



**Universidad**  
Zaragoza

## Trabajo Fin de Máster

ANÁLISIS DE LAS QUITINASAS PLASMÁTICAS EN EL  
SARS-COV-2: ESTUDIO DE NUEVOS  
BIOMARCADORES

ANALYSIS OF PLASMA CHITINASES IN SARS-COV-2: A  
NEW BIOMARKER STUDY

Autor/es

Laura García Zafra

Director/es

Sebastián Menao Guillén

Facultad de medicina

Año 2020-2021

# ÍNDICE

1. GLOSARIO DE ABREVIATURAS.....	3
2. RESUMEN.....	4
3. ABSTRACT.....	5
4. INTRODUCCIÓN .....	7
4.1. Antecedentes y estado actual de los conocimientos científicos..	7
4.2. Características del SARS-CoV-2.....	8
4.3. Características de la quitotriosidasa.....	8
5. OBJETIVOS.....	11
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	11
6.1. Variables.....	11
6.1.1. Sujetos de estudio.....	11
6.1.2. Recogida y análisis de datos.....	11
6.2. Procedimiento.....	12
6.2.1. Amplificación de DNA.....	12
6.2.2. Secuenciación de DNA.....	12
6.3. Aspectos éticos.....	13
7. RESULTADOS.....	14
7.1. Relación entre la presencia de la mutación en el gen <i>CHIT1</i> y la probabilidad de desarrollar la enfermedad COVID-19.....	15
7.2. Relación entre la frecuencia alélica de la población y la evolución de la enfermedad causada por el SARS-CoV-2.....	17
8. DISCUSIÓN.....	19
9. BIBLIOGRAFÍA.....	21

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

**SARS-CoV-2:** Coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo

**RNA:** Ácido ribonucleico

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**ACE2:** Enzima convertidora de angiotensina 2

**IL-6:** Interleucina 6

**CHIT1:** Quitotriosidasa 1

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral-alfa

**NF- $\kappa$ B:** Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

**NOD2:** Dominio de oligomerización por unión de nucleótidos

**TLR:** Receptores de tipo Toll

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**mRNA:** Ácido ribonucleico mensajero

**Bp:** Pares de bases

**NLR:** Relación neutrófilos-linfocitos

**PCR:** Proteína C reactiva

**VSG:** Velocidad de sedimentación globular

**PCT:** Procalcitonina

**CK:** Creatina quinasa

**AST:** Aspartato amino transferasa

**CID:** Coagulación intravascular diseminada

**SDRA:** Síndrome de dificultad respiratoria aguda

**APN:** Amino peptidasa N humana

**DPP4:** Dipeptidil-peptidasa-4

**DNTP:** Desoxinucleótidos trifosfato

**IL-1 $\beta$ :** Interleucina-1-beta

**IP-10:** Proteína inducible 10

**GM-CSF:** Factor estimulante de colonias de macrófagos-granulocitos

**IFN- $\gamma$ :** Interferón-gamma

**DM2:** Diabetes Mellitus de tipo 2

**ADMA:** Dimetilarginina asimétrica

**DATP:** Desoxiadenosina trifosfato

**DTTP:** Desoxitimidina trifosfato

**DGTP:** Desoxiguanosina trifosfato

**DCTP:** Desoxicitosina trifosfato

**DdATP:** Didesoxiadenosina trifosfato

**DdTTP:** Didesoxitimidina trifosfato

**DdGTP:** Didesoxiguanosina trifosfato

**DdCTP:** Didesoxicitosina trifosfato

## RESUMEN

### Introducción

La CHIT1 es una enzima cuya función principal es la hidrólisis de quitina. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que también desempeña un papel fundamental en la activación del sistema inmunitario, tanto a nivel de la respuesta innata como adaptativa. Esta enzima es codificada por el gen *CHIT1*. Una mutación recurrente, c.1049\_1072dup (p.Trp358Ter) (rs3831317), consistente en una duplicación de 24 bp en el exón 10, da lugar a un mRNA con una delección de 87 nucleótidos que induce una ausencia parcial o total de actividad quitotriosidasa. Aproximadamente un 1,2 % de la población tiene un déficit absoluto o completo de actividad quitotriosidasa, que se transmite de forma autosómica recesiva, siendo la prevalencia de portadores de un 16 %. Debido a que esta enzima estimula la proliferación macrofágica, su actividad ha sido propuesta como un marcador de acúmulo de macrófagos en varias enfermedades como la enfermedad de Gaucher, la arteriosclerosis, o la Esclerosis Múltiple. En este trabajo se pretende estudiar la importancia de esta mutación de la CHIT1 en la COVID-19.

### Objetivos

- Correlacionar la gravedad de la clínica de la cohorte de pacientes con SARS-COV-2 con el SNP rs3831317 del gen *CHIT1*.

### Metodología

Se realizó un estudio observacional, longitudinal, no intervencionista, de cohorte prospectiva, pareado por edad y género y con carácter analítico. En el que analizaron las muestras de 80 pacientes diagnosticados de COVID-19 en el HCU "Lozano Blesa" de Zaragoza. Los controles, fueron 80 sujetos procedentes del Banco de Sangre y Tejidos de Aragón.

### Resultados

Se relacionó la frecuencia alélica con la gravedad de la COVID-19, obteniendo diferencias estadísticamente significativas.

### Discusión

Este Trabajo de Fin de Máster se centra en el estudio genético del gen *CHIT1* y su relación con la COVID-19. En este estudio sí que se ha podido comprobar que los individuos con la mutación en heterocigosis desarrollan una clínica con una sintomatología más grave que aquellos con un genotipo wild type, cuya clínica es más moderada. Por otra parte, en individuos homocigotos para la mutación no se ha detectado una clínica grave asociada a la enfermedad, probablemente debido al bajo número de pacientes que presentaron dicha condición genética, que no ha permitido obtener resultados representativos en este aspecto. Por otro lado, no se ha podido demostrar que exista una correlación entre ser portador de la mutación y desarrollar la COVID-19.

## **Conclusiones**

Aquellos pacientes portadores de mutación en el gen *CHIT1* tienen más riesgo de desarrollar una clínica más grave de la COVID-19.

## **Palabras clave**

*CHIT1*, heterocigosis, homocigosis, SARS-CoV-2.

