

## CENTRO NACIONAL DE GENÉTICA MÉDICA

### Título: Relación del polimorfismo -308A>G del gen TNF $\alpha$ con la evolución clínica de pacientes con COVID-19

**Autora:** Dra. Claudia Alemañ Díaz- Perera (Instructor. Residente de 4to año de Genética Clínica.)

**Tutor:** Dra. C. Beatriz Marcheco Teruel (Profesor Titular. Especialista de 2do Grado de Genética Clínica.)  
Dr. Francisco Sotomayor Lugo (Profesor Asistente. Especialista de 1er Grado de Genética Clínica.)

## RESUMEN

**Introducción:** La reciente aparición y la rápida propagación mundial de coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave 2 plantean una crisis de salud sin precedentes. La COVID-19 presenta una heterogeneidad clínica que dificulta su diagnóstico y manejo. Desde el comienzo en Cuba se observan diferencias en las tasas de incidencia y evolución clínica de la enfermedad en distintas regiones del país que, aunque podrían asociarse a factores, geográficos, de estilos de vida y de conductas sociales de mayor o menor riesgo para infectarse, tal vez puedan explicarse parcialmente a través de factores genéticos como el polimorfismo TNF $\alpha$  (-308A>G).

**Objetivos:** Determinar el grado en que la presencia del polimorfismo -308A>G del gen TNF $\alpha$  influye en la evolución clínica de individuos infectados por el SARS-CoV-2.

**Diseño Metodológico:** Se realizó un estudio de casos y controles en el Centro Nacional de Genética Médica, durante el período de junio de 2020 a junio de 2021.

**Resultados:** Aunque se ha informado que el alelo A se asocia con una enfermedad más agresiva, no observamos diferencias importantes en la duración de los síntomas más frecuentes entre los genotipos que portan el alelo A (AG / AA) y el genotipo que no lo porta (GG).

**Discusión:** Los resultados sugieren que el genotipo TNF $\alpha$ .AG parece estar relacionado con formas sintomáticas de la enfermedad, lo que podría explicarse considerando que el TNF $\alpha$  media muchos síntomas presentes en COVID-19. Sin embargo, se encontró que el genotipo TNF $\alpha$ .AA puede no ser un factor relevante en formas más graves, aunque el número de homocigotos del alelo A fue muy bajo en individuos con enfermedad grave.

**Conclusiones:** Este estudio identificó el papel del alelo TNF $\alpha$ .-308A en la evolución clínica de la infección por SARS-CoV-2, al aumentar el riesgo de desarrollar síntomas de COVID-19 en las provincias orientales y occidentales del país. Estos hallazgos sugieren marcadores novedosos que pueden explorarse para identificar criterios novedosos para la estratificación de pacientes con COVID-19 en el país.

**Palabras Claves:** SARS-CoV-2, COVID-19, polimorfismo TNF $\alpha$  (-308A>G)

## 1. INTRODUCCIÓN

El coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave 2 (del inglés Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) (SARS-CoV-2) es un betacoronavirus, causante de neumonía atípica, que emergió en diciembre de 2019 en Wuhan, China, y es la causa de la enfermedad del coronavirus 2019 (del inglés *coronavirus disease 2019*) (COVID-19). La reciente aparición y la rápida propagación mundial de este virus plantean una crisis de salud sin precedentes. La Organización Mundial de la Salud (OMS) determinó que la propagación de esta enfermedad constituye una emergencia de Salud Pública de interés internacional, que fue declarada pandemia el 11 de marzo de 2020.<sup>1-5</sup>

La alta mortalidad asociada a la COVID-19, así como la variedad de manifestaciones clínicas que dificultan su diagnóstico y manejo, han provocado que se aceleren las investigaciones para encontrar posibles opciones de tratamientos seguros y efectivos, así como medidas preventivas que eviten la propagación de la enfermedad.<sup>6</sup>

El riesgo de padecer cuadros clínicos más severos parece estar relacionado con la edad del paciente, enfermedades asociadas y factores de riesgo genéticos relacionados con la penetración del virus a las células, la respuesta inmune frente al SARS-CoV-2 y la efectividad terapéutica.

