	76

RESUMEN

Después de casi dos años de la declaración de la COVID-19 como pandemia mundial por la OMS, se han producido más de 250 millones de casos confirmados y 5 millones de fallecidos a nivel mundial. Por ello, se han llevado a cabo esfuerzos clínicos y de investigación sin precedentes para la identificación de los mecanismos biológicos y moleculares subyacentes en la infección por el SARS-CoV-2. Aunque se han desarrollado métodos diagnósticos, vacunas y terapias, la pandemia no parece estar controlada, por lo que urge desarrollar nuevas vacunas, terapias farmacológicas y biomarcadores de pronóstico y gravedad de la enfermedad, así como dianas terapéuticas de esta.

Entre los nuevos métodos de búsqueda de biomarcadores de diversas enfermedades, se encuentran aquellos basados en la detección y cuantificación en fluidos corporales de los microRNAs (miRNAs), pequeñas moléculas de RNA no codificantes que regulan la expresión génica, así como las terapias basadas en éstos. Los miRNAs regulan multitud de funciones fisiológicas y patológicas. El perfil de los niveles de los miRNAs circulantes está asociado con la expresión alterada de miRNAs procedentes de las células, constituyendo novedosos biomarcadores de diagnóstico, pronóstico y respuesta al tratamiento para las distintas enfermedades, ya que son altamente estables y fácilmente detectables y cuantificables, aún en pequeñas cantidades.

El objetivo de este estudio ha sido determinar los niveles de los miRNAs circulantes en pacientes COVID-19, y así obtener nuevos biomarcadores de la gravedad de la enfermedad. Para ello, se midieron los niveles de varios miRNAs en suero de sujetos sanos, asintomáticos y pacientes graves de COVID-19. Además, se analizó su potencial como biomarcador, y se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento funcional de los genes regulados potencialmente por éstos.

Se han encontrado cuatro miRNAs como posibles biomarcadores de la fase grave de la enfermedad en suero de pacientes COVID-19, cuyos genes diana podrían estar involucrados en importantes procesos biológicos como la coagulación, la apoptosis celular o el tráfico intracelular de vesículas, lo que podría explicar parte de la sintomatología de los pacientes graves de COVID-19.

PALABRAS CLAVE. SARS-COV-2, COVID-19, biomarcadores, miRNAs circulantes, ACE2, TMPRSS2, RAB14.

ABSTRACT

After two years of the WHO's declaration of COVID-19 as a global pandemic, there have been more than 250 million confirmed cases and 5 million deaths globally. Therefore, unprecedented clinical and research efforts have been carried out to identify the biological and molecular mechanisms underlying SARS-CoV-2 infection. Although diagnostic methods, vaccines, and therapies have been developed, the pandemic does not seem to be under control. Therefore, it is urgent to develop new vaccines, pharmacological therapies, biomarkers of prognosis, and severity of the disease.

The detection and quantification of circulating microRNAs (miRNAs) (small non-coding RNA molecules that regulate gene expression) has been proposed as new biomarkers of various diseases. MiRNAs regulate a multitude of physiological and pathological functions. The dysregulated expression levels of circulating miRNAs are associated with the altered expression of miRNAs in cells, constituting novel biomarkers of diagnosis, prognosis, and response to treatment for different diseases, since they are highly stable and easily detectable and quantifiable, together in small quantities.

The objective of this study was to determine the circulating miRNAs levels in COVID-19 patients as biomarkers of disease severity. The levels of several miRNAs in serum of healthy, asymptomatic subjects and severe COVID-19 patients were measured, their potential as biomarkers were analyzed, and functional enrichment analysis of the potentially regulated genes was performed.

In the present study, four miRNAs have been found as possible biomarkers of the severe phase of the disease in the serum of COVID-19 patients. Moreover, their targeted genes may be involved in biological processes such as coagulation, cellular apoptosis, or intracellular trafficking of vesicles, which could explain part of the symptomatology of severe COVID-19 patients.

KEYWORDS. SARS-COV-2, COVID-19, Biomakers, circulating miRNAS, ACE2, TMPRSS2, RAB14.

ABREVIATURAS

ACE2: Enzima convertidora de angiotensina II.
Ang: Angiotensina
ECDC: Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades
CHMP: Comité de Medicamentos Humanos de la EMA.
RTC: Complejo de replicación y transcripción
COVID-19: Enfermedad Infecciosa por Coronavirus 2019
CoVs: Coronavirus
CSS: Síndrome de Tormenta de Citoquinas
DAMPS: Patrones moleculares asociados al daño
ECDC: Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades
EMA: Agencia Europea del Medicamento.
ER: Retículo endoplasmático
rER: Retículo endoplasmático rugoso.
ERGIC: compartimento intermedio del Aparato de Golgi
FDA: Agencia Federal de Medicamentos Norteamericana.
HcoVs: Coronavirus humanos
IFN: Interferón
Long-COVID: COVID-19 larga o persistente.
MERS-CoV: Coronavirus del Síndrome Respiratorio de Oriente Medio
miRNAs: MicroRNAs
Nsp: proteína no estructural
OMS: Organización Mundial de la Salud.
ORF: Marco de Lectura Abierto.
PAMPS: Patrones moleculares asociados a patógenos
FP: Péptido de fusión
PLpro: Proteasa similar a la papaína
Pp1b: poliproteína 1b
3Clpro: Proteasa similar a la 3-quimotripsina,
Proteína E: Proteína de envuelta
Proteína M: Proteína de membrana
Proteína N: Proteína de nucleocápside
Proteína S: Proteína espícula.
RAS: Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
RBD: Dominio de Unión al Receptor
RdRp: RNA polimerasa dependiente- dependiente de RNA
RNAg: RNA genómico
RNAm: RNA mensajero
RNA: Ácido Ribonucleico.
ROS: Especies reactivas de oxígeno
RTC: Complejo de transcripción-replicación
SARS-CoV: Coronavirus del Síndrome Agudo Respiratorio.
SARS-CoV-2: Coronavirus 2 del Síndrome Agudo Respiratorio.
SDRA: Síndrome de Dificultad Respiratoria Aguda
sgRNAs: RNAs subgenómicos
SSs: Estructuras secundarias
TMPRSS2: Serina proteasa transmembrana tipo II
UE: Unión Europea
UTR: Región No Traducida
VOC: Variantes de Preocupación
VOI: Variantes de Interés
DMV: Vesículas de doble membrana modificadas inducidas por virus
miRISC: Complejo de Silenciamiento Inducido por miRNA
MVB: Cuerpos multivesiculares
TGN: Red trans-Golgi
Pp1a: poliproteína 1a

ExoN: Exoribonucleasa de 3' a 5' viral

AGO 2: Proteína Argonauta 2

S1: Subunidad 1 de la proteína S

S2: Subunidad 2 de la proteína S

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LOS CORONAVIRUS

Entre los mamíferos, los murciélagos (quirópteros) constituyen uno de los órdenes más importantes implicados en la aparición y difusión de virus entre distintas especies animales, incluida la humana.

Varias características de distintas especies de quirópteros, como la capacidad de volar, la coexistencia de muchos individuos en grandes colonias, una dieta compuesta por todo tipo de alimentos, la capacidad de recorrer largas distancias durante la migración, etc., han permitido que los murciélagos se encuentren en todo el planeta (excepto en la Antártida y algunas islas oceánicas), ocupando los más variados nichos ecológicos. Este gran éxito evolutivo explica la notable propensión de estos animales a favorecer, tanto como huéspedes como reservorios, la difusión de una amplia variedad de virus¹.

En los últimos años, varios virus capaces de infectar a los humanos se han relacionado con virus que infectan a murciélagos: *Rhabdoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Coronaviridae*, *Flaviviridae*, *Filoviridae* y otros². Con algunas excepciones, la transmisión directa de los virus de murciélagos a los humanos ha sido poco común, de forma que los murciélagos suelen actuar como reservorios de virus ancestrales que, a través de un salto entre especies, llegan a huéspedes secundarios intermediarios donde pueden adquirir tropismo por el huésped humano (zoonosis).

En los últimos años, cambios antropogénicos y naturales sucedidos en el medio ambiente, como el aumento de la deforestación, la alteración de hábitats naturales, la disminución de la diversidad animal o eventos climáticos, han modificado la ecología de los murciélagos y han expuesto a los humanos a nuevos patógenos³.

La transmisión de virus de los murciélagos a humanos se produce a través de diversos medios: contacto directo (mordeduras y arañazos), inhalación de partículas infecciosas por parte de los seres humanos procedentes de secreciones y guano, mediante artrópodos que actúan como vectores de transmisión, por consumo de carne de murciélago en algunas partes del mundo (China y otras partes de Asia) o mediante huéspedes vertebrados secundarios que sirven como amplificadores³. Por lo tanto, los murciélagos representan un reservorio importante para muchos virus zoonóticos que generalmente causan infecciones persistentes en los propios murciélagos. Además, con algunas excepciones, la transmisión de virus de murciélagos a humanos requiere de un segundo huésped animal intermedio, mientras que la transferencia directa del patógeno de murciélagos a humanos ocurre sólo en raras ocasiones².

Los coronavirus (CoVs) son un grupo de grandes virus envueltos con un genoma de RNA lineal, no segmentado, de sentido positivo, monocatenario, que presentan una morfología característica con proyecciones de espigas en forma de garrote que emanan de la superficie del virión, proporcionándoles la apariencia de una corona solar. Pertenecen a la subfamilia *Coronavirinae* de la familia *Coronaviridae* y del orden *Nidovirales*⁴. Tienden a ser casi esféricos observados con microscopía electrónica, presentando proyecciones tipo corona producidas por la proteína Spike (proteína S)⁵ (**Figura 1**).

Hay cuatro géneros de CoVs, que incluyen *Alphacoronavirus* (α CoV), *Betacoronavirus* (β CoV), *Deltacoronavirus* (δ CoV) y *Gammacoronavirus* (γ CoV)⁶. Todos los CoVs que infectan mamíferos, incluidos todos los coronavirus de murciélago detectados hasta la fecha, pertenecen al primer y segundo género, α CoV y β CoV, mientras que todos los CoVs aviares pertenecen al género γ CoV.

Dentro del género γ CoV, sólo existe la cepa SW1 del coronavirus de la ballena beluga que ha sido identificada en este mamífero acuático⁷.

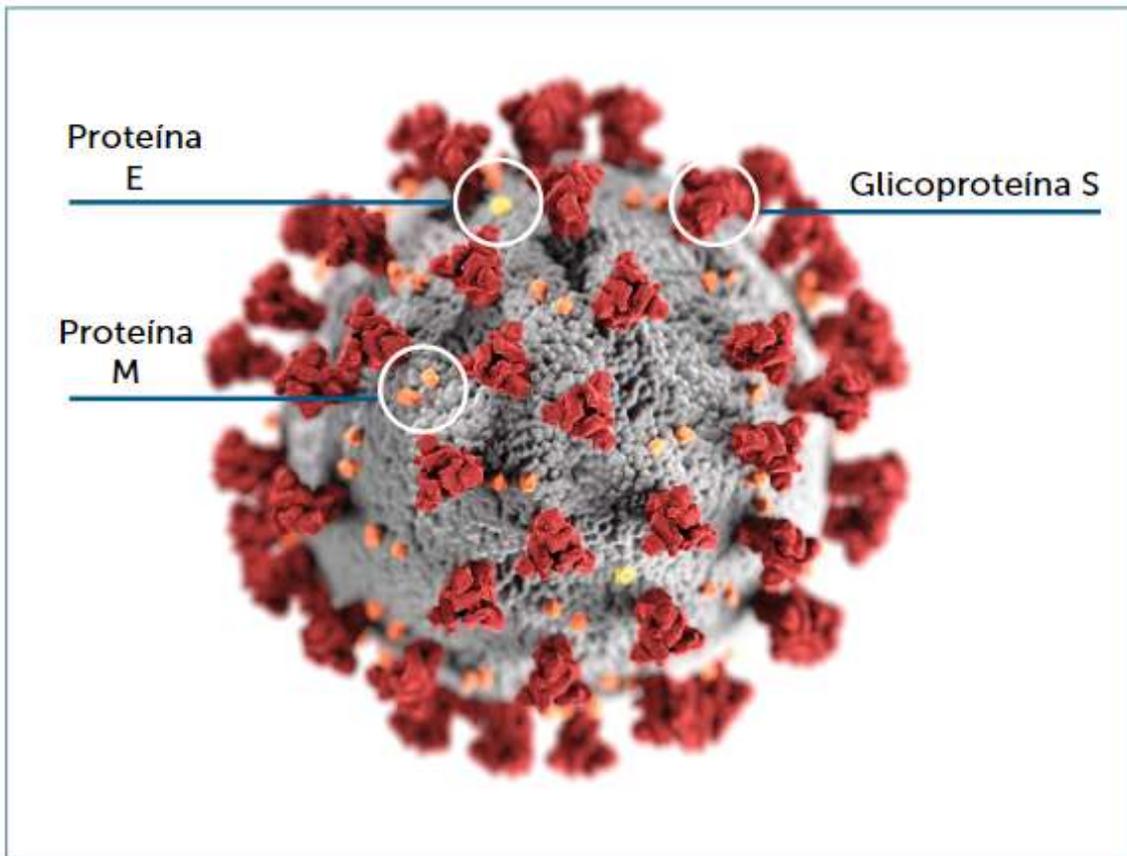


Figura 1. Morfología general de coronavirus. Fuente: Biblioteca de imágenes de salud pública (PHIL).

En total, hasta la fecha, se han descubierto siete coronavirus que afectan a humanos (HCoV): HCoV229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoV-HKU1, SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2^{8 9}. Tanto el SARS-CoV (Coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Grave), como el MERS-CoV (Coronavirus del Síndrome Respiratorio de Oriente Medio) y el SARS-CoV-2 (Coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Grave 2), pertenecen al género β CoV.

En 1966 se describieron los primeros coronavirus en humanos (HCoV), el HCoV-E229 y el HCoV-OC43, agentes etiológicos frecuentes de infecciones respiratorias agudas estacionales y que también incluyen a HCoV-NL63 y HKU1, descritos el 2005. Estos HCoV son endémicos, con amplia distribución geográfica, de circulación estacional y responsables de entre el 2 y el 18% de todas las infecciones respiratorias en vías altas. Producen enfermedades leves como el resfriado común en la mayoría de los casos y, ocasionalmente, cuadros más severos en lactantes, niños pequeños y adultos mayores¹⁰.

Sin embargo, aunque los CoVs humanos se habían identificado desde hacía décadas, su importancia clínica y su potencial epidémico no se reconocieron hasta los brotes del SARS-COV- y del MERS-CoV.

El primer brote de coronavirus, el SARS-CoV, tuvo lugar en China en 2002 y encendió las alarmas entre los científicos por el potencial pandémico de los CoVs, demostrando una rápida diseminación geográfica y llegando a afectar a más de una docena de países. La respuesta

coordinada a nivel internacional permitió un control total del brote para mediados de 2003 a través de implementación de estrictas medidas de salud pública¹¹. El segundo brote, el MERS-CoV, ocurrió en los países de Oriente Medio en 2012, nuevamente asociado a neumonías graves en pacientes adultos, pero con mayor tasa de letalidad que su predecesor (35-45%)¹². A diferencia del SARS-CoV, el MERS-CoV no logró diseminarse efectivamente entre distintas áreas geográficas y solo se reportan casos esporádicos fuera de la península arábiga. Dada la severidad y el potencial rol pandémico de los coronavirus, la *Organización Mundial de la Salud* (OMS) los incorpora a la lista de agentes prioritarios para ser investigados en el año 2017¹¹.

En definitiva, estos CoVs son conocidos por causar enfermedades respiratorias severas en los seres humanos y ser capaces de evolucionar aumentando su patogenicidad y su capacidad de adaptación al ser humano a largo plazo¹. Los murciélagos actuaron como huésped principal para la posterior evolución y propagación del SARS-CoV en humanos³ y las civetas como huésped intermedio¹³. El MERS-CoV también se descubrió que se transmitía a través de murciélagos, los cuales actuaban como huésped ancestral y los camellos como huésped intermedio.^{14,15}

Por todo ello, sería recomendable tomar medidas para prevenir la propagación de zoonosis asociadas a murciélagos mediante la vigilancia sistemática dirigida a controlar patógenos conocidos y descubrir posibles nuevos agentes zoonóticos, así como para la conservación de sus hábitats naturales, evitando así el contacto directo con los humanos y el ganado¹.

1.2. EL SARS-CoV-2

1.2.1. Origen del SARS-CoV-2

El SARS-CoV-2 se detectó en diciembre de 2019 en la ciudad de Wuhan, China, siendo el tercer coronavirus que emerge en las últimas dos décadas y el séptimo coronavirus que afecta al hombre⁹.

A finales de diciembre de 2019, varios centros de salud de la ciudad de Wuhan, en la provincia china de Hubei, reportaron casos de pacientes con neumonía de causa desconocida⁸. Al igual que los pacientes con SARS-CoV y MERS-CoV, estos pacientes mostraron síntomas de neumonía viral, incluyendo fiebre, tos, molestias torácicas, y en casos graves, disnea e infiltración pulmonar bilateral^{16,17}. Entre los primeros 27 pacientes hospitalizados documentados, la mayoría de los casos estaban epidemiológicamente vinculados al Mercado Mayorista de Pescado de Huanan, un mercado húmedo ubicado en el centro de Wuhan, que vendía también animales vivos, incluidos las aves de corral y animales salvajes^{16,17}. Según un estudio retrospectivo de la *National Health Commission of the People's Republic of China*, el inicio del primer caso conocido se remontaba al 8 de diciembre de 2019. El 31 de diciembre, la *Comisión Municipal de Salud de Wuhan* notificó al público un brote de neumonía de causa no identificada e informó a la OMS¹⁸. Mediante la secuenciación del ARN metagenómico y el aislamiento del virus de muestras de líquido de lavado bronco-alveolar de pacientes con neumonía grave, equipos independientes de científicos chinos identificaron que el agente causal de esta enfermedad emergente era un beta-coronavirus que no se había descrito previamente^{16,19,20}.

Más tarde, se identificaron más pacientes sin antecedentes de exposición al mercado mayorista de pescado de Huanan, se notificaron varios grupos familiares de infección y también se produjeron infecciones nosocomiales del virus en los centros de atención de la salud. Todos estos casos proporcionaron pruebas claras de la transmisión de persona a persona del nuevo virus²¹⁻²³. Como el brote coincidió con la proximidad del Año Nuevo Lunar, los viajes entre ciudades antes del festival facilitaron la transmisión del virus en China. Esta nueva neumonía por coronavirus pronto se propagó a otras ciudades de la provincia de Hubei y a otras partes del

país. En febrero, la epidemia alcanzó su pico y las autoridades sanitarias chinas decidieron el confinamiento y aislamiento de la ciudad de Wuhan y, más tarde, todas las actividades y reuniones al aire libre fueron restringidas y las instalaciones públicas fueron cerradas en la mayoría de las ciudades, así como en las zonas rurales²⁴. Debido a estas medidas, el número diario de nuevos casos en China comenzó a disminuir de forma constante, mientras que la propagación internacional del virus se aceleraba a partir de finales de febrero afectando a cada vez más países. La alta eficiencia de transmisión del SARS-CoV-2 y la abundancia de viajes internacionales permitieron una rápida propagación mundial del virus, por lo que la OMS declaró este brote como un evento con características de emergencia de salud pública internacional²⁵ el 30 de enero de 2020 y el 11 de marzo declaró el brote como una nueva pandemia²⁵, ante la presencia de la enfermedad en más de 100 países a nivel mundial.

Para el 1 de septiembre de 2021, el total de casos confirmados en todo el mundo se elevaba a 258.164.425 y 5.166.192²⁶ de fallecidos y, en nuestro país, el número de casos ascendía a 4.979.421 y el de fallecimientos a 87.322²⁶ (actualizado a 27/11/2021), provocando la interrupción de servicios sanitarios y severas consecuencias sociales y económicas en todos los países.

Una vez secuenciado el genoma del SARS-CoV-2 por Zhu et al. en 2020⁸, se encontró que filogenéticamente era el más cercano a otros encontrados en murciélagos (bat-SL-CoVZC45 y bat-SL-CoVZXC2)²⁷ pertenecientes al subgénero *Sarbecovirus* de la familia *Coronaviridae*. Estos hallazgos, junto con otros estudios, muestran que el SARS-CoV-2 es un 79% idéntico al SARS-CoV-2^{28,29} y en un 50% similar al síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV)³⁰.

A día de hoy, se desconoce con certeza cómo y cuándo ocurrieron los eventos involucrados en la transmisión de SARS-CoV-2 al ser humano y si algún animal actuó como hospedador intermediario como fue descrito para SARS-CoV (2012) y MERS-CoV (2004). Aunque la evidencia genética sugiere que el SARS-CoV-2 es un virus natural que probablemente se originó en animales, aún no hay una conclusión sobre cuándo y dónde el virus infectó por primera vez a los humanos.

En un reciente estudio³¹, los investigadores analizaron secuencias parciales de unos 1.240 coronavirus encontrados en murciélagos en China e informaron que el virus que alimenta la pandemia, el SARS-CoV-2, está estrechamente relacionado con un grupo de virus que se encuentran en los murciélagos de herradura (*Rhinolophus*).

Su hallazgo se suma a un informe anterior de que un coronavirus llamado RATG13, que algunos de los autores encontraron en murciélagos de herradura intermedios (*Rhinolophus affinis*) en la provincia de Yunnan, comparte el 96% de su secuencia genética con el SARS-CoV-2²⁰. Sin embargo, ningún virus de murciélago encontrado hasta ahora es lo suficientemente similar al SARS-CoV-2 como para ser un antepasado directo. Por ello, si bien el nuevo virus podría haberse propagado a las personas directamente desde los murciélagos, los investigadores creen que es más probable que haya pasado a través de un animal intermedio, aunque identificar la fuente animal de SARS-CoV-2 podría llevar mucho tiempo, ya que diversos estudios han demostrado que el SARS-CoV-2 puede infectar y replicarse también en otros mamíferos, como gatos, perros, leones, tigres, leopardos, ciervos, hurones o visones^{32,33}. No obstante, en su mayoría la infección ha sido transmitida a éstos desde los seres humanos y no a la inversa y el análisis epidemiológico y la secuenciación genética de virus desde 2020, no apunta hacia la introducción repetida en humanos de cepas de SARS-CoV-2 de posibles orígenes animales. En China, no se ha encontrado evidencia de infección por SARS-CoV-2 en una amplia gama de animales domésticos y salvajes hasta la fecha. Grupos de todo el mundo ya están utilizando herramientas bioinformáticas, la biología celular y molecular para investigar especies que sean susceptibles al virus, aunque hasta ahora sigue siendo difícil de alcanzar³⁴.

Por otra parte, el *Instituto de Virología de Wuhan* alberga un laboratorio de máxima seguridad que es uno de los 59 laboratorios de nivel 4 de bioseguridad (BSL-4) en todo el mundo³⁵. Este laboratorio trabaja con CoVs, entre ellos, la cepa CoV RaTG13 conocida más cercana (96,2%) al SARS-CoV-2, aunque no hay ninguna evidencia que respalde la hipótesis de que el virus pueda haber escapado de allí, los científicos creen que descartarlo por completo será complicado y llevará mucho tiempo. También es teóricamente posible que los científicos del laboratorio modificaran el genoma del virus con fines de investigación antes de que escapara, pero, una vez más, no hay evidencia de que lo hicieran³⁴ y el origen del SARS-CoV-2 en un incidente de laboratorio, es considerado por la misión de la OMS como extremadamente improbable³⁶.

Científicos fuera de China han estudiado el genoma del virus en detalle y han concluido que no existe ninguna evidencia de que el virus haya sido creado en un laboratorio y un análisis publicado en *Nature Medicine*³⁷ discute varias características inusuales del virus y sugiere cómo pudo surgir a partir de procesos naturales. Por tanto, los análisis hasta la fecha muestran que es muy poco probable que el SARS-CoV-2 se haya fabricado o manipulado en un laboratorio.

Por todo ello, para abordar este tema altamente controvertido, es necesario realizar más investigaciones retrospectivas que involucren un mayor número de muestras de pacientes, animales y entornos en China y en todo el mundo con ensayos bien validados. En resumen, “*La ciencia, no la especulación, es esencial para determinar cómo el SARS-CoV-2 llegó a los humanos*”³⁸, artículo publicado en *The Lancet* en julio de 2021 por un grupo de biólogos, médicos, veterinarios, epidemiólogos, virólogos, ecólogos y expertos en salud pública de todo el mundo, entre los que se encontraba el virólogo español Luis Enjuanes, uno de los mayores especialistas en coronavirus del mundo.

1.1.2. Formas de transmisión del SARS-CoV-2

La transmisión entre humanos del SARS-CoV-2, como en el caso de otros virus respiratorios como el de la gripe, la tuberculosis o el sarampión³⁹, se produce fundamentalmente por vía aérea⁴⁰, mediante pequeñas gotículas, partículas que emanan del tracto respiratorio de más de 100 μm de diámetro aerodinámico que generalmente caen al suelo en segundos y dentro de los 2 metros de distancia de la fuente⁴¹ que se emiten por personas infectadas durante la tos o el habla y, por otro lado, mediante partículas más pequeñas (menores de 100 μm) y mucho más numerosas conocidas como partículas de aerosol. Estas últimas pueden permanecer suspendidas en el aire hasta varias horas^{41,42} y pueden viajar por distancias mucho mayores de los 2 metros, acumularse con el tiempo y ser transportadas a largas distancias por las corrientes de aire en espacios interiores para después penetrar profundamente en los pulmones cuando son inhaladas por otra persona^{43,44}.

Varios estudios han demostrado que la exposición a aerosoles en el aire es más probable que conduzca a la infección por SARS-CoV-2 que la transmisión a través de gotículas emitidas por personas infectadas o por contacto indirecto a través de las manos con superficies contaminadas (fomites) con las vías respiratorias y la conjuntiva^{45,46}, ya que los coronavirus pueden persistir en superficies durante días, lo que también es el caso del SARS-CoV-2⁴⁷.

La transmisión vertical, de la madre al hijo en los casos en los que ocurre, parece producirse por el contacto estrecho entre ellos tras el nacimiento. Se han observado varios casos en los que el recién nacido presentaba síntomas de COVID-19 con la detección de la cadena de ácido

ribonucleico (RNA) del SARS-CoV-2, una expresión importante de las proteínas de espícula (S) y de la nucleocápside (N) del virus en la placenta, así como en las células fetales mononucleares, lo que demuestra la transmisión vertical del virus⁴⁸. Sin embargo, aunque la vía de transmisión vertical es posible, se cree que la transmisión se produciría fundamentalmente tras el nacimiento por el contacto del bebé con las secreciones respiratorias de la madre⁴⁹.

Por otro lado, aunque a menudo se ha detectado el genoma y algunas veces el virus infeccioso en heces y orina de personas enfermas, la transmisión a través de las heces y orina es otra hipótesis para la cual no existe evidencia en esta epidemia hasta la fecha^{50,51}.

Además, la dinámica de transmisión es heterogénea, con un papel importante para los eventos de super propagación en el mantenimiento de la epidemia. Así, el hecho de que muchos infectados no generen aerosoles infecciosos o apenas lo hagan y otros sí, depende de varios factores como la carga viral, estados fisiológicos o actividad del infectado. De hecho, se ha demostrado que la carga viral presenta una alta variabilidad entre individuos contagiados^{52,53}, existiendo individuos supercontagadores que pueden producir episodios de super propagación debido a la alta carga viral que presentan frente a otros que suponen un riesgo de transmisión mínimo. Estos eventos a menudo incluyen personas cercanas en entornos interiores con poca ventilación, durante períodos prolongados y sin mascarilla^{44,54}.

Aparte de los beneficios obvios del equipo de protección personal, la evidencia existente es lo suficientemente fuerte como para justificar controles dirigidos a la transmisión aérea como parte de una estrategia general para limitar el riesgo de infección en interiores. Estos incluirían una ventilación suficiente y efectiva, la filtración de aire, la desinfección UV y evitar sistemas que recirculan o mezclan aire, así como la utilización de mascarillas adecuadas bien ajustadas³⁹. La apertura de ventanas, sujetas a confort térmico y seguridad, proporciona más que un gesto hacia la reducción del riesgo de infección por partículas virales persistentes^{45,46,55}. También son pertinentes las medidas para controlar el hacinamiento tanto en la atención de la salud como en los entornos interiores confinados de la comunidad, incluido el transporte público. Estas intervenciones son estrategias críticas para ayudar a poner fin a la pandemia actual y prevenir futuros brotes³⁹.

1.2.3. Estructura y genoma del SARS-CoV-2

Al igual que otros coronavirus, el SARS-COV-2 es un virus con envuelta de bicapa lipídica esférica o pleomórfica de $\approx 0.1 \mu\text{m}$ de diámetro que contiene el genoma empaquetado por proteínas de nucleocápside viral (N) como un complejo de ribonucleoproteínas (RNP). La envoltura presenta proyecciones de glicoproteínas en forma de espiga (proteína S) y tiene asociadas otras dos proteínas estructurales, la proteína E (envuelta), la proteína M (membrana)⁵⁶ (**Figura 2**).

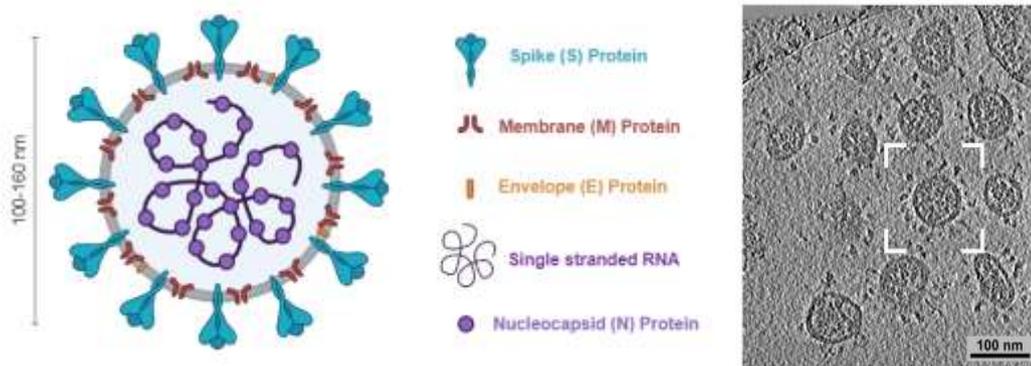


Figura 2. Representación de la estructura del SARS-CoV-2(modificado de⁵⁷) e imagen de tomograma de viriones (modificado de⁵⁸).

El genoma del SARS-CoV-2 (NC_045512.2) está compuesto por RNA monocatenario lineal no segmentado de sentido positivo [(+) ssRNA] que contiene 29.891 nucleótidos⁵⁹, los cuales codifican 9889 aminoácidos, siendo el genoma de ARN más grande entre todos los virus de ARN. La secuencia del genoma de referencia (Wuhan, NC_045512.2), secuenciada por Zhu et al.¹⁶ está disponible en GenBank⁶⁰ y miles de secuenciaciones del genoma del virus realizadas en diferentes partes del mundo son depositadas en GISAID-Initiative (<https://www.gisaid.org>).

El sentido positivo del RNA genómico (RNAg) viral funciona como un RNA mensajero (RNAm) que consiste en una estructura helicoidal terminal en 5' de protección y una cola de poli(A) en 3'. Este ARNg funciona con tres capacidades: (1) ARN de ciclo infeccioso; (2) como plantilla para la replicación y transcripción; y (3) como sustrato para empaquetar la descendencia del virus⁶¹.

La longitud del genoma del SARS-CoV-2es inferior a 30 kb y se ha predicho que existan 11-14 marcos de lectura abiertos (ORF) que codifican proteínas no estructurales (nsp) para la replicación y los procesos de ensamblaje del virus, proteínas estructurales y proteínas accesorias⁶²: ORF1a, ORF1b, ORF2 (proteína S), ORF3a, ORF4 (proteína E), ORF5 (proteína M), ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9 (proteína N) y ORF10 (**Figura 3**).

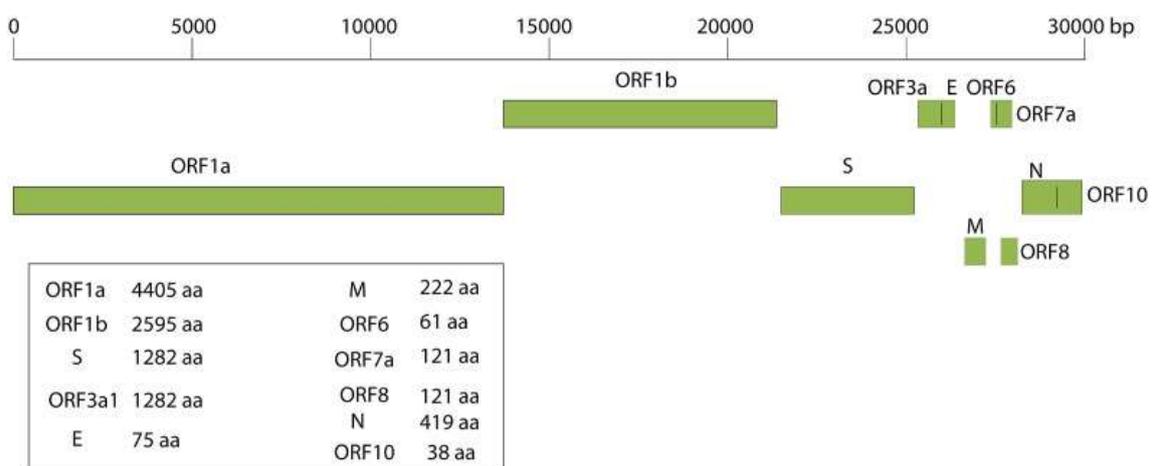


Figura 3. Arquitectura genómica del SARS-CoV-2⁶³.

El genoma del SARS-CoV-2codifica 16 proteínas nsp (1-16), 4 estructurales (S, N, M, E) y 6 accesorias (3a, 6, 7a, 7b, 8 y 9b) (**Figura 1**). Las 16 nsps que intervienen en la transcripción, replicación y evasión inmune del ARN viral son productos de escisión de dos poliproteínas codificadas por ORF1a y ORF1b, que en conjunto ocupan aproximadamente el 70% del genoma

viral desde el extremo 5'. Las proteínas estructurales S, E, M y N para la formación de viriones y las proteínas accesorias (3a, 6, 7a, 7b, 8 y 9b), con función aún no bien establecida, están codificadas juntas por el resto del 30% del genoma viral en el extremo 3'⁵⁶ (**Figura 4**).

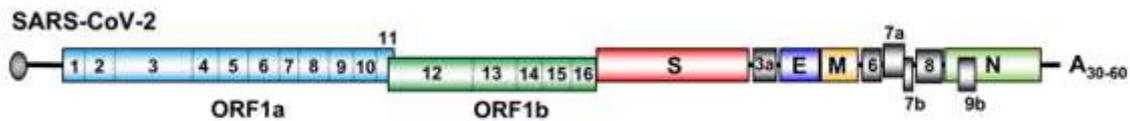


Figura 4. Estructura del genoma y potenciales de codificación del SARS-COV-CoV-2. Tapa (círculo gris) en el extremo 5', cola poli-A (A30-60) en el extremo 3'. 16 genes de proteínas no estructurales (ORF1a→nsp1-11 cajas azules izquierda y ORF1b→nsp12-16, cajas verdes izquierda). Genes de las 4 proteínas estructurales (S, espiga; E, sobre; M, membrana; N, nucleocápside) y proteínas accesorias (cajas grises numeradas), derecha. (Modificado de ⁵⁶).

El RNAg + del SARS-CoV-2 se traduce directamente en el citoplasma en dos poliproteínas, pp1a y pp1b, codificadas por el ORF1a y el ORF1b, tan pronto como el virus entra en una célula susceptible. Debido a que ORF1a y ORF1b se superponen parcialmente y ORF1b está en el marco de lectura -1 en relación con ORF1a, la expresión de ORF1b requiere un desplazamiento de marco ribosómico programado -1, cuyo mecanismo no se entiende completamente⁶⁴. La escisión de las dos poliproteínas por dos proteasas virales auto-activantes (proteasa similar a la papaína, PLpro o nsp3 y proteasa similar a la 3-quimotripsina, 3CLpro o nsp5) produce 16 nsps. Sin embargo, todas las demás proteínas estructurales virales y proteínas accesorias tienen que ser traducidas a partir de ARN subgenómicos virales (sgRNA) recién sintetizados que contienen una secuencia líder de 72-nt en 5' derivada del genoma viral. Una búsqueda de secuencia de Kozak con cada codón de iniciación AUG de ORFs individuales para traducción eficiente⁶⁵ muestra una purina requerida A o G en la posición -4 en ORF1a, S, M, 7a y 7b, 8 y N y una G en la posición +4 en ORF1a, 3a y M⁶⁶. Sin embargo, no todos los ORF en el genoma del SARS-CoV-2 tienen una secuencia de Kozak. La forma en que el SARS-CoV-2 utiliza las máquinas de traducción del huésped para la producción de proteínas virales, en particular para aquellos ORF sin la secuencia de Kozak, permanece en gran medida inexplorada. Al igual que otros coronavirus, el genoma del SARS-CoV-2 no contiene ninguna secuencia de entrada ribosómica interna conocida (IRES)⁶⁶.

En el SARS-CoV-2, ORF1a y el ORF1b ocupan casi dos tercios de la porción del genoma y entre las proteínas que codifican dentro de las nps que codifican se encuentran la ARN polimerasa-ARN-dependiente (RdRp), la helicasa o la endoribonucleasa, además de las dos proteasas encargadas de cortar las 2 poliproteínas, pp1a y pp1b, formadas inicialmente en la traducción de dichos ORFs en el retículo endoplásmico rugoso de la célula huésped y que producirán los 16 nsps (1-16)²⁸ (**Figura 5**).

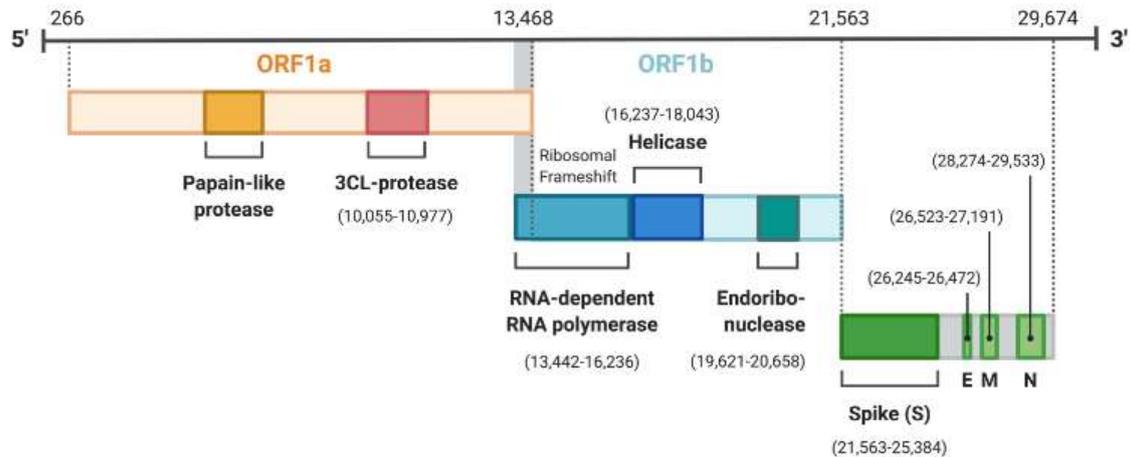


Figura 5. Estructura genómica del SARS-CoV-2. Se representan los ORF1a y 1b con proteínas no estructurales como las proteasas 3CL y la similar a papaína, la RNA polimerasa RNA dependiente (RdRp), helicasa, endorribonucleasa y cuatro proteínas estructurales (S, M, E y N) (Modificado de ⁵⁷).

Los ORFs del extremo 3', que corresponde al tercio restante del genoma, presentan genes que codifican proteínas accesorias y estructurales²⁸ (proteínas S, E, M, N) (Figura 4).

El genoma del SARS-CoV-2, como todos los demás CoVs, tiene una estructura G-cap, en el extremo 5' del genoma⁶⁷ y una cola poli-A de 30–60-nt (47 nts de longitud media) en su extremo de 3' para la estabilidad del genoma viral y la prevención de la digestión de la exorribonucleasa celular⁶⁸.

La región no traducida (UTR) en el extremo 5' del genoma del SARS-CoV-2 tiene una longitud de 265 nt de largo. Contiene una secuencia líder de 72 nt de largo, una secuencia central reguladora de la transcripción (TRS-L, ACGAAC) y varios otros elementos cis para regular la traducción viral, la síntesis de subgenomas y el empaquetamiento del genoma viral^{69,70} y para conferir resistencia a la degradación de los ARNm virales. Del mismo modo, adyacentes a cada ORF aparecen otras secuencias reguladoras TRS-B. La TRS-L y las TRS-B regulan la síntesis discontinua de hebras negativas intermedias de sgRNA⁷¹.

Además, la predicción de la estructura secundaria del SARS-CoV-2 en la región no traducida (UTR) del extremo 5, indica la presencia de 5 estructuras secundarias (SS) en forma de tallo-bucle⁷² (SL) y una unión de cuatro vías muy estable cerca del codón de inicio AUG de ORF1a⁶⁹.

La UTR del extremo 3' contiene el sitio de unión del complejo de replicación y transcripción (RTC) importante para iniciar la replicación y transcripción del ARN intermedio de sentido negativo (-ARN). También contiene una secuencia de octanucleótidos 5'-GGAAGAGC-3' con función desconocida y una región hipervariable no esencial (HVR)^{72,73}. Al igual que otros coronavirus, el UTR de 3' del SARS-CoV-2 no tiene secuencia de señal de poliadenilación canónica AAUAAA, por lo que la poliadenilación de los ARN virales es probablemente llevada a cabo por una adeniltransferasa viral nsp8⁷⁴.

Al igual que otros CoVs, el SARS-CoV-2 presenta una disminución de las islas CpG. Esto es esencial ya que los vertebrados huéspedes poseen proteína antiviral de dedo de zinc (ZAP) que identifica los motivos CpG del genoma viral y los procesa para su degradación⁷⁵.

Por otra parte, según las predicciones de SSs del RNAG, éste presenta otros 2 tipos de SSs: repeticiones invertidas en forma de horquillas (IR), sitios con repeticiones G-cuádruples, y pseudonudos, este último observado con frecuencia en los CoV. Estas SS son esenciales para la replicación del virus y protegen el RNAG viral para que no sea reconocido por el sistema de vigilancia del huésped⁶⁸. Se han predicho un mayor número de este tipo de estructuras en el SARS-CoV-2 que otros virus⁷⁶.

Así, el RNAG del SARS-CoV-2 posee la frecuencia más alta de IR por cada 1000 nucleótidos (nt) de los nidovirus. La mayoría de los IR en la región 5' UTR son de longitud de más de 12 nucleótidos, mientras que 3' UTR las IR son menores de 12 nt. Esta diferencia en la longitud de los IR puede indicar las funciones reguladoras diferenciales de estos dos UTR⁷⁷.

También se han predicho cinco estructuras SL en la región 5'-UTR del SARS-CoV-2 designadas como SL1-SL5⁷⁸, donde SL2 es esencial para la síntesis de sgRNA, TRS-L pertenece a SL3 y SL5 contiene el codón de inicio para el ORF1a.

Un pseudo-nudo estaría presente en ORF1ab, controlando el desplazamiento durante la traducción superpuesta de ORF1a y ORF1ab, lo que se conoce como señal de desplazamiento de marco ribosómico programado-1 (-1 PRF). Aparte del pseudo nudo, la señal PRF -1 también se compone de secuencia deslizante y región enlazadora⁷⁹, la cual muestra homología con el RNA ribosómico (ARNr), lo que indicaría su papel en el inicio de la traducción de proteínas⁸⁰.

Otra SS importante que posee el SARS-CoV-2 son las repeticiones G-cuádruples. Las cuatro bases de guanina forman una estructura cuadrada conocida como tétrada de guanina que son elementos críticos para la replicación del virus, el ensamblaje y la modulación de la respuesta inmune del huésped⁷². Hay 25 repeticiones G-cuádruples en el SARS-CoV-2 predichos específicamente en los genes ORF1ab, ORF3a, S, M y N.

Por último, los CoVs tienen los genomas más grandes conocidos de virus de RNA²⁹, que van desde 26-32 kilobases (kb), y este gran tamaño del genoma es posible gracias a que estos virus tienen un mecanismo para identificar y corregir errores que se introducen durante la replicación del genoma, propiedad correctora que se correlaciona con la expresión de una exoribonucleasa de 3' a 5' viral (ExoN)^{81,82}. Sin tal "corrección", la alta tasa de error de las RNA polimerasas dirigidas por ARN (RdRP) hace que se introduzcan demasiadas mutaciones deletéreas durante cada ciclo de replicación y estas hacen que el genoma sea inviable.

No obstante, a pesar de este mecanismo de corrección, surgen mutaciones y éstas pueden utilizarse para rastrear la propagación y evolución del virus. Así, la tasa de error estimada para los virus de ADN es de 10^{-8} a 10^{-6} s/n/c (número de sustituciones por nucleótido y por ronda de replicación), mientras que los virus de ARN varían de 10^{-6} a 10^{-4} s/n/c^{83,84}. Como ejemplos, el virus de la hepatitis C tiene una tasa de mutación de 1.2×10^{-4} s/n/c, el virus de la influenza A tiene una tasa de mutación de 1.2×10^{-5} y el coronavirus de la hepatitis de ratón coronavirus (MHV) tiene una tasa de mutación de 2.5×10^{-6} ⁸¹. Se espera que la tasa de mutación para el SARS-CoV-2 sea similar a la del MHV y, por lo tanto, más baja que la observada en otros virus de ARN⁸¹.

1.2.4 EL CICLO DE VIDA DEL SARS-CoV-2

El ciclo de vida e infección por el virus SARS-CoV-2 en la célula huésped, como el de otros coronavirus, se puede dividir en varios pasos clave: adhesión y entrada en la célula, traducción de la RNA polimerasa viral, transcripción subgenómica y replicación del RNA viral, traducción de proteínas estructurales, ensamblaje y liberación de viriones⁸⁵ (**Figura 6**).

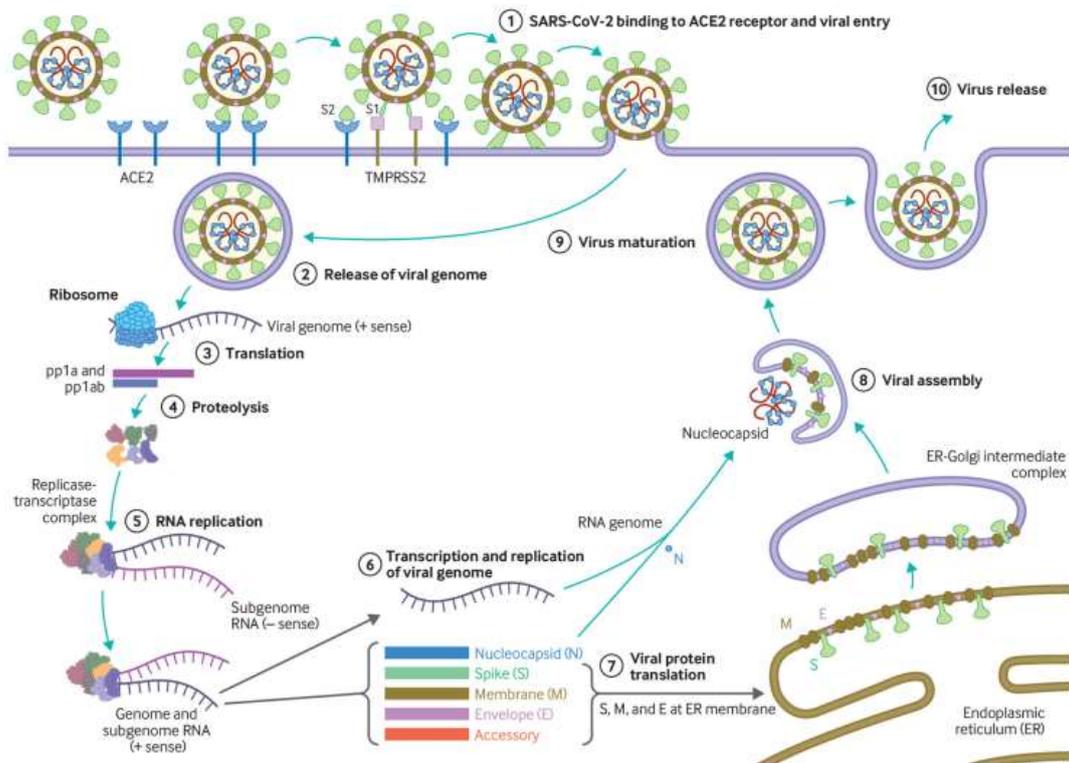


Figura 6. Ciclo de vida del SARS-COV-CoV-2. (1) El virus se une a ACE 2 como receptor de la célula diana del huésped en sinergia con TMPRSS2. Esto conduce a la fusión de la membrana y libera el genoma viral en el citoplasma del huésped (2). En la etapa (3) se produce traducción parcial del RNA viral y proteólisis de la pp1a y pp1 ab, seguido de replicación y transcripción del RNA por el complejo replicasa-transcriptasa (5 y 6)). La proteína N se traduce en los ribosomas citoplasmáticos y se une al ARN viral formando la nucleocápside y la S, M, E se traducen en el RE (7). Formación del complejo ER-Golgi, unión de la nucleocápside ensamblaje viral (8), maduración (9) y liberación del virus (10)⁸⁶.

Los mecanismos generales del ciclo siguen características que se han descrito para otros CoVs y se han confirmado parcialmente para el SARS-CoV-2, como a continuación se describen.

1.2.4.1 Adhesión y entrada en la célula humana.

La proteína S de la superficie de algunos CoVs, es el determinante viral que inicia la infección por unión al receptor y fusión de la envoltura lipídica viral con la membrana celular⁸⁷. Esto ocurre en el caso del SARS-CoV-2 y de su pariente más cercano, al SARS-CoV (**Figura 7**) ya que ambos comparten el mismo receptor funcional en la célula humana hospedadora, la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2)⁸⁸⁻⁹⁰.

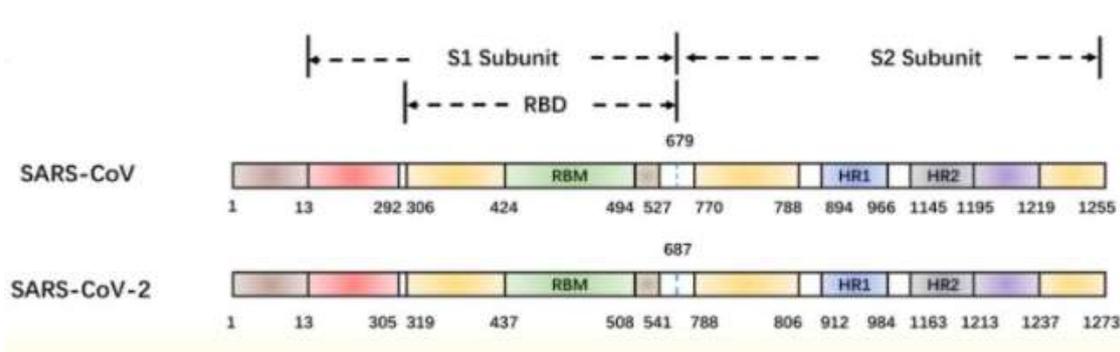


Figura 7. Comparación de las proteínas espiga (S) del SARS-CoV y del SARS-CoV-2. RBD: dominio de unión a receptores; RBM: motivo de unión al receptor; HR1/2, repetición heptábrica 1/2⁹¹.

Proteína ACE2

La ACE2 es una glicometaloproteína de zinc de superficie celular tipo I, con un único dominio extracelular N-terminal con actividad catalítica, un dominio C-terminal de anclaje a membrana y un dominio de unión al zinc HEXXH conservado⁹². Actúa como una carboxipeptidasa que elimina aminoácidos individuales del extremo C-terminal de sus sustratos⁹³. Esta proteína regula el sistema Renina-Angiotensina- Aldosterona (RAS), cascada hormonal que se inicia a través de la síntesis de renina en el aparato yuxtglomerular y que es un regulador de las funciones cardiovascular y renal, desempeñando un papel fundamental en la fisiopatología de varias enfermedades cardiovasculares y renales¹⁻⁴ y también constituye la puerta de entrada del SARS-CoV-2 y otros coronavirus a las células humanas, como el CoV-NL63 y el SARS-CoV⁹⁴, definiendo así el tropismo por estas células⁹⁵.