## **ABSTRACT**

### **Introduction**

*CHIT1* is an enzyme whose main function is the hydrolysis of chitin. However, recent studies have shown that it also plays a fundamental role in the activation of the immune system, both at the level of the innate and adaptive response. This enzyme is encoded by *CHIT1* whose mutation, c.1049\_1072dup (p.Trp358Ter) (rs3831317), consisting of a 24 bp duplication in exon 10, results in an mRNA with a deletion of 87 nucleotides that induces a partial or total absence of chitotriosidase activity. Approximately 1,2 % of the population has an absolute or complete deficit of chitotriosidase activity, which is transmitted in an autosomal recessive manner, with a carrier prevalence of 16 %. Because this enzyme stimulates macrophage proliferation, its activity has been proposed as a marker of macrophage accumulation in several diseases such as Gaucher disease, arteriosclerosis, or Multiple Sclerosis. In this work we aim to study the importance of *CHIT1* in COVID-19.

### **Objective**

To correlate the clinical severity of SARS-COV-2 patients with SNP rs3831317 of *CHIT1*.

### **Material and method**

An observational, longitudinal, non-interventional, prospective cohort, age- and gender-matched, analytical study was performed. Samples from 80 patients diagnosed with COVID-19 of the HCU Lozano Blesa of Zaragoza were analyzed. The controls were 80 subjects from the Blood and Tissue Bank of Aragon.

### **Results**

Allele frequency was related to COVID-19 severity, obtaining statistically significant differences.

### **Discussion**

This Master's thesis focuses on the genetic study of the *CHIT1* gene and its relationship with COVID-19. In this study it has been found that individuals with the mutation in heterozygosis develop a more severe clinical symptomatology than those with a wild type genotype, whose clinical manifestations are more moderate. On the other hand, in individuals homozygous for the mutation, severe clinical symptoms associated with the disease have not been detected, probably due to the low number of patients who presented this genetic condition, which has not allowed us to obtain representative

results in this aspect. On the other hand, it has not been possible to demonstrate a correlation between being a carrier of the mutation and developing COVID-19.

**Conclusions**

Those patients carrying the mutation are at higher risk of developing more severe clinical COVID-19.

**Key words**

CHIT1, homozygosis, heterozygosis, SARS-CoV-2.

## INTRODUCCIÓN

### 1. Antecedentes y estado actual de los conocimientos científicos

El 31 de diciembre de 2019 las Autoridades de la República Popular China, comunicaron a la Organización Mundial de la Salud varios casos de neumonía de etiología desconocida en Wuhan, una ciudad situada en la provincia china de Hubei. Una semana más tarde confirmaron que se trataba de un nuevo coronavirus, denominado SARS-CoV-2. Al igual que otros de la familia de los coronavirus, este virus causa diversas manifestaciones clínicas englobadas bajo el término Covid-19, que incluyen cuadros respiratorios que varían desde el resfriado común hasta episodios de neumonía grave con síndrome de distrés respiratorio, shock séptico y fallo multiorgánico.

Covid-19 es una nueva enfermedad causada por el coronavirus SARS-CoV-2. Se han propuesto distintos modelos fisiopatológicos para explicar esta enfermedad, el más aceptado actualmente es el que distingue 3 fases o estadios fisiopatológicos en función del tiempo de evolución de la enfermedad: fase 1) de infección viral, fase 2) o de infección pulmonar y, fase 3) de actividad inflamatoria. Sin embargo, existen serias dudas acerca de este modelo fisiopatológico, además de presentar el inconveniente de que no responde a la mayor parte de las cuestiones que hacen referencia al por qué y al cómo enferman los pacientes.

La gravedad de la infección pone de manifiesto la necesidad de tomar decisiones terapéuticas en un contexto de gran incertidumbre. Esto, unido a la gran fragilidad de muchos de los pacientes afectados por esta entidad, da lugar a que la toma de decisiones se base en un adecuado balance beneficio/riesgo, que pasa por considerar de forma equilibrada no sólo los beneficios deseados, sino también los perjuicios posibles.

Desde un punto de vista fisiopatológico se sabe que (1):

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

La identificación de biomarcadores en el laboratorio capaces de clasificar a los pacientes en función de su riesgo es esencial para poder garantizar un tratamiento rápido y eficaz

de la infección por SARS-CoV-2. Se han identificado los siguientes biomarcadores hematológicos (recuento de linfocitos, recuento de neutrófilos y NLR), inflamatorios (PCR, VSG, PCT), inmunológicos (IL-6) y bioquímicos (dímero D, CHIT1, troponina, CK, AST), especialmente los relacionados con la CID y el SDRA.

## 2. Características del SARS-CoV-2

A finales de diciembre de 2019, varios centros sanitarios de Wuhan, en la provincia China de Hubei, notificaron la aparición de una neumonía de etiología desconocida en numerosos pacientes. Estos pacientes mostraban síntomas de neumonía de origen vírico, entre los que se incluían fiebre, tos y molestias en el pecho y, en los casos más graves, disnea e infiltración pulmonar bilateral (2). Equipos científicos independientes chinos aislaron el virus y realizaron la secuenciación de su ARN a partir de muestras de líquidos de lavados broncoalveolares de pacientes infectados, descubriendo que se trataba de un betacoronavirus de reciente aparición (3-4). El 11 de febrero, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus denominó al nuevo coronavirus "SARS-CoV-2", y la OMS denominó a la enfermedad "Covid-19" (5). La pandemia generada por este nuevo coronavirus supone un reto científico, médico y social. Se trata de un virus con envoltura y ARN monocatenario de sentido positivo (6). El primer paso de la infección por coronavirus conlleva la unión específica de la proteína espícula del virus a unos receptores, entre los que se incluyen la ACE2, la APN, y la DPP4 (7). La expresión y la distribución tisular de estos receptores influyen, por tanto, en el tropismo y la patogenicidad del virus. El SARS-CoV-2 presenta una evolución impredecible, que puede desarrollarse rápidamente causando complicaciones graves y mortales. Numerosos estudios han establecido que la respuesta inflamatoria provocada por este virus es una de las principales causas de la gravedad de la enfermedad y de la muerte de pacientes infectados.