En las infecciones virales es generalmente aceptado que la respuesta inmune del hospedero puede proteger, pero también participar en la producción del daño tisular. Los fallos en la regulación de la respuesta inmunitaria pueden conducir a la secreción descontrolada de diferentes citoquinas incluyendo entre otras a la interleukina-1(IL-1), interleukina-6(IL-6), Factor de Necrosis Tumoral (TNF) e interferón- $\gamma$ . La “tormenta de

citoquinas”, en la cual son liberadas en el torrente sanguíneo, puede provocar una respuesta inflamatoria severa y perjudicial en la COVID-19.<sup>6</sup>

Teniendo en cuenta que la constitución genética individual es uno de los componentes de la compleja interacción entre factores ambientales y genes que regulan la resistencia o susceptibilidad a las infecciones, es razonable suponer que la variabilidad en la severidad clínica entre pacientes con la COVID-19 y el desarrollo de síntomas graves, incluso en casos sin enfermedades subyacentes, pueda deberse, en alguna medida, a posibles modelos que combinen factores de riesgo genéticos y no genéticos.

Se ha enfatizado el desarrollo de análisis de variantes alélicas de carácter presumiblemente dominante y de frecuencia moderadamente rara en pacientes con complicaciones clínicas severas de la enfermedad. Uno de los genes que pudiera estar involucrado en la respuesta del organismo a la infección por SARS-CoV-2 es el gen TNF $\alpha$  (del inglés, *Tumor necrosis factor- $\alpha$* ). Se han descrito seis polimorfismos de nucleótido único (SNPs, *single nucleotide polymorphisms*) en la región 5' del gen, entre los que se menciona el TNF $\alpha$  (-308A>G) (rs1800629), siendo los individuos que portan el alelo A los que presentan una mayor actividad transcripcional en comparación con aquellos que “cargan” el alelo común G.<sup>7,8</sup> La respuesta del TNF- $\alpha$  a la infección está regulada en parte a nivel transcripcional, por lo que el polimorfismo TNF $\alpha$  (-308A>G) pudiera influir en la evolución clínica de la COVID-19.

En el mundo y en Cuba la infección por el SARS-CoV-2 tras la exposición al virus varía entre los individuos, quienes pueden presentar desde ausencia de infección a pesar de tener alto riesgo, ser portadores asintomáticos o cursar con síntomas leves, hasta padecer formas letales que evolucionan rápidamente ante las complicaciones a pesar de ser objeto de intervenciones médicas oportunas. Desde el comienzo en Cuba se observan diferencias en las tasas de incidencia y evolución clínica de la enfermedad en distintas regiones del país que, aunque podrían asociarse a factores demográficos (como la densidad de población), geográficos, de estilos de vida y de conductas sociales de mayor o menor riesgo para infectarse, tal vez puedan explicarse parcialmente a través de factores genéticos como el polimorfismo TNF $\alpha$  (-308A>G).

### 1.1 PROBLEMA CIENTÍFICO

– En Cuba se desconoce si el polimorfismo -308A>G del gen TNF $\alpha$  influye en la evolución clínica de individuos infectados por el SARS-CoV-2.

### 1.2 PREGUNTAS CIENTÍFICAS

– ¿Cuál es la relación del polimorfismo -308A>G del gen TNF $\alpha$  con la evolución clínica de individuos infectados por el SARS-CoV-2?

– ¿Cómo se distribuyen las frecuencias alélicas de este polimorfismo en la población objeto de estudio?

1.3 HIPÓTESIS: Los pacientes que presentan el Polimorfismo -308A>G del gen TNF $\alpha$  cursan con cuadros más severos de COVID 19

1.4 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO: A punto de partida del incremento notable, en Cuba y el resto del mundo, de casos de COVID-19 es importante la identificación de factores de riesgo clínicos, epidemiológicos y genéticos, que permitan configurar un pronóstico clínico, y establecer tratamientos personalizados en pacientes con infecciones provocadas por el SARS-CoV-2, así como trazar estrategias poblacionales de prevención.

Constituyen fortalezas para el desarrollo de esta investigación: la presencia de una red de centros y servicios de genética médica integrados a la atención primaria de salud como parte de la organización del sistema de salud cubano, la integración de las instituciones de salud con el sistema de entidades de ciencia e innovación tecnológica del país y la capacidad de la industria biotecnológica.

## 2. OBJETIVOS

1. Caracterizar factores socio-demográficos, clínico-epidemiológicos y resultados de laboratorio en pacientes recuperados de la COVID-19.

2. Describir las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo -308A>G del gen TNF $\alpha$  en pacientes recuperados de la COVID-19.

3. Determinar el grado en que la presencia del polimorfismo -308A>G del gen TNF $\alpha$  influye en la evolución clínica de individuos infectados por el SARS-CoV-2

## 4. DISEÑO METODOLÓGICO

### 4.1 Clasificación de la investigación

\* Investigación aplicada.