La expresión de la ACE2 se ha detectado en un número importante de tipos celulares, como las células alveolares tipo II (AT2)⁹⁶⁻¹⁰⁰, células secretoras epiteliales transitorias bronquiales células epiteliales respiratorias¹⁰¹, células miocárdicas⁹⁹, células endoteliales y células del músculo liso de la arteria⁹⁹, células epiteliales del esófago⁹⁷⁻⁹⁹, neuronas y glía¹⁰², células epiteliales de la lengua¹⁰³, estómago^{99,100}, colangiocitos^{99,104}, tejido adiposo¹⁰⁵, glándulas e islotes exocrinos pancreáticos¹⁰⁶, células del túbulo proximal renal^{97-99,107,108}, células uroteliales de la vejiga^{97,100}, testículos (células de Leydig y Sertoli y espermatogonia)^{100,109,110}, células epiteliales del útero¹⁰⁰, ovario y mama¹⁰³, interfaz materno-fetal¹¹¹, enterocitos del íleon⁹⁷⁻⁹⁹ y colon^{97,98,100}, y células del recto⁹⁷, entre otros y, según un estudio realizado por Zou et al.¹¹² en el que relacionaron la expresión de ACE2 en diferentes órganos con su riesgo potencial de infección por SARS-CoV-2, los tejidos de alto riesgo (tipos de células que contenían > proporción del 1% de expresión de ACE2) fueron el tracto respiratorio inferior (2%), pulmón (> 1%), corazón (> 7,5%), íleon (30%), esófago (> 1%), riñón (4%) y vejiga (2,4%), mientras que el estómago e hígado presentaban una proporción menor del 1% de células ACE2 positivas, lo que indica que estos tejidos se consideraron de bajo riesgo de infección por SARS-CoV-2. La cavidad oral también está en riesgo potencial de infección por SARS-CoV-2¹⁰³, ya que la mucosa oral también expresa ACE2, especialmente en las células epiteliales de la lengua.

Además, el análisis del ARNm de ACE2 y la expresión de proteínas en modelos experimentales, y la evaluación de tres bases de datos diferentes han demostrado que el intestino delgado, los testículos, el riñón, el músculo cardíaco, el colon y la glándula tiroides son los tejidos con el nivel más alto de expresión de ACE2, sin que se detecte expresión en las células sanguíneas¹¹³⁻¹¹⁹.

Por otro lado, la ACE2 no se ha detectado en las neuronas sensoriales ni del bulbo olfatorio, pero se expresa en algunas áreas del cerebro¹⁰². Basándose en el brote de SARS-CoV, Baig et al.¹²⁰

propusieron un posible mecanismo fisiopatológico para la afectación del Sistema Nervioso Central (SNC), donde, a través de la diseminación hematológica o a través de la placa cribiforme, el virus sería capaz de romper la barrera hematoencefálica y unirse al receptor ACE2 de neuronas. Además, la detección de SARS-CoV-2 en muestras *post-mortem* de lóbulo frontal¹²¹ y líquido cefalorraquídeo¹²² confirmó el potencial neurotrópico del virus.

Sorprendentemente, el análisis de la expresión de ACE2 en diversos estudios reveló que esta es muy baja en el epitelio respiratorio y en el olfativo, principales vías de entrada del virus, estando fundamentalmente limitada a una pequeña fracción de células epiteliales alveolares tipo II¹¹³⁻¹¹⁵. Debido a la elevada infectividad que presenta el SARS-CoV-2, éste parece depender de otros factores del huésped que faciliten las interacciones entre el virus y la célula huésped en células con bajo nivel de proteína ACE2. Recientemente, se ha observado que el receptor de membrana Neuropilin 1 (NRP1) puede servir como una puerta alternativa o independiente para la entrada e invasión del SARS-CoV-2 a las células humanas¹²³⁻¹²⁵. El estudio de Cantuti-Castelvetri et al., en el que utilizaron tejidos de autopsias humanas, reveló que NRP1 potencia significativamente la infectividad del SARS-CoV-2 y demostró que el NRP1 se expresa fuertemente en los epitelios respiratorios y olfativos, pudiendo mediar la entrada de SARS-CoV-2 en el cerebro a través del bulbo olfatorio, mientras que la ACE2 está ausente o expresada a bajo nivel y, por lo tanto, puede proporcionar una puerta de entrada independiente para la entrada viral y la invasión de las células huésped. Otros receptores como la lectina de tipo C CD209L (L-SIGN) y DC-SIGN utilizados por el SARS-CoV están siendo investigados como posibles alternativas para la unión, entrada y tropismo celular del SARS-CoV-2¹²⁶⁻¹²⁸ y si, como en el caso del VIH-1, el SARS-CoV-2 puede alterar su tropismo hacia diferentes receptores con la progresión de la enfermedad¹²⁹, aunque se necesita más investigación para dilucidar tales hipótesis.

Por otra parte, la proteína S viral posee dos subunidades, S1 y S2¹³⁰ y está formada por un trímero con tres cabezas S1 sobre un tallo trimérico de S2 (**Figura 9**). El trímero de S1 del SARS-CoV contiene el dominio de unión al receptor (RBD) que reconoce específicamente a la ACE2 de la célula humana como su receptor¹³¹⁻¹³³, mientras que la subunidad S2 posee un ectodominio que contiene un péptido de fusión (FP) y dos repeticiones heptádicas (HR1 y HR2), que operan la fusión de las membranas viral con la de la célula huésped, un segmento transmembrana viral (TM) y una cola intraviral (IC) (**Figura 8**)^{87,129,133,134}.

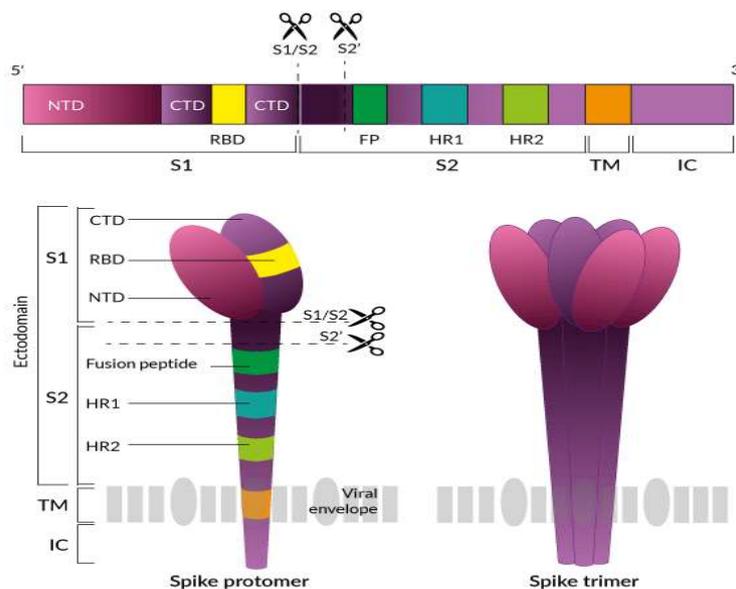


Figura 8. Estructura, dominios y sitios de escisión de la proteína S. (Fuente: InvivoGen).

La S1 contiene un subdominio N-terminal (S1-NTD) y un C-terminal (S1-CTD). El RBD se encuentra en la región S1-CTD y está enterrado en el trímero interno de la cabeza S1 (**Figura 8**).

Por otra parte, el dominio S1 puede adoptar dos conformaciones distintas: "abierta", necesaria para unirse al receptor ACE2 en la superficie de las células diana huésped^{87,130} y "cerrada", por la que el RBD permanece oculto, estado en el que la unión al receptor ACE2 sería inefectiva y contribuiría a la evasión inmune del SARS-CoV-2 como estrategia de enmascaramiento conformacional y ejerciendo una restricción física sobre la subunidad S2 hasta que las proteasas específicas de la membrana celular escinden los sitios S1/S2 y S2¹³⁰.

En el caso del SARS-CoV, el RBD de la proteína S se encuentra principalmente en estado de pie, mientras que en el SARS-CoV-2, sucede lo contrario^{130,135}. El RBD oculto contribuye a la evasión inmune del SARS-CoV-2 como estrategia de enmascaramiento conformacional, lo que puede conducir a respuestas inmunes insuficientes. Sin embargo, también puede producir un reconocimiento deficiente del receptor huésped y a una entrada ineficiente en las células huésped¹³⁶. El SARS-CoV-2 supera este problema mediante la evolución de su RBD con un punto único de escisión por furina, que permite preactivar la proteína S exponiendo su RBD en posición "abierto" para facilitar la unión a la ACE2 y mejorar la entrada del SARS-CoV-2 en la célula, como sugiere el análisis de secuencia de la proteína S del SARS-CoV-2^{130,137}, ya que el sitio S1/S2 de la proteína S del SARS-CoV-2 contiene una inserción de cuatro aminoácidos que proporcionan un sitio de escisión por furina (R-R-A-R685↓), como se ha demostrado en estudios *in vitro*¹³⁸, en contraste con la proteína S del SARS-CoV (**Figura 9**).

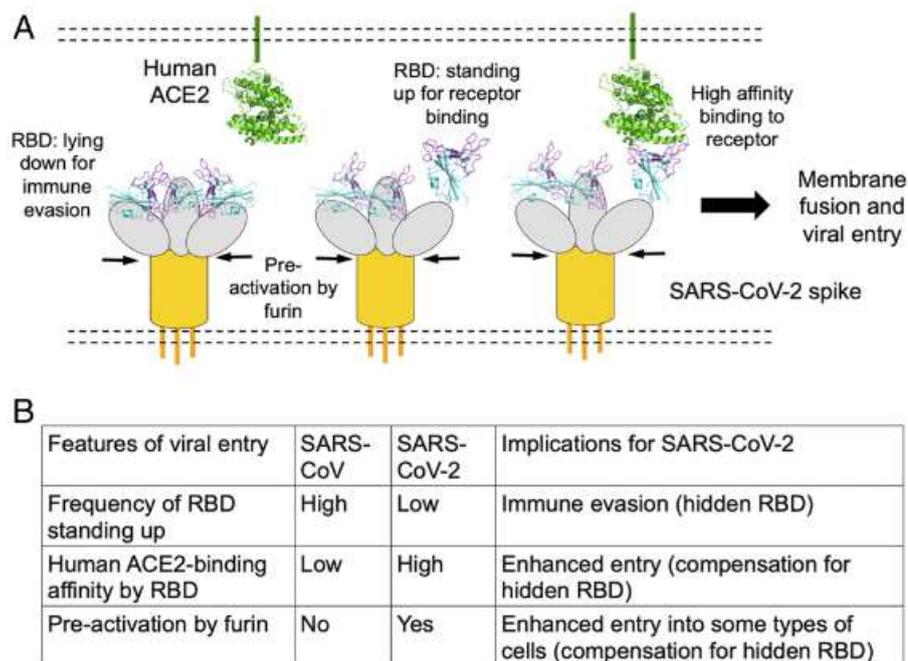


Figura 9. Resumen de los mecanismos de entrada celular del SARS-CoV-2. (A) Una vista esquemática de tres características únicas de la entrada de SARS-CoV-2: RBD en posición "cerrado" oculto para la evasión inmune, la alta afinidad de unión ACE2 de RBD para una entrada eficiente y la preactivación de furina para una entrada mejorada en algunas células. (B) Comparación de las características de SARS-CoV y SARS-CoV-2 para la entrada del virus¹³⁶.

La furina es una proteína transmembrana tipo I que se expresa de forma ubicua en tejidos y células eucariotas. Esta escinde los precursores de una amplia gama de proteínas, incluidas

hormonas, factores de crecimiento, receptores de la superficie celular y moléculas de adhesión durante su transporte a lo largo de la vía secretora. Además, se ha identificado como una proteasa activadora para las proteínas de fusión de una amplia gama de virus, incluidos los virus de la influenza aviar A altamente patógena (HPAIV), el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus del Ébola, el virus del sarampión y el virus de la fiebre amarilla, así como las toxinas bacterianas como la toxina shiga o la toxina del ántrax¹³⁹⁻¹⁴¹.

Además, para fusionarse con la membrana celular, la proteína S debe activarse proteolíticamente, de modo que S1 se disocie y S2 sufra un importante cambio estructural que exponga los péptidos de fusión de la membrana viral con la membrana plasmática^{142,143}. Entre las proteasas activadoras de la entrada del SARS-CoV se incluyen la proteasa de superficie celular serina proteasa transmembrana 2 (TMPRSS2) y las catepsinas de proteasas lisosomales^{142,143}. Diversos estudios indican que TMPRSS2 está implicado en la activación de la proteína S del SARS-CoV-CoV-2^{87,138} de forma que conduciría al cambio estructural final de la S2 necesario para la fusión con la membrana de la célula¹³⁶.

Proteína TMPRSS2

La TMPRSS2 es una proteína transmembrana de tipo II que se expresa en la membrana celular, la cual se produce inicialmente como una proteína precursora, el zimógeno, el cual sufre posteriormente activación autoproteolítica¹⁴⁴. Contiene un dominio extracelular de la serina proteasa (aminoácidos 255-492), seguido de un dominio rico en cisteína que incluye el receptor tipo scavenger (SRCR, aminoácidos 149-242) involucrado en la unión a la superficie de otras células o moléculas extracelulares, un dominio del receptor de LDL de clase A (LDLRA, aminoácidos 113-148) con sitio de unión para el calcio y un dominio transmembrana (TM) (aminoácidos 84-106) seguido del extremo N terminal intracelular¹⁴⁵. La TMPRSS2 sirve también de herramienta para facilitar el ingreso a las células humanas de una amplia gama de virus. Así, participa en la escisión proteolítica y la activación de la proteína hemaglutinina, que es esencial para la infectividad del virus de la influenza A, lo que sugiere que la enzima puede contribuir a la invasión del virus de las vías respiratorias humanas^{146,147}, escinde y activa proteolíticamente los péptidos de fusión de las glicoproteínas S de los coronavirus humanos 229E (HCoV-229E), EMC (HCoV-EMC), SARS-CoV y MERS-CoV^{87,148,149} y las glicoproteínas de fusión del virus de Sendai (SeV), metapneumovirus humano (HMPV), virus de parainfluenza humana 1, 2, 3, 4a y 4b (HPIV)¹⁵⁰ (**Figura 10**).

La TMPRSS2 humana se expresa en muchos tejidos y órganos, incluyendo la próstata, la mama, el conducto biliar, el riñón, el colon, el intestino delgado, el páncreas, el ovario, la glándula salival, el estómago y el pulmón^{151,152}. En estos tejidos, la proteína TMPRSS2 se expresa principalmente en las células epiteliales y se co-expresa con ACE2 en neumocitos tipo II del pulmón, enterocitos de absorción ileal, células epiteliales intestinales, córnea, vesícula biliar y células secretoras de las copas nasales^{117,144,153,154}, lo que podría explicar los tipos de células diana y la manifestación clínica en la infección por SARS-CoV-2¹⁵⁵.

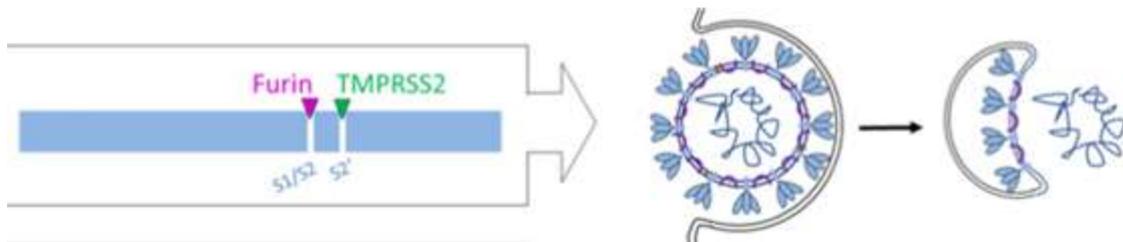


Figura 10. Procesamiento propuesto de la proteína espiga S del SARS-CoV-2 por TMPRSS2 y furina. S debe escindirse en dos sitios, S1/S2 y S2', para desencadenar la fusión de las membranas virales y celulares durante la entrada del virus para liberar el genoma del virus en la célula huésped. Se cree que la escisión de S ocurre secuencialmente, con la escisión en el sitio S1 / S2 que ocurre primero y la escisión posterior en el sitio S2'. La furina procesa el sitio S1/S2, mientras que TMPRSS2 escinde en el sitio S2'¹³⁸

La proteína S del SARS-CoV-2 posee un péptido de fusión que se mantiene protegido e inactivo hasta que el virus se encuentra con una célula huésped apropiada y se activa proteolíticamente por la TMPRSS, exponiendo el péptido de fusión para formar una estructura en forma de horquilla que se inserta en la membrana plasmática de la célula^{156,157}. Otros virus utilizan péptidos de fusión de este tipo, como el virus de la gripe, el del Ébola y el VIH¹⁵⁷. Después, esta estructura en forma de horquilla comienza a plegarse hacia atrás, formando un haz de 6 hélices que tira de las membranas celulares y virales para promover la fusión de ambas membranas.

La forma en que los coronavirus específicos se fusionan en la membrana plasmática durante la endocitosis permanece incompletamente resuelta. En los casos de SARS-CoV, MERS-CoV y MHV, la participación de las proteasas endosómicas y lisosomales sobre sus proteínas S sugiere que la entrada puede ocurrir durante la endocitosis. Para el SARS-CoV y el MERS-CoV, diversos estudios demuestran que pueden utilizar tanto las vías de fusión endocítica como la fusión directa de membranas para la entrada¹⁵⁸⁻¹⁶¹.

Hay estudios que demuestran que la inhibición de las catepsinas endosómicas reduce la eficiencia de la entrada de SARS-CoV-2, lo que sugiere que este virus también explota la endocitosis como otra vía de entrada además de la fusión directa con la membrana plasmática^{87,136,162}.

1.2.4.2. Replicación, transcripción y traducción genómica

Una vez liberada la nucleocápside en el citoplasma celular, el genoma viral de ARN de sentido positivo (RNAg) se traduce por los ribosomas celulares citoplasmáticos para producir proteínas no estructurales (nsps) a partir de dos marcos de lectura abiertos (ORF), ORF1a y ORF1b, que se solapan. La traducción del ORF1a produce la poliproteína pp1a y, a continuación, una secuencia resbaladiza y un pseudo-nudo en la secuencia del RNAg+ situado hacia el final de ORF1, provocan que 25-30% de los ribosomas sufran un cambio de marco ribosómico programado (PRF), cuyo mecanismo no está completamente descrito¹⁶³, continuando la traducción en ORF1b y produciendo la poliproteína pp1ab más larga¹²⁷. Ambas se escinden auto proteolíticamente en 16 npss, por dos proteasas virales que se autoactivan, la proteasa similar a la papaína (PLpro o nsp3) y la proteasa similar a 3-quimotripsina (3CLpro o nsp5), produciendo 16 nsps, incluidas ambas proteasas, la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) (nsp12), la helicasa (Hel) (nps13) y la exonucleasa (ExoN) (nsp14)¹⁶⁴⁻¹⁶⁶.

Luego, nsp 3 y 4 inducen el reordenamiento de la membrana celular para formar vesículas de doble membrana modificadas inducidas por virus (DMV) que se derivan del retículo endoplásmico rugoso (RE) en la región perinuclear^{167,168} (**Figura 11**), donde se ensambla y ancla el complejo de transcripción-replicación del coronavirus (RTC)¹⁶⁹ formado por las proteínas nsp

7, 8, 9, 10, 13 (Helicasa) y 16, junto con la RdRp viral (nps 12), que replica copias de la cadena de ARN (-) de longitud completa del genoma^{8,10,170-173} (Figura 12).

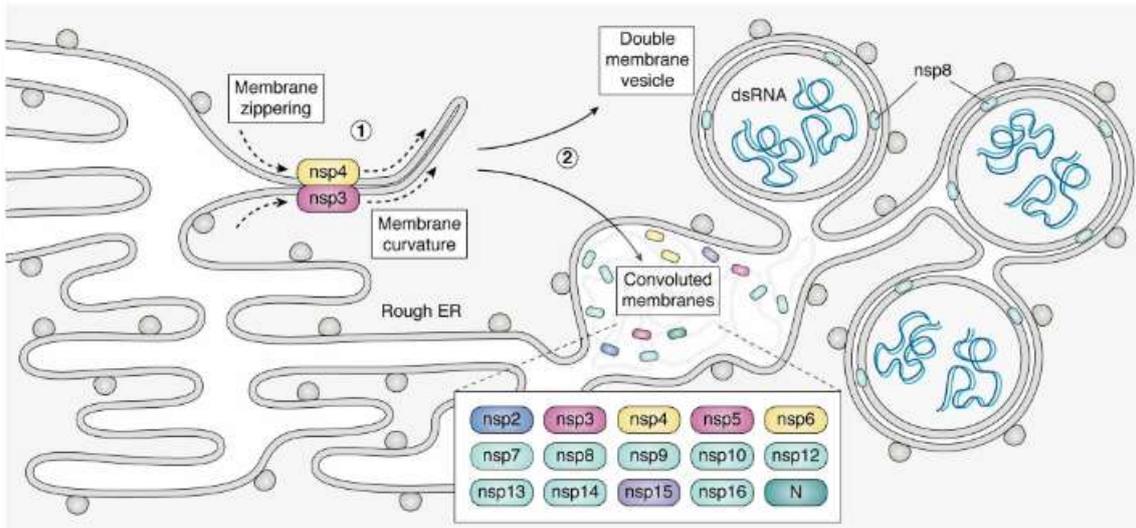


Figura 11. Diagrama de formación de vesículas de doble membrana de replicación. La infección por coronavirus conduce a la modificación de la membrana del ER a medida que se forman los RTC. Nsp3 y nsp4 están integrados co-traducionalmente en la membrana ER e interactúan a través de sus bucles luminales. Esto conduce a un complejo "cremallera" de las membranas ER y a la curvatura inducida (1). Estas interacciones producen una compleja matriz de membranas enrevesadas (CM) y DMV que son contiguas con el ER rugoso (2). Las proteínas que forman los RTC se localizan principalmente en las membranas enrevesadas. Los DMV contienen dsRNA, que se cree que son intermediarios de replicación secuestrados. La membrana interna del DMV no tiene ribosomas, conexiones al citoplasma o conexiones al resto de la red. El mecanismo de formación del DMV y el sitio exacto de la replicación del ARN CoV dentro de esta red de membrana son actualmente desconocidos¹⁷⁴.

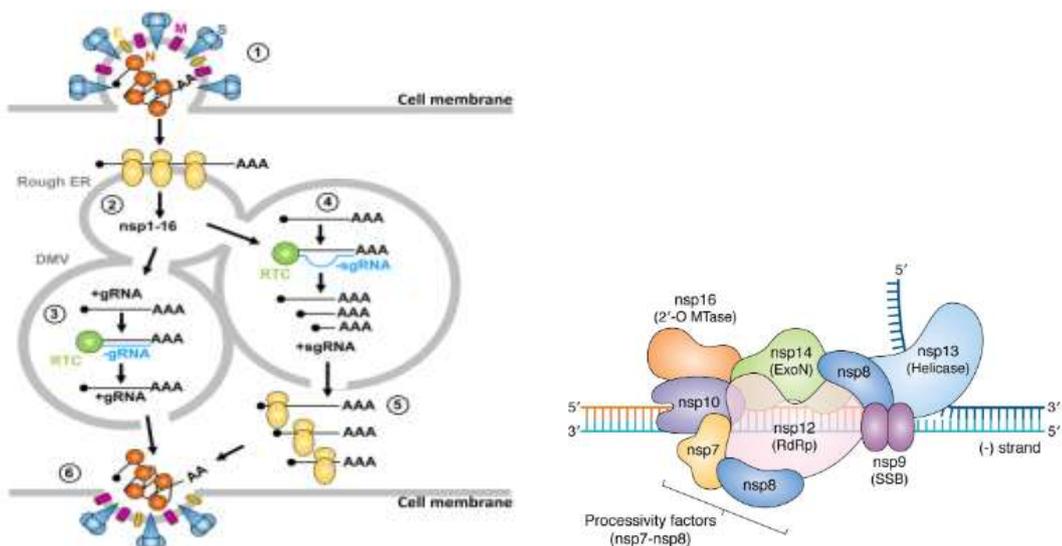


Figura 12. Replicación y transcripción del genoma del coronavirus. Diagrama que muestra los pasos clave en la entrada de coronavirus (1), la traducción inicial del +gRNA viral entrante para expresar proteínas virales no estructurales (nsp1-16) (2), la replicación del genoma en vesículas de doble membrana (DMV), la transcripción continua de gRNA a través de un -gRNA-intermedio por replicación viral y complejo de transcripción (RTC) (3), la generación de sgRNA

por transcripción discontinua RTC (4), la expresión de proteínas estructurales y accesorias de +sgRNA (S, espiga; M, membrana; E, sobre; N proteínas) (5), y ensamblaje y liberación de viriones (6)⁵⁶. (Derecha): Modelo de supuesto RTC del coronavirus. Se muestra un modelo de cómo las diferentes proteínas en el RTC del coronavirus se unen en la hebra negativa viral durante la síntesis del ARN de cadena positiva. Se predice que el RTC consiste en la RdRp (nsp12), los factores de procesividad (nsp7-8) y el complejo ExoN (nsp14, nsp10). Se muestra que la helicasa desenrolla el dsRNA por delante del replisoma, y el SSB (nsp9) se muestra como un dímero que protege las regiones monocatenadas del ARN. Además, la 29-O-MTasa (nsp16), que se cree que está involucrada la protección (cap5') del ARN, también está indicada¹⁷⁴.

Estas se utilizan como plantillas para replicar copias del genoma de RNAg+ de longitud completa y transcribir un subconjunto de 9-12 ARN subgenómicos - (RNAsg-) de los ORFs cercanos al extremo 5', incluidos los que codifican todas las proteínas estructurales, a través de la transcripción discontinua (**Figura 12**).

Estos RNAsg- se transcriben en RNA mensajeros subgenómicos (mRNAsg +) ^{85,166,175} necesarios para la traducción de las proteínas estructurales y accesorias virales codificadas en el resto de ORFs. Las proteínas estructurales S, E y M y otras accesorias se traducen de los mRNAsg+ en el retículo endoplásmico (ER) y posteriormente pasan al Aparato de Golgi, donde se produce el plegamiento y la maduración de las mismas y se insertan en un compartimento intermedio de ER con Golgi (ERGIC), mientras que los sgrNA+ de la proteína N se traducen en los ribosomas citoplasmáticos libres y se une al RNA genómico para formar la nucleocápside¹⁷⁶ (**Figura 13**).

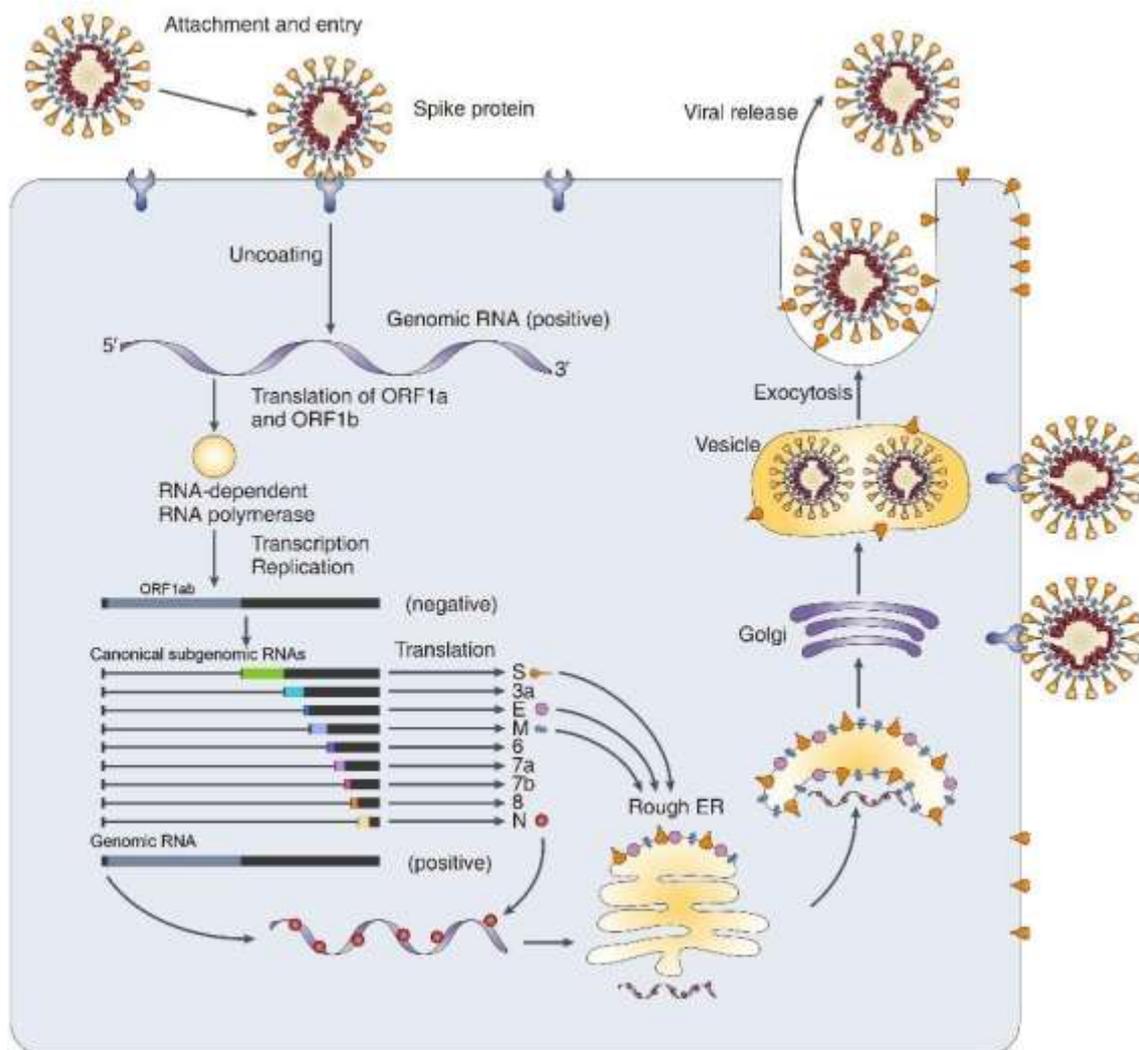


Figura 13. Representación de las distintas fases del ciclo de vida del SARS-CoV-2 con detalle de las fases de replicación, transcripción, traducción y ensamblaje de nuevos virus¹⁷⁷.

Aunque la replicasa viral media principalmente la transcripción genómica, los roles de varios factores del huésped y las proteínas virales no estructurales todavía se están estudiando. Se sabe que la proteína N sirve como una chaperona de RNA y ayuda a controlar la lectura de plantillas de RNA^{178,179}. Diversos estudios *in vitro* demostraron que las proteínas N de SARS-CoV son fosforiladas por la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3), facilitando la síntesis de ARN genómico y sgRNAs más largos¹⁷⁹⁻¹⁸¹. Una proteína de unión al RNA, la ribonucleoproteína A1 nuclear heterogénea (hnRNPA1), también podría unirse estrechamente a la proteína N del SARS-CoV y regular la síntesis de ARN viral¹⁸². Además, las proteínas de unión al RNA del huésped desempeñan un papel crucial al unirse directamente a las regiones no traducidas (UTR) del genoma del coronavirus y regulan la replicación y la transcripción. Entre estas, la CCHC tipo dedo de zinc y el motivo de unión al RNA 1 (ZCRB1) que se une al 5'-UTR del virus IBV¹⁸³, la unión a la aconitasa mitocondrial al 3'-UTR del virus MHV¹⁸⁴ y la proteína de unión poli(A) (PABP) a la cola poli(A) del coronavirus bovino¹⁸⁵ son dignos de mención. Por lo tanto, debido a la similitud del genoma del SARS-CoV-2 con EL SARS-CoVse predice que estos mecanismos se utilizarán en su mayoría, siendo necesario más investigación y experimentos para demostrar su ocurrencia precisa o cualquier desviación en los mecanismos. Un mapa de alta resolución del transcriptoma y el epi-transcriptoma del SARS-CoV-2 reveló que su proceso de transcripción es complejo y que

implica numerosos eventos de transcripción discontinuos¹⁷⁷. Además, se descubrió la presencia de varios ARN, que codifican ORF desconocidos, además de 10 RNA canónicos conocidos. Este extenso estudio también encontró alrededor de 41 sitios potenciales de modificación de RNA con un motivo AAGAA¹⁷⁷.

1.2.4.3. Maduración de proteínas estructurales y ensamblaje y liberación de nuevos virus

Las proteínas estructurales del coronavirus se someten a modificaciones post-traduccionales que las hacen completamente funcionales¹⁸⁶. Se sabe que tanto las proteínas S como las M están modificadas por glicosilación¹⁸⁷. El plegamiento y la maduración de las proteínas transmembrana virales (S) se producen en el ER, y son modulados por chaperonas de proteínas del ER como la calnexina¹⁸⁸.

El ensamblaje de partículas del SARS-CoV-2 y la posterior liberación de viriones tiene lugar en el compartimento intermedio del Aparato de Golgi (ERGIC) y está mediado por la proteína de membrana (M)^{189,190}, cuya interacción homotípica proporciona el andamio para la morfogénesis del virión, mientras que las interacciones M-S y M-N facilitan el reclutamiento de componentes estructurales en el sitio de ensamblaje con la nucleocápside y la envoltura viral^{191,192}. La proteína E también contribuye en el ensamblaje de partículas virales al interactuar con proteínas M¹⁹³ (**Figura 13**). Después, las partículas virales que brotan del ERGIC se transportan en vesículas de pared lisa a través de la vía secretora para su liberación por exocitosis^{194,195}.

Las proteínas RAB GTPasas humanas forman el grupo más grande dentro de la superfamilia Ras GTPasas de bajo peso molecular que funcionan como interruptores moleculares al cambiar entre su GDP inactivo y las formas activas unidas a GTP¹⁹⁶⁻¹⁹⁸. Las RABs están localizadas en varios compartimentos intracelulares y se sabe que desempeñan importantes funciones reguladoras en el tráfico de membranas intracelular y mantienen la identidad de los orgánulos celulares mediante el control de la carga entrante y saliente a través de la brotación, el transporte, el anclaje, el atraque y la fusión de intermediarios vesiculares, supervisando así el transporte vectorial de proteínas y membranas entre orgánulos¹⁹⁷. Entre ellas, la Rab14 se ha propuesto que participa en el tráfico entre el complejo de Golgi y los endosomas ya que se localizó en el Retículo Endoplasmático Rugoso, Aparato de Golgi y endosomas de la vía Trans-Golgi (vacuolas endosómicas tempranas y vesículas asociadas), es decir, en la vía biosintética/reciclaje entre el Golgi y los compartimentos endosómicos¹⁹⁹.

Los virus envueltos generalmente dependen de la maquinaria de tráfico vesicular del huésped para dirigir sus proteínas estructurales y genomas a sitios de replicación, ensamblaje y brotación del virus. En este sentido, las RAB GTPasas se han implicado en la replicación de muchos patógenos virales importantes que infectan a los seres humanos²⁰⁰.

Estudios recientes señalan que el control genético de la expresión de genes que codifican proteínas que actúan como receptores putativos de virus putativos, proteínas necesarias para el tráfico de vesículas, enzimas que interfieren con la replicación viral y otros factores de restricción, pueden subyacer a las diferencias interindividuales en el riesgo o la gravedad de la infección por SARS-CoV-2 u otros virus. Entre ellos, encontraron eQTLs en genes necesarios para la replicación del genoma viral (ZCRB1) y para el tráfico de vesículas de membrana (AP2A2 y RAB14)²⁰¹.

En otro estudio, realizado para identificar los factores del huésped que se predicen que interactúan con proteínas virales durante la infección del virus, enfocado a 332 proteínas del huésped identificadas por Gordon et al. (2020b) como interactores con proteínas SARS-CoV-2 de alta confianza²⁰², identificaron, entre otras, a la GTPasa RAB10 y a la RAB14 (**Figura 14**), que

intervienen en el transporte de vesículas en la Red Trans-Golgi, como factores críticos de la célula para la infección por el SARS-CoV-2. (Figura 15).

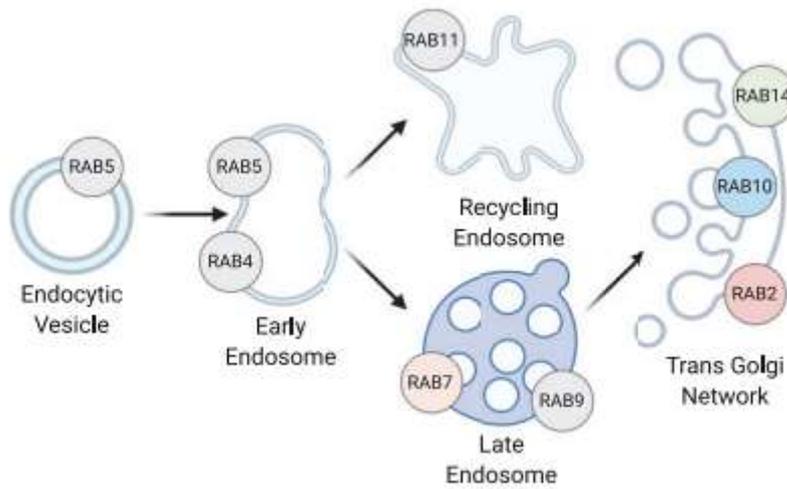


Figura 14. Rab GTPasas Rab y tráfico intracelular de vesículas. Diagrama creado con Biorender.com modificado desde Stenmark (2009)²⁰².

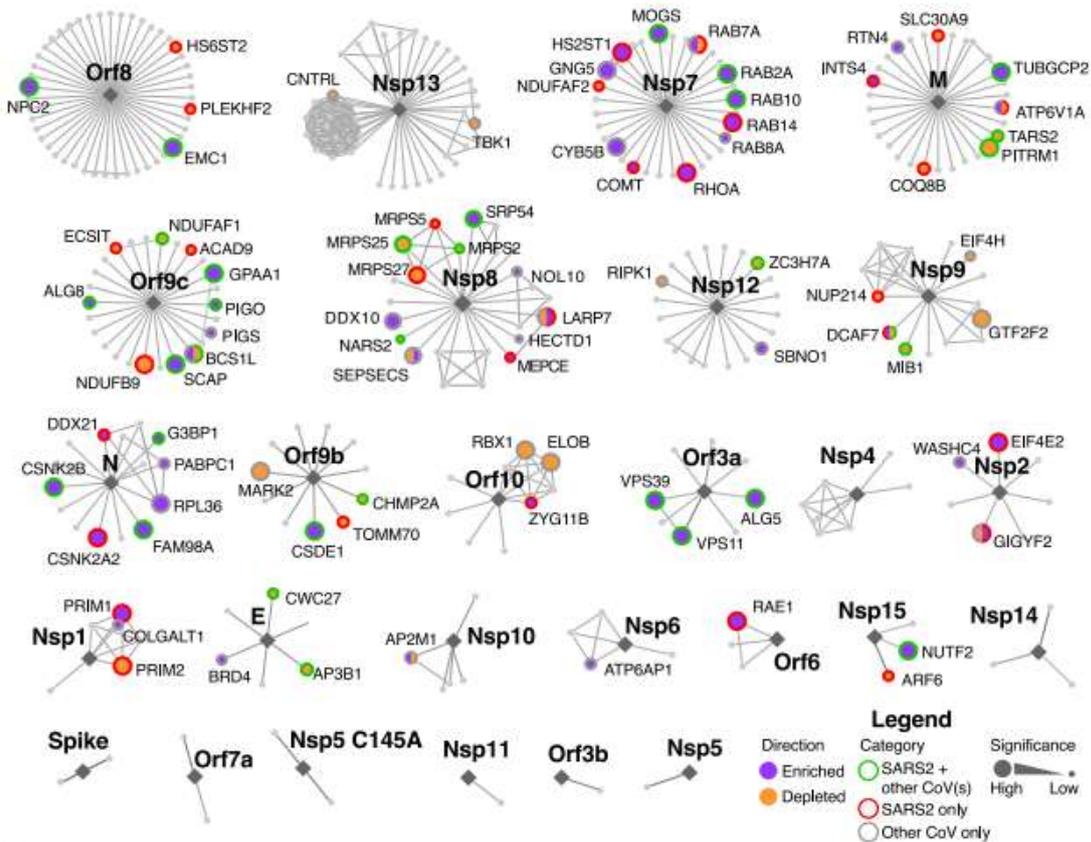


Figura 15. Red de interactomas organizada por proteína del virus de mayor a menor número de interactores putativos. Los colores de los bordes denotan hits de SARS-CoV-2 que se dan con otros Covs (verde), exclusivos de SARS-CoV-2 (rojo) o exclusivos de otros CoVs (gris) con tamaño de nodo escalado según su significancia²⁰².

Los β -coronavirus explotan la vía de exocitosis lisosomal dependiente de ARL8b para su liberación en el entorno extracelular¹⁹⁵. Varios factores del huésped están implicados en el ensamblaje y la liberación del coronavirus y las intrincadas interacciones entre el citoesqueleto y las proteínas estructurales juegan un papel fundamental. Las interacciones entre la proteína IBV M, la β -actina, la proteína TGEVN, la vimentina, la proteína TGEV S y la filamina A (una proteína de unión a la actina), facilitan el ensamblaje y la liberación de partículas de coronavirus^{203,204}.

El SARS-CoV-2 parece explotar la vía de exocitosis lisosomal celular para la salida de la célula interactuando con distintos factores de ésta²⁰⁵. La vía autofágica-lisosomal actúa como un sistema de vigilancia contra la invasión de patógenos²⁰⁶⁻²⁰⁸. La autofagia implica el envolvimiento de una porción de materiales citosólicos seleccionados para ser degradados (orgánulos dañados, agregados de proteínas y patógenos invasores) en un autofagosoma de doble membrana²⁰⁹⁻²¹¹. El autofagosoma se fusiona con vesículas endosomales como endosomas tardíos / lisosomas para formar anfisomas, un proceso conocido como maduración de autofagosomas, que eventualmente conduce a la formación de autosomas degradativos^{212,213}. Los virus han desarrollado mecanismos para evadir la destrucción autofágica e incluso para secuestrar vacuolas autofágicas (es decir, autofagosomas, anfisomas y autosomas no degradativos) para sus propios beneficios como, por ejemplo, para su replicación y la liberación^{206,208,213}. La infección por el virus SARS-COVCoV-2 bloquea la autofagia en un paso de la maduración del autofagosoma, lo que resulta en la acumulación de autofagosomas y anfisomas²¹⁴.

Para ello, la proteína codificada por el ORF3a (nsp3a), promueve la exocitosis lisosomal facilitando la orientación lisosomal del complejo BORC-ARL8b, que media el tráfico de lisosomas a la membrana plasmática y las proteínas SNARE relacionadas con la exocitosis, secuestrando el componente del complejo HOPS VPS39 y evitando que interactúe con la proteína SNARE autofagosómica STX17 y bloqueando de la autofagia²⁰⁵. Esto bloquea el ensamblaje del complejo trans-SNARE compuesto por STX17, SNAP29 y VAMP8, que impulsa la fusión de autofagosomas y anfisomas con lisosomas²¹⁴. El canal de Ca^{2+} TRPML3 es necesario para la exocitosis lisosomal y la ORF3a también aumenta el nivel de Ca^{2+} citosólico²⁰⁵ (**Figura 16**).

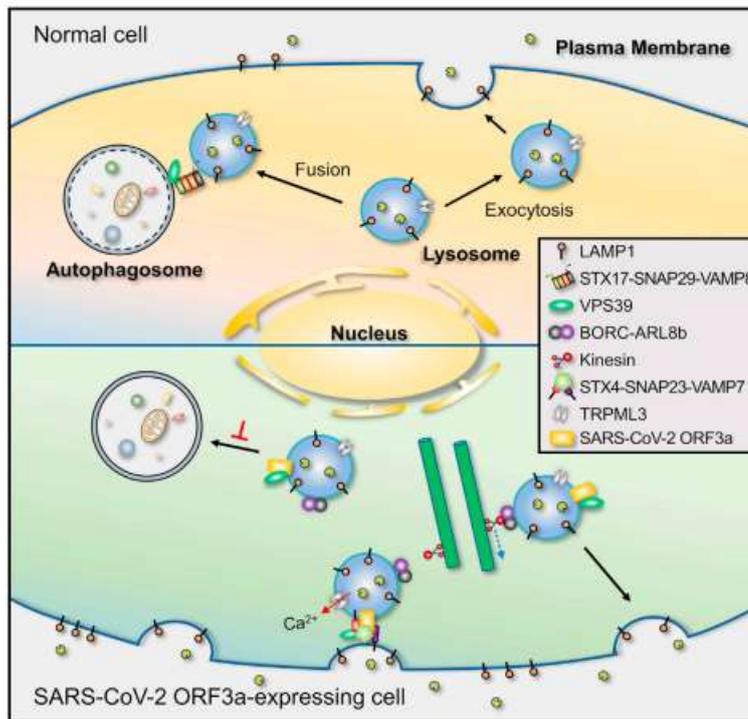


Figura 16. Esquema del proceso de exocitosis del SARS-CoV-2.²⁰⁵

En cambio, la proteína ORF3a del SARS-COV-CoV, no interactúa con VPS39 ni bloquea la maduración del autofagosoma²¹⁴ y, por tanto, no promueve la exocitosis lisosomal.

1.2.5. PATOGÉNESIS DEL SARS-COV-2

Como parásitos intracelulares obligados restringidos por capacidades genómicas limitadas, todos los virus utilizan factores del huésped para posibilitar su ciclo de vida. Del mismo modo, las células huésped también han desarrollado intrincadas redes de señalización para detectar, controlar y erradicar los virus intrusos, aunque estas vías antivirales a menudo son evadidas, inhibidas o subvertidas por el virus. Por lo tanto, la interacción virus-huésped representa una escalada evolutiva en curso perfeccionada a nivel molecular y celular. Cada paso del ciclo de replicación del SARS-CoV-2 involucra ciertos factores del huésped, y las alteraciones dramáticas en la estructura celular y la fisiología activan la respuesta al estrés del huésped, la apoptosis y la inmunidad innata¹⁹⁴. De hecho, los síntomas graves observados en pacientes infectados, tanto con el SARS-CoV-2 como con el SARS-CoV y el MERS-CoV, son producidos, en gran medida, por la activación aberrante del sistema inmunológico. En marcado contraste, otros HCoV leves causan infecciones del tracto respiratorio superior que rara vez se convierten en enfermedades potencialmente mortales en individuos inmunocomprometidos¹⁹⁴.

Por tanto, la patogénesis del SARS-CoV-2 se debe a los efectos, tanto a nivel celular como sistémicos, de la interacción de las proteínas y el genoma virales (estructurales, npss y accesorias) con proteínas de la célula humana durante el ciclo de infección.

Aunque hay alguna variación en la secuencia, muchas de las proteínas del SARS-CoV-2 también se encuentran en el SARS-CoV, presentando un 77.1% de las secuencias de proteínas compartidas en sus proteomas, así como con otros Covs²¹⁵. Por lo tanto, investigaciones anteriores sobre proteínas relacionadas con Covs permiten una mejor comprensión del ciclo de

vida y la patogénesis que provoca, facilitando el diseño de nuevos abordajes terapéuticos contra el SARS-CoV-2 (Tabla 1).

Tabla 1. Proteínas virales, función y efectos patogénicos.

PROTEÍNA VIRAL	FUNCIÓN	EFECTOS PATOGENICOS	REFERENCIAS
NSP1	Inhibición de expresión génica de la célula	Supresión de la respuesta antiviral	216,217
NSP2	Desconocida	Inhibe la replicación célula. Apoptosis.	217-219
NSP3	Procesamiento de pp1a/1b Formación de DMV asociadas al Complejo de Replicación	Antagonista del INF	220,221
NSP4	Formación de DMV asociadas al Complejo de replicación	Desconocidos	217
NSP5	Procesamiento de pp1a/b	Inhibe la vía del INF	222
NSP6	Formación de DMV asociadas al complejo de replicación	Antagonista del INF	223,224
NSP7	Subunidad accesoria de la RdRP. 3'adeniltransferasa.	Desconocidos	225
NSP8	Subunidad accesoria de la RdRP.	Desconocidos	225
NSP9	Proteína de unión a la helicasa	Desconocida	226-228
NSP10	Cofactor de nsp14 y 16 para actividad metil transferasa.	Respuesta inflamatoria exacerbada.	229,230
NSP11	Desconocida	Desconocida	231
NSP12	RdRP	Desconocida	232
NSP13	Helicasa	Potente antagonista del INF	233,234
NSP14	3'-5' exoribonucleasa	Potente antagonista del INF	234,235
NSP15	Endoribonucleasa	Potente antagonista del INF	236-238
NSP16	Ribosa-2'-O-Metiltransferasa que forma la cubierta del RNA	Desconocida	239
PROTEÍNA M	Glicoproteína de membrana Ensamblaje, tráfico y liberación del virus.	Inhibe la producción de INF I y III	191,240-242
PROTEÍNA N	Protección y empaquetado del RNA viral	Inhibe actividad antiviral, la replicación del genoma celular y apoptótica	191,243-245
PROTEÍNA S	Unión a la ACE2	Desregulación del RAS. Tormenta de citoquinas y SDRA Trombosis Apoptosis	129,246,247

PROTEÍNA E	Proteína de envuelta viral Formación de canal de Ca ²⁺ Ensamblaje viral	Daño epitelio respiratorio Activación del inflamósoma Apoptosis	191,248,249
ORF3A	Desconocida	Activa la NLRP3 del inflamósoma	250
ORF3B	Desconocida	Desconocidos	
ORF6	Desconocida	Potente antagonista del INF bloqueando la traslocación nuclear de STAT1 y STAT2.	251
ORF7A	Desconocida	Desconocido	252,253
ORF7B	Desconocida		253
ORF8	Localizada en Golgi Protección y empaquetamiento viral	Desconocido Inhibición de la vía de señalización del INF Unión a IL-17 RA	254
ORF10	Desconocida. Se sospecha que es una proteína de membrana viroporina.	Desconocidos	

Por otra parte, un estudio reciente identificó 332 proteínas humanas que interactuaban con las proteínas del SARS-CoV-2²⁵⁵ (**Figura 17**).

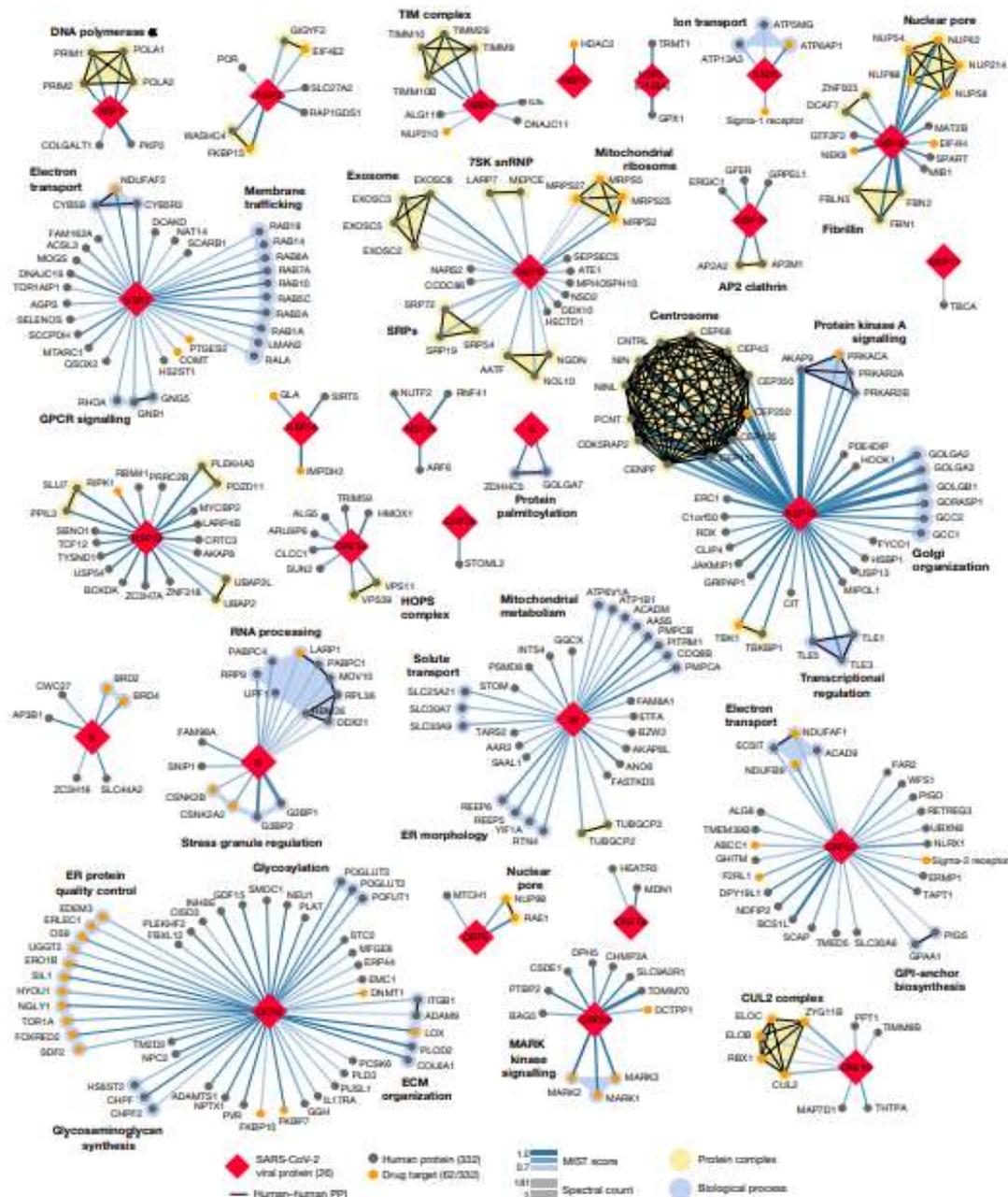


Figura 17. Red de interacción proteína-proteína SARS-CoV-2. 332 interacciones de alta confianza entre 26 proteínas del SARS-CoV-2 (diamantes rojos) y proteínas humanas (círculos; dianas farmacológicas: naranja; complejos proteicos: amarillo; proteínas en el mismo proceso biológico: azul). ECM: matriz extracelular; RE: retículo endoplásmico; snRNP, ribonucleoproteína nuclear pequeña²⁵⁵.