## 3. Características de la quitotriosidasa

La CHIT1 es un análogo de las quitinasas de los invertebrados y los vegetales, cuya existencia en el hombre se probó hace más de veinte años (8-12). Pertenece a un grupo de enzimas que hidrolizan la quitina, con acción antifúngica en las plantas y probablemente con capacidad de degradar patógenos que contienen quitina, como hongos, nematodos e insectos (13-14). Es una  $\beta$ -glucosaminidasa miembro de la familia de las glicosilhidrolasas, de origen lisosómico, cuyo gen se encuentra en el cromosoma 1 q31- q32 consta de 12 exones que traducen una proteína de 466 aminoácidos. La quitina, un polímero formado por unidades repetidas de  $\beta$ -(1-4)-polietil-d-glucosamina, es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza después de la celulosa (15). Está presente en las paredes celulares de hongos y bacterias, en el exoesqueleto de crustáceos y de insectos, en la vaina microfilaria de los nematodos y en el revestimiento del tubo digestivo de numerosos insectos. La quitina aporta protección frente a las duras



condiciones del entorno y a la respuesta inmunitarias del huésped. Así, la ausencia de quitina puede conducir a la muerte del patógeno (16-18).

Este polisacárido estimula la producción de numerosas citoquinas, como la IL-1 $\beta$ , el GM-CSF e IFN- $\gamma$ . Aproximadamente un 1,2 % de la población tiene un déficit absoluto o completo de actividad quitotriosidasa, que se trasmite de forma autosómica recesiva, siendo la prevalencia de portadores de un 16 %. Este déficit se presenta en individuos homocigotos y heterocigotos por una duplicación de 24 bp, c.1049\_1072dup (p.Trp358Ter) (rs3831317), que da lugar a un mRNA con una delección de 87 nucleótidos, lo que provoca una ausencia de actividad quitotriosidasa en el plasma(19)

La CHIT1 presenta dos formas principales; una de 50 kDa predominante en el torrente sanguíneo y otra de 39 kDa ubicada fundamentalmente en los tejidos, ambas con igual actividad hidrolítica (20). La proteína de 50 kDa es producida inicialmente por los macrófagos. Esta isoforma se secreta en respuesta a un estímulo inflamatorio, o se empaqueta en los lisosomas y en los orgánulos relacionados con los lisosomas (LRO), donde se cree que el entorno ácido del interior favorece su división en una isoforma de 39 kDa, plenamente activa desde el punto de vista enzimático. Su función catalítica se encuentra en el dominio N-terminal, mientras que el dominio C-terminal permite la unión a la quitina, ambos dominios están conectados entre sí por una corta región bisagra. La proteína de 39 kDa se escinde tras la traducción en el lisosoma de los macrófagos o se forma a través del procesamiento diferencial del RNA. En ambas formas el dominio de unión a la quitina contiene seis residuos de cisteína que permiten la interacción de la enzima con su sustrato (21).

En humanos la CHIT1 es secretada por macrófagos activados y posiblemente también por neutrófilos, tras ser estimulados por interferones, TNF- $\alpha$  y GM-CSF, a través de las vías de señalización NF- $\kappa$ B, Jak-Stat, NOD2 y TLR (22).

Líneas de investigación recientes estudian sus efectos inmunomoduladores a través de los procesos de reconocimiento de quitina, la presentación de antígenos y la inducción de la inmunidad mediada por células. Se ha observado que participa activamente en las cascadas de activación y polarización de los macrófagos, así como, en la estimulación indirecta de otras células inmunitarias, como los linfocitos Th y los eosinófilos.

La producción de esta enzima se realiza de un modo regulado, apareciendo tras una semana de cultivo celular, y se incrementa progresivamente con el tiempo, por lo que es considerada un marcador de inflamación crónica, además de un marcador de proliferación macrofágica. Recientemente se ha detectado que se expresa en ambas formas de polarización de los macrófagos (M1 y M2). Los macrófagos M1, o macrófagos clásicamente activados, favorecen la inflamación, la eliminación de patógenos y la estimulación de fibrosis tisular tras una lesión. Por otro lado, los macrófagos M2, o macrófagos activados alternativamente, proporcionan señales reguladoras para proteger al huésped de una respuesta inflamatoria exagerada y promueven la remodelación y reparación tisular. El que la CHIT1 se exprese prácticamente por igual en ambas formas, denota sus funciones reguladoras sobre procesos que van más allá de

la hidrólisis de la quitina en patógenos. Los macrófagos participan en la respuesta inmunitaria mediante la producción de moléculas inflamatorias que promueven la eliminación de patógenos y la reparación tisular. Sin embargo, una desregulación de la respuesta macrofágica puede ser perjudicial para el huésped, como se observa en el síndrome de activación de los macrófagos inducido por infecciones graves, incluso en las infecciones por el SARS-CoV-2. En este sentido, la activación macrofágica a gran escala puede explicar que, aunque el virus afecte fundamentalmente al aparato respiratorio, la infección COVID-19 pueda cursar con: hepatitis, miositis y miocarditis, debiéndose estas manifestaciones o bien al efecto agudo del virus o bien a la respuesta inmune que desencadena (23).

Su actividad ha sido propuesta como un marcador de acúmulo de macrófagos en varias enfermedades con alteraciones lisosómicas (24-25), especialmente en la enfermedad de Gaucher, en la que se detectan un nivel de actividad de la enzima superior a 100-1000 veces su valor habitual. Aunque aún no se ha dilucidado la asociación entre los mecanismos moleculares de activación/infiltración de macrófagos y la actividad de la CHIT1 durante el curso del desarrollo de esta enfermedad, se ha empleado la determinación de esta enzima para indicar el tratamiento y como marcador precoz de respuesta al mismo, ya que se correlaciona con la gravedad de la enfermedad, y el descenso en sus niveles precede a la respuesta clínica en varios meses (26-27). Al igual que en la enfermedad de Gaucher, también se detectan niveles elevados de CHIT1 en la enfermedad de Niemann-Pick, dicho incremento se podría justificar por un aumento de la infiltración macrofágica tisular, que produciría una mayor cantidad de esta enzima (28). En la DM2 sin complicaciones, la actividad sérica de la CHIT1 está aumentada en pacientes no tratados. Existe una relación directamente proporcional entre la edad, la glucemia y los niveles de ADMA (29). El incremento de la concentración de ADMA inhibe la síntesis de óxido nítrico y origina una disfunción endotelial (30). La correlación entre la elevación de los niveles de la CHIT1 y de ADMA podría emplearse como biomarcador predictivo de la disfunción endotelial, ya que favorece la aparición de lesiones ateroscleróticas e pacientes con DM2. La CHIT1 también se ha utilizado como marcador de activación específica del macrófago en la arteriosclerosis, enfermedades granulomatosas como la sarcoidosis y otras enfermedades neurológicas inflamatorias crónicas como la Esclerosis Múltiple. En pacientes con arteriosclerosis se han detectado niveles plasmáticos de la CHIT1 55 veces más elevados que en individuos sin la patología, probablemente debido a la sobreproducción de la CHIT1 por las células espumosas. Se ha observado que la actividad de la CHIT1 podría estar relacionada con la gravedad de las lesiones arterioscleróticas. Tanto los pacientes con ictus aterotrombótico como con cardiopatía isquémica presentaron una actividad de la CHIT1 superior a la de los individuos pertenecientes al grupo control. Dado que los macrófagos están presentes en todas las fases de la arteriosclerosis y aumentan su número y actividad en función de la gravedad de cada fase, la actividad de CHIT1 en los macrófagos se ha aceptado como uno de los biomarcadores de la formación de la placa aterosclerótica (31-32). Por otra

parte, también se ha observado que la CHIT1 está involucrada en procesos de remodelación tisular en el tejido hepático (33-34), en la  $\beta$ -talasemia (35), y en múltiples infecciones (36-37).

## OBJETIVOS

1.- Determinar la frecuencia alélica SNP: rs3831317 en una cohorte de pacientes españoles afectados por la Enfermedad SARS-COV-2, haciendo una comparación con sujetos sanos pareados por edad y género.

2.- Correlacionar la gravedad de la clínica de la cohorte de pacientes con SARS-COV-2 con el polimorfismo genético detectado SNP: rs3831317.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio observacional, longitudinal, no intervencionista, de cohorte prospectiva, pareado por edad y género y con carácter analítico.

### 1. Variables

#### - Sujetos de estudio

Fueron candidatos a estudio los pacientes diagnosticados de COVID-19, pertenecientes al Hospital Clínico Universitario “Lozano Blesa” de Zaragoza. Se incorporaron al estudio pacientes detectados que desarrollaron la COVID-19. Se recolectaron los controles, que fueron pareados por edad y género con la población enferma (según normativa del Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón). Los controles, sanos por definición, fueron sujetos que provenían del Banco de Sangre y Tejidos de Aragón.

#### - Recogida y análisis de los datos

Cada participante con COVID-19 tuvo una ficha Excel con un conjunto de datos clínicos y analíticos para la CHIT1.

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente empleando el programa IBM SPSS statistics, donde se utilizó la prueba de Chi-cuadrado. Se estableció un valor de p menor a 0,05 para determinar diferencias significativas entre las muestras. Se correlacionó la frecuencia alélica con la gravedad de la COVID-19.

## 2. Procedimiento

### 2.1. Amplificación de DNA

La técnica empleada para la amplificación del DNA fue la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con la modalidad "Touch-Down", consistente en una reacción de síntesis de DNA in vitro empleando la enzima Taq Polimerasa. Para ello fue necesario conocer parcialmente la secuencia del fragmento de DNA que se quería ampliar, ya que se utilizaron secuencias primer adyacentes para realizar la extensión de esta región de la hebra de DNA. Para repetir el ciclo es necesario aumentar nuevamente la temperatura hasta los 95°C y comenzar todo el proceso. Una vez finalizado el proceso se purifica el producto de la PCR, para eliminar las sustancias que podrían interferir en una adecuada secuenciación, empleando para ello un "reactivo de limpieza" denominado ExoSAP, sintetizado a partir de una mezcla de Exonucleasa I y Fosfatasa Alcalina de camarón. La reacción se llevó a cabo en un termociclador siguiendo los siguientes pasos:

- **Desnaturalización:** permitió la separación de las dos cadenas del DNA, mediante el calentamiento de la muestra hasta alcanzar los 95°C.
- **Unión del primer o alineamiento:** se disminuyó la temperatura hasta los 56°C en 40 segundos, para permitir que el primer previamente seleccionado hibridase por complementariedad de bases con el fragmento de DNA que interesaba amplificar.
- **Elongación de la cadena:** en esta etapa la Taq polimerasa sintetizó únicamente la parte del DNA marcada con los primers. Esta enzima presenta su máxima actividad a temperaturas de entre 75 y 80°C, polimerizando en estas condiciones mil bases por minuto.

### 2.2. Secuenciación de DNA

Para la secuenciación del exón 10 del gen *CHIT1* se utilizó la técnica de Sanger, que se basa en la capacidad de la polimerasa para generar cadenas de distintos tamaños complementarias a una cadena de DNA patrón. La técnica permite determinar en qué orden se coloca la secuencia de bases (C, G, T y A) de un determinado fragmento de DNA.

Se emplearon didesoxinucleótidos, caracterizados por carecer del grupo hidroxilo en el carbono 3'. Esta particularidad provoca que, cuando se une un didesoxinucleótido a la

cadena de DNA que está siendo sintetizada, no pueda formarse un nuevo enlace fosfodiéster que permita la elongación y esta se bloquee.

Se prepararon cuatro tubos de reacción contando todos con el DNA patrón desnaturalizado, los primers, los cuatro nucleótidos trifosfato (dATP, dTTP, dGTP y dCTP) y la DNA polimerasa. A cada tubo se le añadió uno de los didesoxinucleótidos trifosfato marcado fluorescentemente (ddATP, ddTTP, ddGTP y ddCTP). Cuando finalizó el proceso, en cada tubo había cadenas de DNA de distintas longitudes y con un color distinto, que terminaron donde se unió el didesoxinucleótido que se introdujo en cada tubo.

Al someter el producto final a electroforesis, se obtuvo un patrón de bandas en cromatogramas que permitió la identificación de la secuencia del DNA. Es importante destacar que, al producirse la hebra mediante replicación, la secuencia obtenida en los cromatogramas será complementaria a nuestra secuencia objetivo.

### **3. Aspectos éticos**

En el desarrollo de este estudio no se ha realizado ninguna intervención experimental sobre pacientes o animales. Los datos obtenidos cumplen estrictamente los principios de confidencialidad, siendo imposible la identificación de los pacientes dada la ausencia de datos personales.