Según este estudio, las proteínas humanas con las que interactúan las proteínas del SARS-CoV-2 están implicadas en varios procesos biológicos, que incluyen la replicación de ADN (NSP1), reguladores epigenéticos y de expresión génica (NSP5, NSP8, NSP13 y E), tráfico de vesículas (NSP2, NSP6, NSP7, NSP10, NSP13, NSP15, ORF3a, E, M y ORF8), modificación de lípidos (S), procesamiento y regulación de ARN (NSP8 y N), ligasas de ubiquitina (ORF10), señalización (NSP7, NSP8, NSP13, N y ORF9b), maquinaria de transporte nuclear (NSP9, NSP15 y ORF6), citoesqueleto (NSP1 y NSP13), mitocondrias (NSP4, NSP8 y ORF9c) y la matriz extracelular (NSP9)²⁵⁵ (Figura 17).

Además, aproximadamente el 40% de estas proteínas humanas se asociaron con compartimentos de endomembrana o vías de tráfico de vesículas. Las interacciones del huésped con NSP8 (partícula de reconocimiento de señales (SRP)), ORF8 (control de calidad de proteínas en el retículo endoplásmico), M (morfología del retículo endoplásmico) y NSP13 (organización del centrosoma y Golgi) pueden facilitar la marcada reconfiguración del ER y el tráfico del Golgi durante la infección por coronavirus, y las interacciones en los compartimentos periféricos con NSP2 (WASH), NSP6 y M (ATPasa vacuolar), NSP7 (proteínas RAB), NSP10 (AP2), E (AP3) y ORF3a (HOPS) también pueden modificar los compartimentos de la endomembrana para favorecer la replicación del coronavirus. NSP6 y ORF9c interactúan con receptores Sigma que han sido implicados en la remodelación lipídica y la respuesta al estrés del retículo endoplásmico y el tráfico hacia el retículo endoplásmico y las mitocondrias también puede verse afectado por la proteasa principal del SARS-CoV-2, NSP5²⁵⁵.

Se podría decir que la patogénesis del virus en la célula huésped comienza con los efectos de la interacción de la proteína S con la ACE2 celular, lo que permite el reconocimiento y unión del virus a la superficie de la célula huésped^{129,246,247}. Pero, además de ser el receptor de membrana del SARS-CoV-2, la ACE2 desempeña un papel protector fundamental en el sistema cardiovascular y en la célula, ya que ACE2 contrarresta el efecto deletéreo de la vía ACE/RAS a través de su eje ACE2/Angiotensina (1-7)/MAS/G (**Figura 18**).

La proteína de membrana ACE regula el sistema Renina-Angiotensina- Aldosterona (RAS), cascada hormonal que se inicia a través de la síntesis de renina en el aparato yuxtaglomerular y que es un regulador de las funciones cardiovascular y renal, desempeñando un papel fundamental en la fisiopatología de varias enfermedades cardiovasculares y renales¹⁻⁴ que tiene como resultado la producción de angiotensina I (Ang I) que es catalizada por la ACE a Ang II, la cual se une a los receptores de angiotensina II tipo I (AT1) y tipo II (AT2) provocando fibrosis, apoptosis, daño endotelial, vasoconstricción, hipertensión y coagulopatía (**Figura 18**).

La ACE se expresa principalmente en el endotelio vascular de los pulmones y los riñones²⁵⁶, pero también en el epitelio de los pulmones y el sistema respiratorio superior.

En contraste, a la ACE 2 se le atribuyen los efectos opuestos. Mientras que la ACE cataliza la Ang I a Ang II, la ACE2 facilita la conversión de la Ang II (vasoconstrictor) en Ang 1-7, con funciones opuestas a la Ang II, de tipo vasodilatador y antiproliferativo^{13,14} y de la conversión de angiotensina I en Ang 1-9, un péptido inactivo, entre otros^{21,22}(**Figura 18**).

Así, ACE2 contrarresta el efecto deletéreo de la vía ACE/RAS a través de su eje ACE2/Angiotensina (1-7)/MAS/G. El contrapeso de la salida RAS/Ang II está regulado por la actividad del receptor acoplado a proteínas ACE2 y MAS/G. ACE2 escinde Ang I y Ang II en Ang-1-9 y Ang1-7, respectivamente, por lo que activa el receptor acoplado a la proteína MAS/G que inicia una serie de mecanismos en la célula que la protegen de la muerte celular y producen vasodilatación (**Figura 18**).

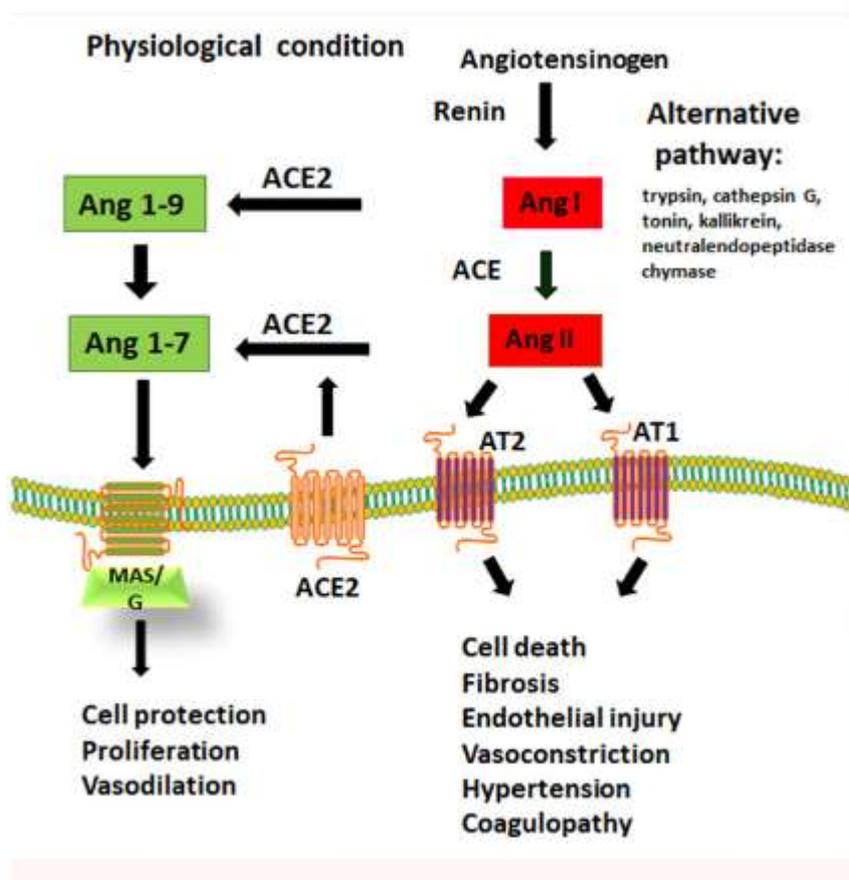


Figura 18. Funciones celulares y sistémicas de ACE y ACEII. En condiciones fisiológicas hay un equilibrio en la actividad de los receptores ACE y ACE2. ACE regula el sistema Renina-Angiotensina- Aldosterona (RAS) y escinde Ang I para producir Ang II. Ang II es un potente vasoconstrictor y perjudica la función endotelial y epitelial a través de la activación de los receptores AT1 y AT2. El contrapeso de la salida RAS/Ang II está regulado por la actividad del receptor acoplado a proteínas ACE2 y Mas/G. ACE2 escinde Ang I y Ang II en Ang-1-9 y Ang1-7, respectivamente, por lo que activa el receptor acoplado a la proteína MAS/G que protege de la muerte celular. Vías alternativas de formación de AngII.²⁵⁷

A nivel celular, la Ang II induce varias vías de señalización, incluyendo serina/treoninequinasa, ERK, JNK/MAPK, así como PKC²⁵⁸. Los estudios han demostrado que Ang II induce eficazmente IL-6 y TNF- α , posiblemente a través de serina tirosina quinasas, activación de ERK/JNK MAPK, activación del receptor acoplado a proteína G o a través de la interacción con receptores mineralocorticoides²⁵⁹⁻²⁶² (Figura 19).

Además, la Ang II es un potente activador de la Nicotinamida Adeninedinucleótido Fosfato Oxidasa (NADPH oxidasa) y, por lo tanto, un inductor de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)²⁶³ y activa el flujo de neutrófilos y macrófagos a los tejidos afectados e inhibe la producción de óxido nítrico, promoviendo la lesión vascular^{264,265}.

Además de su papel protector en el sistema cardiovascular, ACE2 tiene un papel protector directo en las células epiteliales alveolares. En los pulmones, ACE2 tiene numerosas funciones fisiológicas, la mayoría de las cuales son protectoras contra la lesión pulmonar²⁶⁶⁻²⁷⁰. Por lo tanto, la ACE2 expresada por las células epiteliales alveolares puede verse como un factor de supervivencia crítico para estas células pulmonares.

Estudios clínicos observacionales de la COVID-19 indican que en la mayoría de los casos la dificultad respiratoria ocurre muchos días (en general alrededor de 14 días) después de la infección, lo que sugiere que esto puede no ser un efecto directo de la infección viral inicial, sino más bien la reacción de los huéspedes a la pérdida de la función de ACE2 y la desregulación de las vías Ang II / ACE2, así como la activación de las proteasas del huésped. Un estudio publicado por Savamati et al.²⁵⁷ establece la hipótesis de que la unión de la proteína S del coronavirus a ACE2 conduce a la disección de los receptores ACE2 por diversas proteasas, lo que a su vez conduce a la pérdida de la función protectora del eje ACE2/MAS en los pulmones y otros órganos (Figura 18).

Por tanto, la activación de la vía clásica (ACE/RAS/Ang II) y vías alternativas a través de proteasas específicas del tejido (Figura 1), incluidas las catepsinas o proteasas similares a la quinasa, conduce a una producción excesiva de Ang II a nivel tisular. Este proceso podría cambiar aún más el equilibrio de la función protectora de Ang (1-7) / MAS y ACE2 hacia los efectos perjudiciales del aumento de Ang II que contribuiría aún más a la lesión epitelial y endovascular pulmonar.

Además, la ACE2 desempeña un papel importante en la regulación de la lesión inflamatoria inducida por IL-6 pro-inflamatoria a través de las vías NF-κB y STAT3¹²⁸ ya que la AngII es uno de los activadores clave de estas dos rutas que estimula la expresión de IL-6²⁷¹, por lo que la inflamación pulmonar severa inducida por la desregulación del RAS precedería el desarrollo del Síndrome de Destrés Respiratorio Agudo (SDRA) (Figura 19).

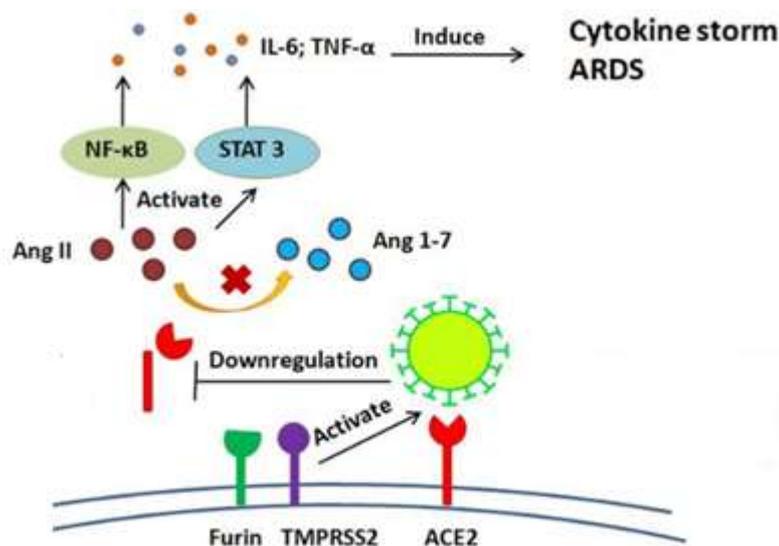


Figura 19. Inducción de la tormenta de citoquinas y el SDRA. Para entrar en las células huésped, el SARS-CoV-2 se une a la ACE2 unida a la membrana con la ayuda de Furina y TMPRSS2. Las infecciones por SARS-CoV-2 pueden inducir la eliminación de ACE2. La disminución de ACE2 podría conducir a la acumulación de Ang II, induciendo así la CS y el SDRA.²⁷²

Otros efectos patogénicos vendrían derivados de la activación de la respuesta inmune innata del huésped por parte del virus.

Al igual que muchos virus, el SARS-CoV-2 ha desarrollado estrategias para eludir la detección inmune innata, incluidos los bajos niveles de citosina-fosfato-guanosina (CpG) en el genoma, la glicosilación para proteger elementos esenciales, incluido el RBD, el blindaje del RNA y la generación de proteínas virales que impiden activamente las respuestas antivirales del INF²⁷³ (**Figura 2**). Además, el SARS-CoV-2 también ha explotado varios mecanismos para proteger los extremos 5' mediante una estructura de tapa de RNA generada durante la replicación. Esta tapa limita la degradación y, lo que es más importante, bloquea el reconocimiento por PPR citosólicos. Mientras que algunos virus arrebatan las tapas del RNA huésped, el SARS-CoV-2, al igual que otros coronavirus, utiliza su propia maquinaria de tapado compuesta por nsp10, nsp13 y la enzima dedicada nsp16 para generar tapas de 2'-o-metiltransferasa²³⁹. El SARS-CoV-2 produce tapas de RNA indistinguibles de las tapas de RNAm celulares, evadiendo así la detección por MDA-5 y la actividad IFIT que se dirigen al ARN para su degradación (**Figura 20**).

El SARS-CoV utiliza su endorribonucleasa (nsp15) para escindir su propio RNA viral en el citosol que de otro modo actuaría como PAMP, evadiendo así la MDA-5, la proteína quinasa R (PKR) y la OEA/RNasa L^{274,275}. El SARS-CoV-2 también puede proteger el ARN viral y las proteínas generadas durante la replicación mediante el complejo replicasa-transcriptasa (RTC) u orgánulo de replicación, formado por vesículas de doble membrana²²⁴. Los RTC se vinculan con el retículo endoplásmico (RE)-compartimento intermedio de Golgi (ERGIC) y el aparato de Golgi que protege el virus durante la maduración. Adicionalmente, los coronavirus utilizan los glicanos y probablemente otras modificaciones post-traslacionales para enmascarar epítopos de proteínas virales inmunogénicas, como el caso de la glicoproteína S²⁷⁶ y otras proteínas estructurales, no estructurales y accesorias también modificadas por glicosilación, palmitoilación, fosforilación o ADP-ribosilación¹⁸⁶. Por el contrario, algunas proteínas virales, por ejemplo, nsp3, poseen actividad desubiquitinasa (DUB) y desglucosilasa, lo que interfiere con las funciones del huésped dirigidas a aquellas que son críticas para la transducción de señalización de la inmunidad innata²⁷⁷. La inserción de la proteína espiga en las membranas celulares durante la replicación es un paso clave para la brotación del virus. Mientras esto ocurre en el RTC, las proteínas espiga unidas al receptor interactúan con TMPRSS2 expresadas en la superficie celular no infectada y media la fusión entre células infectadas y no infectadas promoviendo la formación de sincitia, permitiendo que el virus se propague a células adyacentes no infectadas mientras evade la detección por la respuesta inmune²⁷⁸.

Además de las estrategias para evadir el reconocimiento de la PPR, el SARS-CoV-2 también ha desarrollado estrategias para inhibir los pasos de la vía que conduce a la producción de IFN tipo I / III. Esto puede ser especialmente relevante en los pulmones, donde el tipo IFN III (lambda) se considera más efectivo en el control de las infecciones virales y se ve afectado críticamente en COVID-19. El conocimiento derivado del estudio de otros coronavirus, especialmente el SARS-CoV y el MERS-CoV, ha demostrado que muchas de las proteínas no estructurales, estructurales y accesorias interfieren con elementos de la vía del IFN (**Figura 20**), esenciales para el desarrollo de una inmunidad efectiva. El antagonismo de IFN se ha atribuido a varias de las proteínas estructurales, no estructurales y accesorias que interfieren con el complejo STING-TRAF3-TBK1, bloqueando así la producción de IFN de tipo I inducida por STING/TBK1/IKK, el transductor de señal y el activador de la transcripción (STAT)-1/2 al núcleo, la señalización IRF3, NF-κB, así como la interferencia con las acciones de los productos ISG, incluyendo ifITs. Como ejemplos, nsp1, 4 y 6 y ORF6 interfieren con la señalización STAT-1/2 mientras que nsp 10, 13 y 16 captan el RNA viral, impidiendo el reconocimiento por RIG-I, MDA-5 e IFIT. Nsp3 también actúa por las proteínas DUB, impidiendo así su actividad como RIG-I y otros pasos en las vías de IFN para las que la ubiquitinación es esencial. CoV PLPro (nsp 3) también interrumpe el estimulador de los

genes IFN del complejo STING–TRAF3–TBK1, bloqueando así la producción de IFN STING/TBK1/IKKε/IKKβ^{277,279}. Además de la subversión de la vía IFN, el SARS-CoV ORF7a (también presente en el SARS-COV-CoV-2) bloquea la actividad de la tetherina, también conocida como antígeno estromal de la médula ósea 2 (BST-2)²⁸⁰. BST2 actúa atando virus en ciernes a la membrana celular, evitando así su liberación de las células. ORF7a elimina esta inhibición ayudando a la liberación de viriones maduros.

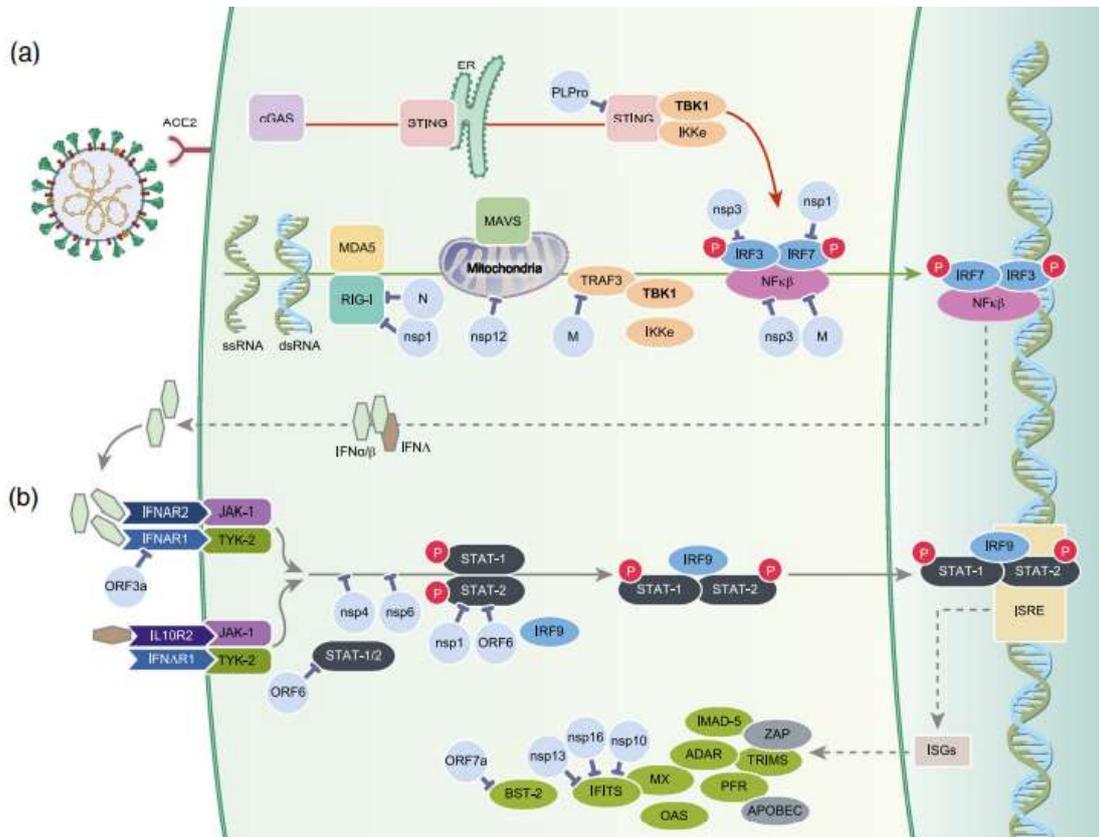


Figura 20. Evasión del SARS-CoV-2 de las vías del interferón (IFN). El SARS-CoV-2 infecta las células permisibles a través de la enzima convertidor de angiotensina 2 (ACE2). Después de la infección (a), el virión o el RNA viral se detecta por la vía cGAs/STING donde el estimulador de los genes de interferón (STING) se involucra TBK1, o a través del gen inducible retinoide I (RIG-I) y el gen 5 asociado a la diferenciación del melanoma (MDA-5). Estas vías conducen a la activación del factor regulador del IFN (IRF3) y / o factor nuclear kappa B (NF-κB) induciendo IFN tipo I / III que es reconocido por los receptores de IFN (b) y la posterior inducción de los genes estimulados por IFN (ISG) y proteínas, muchos de los cuales tienen potentes actividades antivirales. Sobre la base del conocimiento de otros coronavirus, especialmente el SARS-CoV, y los datos emergentes del SARS-CoV-2, muchas de las proteínas no estructurales, estructurales y accesorias subvierten e inhiben numerosos pasos en estas vías, inhibiendo así la producción de IFN que permite una mayor replicación viral ²⁸¹.

Juntas, estas estrategias permiten una infección generalizada y un aumento de la carga viral durante la infección temprana. Pero al final, el SARS-CoV-2 acaba iniciando efectivamente las vías de señalización inmune. Esto se debe probablemente al aumento de la carga viral que produce exponencialmente RNA viral y proteínas virales, es decir, patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), y también induce daño celular que libera patrones moleculares asociados al daño (DAMPs), los cuales desencadenan las vías de la inmunidad innata, induciendo

una respuesta robusta de interferón tipo I/III, producción de citoquinas proinflamatorias y reclutamiento de neutrófilos y células mieloides (**Figura 21**)²⁸¹.

Esto puede inducir hiper-inflamación o, alternativamente, reclutar efectivamente respuestas inmunes adaptativas que ayuden a eliminar la infección y prevenir la reinfección.

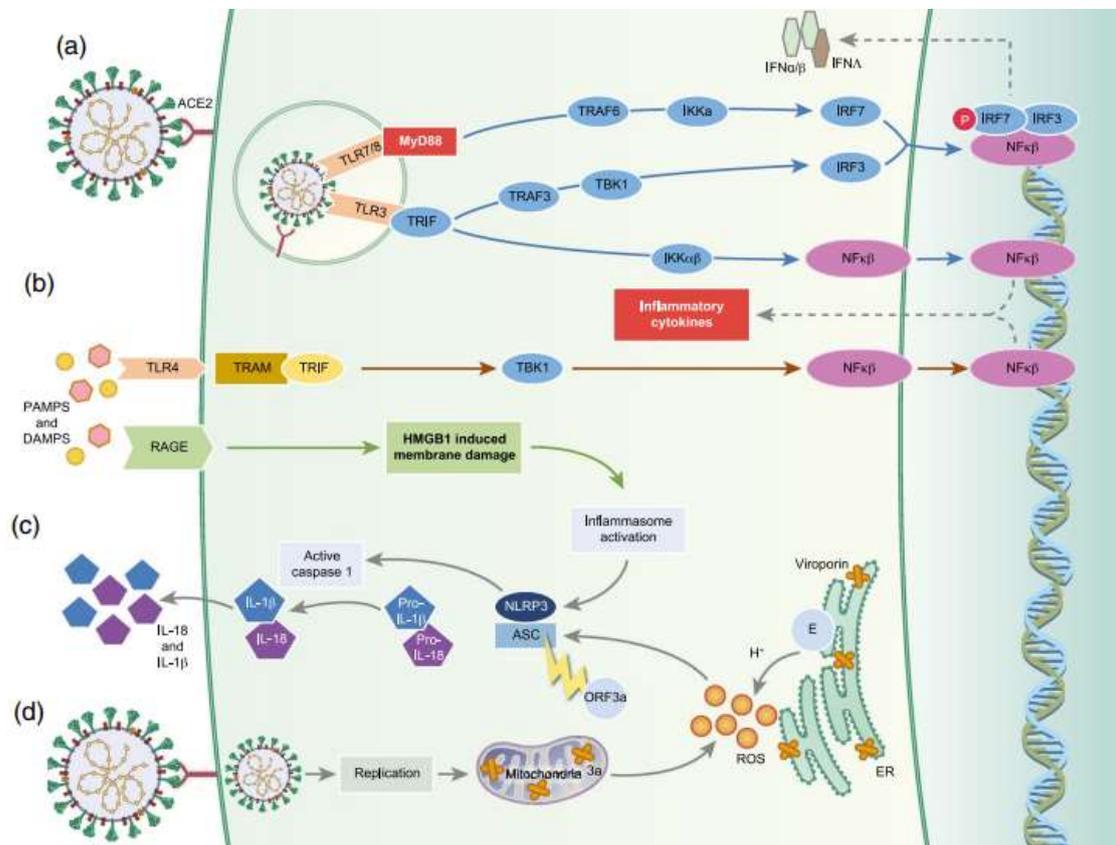


Figura 21. Activación de las vías inmunitarias innatas por el SARS-CoV-2²⁸¹. El SARS-CoV-2 penetra en la célula y es reconocido por los receptores tipo Toll (TLR) 7/8 que desencadenan la vía de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MyD88), o el receptor TLR-3 a través del adaptador que contiene el dominio TIR que induce la vía del NF-κβ (TRIF). Los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y los patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) también son reconocidos por TLR-4 (b) o por el receptor para el extremo de glicación (RAGE) que desencadena el daño inducido por la caja de grupo de alta movilidad 1 (HMGB1) y la activación del dominio de pirina NOD 3 del inflammasoma (NLRP3). Además, durante la replicación viral, las proteínas ORF3a y E forman viroporinas que aumentan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la activación del inflammasoma. Las citoquinas y las quimoquinas también son inducidas a activar una respuesta inflamatoria²⁸¹.

La desregulación del sistema renina-angiotensina debido a la reducción de la ACE2, junto con la activación de la respuesta de interferón tipo I / III, y la respuesta del inflammasoma convergen para promover la producción de radicales libres y el estrés oxidativo. Esto exacerba el daño tisular en el sistema respiratorio, pero también conduce a la activación generalizada de las vías de coagulación que conducen a la trombosis (**Figuras 21 y 22**)²⁸¹.

La unión del SARS-CoV-2 a ACE2 conduce a la reducción de la expresión de ACE2 en la superficie celular (Figs. 3 y 4) y la desregulación del sistema RAS, empujándolo a un modo proinflamatorio que unido a la activación de la respuesta de interferón tipo I / III, y la respuesta de inflammasoma convergen para promover la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y el estrés

oxidativo, fibrosis, deposición de colágeno y un ambiente proinflamatorio, incluida la producción de IL-6 e IL-8, por macrófagos y reclutamiento de neutrófilos (Figura 22).

Por lo tanto, es probable que la unión y entrada de SARS-CoV-2 a través del ACE2 sea el primer paso en una línea de respuestas inmunes aumentadas que implican la activación del complemento, la activación inmune innata a través de PAMPS y DAMPS, la activación del inflamasoma y la piroptosis, la activación de las células asesinas naturales (NK), la hiperactivación de macrófagos, neutrófilos y células T innatas y la inducción de una tormenta de citoquinas (Figura 22).

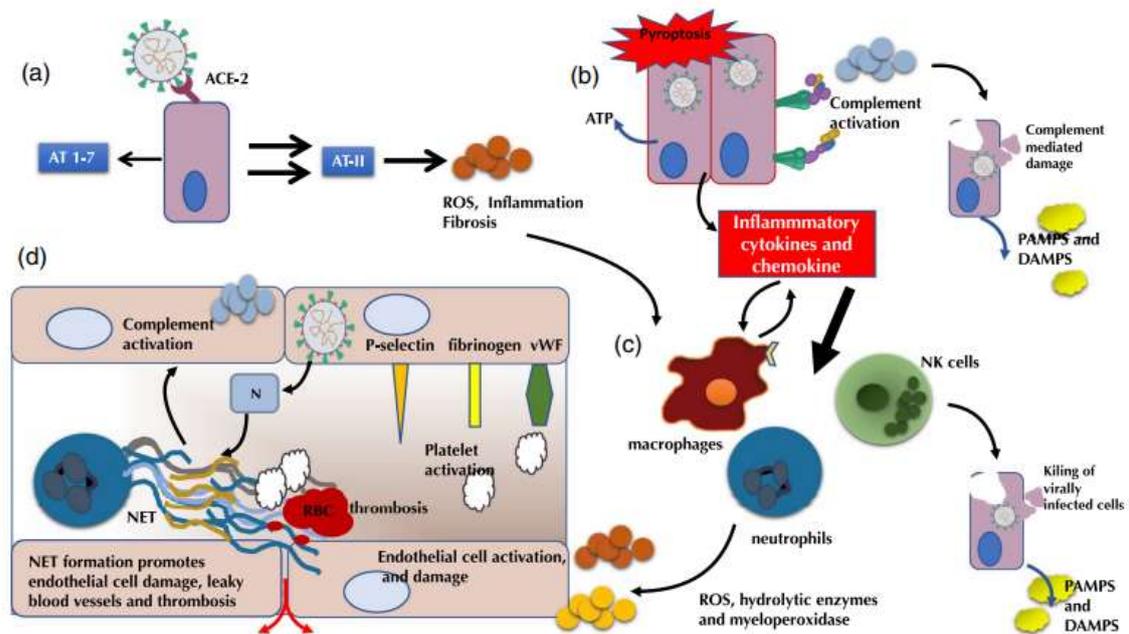


Figura 22. Respuesta inmune y fisiopatología ante la infección por SARS-CoV-2. El SARS-CoV-2 es una enfermedad vascular y de la coagulación. a) La unión del SARS-CoV-2 a la ACE2 bloquea la formación de angiotensina antioxidante inducida por ACE2, lo que facilita la formación de ROS. La infección en algunas personas también desencadena piroptosis, activación del complemento (b) e hiperinflamación con afluencia de macrófagos, células asesinas naturales (NK) y neutrófilos (c). Este ciclo desencadena un mayor daño celular y la liberación DAMPS y PAMPS, así como la producción de ROS. d) La activación de neutrófilos induce trampas extracelulares de neutrófilos (NET) ayudadas por la proteína N y generadas en respuesta al daño celular endotelial inducido por ROS. La interrupción de la barrera vascular y la exposición de las células endoteliales a citoquinas proinflamatorias y ROS aumenta la expresión de P-selectina, factor von Willebrand (vWF) y fibrinógeno que atraen plaquetas desencadenando la expresión del factor tisular. Juntos, esta secuencia activa el sistema del complemento, una de las muchas vías que activan crucialmente la cascada de coagulación que conduce a la formación de trombos²⁸¹.

Por último, otro de los principales mecanismos patogénicos del SARS-CoV-2 es la inducción de la apoptosis celular. Durante las infecciones virales, la apoptosis se induce como una de las respuestas antivirales del huésped para limitar la replicación y producción del virus, aunque muchos virus han desarrollado estrategias distintas para subvertirla²⁸². Sin embargo, se ha demostrado que los CoVs infectan el sistema inmunitario e inducen apoptosis en células inmunes como macrófagos, monocitos, linfocitos T y células dendríticas²⁸³⁻²⁸⁷. Debido a que estas células inmunes están asociadas con la activación de la inmunidad innata y adquirida, es

razonable especular que la eliminación masiva de estas células podría ser una estrategia viral para suprimir las respuestas inmunes innatas y adaptativas del huésped.

Para ello, se cree probable que los mecanismos apoptóticos durante la infección por CoVs sean manipulados por proteínas virales (**Figura 23**), aunque esto solo se ha estudiado principalmente en el SARS-CoV.

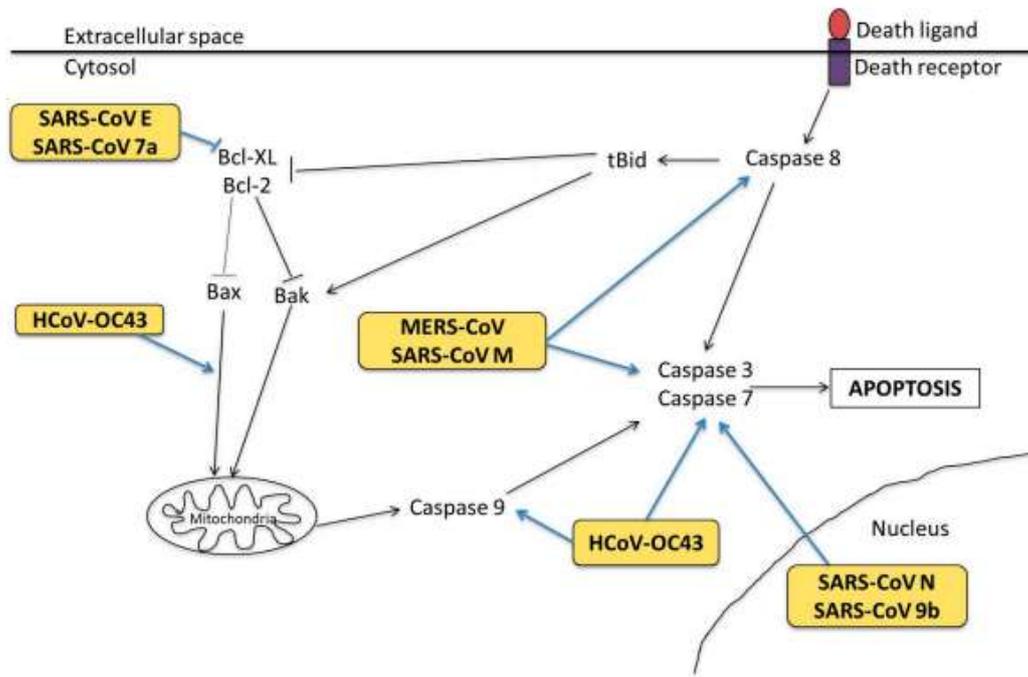


Figura 23. Activación de la apoptosis por HCoVs. La unión de los ligandos de muerte a los receptores de muerte de la membrana celular induce la activación de la caspasa 8, que a su vez activa las caspasas efectoras 3 y 7 para estimular la apoptosis. Por otro lado, la vía intrínseca está regulada por proteínas de la familia Bcl2 proapoptóticas y antiapoptóticas, como Bcl-XL, Bcl2, Bax y Bak para inducir MOMP. La activación posterior de la caspasa 9 causada por MOMP estimula la activación de las caspasas 3 y 7. Durante la infección por HCoV, el virus o las proteínas virales específicas (cajas amarilla-naranjas) se dirigen a múltiples etapas de las vías de señalización de la apoptosis extrínseca e intrínseca.

El RE es un orgánulo celular importante para la síntesis de proteínas, el plegamiento, el procesamiento y las modificaciones post-traslacionales. En circunstancias normales, el RE puede cargarse con una concentración muy alta de proteínas sin perturbar su entorno luminal único²⁸⁸. Sin embargo, cuando la carga de proteína excede la capacidad de plegamiento y procesamiento de ER, se produce una rápida acumulación de proteínas mal plegadas o desplegadas dentro del lumen de ER, se activan varias vías de señalización, conocidas colectivamente como respuesta al estrés de la ER o UPR. En casos de estrés prolongado e irreversible en la ER, se activan mecanismos de apoptosis²⁸⁹. Durante las infecciones virales, se induce la respuesta al estrés en la ER. Esta utilización masiva de la ER provoca una inmensa carga, haciendo que el huésped monte UPR como su respuesta antiviral²⁹⁰.

Específicamente, se ha demostrado que las proteínas víricas S, N, E, M, ORF-6, 7a y 9b cumplen funciones pro-apoptóticas en sus células huésped^{285,291-297}. La expresión de la proteína E del SARS-CoV y la proteína 7a promovió la apoptosis mediada por mitocondrias al secuestrar la proteína anti-apoptótica Bcl-XL a las membranas del retículo endoplásmico (RE)^{285,298}. La proteína M del SARS-CoV también es altamente pro-apoptótica y media la activación de las

caspasas 8 y 9²⁹⁶. La localización de la proteína N y 9b del SARS-CoV se asocia con la inducción de la apoptosis dependiente de caspasa^{295,299}.

1.3. LA COVID-19

El SARS-CoV-2 produce la enfermedad denominada COVID-19 (Enfermedad Infecciosa por Coronavirus 2019) y ha demostrado ser fácilmente transmisible entre humanos con una rápida diseminación mundial. Mientras que el SARS-CoV y el MERS-CoV mostraban tasas de mortalidad más elevadas (13% y 35%, respectivamente ³⁰⁰), el SARS-CoV-2 presenta una tasa menor, alrededor del 5,6%³⁰⁰, aunque una capacidad de transmisión mucho mayor.

El SARS-CoV-2 infecta preferentemente a las células de las vías respiratorias³⁰¹, si bien se ha detectado en casi todos los órganos humanos, incluidos los pulmones, la faringe, el corazón, el hígado, el cerebro, los riñones y los órganos del sistema digestivo^{302,303}.

Al unirse a las células epiteliales en el tracto respiratorio, el SARS-CoV-2 comienza a replicarse y migrar hacia las vías respiratorias infectando las células epiteliales alveolares de los pulmones. La rápida replicación del SARS-CoV-2 en los pulmones puede desencadenar una fuerte respuesta inmune. El síndrome de tormenta de citoquinas (CS) causa SDRA e insuficiencia respiratoria, que se considera la principal causa de muerte en pacientes con COVID-19^{304,305}.

Además, la infección por COVID-19 exhibe una amplia variabilidad interindividual y rango de gravedad, desde la enfermedad asintomática hasta pacientes con insuficiencia orgánica múltiple³⁰⁶. El periodo de incubación es prolongado y se ha descrito entre 5 y hasta 14 días³⁰⁷. La transmisibilidad o período de infectividad comienza a las 24-48 horas antes del inicio de síntomas y dura hasta el día 7-9 desde el inicio de éstos³⁰⁸. Las manifestaciones clínicas más frecuentes descritas son cefalea, mialgias, tos, fiebre, dolor abdominal, diarrea, anosmia, pérdida del sentido del gusto y dolor torácico entre otros. La mayoría de los infectados (80%) presentan sintomatología leve o moderada, en cambio un 15% evolucionan a una forma grave de la enfermedad, requiriendo de hospitalización³⁰⁹. Estos pueden evolucionar a neumonía grave con disnea, hipoxemia de rápida progresión a SDRA, trastornos de la coagulación, shock séptico, y fallo multiorgánico³⁰⁹. La letalidad es significativamente mayor en pacientes que requieren tratamiento en Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) y Ventilación Mecánica Invasiva (VMI)³⁰⁹. Estudios recientes han demostrado, mediante muestreo directo de los alvéolos pulmonares de pacientes en estado crítico infectados con SARS-CoV-2, que la microbiota pulmonar junto con una respuesta inmune alveolar deteriorada son predictivas de malos resultados clínicos³¹⁰.

Los casos graves se presentan principalmente en adultos mayores de 60 años e individuos con comorbilidades subyacentes como hipertensión arterial, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, diabetes, enfermedad cardiovascular y obesidad, mientras que la mayoría de los jóvenes y niños solo tienen enfermedades leves o son asintomáticos^{18,311,312}. De hecho, un estudio reciente indica que el 50% de los fallecidos por COVID-19 tenían enfermedades metabólicas o vasculares tales como diabetes, obesidad, hipertensión o hígado graso³¹³.

Esto hace que el SARS-CoV-2 sea algo anómalo, ya que, para la mayoría de otros virus respiratorios, desde la influenza hasta el virus sincitial respiratorio, los niños pequeños y ancianos suelen ser los más vulnerables, mientras que, en adultos, mediante infección previa o vacunación, sus sistemas inmunológicos han sido entrenados para lidiar con patógenos similares. Sin embargo, el SARS-CoV-2 está demostrando que los niños son naturalmente

mejores para controlar las infecciones virales. Estudios realizados en Estados Unidos y en la India, encontraron que más de la mitad de los niños de 6 a 17 años tenían anticuerpos detectables^{314,315}. Inicialmente se plantearon varias hipótesis, como que éstos tuviesen menos receptores ACE2 en el tracto respiratorio, pero no se han encontrado diferencias significativas en la carga viral en las vías respiratorias superiores en cuanto a la edad. También se planteó que una mayor exposición de los niños a CoVs que causan resfriados comunes, les proporcionaría una inmunidad cruzada de anticuerpos, pero esto se ha descartado ya que los adultos también poseerían dicha inmunidad y se ha comprobado que ésta no ofrece ninguna protección especial. Así, actualmente se postula que la razón por la que, en general, a los niños no les ha afectado tanto la COVID-19 podría estar en la respuesta inmune innata, ya que se han encontrado en los niños niveles más bajos de anticuerpos neutralizantes, células T reguladoras o monocitos (típicos de la respuesta inflamatoria e inmune adaptativa) y más elevados de proteínas de señalización (Interferón- γ e Interleuquina-17) producidos por células de la inmunidad innata que alertan al sistema inmune de la llegada de un patógeno. Por tanto, todo ello podría indicar que los niños desarrollan una respuesta inmune adaptativa menos robusta porque su respuesta innata es más eficiente para eliminar el patógeno, aunque se necesitan más estudios para apoyar plenamente esa hipótesis³¹⁶.

Los impactos que la COVID-19 está provocando a nivel mundial son muy importantes y diversos. Además de la elevada pérdida de vidas humanas y económicas o la saturación y colapso de los sistemas sanitarios durante los picos de contagios, también está produciendo un gran incremento de las enfermedades mentales, como la ansiedad y la depresión³¹⁷, sobre todo en jóvenes y niños, así como la disminución de la esperanza de vida al nacer³¹⁸⁻³²¹.

Por otra parte, son numerosas las personas que, tras haber superado la infección, siguen sufriendo una gran variedad de síntomas de la enfermedad con distinta intensidad que afectan a diferentes órganos durante semanas o meses o por la aparición de los síntomas tras un tiempo sin ellos (**Figura 24**). Este síndrome se ha denominado COVID-19 Persistente o Prolongado (Long-COVID)³²². Un estudio del Reino Unido estima que entre el 7% y el 18% de las personas que padecieron COVID-19 desarrollaron algunos síntomas de COVID-19 prolongado que persistieron durante al menos 5 semanas³²³.

Además, la aparición no está relacionada con la gravedad de la infección inicial, por lo que puede afectar tanto en pacientes que cursaron la enfermedad de forma leve como a aquellos que la cursaron de forma grave y fueron hospitalizados³²². Síntomas como fatiga persistente, falta de aliento, niebla cerebral y depresión podrían debilitar a muchos millones de personas en todo el mundo. Sin embargo, se sabe muy poco sobre este síndrome ya que no existen características bioquímicas o radiológicas claras para ayudar al diagnóstico, y potencialmente hay varios fenotipos con diferentes presentaciones, pronósticos y resultados³²². La causa de la COVID-19 prolongada tampoco está clara. Una posibilidad es que un reservorio del coronavirus permanezca después de la infección aguda en varios tejidos, como el intestino, el hígado o el cerebro, y continúe causando daños. Otra posibilidad es que la amplia respuesta inmune desencadenada por la infección inicial pueda generar anticuerpos y otras reacciones inmunológicas contra los propios tejidos del cuerpo. Eso podría continuar causando complicaciones después de que la infección haya sido eliminada³²⁴.

Sin tratamientos probados o incluso orientación para la rehabilitación, el COVID-19 prolongado afecta la capacidad de las personas para reanudar la vida normal y su capacidad para trabajar. El efecto en la sociedad por el aumento de la carga en la atención de la salud y las pérdidas

económicas y de productividad, está siendo sustancial, por lo que el Long-COVID se ha convertido en un desafío científico de primer orden³²².



Figura 24. Síntomas asociados a la COVID persistente (Ministerio de Sanidad. Gobierno de España).

1.4. TERAPIAS Y VACUNAS CONTRA LA COVID-19

1.4.1 Terapias contra la COVID-19

La enorme gravedad de los efectos de la pandemia ha provocado una movilización de recursos a nivel mundial desde los gobiernos, las instituciones científicas, las agencias reguladoras de medicamentos y las empresas farmacéuticas sin precedentes, a fin de encontrar tanto métodos diagnósticos y pronósticos de la enfermedad como terapias y vacunas efectivas.

Para el descubrimiento de terapias contra la COVID-19 se han aplicado 3 enfoques comunes. El primero es la selección de bibliotecas químicas con bases de datos que contienen un gran número de compuestos existentes que pueden tener propiedades antivirales (por ejemplo, remdesivir). El segundo es la prueba de los medicamentos antivirales de amplio espectro existentes y utilizados en otras pandemias con otros virus (por ejemplo, ribavirina e interferones). El tercer método implica el desarrollo de medicamentos novedosos y específicos, como los anticuerpos monoclonales, basados en la comprensión genómica y biofísica del SARS-CoV-2³²⁵.

El desarrollo de nuevos agentes lleva años y, dada la urgencia de la pandemia actual, los primeros tratamientos contra la COVID-19 que se han utilizado son los que se aplicaron a partir de los brotes del SARS-CoV y el MERS-CoV, así como en el tratamiento de otros virus.

Además, se han autorizado ensayos clínicos de tratamientos prometedores en todo el mundo: Remdesivir, Lopinavir/Ritonavir, Interferón- β , Hidroxicloroquina y Dexametasona son algunos de los fármacos incluidos en los ensayos SOLIDARITY de la OMS y RECOVERY^{326,327}. También se están explorando nuevas vacunas, tratamientos emergentes dirigidos a la "tormenta de citoquinas" y terapias con plasma de convalecientes.

Así, se están aplicando y estudiando tratamientos basados en 4 estrategias fundamentales: bloquear la entrada e infección del virus en la célula, impedir la replicación del virus en la célula, activar la respuesta inmune innata y modular la respuesta inflamatoria³²⁸ (**Figura 25**).

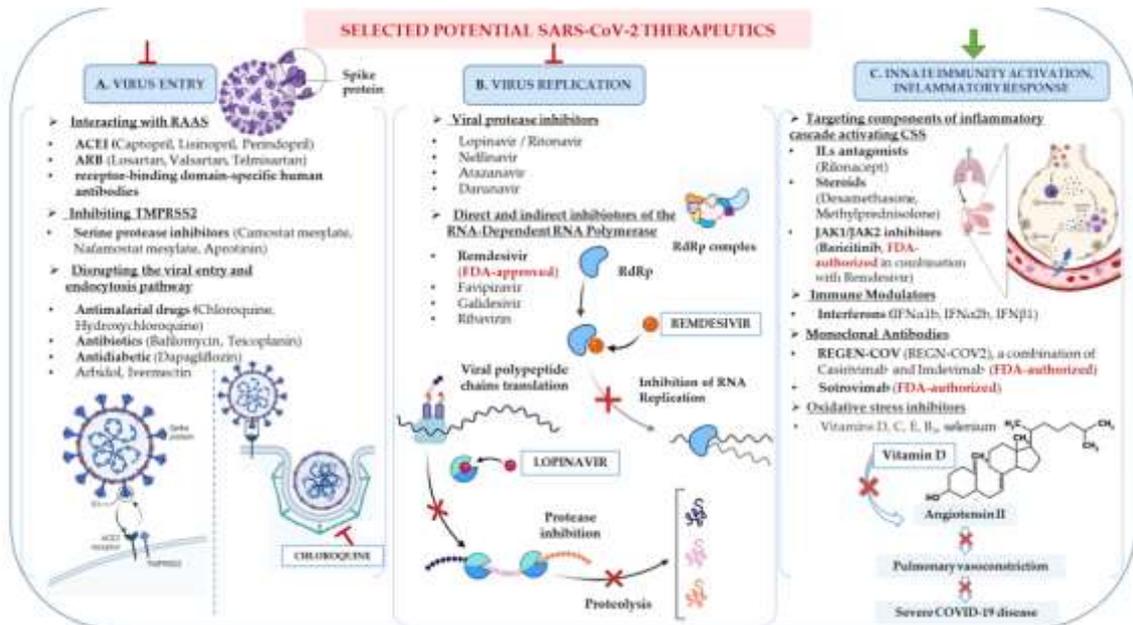


Figura 25. Estrategias terapéuticas contra la COVID-19 ³²⁸.

1.4.1.1 Agentes bloqueantes de la entrada del virus.

Entre los medicamentos que bloquean la entrada del virus a la célula, se encuentran aquellos que interactúan con el Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (RAAS), como Captopril, Linopril, Losartán, Valsartán, o anticuerpos específicos que se unen al dominio del receptor de la ACE2; inhibidores de la Serin Proteasa 2 (TMPRSS2), como Camostat mesylate, Nafamostat mesylate o Aprotinin; disruptores de la entrada del virus y la ruta de endocitosis como los medicamentos antimalaria (Cloroquina e Hidroxicloroquina), antibióticos (Bafilomycin, Teicoplanin), antidiabéticos (Dapagliflozin), Arbidol e Ivermectina (**Figura 25**).

Dos medicamentos específicos antipalúdicos, Cloroquina e Hidroxicloroquina, que exhiben capacidades antiinflamatorias, antiproliferativas e inmunomoduladoras, también se incluyeron en ensayos clínicos. En coronavirus anteriores, se demostró que la Hidroxicloroquina inhibía el SARS-CoV, el MERS-CoV y el HCoV-229E in vitro^{329,330}, modulando la glicosilación del receptor ACE-2 e inhibiendo la replicación del virus in vitro. Sin embargo, los efectos nunca se exploraron completamente in vivo³³¹. Dado que se ha demostrado que el virus utiliza los receptores ACE-2, se planteó la hipótesis de que la Hidroxicloroquina también podría interferir con su glicosilación, evitando así la unión del SARS-CoV-2 a sus células diana y también inhibir la acidificación de los lisosomas e interferir con el proceso de fusión del SARS-CoV-2 con la célula huésped^{332,333}. En cambio, en estudios con pacientes, el fármaco se asoció con un aumento de la mortalidad del 27% en comparación con el 25% en el control, así como una hospitalización más larga³³⁴. También hay descritos varios efectos secundarios graves sobre la hidroxicloroquina y la cloroquina en el tratamiento de pacientes con COVID-19, incluidos problemas cardíacos, trastornos sanguíneos y linfáticos, lesiones renales e insuficiencia hepática³³⁵, así como con el tratamiento combinado de hidroxicloroquina y azitromicina³³⁶ por lo que estas discrepancias con COVID-19 inciden en la necesidad de realizar estudios de medicamentos más profundos tras la traslación de estudios in vitro a pacientes.

Otro medicamento incluido en este grupo, que está generando una gran controversia en la aplicación para el tratamiento de la COVID-19, es la ivermectina, antiparasitario de amplio espectro, que está incluido en la lista de medicamentos esenciales de la OMS como tratamiento

para distintas enfermedades parasitarias. Estudios realizados *in vitro* sugieren que la ivermectina actúa inhibiendo las proteínas de transporte nuclear importina alfa / beta-1 del huésped, que son parte de un proceso clave de transporte intracelular que los virus secuestran para mejorar la infección al suprimir la respuesta antiviral del huésped^{337,338}. Además, el acoplamiento de ivermectina puede interferir con la unión de la proteína espiga del coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2) a la membrana celular humana³³⁹. Se cree que la ivermectina es un agente dirigido al huésped, que puede ser la base de su actividad de amplio espectro *in vitro* contra los virus que causan el dengue, el Zika, el VIH y la fiebre amarilla^{337,340-342}. A pesar de esta actividad *in vitro*, ningún ensayo clínico ha reportado un beneficio clínico para la ivermectina en pacientes con estos virus. Algunos estudios de ivermectina también han reportado posibles propiedades antiinflamatorias, que se han postulado como beneficiosas en personas con COVID-19³⁴³⁻³⁴⁵.