## Resultados

Para comprobar la presencia de la mutación se realizó una amplificación y una secuenciación del exón 10 del gen *CHIT1* del DNA de los pacientes de los grupos control y COVID-19. Se obtuvo la secuencia representada en la figura 1 en el caso de los individuos de tipo wild type, donde se observa la señal de cada una de las bases sin ningún tipo de anomalía o solapamiento. En los pacientes portadores de la mutación en heterocigosis, la secuencia se muestra en la figura 2. Los picos dobles indican que se ha producido una duplicación únicamente en una de las hebras, provocando un solapamiento en la lectura. Por último, la mutación en homocigosis se refleja en la secuencia de la figura 3, donde no se ven dobles picos debido a que la duplicación ha ocurrido en ambas hebras. Sin embargo, la secuencia leída no sigue a la secuencia molde, ya que la duplicación ha hecho que el fragmento vuelva a comenzar desde el inicio.

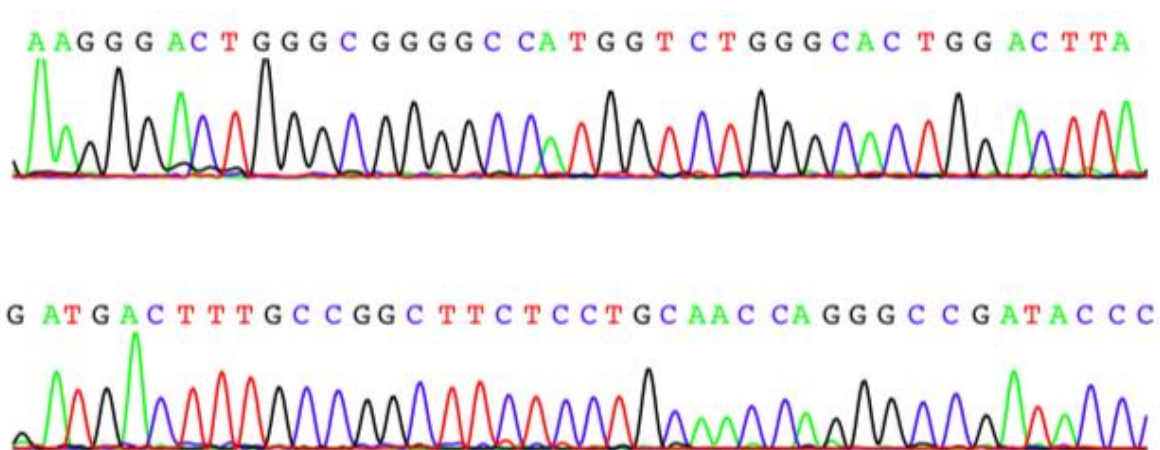


Figura 1. Secuencia wild type.

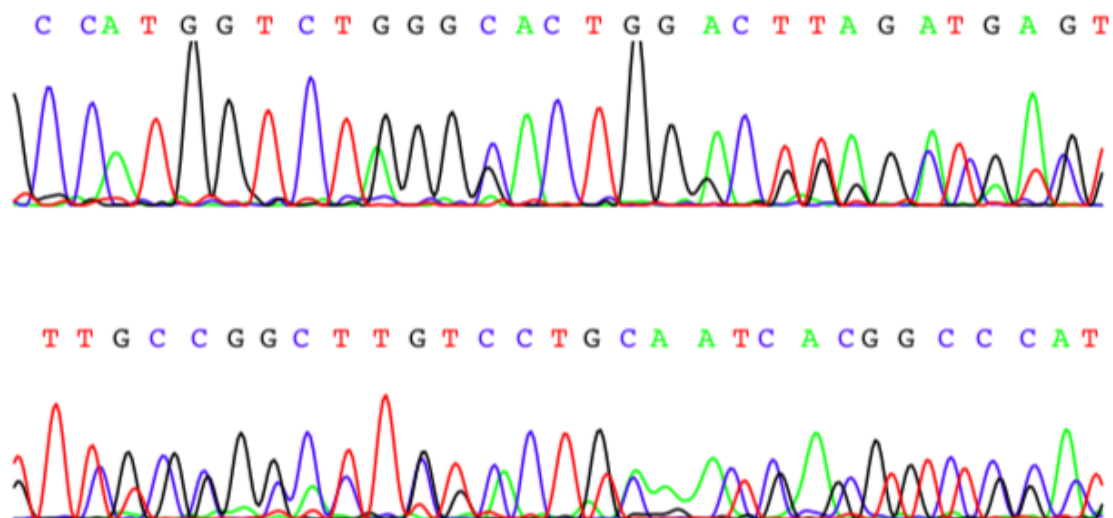


Figura 2. Secuencia de la mutación en heterocigosis.