Sin embargo, según la OMS, los datos disponibles no han permitido demostrar que la ivermectina sea eficaz contra el COVID-19 y las pruebas fueron “muy poco fiables”, recomendando su uso solamente para ensayos clínicos³⁴⁶. De hecho, tanto la OMS como la FDA han advertido de informes de personas que se han requerido atención de urgencia, después de automedicarse con ivermectina para la prevención de la enfermedad. Así, un panel de expertos científicos creado por la OMS, tras analizar los datos de 16 ensayos clínicos³⁴⁷ sobre los efectos de la ivermectina en el tratamiento de la COVID-19, incluidos pacientes hospitalizados y ambulatorios con COVID-19, determinó que la evidencia sobre si la ivermectina reduce la mortalidad, la necesidad de ventilación mecánica, la necesidad de ingreso hospitalario y el tiempo para la mejoría clínica en pacientes con COVID-19 es de “certeza muy baja”, debido que presentaban un tamaño de muestra muy bajo e importantes limitaciones metodológicas³⁴⁸. En el mismo sentido, la FDA concluyó que si bien se han desarrollado estudios clínicos y hay otros en proceso para evaluar el uso de la ivermectina para la prevención o el tratamiento del COVID-19 en humano, sus resultados “no han sido satisfactorios”³⁴⁹. De hecho, los autores de varios de esos ensayos clínicos cuyos resultados fueron publicados, se han retractado^{350,351} e incluso algunos estudios se han identificado como potencialmente fraudulentos³⁵².

1.4.1.2 Transfusión de plasma convaleciente.

Otro enfoque empleado contra la COVID-19 fue explorar la eficacia de la transfusión de plasma convaleciente (PCT), supuestamente abundante en anticuerpos contra las proteínas estructurales del virus, que se ha utilizado durante más de un siglo como post-profilaxis de la exposición y tratamiento de diversas enfermedades infecciosas. Los resultados de su aplicación en anteriores brotes virales sugirieron que redujo la carga viral y los niveles de citoquinas, mejorando los resultados clínicos³⁵³. Aun así, los ensayos clínicos aleatorizados de Simonovich et al.³⁵⁴ informaron que la PCT no ayudó a combatir los síntomas de COVID-19, ya que no se observaron diferencias clínicas significativas ni de mortalidad general entre los pacientes hospitalizados por COVID-19 tratados con plasma y los que recibieron un placebo. Además, en otro estudio de la terapia PCT en pacientes realizado por Abani et al.³⁵⁵, el plasma de convalecientes no mejoró la supervivencia ni otros resultados clínicos predeterminados.

1.4.1.3 Tratamientos con anticuerpos monoclonales.

En cuanto a los tratamientos con anticuerpos monoclonales, en un ensayo clínico fase III, se ha comprobado que el **Sotrovimab**, anticuerpo monoclonal que se cree que se une y bloquea epítomos altamente conservados de los Sarbecovirus, reduce el riesgo de progresión de la

enfermedad en pacientes de alto riesgo con COVID-19 leve a moderada³⁵⁶ y, por otro lado, los resultados preliminares del ensayo clínico³⁵⁷ RECOVERY, la administración conjunta de dos anticuerpos monoclonales, **Casirivimab e Imdevimab (REGEN-COV)**^{358,359}, en pacientes con alto riesgo de progresión a la forma severa de la COVID-19 fueron muy prometedores y el tratamiento fue autorizado por la *U.S. Food and Drugs Administration* (FDA) norteamericana para su uso de emergencia el pasado mes de octubre, como profilaxis tras la exposición al virus³⁶⁰.

1.4.1.4 Medicamentos antivirales.

Entre los medicamentos antivirales que impiden la replicación del virus están los Inhibidores de la proteasa viral (Lopinavir/Ritonavir, Nelfinavir, Atazanavir, Duranavir) y los inhibidores de la RNA polimerasa viral (Remdesivir, Favipiravir, Galidesivir, Ribavirina) (**Figura 25**).

Los antivirales de amplio espectro son tratamientos comunes para pacientes con COVID-19. Sin embargo, es poco probable que proporcionen alguna mejoría clínica^{361,362}. Lopinavir inhibe la replicación del SARS-CoV-2 *in vitro*, pero recientemente se descubrió que el Ritonavir no lo hizo³⁶³. Los estudios realizados con el SARS-CoV y el MERS-CoV proporcionan más pruebas de sus limitaciones. Así, aunque el Lopinavir inhibió la replicación del SARS-CoV, no fue eficaz en el MERS-CoV³⁶⁴.

Proteínas estructurales y no estructurales del SARS-CoV-2, incluyendo la S, M, E y N, la RdRp y la PLpro, han sido reconocidas como posibles agentes inmunizantes, así como objetivos para medicamentos inhibidores que actualmente están disponibles y se utilizan en diversas terapias virales. Así, se propuso la inhibición de la actividad de la proteasa viral contra la infección por COVID-19³⁶⁵. Curiosamente, los inhibidores de la proteasa (IP) como Lopinavir, inhibidor de la proteasa del VIH-1, y Ritonavir, un inhibidor del CYP3A4, demostraron eficacia antiviral *in vitro* contra el SARS-CoV y el MERS-CoV a través de la inhibición de la proteasa similar a la 3-quimotripsina³⁶⁶. Sin embargo, en el estudio aleatorizado realizado por Horby et al. del Recovery Collaborative Group, el tratamiento con Lopinavir-Ritonavir no se asoció con la reducción de la mortalidad a los 28 días en pacientes hospitalizados con COVID-19 o la perspectiva de progresar a ventilación mecánica invasiva o muerte³⁶⁷.

Otros antivirales como la **Ribavirina**, son igualmente poco probable que proporcionen valor clínico. En estudios realizados *in vitro* se encontró que solo podía inhibir el SARS-CoV a niveles muy altos, lo cual es difícil de aplicar en la clínica³⁶⁸ y no tiene ningún beneficio en pacientes con SARS-CoV y MERS-CoV³⁶⁹.

Un fármaco de amplio espectro, análogo de la adenosina, el **Remdesivir**, mostró eficacia en la inhibición de la replicación del SARS-CoV-2 en modelos animales³⁷⁰, conduciendo a la terminación prematura de la cadena de ARN viral. Sin embargo, Grein et al.³⁷¹ informaron de efectos secundarios adversos tras su uso en pacientes con COVID-19 incluidos diarrea, erupción, hipotensión, anomalías de la función hepática y disfunción renal e incluso graves, como daño renal agudo, shock séptico e insuficiencia multiorgánica, en el 23% de los pacientes.

Otro ensayo clínico, demostró que la terapia con plasma de enfermos convalecientes junto con Remdesivir obtuvo resultados positivos³⁷², mientras que en otro ensayo sobre la eficacia del Remdesivir no se asoció con resultados estadísticamente significativos, por lo que se necesitan más estudios para proporcionar datos adicionales sobre su eficacia³⁷³.

Un medicamento que ha demostrado buenos resultados en ensayo clínico en fase III es el **Molnupiravir**, de administración por vía oral, un ribonucleósido análogo de N4-hidroxicitidina que inhibe la replicación del SARS-CoV-2 mediante la introducción de errores de copia durante la replicación viral. Este fármaco reduciría en un 50% el riesgo de hospitalización y en un 7-14% el de muerte en personas con COVID-19 de leve a moderado (ensayo clínico en fase III MOVE-OUT)³⁷⁴. Este medicamento acaba de ser aprobado para su uso de emergencia por la agencia reguladora de medicamentos británica, la MHPR (Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency), el pasado 4 de noviembre³⁷⁵, convirtiéndose en el primer medicamento antiviral de administración oral contra la COVID-19 en ser aprobado en todo el mundo.

1.4.1.5 Agentes activadores de la respuesta inmune innata.

Entre los medicamentos activadores de la respuesta inmune innata se encuentran los Interferones y los anticuerpos monoclonales anti SARS-CoV-2 (REGEN-COV, Sotrovimab) y entre los medicamentos moduladores de la respuesta inflamatoria están, por un lado, los que se unen a componentes de la cascada inflamatoria, como los antagonistas de interleuquinas (Tocilizumab, Sarilumab), los esteroides (Dexametasona, Metilprednisolona) o los inhibidores de JAK1/JAK2 (Baricitinib) y, por otro lado, los inhibidores del estrés oxidativo (Vitaminas D, C, B₃ y selenio) (**Figura 25**).

La evidencia actual, sugiere que las muertes relacionadas con COVID-19 se deben principalmente al aumento de la inflamación. Por lo tanto, la intensidad de las liberaciones de citoquinas proinflamatorias diferencia significativamente entre casos leves y graves de COVID-19³⁷⁶. El CSS y los daños en los órganos caracterizados por una liberación excesiva de citoquinas proinflamatorias podrían reducirse con medicamentos inmunomoduladores. Corticosteroides, como el Metilprednisolona y la Dexametasona redujeron significativamente la tasa de mortalidad en pacientes con COVID-19 que sufren SDRA. Un estudio clínico mostró que la Metilprednisolona redujo el riesgo de muerte en pacientes con SDRA³⁷⁷. Otros estudios encontraron que una dosis única de 40-500 mg de Metilprednisolona podría disminuir el proceso inflamatorio sin afectar negativamente el aclaramiento viral y la producción de IgG específicos. Sin embargo, la administración a largo plazo de Metilprednisolona retrasó el aclaramiento viral y suprimió el sistema inmunitario³⁷⁸. La Dexametasona también es un corticosteroide potente aprobado con acción predominantemente glucocorticoide que exhibe efectos antiinflamatorios e inmunosupresores. Los estudios realizados por el grupo UK Recovery proporcionaron evidencia de que en pacientes hospitalizados por COVID-19, el uso de Dexametasona resultó en una menor tasa de mortalidad tanto entre los que recibieron ventilación mecánica invasiva como oxígeno solamente³⁷⁹.

Anteriormente, se demostró que antagonistas de los receptores de la IL-6 como el **Tocilizumab** o el **Sarilumab** tenían efectos neutralizantes in vitro, en ratones y en macacos Rhesus para SARS-CoV y MERS-CoV^{380,381}. Sin embargo, sólo se ha probado la eficacia de éstos en pacientes COVID-19 en estado crítico^{382,383}.

Los inhibidores de la JAK1/JAK2 también exhiben efectos antivirales al bloquear la endocitosis y la activación de citoquinas³⁸⁴. **Baricitinib**, por ejemplo, regulador de la endocitosis viral que impide la penetración del SARS-CoV-2 en las células epiteliales alveolares. Un ensayo clínico realizado por Cantini et al.³⁸⁵, demostró que pacientes con neumonía moderada por COVID-19 tratados con Baricitinib combinado con Lopinavir-Ritonavir mejoraron, sobre todo, en la fiebre, la saturación de oxígeno y la proteína C reactiva. Además, los resultados de un ensayo aleatorizado revelaron que Baricitinib administrado conjuntamente con Remdesivir, mostró

mejores resultados clínicos que el Remdesivir administrado sólo, al acelerar la mejoría y reducir el tiempo de recuperación³⁸⁶.

Aunque es poco probable que los antivirales de amplio espectro sean efectivos por sí solos, pueden desempeñar un papel junto con otras terapias. Así, varios ensayos han demostrado los efectos beneficiosos del **IFN-β**, mejorando la clínica y la recuperación, así como disminuyendo la mortalidad a los 28 días del 43,6% al 19%³⁸⁷. El IFN es capaz de inhibir la replicación del SARS-CoV y el MERS-CoV tanto in vitro como en animales³⁸⁸ y tuvo el máximo efecto utilizado en combinación con los antivirales de amplio espectro, Lopinavir/Ritonavir y Ribavirina³⁸⁹. Un ensayo clínico de IFN-α 2a y Ribavirina en pacientes con MERS-COV mostró una mejoría en la supervivencia a los 14 días, pero no a la supervivencia a los 28 días. Significativamente, IFN-β 1a resultó en una tasa de mortalidad del 64% en comparación con el 85% en IFN-α 2a³⁸⁰.

1.4.1.6 Inhibidores de estrés oxidativo.

Los inhibidores del estrés oxidativo también pueden ser útiles en el tratamiento de COVID-19. Así, la vitamina C, un antioxidante, y el selenio, que apoya un grupo de enzimas, pueden contribuir a la prevención de los ROS y el daño celular³⁹⁰. Además, la investigación demostró que los pacientes con COVID-19 también pueden tener una deficiencia de vitamina D (antioxidante de membrana)³⁹¹, la cual inhibe, además, la expresión de ACE-2³⁹², por lo que podría limitar la entrada del SARS-CoV-2 en las células.

Por otro lado, el papel de la vitamina C en la prevención y el tratamiento de la neumonía y la sepsis se ha planteado durante muchas décadas³⁹³. Estos estudios proporcionaron la base para estudios de pacientes con síntomas graves de COVID-19. Los pacientes con neumonía y sepsis tienen niveles bajos de vitamina C y niveles elevados de estrés oxidativo. Por lo tanto, la administración de vitamina C a pacientes con neumonía puede reducir la gravedad de los síntomas y la duración de la enfermedad³⁹⁴. Los pacientes en estado crítico con sepsis requieren altas dosis de vitamina C intravenosa para normalizar los niveles plasmáticos. La vitamina C tiene funciones fisiológicas pleiotrópicas, muchas de las cuales parecen estar relacionadas con la susceptibilidad a COVID-19, incluyendo propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticoagulantes e inmunomoduladoras³⁹⁵. Estudios preliminares muestran niveles bajos de vitamina C en pacientes con COVID-19 en estado crítico³⁹⁶. Entre las terapias integrativas, la infusión de vitamina C puede aumentar la síntesis de norepinefrina y vasopresina, reducir los niveles de citoquinas y prevenir la activación de neutrófilos³⁹⁷. Actualmente se están llevando a cabo varios ensayos clínicos en pacientes con COVID-19 que utilizan vitamina C como tratamiento intravenoso u oral³⁹⁸.

El posible vínculo entre la deficiencia de vitamina D3 (VD3) y la susceptibilidad al SARS-COVCoV-2 también ha ganado recientemente la atención de la comunidad médica. Existen vías moleculares en las que VD3 regula los procesos implicados tanto en la replicación del SARS-CoV-2 como en la supervivencia celular³⁹⁹. Varios informes indican que la deficiencia de VD3 se asocia con un mayor riesgo de infección del tracto respiratorio superior⁴⁰⁰. En el virus sincitial respiratorio, VD3 aumenta la síntesis del IκBα (factor nuclear del potenciador del gen del polipéptido ligero kappa en el inhibidor de células B, alfa) en el epitelio respiratorio, lo que resulta en una reducción en la expresión de genes proinflamatorios⁴⁰¹. Un ensayo clínico que involucró a más de cuatro mil pacientes con COVID-19 encontró que la deficiencia de vitamina D se asoció con un riesgo casi dos veces mayor de contraer el virus. La deficiencia de vitamina D puede ser una variable común entre los ancianos y los pacientes con enfermedades subyacentes en poblaciones con mayor riesgo de complicaciones y mortalidad por COVID-19⁴⁰². Podría justificar el uso de vitamina D como agente de mantenimiento y expresión en la respuesta inmune, que es esencial para disminuir el riesgo y la gravedad de la infección viral y aliviar los

síntomas de la enfermedad⁴⁰³. Sin embargo, no hay recomendaciones precisas con respecto a la dosis de suplementos de vitamina D para la prevención o el tratamiento de COVID-19^{404,405}.

Actualmente, la *Agencia Europea del Medicamento* (EMA) ha autorizado para su uso en la Unión Europea como tratamiento en COVID-19, el antiviral Remdesivir (Veklury), para pacientes adultos y pediátricos que requieren hospitalización, la combinación Casirivimab/Indevimab (REGEN-CoV), para el tratamiento en adultos que no requieren oxígeno suplementario y que tienen un mayor riesgo de que su enfermedad se vuelva grave y Regdanvimab para el tratamiento en adultos y adolescentes que no requieren oxígeno suplementario y que tienen un mayor riesgo de que su enfermedad se vuelva grave. Otros cinco medicamentos, Anakinra, Baricitinib, Tocilizumab, la combinación Casirivimab/Indevimab, Molnupavir y Sotrovimab, están siendo evaluados para su posible autorización de comercialización y, Evusheld, se encuentra en etapa de revisión de datos clínicos por esta Agencia.⁴⁰⁶ **(Tabla 2).**

Tabla 2. Medicamentos contra la COVID-19. EMA. (Actualizado a 27/11/2021).

MEDICAMENTOS AUTORIZADOS	EN EVALUACIÓN PARA AUTORIZACIÓN	EN REVISIÓN DE DATOS CLÍNICOS
Veklury (Remdesivir)	Anakinra (Kineret)	Evusheld (Tixagevimab/Cilgavimab)
REGEN-COV (Casirivimab-Imdevimab)	Lagevrio (Molnupavir)	
Regkirona (Regdanvimab)	Roactemra (Tocilizumab)	
	Xevudy (Sotrovimab)	
	Olumiant (Baricitinib)	

1.4.2 Vacunación frente al SARS-COV-CoV-2.

La vacunación constituye la estrategia más importante para acabar con la pandemia. Sin embargo, la aparición de múltiples variantes del SARS-CoV-2 con una susceptibilidad reducida a la inmunidad inducida por la enfermedad y/o la vacuna, amenaza el progreso alcanzado con esta estrategia⁴⁰⁷.

Hasta mayo de 2021, 10 vacunas contra la COVID-19 estaban autorizadas y aprobadas para su uso en diferentes regiones del mundo⁴⁰⁸ y hay más de 200 candidatas de diversos tipos en desarrollo para prevenir las infecciones por SARS-CoV-2 basadas en una larga lista de tipos y tecnologías^{409,410}, incluidas las vacunas virales inactivadas, las vacunas virales vivas atenuadas, las vacunas de vectores virales, las vacunas de subunidades virales y las vacunas de ácido nucleico viral^{411,412} **(Figura 27).**

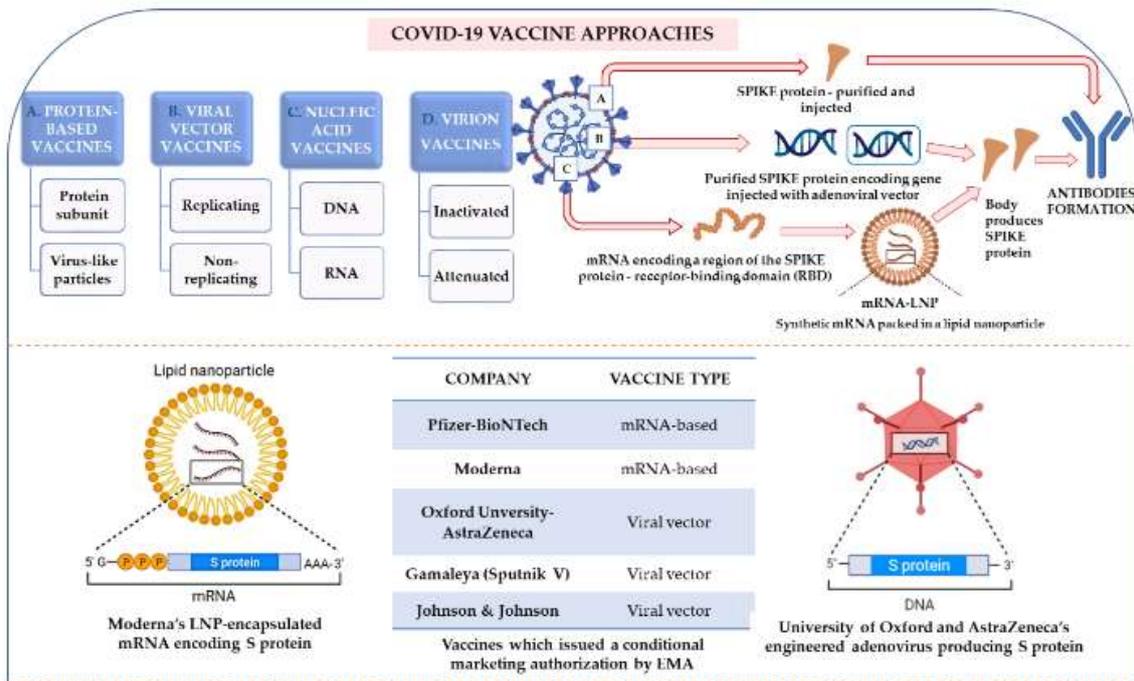


Figura 27. Tipos de vacunas frente a la COVID-19³²⁸.

Actualmente, la EMA (*European Medicine Agency*) ha autorizado 4 vacunas para su uso en Europa contra la COVID-19, 1 vacuna está proceso de evaluación para su autorización de comercialización y otras 3 están en fase de revisión de datos clínicos⁴¹³ (Tabla 3).

Tabla 3. Estado del procedimiento de autorización de vacunas contra COVID-19 por la EMA (Actualizado a 27/11/2021).

VACUNAS AUTORIZADAS	EN EVALUACIÓN PARA AUTORIZACIÓN	EN REVISIÓN DE DATOS CLÍNICOS
Comirnaty (Pfizer-BioNTech) (21/12/2020)	Nuvaxovid (Nvx-CoV2373)	Sputnik V
Spikevax (Moderna) (06/01/2021)		COVID-19 vaccine (Vero Cell) Inactivated
Vaxzevria (AstraZeneca) (29/01/2021)		Vidprevtyn
Covid-19 Vaccine Janssen (11/03/2021)		

El 54% de la población mundial ha recibido al menos una dosis de una vacuna contra la COVID-19, pero el acceso de la población mundial a las distintas vacunas está resultando muy desigual, ya que mientras que más del 80% de las dosis de las vacunas han acabado en países ricos, sólo el 5.7% de las personas de países con bajos ingresos han recibido alguna dosis⁴¹⁴ (Figura 28). Así, más del 80% de las vacunas han acabado en países de ingresos altos, a pesar de que solo son la mitad de la población de todo el mundo, lo que está favoreciendo la aparición de nuevas variantes del virus, algunas de ellas muy peligrosas para la población mundial. Este hecho ha llevado a la OMS a crear el Programa COVAX⁴¹⁵, para fomentar la colaboración mundial para un acceso equitativo mundial a las vacunas contra la COVID-19.

Share of people vaccinated against COVID-19, Nov 26, 2021

Alternative definitions of a full vaccination, e.g. having been infected with SARS-CoV-2 and having 1 dose of a 2-dose protocol, are ignored to maximize comparability between countries.

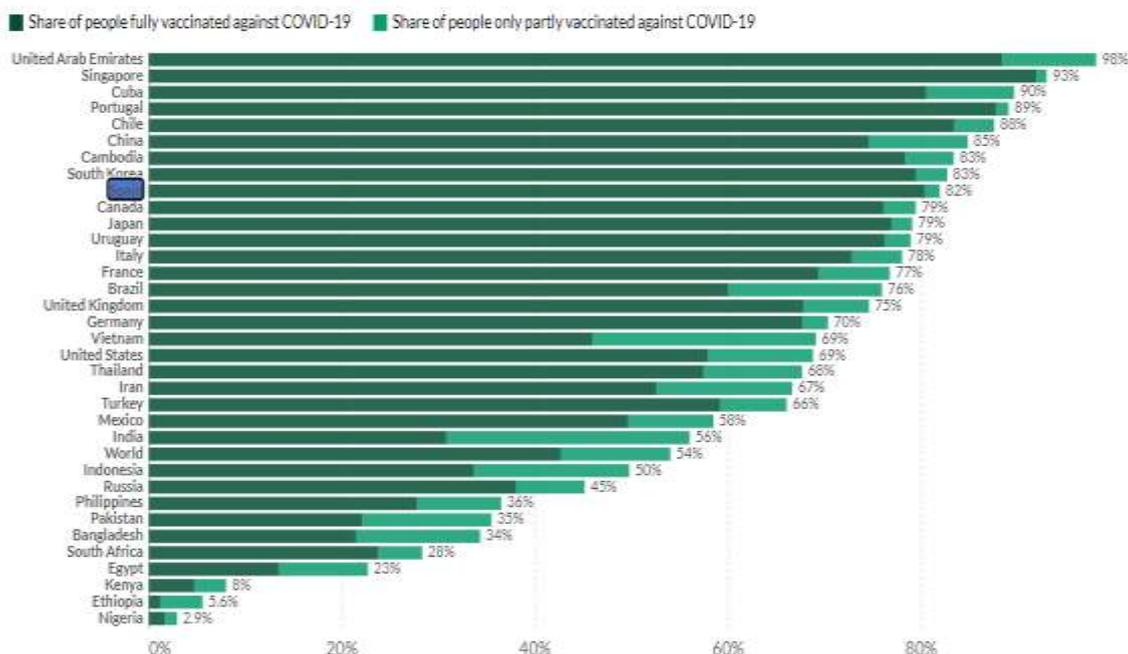


Figura 28. Población mundial vacunada contra COVID-19 a 26/11/2021. Fuente: Our World in Data.

En España, el 89,2% de la población diana (mayores de 12 años) ha recibido la pauta completa de vacunación y más de 4 millones y medio de personas de riesgo han recibido una dosis de refuerzo, convirtiéndose así en uno de los países a nivel mundial que más éxito ha tenido en la administración de vacunas COVID-19⁴¹⁶ (**Tabla 4**). Además, el pasado 25 de noviembre, el Comité de Medicamentos Humanos (CHMP) de la EMA ha recomendado conceder una extensión de la indicación para la vacuna COVID-19 Comirnaty para incluir el uso en niños de 5 a 11 años, por lo que se espera que próximamente se empiece a administrar en nuestro país, elevando ostensiblemente los niveles de vacunación⁴¹⁷.

Tabla 4. Datos de vacunación COVID-19 en España (Actualizados a 25/11/2021). (* Mayores de 12 años. (** Personas con condición de alto riesgo, personas que viven en residencias, personas mayores de 70 años y refuerzo de Janssen).

VACUNA	Nº DE PERSONAS CON PAUTA COMPLETA	Nº DE PERSONAS CON DOSIS DE RECUERDO**
PFIZER/BIOTECH	26.034.767	3.782.969
MODERNA	4.721.435	784.343
ASTRAZENECA	4.851.773	-
JANSSEN	1.974.199	-
TOTAL	37.582.174 (89.2 % DE LA POBLACIÓN DIANA*)	4.567.312

Aunque aún es prematuro evaluar los efectos que tiene esta elevada tasa de vacunación en nuestro país, un artículo de *The Lancet* reflexiona sobre cómo la alta tasa de vacunación en España parece que, de momento, está facilitando la convivencia con el virus⁴¹⁸.

Poco después de la emergencia del SARS-CoV, la proteína S fue identificada como el antígeno inmuno-dominante del virus⁴¹⁹. Así mismo, la evaluación de los pacientes con SARS-CoV-2 reveló que los anticuerpos de unión y neutralización se dirigen principalmente al dominio de unión al receptor de la subunidad S1⁴²⁰.

Una vez que se identificó este supuesto objetivo de la vacuna, el siguiente desafío fue cómo generar una respuesta inmune efectiva al SARS-CoV-2 que incluyese la producción de anticuerpos neutralizantes y la generación de una respuesta de células T, evitando la enfermedad inmuno-aumentada (respuesta inducida por la vacuna que conduce a un aumento paradójico de la gravedad de la enfermedad ante el virus)⁴²¹.

Por ello, la mayoría de las vacunas aprobadas y candidatas contra COVID-19 tienen como objetivo inducir anticuerpos neutralizantes contra la proteína S, evitando la absorción por el receptor humano ACE-2. Sin embargo, éstas han sido diseñadas en base a la secuenciación que se hizo de la cepa original de Wuhan, mientras que el virus está sufriendo múltiples mutaciones en las regiones codificantes de la proteína S que reconocen los anticuerpos neutralizantes generados por la administración de las vacunas, que pueden alterar la interacción con el receptor ACE-2⁴²² y han llevado a la aparición de variantes de SARS-CoV-2 que circulan a nivel mundial⁴²³, por lo que se plantea la posibilidad de que mutaciones específicas puedan disminuir la eficacia de las vacunas e incluso que aparezcan variantes que puedan escapar al control de estos anticuerpos⁴²⁴.

Instituciones como el *Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades* (ECDC) evalúan regularmente nuevas pruebas sobre las variantes detectadas a través del seguimiento epidémico, el cribado de variantes genómicas u otras fuentes científicas y elabora tablas informativas sobre las mismas⁴²⁵, donde se recoge información como la nomenclatura científica, las etiquetas propuestas por la OMS para las variantes globales de preocupación por el SARS-CoV-2 y las variantes de interés que se utilizan junto con la nomenclatura científica en las comunicaciones sobre variantes al público (desde el 31 de mayo de 2021), el linaje y las mutaciones que afectan a la proteína S, el país y la fecha de la primera detección, la evidencia relativa a propiedades en tres categorías diferentes, transmisibilidad, inmunidad y gravedad de la infección o el grado de transmisión en la UE, clasificado como dominante, comunitario, brote(s) y esporádico/viaje.

Las distintas variantes se agrupan en 4 categorías:

- **Variantes Preocupantes (VOC)**, aquellas de las que se dispone de pruebas claras que indican un impacto significativo en la transmisibilidad, la gravedad y/o la inmunidad que es probable que tenga un impacto en la situación epidemiológica en la UE.
- **Variantes de Interés (VOI)**, de las que se dispone de pruebas sobre propiedades genómicas, pruebas epidemiológicas o pruebas in vitro que podrían implicar un impacto significativo en la transmisibilidad, la gravedad y/o la inmunidad, teniendo un impacto realista en la situación epidemiológica en la UE, aunque la evidencia aún es preliminar o se asocia con una gran incertidumbre.
- **Variantes de Seguimiento**, de las que hay indicios de que podrían tener propiedades similares a las de un VOC, pero la evidencia es débil o aún no ha sido evaluada por el ECDC.
- **Variantes Desescaladas**, que incluyen variantes que ya no circulan o han estado circulando durante mucho tiempo sin ningún impacto en la situación epidemiológica general o la evidencia científica demuestra que la variante no está asociada con ninguna propiedad preocupante, como es el caso de la variante Alfa de Reino Unido, B.1.1.7., que ha sufrido una reducción drástica de la circulación en la UE (**Tabla 5**).

Tabla 5. Principales variantes de SARS-COV-CO-2 (Actualizada a 27/11/2021) (n/a: no aplicable).

NOMBRE	LINAGE	PAIS DETECCIÓN	MUTACIÓN EN SPIKE	FECHA DETECCIÓN	IMPACTO TRANSMISIÓN	IMPACTO INMUNIDAD	IMPACTO SEVERIDAD
VARIANTES PREOCUPANTES (VOC)							
BETA	B.1.351	Sudáfrica	K417N, E484K, N501Y, D614G, A701V	Septiembre 2020	Sí	Sí	Sí
GAMMA	P.1	Brasil	K417T, E484K, N501Y, D614G, H655Y	Diciembre 2020	Sí	Sí	Sí
DELTA	B.1.617.2	India	L452R, T478K, D614G, P681R	Diciembre 2020	Sí	Sí	Sí
OMICRON	B.1.1.529	Sudáfrica Bostwana Hong-Kong	-	Noviembre 2021	-	-	-
VARIANTES DE INTERÉS (VOI)							
n/a	B.1.620		S477N, E484K, D614G, P681H	Febrero 2021	-	Sí	-
MU		Colombia	R346K, E484K, N501Y, D614G, P681H	Enero 2021	-	Sí	-
LAMBDA		Perú	L452Q, F490S, D614G	Diciembre 2020	-	Sí	-
VARIANTES EN SEGUIMIENTO							
n/a	C.36+L452R	Egipto	L452R, D614G, Q677H	Diciembre 2020		Sí	
n/a	AT.1	Rusia	E484K, D614G, N679K, ins679GIAL	Enero 2021		Sí	
n/a	B.1.1.318	No aclarado	E484K, D614G, P681H	Enero 2021		Sí	
n/a	P.1+P681H	Italia	D614G, E484K, H655Y, K417T, N501Y, P681H	Febrero 2021		Uclear	
n/a	B.1.617.2 + K417N	Reino Unido	L452R, T478K, D614G, P681R, K417N	Junio 2021			
n/a	C.1.2	Sudáfrica	D614G, E484K, H655Y, N501Y, N679K, Y449H	Junio 2021	Sí	Sí	
n/a	B.1.617.2 + E484Q	India	L452R, T478K, D614G, P681R, E484Q	Abril 2021			
n/a	B.1.617.2 + Q613H	India	L452R, T478K, D614G, P681R, Q613H	Abril 2021			

1.4.3 Eficacia de las vacunas.

Numerosos los estudios están actualmente evaluando la eficacia de las vacunas ante las nuevas variantes. Así, entre diciembre de 2020 y abril de 2021, los datos de las cohortes HEROES-RECOVER, entre trabajadores de primera línea en Estados Unidos, mostraron que las vacunas Pfizer/BioNTech y Moderna presentaban aproximadamente un 90% de efectividad en la prevención de la infección sintomática y de la asintomática con SARS-CoV-2^{426,427}. Sin embargo, estas estimaciones disminuyeron al 66% desde que la variante Delta del SARS-CoV-2 se convirtió en predominante en los sitios de estudio de cohorte HEROES-RECOVER⁴²⁸.

En estudios preliminares realizados en enero de 2021, el equipo de Xie et al. encontró diferencias en la afinidad de los anticuerpos producidos por los 20 participantes contra los virus portadores de la mutación N501Y en comparación con los anticuerpos producidos para combatir los virus que carecen de este cambio⁴²⁹.

También está surgiendo evidencia de que la mutación E484K puede permitir que el virus evada la respuesta inmune. En un estudio publicado el 28 de diciembre de 2020, Andreano et al.⁴³⁰ cultivaron SARS-CoV-2 en presencia de bajos niveles de suero de convalecencia. En 90 días, el virus sufrió tres mutaciones que lo hicieron resistente al suero humano: una fue la mutación E484K encontrada en la variante sudafricana; los otros son cambios en el dominio N-terminal que se encuentran tanto en las variantes sudafricanas como británicas. Esto sugirió que toda la respuesta de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 se dirigía contra una pequeña fracción de la proteína espiga.

Estudios de cohortes realizados por Challen et al.⁴²² sugieren que la variante B.1.1.7 (variante india) puede estar asociada con un aumento de la mortalidad y en un análisis de más de 130 trabajadores de la salud infectados con SARS-CoV-2 en tres centros en la India durante un período de circulación de linaje mixto, científicos observaron una menor eficacia de la vacuna Astra/Zeneca ChAdOx-1 frente a la variante Delta B.1.617.2⁴³¹. Del mismo modo, el equipo de Hoffmann et al. probó los sueros de personas previamente infectadas con SARS-CoV-2 y encontró que sus anticuerpos neutralizaban a B.1.617 aproximadamente un 50% de forma menos efectiva que las cepas circulantes anteriormente. Además, cuando probaron el suero de pacientes después de dos dosis de la vacuna de Pfizer, encontraron que los anticuerpos eran aproximadamente 67% efectivos contra la variante B.1.617⁴³². El brote reafirma la importancia de que la prevención mediante la vacunación y los tratamientos sean más eficientes y se apliquen de forma rápida para evitar la generación de otros mutantes.

Por otro lado, las mutaciones que deben considerarse en la modificación de vacunas siguen siendo cuestionables. Los principales candidatos son E484K, N501Y y L452R en el RBD (L452R se encontró en la variante india B.1.617 recientemente reportada y la variante estadounidense B.1.429⁴³³). Sobre la base de la tasa de mutación del SARS-CoV-2, se espera que se necesite una revisión anual de la secuencia de la vacuna durante al menos los próximos 2-3 años⁴⁰⁵.

Además, las compañías farmacéuticas dedicadas a la producción de vacunas prefieren desarrollar vacunas químicamente definidas, basadas en pocos elementos que no puedan evolucionar, tales como proteínas purificadas. Pero estas vacunas no suelen ser inductoras de respuestas inmunes fuertes en mucosas, que es donde se requiere la inmunidad que protege frente la invasión de virus respiratorios como los coronavirus. Esta inmunidad solo se induce eficientemente proporcionando un antígeno que se exprese en las propias mucosas respiratorias, por lo que una administración intranasal de las vacunas proporcionaría una inmunidad mucho más robusta (esterilizante)⁴³⁴.

Esta ruta de administración requiere más controles que demuestren que la vacuna no cruza la barrera hematoencefálica, pasando desde la circulación sanguínea al cerebro y causando problemas secundarios adversos, por lo que son más difíciles de aprobar por las agencias reguladoras del medicamento. En consecuencia, las farmacéuticas se decantan inicialmente por las vacunas administradas intramuscularmente⁴³⁴.

En cambio, la administración de antígenos por vía intramuscular induce una respuesta inmune humoral y celular sistémica que es de bajo nivel y corta duración en las mucosas, lo que implica la necesidad de administrar al menos dos dosis para provocar una respuesta inmune que dé una inmunidad esterilizante que no permita el crecimiento del virus en una posible reinfección posterior. Este es un problema común de las vacunas actuales frente al SARS-CoV⁴³⁴.

En España se están desarrollando más de 10 vacunas, 3 de ellas en el *Centro Superior de Investigaciones Científicas* (CSIC). De ellas, la vacuna que está siendo desarrollada por Luis Enjuanes y su equipo en el *Laboratorio de Coronavirus del Centro Nacional de Biotecnología* (CNB) está basada en replicones RNA (copia del genoma RNA del virus, del que se han eliminado varios genes) derivados de los genomas de los virus MERS-CoV o del SARS-CoV. Al mantener genes que codifican antígenos que inducen protección, estos replicones inducen una respuesta inmune protectora y en ensayos preclínicos en modelos animales han mostrado una inmunidad esterilizante. Esto impide que el virus se replique en los animales vacunados, por lo que se bloquea la transmisión del virus⁴³⁴.

Otra cuestión que aún sigue en estudio es la duración de la inmunidad humoral y celular proporcionada por las vacunas actualmente en uso, así como de la inmunidad derivada de haber contraído la enfermedad y la necesidad de la administración de dosis adicionales o de refuerzo. Así, en un estudio reciente, los resultados muestran que, independientemente si se pasó la COVID-19 con síntomas o sin ellos, los anticuerpos persisten en titulaciones altas al menos nueve meses después de la infección⁴³⁵. Según los últimos datos científicos, se logra una protección documentada de hasta los seis meses posteriores a la administración de la vacuna, con una pérdida muy lenta de efectividad, aunque persiste el seguimiento. En abril, Pfizer/BioNTech confirmaron que la inmunidad de su vacuna de ARN sigue siendo fuerte (91,3% de efectividad) seis meses después de la segunda dosis⁴³⁶. De manera similar, la evidencia de la vacuna Moderna muestra una efectividad del 94% seis meses después de la segunda dosis⁴³⁷. Algunos estudios que han evaluado la memoria de las células T y B a los 6 meses o más después de la infección. Al evaluar específicamente las células T a los 6 meses después de la infección en 95 sujetos, un estudio encontró células T CD4 + de memoria en el 90% de los casos y células TCD8 + de memoria en el 70% de los casos donde se incluyeron un 44% de casos asintomáticos y que también estos, en su mayoría, tenían memoria inmunológica, presentando células T detectables, aunque a niveles moderadamente más bajos que los casos sintomáticos⁴³⁸. Las células B de memoria se han evaluado 6 meses después de COVID-19 en múltiples estudios^{439,440}. En una cohorte de 188 casos, las células B de memoria específicas para la proteína de la espícula, RBD y nucleocápside fueron detectables en el 100% de los sujetos a los 6 meses o más después de la infección⁴³⁹. En particular, las células B de memoria aumentaron con el tiempo, con más células B de memoria RBD a los 6 meses que al mes de la infección^{439,440}. Además, a los 6 meses las células no sólo habían aumentado en número, sino que también habían experimentado una maduración por afinidad y expresaron anticuerpos neutralizantes de mayor potencia⁴⁴⁰. Hay que destacar que la característica definitoria de la memoria inmune de COVID-19 es la heterogeneidad. Los distintos compartimentos de la respuesta inmune, los anticuerpos específicos frente al virus, las célula B de memoria, las células T CD4 + de memoria y las células TCD8 + de memoria presentan patrones diferentes en los distintos individuos y a lo largo del tiempo⁴³⁹.

En conclusión y a la espera de nuevos estudios, con los datos disponibles hasta ahora, es probable que la memoria de las células T y de las células B, así como los anticuerpos, persistan durante años en la mayoría de las personas infectadas por el SARS-CoV-2⁴³⁸⁻⁴⁴⁰.

En base a los resultados de varios estudios, el Comité de Medicamentos Humanos de la EMA (CHMP) recomendó el octubre pasado la administración de una dosis adicional de las vacunas COVID-19 Comirnaty (BioNTech / Pfizer) y Spikevax (Moderna) a personas con sistemas inmunitarios gravemente debilitados, al menos 28 días después de su segunda dosis ya que demostraron que aumenta la capacidad de producir anticuerpos contra el virus en pacientes trasplantados de órganos con sistemas inmunitarios debilitados^{441,442}. Además, el CHMP ha evaluó los datos de Comirnaty que muestran un aumento en los niveles de anticuerpos cuando se administra una dosis de refuerzo aproximadamente 6 meses después de la segunda dosis en personas de 18 a 55 años con sistemas inmunitarios normales concluyendo que las dosis de refuerzo pueden considerarse al menos 6 meses después de la segunda dosis para las personas de 18 años o más, por lo que ha recomendado su administración para éstos⁴¹⁷.

1.5. NUEVAS DIANAS TERAPÉUTICAS

Una de las preguntas que sigue sin respuesta con respecto a la COVID-19 es por qué algunas personas infectadas con SARS-CoV-2 tienen síntomas graves mientras que otras no. Por lo tanto, el conocimiento de la susceptibilidad de un individuo a la infección por SARS-CoV-2 y otros patógenos virales a través de la identificación de biomarcadores críticos específicos puede guiar futuras estrategias de prevención y tratamiento de la enfermedad en sus distintas fases.

Entre los nuevos métodos de utilización de biomarcadores de diversas enfermedades se encuentran aquellos basados en la detección y cuantificación en fluidos corporales de microRNAs (miRNAs), pequeñas moléculas de RNA no codificantes que regulan la expresión génica, así como las terapias basadas en éstos.

Los miRNA son uno de los tipos más diversos de RNA humanos no codificantes, con 2.656 especies diferentes y 1.610.510 de genes objetivos (<http://mirbase.org>)⁴⁴³ identificados hasta la fecha en humanos y este número sigue creciendo⁴⁴⁴. Al estar involucrados en la regulación de la expresión génica, contribuyen así a una variedad de procesos celulares que incluyen proliferación, diferenciación, apoptosis o metabolismo⁴⁴⁵⁻⁴⁴⁸. Según las estimaciones actuales, los miRNAs regulan la expresión de más del 60% de los genes de mamíferos⁴⁴⁹, por lo que muchos procesos patológicos se acompañan de distorsiones de la expresión de los miRNA^{450,451}, pudiendo utilizarse como biomarcadores de diagnóstico, pronóstico y respuesta al tratamiento para enfermedades como el cáncer⁴⁵²⁻⁴⁵⁵, enfermedad de Alzheimer⁴⁵⁶, enfermedad de Parkinson⁴⁵⁷, enfermedades cardiovasculares⁴⁵⁸⁻⁴⁶¹, diabetes⁴⁶², fibrosis hepática⁴⁶³, fibrosis pulmonar⁴⁶⁴ o la enfermedad inflamatoria⁴⁶⁵ (**Figura 29**).

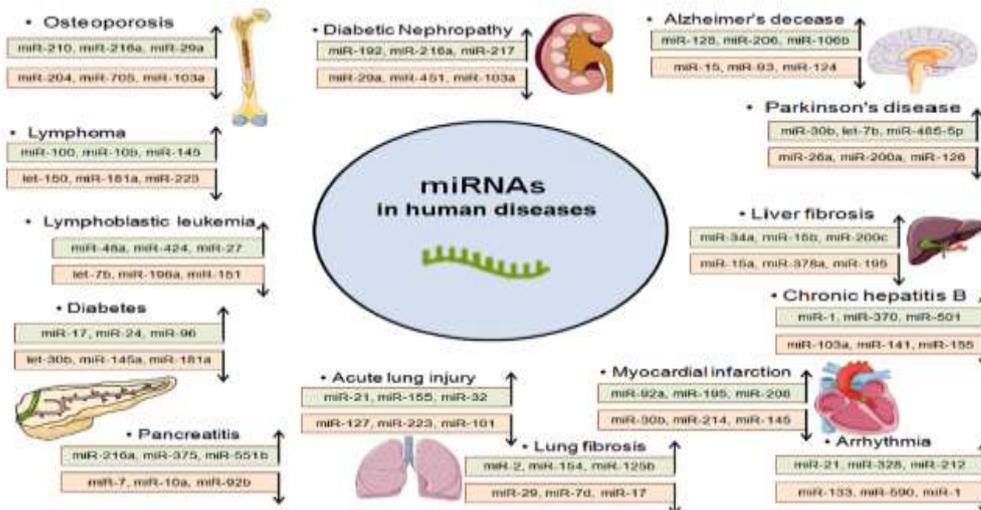


Figura 29. Algunos miRNAs relacionados con enfermedades humanas.⁴⁶⁶

Los miRNAs son pequeños RNAs no codificantes (20-24 ribonucleótidos) que regulan la expresión génica a nivel post-transcripcionalmente, uniéndose sus objetivos específicos de RNAs mensajeros (RNAm) y promoviendo su degradación y/o inhibición traduccional. En los genomas de mamíferos, los genes miRNA están presentes como unidades de transcripción independientes o localizados en intrones y exones de otros genes y aproximadamente la mitad de todos los genes codificantes de miRNA de mamíferos se encuentran dentro de los intrones^{446,467}. Además, se transcriben con frecuencia de sus propios promotores independientemente de los genes del huésped^{468,469}.

1.5.4. Biogénesis y silenciamiento post-transcripcional de los miRNAs

En la biogénesis de los miRNAs, la RNA polimerasa II (Pol II) transcribe los genes codificantes en el núcleo de la célula en forma grandes transcritos primarios (pri-miRNAs) con tapa en UTR 5' y poliadenilados en UTR 3' transcritos primarios (3'), que presentan una longitud variable que oscila entre cientos y miles de ribonucleótidos⁴⁷⁰⁻⁴⁷². Dichos pri-miRNAs pueden ser monocistrónicos (con una sola horquilla) o policistrónicos (varias horquillas) y presentan 3 características definitorias: 1) estructura de asa; 2) protuberancias internas, y 3) estructura bicatenaria. Los pri-miRNA son procesados posteriormente en el núcleo para formar precursores más cortos (de aproximadamente 70 nucleótidos) llamados pre-miRNA por una enzima RNasa tipo III llamada «Drosha» junto con su cofactor, como la proteína de la región crítica del gen 8 del síndrome DiGeorge (Pasha en las plantas), que crean un complejo enzimático nuclear llamado Microprocesador que acorta las moléculas de pri-miRNA en los extremos 3' y 5' formando las moléculas de pre-miRNA con una longitud de alrededor de 70 nucleótidos^{470,472-478}. Los pre-miRNAs se mueven hacia el citoplasma con la ayuda de RAN-GTP y exportina-5, donde tiene lugar la siguiente etapa de su maduración (**Figura 30**).

Dentro del citoplasma, la maduración tiene lugar principalmente con la ayuda de la enzima Dicer y las proteínas Argonauta (AGO), la proteína de unión al ARN de respuesta trans-activante (TRBP) y el activador de proteínas de PKR (PACT)^{470-475,479-485}. La enzima Dicer, que reconoce un pre-miRNA de doble cadena, lo disecciona alrededor de la base del bucle, formando moléculas de RNA de doble cadena de alrededor de 22 nucleótidos. La proteína AGO2, según la vía canónica de procesamiento de los miRNA, toma una de las cadenas a través de un mecanismo aún desconocido y se incorporan en el Complejo de Silenciamiento Inducido por miRNA (miRISC) que

tiene la capacidad de reconocer la cadena dúplex de RNA y convertirlo en miRNA maduro monocatenario, después de la degradación de la segunda hebra ^{471-473,478-480,484,485} (Figura 30).

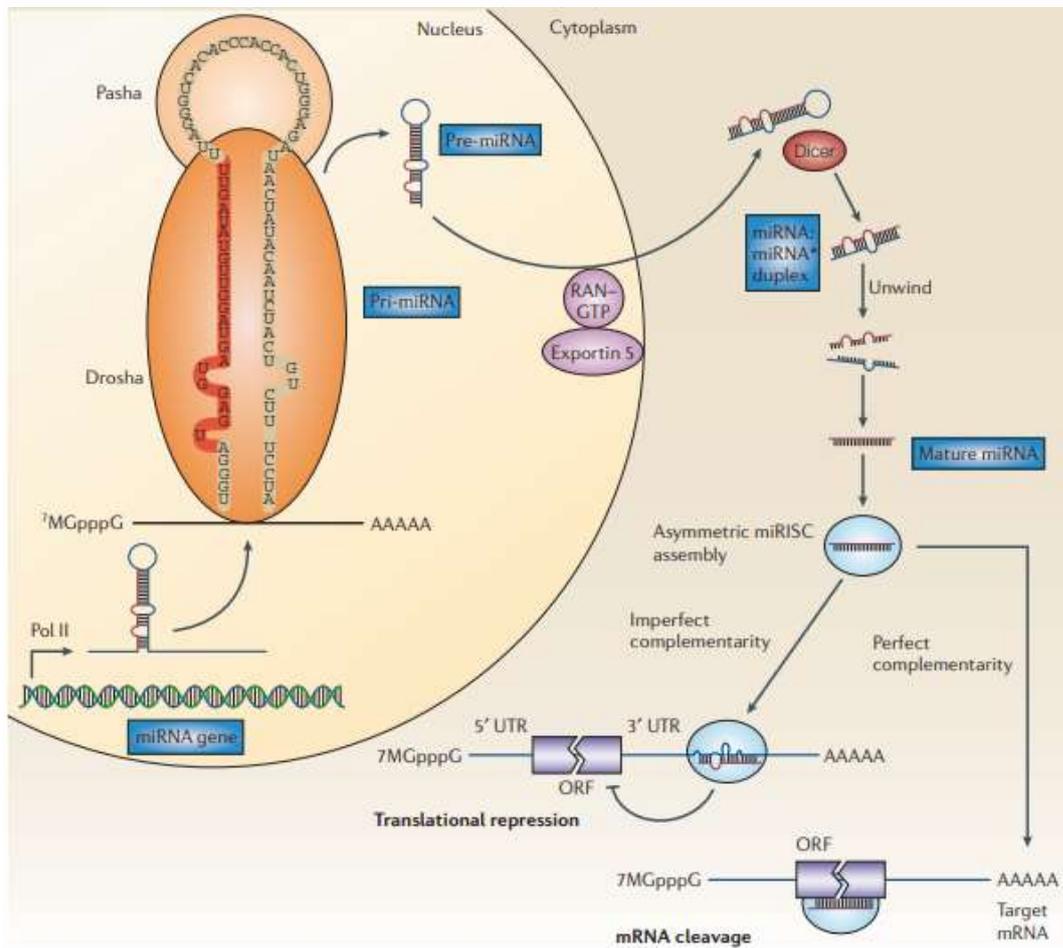


Figura 30. La biogénesis de los microRNA ⁴⁸⁶.

El elemento clave en una molécula madura de miRNA es el fragmento de siete nucleótidos en el extremo 5' (secuencia semilla), que determina la unión con el ARNm objetivo ⁴⁸⁷. La supresión postranscripcional se logra predominantemente mediante la unión del complejo miRNA-RISC en la región UTR 3' del RNAm.

Los miRNAs maduros pueden tener un efecto sobre el nivel de expresión de los genes a través de dos procesos: mediante la degradación del RNAm o por inhibición de la traducción ^{471,472,484,488}. El primer proceso se conoce como silenciamiento génico post-transcripcional, que requiere una complementariedad total entre el miRNA y el RNAm objetivo, y muy rara vez ocurre en células animales. El segundo proceso, que ocurre típicamente en células animales, consiste en la inhibición de la traducción y no depende de la complementariedad total entre el miRNA y el ARNm dirigido. En este caso, la inhibición de la expresión génica se produce a través de la unión del miRNA a la región no traducida 3' (3'UTR) del ARNm, con la participación de una proteína específica GW182, lo que resulta en la inhibición de la traducción a proteínas ^{472,484,488} (Figura 31).