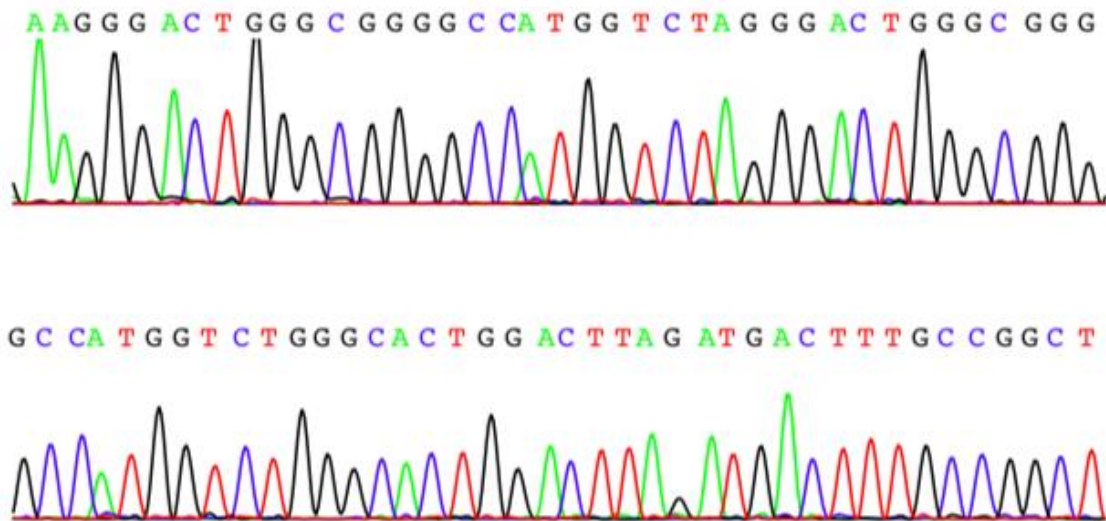


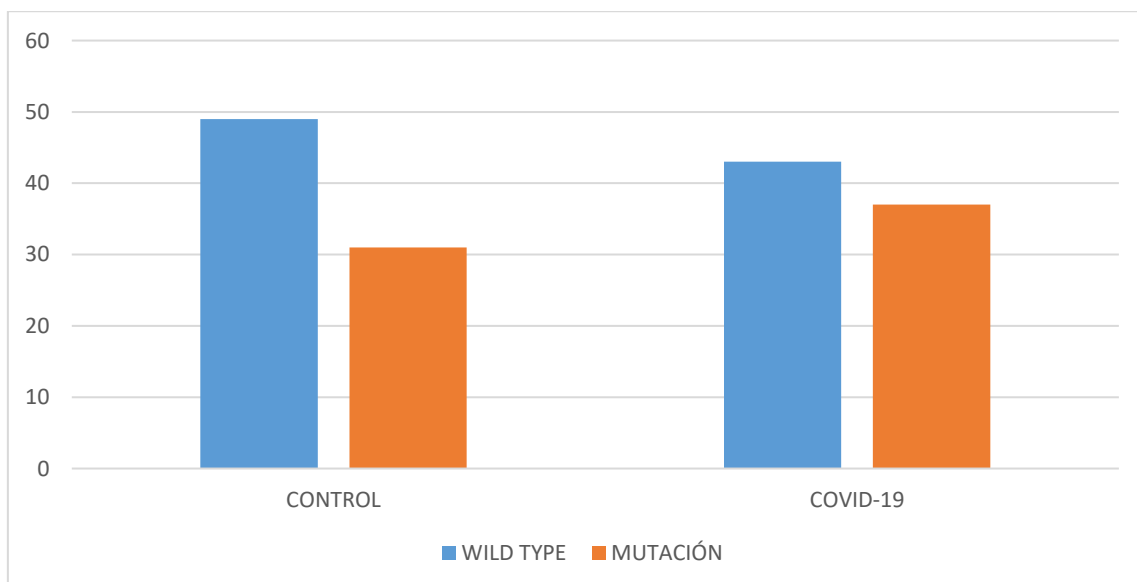
Figura 3. Secuencia de la mutación en homocigosis.

**- Relación entre la presencia de la mutación en el gen *CHIT1* y la probabilidad de desarrollar la enfermedad COVID-19:**

Debido a la implicación del gen *CHIT1* en el desarrollo de la respuesta inmune, decidimos comprobar si existía una relación entre ser portador de la mutación y desarrollar la COVID-19, se analizó mediante la prueba de Chi-Cuadrado, la frecuencia alélica en los grupos control y COVID-19. En la Tabla 1 aparece recogida la distribución de los pacientes en estudio, sobre los que se realizó el análisis estadístico, fijando la significatividad en  $p < 0.05$ . En la figura 4 se refleja un menor número de pacientes con la mutación dentro del grupo control con respecto al grupo COVID-19, sin embargo, el análisis estadístico mostró un valor de  $p = 0.3$ , por lo que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

	CONTROL	COVID-19
WILD TYPE	49	43
HETEROCIGOTOS	28	35
HOMOCIGOTOS	3	2
FRECUENCIA ALÉLICA (%)	38.7	46.25

**Tabla1: Distribución de la mutación entre los pacientes.** Dentro del grupo control se analizaron las muestras de 80 pacientes, de las cuales 49 presentaron genotipo wild-type, 28 heterocigosis y 3 homocigosis. De los 80 pacientes que desarrollaron la COVID-19, 43 mostraron el genotipo wild-type, 35 heterocigosis y 2 homocigosis. La frecuencia alélica fue 38.7% en el grupo control y 46.25% en el grupo COVID-19.



**Figura 4. Distribución de la mutación entre los pacientes.** Se representa en los grupos control y COVID-19 el número de pacientes wild type, incluidos en la columna de color azul, así como el número de pacientes con la mutación, englobados en la columna de color naranja.



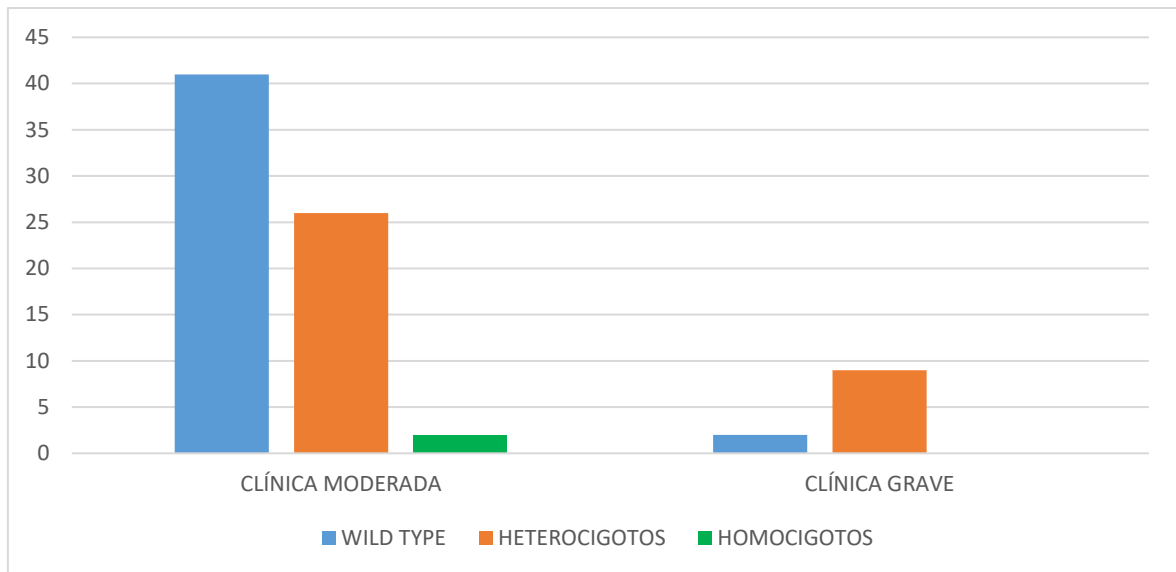
- **Relación entre la frecuencia alélica de la población y la evolución de la enfermedad causada por el SARS-CoV-2.**

Para estudiar la posible relación entre la frecuencia alélica de la población del grupo COVID-19 y la clínica asociada a la enfermedad se empleó la prueba de Chi-Cuadrado. La significación estadística se fijó en  $p < 0.05$ . Como criterios de evolución de la enfermedad se consideró como clínica moderada el ingreso en planta, y como clínica grave el ingreso en la U.C.I., obteniendo la distribución mostrada en la Tabla 2.