Así, en animales, los miRNAs se unen a las proteínas Argonata (AGO) en complejos silenciadores inducidos por miRNA (miRISCs) y éstas proteínas AGO interactúan con una

proteína GW182 que proporciona el andamiaje necesario para reclutar otras proteínas efectoras⁴⁸⁹, como los complejos poli(A)-deadenilasa PAN2-PAN3 y CCR4-NOT, siguiendo la interacción miRNA:RNAm objetivo^{490,491}. Los complejos PAN2-PAN3 y CCR4-NOT catalizan la poli-deadenilación del RNAm diana. Las proteínas GW182 constan en un dominio de unión amino-terminal a AGO (ABD) y un dominio con repeticiones de triptófano (W) que interactúan con poli(A)- proteína C (PABPC) y promueven una deadenilación⁴⁹⁰. Posteriormente, el decapado se lleva a cabo facilitado por la proteína 2 (DCP2) y las proteínas asociadas⁴⁸⁹, seguida de la degradación 5'-3' del RNAm por la exoribonucleasa 1 (XRN1)⁴⁹² (**Figura 31**).

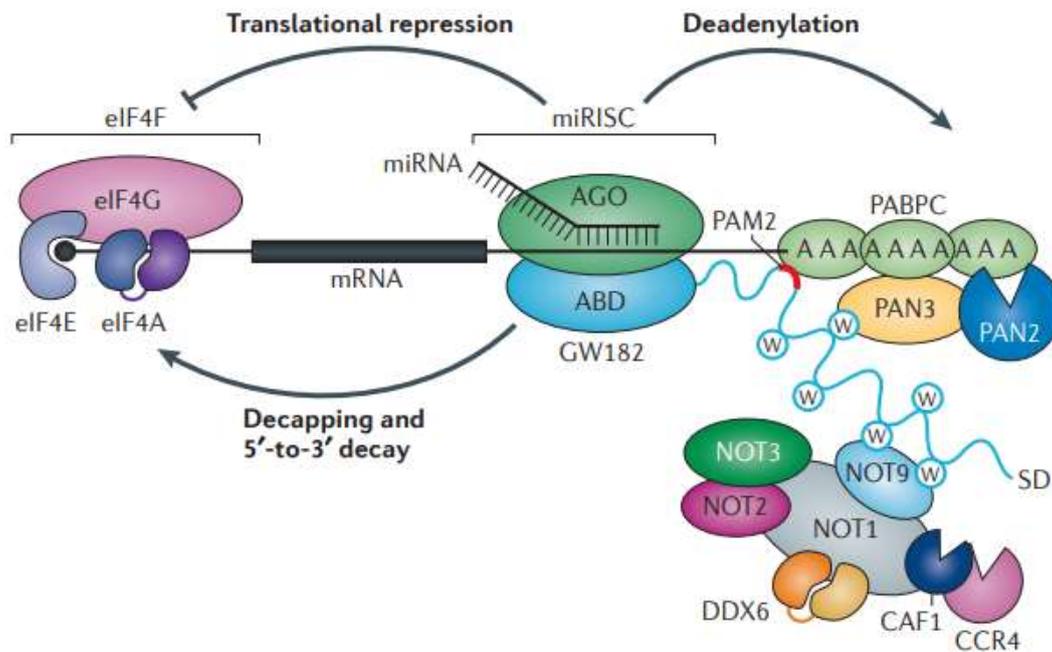


Figura 31. Descripción general del silenciamiento génico mediado por miRNA en animales⁴⁹⁰.

Además, se sabe los miRNAs pueden reprimir la traducción, pero el mecanismo molecular preciso para esto sigue sin estar claro. El consenso emergente es que los miRNAs inhiben el inicio de la traducción al interferir con la actividad y/o el ensamblaje del complejo del factor de iniciación eucariota 4F (eIF4F). El complejo eIF4F consiste en la proteína de unión a la tapa del RNAm, el factor eIF4E, la proteína adaptadora de eIF4G y la caja DEAD ARN helicasa eIF4A⁴⁵¹. El factor F4G sirve como andamio para las interacciones proteína-proteína que son esenciales para el reclutamiento del complejo de pre-iniciación 43S del ribosoma y para la iniciación de la traducción⁴⁵¹ (**Figura 31**).

Por otro lado, aunque en la mayoría de los casos, las regiones de unión a miRNA se encuentran en el 3'-UTR de los ARNm diana para inducir la degradación del RNAm y la represión traduccional⁴⁹³, también se ha reportado la interacción de miRNAs con otras regiones, incluyendo el UTR 5', la secuencia codificante y los promotores de genes⁴⁹⁴.

Además, los miRNAs también pueden activar la expresión génica bajo ciertas condiciones⁴⁹⁵. Estudios recientes han sugerido que los miRNAs se transportan entre diferentes compartimentos subcelulares para controlar la tasa de traducción, e incluso la transcripción⁴⁹⁶. Debido a su corta longitud y complementariedad incompleta, cada miRNA podría tener cientos de objetivos potenciales de RNAm⁴⁹³ y, por otro lado, cualquier RNAm dado puede tener

múltiples sitios de unión para el mismo o diferentes miRNAs, lo que permite una regulación compleja de la expresión génica⁴⁴⁹.

La interacción de los miRNAs con sus genes diana es dinámica y depende de muchos factores, como la localización subcelular de los miRNAs, la abundancia de miRNAs y mRNAs diana, y la afinidad de las interacciones miRNA-RNA. Por ejemplo, miRISC y el RNA objetivo pueden localizarse en múltiples compartimentos subcelulares, incluidos el retículo endoplásmico rugoso (rER)⁴⁹⁷, los cuerpos de procesamiento (P)⁴⁹⁸, los gránulos de estrés (SG)⁴⁹⁹, la red trans-Golgi (TGN), los endosomas tempranos / tardíos⁵⁰⁰, los cuerpos multivesiculares (MVB)⁵⁰¹, los lisosomas⁵⁰¹, las mitocondrias^{502,503} y el núcleo^{504,505}. Finalmente, los componentes que facilitan la regulación génica post-transcripcional del miRNA se enriquecen en los sitios donde se localizan los complejos miRISC-mRNA⁴⁹⁸.

1.5.5. miRNAs extracelulares

Los miRNAs pueden ser liberados desde las células que los producen en fluidos extracelulares y ser así utilizados como biomarcadores para una variedad de enfermedades⁵⁰⁶⁻⁵⁰⁸. Así, se han detectado cantidades sustanciales de miRNA fuera de la célula en prácticamente todos los fluidos corporales conocidos, incluidos plasma y suero^{509,510}, líquido cefalorraquídeo⁵¹¹, saliva⁵¹², leche materna⁵¹³, orina o lágrimas, entre otros. Contrariamente a las especies de RNA celular, los miRNAs extracelulares son altamente estables, debido a la asociación con varios portadores, resistiendo la degradación a temperatura ambiente durante hasta 4 días y en condiciones perjudiciales como ebullición, múltiples ciclos de congelación-descongelación y fluctuaciones significativas de pH^{509,514}.

Existen dos tipos de poblaciones de miRNAs extracelulares en fluidos biológicos. Uno se puede encontrar en vesículas como exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos^{512,515}, mientras que el otro está asociado con proteínas, especialmente AGO2^{512,516}. Principalmente, se ha demostrado que varias vesículas extracelulares (EV) sirven como portadoras de miRNA circulante. De hecho, casi todos los tipos de células forman y excretan varios tipos de vehículos, incluidas las microvesículas (vesículas de desprendimiento) y los exosomas y en el espacio extracelular se han encontrado cuerpos apoptóticos que también contienen miRNAs⁵¹⁷. También se han encontrado miRNAs extracelulares en las fracciones de partículas de lipoproteínas de alta densidad (HDL)⁵²³ o unidos a nucleofosmina 1 (NOM1), así como miRNA extracelular flotando libremente con proteínas AGO^{516,519} (**Figura 32**).

Según algunos estudios, la mayoría de los miRNAs extracelulares no están asociados con exosomas/microvesículas, sino que están unidos a AGO2^{516,519}. Sin embargo, otro estudio informó que los miRNAs extracelulares están presentes predominantemente en exosomas en suero humano y saliva⁵¹². Dado que estos estudios solo midieron un determinado miRNA en unas pocas muestras de plasma, es posible que la existencia de miRNA predominantemente exosómico o libres de vesículas dependa del propio miRNA, del tipo de célula del que se originan y/u otros factores que afecten la secreción de miRNA en individuos.

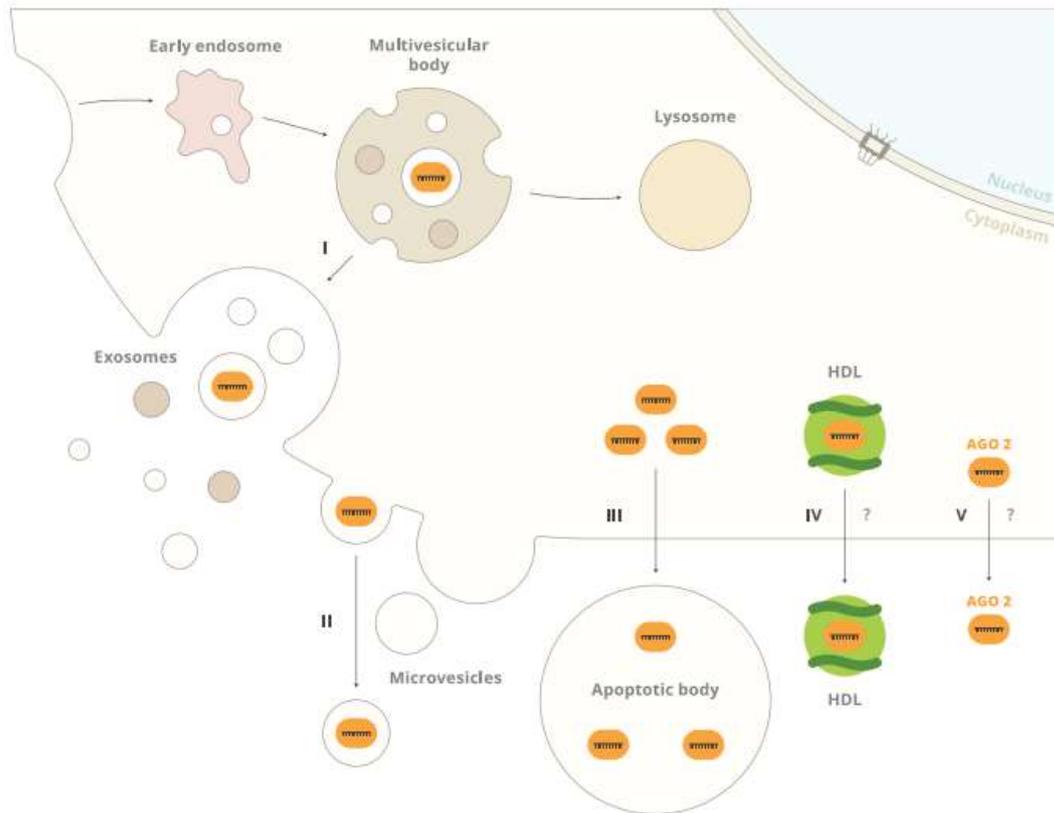


Figura 32. Vías de secreción de miRNA. El miRNA puede ser secretado por varios tipos de vesículas extracelulares. Los exosomas se forman por invaginaciones de membranas de endosomas tempranos y MVB. MVB se fusiona con lisosomas o membrana plasmática. Este último evento conduce a la liberación de exosomas (i). Las microvesículas se forman al brotar directamente de la superficie de la membrana plasmática (ii), y los cuerpos cetónicos se forman como resultado de la muerte celular (iii). Los mecanismos de HDL incorporados a la secreción de miARN (iv) y los complejos AGO-miRNA (v) que flotan libremente siguen sin estar claros. Sin embargo, los complejos AGO-miRNA libres pueden liberarse de forma no específica después del daño celular⁴⁹⁶.

En general, se cree que la presencia de miARN en vesículas o con proteínas acompañantes protege los miARN extracelulares y aumenta su estabilidad en el medio extracelular⁵¹⁹⁻⁵²¹. Aunque algunos miRNAs extracelulares son considerados como subproductos de actividades celulares, como lesiones celulares o muerte⁵²¹, la creciente evidencia sugiere que la liberación de miRNAs extracelulares es un proceso regulado⁵²²⁻⁵²⁵.

Los miRNAs extracelulares pueden ser entregados a las células diana y actuar como reguladores autocrinos, paracrinos y/o endocrinos para modular las actividades celulares⁵²⁶⁻⁵²⁸. Por ejemplo, exosomas procedentes de células de cáncer de mama metastásico que contienen altos niveles de miR-105, regulaban la expresión de la proteína ZO-1 en células endoteliales, resultando en la destrucción de la barrera endotelial y promoviendo la metástasis⁵²⁹. Además, los exosomas de la sangre del cordón umbilical parecen estar enriquecidos en miR-21-3p, lo que promueve la proliferación y migración de fibroblastos, así como las actividades angiogénicas de las células endoteliales, lo que llevó a la cicatrización acelerada de heridas⁵³⁰. Por otra parte, miR342-3p y miR-1246, secretados a partir de una línea celular de cáncer oral humano altamente metastásica, inducen metástasis en una línea celular de cáncer poco metastásica⁵³¹. Además, los miRNAs extracelulares se unen a receptores tipo Toll⁵³², activan eventos de señalización aguas

abajo y, finalmente, conducen a respuestas biológicas, como el crecimiento tumoral, la metástasis⁵³³ y la neurodegeneración⁵³⁴.

Por otro lado, aún no se conocen bien los mecanismos de absorción extracelular de los miRNAs. Se ha propuesto que los miRNAs extracelulares asociados a vesículas pueden ingresar a las células por endocitosis, fagocitosis o fusión directa con las membranas plasmáticas, mientras que los miRNAs secretados libres de vesículas pueden ser absorbidos por receptores específicos en la superficie celular⁵³⁵. De hecho, varios estudios han demostrado que los miRNAs entran en las células receptoras por endocitosis y micropinocitosis^{536,537}. Si bien estos estudios sugieren que los miRNAs extracelulares pueden interactuar con las células receptoras a través de múltiples mecanismos, los factores que determinan la especificidad de tales interacciones deben ser investigados.

1.5.6. MiRNAs extracelulares como biomarcadores de enfermedades

Como ya se ha comentado, los miRNAs regulan multitud de funciones fisiológicas y patológicas y, los niveles de expresión desregulados de los miRNAs circulantes, están asociados con la expresión alterada de miRNAs en las células. Por todo ello, los miRNAs constituyen novedosos biomarcadores no invasivos de diagnóstico, pronóstico y respuesta al tratamiento para distintas enfermedades porque son altamente estables y fácilmente detectables y cuantificables⁵³⁸, aunque estén en pequeñas cantidades, en sangre y otros fluidos.

De hecho, miRNAs han sido o están siendo evaluados en estudios preclínicos o ensayos clínicos en enfermedades como el cáncer⁴⁵²⁻⁴⁵⁵, el Alzheimer, enfermedades cardiovasculares⁴⁵⁸⁻⁴⁶¹, hepáticas, diabetes⁴⁶² o la enfermedad inflamatoria⁴⁶⁵. Estos se podrían introducir en la clínica de manera rutinaria, para aumentar la sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas y pronósticas, lo que ofrecería nuevas oportunidades para mejores tratamientos personalizados⁴⁵⁵.

Esta nueva clase de moléculas posee una serie de ventajas que podrían convertirlas en candidatos ideales para biomarcadores en una variedad de afecciones, ya que un biomarcador ideal debe ser de fácil acceso, una condición que se aplica a los miRNAs, que se pueden extraer fácilmente a través de biopsias líquidas de sangre, orina y otros fluidos corporales. También tienen una alta especificidad para el tejido o tipo de procedencia celular y varían según la progresión de la enfermedad, siendo utilizados en varios estudios para la diferenciación de las etapas de distintas enfermedades como el cáncer⁵³⁹ e incluso para la medición de la capacidad de respuesta de la terapia⁵⁴⁰. Además, las tecnologías para la detección de ácidos nucleicos ya existen y el desarrollo de nuevos ensayos requiere menos tiempo y menores costes en comparación con la producción de nuevos anticuerpos para biomarcadores de proteínas. Si bien la ejecución de muchos marcadores de proteínas puede ser costosa y llevar mucho tiempo, el uso de paneles multimarcador compuestos por numerosos miRNAs puede proporcionar un método no invasivo para el diagnóstico y la predicción de la progresión de la enfermedad. Por ejemplo, la identificación de la firma de miRNA urinario de la nefritis lúpica ha promovido la detección temprana de la fibrosis renal⁵⁴¹. Del mismo modo, por ejemplo, se ha descrito un panel multimarcador de nueve miRNA para el carcinoma de mama que parece mejorar significativamente la fiabilidad del diagnóstico de este cáncer⁵⁴².

1.5.7. Mirnas como biomarcadores en enfermedades patogénicas

Los miRNAs también tienen el potencial de servir como biomarcadores de infección con bacterias, parásitos, virus e incluso priones⁵⁴³.

Actualmente, estos se han perfilado como biomarcadores potenciales en enfermedades infecciosas como el VIH⁵⁴⁴, tuberculosis⁵⁴⁵, malaria⁵⁴⁶ o Ébola⁵⁴⁷. Además, los miRNAs séricos circulantes se han utilizado para distinguir la tuberculosis latente y activa, para generar firmas pronósticas tempranas de sepsis y como biomarcadores de la gravedad de la enfermedad en la hepatitis viral causada por el virus de la hepatitis B y C^{548,549}.

En infecciones virales, tanto los miRNAs codificados por el virus como por la célula huésped, pueden regular la expresión de objetivos genéticos relacionados con la inmunidad a través de complejas redes de interacciones virus-célula huésped⁵⁵⁰, la evasión inmune, la replicación viral o la traducción del genoma viral^{551,552} (Tabla 6).

Tabla 6. Papel de distintos miRNAs en infecciones virales⁵⁵³.

Virus	miRNA	Function
James Canyon Virus (JCV)	miRNA J1 (Viral)	Downregulates early gene expression
Human Papillomavirus (HPV)	miRNA 203 (Cellular)	Downregulates expression of p63
SARS	miRNA 17 and miRNA 214 (Cellular)	Facilitates gene replication and helps in immune invasion
Herpes Simplex Virus (HSV)	miRNA LAT (Viral)	Anti-apoptotic role
Hepatitis C Virus (HCV)	miRNA 122 (Cellular)	Enhances viral replication
Human Immunodeficiency Virus (HIV)	miRNA N367 (Viral)	Reduces LTR transcription
Human Cytomegalovirus (HCMV)	miRNA UL23 (Viral)	Immunomodulation
Simian Virus 40 (SV 40)	miRNA S1 (Viral)	Downregulates early gene expression
Influenza	miRNA 507 (Cellular)	Helps adapting influenza A1 (Avian Influenza) to mammalian cells/species <i>via</i> targeting PB2
BK Virus (BKV)	miRNA B1 (Viral)	Downregulates early gene expression

Por otra parte, la expresión de miRNAs humanos está sustancialmente desregulada en muchas, si no en todas, las infecciones y enfermedades virales crónicas⁵⁵⁴. Una predicción de secuencias complementarias mediante herramientas bioinformáticas sugirió que pueden tener efectos antivirales potenciales contra más de 200 virus humanos, de los que 62 eran virus de ARN monocatenario⁵⁵⁵. Además, los miRNAs pueden influir en la replicación del virus y la expresión génica, así como en la latencia o la tumorigénesis, que se puede lograr mediante la expresión de ortólogos funcionales celulares de miRNAs virales, como se ha demostrado para algunos herpesvirus⁵⁵⁶. Esto plantea si los miRNAs del huésped evolucionaron para combatir las infecciones virales o si los virus, que evolucionan más rápido, lo hicieron para imitar los específicos del huésped⁵⁵⁶.

La respuesta antiviral por parte de los miRNAs del huésped puede implicar la regulación de sus dianas de ARNm, que pueden ser componentes de vías de señalización que participan en la respuesta celular desencadenada por la infección viral, como WNT, INF, PIK3/AKT, MAPK y NOTCH⁵⁵⁷. Además, otros mecanismos, entre ellos la "evasión" de los miRNAs celulares, y los defectos en la biogénesis del miRNA, pueden favorecer la replicación viral y la supervivencia del virus en las células huésped⁵⁵⁸.

Por otro lado, muchos virus codifican sus propios miRNAs⁵⁵⁹ y, tanto las secuencias virales codificantes como las no codificantes albergan genes de estas moléculas, que es una forma eficiente de empaquetar la capacidad reguladora en genomas virales que a menudo tienen un tamaño pequeño y una capacidad de codificación limitada. Por lo tanto, los virus pueden ampliar eficientemente sus posibilidades de regular la expresión de sus propios genes, así como de los genes del huésped, mediante la codificación de miRNAs. Los miRNAs virales pueden manipular eficientemente la expresión del gen del huésped, ya que pueden regular una serie de ARNm objetivos, y es menos probable que sean reconocidos por el sistema inmune del huésped que las proteínas virales⁵⁶⁰. Así, las funciones conocidas de estos incluyen la regulación de la

persistencia o latencia viral y la reactivación, la proliferación y la supervivencia a largo plazo de las células huésped a pesar de la presencia del virus, y la evasión inmune del huésped que contribuye al establecimiento de la infección. Además, los miRNAs virales también pueden regular la expresión de genes codificantes de proteínas virales⁵⁶⁰, facilitando así la modulación y evasión inmune mediante la orientación directa de genes pro-apoptóticos y el control de la latencia viral, que apoyan el establecimiento de la persistencia viral⁵⁶¹.

La identificación de marcadores del estado inmunológico individual o de las respuestas inmunes del huésped a los patógenos abriría un nuevo campo de aplicaciones para los diagnósticos y terapias basados en miRNAs. Como ejemplo, el miR-155, que es un modulador clave de las respuestas de las células T y parece desempeñar un papel central en la respuesta inmune a muchas infecciones virales y bacterianas⁵⁶²⁻⁵⁶⁴.

Por todo ello, el potencial de los miRNAs en las enfermedades infecciosas, entre ellas las virales, hace que muchas mejoras sean concebibles, incluida la detección temprana, la identificación de patógenos, la detección de infecciones latentes, la medición de la eficacia del tratamiento, la predicción de los resultados de la enfermedad y respuesta del huésped, y la orientación de la selección terapéutica óptima, así como el diagnóstico complementario⁵⁶⁵, aunque aún se han establecido pocos en la práctica diagnóstica en la actualidad.

1.5.8. miRNAs y la COVID-19

Desgraciadamente, entre 20 y el 30% de los pacientes hospitalizados con COVID-19 desarrollan un fenotipo grave de la enfermedad que requiere ingreso en la unidad de cuidados intensivos (UCI) con una tasa de mortalidad variable en la UCI que oscila entre el 25- 50%^{566,567}. En este escenario, existe una demanda urgente de herramientas confiables para definir el estado del paciente y predecir los resultados clínicos, pero también para definir la susceptibilidad de sufrir la COVID-19 grave frente a la asintomática o leve, más allá de las comorbilidades descritas en la literatura.

De hecho, aunque el modelado de riesgos basado en características clínicas y/o biomarcadores ha logrado un progreso notable, la predicción temprana del deterioro del estado vital sigue siendo un desafío para los médicos⁵⁶⁸. Además, la mayoría de los estudios de COVID-19 se han centrado en biomarcadores proteómicos, metabolómicos y celulares^{569,570} por lo que la investigación de indicadores clínicos alternativos, incluidos los basados en miRNAs, puede arrojar luz sobre el desarrollo de nuevas herramientas para el manejo de COVID-19 y la susceptibilidad de la versión grave de la COVID-19.

Así, desde el inicio de la pandemia, el uso de herramientas bioinformáticas ha permitido analizar el genoma del SARS-CoV-2 y detectar tanto posibles miRNAs virales⁵⁷¹⁻⁵⁷⁴, como los posibles miRNAs humanos que pudieran dirigirse al genoma viral⁵⁷⁵⁻⁵⁸⁵ y miRNAs humanos que pudieran regular la expresión de las proteínas del huésped implicadas en los distintos pasos del ciclo del virus^{571,572,577,578,580,583-588}. Es el caso de estudios centrados en predecir miRNAs que potencialmente regulan su expresión génica de ACE2 y la TMPRSS2⁵⁸⁹⁻⁵⁹⁴.

Actualmente, se han realizado estudios que han analizado la expresión de miRNAs humanos en cultivos de líneas celulares^{577,595,596} y también en muestras biológicas de pacientes COVID-19^{591,597-599}.

Algunos autores han propuesto que los coronavirus patógenos podrían modular los niveles de miRNA del huésped actuando como "esponjas de miRNAs" para facilitar la replicación viral y / o evitar respuestas inmunes" ⁶⁰⁰. Otros estudios adicionales posteriores apuntaron en la misma dirección^{550,601}.

Además, un estudio reciente ha analizado el potencial uso de un panel de miRNAs circulantes previamente asociados o propuestos como biomarcadores de mecanismos moleculares vinculados a la enfermedad como panel de miRNAs para predecir la mortalidad en la UCI con muestras de sangre de pacientes hospitalizados⁶⁰². Este trabajo encontró que la COVID-19 grave induce cambios moleculares característicos en el perfil de miRNA circulante, destacando dos miRNAs particulares como predictores relevantes del resultado del paciente en la fase clínicamente grave⁶⁰².

Actualmente, se está trabajando para ver si las moléculas de miRNA que se dirigen a ACE2 se pueden usar para regular el receptor del SARS-CoV-2 en tipos de tejidos específicos que son susceptibles a la patología de la enfermedad⁵⁵³.

1.5.9. Terapias basadas en MiRNA

Los miRNAs por sus funciones se convierten en objetivos terapéuticos potenciales⁶⁰³ y la manipulación de su expresión se utiliza como nueva estrategia de tratamiento clínico.

Aunque las vacunas y las terapias contra la COVID-19 aprobadas, como fármacos y anticuerpos monoclonales han sido prometedoras en el manejo inicial de la enfermedad, se necesitan más y nuevas terapias como las basadas en miRNAs, que accedan al interior de la célula para interferir en la expresión genes codificantes de proteínas implicadas en el ciclo de infección del SARS-CoV-2.

Existen numerosos ensayos preclínicos y clínicos en curso basados en miRNAs contra varias enfermedades como el cáncer, trastornos pulmonares, cardíacos, circulatorios, renales, fibrosis cardíaca, Esclerosis Lateral Amiotrófica, virus de la Hepatitis C, etc.)⁴⁶⁶ (Tabla 7).

Tabla 7. Principales terapias basadas en miRNAs en fase de desarrollo (2020)⁴⁶⁶.

Therapeutic molecule	Disease	Target miRNA	Biotechnology or Biopharmaceutical Company	Stage of Development (Clinical trial/preclinical trial)
Miravirsin(SPC3649)	For the treatment of hepatitis C virus (HCV) infection	miR-122	SantarisPharma	Phase II clinical trials
MRX34	For the treatment of different types of cancers	miR-34a	miRNATherapeutics	Phase I clinical trial
RG-101	For the treatment viral effect	miR-122	Regulus Therapeutics	Phase IB clinical trial
RG-012	To prevent alport nephropathy	miRNA-21	Regulus therapeutics (with the strategic alliance with Genzyme)	Preclinical stage
RGLS4326	For the treatment of Polycystic kidney disease (PKD)	miR-17	Regulus Therapeutics	Phase I clinical study
MGN-1374	For the treatment of post-myocardial infarction	miRNA-15 and miR-195	miRagen therapeutics	Preclinical stage
MGN-2677	For the treatment of vascular disease	miR-143/145	miRagen therapeutics	Preclinical stage
MGN-4220	For the treatment of cardiac fibrosis	miR-29	miRagen therapeutics	Preclinical stage
MGN-4893	For the treatment of disorders like abnormal red blood cell production	miR-451	miRagen therapeutics.	Preclinical stage
MGN-5804	For the treatment of cardiometabolic disease	miR-378	miRagen therapeutics	Preclinical stage
MGN-6114	For the treatment of peripheral arterial disease	miR-92	miRagen therapeutics	Preclinical stage
MGN-9103	For the treatment of chronic heart failure	miR-208	miRagen therapeutics	Preclinical stage
Cobomarsen (MRG-106)	For the treatment of cutaneous T-cell lymphoma (CTCL)	miR-155	miRagen therapeutics	Phase-I clinical trial
MRG-107	For the treatment of amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	miR-155	miRagen therapeutics	Completed preclinical trial and entering in clinical trial
MRG-110	Target blood vessel growth and to control ischemia	miR-92a	miRagen therapeutics	Phase-I clinical trial
Reclarsen (MRG-201)	For the treatment of different type of fibrosis such as cutaneous fibrosis, idiopathic pulmonary fibrosis etc.	miR-29	miRagen therapeutics	Phase-I clinical trial (for idiopathic pulmonary fibrosis and other fibrosis)

Las terapias basadas en miRNAs consisten en la administración de imitaciones de miRNAs (mimics miRNAs) para suprimir la traducción del RNAm objetivo, así como la administración de anti-miRNAs, para suprimir la función de bloqueo o degradación del RNAm objetivo y permitir la traducción de este.

Sistemas de administración.

Los principales problemas con la investigación de terapias virales basadas en miRNA son los sistemas de administración de miRNAs a las células / tejidos diana específicos, dado que un miRNA en particular puede controlar simultáneamente múltiples genes diana y funcionar de manera diferencial en varios tipos de células, se pueden generar efectos inesperados fuera del objetivo de la terapia y deben considerarse en el desarrollo terapéutico, la vida media (ya que los miRNAs son altamente inestables) y la toxicidad asociada con los vehículos de administración convencionales.

La modificación química simple puede servir como un medio para mejorar la estabilidad de los miRNAs, pero puede no proporcionar traducción *in vivo* y clínica. Por otro lado, varios vectores virales (vectores adenovirales, retrovirales y lentivirales) se han aplicado ampliamente con fines preclínicos y clínicos. Sin embargo, su pobre eficacia de carga de miRNA, toxicidad fuera del objetivo e inmunogenicidad dificultan significativamente su uso. Por lo tanto, el desarrollo de vectores de entrega no virales se considera una opción adecuada para la administración efectiva de microARN⁶⁰⁴.

Por otro lado, el uso de nanopartículas aborda estos obstáculos relacionados con la terapéutica de miRNA^{605,606}. La nanoterapéutica es una de las plataformas más favorables para entregar efectivamente los miRNAs a las células huésped pertenecientes a su pequeño tamaño y bajo peso molecular. Se han sugerido varios portadores de nanopartículas para la entrega exitosa de miRNA, principalmente nanopartículas inorgánicas, partículas poliméricas, nanopartículas lipídicas y otras⁶⁰⁷. Entre todos estos sistemas de administración no virales, los portadores basados en lípidos (miRNAs complejados o encapsulados dentro de la superficie similar a la membrana del lipoplex / liposoma) son la categoría ampliamente empleada. Actualmente, este tipo de formulaciones (lipofectamina, SiPORT y DharmaFECT)^{604,608} ya se están utilizando para aplicaciones *in vitro* e *in vivo*.

Los sistemas de administración basados en polímeros, como PEI, PLGA u otros portadores biodegradables basados en polímeros, no solo ofrecen biocompatibilidad, sino también una toxicidad mínima y una entrega eficiente. Los núcleos de nanopartículas protegen el miRNA desnudo de su degradación, por lo tanto, proporcionan una circulación mejorada en el sistema. Además, debido al rango de tamaño nanométrico de los nanoportadores, se logra la entrega dirigida de miRNAs⁶⁰⁹.

Un concepto relativamente nuevo de usar exosomas o vesículas endosómicas sintéticas como vehículos de entrega, también es otra opción para administrar con éxito miRNAs⁶¹⁰.

Por tanto, la terapéutica basada en miRNA ha confirmado que podrían ser los medicamentos de próxima generación para la cura de diversas enfermedades. Actualmente, varias compañías farmacéuticas están involucradas en el desarrollo de miRNAs terapéuticos y nuevos sistemas de administración para la entrega de miRNAs al sitio objetivo. Al ser capaces de llevar a cabo una regulación específica de la expresión de genes, los miRNAs terapéuticos son la opción perfecta para futuros medicamentos.⁴⁶⁶

Por todo ello, en este estudio hemos llevado a cabo una selección de varios miRNAs que han sido predichos, en estudios científicos previos basados en las herramientas de la bioinformática, que tienen como objetivo los RNAm de tres proteínas claves de la célula humana en el ciclo de vida del SARS-CoV-2 (3 miRNAs que tienen como objetivo el RNAm de la ACE2, proteína de la membrana celular que sirve de reconocimiento y acceso del SARS-CoV-2 a la célula humana, otros 3 cuyo objetivo es el de la TMPRSS2, proteasa de membrana que posibilita la fusión de la membrana celular y viral para la entrada del virus y un último miRNA, identificado como tendría como objetivo el RNAm de la proteína RAB 14, involucrada en el tráfico celular de vesículas en la vía Trans-Golgi, para determinar su presencia y cuantificar sus niveles en sangre periférica en pacientes de COVID-19 graves hospitalizados y compararlos con los niveles de estos miRNAs en pacientes asintomáticos o con COVID-19 leve y sujetos sanos, a fin de establecer si constituyen biomarcadores de pronóstico de la gravedad de la enfermedad, proporcionando nuevas herramientas para el manejo de la COVID-19, así como posibles dianas terapéuticas de terapias anti-miRNAs o mimics-miRNAs.

2. HIPÓTESIS

Dada la relevancia de la pandemia actual debida a la infección por SARS-CoV-Cov-2, resulta imprescindible ahondar en los mecanismos de acción de este virus, así como identificar posibles dianas terapéuticas para frenar los síntomas asociados. En este sentido, teniendo en cuenta el papel de los miRNAs como potenciales biomarcadores en diferentes patologías, en el presente trabajo se hipotetiza que determinados miRNAs reguladores de la expresión de proteínas humanas clave en el ciclo de vida del SARS-COV-CoV-2, pueden servir como biomarcadores de gravedad de la COVID-19.

3. OBJETIVOS

El objetivo general de este estudio es evaluar los niveles de expresión de varios miRNAs asociados directa o indirectamente a proteínas implicadas en la infección y replicación del virus, en el suero de individuos asintomáticos y pacientes críticos infectados por SARS-COV-CoV-2. Dichos miRNA podrían emplearse como biomarcadores de la gravedad de la enfermedad.

Así mismo, se pretende aportar información sobre los genes diana cuya expresión está regulada por dichos miRNAs y la participación de las proteínas humanas que codifican en el ciclo de vida y la patogénesis del SARS-COV-CoV-2; y sobre los procesos biológicos que subyacen en la infección por este virus.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Análisis bioinformático para predecir miRNAs que se dirigen a ACE2, TMPRSS2 y RAB14.

Para realizar la predicción de los miRNAs y sus genes objetivo se utilizaron las bases de datos *miRDB*⁶¹¹ (<http://mirdb.org/>) y *TargetScan*⁶¹² (<http://www.targetscan.org>) y la imagen de red se obtuvo utilizando la herramienta *miRNet*⁶¹³ (<https://www.mirnet.ca>). El análisis utilizando estas herramientas se realizó utilizando los parámetros predeterminados y seleccionando el parámetro *Homo sapiens*. Los genes diana compartidos de los miRNAs predichos se analizaron con la *Herramienta de Búsqueda para la Recuperación de Genes Interactuantes (STRING)*⁶¹⁴ (<https://string-db.org>) para determinar las redes funcionales de asociación de proteínas y la imagen de red miRNA-gen se realizó con el software *Flourish* (<https://flourish.studio>). El *StarMir*⁶¹⁵ (<https://sfold.wadsworth.org/cgi-bin/starmir.pl>) se utilizó para la predicción de sitios de unión de miRNA a sitios de unión a la 3'UTR del RNAm.

4.2 Población de estudio.

El estudio se realizó en pleno cumplimiento de la Declaración de Helsinki. El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Ética de cada centro hospitalario. Los participantes, o sus representantes legales, dieron su consentimiento informado.

Para la realización del estudio se reclutaron un total de 49 sujetos que se dividieron en tres grupos:

- Sujetos sanos con prueba PCR de hisopo nasofaríngeo negativo para SARS-CoV-2 y test de anticuerpos (IgG e IgM) realizados con kits ELISA específicos (*Erba Mannheim*) frente a SARS-CoV-2 negativo (n= 16) que fueron reclutados durante la primera ola pandémica en España (marzo-abril de 2020) entre voluntarios del personal sanitario del Hospital Nacional de Paraplégicos de Toledo. Este grupo se estableció como grupo control.
- Sujetos infectados con prueba PCR de hisopo nasofaríngeo negativo para SARS-CoV-2 y test de anticuerpos (IgG) realizados con kits ELISA específicos (*Erba Mannheim*) frente a SARS-CoV-2 positivo (n= 16) que fueron reclutados durante la primera ola pandémica en España (marzo-abril de 2020) entre voluntarios del personal sanitario del Hospital Nacional de Paraplégicos de Toledo. Este grupo se estableció como donantes asintomáticos.
- Pacientes en estado grave que requirieron hospitalización, con PCR de hisopo nasofaríngeo positiva frente a SARS-COV-Cov-2, ingresados en el Hospital Militar Vigil de Quiñones (Sevilla) (n=6) y en el Hospital Universitario Puerta del Mar (Cádiz) (n=11) y que se reclutaron en el momento de la hospitalización durante los meses de mayo y junio de 2021. Este grupo se estableció como pacientes graves.

Los tres grupos, están formados por hombres y mujeres con edades comprendidas entre 36 y 68 años.

4.3 Colección de suero.

Se recogieron muestras de sangre periférica de los pacientes en tubos separadores séricos (SST™ II advance, BD Vacutainer®). La sangre se mezcló hacia arriba y hacia abajo de 8 a 10 veces. Después de eso, los tubos SST se incubaron a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos para garantizar la separación del suero de los componentes celulares, y el suero se recolectó por centrifugación (2000 g durante 10 min a 4 °C). La fracción de suero fue alicuotada en crioviales identificando los tubos con códigos para garantizar el anonimato de los donantes y estos fueron enviados en hielo seco hasta los laboratorios de investigación en Biomedicina de la Universidad de Cádiz, donde se almacenaron a -80 °C hasta su procesamiento.

4.4 Aislamiento de RNA.

El aislamiento del RNA total del suero, incluidos los micro, se llevó a cabo a partir de 200 µL de muestras de suero utilizando el kit de suero / plasma el *miRNeasy Serum/ Plasma Advanced Kit (Qiagen)*, siguiendo las instrucciones del fabricante y a partir de 200 µl de suero.

Para hacer el seguimiento de la calidad técnica del aislamiento de ARN se añadió a cada muestra de suero el kit de RNA Spike In *UniSp2* (2 fmol), *UniSp4* (0.02 fmol), *UniSp5* (0.00002 fmol) de *RNA Spike-in Mix de RNA Spike-in Kit (Qiagen)* para hacer el seguimiento del aislamiento de RNA y *RNA portador de MS2 (Merck)*, para mejorar el rendimiento de RNA extracelular. El RNA obtenido fue inmediatamente sometido a proceso de transcripción inversa

4.5 Reacción de transcriptasa inversa

Para la síntesis de cDNAs a partir de los miRNAs aislados, se utilizaron 2 µL de la solución de RNA aislado junto con *UniSp6 RNA spike-in*, de *RNA Spike-in Kit (Qiagen)* (0,075 fmol) en combinación con *cel-miR-39-3p* sintético de *Caenorhabditis elegans* (0,001 fmol), que carece de homología de secuencia a los miRNAs humanos, como miRNA de referencia externa, como controles positivos de la síntesis de cDNA que se agregaron al tubo de reacción para componer un volumen final de 10 µl de mezcla de reacción.

Dado que la cantidad total de ARN que está presente en el plasma es baja y la concentración de ARN no se puede determinar con precisión en las muestras de plasma, la cantidad de ARN de entrada para el análisis posterior se basó en el volumen inicial en lugar de la cantidad de ARN. Se utilizó una cantidad de entrada consistente para todas las muestras.

La retrotranscripción de mediante el kit comercial *miRCURY® LNA® Reverse Transcription Kit (Qiagen)*, según las indicaciones del fabricante (**Tabla 8**).

Tabla 8. Preparación de la RT-PCR por reacción.

Reactivo	Volumen por reacción
Tampón de reacción 5x	2 µl
Mezcla enzimática 10x	1 µl
UniSp6 RNA spike-in	0,5 µl
Agua libre de RNAsas	4.5 µl
Muestra RNA	2 µl
Volumen total de reacción	10 µl

La RT-PCR se llevó a cabo en el equipo *C1000 Touch Thermo Cycler (BioRad)*, siguiendo el protocolo descrito por el fabricante (**Tabla 9**).

Tabla 9. Reacción de la RT-PCR.

Temperatura	Tiempo	Descripción
42 °C	60 min	Reverso-Transcripción
95 °C	5 min	Inactivación Retro-Transcriptasa
4°C	∞	Mantenimiento

El cDNA obtenido fue inmediatamente almacenado a -20°C hasta su procesamiento.

4.6. Análisis de los niveles de expresión de miRNAs.

La cuantificación de los niveles de los miRNAs fue realizada en una reacción de un volumen final de 10µL, de acuerdo con el protocolo *miRCURY LNA SYBR® Green PCR Kit (Qiagen)* para la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR). (**Tabla 9**).

Las qPCRs fueron llevadas a cabo usando placas de 96 pocillos personalizadas *miRCURY LNA miRNA Serum/Plasma Focus PCR Panel (Qiagen)*, para los miRNAs seleccionados (**Tabla 10**) por duplicado. Para tener en cuenta la variabilidad entre placas, se utilizó el calibrador interplacas *UniSp3* y control de la qPCR.

Tabla 10. Preparación de la qPCR por reacción

Reactivo	Volumen por reacción
Mezcla maestra <i>miRCURY SYBR Green 2x</i>	5 µl
Agua libre de RNAsas	1 µl
Muestra cDNA 1:40	4 µl
Volumen total de reacción	10 µl

Para llevar a cabo la qPCR se utilizó el equipo *CFX Connect™ Real-Time System (Bio-Rad)*, siguiendo los parámetros especificados por el fabricante del kit (**Tabla 11**).

Tabla 11. Reacción de la qPCR

Etapa	Temperatura	Tiempo	Descripción
1	95°C	2 min	
2	95°C	10 seg	Desnaturalización
3	56°C	1 min	Alineamiento y extensión
4			Lectura de fluorescencia de la placa Vuelta a etapa 2, 39 ciclos.

Las curvas de amplificación de qPCR se evaluaron con el software *CFX Manager™ (BioRad)*. La especificidad de la amplificación fue confirmada por el análisis de la curva de fusión.

El ciclo de cuantificación (Cq) se definió como el número de ciclo en el que la fluorescencia superó un umbral dado. La especificidad de la qPCR fue corroborada por el análisis de la curva de fusión. Los Cqs por encima de 35 ciclos se consideraron indetectables y se censuraron al nivel mínimo observado para cada miRNA.

Después, los niveles de expresión de cada miRNA fueron calculados mediante el método $2^{-\Delta Cq}$ 627, donde $\Delta Cq = Cq_{miRNA} - Cq_{miR-103a-3p}$. Los niveles de expresión normalizados se transformaron en escala logarítmica con fines estadísticos.

4.7. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software *GraphPad Prism 8.01*. Las comparaciones entre múltiples grupos se realizaron mediante el análisis unidireccional de la varianza (ANOVA), seguido de tests de rango no paramétrico de *Kruskal-Wallis*. Las diferencias se consideraron como estadísticamente significativas para un $p < 0,05$.

Se utilizaron curvas de características operativas del receptor (ROC) para caracterizar el rendimiento diagnóstico de cada uno de los miRNAs y estos de forma combinada. Las curvas ROC se generaron trazando la sensibilidad frente a la especificidad de 100, indicado el área bajo la curva (AUC) y los intervalos de confianza del 95%.

4.8. Análisis de enriquecimiento funcional

El enriquecimiento funcional de genes predichos de miRNAs expresados diferencialmente se analizó utilizando el software *FunRich* (<http://www.funrich.org/>). Las bases de datos de *GO*, *Uniprot*, *Reactome* y *FunRich* se utilizaron para identificar la función molecular (MF), el proceso biológico (BP), el componente celular (CC), la vía biológica (BPA), los dominios de proteínas (PD), los factores de transcripción (TF) y los términos fenotípicos de la sinopsis clínica.

5. RESULTADOS

5.1 Selección de los miRNAs candidatos.

Para determinar los miRNAs que regulan la expresión de *ACE2*, *TMPRSS2* y *RAB14* y que potencialmente estarían involucrados en la fisiopatología del COVID-19, en primer lugar, se llevó a cabo un análisis *in silico* utilizando diferentes predicciones de miRNAs mediante la base de datos miRDB. El resultado fue una predicción de 50 miRNAs que regulan la expresión de *ACE2*, 63 miRNAs que regulan la de *TMPRSS2* y 249 que regulan *RAB14*. De ellos, *ACE2* y *TMPRSS2* comparte 3 miRNAs, *ACE2* y *RAB14* comparten 7 miRNAs y *TMPRSS2* comparte 6 miRNAs con *RAB14* (Figura 33A).

A continuación, se revisaron las anotaciones funcionales de los miRNAs, a fin de restringir la búsqueda a aquellos con anotaciones relacionadas con el tracto respiratorio o con patologías de este. Finalmente, se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica de estudios de miRNAs, *in silico*, *in vitro* o *in vivo*, de cada uno de los 3 genes, relacionados con SARS-CoV-2 o COVID-19 y se comprobaron coincidencias con los resultados anteriores para determinar los miRNAs candidatos para el estudio. En el caso de los miRNAs que regulan la expresión de *RAB14*, no se encontró ningún estudio relacionado con este y SARS-CoV-2 o COVID-19 (Tabla 1).

Tabla 12. Referencias bibliográficas encontradas para los miRNAs seleccionados.

MIRNA	GEN	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
HSA-MIR-1246	<i>ACE2</i>	DOI: 10.1164/rccm.202003-0541OC DOI: 10.4143/crt.2018.638 DOI: 10.1080/07391102.2020.1833760 DOI: 10.1016/j.vph.2020.106680 DOI: 10.1016/j.yjmcc.2020.08.017 DOI: 10.3390/genes11091002
HSA-MIR-421	<i>ACE2</i>	DOI: 10.1159/000503020 DOI: 10.1042/CS20130420 DOI: 10.3892/ol.2020.12169 DOI: 10.2147/CMAR.S167432 DOI: 10.26355/eurrev.201905.17805 DOI: 10.2147/CMAR.S258887 DOI: 10.1016/j.prp.2019.152555 DOI: 10.1038/s41419-019-2031-1 DOI: 10.1002/jcb.28945 DOI: 10.3390/ijms21124370 DOI: 10.2147/CMAR.S248869 DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.05.056 DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-15-0161 DOI: 10.1080/07391102.2020.1833760
HSA-MIR-32-5P	<i>TMPRSS2</i>	DOI: 10.1016/j.virusres.2020.198275 DOI: 10.3390/brainsci10100666
HSA-MIR-214-3P	<i>TMPRSS2</i>	DOI: 10.1016/j.virusres.2020.198275
HSA-98-3P	<i>TMPRSS2</i>	DOI: 10.1016/j.virusres.2020.198275 DOI: 10.3390/brainsci10100666
HSA-MIR-423-3P	<i>RAB14</i>	DOI: 10.1186/s13000-019-0831-3 DOI: 10.1186/s11658-021-00247-y DOI: 10.1016/j.tube.2014.10.011

Finalmente, se seleccionaron 6 miRNAs (has-miR-32-5p, has-miR-98-3p, has-miR-214-3p, has-miR-421, has-miR-423-3p y has-miR-1246) los cuales regulan potencialmente la expresión de nuestros genes de interés (**Figura 33B**).

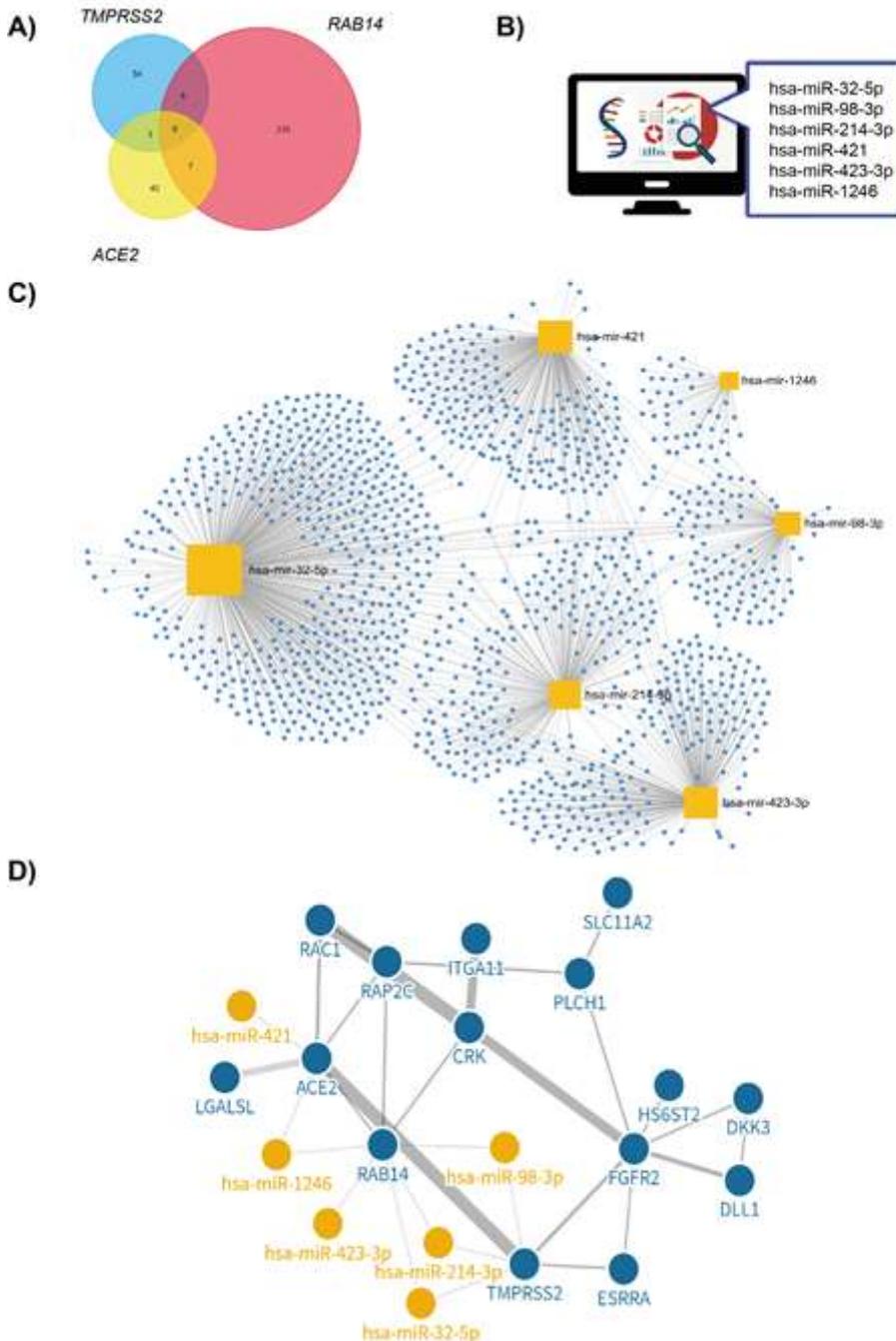


Figura 33. Selección de miRNAs. A) Diagrama de Venn donde se muestran el número de miRNAs predichos *in silico* que tienen como objetivos únicos los genes ACE2, TMPRSS y RAB14 y los comunes a varios de ellos. B) miRNAs seleccionados de la búsqueda bibliográfica para el estudio. C) Red de interacción de los genes diana de cada miRNA seleccionado en la búsqueda bibliográfica obtenida usando miRNet, D) Análisis de redes de interacción proteína-proteína (PPI) de los genes seleccionados y de interacción miRNA-proteína (MPI). En azul, las proteínas y en amarillo, los miRNAs. Las líneas grises representan el grado de interacción entre proteínas.

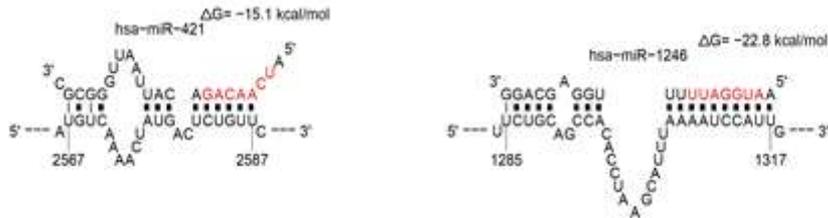
A continuación, se elaboró la red de interacción de los genes diana de cada miRNA seleccionado en la búsqueda bibliográfica obtenida usando miRNet (**Figura 33D**) y se llevó a cabo un análisis de redes de interacción proteína-proteína (PPI) de los genes seleccionados y de interacción miRNA-proteína (MPI) con STRING que mostró que los genes objetivos compartidos de nuestros miRNAs predichos interactúan entre sí ($p= 0,00318$). Además, se observó que nuestros seis candidatos a miRNA comparten la orientación de los genes *ACE2*, *TMPRSS2* y *RAB14* (**Figura 33D**).

También se analizó el número de sitios de unión de los seis miRNAs, indicando el número de sitios de todos los miRNAs en los 3'UTR de los RNAm de *ACE2*, *TMPRSS2* y *RAB14* (**Tabla 13**). Cuando hay una coincidencia de seis nucleótidos entre miRNA y la secuencia 3'UTR, puede considerarse como una región potencial de unión del miRNA (**Figura 34**)⁶²⁸. Hsa-miR-98-3p mostró el mayor número, con 6 sitios de unión en 3'UTR para el gen *TMPRSS2*, mientras que has-miR-98-3p y has-miR-423-3p presentaron el menor número de sitios de unión 3'UTR de los genes *TMPRSS2* y *RAB14*, respectivamente.

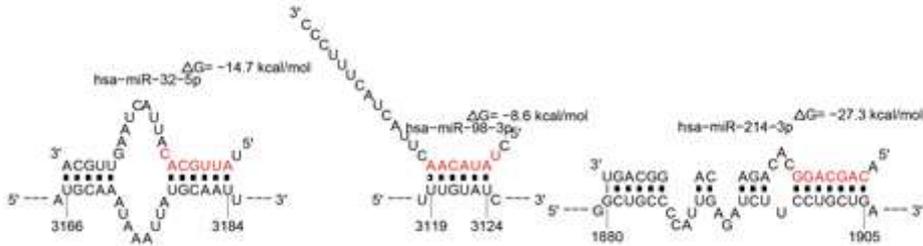
Tabla 13. Posición de sitios de unión de los miRNAs candidatos al extremo 3'UTR del RNAm.

3'UTR RNAM	MIRNA	Nº DE SITIOS DE UNIÓN	POSICIÓN EN LA SECUENCIA 3'UTR (SITIOS DE COINCIDENCIA CANÓNICA)
ACE2	hsa-miR-421	3	2567-2591, 2567-2587, 2488-2509
	hsa-miR-1246	3	1285-1317, 450-468, 2397-2433
TMPRSS2	hsa-miR-32-5p	2	3166-3184, 2898-2933
	hsa-miR-98-3p	1	3119-3124
	hsa-miR-214-3p	5	1880-1905, 1942-1962, 1770-1798, 2422-2438, 2340-2355
RAB14	hsa-miR-32-5p	2	2822-2843, 1853-1870
	hsa-miR-98-3p	6	1527-1543, 3087-3093, 1578-1583, 1941-1947, 2500-2537, 2237-2269
	hsa-miR-214-3p	6	1824-1845, 2419-2439, 2027-2056, 2719-2744, 2877-2914, 1855-1890
	hsa-miR-423-3p	1	1161-1175
	hsa-miR-1246	3	2666-2692, 3382-3407, 1423-1456

A) ACE2 binding site



B) TMPRSS2 binding site



C) RAB14 binding site

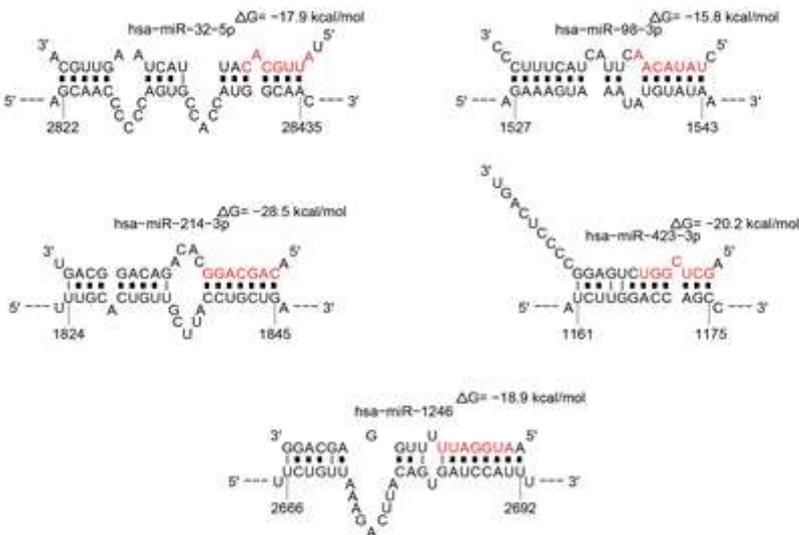


Figura 34. Predicción del sitio de unión de los miRNAs seleccionados al extremo 3'UTR del RNAm de *ACE2*, *TMPRSS2* y *RAB14* realizado con STarMiR. La secuencia en rojo denota la secuencia de unión del miRNA al RNAm. El valor ΔG denota la predicción de la fuerza de unión. (A) Sitio de unión de has-miR-421 y has-miR-1246 en 3'UTR del RNAm de *ACE2*. (B) Sitio de unión de has-miR-32-5p, has-miR-98-3p y has-miR-214-3p en 3'UTR del RNAm de *TMPRSS2*. (C) Sitio de unión de has-miR-32-5p, has-miR-98-3p, has-miR-214-3p y has-miR-1246 en 3'UTR del RNAm de *RAB14*.

5.2 Identificación de miRNAs expresados diferencialmente en pacientes graves con COVID-19

Una vez seleccionados los seis candidatos miRNAs, los niveles de expresión sérica fueron analizados por qPCR en nuestra población de estudio. El perfil de expresión de los miRNAs que fueron detectables en las muestras de suero se indica en la **Tabla 14**. Un total de cuatro miRNAs periféricos (has-miR-32-5p, has-miR-98-3p, has-miR-423-3p y has-miR-1246) se expresaron diferencialmente en nuestra población (**Figura 35**). Los niveles de expresión de has-miR-32-5p, has-miR-98-3p, has-miR-423-3p y has-miR-1246 periféricos aumentaron significativamente en pacientes graves con COVID19 en comparación con donantes sanos negativos para COVID-19 (**Figura 35A, 35C y 35D**). Además, los niveles periféricos de expresión de has-miR-32-5p y has-miR-1246 se expresaron diferencialmente en pacientes graves de COVID19 en comparación con sujetos asintomáticos IgG +COVID-19 (**Figura 35A y 35C**).

Tabla 14. Niveles sanguíneos de miRNAs en los grupos de estudio.

	CONTROLES SANOS			PACIENTES IGG+				PACIENTES GRAVES				
	Mediana	Q1	Q3	Mediana	Q1	Q3	Valor p vs sanos	Mediana	Q1	Q3	Valor p vs sanos	Valor p vs IgG+
HSA-MIR-32-5P	5.359	5.161	5.444	5.186	4.677	5.324	0.1616	5.356	5.191	5.789	>0.9999	0.0330
HSA-MIR-98-3P	3.201	2.905	3.362	3.377	3.087	3.624	0.2258	3.469	3.269	3.815	0.0254	>0.9999
HSA-MIR-214-3P	3.869	3.737	4.125	3.793	3.534	4.164	>0.999	3.756	3.525	3.926	0.8096	>0.9999
HSA-MIR-421	4.037	3.919	4.137	4.113	4.059	4.257	0.4034	4.148	4.074	4.361	0.1692	>0.9999
HSA-MIR-423-3P	4.961	4.842	5.048	5.094	5.037	5.181	0.1207	5.192	4.969	5.289	0.0048	0.7860
HSA-MIR-1246	5.343	5.155	5.583	5.361	5.121	5.605	>0.9999	6.009	5.695	6.846	0.0007	0.0005

DATOS PRESENTADOS COMO MEDIANA (Q1-Q3). COEFICIENTE SIGNIFICATIVO A P<0.05.

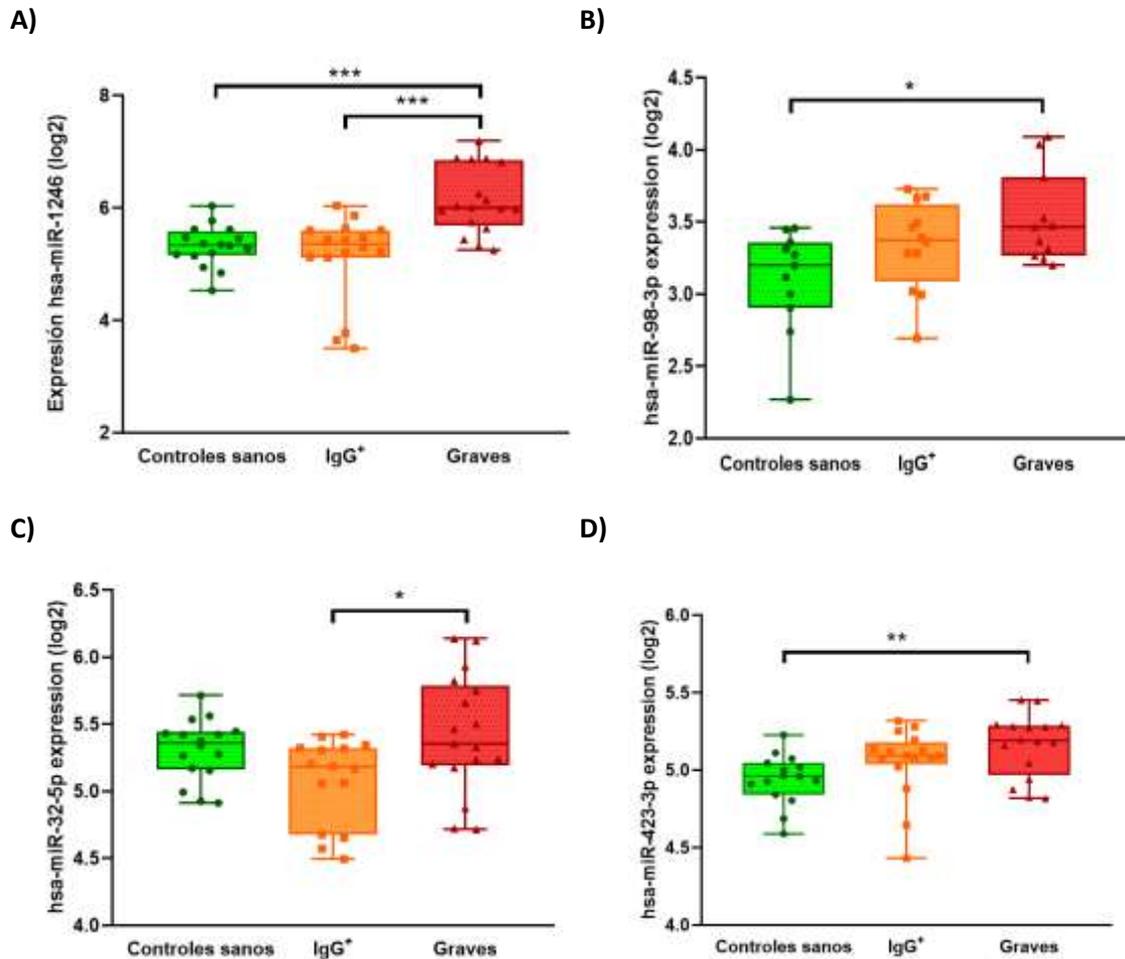


Figura 35. Niveles de expresión diferencial de los miRNAs en suero, normalizados a has-miR-103a-3p, en controles sanos, sujetos leves con IgG COVID-19 positivo y pacientes graves hospitalizados con COVID-19 (A-D). (A) hsa-miR-1246, (B) has-miR-98-3p, (C) has-miR-32-5p, (D) has-miR-423-3p. Los datos se presentan en log₂, y representan la media ± SEM. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

5.3 Potencial diagnóstico de los miRNAs séricos evaluados por análisis ROC

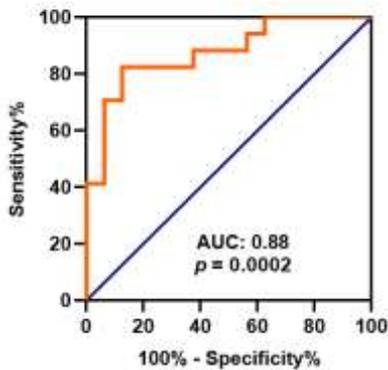
Además, para analizar el valor diagnóstico, se comparó el AUC-ROC (Área Bajo la Curva- Característica Operativa del Receptor) para los miRNAs individuales y combinados expresados diferencialmente (**Tabla 15**). Aunque los valores combinados de AUC de miRNAs fueron significativos, ninguno de ellos alcanzó un valor más alto que los miRNAs individuales. La curva ROC de has-miR-32-5p, has-miR-98-3p, has-miR-423-3p y has-miR-1246 reveló la probabilidad de que sean biomarcadores válidos para diagnosticar el COVID-19 grave frente a sujetos sanos y también frente a sujetos asintomáticos. (**Figura 36**). La mayor potencia discriminadora alcanzada por un solo miRNAs fue adquirida para has-miR-1246 con un AUC de 0,875 (IC 95%: 0,755-0,995; p = 0,0002) (**Figura 36A**).

Tabla 15. Comparaciones de miRNAs individuales como predictores de pacientes con COVID-1.

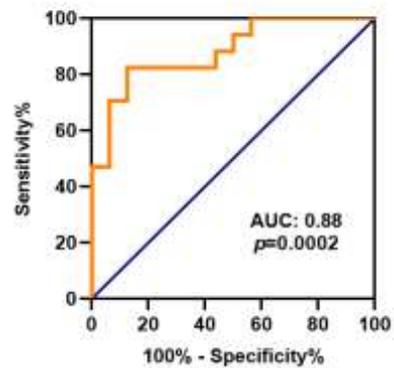
	MIRNA	AUC (95% CI)	SENSIBILIDAD (%)	ESPECIFICIDAD (%)	VALOR <i>P</i>
CONTROLES SANOS VS PACIENTES GRAVES	hsa-miR-98-3p	0.8264 (0.6538-0.9991)	72.73	63.64	0.0095
	hsa-miR-423-3p	0.7875 (0.6199-0.9551)	75.00	73.33	0.0064
	hsa-miR-1246	0.8750 (0.755-0.995)	82.35	87.50	0.0002
	hsa-miR-98-3p+ hsa-miR-423-3p+ hsa-miR-1246	0.6634 (0.5484-0.7784)	63.64	69.05	0.0091
SUJETOS IGG+ VS PACIENTES SANOS	hsa-miR-32-5p	0.7490 (0.5799-0.9181)	76.47	60.00	0.0165
	hsa-miR-1246	0.8824 (0.7681-0.9966)	82.35	87.50	0.0002
	hsa-miR-32-5p+ hsa-miR-1246	0.7913 (0.6831-0.8994)	73.53	64.52	<0.0001

A)

CURVA ROC hsa-miR-1246 controles sanos/graves

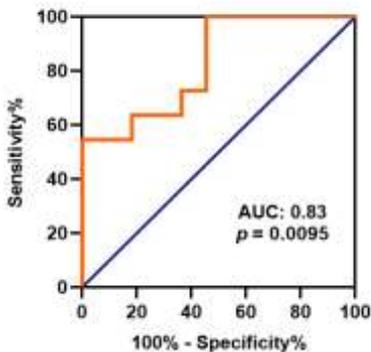


CURVA ROC hsa-miR-1246 IGG+/graves



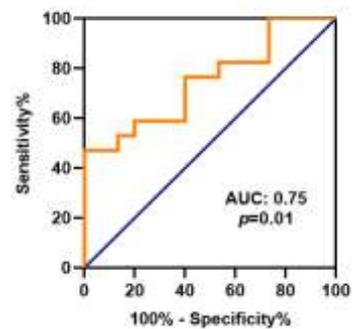
B)

CURVA ROC hsa-miR-98-3p controles sanos/graves



C)

CURVA ROC hsa-miR-32-5p IGG+/graves



D)

CURVA ROC hsa-miR-423-3p controles sanos/graves

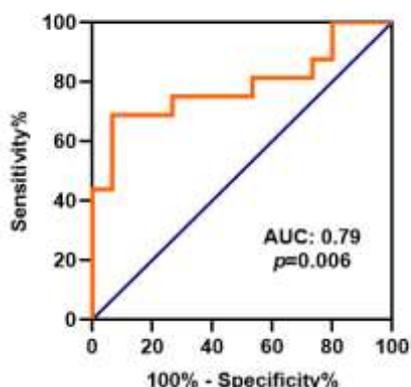


Figura 36. Análisis del ROC de los miRNAs en pacientes graves con COVID19 (A-D) con AUC. A) Análisis ROC de has-miR-1246 en controles sanos en comparación con pacientes graves (panel izquierdo) y sujetos IgG+ en COVID-19 comparado con pacientes graves (panel derecho). B) Análisis ROC de has-miR-98-3p de controles sanos en comparación con pacientes graves en COVID-19. C) Análisis ROC de has-miR-32-p de pacientes IgG+ en COVID-19 en comparación con pacientes graves. C) Análisis ROC de has-miR-423-3p de controles sanos en comparación con pacientes graves en COVID-19.

5.4 Análisis de enriquecimiento de funciones y vías

Se detectaron un total de 2.812 genes que son posibles dianas de nuestros miRNAs con niveles séricos aumentados diferencialmente en pacientes graves. Sorprendentemente, *RAB14* fue el único gen diana común para hsa-miR-32-5p, hsa-miR-98-3p, hsa-miR-423-3p y hsa-miR-1246 (Figura 37).

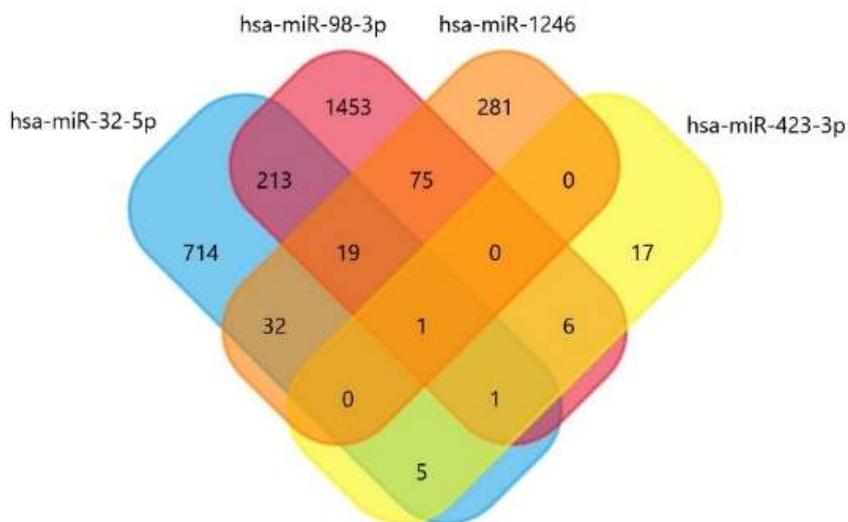


Figura 37. Diagrama de Venn de los genes diana de los 4 miRNAs cuyos niveles aumentan en pacientes graves.

Luego, se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento funcional para estos genes potencialmente regulados por los 4 miRNAs a través de *Funrich* (Tabla 16). El análisis reveló, no sólo que estos mirnas están involucrados en el procesamiento del RNAm, sino que también participan en procesos como la entrada del virus en la célula, el transporte intracelular mediado por vesículas o la coagulación sanguínea (Figura 38).

Tabla 16. Análisis de enriquecimiento de genes.

BASE DE DATOS	PROCESO BIOLÓGICO	Nº DE GENES DE LA BASE DE DATOS	% DE GENES	VALOR P	GENES
UNIPROT	Proceso viral	98	3,88	0,00028	Q8IZP0; Q9H3P7; P39687; Q07021; Q13936; Q9BY67; P45973; P20248; P51686; Q8TD46; P05156; O15519; P16220; Q92793; Q6UUUV7; P35222; Q13616; Q93034; P49238; O00571; Q9BUN8; Q9UPY3; Q12959; 9NXW2; Q8TBM8; Q13627; P60842; Q14240; Q969H0; P31994; Q06787; Q13283; Q9UN86; Q9Y5Z7; P09651; P22626; Q00839; P08069; P40189; O00410; Q92831; Q9NXV2; O60870; Q07866; Q99683; Q9P1T7; Q00987; Q14149; Q9Y2A7; Q9BTX1; P25963; O60462; P49790; Q12769; Q92621; Q8NFH5; 8NFH3; Q9BVL2; P52948; O60502; Q9BRP4; Q8NEN9; 75925; P27986; Q16513; P08575; P43487; P49792; P61586; Q6R327; Q9NWF9; Q01826; Q86VE9; Q01105; P84022; Q2TAY7; P08047; Q96T58; O95793; P21675; Q92973; P11387; Q15629; P36406; Q9C030; Q9NPG3; 9BZM6; Q9BZM4; Q9UPU5; 93009; Q9P0L0; Q9UBQ0; Q7Z5K2; Q8TAF3; O14980; Q9BSR8; Q7Z739; Q8TBZ5;
GO	Entrada viral en célula huésped	27	1,05	0,00052	ACE2; AGTR1; AXL; CD46; CLDN1; CLEC5A; CXADR; DAG1; EFNB2; EFNB3; HTR2A; ITCH; ITGA5; ITGAV; ITGB1; KPNA3; NCAM1; NECTIN1; NPC1; NRP1; NUP153; PHB; SLAMF1; SLC52A1; TFRC; UVRAG; WWP2; A1CF; AFF2; C1QBP; CCAR2; CNOT6L; CPEB1; CPSF6; ELAVL4; ESRP1; FMR1; GEMIN2; HNRNPA1L2; HNRNPA2B1; KIN; MBNL1; MBNL2; MBNL3; METTL3; PAN3; PPP4R2; PRPF18; PRPF38B; PRPF8; PTBP3; QKI; RBFOX1; RBFOX2; RBM26; RBM27; SCAF11; SFPQ; SNRNP48; SREK1IP1; SRSF1; SRSF11; SRSF2; TENT4A; TTF2; VIRMA; WTAP; ZFP36L1; ZNF326; ZNF830; FMR1; PUM1; PUM2;
GO	Procesamiento de RNAm	43	1,67	0,00019	
GO	Silenciamiento de gen por miRNA	3	0,12	0,04276	
GO	Endocitosis	37	1,44	0,03583	AAK1; ANKFY1; APP; ATP6V1H; CDC42; CFI; CLCN5; CSNK1G3; DENND1B; DGKD; EEA1; EPS15L1; HEATR5A; HEATR5B; HIP1; LRP2; LRRK2; LY75; MIA3; MTMR9; NECAP1; NPC1; PIK3C2A; PIK3C3; PIK3CB; PRG4; PRSS12; RAB22A; RAB7A; RABGAP1L; REPS2; SH3GL3; SNX10; SNX2; SNX9; STEAP2; TMPRSS2;
GO	Transporte mediado por vesículas	35	1,36	0,00856	ADAMTS9; AP1S3; ARF1; ARF6; ARL1; ARL17A; ARL5A; BVES; CECR2; CHM; CNIH1; FMN2; GOLGA4; HSPA14; KALRN; KIF3B; MYO5A; NECAP1; NSF; PRKCI; RAB10; RAB11FIP3; RAB14; SFT2D1; SPIRE1; SPTBN4; STON2; STXBP1; SYT1; SYT15; TBC1D4; TRIM23; TVP23B; TVP23C; VPS45;
GO	Reciclaje endocítico	14	0,54	0,01129	ACAP2; ANKRD50; ARF6; CMTM6; DENND1B; EPG5; KIAA1109; RAB11B; RAB11FIP3; RAB14; SNX3; VPS26A; VPS29; VPS53;
UNIPROT	Coagulación sanguínea	36	1,42	0,01713	O43572; P47755; Q5VZK9; P45973; P16671; P13987; P60953; P08123; Q14185; Q5JSL3; Q9BZ29; Q9Y6X5; P49961; P55085; P13726; P06241; P23769; P23771; Q92908; P50148; P07359; Q92769; Q86YV9; O60674; P49257; Q9C0E8; O15525; O60675; P22694; P31323; P22891; P63000; Q9UQQ2; P10646; Q9NRW7; Q8WW38;

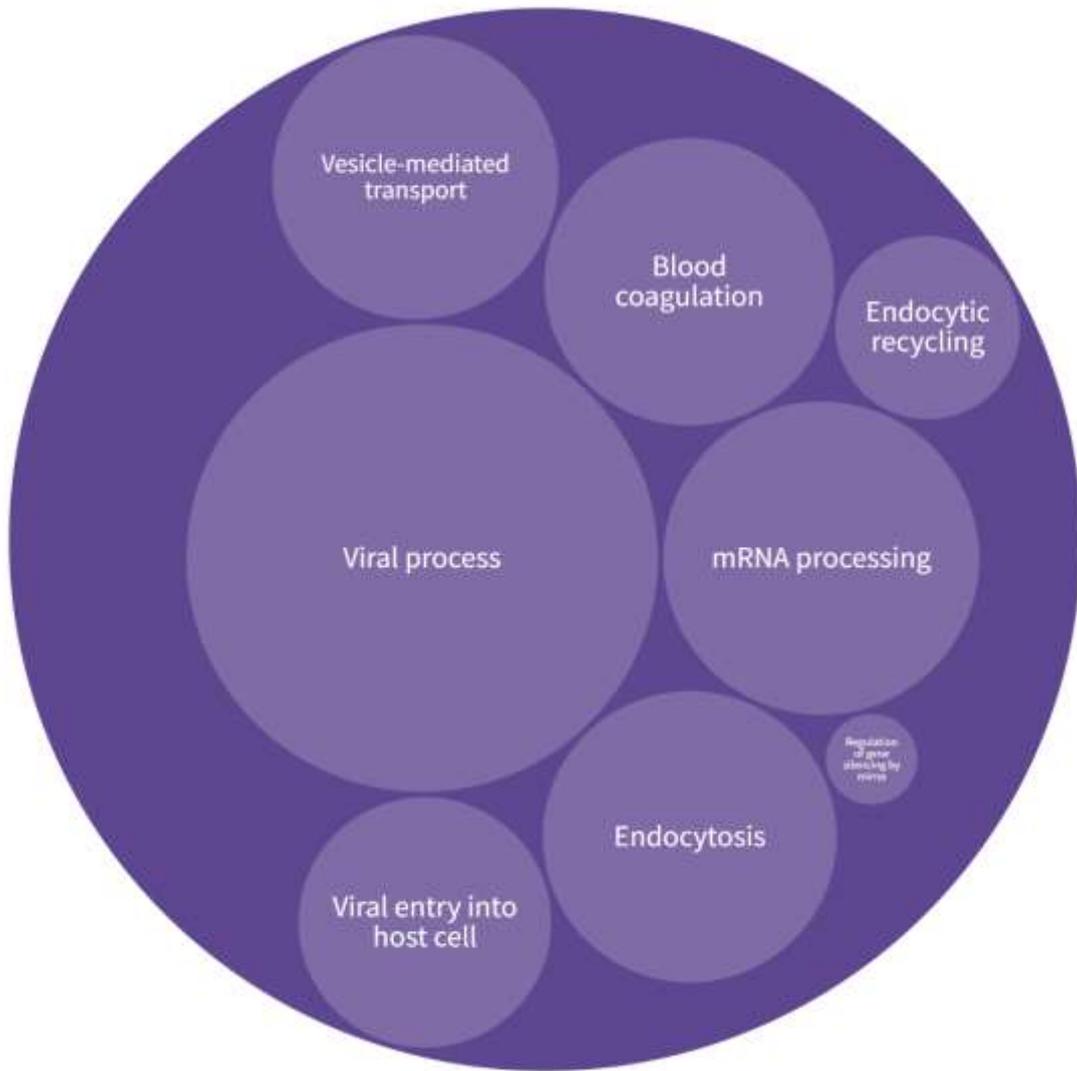


Figura 38. Procesos biológicos en los que intervienen las proteínas encontradas a través del análisis de enriquecimiento cuya expresión sería regulada por alguno de los 4 miRNAs.

6. DISCUSIÓN

El 30 de enero de 2020, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró la enfermedad COVID-19 como una emergencia de salud pública de importancia internacional, convirtiéndose en una pandemia mundial el 11 de marzo de 2020⁶¹⁸. Casi dos años después del informe del primer caso de COVID-19, se han producido 258.164.425 casos confirmados de COVID-19 y más de 5 millones de fallecidos en todo el mundo por esta enfermedad²⁶.

Aunque hasta la fecha se han desarrollado, en tiempo récord, numerosos métodos diagnósticos, vacunas y terapias, gracias a los extraordinarios esfuerzos clínicos y de investigación sin precedentes para la identificación de los mecanismos biológicos y moleculares que subyacen en la infección por el virus y su patogenicidad en las células huésped humanas, aún no hay signos de que la pandemia esté controlada, por lo que existe una necesidad urgente de desarrollar nuevas vacunas y terapias farmacológicas, así como biomarcadores de susceptibilidad de sufrir la COVID-19 grave frente a la asintomática o leve, más allá de las comorbilidades descritas en la literatura, de diagnóstico del estado del paciente, de pronóstico de los resultados clínicos y nuevas dianas terapéuticas de esta enfermedad y de futuras enfermedades provocadas por CoVs u otros virus.

Una de las preguntas que sigue sin respuesta con respecto a la COVID-19 es por qué algunas personas infectadas con SARS-CoV-2 desarrollan la enfermedad grave mientras que otras no lo hacen. Así, la mayoría de los pacientes presentan síntomas leves a moderados como fiebre, tos seca persistente, dolores corporales y disnea ocasional, pero una pequeña fracción de los pacientes también puede presentar insuficiencia respiratoria aguda y síndrome de dificultad respiratoria aguda asociada a fallo multiorgánico^{306,309}.

Por otro lado, los mecanismos fisio-patogénicos de la infección por SARS-CoV-2 aún no se han esclarecido en su totalidad. La evidencia actual indica que este virus puede invadir múltiples sistemas, incluyendo el sistema respiratorio, el sistema digestivo o el sistema circulatorio, produciendo en los casos graves, numerosos daños celulares y tisulares, así como sistémicos, debido a la inducción de mecanismos de defensa del huésped como la apoptosis o una respuesta exacerbada de la inmunidad innata que puede llevar al fallo multisistémico y la muerte^{194,218}.

Por tanto, el conocimiento de la susceptibilidad de un individuo a la infección por SARS-CoV-2 y otros patógenos virales a través de la identificación de biomarcadores críticos específicos puede guiar futuras estrategias de tratamiento de la enfermedad en sus distintas fases. Y es aquí donde han entrado en juego el papel de los miRNAs. De hecho, en los últimos dos años, se ha incrementado el número de publicaciones que han demostrado que los miRNAs pueden desempeñar un papel importante en la patogénesis del SARS-COV-CoV-2^{571,572,619-627}.

Tras revisar varios estudios sobre proteínas humanas críticas que interaccionan con el SARS-COV-CoV-2^{87,202,255}, elegimos la proteína ACE2 por constituir la proteína clave para el reconocimiento y la entrada del virus en la célula, la TMPRSS2, por ser fundamental para el procesamiento de la subunidad S2 de la proteína S viral que contiene el péptido de fusión que permite la fusión de ambas membranas y, por último, la RAB14, por ser una proteína fundamental para la maduración y ensamblaje de las proteínas virales de los nuevos viriones en la vía TRANS-Golgi⁶²⁸⁻⁶³⁰.

También seleccionamos varios miRNAs que, según los resultados de estudios científicos basados en las herramientas bioinformáticas, se prevé que actúan como reguladores post-transcripcionales de la expresión de las tres proteínas. En el presente estudio se ha demostrado, por primera vez que los niveles de cuatro miRNAs circulantes, has-miR-1246, has-miR-98-3p,

has-miR-32-5p y has-miR-423-3p, aumentan significativamente en pacientes graves y, además, has-miR-1246 es capaz de discriminar entre sujetos asintomáticos y pacientes graves. Es más, mediante el análisis de ROC, se observa que podrían considerarse como buenos biomarcadores específicos a los que se podrían orientar estrategias futuras de tratamiento.

Son dos los miRNAs circulantes diferencialmente expresados en pacientes graves COVID19 los que presentan como genes diana a *TMPRSS2*, como a *RAB14*, hsa-miR-32-5p y hsa-miR-98-3p. Kaur et al. (2021) demostraron tanto *in silico* como *in vitro*, que el miR-32 y miR-98 regulan la expresión del *TMPRSS2* en células Caco-2 (modelo para cáncer de colon), presentándolos como una posible diana con carácter terapéutico prospectivo para silenciar la expresión de *TMPRSS2*⁶³¹ en pacientes con COVID-19. En lo que respecta a la proteína RAB14, no hemos encontrado bibliografía referente a la regulación de su expresión por miR-32 y miR-98 en el sistema respiratorio o relacionados con COVID-19, salvo un análisis *in silico* en tumores de páncreas y colon en el que demuestran que *RAB14* es un gen diana de miR-32-5p. Varios artículos demuestran la relación de estos miRNAs con procesos víricos. En el caso de miR-32, presenta un papel regulador significativo en las infecciones virales de la hepatitis A aviar.⁶³² Referente miR-98, su expresión disminuye en los cerebros infectados por el virus del Nilo⁶³³.

En el caso del hsa-miR-1246, no solo sus niveles se ven aumentados en los pacientes graves, sino que este miRNA podría servir como biomarcador para discriminar a pacientes graves frente a los controles sanos y frente a los asintomáticos (**Tabla 15 y Figura 36**). Además, el estudio *in silico* muestra que presenta como genes diana a la *ACE2* y *RAB14*. Este miRNA tiene una relación estrecha con el sistema respiratorio, ya que ha sido descrito como biomarcador de enfisema en pacientes con EPOC⁶³⁴ y en cáncer de pulmón de células pequeñas⁶³⁵. Referente a la regulación de la expresión de *ACE2*, un estudio preliminar describe que en el epitelio de las vías respiratorias de fumadores, el aumento de los niveles del mRNA de *ACE2* podría estar influenciado por la disminución de los niveles de miR-1246⁶³⁶. Kanh et al. (2020) describieron, tanto *in silico* como *in vitro*, que la regulación de la proteína ACE2 por miR-1246 en pacientes con síndrome de dificultad respiratoria aguda^{589,637} Al igual que en los miRNAs anteriores, se ha descrito a hsa-miR-1246 como biomarcador en cáncer de páncreas, y se ha predicho a *RAB14* como uno de sus genes diana⁶³⁸, pero no hemos encontrado bibliografía referente a la regulación de la expresión de estas proteína en el sistema respiratorio o pacientes COVID-19. Sin embargo, recientemente un estudio ha identificado al miR-1246 como posible regulador del genoma del SARS-COV-CoV-2632, lo que proporcionaría más información sobre los mecanismos de protección asociados a los miRNAs.

Por otro lado, el hsa-miR-423-3p presentó niveles elevados en pacientes graves COVID, y según el análisis *in silico* realizado, se presenta como gen diana a *RAB14*, por lo que podría estar regulando su expresión. De acuerdo con un estudio reciente, los niveles circulantes de miR-423-5p aumentan en pacientes COVID-19⁶³⁹, sin embargo, en este estudio no se hace referencia a nuestro biomarcador hsa-miR-423-3p. Si que ha sido descrito al hsa-miR-423-3p como biomarcador de cáncer de pulmón⁶⁴⁰, y que se encuentra relacionado con la tuberculosis y las vías de la endocitosis en la que juega un papel importante la familia de las proteínas RAB⁶⁴¹.

Además de los genes *ACE2*, *TMPRSS2* y *RAB14*, se predijeron 2812 genes diana para nuestros cuatro miRNAs. Cabe remarcar que los cuatro miRNAs compartían a *RAB14* como gen diana. El análisis *in silico* realizado sugiere que estos miRNAs podrían considerarse mucho más que simples reguladores post-transcripcionales ya que, además, están involucrados en varios procesos biológicos relacionados con la patogénesis del SARS-COV-CoV-2.

En estudio previo en el que se analizan polimorfismos genéticos de genes clave en la infección por SARS-CoV-2 en muestras de pulmón de pacientes con adenocarcinomas, se encontró que los niveles del transcrito de *RAB14* disminuían según el tipo de polimorfismo²⁰¹. Esta disminución concuerda con el aumento de la expresión observado en estos miRNAs circulantes estudiados. Se ha descrito a *RAB14* en varios artículos como una proteína fundamental que participa en la formación de las vesículas donde se produce el final de la maduración de las proteínas estructurales del SARS-CoV-2 y el ensamblaje como proteína fundamental en la infección por SARS-CoV-2 en varios estudios^{202,255}. Los resultados del estudio *in silico* muestran que no sólo *RAB 14*, sino otros muchos genes están implicados en el tráfico vesicular. Además, estos resultados nos indican que los genes también participan en el proceso de entrada del virus en la célula, que junto a la posible inhibición de la expresión de *RAB14* por el aumento de los cuatro miRNAs podría indicar un mecanismo de defensa de la célula frente a la proliferación del virus.

Por otro lado, vemos que los genes diana de los miRNAs circulantes cuyos niveles aumentan en pacientes graves están relacionados, según el estudio de enriquecimiento funcional, con la desregulación de genes asociados con el funcionamiento de la coagulación sanguínea. La anormalidad de la coagulación sanguínea es uno de los parámetros clínicos más observados en pacientes graves⁶⁴², lo que parece concordar con los resultados obtenidos.

En resumen, hemos identificado 4 miRNAs circulantes expresados diferencialmente en nuestro grupo de pacientes COVID-19 graves que podrían ser potenciales biomarcadores clínicos. Además, el análisis bioinformático de enriquecimiento funcional podría ser útil para elucidar los posibles mecanismos biológicos de la infección por SARS-CoV-CoV-2.

7. CONCLUSIONES

Según nuestros resultados, en el presente estudio se han encontrado cuatro miRNAs circulantes, has-miR-1246, has-miR-98-3p, has-miR-32-5p y has-miR-423-3p, cuyos niveles se encuentran significativamente aumentados en pacientes graves de COVID-19 y, de ellos, has-miR-1246, además, es capaz de discriminar entre sujetos asintomáticos y pacientes graves. Es más, mediante el análisis de ROC, se observa que podrían considerarse como buenos biomarcadores específicos de la fase grave en el suero de pacientes con COVID-19, a los que se podrían dirigir estrategias futuras de tratamiento.

Además, tras un análisis *in silico* de enriquecimiento funcional, se ha encontrado que has-miR-1246 podría tener como genes diana, tanto el de la proteína ACE2 como el de la *RAB14*, el has-miR-98-3p el de la *TMPRSS2* y la *RAB14*, has-miR-32-5p el de la *TMPRSS2* y la *RAB14* y el miRNA has-miR-423-3p tendría como objetivo el gen de la *RAB14*. Por tanto, de los genes cuya expresión se prevé que esté regulada por estos cuatro miRNAs, el gen de la proteína *RAB14* es el único gen diana común a estos.

Por otra parte, se ha encontrado también que estos genes están involucrados en importantes procesos tanto celulares como sistémicos, como la coagulación sanguínea, la apoptosis celular o el tráfico intracelular de vesículas, lo que podría explicar parte de la sintomatología de los pacientes graves de COVID-19.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Los resultados de este estudio aun siendo muy prometedores, necesitan ser validados en una muestra mayor de pacientes. Además, sería interesante la búsqueda de un mayor número de miRNAs dirigidos a estos y otros genes diana claves en la fisiopatogénesis del SARS-COV-CoV-2, así como estudios de correlación de los resultados alcanzados con los datos clínicos de los pacientes.

También se podría llevar a cabo el análisis de los niveles de expresión de estos miRNAs en muestras de tejidos de pacientes de COVID-19, así como de la regulación de la expresión por estos miRNAs de las proteínas identificadas *in silico* en cultivos de distintas líneas celulares.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Balboni, A., Battilani, M. & Prosperi, S. *The SARS-like coronaviruses: the role of bats and evolutionary relationships with SARS coronavirus*. *NEW MICROBIOLOGICA* vol. 35 (2012).
2. Calisher, C. H., Childs, J. E., Field, H. E., Schountz, T. & Holmes, K. v. Bats: Important Reservoir Hosts of Emerging Viruses. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS* 19, 531–545 (2006).
3. Wang, L.-F. *et al.* Review of Bats and SARS - Volume 12, Number 12—December 2006 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. *Emerging Infectious Diseases* 12, 1834–1840 (2006).
4. Fauquet, C., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U. & Ball, L. A. *Virus taxonomy: Eighth report of the international committee on taxonomy of viruses*. *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (2005).
5. Kolesnikova, L., Slenczka, W., Brodt, H.-R., Klenk, H.-D. & Becker, S. Electron microscopy in diagnostics of SARS case. *Microscopy and Microanalysis* 9, 438–439 (2003).
6. Lim, Y., Ng, Y., Tam, J. & Liu, D. Human Coronaviruses: A Review of Virus–Host Interactions. *Diseases* 4, 26 (2016).
7. Fauquet C.M. *et al.* (eds.), 2005 - Reference Details - The Taxonomicon. <http://taxonomicon.taxonomy.nl/Reference.aspx?id=4554>.
8. Zhu N. *et al.* A Novel Coronavirus from patients with pneumonia in China. *The New England Journal of Medicine*. 20;382(8):727-733. (2020).
9. Asghari, A., Naseri, M., Safari, H., Saboory, E. & Parsamanesh, N. The Novel Insight of SARS-CoV-2 Molecular Biology and Pathogenesis and Therapeutic Options. *DNA and Cell Biology* vol. 39 1741–1753 (2020).
10. Cui, J., Li, F. & Shi, Z.-L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews. Microbiology*.17(3):181-192 (2020).
11. Paules c., Marston H.D., Fauci A.S. Coronavirus Infections-More Than Just the Common Cold. *JAMA*. 323(8):707-708. (2020).
12. Krishnamoorthy, S., Swain, B., Verma, R. S. & Gunthe, S. S. SARS-CoV, MERS-CoV, and 2019-nCoV viruses: an overview of origin, evolution, and genetic variations. *VirusDisease* vol. 31 411–423 (2020).
13. Guan, Y. *et al.* Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in Southern China. *Science* 302, 276–278 (2003).
14. Zaki AN, van Boheemen S., Bestebreer T.M. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *The New England journal of medicine* 367, 1814–1820 (2012).
15. Zaki AN, van Boheemen S., Bestebreer T.M. Middle East respiratory syndrome coronavirus infection in dromedary camels in Saudi Arabia. *mBio* 5, (2014).
16. Zhu, N. *et al.* A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine* 382, 727–733 (2020).
17. Gralinski, L. E. & Menachery, V. D. Return of the coronavirus: 2019-nCoV. *Viruses* vol. 12 (2020).
18. Wu, Z. & McGoogan, J. M. Characteristics of and Important Lessons from the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72314 Cases from the Chinese Center

- for Disease Control and Prevention. *JAMA - Journal of the American Medical Association* vol. 323 1239–1242 (2020).
19. Wu, F. *et al.* A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 579, (2020).
 20. Zhou, P. *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *270 | Nature | 579*, (2012).
 21. Chan, J. F. W. *et al.* A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *The Lancet* 395, 514–523 (2020).
 22. Chen, N. *et al.* Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *The Lancet* 395, 507–513 (2020).
 23. Z, Z., K, X., X, Z., A, R. & Y, S. Emergence of SARS-like coronavirus in China: An update. *The Journal of Infection* 80, e28–e29 (2020).
 24. Fisher, D. & Heymann, D. Q&A: The novel coronavirus outbreak causing COVID-19. *BMC Med.* 28;18(1):57 (2020).
 25. World Health Organization. Timeline of WHO's response to COVID-19. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/interactive-timeline#!>
 26. World Health Organization. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data. *Who* 1–5 (2021).
 27. Zhou, P. *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579, (2012).
 28. RA, K., M, S. & M, O. Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2. *Gene reports* 19, (2020).
 29. Perlman, S. Another Decade, Another Coronavirus. *New England Journal of Medicine* 382, 760–762 (2020).
 30. Lu, R. *et al.* Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *www.thelancet.com* 395, 565 (2020).
 31. Latinne, A. *et al.* Origin and cross-species transmission of bat coronaviruses in China. *bioRxiv* (2020).
 32. Lei, Z. *et al.* Substitutions and codon usage in SARS-CoV-2 in mammals indicate natural selection and host adaptation. *bioRxiv* 2021.04.04.438417 (2021).
 33. Mahdy, M. A. A., Younis, W. & Ewaida, Z. An Overview of SARS-CoV-2 and Animal Infection. *Frontiers in Veterinary Science* 7, (2020).
 34. Cyranoski, D. The biggest mystery: what it will take to trace the coronavirus source. *Nature* (2020).
 35. Tracking BSL-4 labs around the world. <https://www.globalbiolabs.org/>.
 36. WHO-convened Global Study of Origins of SARS-CoV-2: China Part | Joint WHO-China Study, 14 January-10 February 2021 | ReliefWeb Mobile. <https://m.reliefweb.int/report/3725850/world/who-convened-global-study-origins-sars-cov-2-china-part-joint-who-china-study-14?lang=es>.
 37. Andersen, K. G., Rambaut, A., Lipkin, W. I., Holmes, E. C. & Garry, R. F. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nature Medicine* vol. 26 450–452 (2020).
 38. Calisher, C. H. *et al.* Science, not speculation, is essential to determine how SARS-CoV-2 reached humans. *Lancet (London, England)* 398, 209 (2021).

39. Wang, C. C. *et al.* Airborne transmission of respiratory viruses. *Science* 373, (2021).
40. Greenhalgh, T. *et al.* Ten scientific reasons in support of airborne transmission of SARS-CoV-2. *The Lancet* 397, 1603–1605 (2021).
41. KA, P. *et al.* Airborne transmission of SARS-CoV-2. *Science (New York, N.Y.)* 370, 303–304 (2020).
42. N, van D. *et al.* Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *The New England journal of medicine* 382, 1564–1567 (2020).
43. van Doremalen, N. *et al.* Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *The New England Journal of Medicine* (2020).
44. Meyerowitz, E. A., Richterman, A., Rajesh, ,, Gandhi, T. & Sax, P. E. Transmission of SARS-CoV-2: A Review of Viral, Host, and Environmental Factors. (2021).
45. Morawska, L. *et al.* How can airborne transmission of COVID-19 indoors be minimised? *Environment International* 142, 105832 (2020).
46. Kampf, G. *et al.* Potential sources, modes of transmission and effectiveness of prevention measures against SARS-CoV-2. *Journal of Hospital Infection* 106, 678–697 (2020).
47. Aboubakr, H. A., Sharafeldin, T. A., Goyal, S. M. & Hamada Aboubakr, C. A. Stability of SARS-CoV-2 and other coronaviruses in the environment and on common touch surfaces and the influence of climatic conditions: A review. *Transbound Emerg Dis* 68, 296–312 (2021).
48. F, F. *et al.* SARS-CoV2 vertical transmission with adverse effects on the newborn revealed through integrated immunohistochemical, electron microscopy and molecular analyses of Placenta. *EBioMedicine* 59, (2020).
49. Schwartz, D. A. & Thomas, K. M. Characterizing COVID-19 maternal-fetal transmission and placental infection using comprehensive molecular pathology. *EBioMedicine* 60, (2020).
50. C, Y., S, K. & D, Y. Enteric involvement of coronaviruses: is faecal-oral transmission of SARS-CoV-2 possible? *The lancet. Gastroenterology & hepatology* 5, 335–337 (2020).
51. Holshue, M. L. *et al.* Brief Report: First Case of 2019 Novel Coronavirus in the United States. *The New England Journal of Medicine* 382, 929 (2020).
52. Chen, P. Z. *et al.* Heterogeneity in transmissibility and shedding SARS-CoV-2 via droplets and aerosols. *eLife* 10, (2021).
53. Q, Y. *et al.* Just 2% of SARS-CoV-2-positive individuals carry 90% of the virus circulating in communities. *medRxiv : the preprint server for health sciences* (2021).
54. Hamner, L. High SARS-CoV-2 Attack Rate Following Exposure at a Choir Practice — Skagit County, Washington, March 2020. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report* 69, 606–610 (2020).
55. Hobday, R. A. & Dancer, S. J. Roles of sunlight and natural ventilation for controlling infection: historical and current perspectives. *Journal of Hospital Infection* 84, 271–282 (2013).
56. AC, B., W, T., V, M., W, Y. & ZM, Z. SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication. *Cell & bioscience* 11, (2021).
57. Malik, S. *et al.* Emerging therapeutic modalities against covid-19. *Pharmaceuticals* vol. 13 1–32 (2020).
58. Yao, H. *et al.* Molecular Architecture of the SARS-CoV-2 Virus. *Cell* 183, 730–738 (2020).
59. J, H. *et al.* Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 from Patient with Coronavirus Disease, United States. *Emerging infectious diseases* 26, 1266–1273 (2020).

60. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate Wuhan-Hu-1, co - Nucleotide - NCBI. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_045512.
61. DX, L., TS, F., KK, C., A, S. & R, H. Accessory proteins of SARS-CoV and other coronaviruses. *Antiviral research* 109, 97–109 (2014).
62. Abduljalil, J. M. & Abduljalil, B. M. Epidemiology, genome, and clinical features of the pandemic SARS-CoV-2: a recent view. *New Microbes and New Infections* 35, 100672 (2020).
63. Giovanetti, M. *et al.* Evolution patterns of SARS-CoV-2: Snapshot on its genome variants. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 538, 88 (2021).
64. Kelly, J. A., Woodside, M. T. & Dinman, J. D. Programmed -1 Ribosomal Frameshifting in coronaviruses: A therapeutic target. *Virology* 554, 75–82 (2021).
65. Kozak, M. The scanning model for translation: an update. *Journal of Cell Biology* 108, 229–241 (1989).
66. de Breyne, S. *et al.* Translational control of coronaviruses. *Nucleic Acids Research* 48, 12502–12522 (2020).
67. T, V. *et al.* Structural Basis of RNA Cap Modification by SARS-CoV-2 Coronavirus. *bioRxiv: the preprint server for biology* (2020).
68. D, K. *et al.* The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell* 181, 914-921.e10 (2020).
69. Miao, Z., Tidu, A., Eriani, G. & Martin, F. Secondary structure of the SARS-CoV-2 5'-UTR. *RNA Biology* 18, 447 (2021).
70. D, W. *et al.* The SARS-CoV-2 subgenome landscape and its novel regulatory features. *Molecular cell* 81, 2135-2147.e5 (2021).
71. CA, de H., L, K., PS, M., H, V. & PJ, R. Coronavirus particle assembly: primary structure requirements of the membrane protein. *Journal of virology* 72, 6838–6850 (1998).
72. Rangan, R., Zheludev, I. N. & Das, R. RNA genome conservation and secondary structure in SARS-CoV-2 and SARS-related viruses. *bioRxiv* (2020).
73. R, M., M, F., M, M. & J, Z. RNA structure analysis of alphacoronavirus terminal genome regions. *Virus research* 194, 76–89 (2014).
74. J, T. *et al.* Identification and Characterization of a Human Coronavirus 229E Nonstructural Protein 8-Associated RNA 3'-Terminal Adenylyltransferase Activity. *Journal of virology* 93, (2019).
75. P, D., HM, L., C, S., F, G. & E, G. Intra-genome variability in the dinucleotide composition of SARS-CoV-2. *Virus evolution* 6, (2020).
76. Simmonds, P. Pervasive RNA secondary structure in the genomes of SARS-CoV-2 and other coronaviruses – an endeavour to understand its biological purpose. *bioRxiv* 2020.06.17.155200 (2020).
77. Dutkiewicz, M., Stachowiak, A., Swiatkowska, A. & Ciesiołka, J. Structure and function of RNA elements present in enteroviral genomes. *Acta Biochimica Polonica* 63, 623–630 (2016).
78. Z, M., A, T., G, E. & F, M. Secondary structure of the SARS-CoV-2 5'-UTR. *RNA biology* 18, 447–456 (2021).
79. Bartas, M. *et al.* In-Depth Bioinformatic Analyses of Nidovirales Including Human SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV Viruses Suggest Important Roles of Non-canonical Nucleic Acid Structures in Their Lifecycles. *Frontiers in Microbiology* 11, (2020).