Tras realizar el análisis estadístico se obtuvo un valor de  $p = 0.023$ , por lo que se podría afirmar que sí que existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo con genotipo wild type y el grupo portador de la mutación en heterocigosis. Esto implica, como se observa en la figura 5, que la frecuencia alélica sí que está relacionada con la evolución clínica. Por tanto, según nuestros resultados, los individuos con la mutación en heterocigosis presentarán una peor evolución de la clínica que los portadores de un genotipo wild type.

	<b>CLÍNICA MODERADA</b>	<b>CLÍNICA GRAVE</b>	<b>FRECUENCIA ALÉLICA (%)</b>
<b>WILD TYPE</b>	41	2	54
<b>HETEROCIGOTOS</b>	26	9	44
<b>HOMOCIGOTOS</b>	2	0	2

**Tabla 2. Relación entre la frecuencia alélica de la población y la clínica de la COVID-19.** Dentro de la población portadora de la mutación en heterocigosis 26 individuos desarrollaron una clínica moderada y 9 una grave. En el grupo de los individuos homocigotos 2 tuvieron una evolución moderada y ninguno presentó una clínica grave. En la población wild type 41 pacientes presentaron una evolución moderada frente a 2 que desarrollaron una clínica grave. Se obtuvo una frecuencia alélica del 44% en heterocigosis, del 2% en homocigosis y del 54% en wild type.



**Figura 5. Relación entre la frecuencia alélica de la población y la clínica de la COVID-19.** Se representa la relación existente entre la frecuencia alélica (wild type, homocigosis y heterocigosis) y la clínica de la enfermedad. Los individuos con genotipo wild type aparecen representados en azul, los heterocigotos en naranja y los homocigotos en verde.

## Discusión

Este Trabajo de Fin de Máster se centra en el estudio genético del gen *CHIT1* y su relación con la COVID-19.

Por otro lado, en concordancia con los datos obtenidos tras el análisis de la frecuencia alélica, sí que se ha podido comprobar que los individuos con la mutación en heterocigosis desarrollan una clínica con una sintomatología más grave que aquellos con un genotipo wild type, cuya clínica es más moderada. Por otra parte, en individuos homocigotos para la mutación no se ha detectado una clínica grave asociada a la enfermedad, probablemente debido al bajo número de pacientes que presentaron dicha condición genética, que no ha permitido obtener resultados representativos en este aspecto. No se ha podido demostrar que exista una correlación entre ser portador de la mutación y desarrollar la COVID-19. Una de las limitaciones del estudio es el pequeño tamaño muestral.

En otros estudios actuales se ha comprobado que los niveles de algunas de estas citoquinas moduladas por la *CHIT1*, como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, IP-10, MCP-1 e IFN- $\gamma$  aumentan durante la infección por el SARS-CoV-2. Además, los pacientes con una clínica grave de COVID-19 presentan mayores niveles de IL-2, IL-6, IL-7, IL-10, IP-10, MCP1, TNF- $\alpha$ , proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (MIP1A) y factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) que los pacientes con infecciones leves y moderadas (38-39). Recientemente, también se ha puesto de manifiesto que, los linfocitos T CD4 y T CD8 se encuentran hiperactivados y en menor concentración en los estadios más graves de la enfermedad. Además, se ha podido comprobar que la linfopenia es una característica común de la COVID-19, lo que sugiere un factor crítico que puede explicar tanto la gravedad como la mortalidad de esta entidad (40).

Liu et al. encontraron disminuciones significativas y sostenidas en los recuentos de linfocitos CD4 y CD8, especialmente de linfocitos T CD8, pero aumentos en la concentración de neutrófilos en los pacientes graves con COVID-19 en comparación con los pacientes leves. Por lo tanto, la relación neutrófilos-linfocitos (NLR) podría ser predictiva de la evolución de la COVID-19 (44-45). Las tormentas de citoquinas y la linfopenia están asociadas a la gravedad de la COVID-19. Este hecho pone de manifiesto la posibilidad de establecer una estrategia terapéutica en base al NLR, así como acorde a la presencia de la mutación en el gen *CHIT1*, ya que la mutación en heterocigosis podría estar relacionada con una clínica más grave de la COVID-19.

El diferente desenlace de la enfermedad en los pacientes con la mutación podría ser consecuencia del déficit parcial o total de actividad quitotriosidasa, el cual, como se ha comentado previamente, está vinculado a la presencia de la mutación. La ausencia parcial o total de actividad quitotriosidasa origina una respuesta inmunitaria más débil. Esto es debido a que la enzima en cuestión participa tanto en la respuesta inmunitaria

innata como en la adquirida, además de actuar como factor de gran importancia en la proliferación macrofágica, ya que su expresión aumenta exponencialmente durante el paso de monocitos a macrófagos, mostrando un pico de actividad entre el 5º y el 7º día de cultivo, recientemente se ha detectado que se expresa en ambas formas de polarización de los macrófagos (M1 y M2).

En conclusión, la CHIT1 podría considerarse tanto un indicador de proliferación macrofágica como un regulador de la actividad inflamatoria (41-42). En vista de la posible relación entre una sintomatología más grave y la menor actividad de la CHIT1, sería interesante realizar en un futuro la cuantificación de la actividad enzimática en individuos portadores de la mutación y relacionarlo con la clínica presentada. Asimismo, debido al papel de la CHIT1 en la modulación de la inflamación por citoquinas, sería de interés comprobar cuales son los niveles de esta enzima en los pacientes que desarrollaron una mayor gravedad debida a la cascada de citoquinas asociada a la enfermedad.

## Conclusiones

- I. La frecuencia alélica se podría correlacionar con los aspectos clínicos de la COVID-19, ya que los individuos con genotipo wild type presentan una clínica más leve que los individuos heterocigotos.
- II. No se ha podido establecer una relación entre ser portador de la mutación en el exón 10 del gen CHIT1 y la presencia de la enfermedad.