80. JA, K. *et al.* Structural and functional conservation of the programmed -1 ribosomal frameshift signal of SARS coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *The Journal of biological chemistry* 295, 10741–10748 (2020).
81. Royal Society, T. The SARS-CoV-2 genome: variation, implication and application. (2020).
82. AE, G., L, E., J, Z. & EJ, S. Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome. *Virus research* 117, 17–37 (2006).
83. R, S., MR, N., N, C., LM, M. & R, B. Viral mutation rates. *Journal of virology* 84, 9733–9748 (2010).
84. KM, P. & AS, L. Complexities of Viral Mutation Rates. *Journal of virology* 92, (2018).
85. Fehr, A. R. & Perlman, S. Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. *Coronaviruses: Methods and Protocols* 1282, 1–23 (2015).
86. Cevik, M., Kuppalli, K., Kindrachuk, J. & Peiris, M. CLINICAL UPDATE Virology, transmission, and pathogenesis of SARS-CoV-2. doi:10.1136/bmj.m3862.
87. Hoffmann, M. *et al.* SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* 181, 271-280.e8 (2020).
88. W, L. *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 426, 450–454 (2003).
89. M, H. *et al.* The novel coronavirus 2019 (2019-nCoV) uses the SARS-coronavirus receptor ACE2 and the cellular protease TMPRSS2 for entry into target cells. *bioRxiv* (2020).
90. P, Z. *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579, 270–273 (2020).
91. Zhou, G. & Zhao, Q. Perspectives on therapeutic neutralizing antibodies against the Novel Coronavirus SARS-CoV-2. *International Journal of Biological Sciences* 16, 1718 (2020).
92. M, D. *et al.* A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circulation research* 87, (2000).
93. AJ, T. & NM, H. The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *Trends in pharmacological sciences* 23, 177–183 (2002).
94. Scialo, F. *et al.* ACE2: The Major Cell Entry Receptor for SARS-CoV-2. *Lung* 198, 867–877 (2020).
95. H, C. *et al.* Comparative tropism, replication kinetics, and cell damage profiling of SARS-CoV-2 and SARS-CoV with implications for clinical manifestations, transmissibility, and laboratory studies of COVID-19: an observational study. *The Lancet. Microbe* 1, e14–e23 (2020).
96. NE, I. *et al.* Understanding the renin-angiotensin-aldosterone-SARS-CoV axis: a comprehensive review. *The European Respiratory Journal* 56, (2020).
97. F, Q., S, Q., S, Z. & Z, Z. Single cell RNA sequencing of 13 human tissues identify cell types and receptors of human coronaviruses. *Biochemical and biophysical research communications* 526, 135–140 (2020).
98. Zhang, H. *et al.* Digestive system is a potential route of COVID-19: an analysis of single-cell coexpression pattern of key proteins in viral entry process. *Gut* 69, 1010–1018 (2020).
99. Zhao, Y. *et al.* Single-Cell RNA Expression Profiling of ACE2, the Receptor of SARS-CoV-2. 202, 756–759 (2020).
100. Zhang, J. *et al.* Bioinformatic analysis reveals that the reproductive system is potentially at risk from 2019-nCoV. (2020)

101. Lukassen, S. *et al.* SARS-CoV-2 receptor ACE2 and TMPRSS2 are primarily expressed in bronchial transient secretory cells. *The EMBO Journal* 39, e105114 (2020).
102. Kabrani, N. & Olds, J. L. Does COVID19 Infect the Brain? If So, Smokers Might Be at a Higher Risk. *Molecular Pharmacology* 97, 351–353 (2020).
103. H, X. *et al.* High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *International journal of oral science* 12, (2020).
104. Chai, X. *et al.* Specific ACE2 expression in cholangiocytes may cause liver damage after 2019-nCoV infection. *bioRxiv* (2020).
105. Chen, J. *et al.* Individual variation of the SARS-CoV-2 receptor ACE2 gene expression and regulation. *Aging Cell* 19, e13168 (2020).
106. Liu, F. *et al.* Highly ACE2 expression in pancreas may cause pancreas damage after SARS-CoV-2 infection. *medRxiv* (2020).
107. Su, H. *et al.* Renal histopathological analysis of 26 postmortem findings of patients with COVID-19 in China. *Kidney International* 98, 219–227 (2020).
108. Pan, X. *et al.* Identification of a potential mechanism of acute kidney injury during the COVID-19 outbreak: a study based on single-cell transcriptome analysis. *Intensive Care Medicine* 2020 46:6 46, 1114–1116 (2020).
109. Douglas, G. C. *et al.* The novel Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) homolog, ACE2, is selectively expressed by adult leydig cells of the testis. *Endocrinology* 145, 4703–4711 (2004).
110. Wang, Z. & Xu, X. scRNA-seq Profiling of Human Testes Reveals the Presence of the ACE2 Receptor, A Target for SARS-CoV-2 Infection in Spermatogonia, Leydig and Sertoli Cells. *Cells* 2020, Vol. 9, Page 920 9, 920 (2020).
111. Li, M., Chen, L., Zhang, J., Xiong, C. & Li, X. The SARS-CoV-2 receptor ACE2 expression of maternal-fetal interface and fetal organs by single-cell transcriptome study. *PLOS ONE* 15, e0230295 (2020).
112. X, Z. *et al.* Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. *Frontiers of medicine* 14, 185–192 (2020).
113. Wang, Y. *et al.* A comprehensive investigation of the mrna and protein level of ace2, the putative receptor of sars-cov-2, in human tissues and blood cells. *International Journal of Medical Sciences* 17, 1522–1531 (2020).
114. Zou, X. *et al.* Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. *Frontiers of Medicine* 2020 14:2 14, 185–192 (2020).
115. Serfozo, P. *et al.* Ang II (Angiotensin II) Conversion to Angiotensin-(1-7) in the Circulation Is POP (Prolyl oligopeptidase)-Dependent and ACE2 (Angiotensin-Converting Enzyme 2)-Independent. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 75, 173–182 (2020).
116. MW, Z. *et al.* Increasing host cellular receptor-angiotensin-converting enzyme 2 expression by coronavirus may facilitate 2019-nCoV (or SARS-CoV-2) infection. *Journal of medical virology* 92, 2693–2701 (2020).
117. Ziegler, C. G. K. *et al.* SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Is an Interferon-Stimulated Gene in Human Airway Epithelial Cells and Is Detected in Specific Cell Subsets across Tissues. *Cell* 181, 1016-1035.e19 (2020).
118. Onabajo, O. O. *et al.* Interferons and viruses induce a novel truncated ACE2 isoform and not the full-length SARS-CoV-2 receptor. *Nature Genetics* 2020 52:12 52, 1283–1293 (2020).

119. Ye, M. *et al.* Increased ACE 2 and Decreased ACE Protein in Renal Tubules From Diabetic Mice. *Hypertension* 43, 1120–1125 (2004).
120. AM, B., A, K., U, A. & H, S. Evidence of the COVID-19 Virus Targeting the CNS: Tissue Distribution, Host-Virus Interaction, and Proposed Neurotropic Mechanisms. *ACS chemical neuroscience* 11, 995–998 (2020).
121. A, P.-M. *et al.* Central nervous system involvement by severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2). *Journal of medical virology* 92, 699–702 (2020).
122. Moriguchi, T. *et al.* A first case of meningitis/encephalitis associated with SARS-Coronavirus-2. *International Journal of Infectious Diseases* 94, 55–58 (2020).
123. Abebe, E. C., Ayele, T. M., Muche, Z. T. & Dejenie, T. A. Neuropilin 1: A Novel Entry Factor for SARS-CoV-2 Infection and a Potential Therapeutic Target. *Biologics : Targets & Therapy* 15, 143 (2021).
124. JL, D. *et al.* Neuropilin-1 is a host factor for SARS-CoV-2 infection. *Science (New York, N.Y.)* 370, 861–865 (2020).
125. ZL, L. & M, B. Neuropilin-1 Assists SARS-CoV-2 Infection by Stimulating the Separation of Spike Protein Domains S1 and S2. *bioRxiv: the preprint server for biology* (2021) doi:10.1101/2021.01.06.425627.
126. Li, W. *et al.* Receptor and viral determinants of SARS-coronavirus adaptation to human ACE2. *The EMBO Journal* 24, 1634 (2005).
127. Masters, P. S. The Molecular Biology of Coronaviruses. *Advances in Virus Research* 66, 193 (2006).
128. de Wit, E., van Doremalen, N., Falzarano, D. & Munster, V. J. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nature reviews. Microbiology* 14, 523–534 (2016).
129. AC, W. *et al.* Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell* 181, 281-292.e6 (2020).
130. AC, W. *et al.* Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell* 181, 281-292.e6 (2020).
131. F, L. Receptor recognition mechanisms of coronaviruses: a decade of structural studies. *Journal of virology* 89, 1954–1964 (2015).
132. W, L. *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 426, 450–454 (2003).
133. F, L., W, L., M, F. & SC, H. Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor. *Science (New York, N.Y.)* 309, 1864–1868 (2005).
134. Li, F. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annual review of virology* 3, 237 (2016).
135. Y, Y. *et al.* Cryo-EM structures of MERS-CoV and SARS-CoV spike glycoproteins reveal the dynamic receptor binding domains. *Nature communications* 8, (2017).
136. J, S. *et al.* Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117, (2020).
137. B, C. *et al.* The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral research* 176, (2020).
138. D, B. *et al.* TMPRSS2 and furin are both essential for proteolytic activation of SARS-CoV-2 in human airway cells. *Life science alliance* 3, (2020).
139. HD, K. & W, G. Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *Trends in microbiology* 2, 39–43 (1994).

140. Garten, W. Characterization of Proprotein Convertases and Their Involvement in Virus Propagation. *Activation of Viruses by Host Proteases* 205–248 (2018) doi:10.1007/978-3-319-75474-1_9.
141. NC, R., DJ, K., T, K. & RS, F. Precursor processing by kex2/furin proteases. *Chemical reviews* 102, 4525–4548 (2002).
142. S, B., JK, M., BN, L. & GR, W. Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses* 4, 1011–1033 (2012).
143. T, H.-S. & T, G. Ready, set, fuse! The coronavirus spike protein and acquisition of fusion competence. *Viruses* 4, 557–580 (2012).
144. S, B. *et al.* TMPRSS2 and TMPRSS4 facilitate trypsin-independent spread of influenza virus in Caco-2 cells. *Journal of virology* 84, 10016–10025 (2010).
145. Antalis, T. M., Bugge, T. H. & Wu, Q. Membrane-Anchored Serine Proteases in Health and Disease. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 99, 1 (2011).
146. E, B.-F. *et al.* Cleavage of influenza virus hemagglutinin by airway proteases TMPRSS2 and HAT differs in subcellular localization and susceptibility to protease inhibitors. *Journal of virology* 84, 5605–5614 (2010).
147. Kim, T. S., Heinlein, C., Hackman, R. C. & Nelson, P. S. Phenotypic Analysis of Mice Lacking the Tmprss2-Encoded Protease. *Molecular and Cellular Biology* 26, 965 (2006).
148. A, H. *et al.* TMPRSS2 and ADAM17 cleave ACE2 differentially and only proteolysis by TMPRSS2 augments entry driven by the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein. *Journal of virology* 88, 1293–1307 (2014).
149. R, Z. *et al.* TMPRSS2 and TMPRSS4 promote SARS-CoV-2 infection of human small intestinal enterocytes. *Science immunology* 5, (2020).
150. Abe, M. *et al.* TMPRSS2 Is an Activating Protease for Respiratory Parainfluenza Viruses. *Journal of Virology* 87, 11930 (2013).
151. Lucas, J. M. *et al.* The androgen-regulated type II serine protease TMPRSS2 is differentially expressed and mislocalized in prostate adenocarcinoma. *Journal of Pathology* 215, 118–125 (2008).
152. Lin, B. *et al.* Prostate-localized and androgen-regulated expression of the membrane-bound serine protease TMPRSS2. *undefined* (1999).
153. YW, C. *et al.* TMPRSS2, a serine protease expressed in the prostate on the apical surface of luminal epithelial cells and released into semen in prostasomes, is misregulated in prostate cancer cells. *The American journal of pathology* 176, 2986–2996 (2010).
154. I, G. *et al.* Evidence that TMPRSS2 activates the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for membrane fusion and reduces viral control by the humoral immune response. *Journal of virology* 85, 4122–4134 (2011).
155. D, M. *et al.* Expression of SARS-CoV-2 receptor ACE2 and TMPRSS2 in human primary conjunctival and pterygium cell lines and in mouse cornea. *Eye (London, England)* 34, 1212–1219 (2020).
156. Bosch, B. J., van der Zee, R., de Haan, C. A. M. & Rottier, P. J. M. The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *Journal of virology* 77, 8801–8811 (2003).
157. Rey, F. A. & Lok, S. M. Common Features of Enveloped Viruses and Implications for Immunogen Design for Next-Generation Vaccines. *Cell* 172, 1319–1334 (2018).

158. Simmons, G. *et al.* Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 11876 (2005).
159. Wang, H. *et al.* SARS coronavirus entry into host cells through a novel clathrin- and caveolae-independent endocytic pathway. *Cell research* 18, 290–301 (2008).
160. Inoue, Y. *et al.* Clathrin-Dependent Entry of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus into Target Cells Expressing ACE2 with the Cytoplasmic Tail Deleted. *Journal of Virology* 81, 8722 (2007).
161. Zhou, N. *et al.* Glycopeptide Antibiotics Potently Inhibit Cathepsin L in the Late Endosome/Lysosome and Block the Entry of Ebola Virus, Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV), and Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV). *The Journal of biological chemistry* 291, 9218–9232 (2016).
162. Wang, M. *et al.* Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell research* 30, 269–271 (2020).
163. Kelly, J. A., Woodside, M. T. & Dinman, J. D. Programmed -1 Ribosomal Frameshifting in coronaviruses: A therapeutic target. *Virology* 554, 75–82 (2021).
164. Y, Y., N, H., S, H., H, S. & M, M. Polyadenylate in the virion RNA of mouse hepatitis virus. *Journal of biochemistry* 82, 1103–1108 (1977).
165. Sharma, A., Tiwari, S., Deb, M. K. & Marty, J. L. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2): a global pandemic and treatment strategies. *International Journal of Antimicrobial Agents* 56, 106054 (2020).
166. D, K. *et al.* The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell* 181, 914-921.e10 (2020).
167. Angelini, M. M., Akhlaghpour, M., Neuman, B. W. & Buchmeier, M. J. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural proteins 3, 4, and 6 induce double-membrane vesicles. *mBio* 4, (2013).
168. Maier, H. J. *et al.* Infectious bronchitis virus generates spherules from zippered endoplasmic reticulum membranes. *mBio* 4, (2013).
169. Han, D. P., Lohani, M. & Cho, M. W. Specific asparagine-linked glycosylation sites are critical for DC-SIGN- and L-SIGN-mediated severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *Journal of virology* 81, 12029–12039 (2007).
170. C, L. *et al.* Research and Development on Therapeutic Agents and Vaccines for COVID-19 and Related Human Coronavirus Diseases. *ACS central science* 6, 315–331 (2020).
171. YR, G. *et al.* The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak - an update on the status. *Military Medical Research* 7, (2020).
172. Y, Y. & RG, W. MERS, SARS and other coronaviruses as causes of pneumonia. *Respirology (Carlton, Vic.)* 23, 130–137 (2018).
173. AR, F. & S, P. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1282, 1–23 (2015).
174. E, H. *et al.* The molecular virology of coronaviruses. *The Journal of biological chemistry* 295, 12910–12934 (2020).
175. WH, C., U, S., PJ, H. & ME, B. The SARS-CoV-2 Vaccine Pipeline: an Overview. *Current tropical medicine reports* 7, 61–64 (2020).
176. PS, M. The molecular biology of coronaviruses. *Advances in virus research* 66, 193–292 (2006).

177. D, K. *et al.* The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell* 181, 914-921.e10 (2020).
178. Zúñiga, S. *et al.* Coronavirus nucleocapsid protein is an RNA chaperone. *Virology* 357, 215–227 (2007).
179. Zúñiga, S. *et al.* Coronavirus Nucleocapsid Protein Facilitates Template Switching and Is Required for Efficient Transcription. *Journal of Virology* 84, 2169 (2010).
180. Zhang, X. *et al.* Identification of the interaction between vimentin and nucleocapsid protein of transmissible gastroenteritis virus. *Virus research* 200, 56–63 (2015).
181. Wu, C. H., Chen, P. J. & Yeh, S. H. Nucleocapsid phosphorylation and RNA helicase DDX1 recruitment enables coronavirus transition from discontinuous to continuous transcription. *Cell host & microbe* 16, 462–472 (2014).
182. Luo, H. *et al.* The nucleocapsid protein of SARS coronavirus has a high binding affinity to the human cellular heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1. *FEBS letters* 579, 2623–2628 (2005).
183. Tan, Y. W., Hong, W. & Liu, D. X. Binding of the 5'-untranslated region of coronavirus RNA to zinc finger CCHC-type and RNA-binding motif 1 enhances viral replication and transcription. *Nucleic acids research* 40, 5065–5077 (2012).
184. Nanda, S. K. & Leibowitz, J. L. Mitochondrial Aconitase Binds to the 3' Untranslated Region of the Mouse Hepatitis Virus Genome. *Journal of Virology* 75, 3352 (2001).
185. Spychalski, P., Błażyńska-Spychalska, A. & Kobiela, J. Estimating case fatality rates of COVID-19. *The Lancet Infectious Diseases* 20, 774–775 (2020).
186. Fung, T. S. & Liu, D. X. Post-translational modifications of coronavirus proteins: roles and function. *Future virology* 13, 405–430 (2018).
187. Zheng, J. *et al.* Identification of N-linked glycosylation sites in the spike protein and their functional impact on the replication and infectivity of coronavirus infectious bronchitis virus in cell culture. *Virology* 513, 65–74 (2018).
188. Fukushi, M. *et al.* Monitoring of S protein maturation in the endoplasmic reticulum by calnexin is important for the infectivity of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Journal of virology* 86, 11745–11753 (2012).
189. J, K. *et al.* Coronavirus M proteins accumulate in the Golgi complex beyond the site of virion budding. *Journal of virology* 68, 6523–6534 (1994).
190. Kono, M. *et al.* Inhibition of human coronavirus 229E infection in human epithelial lung cells (L132) by chloroquine: Involvement of p38 MAPK and ERK. *Antiviral Research* 77, 150 (2008).
191. YL, S. *et al.* The M, E, and N structural proteins of the severe acute respiratory syndrome coronavirus are required for efficient assembly, trafficking, and release of virus-like particles. *Journal of Virology* 82, 11318–11330 (2008).
192. Nakauchi, M. *et al.* Analysis of severe acute respiratory syndrome coronavirus structural proteins in virus-like particle assembly. *Microbiology and immunology* 52, 625–630 (2008).
193. Lim, Y., Ng, Y., Tam, J. & Liu, D. Human Coronaviruses: A Review of Virus-Host Interactions. *Diseases (Basel, Switzerland)* 4, 26 (2016).
194. Fung, T. S. & Liu, D. X. Human Coronavirus: Host-Pathogen Interaction. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115759> 73, 529–557 (2019).
195. Ghosh, S. *et al.* β -Coronaviruses Use Lysosomes for Egress Instead of the Biosynthetic Secretory Pathway. *Cell* 183, 1520-1535.e14 (2020).

196. Pereira-Leal, J. B. & Seabra, M. C. Evolution of the rab family of small GTP-binding proteins. *Journal of Molecular Biology* 313, 889–901 (2001).
197. Zerial, M. & McBride, H. Rab proteins as membrane organizers. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2, 107–117 (2001).
198. Pfeffer, S. R. Structural Clues to Rab GTPase Functional Diversity. *Journal of Biological Chemistry* 280, 15485–15488 (2005).
199. Junutula, J. R. *et al.* Rab14 Is Involved in Membrane Trafficking between the Golgi Complex and Endosomes. *Molecular Biology of the Cell* 15, 2218 (2004).
200. Spearman, P. Viral interactions with host cell Rab GTPases. *Small Gtpases* 9, 192–201 (2017).
201. Cotroneo, C. E., Mangano, N., Dragani, T. A. & Colombo, F. Lung expression of genes putatively involved in SARS-CoV-2 infection is modulated in cis by germline variants. *European journal of human genetics : EJHG* 29, 1019–1026 (2021).
202. Hoffmann, H.-H. *et al.* Functional interrogation of a SARS-CoV-2 host protein interactome identifies unique and shared coronavirus host factors. *Cell Host & Microbe* 29, 267-280.e5 (2021).
203. Reggiori, F. *et al.* Coronaviruses hijack the LC3-I-positive EDEMosomes, ER-derived vesicles exporting short-lived ERAD regulators, for replication. *Cell Host and Microbe* 7, 500–508 (2010).
204. Wang, J. *et al.* Interaction of the coronavirus infectious bronchitis virus membrane protein with beta-actin and its implication in virion assembly and budding. *PLoS one* 4, (2009).
205. Chen, D. *et al.* ORF3a of SARS-CoV-2 promotes lysosomal exocytosis-mediated viral egress. *Developmental Cell* 56, (2021).
206. Deretic, V., Saitoh, T. & Akira, S. Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology* 2013 13:10 13, 722–737 (2013).
207. Levine, B., Mizushima, N. & Virgin, H. W. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* 2011 469:7330 469, 323–335 (2011).
208. Wong, H. H. & Sanyal, S. Manipulation of autophagy by (+) RNA viruses. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 101, 3–11 (2020).
209. Lamb, C. A., Yoshimori, T. & Tooze, S. A. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2013 14:12 14, 759–774 (2013).
210. Mizushima, N., Yoshimori, T. & Ohsumi, Y. The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154005> 27, 107–132 (2011).
211. Stolz, A., Ernst, A. & Dikic, I. Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nature Cell Biology* 2014 16:6 16, 495–501 (2014).
212. Zhao, Y. G., Codogno, P. & Zhang, H. Machinery, regulation and pathophysiological implications of autophagosome maturation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2021 22:11 22, 733–750 (2021).
213. Zhao, Y. G. & Zhang, H. Autophagosome maturation: An epic journey from the ER to lysosomes. *Journal of Cell Biology* 218, 757–770 (2019).
214. Miao, Y., Li, G., Zhang, X., Xu, H. & Abraham, S. N. A TRP Channel Senses Lysosome Neutralization by Pathogens to Trigger Their Expulsion. *Cell* 161, 1306–1319 (2015).
215. C, C. & FM, G. Genomic variance of the 2019-nCoV coronavirus. *Journal of medical virology* 92, 522–528 (2020).
216. Schubert, K. *et al.* SARS-CoV-2 Nsp1 binds the ribosomal mRNA channel to inhibit translation. *Nature Structural & Molecular Biology* 2020 27:10 27, 959–966 (2020).

217. FK, Y. The Proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS CoV-2 or n-COV19), the Cause of COVID-19. *The protein journal* 39, 198–216 (2020).
218. P, D. *et al.* The four horsemen of a viral Apocalypse: The pathogenesis of SARS-CoV-2 infection (COVID-19). *EBioMedicine* 58, (2020).
219. CT, C.-T., L, L., JR, Y., P, K. & MJ, B. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein 2 interacts with a host protein complex involved in mitochondrial biogenesis and intracellular signaling. *Journal of virology* 83, 10314–10318 (2009).
220. Y, S. *et al.* Two-amino acids change in the nsp4 of SARS coronavirus abolishes viral replication. *Virology* 510, 165–174 (2017).
221. J, L., Y, K. & R, H. Nsp3 of coronaviruses: Structures and functions of a large multi-domain protein. *Antiviral research* 149, 58–74 (2018).
222. S, T. *et al.* Ligand-induced Dimerization of Middle East Respiratory Syndrome (MERS) Coronavirus nsp5 Protease (3CLpro): IMPLICATIONS FOR nsp5 REGULATION AND THE DEVELOPMENT OF ANTIVIRALS. *The Journal of biological chemistry* 290, 19403–19422 (2015).
223. EM, C., MC, W. & T, W. Coronavirus NSP6 restricts autophagosome expansion. *Autophagy* 10, 1426–1441 (2014).
224. MM, A., M, A., BW, N. & MJ, B. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural proteins 3, 4, and 6 induce double-membrane vesicles. *Mbio* 4, (2013).
225. Velthuis, A. J. W. te, Worm, S. H. E. van den & Snijder, E. J. The SARS-coronavirus nsp7+nsp8 complex is a unique multimeric RNA polymerase capable of both de novo initiation and primer extension. *Nucleic Acids Research* 40, 1737 (2012).
226. Zhao, S. *et al.* The DEAD-box RNA helicase 5 positively regulates the replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by interacting with viral Nsp9 in vitro. *Virus Research* 195, 217–224 (2015).
227. Littler, D. R., Gully, B. S., Colson, R. N. & Rossjohn, J. Crystal Structure of the SARS-CoV-2 Non-structural Protein 9, Nsp9. *iScience* 23, 101258 (2020).
228. Slanina, H. *et al.* Coronavirus replication-transcription complex: Vital and selective NMPylation of a conserved site in nsp9 by the NiRAN-RdRp subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118, (2021).
229. Y, M. *et al.* Structural basis and functional analysis of the SARS coronavirus nsp14-nsp10 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, 9436–9441 (2015).
230. Y, W. *et al.* Coronavirus nsp10/nsp16 Methyltransferase Can Be Targeted by nsp10-Derived Peptide In Vitro and In Vivo To Reduce Replication and Pathogenesis. *Journal of virology* 89, 8416–8427 (2015).
231. Gadhave, K. *et al.* Conformational Dynamics of NSP11 Peptide of SARS-CoV-2 Under Membrane Mimetics and Different Solvent Conditions. (2020) doi:10.1101/2020.10.07.330068.
232. Hillen, H. S. *et al.* Structure of replicating SARS-CoV-2 polymerase. *Nature* 2020 584:7819 584, 154–156 (2020).
233. T, S. *et al.* SARS-Coronavirus-2 Nsp13 Possesses NTPase and RNA Helicase Activities That Can Be Inhibited by Bismuth Salts. *Virologica Sinica* 35, 321–329 (2020).
234. KA, I. *et al.* Multiple enzymatic activities associated with severe acute respiratory syndrome coronavirus helicase. *Journal of virology* 78, 5619–5632 (2004).

235. JB, C., AW, A., TS, D. & MR, D. Mutagenesis of S-Adenosyl-L-Methionine-Binding Residues in Coronavirus nsp14 N7-Methyltransferase Demonstrates Differing Requirements for Genome Translation and Resistance to Innate Immunity. *Journal of virology* 90, 7248–7256 (2016).
236. M, H., X, D. & SC, B. Coronavirus endoribonuclease targets viral polyuridine sequences to evade activating host sensors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117, 8094–8103 (2020).
237. K, B., L, G. & CC, K. The severe acute respiratory syndrome coronavirus Nsp15 protein is an endoribonuclease that prefers manganese as a cofactor. *Journal of virology* 78, 12218–12224 (2004).
238. Deng, X. & Baker, S. C. An “Old” protein with a new story: Coronavirus endoribonuclease is important for evading host antiviral defenses. *Virology* 517, 157–163 (2018).
239. Decroly, E. *et al.* Crystal Structure and Functional Analysis of the SARS-Coronavirus RNA Cap 2'-O-Methyltransferase nsp10/nsp16 Complex. *PLoS Pathogens* 7, e1002059 (2011).
240. Neuman, B. W. *et al.* A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. *Journal of Structural Biology* 174, 11 (2011).
241. H, T. *et al.* The SARS-coronavirus membrane protein induces apoptosis via interfering with PDK1-PKB/Akt signalling. *The Biochemical journal* 464, 439–447 (2014).
242. Siu, Y. L. *et al.* The M, E, and N structural proteins of the severe acute respiratory syndrome coronavirus are required for efficient assembly, trafficking, and release of virus-like particles. *Journal of Virology* 82, 11318–11330 (2008).
243. ME, G., AR, F., J, A. & S, P. The coronavirus nucleocapsid protein is ADP-ribosylated. *Virology* 517, 62–68 (2018).
244. J, M. *et al.* SARS-CoV-2-encoded nucleocapsid protein acts as a viral suppressor of RNA interference in cells. *Science China. Life sciences* 63, (2020).
245. Surjit, M., Liu, B., Chow, V. T. K. & Lal, S. K. The Nucleocapsid Protein of Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus Inhibits the Activity of Cyclin-Cyclin-dependent Kinase Complex and Blocks S Phase Progression in Mammalian Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 281, 10669 (2006).
246. J, L. *et al.* Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature* 581, 215–220 (2020).
247. J, S. *et al.* Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature* 581, 221–224 (2020).
248. PP, S. T. & IT, A. SARS-CoV-2 E protein is a potential ion channel that can be inhibited by Gliclazide and Memantine. *Biochemical and biophysical research communications* 530, 10–14 (2020).
249. VS, M. *et al.* Structure and drug binding of the SARS-CoV-2 envelope protein transmembrane domain in lipid bilayers. *Nature structural & molecular biology* 27, 1202–1208 (2020).
250. Siu, K. L. *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus ORF3a protein activates the NLRP3 inflammasome by promoting TRAF3-dependent ubiquitination of ASC. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 33, 8865–8877 (2019).
251. Zhao, J. *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus protein 6 is required for optimal replication. *Journal of virology* 83, 2368–2373 (2009).
252. Nelson, C. A., Pekosz, A., Lee, C. A., Diamond, M. S. & Fremont, D. H. Structure and Intracellular Targeting of the SARS-Coronavirus Orf7a Accessory Protein. *Structure* 13, 75–85 (2005).

253. Schaecher, S. R., Mackenzie, J. M. & Pekosz, A. The ORF7b protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) is expressed in virus-infected cells and incorporated into SARS-CoV particles. *Journal of virology* 81, 718–731 (2007).
254. Wong, H. H. *et al.* Accessory proteins 8b and 8ab of severe acute respiratory syndrome coronavirus suppress the interferon signaling pathway by mediating ubiquitin-dependent rapid degradation of interferon regulatory factor 3. *Virology* 515, 165 (2018).
255. Gordon, D. E. *et al.* A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature* 583, 459–468 (2020).
256. Wakahara, S. *et al.* Synergistic Expression of Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) and ACE2 in Human Renal Tissue and Confounding Effects of Hypertension on the ACE to ACE2 Ratio. *Endocrinology* 148, 2453–2457 (2007).
257. L, S. & BD, U. ACE2, Much More Than Just a Receptor for SARS-COV-2. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 10, (2020).
258. A, M., BP, K., S, C., D, O. & LG, M. Angiotensin II promotes glucose-induced activation of cardiac protein kinase C isozymes and phosphorylation of troponin I. *Diabetes* 50, 1918–1926 (2001).
259. Y, F., T, I., K, I. & A, T. Induction of interleukin-6 expression by angiotensin II in rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 34, 118–125 (1999).
260. Han, Y., Runge, M. S. & Brasier, A. R. Angiotensin II Induces Interleukin-6 Transcription in Vascular Smooth Muscle Cells Through Pleiotropic Activation of Nuclear Factor-B Transcription Factors. 17, 2021 (1999).
261. M, R.-O. *et al.* Angiotensin II regulates the synthesis of proinflammatory cytokines and chemokines in the kidney. *Kidney international. Supplement* 62, S12–S22 (2002).
262. JM, L. *et al.* Angiotensin II induces interleukin-6 in humans through a mineralocorticoid receptor-dependent mechanism. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 48, 1050–1057 (2006).
263. AM, G. & KK, G. NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling. *Molecular and cellular endocrinology* 302, 148–158 (2009).
264. H, K., J, H., AV, C. & P, B. Effects of angiotensin II infusion and inhibition of nitric oxide synthase on the rat aorta. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 28, 153–158 (1996).
265. YN, N. *et al.* Angiotensin II induces neutrophil accumulation in vivo through generation and release of CXC chemokines. *Circulation* 110, 3581–3586 (2004).
266. Wang, R. *et al.* Angiotensin II induces apoptosis in human and rat alveolar epithelial cells. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1999.276.5.L885> 276, 1013–1017 (1999).
267. Li, X. *et al.* Angiotensin converting enzyme-2 is protective but downregulated in human and experimental lung fibrosis. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00009.2008> 295, (2008).
268. BD, U., X, L., A, X., X, G. & A, A.-H. Regulation of alveolar epithelial cell survival by the ACE-2/angiotensin 1-7/Mas axis. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 301, (2011).
269. Gopallawa, I. & Uhal, B. D. Angiotensin-(1–7)/mas inhibits apoptosis in alveolar epithelial cells through upregulation of MAP kinase phosphatase-2. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00187.2015> 310, L240–L248 (2016).
270. le Tram, Y. & Foster, C. Angiotensin-(1-7) and the Rat Aorta: Modulation by the Endot... : *Journal of Cardiovascular Pharmacology. Journal of Cardiovascular Pharmacology* https://journals.lww.com/cardiovascularpharm/Fulltext/1997/11000/Angiotensin__1_7__and_the_Rat_Aorta__Modulation_by.19.aspx (1997).

271. Li, C. *et al.* Qishenyiqi protects ligation-induced left ventricular remodeling by attenuating inflammation and fibrosis via STAT3 and NF- κ B signaling pathway. *PLoS one* 9, (2014).
272. Yang, Y., Zhao, Y., Zhang, F., Zhang, L. & Li, L. COVID-19 in elderly adults: Clinical features, molecular mechanisms, and proposed strategies. *Aging and Disease* 11, 1481–1495 (2020).
273. Xia, X. Extreme Genomic CpG Deficiency in SARS-CoV-2 and Evasion of Host Antiviral Defense. *Molecular biology and evolution* 37, 2699–2705 (2020).
274. Deng, X. *et al.* Coronavirus nonstructural protein 15 mediates evasion of dsRNA sensors and limits apoptosis in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114, E4251–E4260 (2017).
275. Menachery, V. D., Debbink, K. & Baric, R. S. Coronavirus non-structural protein 16: evasion, attenuation, and possible treatments. *Virus research* 194, 191–199 (2014).
276. Watanabe, Y., Allen, J. D., Wrapp, D., McLellan, J. S. & Crispin, M. Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. *Science (New York, N.Y.)* 369, 330–333 (2020).
277. Chen, X. *et al.* SARS coronavirus papain-like protease inhibits the type I interferon signaling pathway through interaction with the STING-TRAF3-TBK1 complex. *Protein & cell* 5, 369–381 (2014).
278. Xia, S. *et al.* Inhibition of SARS-CoV-2 (previously 2019-nCoV) infection by a highly potent pan-coronavirus fusion inhibitor targeting its spike protein that harbors a high capacity to mediate membrane fusion. *Cell research* 30, 343–355 (2020).
279. Li, S. W. *et al.* SARS Coronavirus Papain-Like Protease Inhibits the TLR7 Signaling Pathway through Removing Lys63-Linked Polyubiquitination of TRAF3 and TRAF6. *International journal of molecular sciences* 17, (2016).
280. Taylor, J. K. *et al.* Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus ORF7a Inhibits Bone Marrow Stromal Antigen 2 Virion Tethering through a Novel Mechanism of Glycosylation Interference. *Journal of virology* 89, 11820–11833 (2015).
281. Amor, S., Fernández Blanco, L. & Baker, D. Innate immunity during SARS-CoV-2: evasion strategies and activation trigger hypoxia and vascular damage. *Clinical and experimental immunology* 202, 193–209 (2020).
282. Benedict, C. A., Norris, P. S. & Ware, C. F. To kill or be killed: viral evasion of apoptosis. *Nature Immunology* 3, 1013–1018 (2002).
283. Gu, J. & Korteweg, C. Pathology and pathogenesis of severe acute respiratory syndrome. *The American journal of pathology* 170, 1136–1147 (2007).
284. Collins, A. R. In vitro detection of apoptosis in monocytes/macrophages infected with human coronavirus. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 9, 1392–1395 (2002).
285. Yang, Y. *et al.* Bcl-xL inhibits T-cell apoptosis induced by expression of SARS coronavirus E protein in the absence of growth factors. *The Biochemical Journal* 392, 135–143 (2005).
286. Ying, T., Li, W. & Dimitrov, D. S. Discovery of T-Cell Infection and Apoptosis by Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *The Journal of infectious diseases* 213, 877–879 (2016).
287. Chu, H. *et al.* Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Efficiently Infects Human Primary T Lymphocytes and Activates the Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Pathways. *The Journal of infectious diseases* 213, 904–914 (2016).
288. Stevens, F. J. & Argon, Y. Protein folding in the ER. *Seminars in cell & developmental biology* 10, 443–454 (1999).

289. Ron, D. & Walter, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8, 519–529 (2007).
290. Fung, T. S. & Liu, D. X. Coronavirus infection, ER stress, apoptosis and innate immunity. *Frontiers in microbiology* 5, (2014).
291. Chow, K. Y. C. *et al.* Adenovirus-mediated expression of the C-terminal domain of SARS-CoV spike protein is sufficient to induce apoptosis in Vero E6 cells. *FEBS Letters* 579, 6699–6704 (2005).
292. Surjit, M., Liu, B., Jameel, S., Chow, V. T. K. & Lal, S. K. The SARS coronavirus nucleocapsid protein induces actin reorganization and apoptosis in COS-1 cells in the absence of growth factors. *The Biochemical journal* 383, 13–18 (2004).
293. Tan, Y.-J. *et al.* Overexpression of 7a, a protein specifically encoded by the severe acute respiratory syndrome coronavirus, induces apoptosis via a caspase-dependent pathway. *Journal of Virology* 78, 14043–14047 (2004).
294. Ye, Z., Wong, C. K., Li, P. & Xie, Y. A SARS-CoV protein, ORF-6, induces caspase-3 mediated, ER stress and JNK-dependent apoptosis. *Biochimica et biophysica acta* 1780, 1383–1387 (2008).
295. Sharma, K. *et al.* SARS-CoV 9b protein diffuses into nucleus, undergoes active Crm1 mediated nucleocytoplasmic export and triggers apoptosis when retained in the nucleus. *PLoS one* 6, (2011).
296. Tsoi, H. *et al.* The SARS-coronavirus membrane protein induces apoptosis via interfering with PDK1-PKB/Akt signalling. *The Biochemical journal* 464, 439–447 (2014).
297. DeDiego, M. L. *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein regulates cell stress response and apoptosis. *PLoS pathogens* 7, (2011).
298. Tan, Y.-X. *et al.* Induction of Apoptosis by the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 7a Protein Is Dependent on Its Interaction with the Bcl-X L Protein . *Journal of Virology* 81, 6346–6355 (2007).
299. Diemer, C. *et al.* Cell type-specific cleavage of nucleocapsid protein by effector caspases during SARS coronavirus infection. *Journal of molecular biology* 376, 23–34 (2008).
300. Pormohammad, A. *et al.* Comparison of confirmed COVID-19 with SARS and MERS cases-Clinical characteristics, laboratory findings, radiographic signs and outcomes: A systematic review and meta-analysis. (2020) doi:10.1002/rmv.2112.
301. Zou, L. *et al.* SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. *New England of Medicine* (2020) doi:10.1056/NEJMoa1911614.
302. Puelles, V. G. *et al.* Multiorgan and Renal Tropism of SARS-CoV-2. *The New England Journal of Medicine* 383, 590–592 (2020).
303. Lin, L. *et al.* Gastrointestinal symptoms of 95 cases with SARS-CoV-2 infection. *Gut* 69, 997–1001 (2020).
304. Huang, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *www.thelancet.com* 395, 497 (2020).
305. Mehta, P. *et al.* COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *The Lancet* 395, 1033–1034 (2020).
306. NL, P. *et al.* COVID-19: Understanding Inter-Individual Variability and Implications for Precision Medicine. *Mayo Clinic proceedings* 96, 446–463 (2021).
307. Dhama, K. *et al.* Coronavirus disease 2019–COVID-19. *Clinical Microbiology Reviews* 33, 1–48 (2020).

308. Prompetchara, E., Ketloy, C. & Palaga, T. Allergy and Immunology Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: Lessons learned from SARS and MERS epidemic. doi:10.12932/AP-200220-0772.
309. Hu, B., Guo, H., Zhou, P. & Shi, Z.-L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology* doi:10.1038/s41579-020-00459-7.
310. Dickson, R. P. Lung microbiota and COVID-19 severity Direct sampling of lung alveoli of critically-ill patients infected with SARS-CoV-2 shows that lung microbiota and an impaired alveolar immune response together are predictive of poor clinical outcomes. *Nature Microbiology* (2021) doi:10.1038/s41564-021-00969-x.
311. Hu, Y., Liang, W., Liu, L. & Li, L. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *New England Journal of Medicine* 18, 1708–1728 (2020).
312. Lu, X. et al. SARS-CoV-2 Infection in Children. *New England Journal of Medicine* (2020) doi:10.1056/NEJMoa2002032.
313. Gustav Carus Steenblock, C. C. et al. COVID-19 and metabolic disease: mechanisms and clinical management. *THE LANCET Diabetes & Endocrinology* 2021 (2021) doi:10.1016/S2213-8587(21)00244-8.
314. Coronavirus Disease 2019 in Children - United States, February 12-April 2, 2020. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report* 69, 422–426 (2020).
315. Laboratory surveillance for SARS-CoV-2 in India: Performance of testing & descriptive epidemiology of detected COVID-19, January 22 - April 30, 2020. *The Indian journal of medical research* 151, 424–437 (2020).
316. Mallapaty, S. Kids and COVID: why young immune systems are still on top. *Nature* 597, 166–168 (2021).
317. Santomauro, D. F. et al. Global prevalence and burden of depressive and anxiety disorders in 204 countries and territories in 2020 due to the COVID-19 pandemic. *The Lancet* (2021) doi:10.1016/S0140-6736(21)02143-7.
318. Hossain, M. et al. Epidemiology of mental health problems in COVID-19: a review [version 1; peer review: 2 approved] report report. *F1000Research* (2020) doi:10.12688/f1000research.24457.1.
319. Aburto, J. M. et al. Quantifying impacts of the COVID-19 pandemic through life-expectancy losses: a population-level study of 29 countries. *International Journal of Epidemiology* (2021) doi:10.1093/ije/dyab207.
320. Gupta, S., Manveen, | & Jawanda, K. The impacts of COVID-19 on children. *Acta Paediatrica* 109, 2181–2183 (2020).
321. Khetrapal, S. , & Bhatia, R. Impact of COVID-19 pandemic on health system & Sustainable Development Goal 3. *Indian J Med Res* 151 (2020) doi:10.4103/ijmr.IJMR_1920_20.
322. Editorial. Understanding long COVID: a modern medical challenge. *The Lancet* <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0140673621019000?token=4F7A4EECD95FF5B6D527CF5FF1C80770538B7D8895493CB8D63764D987500B1047DC8A42EDB6468746886CDF57574E98&originRegion=eu-west-1&originCreation=20211005100723> (2021).
323. Official statistics overview: Technical article: Updated estimates of the prevalence of post-acute symptoms among people with coronavirus (COVID-19) in the UK, 26 April 2020 to 1 August 2021 - GOV.UK. <https://www.gov.uk/government/statistics/technical-article-updated-estimates-of-the-prevalence-of-post-acute-symptoms-among-people-with-coronavirus-covid-19-in-the-uk-26-april-2020-to-1-a>.

324. Ledford, H. Do vaccines protect against long COVID? What the data say. *Nature* 599, 546–548 (2021).
325. Zumla, A., W Chan, J. F., Azhar, E. I., C Hui, D. S. & Yuen, K.-Y. Coronaviruses — drug discovery and therapeutic options. (2016) doi:10.1038/nrd.2015.37.
326. Repurposed Antiviral Drugs for Covid-19 — Interim WHO Solidarity Trial Results. *New England Journal of Medicine* 384, 497–511 (2021).
327. Welcome — RECOVERY Trial. <https://www.recoverytrial.net/>.
328. Naro` Zna, M., Zej, B., Rubi´s, R. & Kubiak, J. Z. Anti-SARS-CoV-2 Strategies and the Potential Role of miRNA in the Assessment of COVID-19 Morbidity, Recurrence, and Therapy. *International Journal of Molecular Science* (2021) doi:10.3390/ijms22168663.
329. Keyaerts, E., Vijgen, L., Maes, P., Neyts, J. & Ranst, M. van. In vitro inhibition of severe acute respiratory syndrome coronavirus by chloroquine. *The New England Journal of Medicine* (2004) doi:10.1016/j.bbrc.2004.08.085.
330. Dyall, J. *et al.* Middle East Respiratory Syndrome and Severe Acute Respiratory Syndrome: Current Therapeutic Options and Potential Targets for Novel Therapies. *Drugs* (2017) doi:10.1007/s40265-017-0830-1.
331. Keyaerts, E. *et al.* Antiviral Activity of Chloroquine against Human Coronavirus OC43 Infection in Newborn Mice. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY* 53, 3416–3421 (2009).
332. S.A. Meo, D.C. Klonof & J. Akram. Efficacy of chloroquine and hydroxychloroquine in the treatment of COVID-19. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* (2020).
333. Gasmi, A. *et al.* Chloroquine and hydroxychloroquine in the treatment of COVID-19: the never-ending story. *Applied Microbiology and Biotechnology* (2021) (2021) doi:10.1007/s00253-021-11094-4/Published.
334. Horby, P. *et al.* Effect of Hydroxychloroquine in Hospitalized Patients with Covid-19. *The New England Journal of Medicine* 21, 2030–2070 (2020).
335. Hydroxychloroquine or Chloroquine for COVID-19: Drug Safety Communication - FDA Cautions Against Use Outside of the Hospital Setting or a Clinical Trial Due to Risk of Heart Rhythm Problems | FDA. <https://www.fda.gov/safety/medical-product-safety-information/hydroxychloroquine-or-chloroquine-covid-19-drug-safety-communication-fda-cautions-against-use> (2021).
336. Gautret, P. *et al.* Hydroxychloroquine and azithromycin as a treatment of COVID-19: results of an open-label non-randomized clinical trial. *International Journal of Antimicrobial Agents* 56, 105949 (2020).
337. Morgenstern, J. *et al.* The use of compassionate Ivermectin in the management of symptomatic outpatients and hospitalized patients with clinical diagnosis of COVID-19 at the Medical Center Bournigal and the Medical Center Punta Cana, Rescue Group, Dominican Republic, from may 1 to august 10, 2020. *medRxiv* 2020.10.29.20222505 (2020) doi:10.1101/2020.10.29.20222505.
338. Cadegiani, F. A., Goren, A., Wambier, C. G. & McCoy, J. Early COVID-19 Therapy with Azithromycin Plus Nitazoxanide, Ivermectin or Hydroxychloroquine in Outpatient Settings Significantly Reduced Symptoms Compared to Known Outcomes in Untreated Patients. *medRxiv* 2020.10.31.20223883 (2020) doi:10.1101/2020.10.31.20223883.
339. Héctor, C., Roberto, H. & Eugenia, F. M. Safety and Efficacy of the combined use of ivermectin, dexamethasone, enoxaparin and aspirin against COVID 19. *medRxiv* 2020.09.10.20191619 (2020) doi:10.1101/2020.09.10.20191619.

340. Bukhari, K. H. S. *et al.* Efficacy of Ivermectin in COVID-19 Patients with Mild to Moderate Disease. *medRxiv* 2021.02.02.21250840 (2021) doi:10.1101/2021.02.02.21250840.
341. H, E. *et al.* Effect of a combination of nitazoxanide, ribavirin, and ivermectin plus zinc supplement (MANS.NRIZ study) on the clearance of mild COVID-19. *Journal of medical virology* 93, 3176–3183 (2021).
342. Chahla, R. E. *et al.* Cluster Randomised Trials - Ivermectin Repurposing For COVID-19 Treatment Of Outpatients With Mild Disease In Primary Health Care Centers. (2021) doi:10.21203/RS.3.RS-495945/V1.
343. Tanioka, H., Tanioka, S. & Kaga, K. Why COVID-19 is not so spread in Africa: How does Ivermectin affect it? *medRxiv* 2021.03.26.21254377 (2021) doi:10.1101/2021.03.26.21254377.
344. Roy, S., Samajdar, S. S., Tripathi, S. K., Mukherjee, S. & Bhattacharjee, K. Outcome of Different Therapeutic Interventions in Mild COVID-19 Patients in a Single OPD Clinic of West Bengal: A Retrospective study. *medRxiv* 2021.03.08.21252883 (2021) doi:10.1101/2021.03.08.21252883.
345. H, P.-J. *et al.* Use of ivermectin in the treatment of Covid-19: A pilot trial. *Toxicology reports* 8, 505–510 (2021).
346. La OMS recomienda usar ivermectina para el COVID-19 solo en ensayos clínicos | Noticias ONU. <https://news.un.org/es/story/2021/03/1490322>.
347. Table 2c. Ivermectin: Selected Clinical Data | COVID-19 Treatment Guidelines. <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/tables/table-2c/>.
348. La OMS recomienda usar ivermectina para el COVID-19 solo en ensayos clínicos | Noticias ONU. <https://news.un.org/es/story/2021/03/1490322>.
349. Why You Should Not Use Ivermectin to Treat or Prevent COVID-19 | FDA. <https://www.fda.gov/consumers/consumer-updates/why-you-should-not-use-ivermectin-treat-or-prevent-covid-19>.
350. Hill, A. *et al.* Meta-analysis of randomized trials of ivermectin to treat SARS-CoV-2 infection. *Open Forum Infectious Diseases* (2021) doi:10.1093/OFID/OFAB358.
351. AA, S. *et al.* Effects of a Single Dose of Ivermectin on Viral and Clinical Outcomes in Asymptomatic SARS-CoV-2 Infected Subjects: A Pilot Clinical Trial in Lebanon. *Viruses* 13, (2021).
352. Ivermectin for COVID-19: addressing potential bias and medical fraud. (2021) doi:10.21203/RS.3.RS-1003006/V1.
353. Ripoll, J. G. & et al. Convalescent Plasma for Infectious Diseases: Historical Framework and Use in COVID-19 | Elsevier Enhanced Reader. *Clinical Microbiology* <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0196439921000052?token=CC9B194CE233BC8661443CF388D170735E6EEC62D9338EF5BBD59F7C582DE6E40DD5418F0523893A20B24B3A06EF099A&originRegion=eu-west-1&originCreation=20211002125614> (2021).
354. Simonovich V. A. & et al. A Randomized Trial of Convalescent Plasma in Covid-19 Severe Pneumonia. *The New England Journal of Medicine* (2021) doi:10.1056/NEJMoa2031304.
355. RECOVERY Collaborated Group. Convalescent plasma in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised controlled, open-label, platform trial | Elsevier Enhanced Reader. *Elsevier* <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0140673621008977?token=943EF17FC25810021D5CA3076367A23E56AB2065BA86334D0C1CDA296A1A6FD2B8CEB23082B3A6C5D04C93DD8D0D8D88&originRegion=eu-west-1&originCreation=20211002130914> (2021).
356. Gupta, A. *et al.* Early Treatment for Covid-19 with SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody Sotrovimab. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2107934> (2021) doi:10.1056/NEJMoa2107934.

357. RECOVERY trial finds Regeneron’s monoclonal antibody combination reduces deaths for hospitalised COVID-19 patients who have not mounted their own immune response — RECOVERY Trial. <https://www.recoverytrial.net/news/recovery-trial-finds-regeneron2019s-monoclonal-antibody-combination-reduces-deaths-for-hospitalised-covid-19-patients-who-have-not-mounted-their-own-immune-response-1>.
358. About REGEN-COV Treatment for COVID-19. <https://www.regencov.com/patient>.
359. Weinreich, D. M. et al. REGEN-COV Antibody Combination and Outcomes in Outpatients with Covid-19. *The New England Journal of Medicine* (2021) doi:10.1056/NEJMoa2108163.
360. FDA authorizes REGEN-COV monoclonal antibody therapy for post-exposure prophylaxis (prevention) for COVID-19 | FDA. <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-authorizes-regen-cov-monoclonal-antibody-therapy-post-exposure-prophylaxis-prevention-covid-19>.
361. Wang, Y. et al. A Trial of Lopinavir–Ritonavir in Adults Hospitalized with Severe Covid-19. *The New England Journal of Medicine* (2020) doi:10.1056/NEJMoa2001282.
362. Horby, P. W. et al. Lopinavir–ritonavir in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial. *The Lancet* 396, 1345–1352 (2020).
363. Choy, K. & et al. Remdesivir, lopinavir, emetine, and homoharringtonine inhibit SARS-CoV-2 replication in vitro | Elsevier Enhanced Reader. *Antiviral Research* <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S016635422030200X?token=E175BC81EC8797F1834626A9C5D8D0C08816D40FF13376E1A701D85EA0200FBD4678D4ECA4B5714C5B062719EFA028D5&originRegion=eu-west-1&originCreation=20210923094513> (2020).
364. Yao, T.-T. et al. A systematic review of lopinavir therapy for SARS coronavirus and MERS coronavirus-A possible reference for coronavirus disease-19 treatment option. *J Med Virol* 92, 556–563 (2020).
365. Wang, Y., Grunewald, M. & Perlman, S. Coronaviruses: An Updated Overview of Their Replication and Pathogenesis. *Methods in Molecular Biology* 2203, 1–29 (2020).
366. Pujari, R., Thommana, M. v., Mercedes, B. R. & Serwat, A. Therapeutic Options for COVID-19: A Review. *Cureus* 12, (2020).
367. RECOVERY Collaborative Group. Lopinavir-ritonavir in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial |. *The Lancet* <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0140673620320134?token=687093A5BF8871F750A13B05DE80E19EC7353889F492E11511857D30A5C21AC6717CCD021E69E42E19B8BFAECC1ED637&originRegion=eu-west-1&originCreation=20211002175645> (2020).
368. Chu, C. M. et al. Role of lopinavir/ritonavir in the treatment of SARS: initial virological and clinical findings. *Thorax* 59, 252–256 (2004).
369. Sanders, J. M., Monogue, M. L., Jodlowski, T. Z. & Cutrell, J. B. Pharmacologic Treatments for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). A Review. *JAMA* (2020) doi:10.1001/jama.2020.6019.
370. Pruijssers, A. J. , & et al. Remdesivir Inhibits SARS-CoV-2 in Human Lung Cells and Chimeric SARS-CoV Expressing the SARS-CoV-2 RNA Polymerase in Mice. *Cell Reports* <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S2211124720309219?token=3ACA12ADEC9076E36E5A2490252E02C0E05359F4EF7A0758C06A3CFA724DBA52219DBFCA62397962740BA873EE0FCBE0&originRegion=eu-west-1&originCreation=20211002180738> (2020).
371. Grein, J. & et al. Compassionate Use of Remdesivir for Patients with Severe Covid-19. *The New England Journal of Medicine* (2020) doi:10.1056/NEJMoa2007016.
372. Hegerova, L. & et al. Use of convalescent plasma in hospitalized patients with COVID-19: case series. *Blood* 12528 (2020) doi:10.1001/jama.2020.10044.

373. Davies, M. *et al.* Remdesivir in Treatment of COVID-19: A Systematic Benefit-Risk Assessment. *Drug Safety* 43, 645–656 (2020).
374. Merck and Ridgeback Biotherapeutics Provide Update on Progress of Clinical Development Program for Molnupiravir, an Investigational Oral Therapeutic for the Treatment of Mild-to-Moderate COVID-19 - Merck.com. <https://www.merck.com/news/merck-and-ridgeback-biotherapeutics-provide-update-on-progress-of-clinical-development-program-for-molnupiravir-an-investigational-oral-therapeutic-for-the-treatment-of-mild-to-moderate-covid-19/>.
375. First oral antiviral for COVID-19, Lagevrio (molnupiravir), approved by MHRA - GOV.UK. <https://www.gov.uk/government/news/first-oral-antiviral-for-covid-19-lagevrio-molnupiravir-approved-by-mhra>.
376. Rowaiye, A. B. *et al.* Attenuating the Effects of Novel COVID-19 (SARS-CoV-2) Infection-Induced Cytokine Storm and the Implications. *Journal of Inflammation Research* (2021) doi:10.2147/JIR.S301784.
377. Mahase, E. Covid-19: Low dose steroid cuts death in ventilated patients by one third, trial finds. *BMJ* (2020) doi:10.1136/bmj.m2263.
378. J, L., X, Z., Y, H., H, S. & J, H. Successful use of methylprednisolone for treating severe COVID-19. *The Journal of allergy and clinical immunology* 146, 325–327 (2020).
379. Horby, P. *et al.* Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *N Engl J Med* 8, 693–704 (2021).
380. Mo, Y. & Fisher, D. A review of treatment modalities for Middle East Respiratory Syndrome. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2016) doi:10.1093/jac/dkw338.
381. Taylor, P. C. *et al.* Neutralizing monoclonal antibodies for treatment of COVID-19. *Nature Reviews Immunology* (2021) doi:10.1038/s41577-021-00542-x.
382. Gordon, A. C. *et al.* Interleukin-6 Receptor Antagonists in Critically Ill Patients with Covid-19. *N Engl J Med* 384, 1491–502 (2021).
383. RECOVERY Collaborative Group. Tocilizumab in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial. *The Lancet* <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0140673621006760?token=35BFC9033FAE19A8A4BA57E085D9857A4F1B781090678D8743EDA117E54DC44CA6F03FC3027D0153D63A87E59B011C47&originRegion=eu-west-1&originCreation=20211002190042> (2021).
384. Mehta, P., Ciurtin, C., Scully, M., Levi, M. & Chambers, R. C. JAK inhibitors in COVID-19: need for vigilance regarding increased inherent thrombotic risk. *European Respiratory Journal* (2020) doi:10.1183/13993003.01919-2020.
385. F, C. *et al.* Baricitinib therapy in COVID-19: A pilot study on safety and clinical impact. *The Journal of infection* 81, 318–356 (2020).
386. Baricitinib plus Remdesivir for Hospitalized Adults with Covid-19. *The New England Journal of Medicine* (2020) doi:10.1056/NEJMoa2031994.
387. Davoudi-Monfared, E. *et al.* A Randomized Clinical Trial of the Efficacy and Safety of Interferon-1a in Treatment of Severe COVID-19. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2020) doi:10.1128/AAC.
388. Zumla, A., W Chan, J. F., Azhar, E. I., C Hui, D. S. & Yuen, K.-Y. Coronaviruses — drug discovery and therapeutic options. *Nature Publishing Group* (2016) doi:10.1038/nrd.2015.37.
389. Wong, S. S. Y. & Yuen, K.-Y. The management of coronavirus infections with particular reference to SARS. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2008) doi:10.1093/jac/dkn243.

390. Muhammad, Y. & et al. Deficiency of antioxidants and increased oxidative stress in COVID-19 patients: A cross-sectional comparative study in Jigawa, Northwestern Nigeria. *SAGE Open Medicine* (2021) doi:10.1177/2050312121991246.
391. Brenner, H. & Schöttker, B. Vitamin D Insufficiency May Account for Almost Nine of Ten COVID-19 Deaths: Time to Act. Comment on: "Vitamin D Deficiency and Outcome of COVID-19 Patients". *Nutrients* 2020, 12, 2757. *Nutrients* 12, 3642 (2020).
392. Ali, R. M., Al-Shorbagy, M. Y., Helmy, M. W. & El-Abhar, H. S. Role of Wnt4/ β -catenin, Ang II/TGF β , ACE2, NF- κ B, and IL-18 in attenuating renal ischemia/reperfusion-induced injury in rats treated with Vit D and pioglitazone. *Molecular and Cellular Pharmacology* (2018) doi:10.1016/j.ejphar.2018.04.032.
393. H, H. & P, L. Vitamin C for preventing and treating pneumonia. *The Cochrane database of systematic reviews* 2013, (2013).
394. Cerullo, G. *et al.* The Long History of Vitamin C: From Prevention of the Common Cold to Potential Aid in the Treatment of COVID-19. *Frontiers in Immunology* 11, 1 (2020).
395. Carr, A. C. & Rowe, S. The Emerging Role of Vitamin C in the Prevention and Treatment of COVID-19. *Nutrients* (2020) doi:10.3390/nu12113286.
396. Maria Tomasa-Irriguible, T. & Bielsa-Berrocal, L. COVID-19: Up to 82% critically ill patients had low Vitamin C values. *Nutrition Journal* 20, 66 (2021).
397. Hoang, B. X., Shaw G., Fang W. & Han B. Possible application of high-dose vitamin C in the prevention and therapy of coronavirus infection. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S2213716520302587?token=707A6C0E6F1FA6F174EA72A3E55B951210ED8883FD76A1E5EF61D344EA8FE5FEB4705B942002FA62D3C59BD8C75B5E18&originRegion=eu-west-1&originCreation=20211002192418> (2020).
398. Carr, A. C. A new clinical trial to test high-dose vitamin C in patients with COVID-19. *Critical Care* (2020) doi:10.1186/s13054-020-02851-4.
399. Biesalsk, H. K. Vitamin D deficiency and co-morbidities in COVID-19 patients – A fatal relationship? *NFS Journal* <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S2352364620300067?token=5932B2D28B6E604AB0EB3FD49BFC48D02F28EBF654EC7BBE2F749F32779DBA0A872436AFF1AC31FA04A8AE3D0F462DAA&originRegion=eu-west-1&originCreation=20211003101900> (2020).
400. Razdan, K., Singh, K. , & Sing, D. Vitamin D Levels and COVID-19 Susceptibility: Is there any Correlation? *Medicine in Drug Discovery* <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S2590098620300385?token=8C8B033B77C8B3121008430593B98D96D86769FE9413703067BB57A00B1039593605C7BA10A385508F9B52CA5AB0C834&originRegion=eu-west-1&originCreation=20211003102202> (2020).
401. Powers, A. *et al.* State Epithelium While Maintaining the Antiviral Chemokines and Cytokines in Airway Linked – B κ Virus Induction of NF-Vitamin D Decreases Respiratory Syncytial. *J Immunol References* 184, 965–974 (2021).
402. Benskin, L. L. A Basic Review of the Preliminary Evidence That COVID-19 Risk and Severity Is Increased in Vitamin D Deficiency. *Frontiers in Public Health* 0, 513 (2020).
403. Sulli, A. *et al.* Vitamin D and Lung Outcomes in Elderly COVID-19 Patients. *Nutrients* (2021) doi:10.3390/nu13030717.
404. Brenner, H. Vitamin D Supplementation to Prevent COVID-19 Infections and Deaths-Accumulating Evidence from Epidemiological and Intervention Studies Calls for Immediate Action. *Nutrients* 13, 1–8 (2021).

405. Gupta, R. K. Will SARS-CoV-2 variants of concern affect the promise of vaccines? *Nature Reviews Immunology* (2021) doi:10.1038/s41577-021-00556-5.
406. COVID-19 treatments | European Medicines Agency. <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/public-health-threats/coronavirus-disease-covid-19/treatments-vaccines/covid-19-treatments>.
407. Creech, C. B., Walker, S. C. & Samuels, R. J. SARS-CoV-2 Vaccines. *JAMA* (2021) doi:10.1001/jama.2021.3199.
408. Alderson, J. *et al.* Overview of approved and upcoming vaccines for SARS-CoV-2: a living review. *Oxford Open Immunology* (2021) doi:10.1093/oxfimm/iqab010.
409. COVID-19 vaccine tracker and landscape. *World Health Organization* <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>.
410. WHO. LIST OF CANDIDATE VACCINES DEVELOPED AGAINST SARS-CoV-2. <https://www.who.int/blueprint/priority-diseases/key-action/list-of-candidate-vaccines-developed-against-sars.pdf>.
411. Thanh Le, T. *et al.* The COVID-19 vaccine development landscape. *Nature Reviews Drug Discovery* (2020) doi:10.1038/d41573-020-00073-5.
412. Mayo Clinic. Different types of COVID-19 vaccines: How they work. <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/coronavirus/in-depth/different-types-of-covid-19-vaccines/art-20506465>.
413. COVID-19 vaccines | European Medicines Agency. <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/public-health-threats/coronavirus-disease-covid-19/treatments-vaccines/covid-19-vaccines>.
414. Coronavirus (COVID-19) Vaccinations - Statistics and Research - Our World in Data. <https://ourworldindata.org/covid-vaccinations>.
415. COVAX: colaboración para un acceso equitativo mundial a las vacunas contra la COVID-19. <https://www.who.int/es/initiatives/act-accelerator/covax>.
416. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social - Profesionales - Estrategia de vacunación COVID-19 en España. <https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/vacunaCovid19.htm>.
417. Comirnaty COVID-19 vaccine: EMA recommends approval for children aged 5 to 11 | European Medicines Agency. <https://www.ema.europa.eu/en/news/comirnaty-covid-19-vaccine-ema-recommends-approval-children-aged-5-11>.
418. Kirby, T. Has Spain reached herd immunity? *The Lancet Respiratory Medicine* 0, (2021).
419. L, D. *et al.* The spike protein of SARS-CoV--a target for vaccine and therapeutic development. *Nature reviews. Microbiology* 7, 226–236 (2009).
420. L, P. *et al.* The receptor binding domain of the viral spike protein is an immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients. *Science immunology* 5, (2020).
421. Tseng, C.-T. *et al.* Immunization with SARS Coronavirus Vaccines Leads to Pulmonary Immunopathology on Challenge with the SARS Virus. *PLoS ON* (2012) doi:10.1371/journal.pone.0035421.
422. Challen, R. *et al.* Risk of mortality in patients infected with SARS-CoV-2 variant of concern 202012/1: matched cohort study. *The BMJ* (2021) doi:10.1136/bmj.n579.

423. European Centre for Diseases Prevention and Control. SARS-CoV-2 variants of concern as of 30 September 2021. <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/variants-concern>.
424. Weisblum, Y. *et al.* Escape from neutralizing antibodies by SARS-CoV-2 spike protein variants. *eLIFE* (2020) doi:10.7554/eLife.61312.
425. European Centre for Disease Prevention and Control. SARS-CoV-2 variants of concern as of 30 September 2021. <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/variants-concern> (2021).
426. Thompson M.G. & *et al.* Prevention and Attenuation of Covid-19 with the BNT162b2 and mRNA-1273 Vaccines. *The New England Journal of Medicine* (2021) doi:10.1056/NEJMoa2107058.
427. MG, T. *et al.* Interim Estimates of Vaccine Effectiveness of BNT162b2 and mRNA-1273 COVID-19 Vaccines in Preventing SARS-CoV-2 Infection Among Health Care Personnel, First Responders, and Other Essential and Frontline Workers - Eight U.S. Locations, December 2020-March 2021. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report* 70, 495–500 (2021).
428. Fowlkes, A. Effectiveness of COVID-19 Vaccines in Preventing SARS-CoV-2 Infection Among Frontline Workers Before and During B.1.617.2 (Delta) Variant Predominance — Eight U.S. Locations, December 2020–August 2021. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report* 70, 1167–1169 (2021).
429. Xie, X. *et al.* Neutralization of N501Y mutant SARS-CoV-2 by BNT162b2 vaccine-elicited sera. *BioRxiv* (2021) doi:10.1101/2021.01.07.425740.
430. Andreano, E. *et al.* SARS-CoV-2 escape from a highly neutralizing COVID-19 convalescent plasma. *PNAS* (2021) doi:10.1073/pnas.2103154118/-/DCSupplemental.
431. Mlcochova, P. *et al.* SARS-CoV-2 B.1.617.2 Delta variant replication and immune evasion. doi:10.1038/s41586-021.
432. Hoffmann, M. & *et al.* SARS-CoV-2 variant B.1.617 is resistant to bamlanivimab and evades antibodies induced by infection and vaccination. *Cell Reports* <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S2211124721008287?token=5BE1E5325282166614BF3B0D08D4105DA80A1B68E829BC049B97DEDD2246A185091496527AD04E693011847D5984E86&originRegion=eu-west-1&originCreation=20211003130540> (2021).
433. Cherian, S. *et al.* Convergent evolution of SARS-CoV-2 spike mutations, L452R, E484Q and P681R, in the second wave of COVID-19 in Maharashtra, India. *bioRxiv* 2021.04.22.440932 (2021) doi:10.1101/2021.04.22.440932.
434. Enjuanes, L. , Sola, I. , & Zúñiga, S. Virus frente a vacunas, una batalla evolutiva que debe ganar la ciencia | Vacunación COVID-19 Gobierno de España. *Estrategia de vacunación COVID-19. Gobierno de España*. <https://www.vacunacovid.gob.es/voces-expertas/virus-frente-vacunas-una-batalla-evolutiva-que-debe-ganar-la-ciencia>.
435. Dorigatti, I. *et al.* SARS-CoV-2 antibody dynamics and transmission from community-wide serological testing in the Italian municipality of Vo'. *Nature Communications* 2021 12:1 12, 1–11 (2021).
436. Liu, Y. *et al.* Neutralizing Activity of BNT162b2-Elicited Serum. *New England Journal of Medicine* 384, 1466–1468 (2021).
437. Doria-Rose, N. *et al.* Antibody Persistence through 6 Months after the Second Dose of mRNA-1273 Vaccine for Covid-19. *New England Journal of Medicine* 384, 2259–2261 (2021).
438. Zuo, J. *et al.* Robust SARS-CoV-2-specific T cell immunity is maintained at 6 months following primary infection. *Nature Immunology* 2021 22:5 22, 620–626 (2021).
439. JM, D. *et al.* Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science (New York, N.Y.)* 371, (2021).

440. Gaebler, C. *et al.* Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2. *Nature* 2021 591:7851 591, 639–644 (2021).
441. Kamar, N. *et al.* Three Doses of an mRNA Covid-19 Vaccine in Solid-Organ Transplant Recipients. *The New England Journal of Medicine* 385, 661–662 (2021).
442. Hall, V. G. *et al.* Randomized Trial of a Third Dose of mRNA-1273 Vaccine in Transplant Recipients. *The New England Journal of Medicine* 385, 1244–1246 (2021).
443. miRBase. <https://mirbase.org/>.
444. Friedländer, M. R. *et al.* Evidence for the biogenesis of more than 1,000 novel human microRNAs. *Genome Biology* 15, 1–17 (2014).
445. Tonevitsky, A. G. *et al.* Dynamically regulated miRNA-mRNA networks revealed by exercise. *BMC Physiology* 13, (2013).
446. Hausser, J. & Zavolan, M. Identification and consequences of miRNA–target interactions — beyond repression of gene expression. *Nature Reviews Genetics* 2014 15:9 15, 599–612 (2014).
447. Makarova, J. A. *et al.* Exercise immunology meets MiRNAs. *Exercise Immunology Review* 20, 135–164 (2014).
448. Jonas, S. & Izaurralde, E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nature Reviews Genetics* 2015 16:7 16, 421–433 (2015).
449. Friedman, R. C., Farh, K. K. H., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research* 19, 92–105 (2009).
450. Maltseva, D. v. *et al.* MiRNome of inflammatory breast cancer. *BMC Research Notes* 7, (2014).
451. Palanichamy, J. K. & Rao, D. S. miRNA dysregulation in cancer: Towards a mechanistic understanding. *Frontiers in Genetics* 5, (2014).
452. Ediriweera, M. K. & Cho, S. K. Targeting miRNAs by histone deacetylase inhibitors (HDACi): Rationalizing epigenetics-based therapies for breast cancer. *Pharmacology & therapeutics* 206, (2020).
453. He, B. *et al.* miRNA-based biomarkers, therapies, and resistance in Cancer. *International journal of biological sciences* 16, 2628–2647 (2020).
454. Gilam, A. *et al.* Local microRNA delivery targets Palladin and prevents metastatic breast cancer. *Nature Communications* 2016 7:1 7, 1–14 (2016).
455. Moro-Soria, A. Los microARN como biomarcadores y blancos terapéuticos en cáncer.
456. Swarbrick, S., Wragg, N., Ghosh, S. & Stolzing, A. Systematic Review of miRNA as Biomarkers in Alzheimer’s Disease. *Molecular Neurobiology* 2019 56:9 56, 6156–6167 (2019).
457. Hewel, C. *et al.* Common miRNA Patterns of Alzheimer’s Disease and Parkinson’s Disease and Their Putative Impact on Commensal Gut Microbiota. *Frontiers in neuroscience* 13, (2019).
458. Min, P. K. & Chan, S. Y. The Biology of Circulating MicroRNAs in Cardiovascular Disease. *European journal of clinical investigation* 45, 860 (2015).
459. Xu, J. *et al.* Circulating microRNAs: novel biomarkers for cardiovascular diseases. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 90, 865–875 (2012).
460. Ono, K., Kuwabara, Y. & Han, J. MicroRNAs and cardiovascular diseases. *The FEBS journal* 278, 1619–1633 (2011).
461. Creemers, E. E., Tijssen, A. J. & Pinto, Y. M. Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circulation research* 110, 483–495 (2012).

462. Bielska, A., Niemira, M. & Kretowski, A. Recent highlights of research on mirnas as early potential biomarkers for cardiovascular complications of type 2 diabetes mellitus. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 1–25 (2021).
463. Tadokoro, T., Morishita, A. & Masaki, T. Diagnosis and Therapeutic Management of Liver Fibrosis by MicroRNA. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 22 (2021).
464. Boateng, E. & Krauss-Etschmann, S. miRNAs in Lung Development and Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 21, (2020).
465. Lu, Q., Wu, R., Zhao, M., Garcia-Gomez, A. & Ballestar, E. miRNAs as Therapeutic Targets in Inflammatory Disease. *Trends in Pharmacological Sciences* 40, 853–865 (2019).
466. Chakraborty, C., Sharma, A. R., Sharma, G. & Lee, S. S. Therapeutic advances of miRNAs: A preclinical and clinical update. *Journal of Advanced Research* 28, 127–138 (2021).
467. Godnic, I. *et al.* Genome-Wide and Species-Wide In Silico Screening for Intragenic MicroRNAs in Human, Mouse and Chicken. *PLOS ONE* 8, e65165 (2013).
468. Monteys, A. M. *et al.* Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *RNA* 16, 495–505 (2010).
469. Ramalingam, P. *et al.* Biogenesis of intronic miRNAs located in clusters by independent transcription and alternative splicing. *RNA* 20, 76–87 (2014).
470. Singh, N. K. microRNAs Databases: Developmental Methodologies, Structural and Functional Annotations. *Interdisciplinary sciences, computational life sciences* 9, 357–377 (2017).
471. Huhowska, B. & Deptula, W. BIOLOGICAL ROLE OF microRNA (miRNA) - NEW DATA | Request PDF. *Postepy Biologii Komorki* 37(3):585-597 https://www.researchgate.net/publication/299019726_BIOLOGICAL_ROLE_OF_microRNA_miRNA_-_NEW_DATA (2010).
472. Barwari, T., Joshi, A. & Mayr, M. MicroRNAs in Cardiovascular Disease. *Journal of the American College of Cardiology* 68, 2577–2584 (2016).
473. Kim, Y. K., Kim, B. & Kim, V. N. Re-evaluation of the roles of DROSHA, Exportin 5, and DICER in microRNA biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113, E1881–E1889 (2016).
474. Svobodova, E., Kubikova, J. & Svoboda, P. Production of small RNAs by mammalian Dicer. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 468, 1089–1102 (2016).
475. Johanson, T. M., Lew, A. M. & Chong, M. M. W. MicroRNA-independent roles of the RNase III enzymes Drosha and Dicer. *Open biology* 3, 130144 (2013).
476. Kwon, S. C. *et al.* Structure of Human DROSHA. *Cell* 164, 81–90 (2016).
477. Sperber, H. *et al.* miRNA sensitivity to Drosha levels correlates with pre-miRNA secondary structure. *RNA (New York, N.Y.)* 20, 621–631 (2014).
478. Hammond, S. M. An overview of microRNAs. *Advanced drug delivery reviews* 87, 3–14 (2015).
479. Desvignes, T. *et al.* miRNA Nomenclature: A View Incorporating Genetic Origins, Biosynthetic Pathways, and Sequence Variants. *Trends in Genetics* 31, 613–626 (2015).
480. Liu, Y. P. *et al.* Mechanistic insights on the Dicer-independent AGO2-mediated processing of AgoRNAs. *RNA Biology* 12, 92–100 (2015).
481. Nguyen, T. A. *et al.* Functional Anatomy of the Human Microprocessor. *Cell* 161, 1374–1387 (2015).

482. Wilson, R. C. *et al.* Dicer-TRBP Complex Formation Ensures Accurate Mammalian MicroRNA Biogenesis. *Molecular Cell* 57, 397–407 (2015).
483. Guo, D., Barry, L., Lin, S. S. H., Huang, V. & Li, L. C. RNAa in action: from the exception to the norm. *RNA biology* 11, 1221–1225 (2014).
484. Gurtan, A. M. & Sharp, P. A. The Role of miRNAs in Regulating Gene Expression Networks. *Journal of Molecular Biology* 425, 3582–3600 (2013).
485. Koscianska, E., Starega-Roslan, J. & Krzyzosiak, W. J. The Role of Dicer Protein Partners in the Processing of MicroRNA Precursors. *PLoS ONE* 6, (2011).
486. Esquela-Kerscher, A. & Slack, F. J. Oncomirs - MicroRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer* 6, 259–269 (2006).
487. Mullany, L. E., Herrick, J. S., Wolff, R. K. & Slattery, M. L. MicroRNA Seed Region Length Impact on Target Messenger RNA Expression and Survival in Colorectal Cancer. *PLOS ONE* 11, e0154177 (2016).
488. Iwakawa, H. & Tomari, Y. The Functions of MicroRNAs: mRNA Decay and Translational Repression. *Trends in Cell Biology* 25, 651–665 (2015).
489. Behm-Ansmant, I. *et al.* mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes & Development* 20, 1885 (2006).
490. Jonas, S. & Izaurralde, E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nature Reviews Genetics* 2015 16:7 16, 421–433 (2015).
491. Christie, M., Boland, A., Huntzinger, E., Weichenrieder, O. & Izaurralde, E. Structure of the PAN3 pseudokinase reveals the basis for interactions with the PAN2 deadenylase and the GW182 proteins. *Molecular cell* 51, 360–373 (2013).
492. Braun, J. E. *et al.* A direct interaction between DCP1 and XRN1 couples mRNA decapping to 5' exonucleolytic degradation. *Nature structural & molecular biology* 19, 1324–1331 (2012).
493. Bartel, D. P. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* 136, 215–233 (2009).
494. Broughton, J. P., Lovci, M. T., Huang, J. L., Yeo, G. W. & Pasquinelli, A. E. Pairing beyond the Seed Supports MicroRNA Targeting Specificity. *Molecular Cell* 64, 320–333 (2016).
495. Vasudevan, S. Posttranscriptional upregulation by microRNAs. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* 3, 311–330 (2012).
496. Makarova, J. A. *et al.* Intracellular and extracellular microRNA: An update on localization and biological role. *Progress in histochemistry and cytochemistry* 51, 33–49 (2016).
497. Barman, B. & Bhattacharyya, S. N. mRNA Targeting to Endoplasmic Reticulum Precedes Ago Protein Interaction and MicroRNA (miRNA)-mediated Translation Repression in Mammalian Cells*. *undefined* 290, 24650–24656 (2015).
498. Nishi, K. *et al.* Control of the localization and function of a miRNA silencing component TNRC6A by Argonaute protein. *Nucleic acids research* 43, 9856–9873 (2015).
499. Detzer, A., Engel, C., Wünsche, W. & Sczakiel, G. Cell stress is related to re-localization of Argonaute 2 and to decreased RNA interference in human cells. *Nucleic acids research* 39, 2727–2741 (2011).
500. Bose, M., Barman, B., Goswami, A. & Bhattacharyya, S. N. Spatiotemporal Uncoupling of MicroRNA-Mediated Translational Repression and Target RNA Degradation Controls MicroRNP Recycling in Mammalian Cells. *Molecular and cellular biology* 37, (2017).

501. Gibbings, D. J., Ciaudo, C., Erhardt, M. & Voinnet, O. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nature cell biology* 11, 1143–1149 (2009).
502. Barrey, E. *et al.* Pre-microRNA and Mature microRNA in Human Mitochondria. *PLOS ONE* 6, e20220 (2011).
503. Zhang, X. *et al.* MicroRNA directly enhances mitochondrial translation during muscle differentiation. *Cell* 158, 607–619 (2014).
504. Miao, L. *et al.* A dual inhibition: microRNA-552 suppresses both transcription and translation of cytochrome P450 2E1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1859, 650–662 (2016).
505. Gagnon, K. T., Li, L., Chu, Y., Janowski, B. A. & Corey, D. R. RNAi Factors are Present and Active in Human Cell Nuclei. *Cell reports* 6, 211 (2014).
506. Roderburg, C. & Luedde, T. Circulating microRNAs as markers of liver inflammation, fibrosis and cancer. *Journal of Hepatology* 61, 1434–1437 (2014).
507. Sohn, W. *et al.* Serum exosomal microRNAs as novel biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Experimental & Molecular Medicine* 2015 47:9 47, e184–e184 (2015).
508. Pereira-da-Silva, T. *et al.* Circulating miRNAs Are Associated with the Systemic Extent of Atherosclerosis: Novel Observations for miR-27b and miR-146. *Diagnostics (Basel, Switzerland)* 11, (2021).
509. Chen, X. *et al.* Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell research* 18, 997–1006 (2008).
510. Arroyo, J. D. *et al.* Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 5003–5008 (2011).
511. Cogswell, J. P. *et al.* Identification of miRNA Changes in Alzheimer’s Disease Brain and CSF Yields Putative Biomarkers and Insights into Disease Pathways. *Journal of Alzheimer’s Disease* 14, 1–11 (2008).
512. Gallo, A., Tandon, M., Alevizos, I. & Illei, G. G. The Majority of MicroRNAs Detectable in Serum and Saliva Is Concentrated in Exosomes. *PLoS ONE* 7, 30679 (2012).
513. Zhou, Q. *et al.* Immune-related microRNAs are abundant in breast milk exosomes. *International journal of biological sciences* 8, 118–123 (2012).
514. Mitchell, P. S. *et al.* Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 10513 (2008).
515. Iftikhar, H. & Carney, G. E. Evidence and potential in vivo functions for biofluid miRNAs: From expression profiling to functional testing: Potential roles of extracellular miRNAs as indicators of physiological change and as agents of intercellular information exchange. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 38, 367–378 (2016).
516. Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A. & Burwinkel, B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Research* 39, 7223 (2011).
517. Zerneck, A. *et al.* Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Science Signaling* 2, (2009).
518. Vickers, K. C., Palmisano, B. T., Shoucri, B. M., Shamburek, R. D. & Remaley, A. T. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nature cell biology* 13, 423–435 (2011).

519. Arroyo, J. D. *et al.* Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 5003–5008 (2011).
520. Wang, K., Zhang, S., Weber, J., Baxter, D. & Galas, D. J. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic acids research* 38, 7248–7259 (2010).
521. Turchinovich, A., Weiz, L. & Burwinkel, B. Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function. *Trends in Biochemical Sciences* 37, 460–465 (2012).
522. Kosaka, N. *et al.* Secretory Mechanisms and Intercellular Transfer of MicroRNAs in Living Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 285, 17442 (2010).
523. Zhu, J. J. *et al.* VAMP3 and SNAP23 mediate the disturbed flow-induced endothelial microRNA secretion and smooth muscle hyperplasia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114, 8271–8276 (2017).
524. Gümürdü, A. *et al.* MicroRNA exocytosis by large dense-core vesicle fusion. *Scientific Reports* 2017 7:1 7, 1–10 (2017).
525. Hannafon, B. N. *et al.* Exosome-mediated microRNA signaling from breast cancer cells is altered by the anti-angiogenesis agent docosahexaenoic acid (DHA). (2012) doi:10.1186/s12943-015-0400-7.
526. Hayes, J., Peruzzi, P. P. & Lawler, S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends in molecular medicine* 20, 460–469 (2014).
527. Wang, J., Chen, J. & Sen, S. MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics. *Journal of cellular physiology* 231, 25–30 (2016).
528. Huang, W. MicroRNAs: Biomarkers, Diagnostics, and Therapeutics. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1617, 57–67 (2017).
529. Zhou, W. *et al.* Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis. *Cancer cell* 25, 501–515 (2014).
530. Hu, Y. *et al.* Exosomes from human umbilical cord blood accelerate cutaneous wound healing through miR-21-3p-mediated promotion of angiogenesis and fibroblast function. *Theranostics* 8, 169 (2018).
531. Sakha, S., Muramatsu, T., Ueda, K. & Inazawa, J. Exosomal microRNA miR-1246 induces cell motility and invasion through the regulation of DENND2D in oral squamous cell carcinoma. *Scientific Reports* 2016 6:1 6, 1–11 (2016).
532. Fabbri, M. MicroRNAs and miRceptors: a new mechanism of action for intercellular communication. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 373, (2018).
533. Fabbri, M. *et al.* MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, (2012).
534. Lehmann, S. M. *et al.* An unconventional role for miRNA: let-7 activates Toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration. *Nature neuroscience* 15, 827–835 (2012).
535. Chen, X., Liang, H., Zhang, J., Zen, K. & Zhang, C. Y. Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. *Trends in cell biology* 22, 125–132 (2012).
536. Xu, J., Chen, Q., Zen, K., Zhang, C. & Zhang, Q. Synaptosomes secrete and uptake functionally active microRNAs via exocytosis and endocytosis pathways. *Journal of Neurochemistry* 124, 15–25 (2013).

537. Tian, T. *et al.* Exosome Uptake through Clathrin-mediated Endocytosis and Macropinocytosis and Mediating miR-21 Delivery. *The Journal of Biological Chemistry* 289, 22258 (2014).
538. Chen, C., Tan, R., Wong, L., Fekete, R. & Halsey, J. Quantitation of microRNAs by real-time RT-qPCR. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 687, 113–134 (2011).
539. Lan, H., Lu, H., Wang, X. & Jin, H. MicroRNAs as Potential Biomarkers in Cancer: Opportunities and Challenges. *BioMed Research International* 2015, (2015).
540. Acunzo, M., Romano, G., Wernicke, D. & Croce, C. M. MicroRNA and cancer--a brief overview. *Advances in biological regulation* 57, 1–9 (2015).
541. Solé, C., Moliné, T., Vidal, M., Ordi-Ros, J. & Cortés-Hernández, J. An Exosomal Urinary miRNA Signature for Early Diagnosis of Renal Fibrosis in Lupus Nephritis. *Cells* 8, 773 (2019).
542. Xiong, D. D. *et al.* A nine-miRNA signature as a potential diagnostic marker for breast carcinoma: An integrated study of 1,110 cases. *Oncology Reports* 37, 3297–3304 (2017).
543. Montag, J. *et al.* Upregulation of miRNA hsa-miR-342-3p in experimental and idiopathic prion disease. (2009) doi:10.1186/1750-1326-4-36.
544. Biswas, S., Haleyuririsetty, M., Lee, S., Hewlett, I. & Devadas, K. Development and validation of plasma miRNA biomarker signature panel for the detection of early HIV-1 infection. *EBioMedicine* 43, 307–316 (2019).
545. Lyu, L. *et al.* Small RNA profiles of serum exosomes derived from individuals with latent and active tuberculosis. *Frontiers in Microbiology* 10, (2019).
546. Li, J. jing *et al.* Identification of potential whole blood MicroRNA biomarkers for the blood stage of adult imported falciparum malaria through integrated mRNA and miRNA expression profiling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 506, 471–477 (2018).
547. Duy, J. *et al.* Circulating microRNA profiles of Ebola virus infection. *Scientific Reports* 2016 6:1 6, 1–13 (2016).
548. Drury, R. E., O'Connor, D. & Pollard, A. J. The clinical application of MicroRNAs in infectious disease. *Frontiers in Immunology* 8, (2017).
549. Correia, C. N. *et al.* Circulating microRNAs as potential biomarkers of infectious disease. *Frontiers in Immunology* 8, (2017).
550. Ali Hosseini Rad, S. M. & McLellan, A. D. Implications of SARS-CoV-2 Mutations for Genomic RNA Structure and Host microRNA Targeting. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 1–18 (2020).
551. Scheel, T. K. H. *et al.* A Broad RNA Virus Survey Reveals Both miRNA Dependence and Functional Sequestration. (2016) doi:10.1016/j.chom.2016.02.007.
552. Trobaugh, D. W. & Klimstra, W. B. MicroRNA Regulation of RNA Virus Replication and Pathogenesis. *Trends in molecular medicine* 23, 80–93 (2017).
553. Chauhan, N., Jaggi, M., Chauhan, S. C. & Yallapu, M. M. COVID-19: fighting the invisible enemy with microRNAs. *Expert review of anti-infective therapy* 19, 137–145 (2021).
554. Li, Y. & Kowdley, K. v. MicroRNAs in Common Human Diseases. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 10, 246–253 (2012).
555. Watanabe, Y., Kishi, A., Yachie, N., Kanai, A. & Tomita, M. Computational analysis of microRNA-mediated antiviral defense in humans. *FEBS Letters* 581, 4603–4610 (2007).
556. Lagatie, O., Tritsmans, L. & Stuyver, L. J. The miRNA world of polyomaviruses. *Virology Journal* 10, 1 (2013).

557. Barbu, M. G. *et al.* MicroRNA Involvement in Signaling Pathways During Viral Infection. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8, 143 (2020).
558. Bernier, A. & Sagan, S. M. The Diverse Roles of microRNAs at the Host–Virus Interface. *Viruses* 2018, Vol. 10, Page 440 10, 440 (2018).
559. Kincaid, R. P. & Sullivan, C. S. Virus-Encoded microRNAs: An Overview and a Look to the Future. *PLOS Pathogens* 8, e1003018 (2012).
560. Skalsky, R. L. & Cullen, B. R. Viruses, microRNAs, and host interactions. *Annual review of microbiology* 64, 123–141 (2010).
561. Boss, I. W. & Renne, R. Viral miRNAs: tools for immune evasion. *Current opinion in microbiology* 13, 540 (2010).
562. Dudda, J. C. *et al.* MicroRNA-155 Is Required for Effector CD8+ T Cell Responses to Virus Infection and Cancer. *Immunity* 38, 742–753 (2013).
563. Lind, E. F., Elford, A. R. & Ohashi, P. S. Micro-RNA 155 is required for optimal CD8+ T cell responses to acute viral and intracellular bacterial challenges. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 190, 1210–1216 (2013).
564. Lind, E. F. & Ohashi, P. S. Mir-155, a central modulator of T-cell responses. *European journal of immunology* 44, 11–15 (2014).
565. Tribolet, L. *et al.* MicroRNA Biomarkers for Infectious Diseases: From Basic Research to Biosensing. *Frontiers in microbiology* 11, (2020).
566. Grasselli, G. *et al.* Risk Factors Associated With Mortality Among Patients With COVID-19 in Intensive Care Units in Lombardy, Italy. *JAMA Internal Medicine* 180, 1345–1355 (2020).
567. Grasselli, G. *et al.* Baseline Characteristics and Outcomes of 1591 Patients Infected With SARS-CoV-2 Admitted to ICUs of the Lombardy Region, Italy. *JAMA* 323, 1574–1581 (2020).
568. Gupta, R. K. *et al.* Systematic evaluation and external validation of 22 prognostic models among hospitalised adults with COVID-19: an observational cohort study. *European Respiratory Journal* 56, (2020).
569. Shen, B. *et al.* Proteomic and Metabolomic Characterization of COVID-19 Patient Sera. *Cell* 182, 59-72.e15 (2020).
570. Lin, B. R. & Liu, W. P. Analysis of a three-level bidirectional ZVS resonant converter. *Applied Sciences (Switzerland)* 10, 1–18 (2020).
571. Khan, M. A. A. K., Sany, M. R. U., Islam, M. S. & Islam, A. B. M. M. K. Epigenetic Regulator miRNA Pattern Differences Among SARS-CoV, SARS-CoV-2, and SARS-CoV-2 World-Wide Isolates Delineated the Mystery Behind the Epic Pathogenicity and Distinct Clinical Characteristics of Pandemic COVID-19. *Frontiers in genetics* 11, (2020).
572. Demirci, M. D. S. & Adan, A. Computational analysis of microRNA-mediated interactions in SARS-CoV-2 infection. *PeerJ* 8, (2020).
573. Sarma, A., Phukan, H., Halder, N. & Madanan, M. G. An in-silico approach to study the possible interactions of miRNA between human and SARS-CoV2. *Computational Biology and Chemistry* 88, 107352 (2020).
574. Saini, S. *et al.* Genome-wide computational prediction of miRNAs in severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) revealed target genes involved in pulmonary vasculature and antiviral innate immunity. *Molecular Biology Research Communications* 9, 83–91 (2020).
575. Ahmed, S. S. S. J. *et al.* Regulatory Cross Talk Between SARS-CoV-2 Receptor Binding and Replication Machinery in the Human Host. *Frontiers in physiology* 11, (2020).

576. S, F. *et al.* COVID-19 Virulence in Aged Patients Might Be Impacted by the Host Cellular MicroRNAs Abundance/Profile. *Aging and disease* 11, 509–522 (2020).
577. Arisan, E. D. *et al.* The Prediction of miRNAs in SARS-CoV-2 Genomes: hsa-miR Databases Identify 7 Key miRs Linked to Host Responses and Virus Pathogenicity-Related KEGG Pathways Significant for Comorbidities. *Viruses* 2020, Vol. 12, Page 614 12, 614 (2020).
578. Balmeh, N., Mahmoudi, S., Mohammadi, N. & Karabedianhajiabadi, A. Predicted therapeutic targets for COVID-19 disease by inhibiting SARS-CoV-2 and its related receptors. *Informatics in medicine unlocked* 20, (2020).
579. Chen, L. & Zhong, L. Genomics functional analysis and drug screening of SARS-CoV-2. *Genes & Diseases* 7, 542–550 (2020).
580. Haddad, H. & Walid Al-Zyoud. miRNA target prediction might explain the reduced transmission of SARS-CoV-2 in Jordan, Middle East. *Non-coding RNA Research* 5, 135–143 (2020).
581. Srivastava, R., Daulatabad, S. V., Srivastava, M. & Janga, S. C. Role of SARS-CoV-2 in Altering the RNA-Binding Protein and miRNA-Directed Post-Transcriptional Regulatory Networks in Humans. *International journal of molecular sciences* 21, 1–18 (2020).
582. Mukherjee, M. & Goswami, S. Global cataloguing of variations in untranslated regions of viral genome and prediction of key host RNA binding protein-microRNA interactions modulating genome stability in SARS-CoV-2. *PLOS ONE* 15, e0237559 (2020).
583. Nersisyan, S. A., Shkurnikov, M. Y., Osipyants, A. I. & Vechorko, V. I. Role of ACE2/TMPRSS2 genes regulation by intestinal microRNA isoforms in the covid-19 pathogenesis. *Bulletin of Russian State Medical University* 16–18 (2020) doi:10.24075/BRSMU.2020.024.
584. Chow, J. T. S. & Salmena, L. Prediction and Analysis of SARS-CoV-2-Targeting MicroRNA in Human Lung Epithelium. *Genes* 11, 1–12 (2020).
585. Sardar, R., Satish, D., Birla, S. & Gupta, D. Integrative analyses of SARS-CoV-2 genomes from different geographical locations reveal unique features potentially consequential to host-virus interaction, pathogenesis and clues for novel therapies. *Heliyon* 6, (2020).
586. Politano, G. & Benso, A. IL6-mediated HCoV-host interactome regulatory network and GO/Pathway enrichment analysis. *PLOS Computational Biology* 16, e1008238 (2020).
587. Taz, T. A. *et al.* Network-based identification genetic effect of SARS-CoV-2 infections to Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) patients. *Briefings in bioinformatics* 22, 1254–1266 (2021).
588. Vastrad, B., Vastrad, C. & Tengli, A. Identification of potential mRNA panels for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (COVID-19) diagnosis and treatment using microarray dataset and bioinformatics methods. *3 Biotech* 2020 10:10 10, 1–65 (2020).
589. Khan, A. T. A., Khalid, Z., Zahid, H., Yousaf, M. A. & Shakoori, A. R. A computational and bioinformatic analysis of ACE2: an elucidation of its dual role in COVID-19 pathology and finding its associated partners as potential therapeutic targets. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* (2020) doi:10.1080/07391102.2020.1833760/SUPPL_FILE/TBSD_A_1833760_SM8447.DOCX.
590. Lu, D. *et al.* MicroRNAs targeting the SARS-CoV-2 entry receptor ACE2 in cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 148, 46–49 (2020).
591. Zhang, H. *et al.* Expression of the SARS-CoV-2 ACE2 receptor in the human airway epithelium. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 202, 219–229 (2020).
592. Mukhopadhyay, D. & Mussa, B. M. Identification of Novel Hypothalamic MicroRNAs as Promising Therapeutics for SARS-CoV-2 by Regulating ACE2 and TMPRSS2 Expression: An In Silico Analysis. *Brain Sciences* 2020, Vol. 10, Page 666 10, 666 (2020).

593. Nersisyan, S. A., Shkurnikov, M. Y., Osipyants, A. I. & Vechorko, V. I. Role of ACE2/TMPRSS2 genes regulation by intestinal microRNA isoforms in the covid-19 pathogenesis. *Bulletin of Russian State Medical University* 16–18 (2020) doi:10.24075/BRSMU.2020.024.
594. Paniri, A., Hosseini, M. M. & Akhavan-Niaki, H. First comprehensive computational analysis of functional consequences of TMPRSS2 SNPs in susceptibility to SARS-CoV-2 among different populations. *Journal of biomolecular structure & dynamics* 39, 1–18 (2021).
595. Lu, D. *et al.* MicroRNAs targeting the SARS-CoV-2 entry receptor ACE2 in cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 148, 46–49 (2020).
596. Chow, J. T. S. & Salmena, L. Prediction and Analysis of SARS-CoV-2-Targeting MicroRNA in Human Lung Epithelium. *Genes* 11, 1–12 (2020).
597. Li, C., Hu, X., Li, L. & Li, J. hui. Differential microRNA expression in the peripheral blood from human patients with COVID-19. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 34, (2020).
598. Maitra, A. *et al.* Mutations in SARS-CoV-2 viral RNA identified in Eastern India: Possible implications for the ongoing outbreak in India and impact on viral structure and host susceptibility. *Journal of Biosciences* 45, 1–18 (2020).
599. Chen, L., Zhou, Y. & Li, H. LncRNA, miRNA and lncRNA-miRNA interaction in viral infection. *Virus Research* 257, 25–32 (2018).
600. Bartoszewski, R. *et al.* SARS-CoV-2 may regulate cellular responses through depletion of specific host miRNAs. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 319, L444–L455 (2020).
601. Guterres, A., de Azeredo Lima, C. H., Miranda, R. L. & Gadelha, M. R. What is the potential function of microRNAs as biomarkers and therapeutic targets in COVID-19? *Infection, Genetics and Evolution* 85, 104417 (2020).
602. GONZALO-CALVO, D. de *et al.* Circulating microRNA profiles predict the severity of COVID-19 in hospitalized patients. *Translational Research* 236, 147 (2021).
603. Rupaimoole, R. & Slack, F. J. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nature Reviews Drug Discovery* 2017 16:3 16, 203–222 (2017).
604. Fu, Y., Chen, J. & Huang, Z. Recent progress in microRNA-based delivery systems for the treatment of human disease. *ExRNA* 2019 1:1 1, 1–14 (2019).
605. Lee, S. W. L. *et al.* MicroRNA delivery through nanoparticles. *Journal of Controlled Release* 313, 80–95 (2019).
606. Fernandez-Piñeiro, I., Badiola, I. & Sanchez, A. Nanocarriers for microRNA delivery in cancer medicine. *Biotechnology Advances* 35, 350–360 (2017).
607. Bai, Z. *et al.* Non-viral nanocarriers for intracellular delivery of microRNA therapeutics. *Journal of Materials Chemistry B* 7, 1209–1225 (2019).
608. Yang, N. An overview of viral and nonviral delivery systems for microRNA. *International Journal of Pharmaceutical Investigation* 5, 179 (2015).
609. Ganju, A. *et al.* miRNA nanotherapeutics for cancer. *Drug discovery today* 22, 424–432 (2017).
610. Martirosyan, A., Olesen, M. J. & Howard, K. A. Chitosan-based nanoparticles for mucosal delivery of RNAi therapeutics. *Advances in genetics* 88, 325–352 (2014).
611. Chen, Y. & Wang, X. miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic acids research* 48, D127–D131 (2020).

612. Agarwal, V., Bell, G. W., Nam, J. W. & Bartel, D. P. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife* 4, (2015).
613. Chang, L., Zhou, G., Soufan, O. & Xia, J. miRNet 2.0: network-based visual analytics for miRNA functional analysis and systems biology. *Nucleic acids research* 48, W244–W251 (2020).
614. Szklarczyk, D. *et al.* The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic acids research* 49, D605–D612 (2021).
615. Rennie, W. *et al.* Sfold Tools for MicroRNA Target Prediction. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1970, 31–42 (2019).
616. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25, 402–408 (2001).
617. Agarwal, V., Bell, G. W., Nam, J. W. & Bartel, D. P. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife* 4, (2015).
618. Cucinotta, D. & Vanelli, M. WHO Declares COVID-19 a Pandemic. *Acta bio-medica : Atenei Parmensis* 91, 157–160 (2020).
619. Aydemir, M. N. *et al.* Computationally predicted SARS-CoV-2 encoded microRNAs target NFKB, JAK/STAT and TGFB signaling pathways. *Gene Reports* 22, (2021).
620. Satyam, R. *et al.* miRNAs in SARS-CoV 2: A Spoke in the Wheel of Pathogenesis. *Current pharmaceutical design* 27, 1628–1641 (2021).
621. Chow, J. T. S. & Salmena, L. Prediction and Analysis of SARS-CoV-2-Targeting MicroRNA in Human Lung Epithelium. *Genes* 11, 1–12 (2020).
622. Ali Hosseini Rad, S. M. & McLellan, A. D. Implications of SARS-CoV-2 Mutations for Genomic RNA Structure and Host microRNA Targeting. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol. 21, Page 4807 21, 4807 (2020).
623. Hassanpour, M., Rezaie, J., Nouri, M. & Panahi, Y. The role of extracellular vesicles in COVID-19 virus infection. *Infection, Genetics and Evolution* vol. 85 (2020).
624. Abedi, F., Rezaee, R., Hayes, A. W., Nasiripour, S. & Karimi, G. MicroRNAs and SARS-CoV-2 life cycle, pathogenesis, and mutations: biomarkers or therapeutic agents? *Cell Cycle* vol. 20 143–153 (2021).
625. Baldassarre, A. *et al.* Potential use of noncoding RNAs and innovative therapeutic strategies to target the 5'UTR of SARS-CoV-2. *Epigenomics* 12, 1349–1361 (2020).
626. Henzinger, H., Barth, D. A., Klec, C. & Pichler, M. Non-Coding RNAs and SARS-Related Coronaviruses. *Viruses* 12, (2020).
627. Kim, W. R. *et al.* Expression analyses of micrnas in hamster lung tissues infected by sars-cov-2. *Molecules and Cells* 43, 953–963 (2020).
628. Junutula, J. R. *et al.* Rab14 is involved in membrane trafficking between the Golgi complex and endosomes. *Molecular biology of the cell* 15, 2218–2229 (2004).
629. Yamamoto, H. *et al.* Functional cross-talk between Rab14 and Rab4 through a dual effector, RUFY1/Rabip4. *Molecular biology of the cell* 21, 2746–2755 (2010).
630. Lindsay, A. J. & McCaffrey, M. W. Rab antibody characterization: comparison of Rab14 antibodies. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1298, 161–171 (2015).
631. Kaur, T. *et al.* Tmprss2 specific miRNAs as promising regulators for SARS-CoV-2 entry checkpoint. *Virus Research* 294, (2021).

632. Wu, F. *et al.* Immune-related miRNA-mRNA regulation network in the livers of DHAV-3-infected ducklings. *BMC genomics* 21, (2020).
633. Kumar, M. & Nerurkar, V. R. Integrated analysis of microRNAs and their disease related targets in the brain of mice infected with West Nile virus. *Virology* 452–453, 143–151 (2014).
634. Cazorla-Rivero, S. *et al.* Circulating miR-1246 in the Progression of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) in Patients from the BODE Cohort. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease* 15, 2727–2737 (2020).
635. Zhang, W. C. *et al.* Tumour-initiating cell-specific miR-1246 and miR-1290 expression converge to promote non-small cell lung cancer progression. *Nature communications* 7, (2016).
636. Zhang, H. *et al.* Expression of the SARS-CoV-2 ACE2 Receptor in the Human Airway Epithelium. *American journal of respiratory and critical care medicine* 202, 219–229 (2020).
637. Liu, Q. *et al.* miRNA-200c-3p is crucial in acute respiratory distress syndrome. *Cell discovery* 3, (2017).
638. Ji, B. *et al.* Identification of an 8-miRNA signature as a potential prognostic biomarker for glioma. *PeerJ* 8, e9943 (2020).
639. Farr, R. J. *et al.* Altered microRNA expression in COVID-19 patients enables identification of SARS-CoV-2 infection. *PLOS Pathogens* 17, e1009759 (2021).
640. Zhu, Y. *et al.* Identification of a serum microRNA expression signature for detection of lung cancer, involving miR-23b, miR-221, miR-148b and miR-423-3p. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 114, 6–11 (2017).
641. Vegh, P. *et al.* MicroRNA profiling of the bovine alveolar macrophage response to Mycobacterium bovis infection suggests pathogen survival is enhanced by microRNA regulation of endocytosis and lysosome trafficking. *Tuberculosis* 95, 60–67 (2015).
642. Giannis, D., Ziogas, I. A. & Gianni, P. Coagulation disorders in coronavirus infected patients: COVID-19, SARS-CoV-1, MERS-CoV and lessons from the past. *Journal of Clinical Virology*. 127, (2020).