## Bibliografía

1. Boot RG, Renkema GH, Verhoek M, et al. Nature of inherited enzyme deficiency. *J Biol Chem* 1998; 273: 25680-25685.
2. Zhu N, et al. A Novel Coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* 2020;382:727–733.
3. Wu F, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature.* 2020;579:265–269.
4. Zhou P, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020;579:270–273.
5. Eurosurveillance Editorial Team Note from the editors: World Health Organization declares novel coronavirus (2019-nCoV) sixth public health emergency of international concern. *Euro. Surveill.* 2020;25:200131e.
6. Lu R, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet.* 2020;395:565–574.
7. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res.* 2000;87(5): E1–E9.
8. Boot RG, Renkema GH, Strijland A, et al. Cloning of cDNA encoding chitotriosidase, a human chitinase produced by macrophages. *J Biol Chem.* 1995; 270: 26252-26256.
9. Renkema GH, Boot RG, Strijland A, et al. Synthesis, sorting, and processing into distinct isoforms of human macrophage chitotriosidase. *Eur J Biochem.* 1997; 244:279-285.
10. Boussac M, Garin J. Calcium-dependent secretion in human neutrophils: a proteomic approach. *Electrophoresis.* 2000 Feb; 21(3):72-665.
11. Renkema GH, Boot RG, Strijland A, et al. Synthesis, sorting, and processing into distinct isoforms of human macrophage chitotriosidase. *Eur J Biochem.* 1997; 244:279-285.
12. Renkema GH, Boot RG, Au FL, et al. Chitotriosidase, a chitinase, and the 39-kDa human cartilage glycoprotein, a chitin-binding lectin, are homologues of family glycosyl hydrolases secreted by human macrophages. *Eur J Biochem.* 1998; 251: 504-509.
13. Collinge DB, Kragh KM, Mikkelsen JD, et al. *Plant J.* 1993; 3: 31- 40.
14. Flach J, Pilet PE, Jolles P. *Experientia (Basel).* 1992; 48: 701- 716.
15. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci.* 2006;31:603–632.

16. Chun GL, Da Silva CA, De la Cruz C, et al. Role of Chitin and Chitinase/Chitinase-Like Proteins in inflammation, tissue remodeling, and injury. *Annu Rev Physiol.*2011; 73:1-28.
17. Araujo AC, Souto-Padron T, de Souza W. Cytochemical localization of carbohydrate residues in microfilariae of *Wuchereria bancrofti* and *Brugia malayi*. *J. Histochem. Cytochem.* 1993;41:571–578.
18. Shahabuddin M, Kaslow DC. *Plasmodium*: parasite chitinase and its role in malaria transmission. *Exp. Parasitol.* 1994;79:85–88.
19. <https://gnomad.broadinstitute.org>
20. Boot RG, Blommaart EFC, Swart J, et al. Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase. *J. Biol. Chem.*2001. 6770– 6778.
21. Renkema GH, Boot RG, Strijlan A, et al. Synthesis, sorting, and processing into distinct isoforms of human macrophage chitotriosidase. *Eur. J. Biochem.*1997.279– 285.
22. De Chang L, Lokesh S, Dela Cruz C. Chitotriosidase: a marker and modulator of lung disease. *European Respiratory Review.*2020;29: 190143.
23. Brundo V, Malaguarnera M, Di Rosa M. *World J Immunol.*2016; 6(2): 96-104.
24. Guo Y, He W, Boer AM, et al. Elevated plasma chitotriosidase activity in various lysosomal storage disorders. *J Inher Metab Dis.*1995;18:22-717.
25. Isman F, Natowicz MR. Plasma chitotriosidase in lysosomal storage diseases. *Clin Chim Acta.*2008;387:165–7.
26. Harmanci O, Bayraktar Y. Gaucher disease: new developments in treatment and etiology. *World J Gastroenterol.* 2008;14:3968–3973.
27. Sumarac Z, Suvajdžić N, Iggjatović S, et al. Biomarkers in Serbian patients with Gaucher disease. *Clin Biochem.* 2011;44:950–4.
28. Sheth JJ, Sheth FJ, Oza NJ, et al. Plasma chitotriosidase activity in children with lysosomal storage disorders. *Indian J Pediatr.* 2010;77:203–205.
29. Sonmez A, Haymana C, Tapan S, et al. Chitotriosidase activity predicts endothelial dysfunction in type-2 diabetes mellitus. *Endocrine.* 2010;37:455–459.
30. Sibal L, Agarwal SC, Home PD, et al. The role of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in endothelial dysfunction and cardiovascular disease. *Curr Cardiol Rev.* 2010;6:82–90.
31. Moreno PR, Falk E, Palacios IF, et al. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture. *Circulation.* 1994;90:775–778.
32. Artieda M, Cenarro A, Ganán A, et al. Serum chitotriosidase activity is increased in subjects with atherosclerosis disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1645–1652.
33. Karadag B, Kucur M, Isman FK, et al. Serum chitotriosidase activity in patients with coronary artery disease. *Circ J.* 2008;72:71–75.

34. Malaguarnera L, Di Rosa M, Zambito AM, et al. Potential role of chitotriosidase gene in nonalcoholic fatty liver disease evolution. *Am J Gastroenterol.* 2006;101:2060–2069.
35. Barone R, Di Gregorio F, Romeo MA, et al. Plasma chitotriosidase activity in patients with  $\beta$ -thalassemia. *Blood Cells Mol Dis.*1999;25:1–8.
36. Barone R, Simporè J, Malaguarnera L, et al. Plasma chitotriosidase activity in acute Plasmodium falciparum malaria. *Clin Chim Acta.*2003;331:79–85.
37. Labadaridis I, Dimitriou E, Theodorakis M. Chitotriosidase in neonates with fungal and bacterial infections. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.*2005;90:2-531.
38. Meftahi GH, Jangravi Z, Sahraei H, Bahari Z. The possible pathophysiology mechanism of cytokine storm in elderly adults with COVID-19 infection: The contribution of "inflamm-aging". *Inflamm. Res.* 2020;69:825–839.
39. Huang C, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020;395:497–506.
40. Jarjour N, Masopust D, Jameson S. T cell memory: Understanding COVID-19. *Immunity.* 2021; 54(1): 14-18.
41. Artieda M, Cenarro A, Ganan A, Lukic A, Moreno E, Puzo J, et al: Serum chitotriosidase activity, a marker of activated macrophages, predicts new cardiovascular events independently of C-reactive protein. *Cardiology* 2007;108: 297–306.
42. Di Rosa M, Musumeci M, Scuto A, Musumeci S, Malaguarnera L: Effect of interferon gamma, interleukin-10, lipopolysaccharide and tumor necrosis factor-alpha on chitotriosidase synthesis in human macrophages. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43: 499–502.