## 4.2 Aspectos generales del estudio, definición de población

Se realizó un estudio analítico transversal en el Centro Nacional de Genética Médica (CNGM), durante el período comprendido de junio de 2020 a junio de 2021.

### Definición de la población

La población de estudio estuvo conformada por los 1200 pacientes cubanos residentes en Cuba confirmados con el diagnóstico de COVID-19 entre el 11 de marzo y 11 de junio de 2020 que hayan recibido el alta epidemiológica

La población de estudio quedó definida en tres grupos:

- **Grupo 1 (G1):** casos confirmados en los que la infección por SARS-CoV-2 cursó de modo asintomático.
- **Grupo 2 (G2):** casos confirmados como enfermos pero que no presentaron complicaciones clínicas.
- **Grupo 3 (G3):** casos confirmados para quienes la enfermedad cursó con complicaciones clínicas severas que requirieron de cuidados intensivos.

### Criterios de inclusión:

- Individuos en los que se confirmó el diagnóstico de infección por SARS-CoV-2 mediante estudios de PCR en tiempo real.

### Criterios de exclusión:

- Individuos fallecidos.
- Individuos menores de un año.

## 4.3 Procedimientos y técnicas para la recolección de información por estudios

### 4.3.1 Estudio clínico-epidemiológico

Para la recolección de información clave que permita evaluar las características clínicas y epidemiológicas de los individuos incluidos en el estudio, se aplicó un cuestionario perteneciente al proyecto **Factores de riesgo genético asociados a la severidad clínica de la COVID 19 en pacientes cubanos**, del cual esta investigación constituye una tarea, por lo cual solo se utilizaron las variables que se indican más adelante. En él se incluye el consentimiento informado para la participación en la investigación, y dos espacios que fueron llenados por el investigador, uno de ellos a partir de las respuestas brindadas por el paciente o sus tutores legales. Los aspectos de interés incluyen datos demográficos, hábitos y estilo de vida, comorbilidades, síntomas, presencia de complicaciones clínicas, tratamiento farmacológico recibido y respuesta al mismo y evolución clínica.

### Aseguramientos de laboratorio clínico

#### Aseguramientos de laboratorio clínico

Se obtuvieron muestras de 7mL de sangre venosa periférica, por punción de las venas superficiales de la región anterior del antebrazo, con previa limpieza de la región y tomando todas las medidas de asepsia y antisepsia necesarias. Se utilizaron materiales desechables y solo se aplicó el torniquete, durante el tiempo mínimo necesario. La extracción de sangre fue realizada por personal de laboratorio clínico de los Centros Provinciales y Municipales de Genética Clínica de cada territorio. El material biológico obtenido fue dispuesto de la siguiente manera: 3mL se depositaron en un Vacutainer con K2-EDTA para extracción de ADN. Las muestras se conservaron y trasladaron en termo refrigerado al Centro Nacional de Genética Médica siguiendo las medidas de bioseguridad dictadas por las autoridades sanitarias para el traslado de material biológico

### 4.3.2 Estudio genético molecular

#### Técnicas de extracción de ADN

Se realizó la extracción de ADN mediante el extractor automático QIASymphony SP, y fue utilizado el estuche de reactivos QIASymphony DNA Mini (Qiagen) y el protocolo de extracción DNA Blood 200. La cantidad y calidad del ADN extraído fueron medidas mediante el espectrofotómetro BioSpec-mini (ShimadzuBiotech) y posteriormente refrigerado a - 20 °C para su conservación.

### Estudios moleculares

Se incluyó el estudio del polimorfismo -308A>G (rs1800629) del gen TNF $\alpha$ , por estar vinculados a la expresión de proteínas relacionadas con la respuesta inmune al SARS-CoV-2.

### Diseño de cebadores

El diseño de las secuencias de los cebadores realizado en Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) se muestra a continuación:

Cebador	Secuencia (5'-3')
TNF F1	¡TTTTGAGGGGCATGA
TNF F2	¡TTTTGAGGGGCATGG
TNF R	GTTTCTTCTCCATCG

A su recibo tras la entrega del fabricante, los cebadores fueron diluidos a una concentración apropiada para pruebas de PCR en 10 mM del buffer Tris, y se conservaron a -20 °C hasta su uso.

### Condiciones del PCR y procedimientos técnicos

Cada juego de cebadores era compatible con un PCR alelo específico, con un producto de 184 pares de bases, que será identificado en una electroforesis en geles de agarosa al 2%.

Como control interno de amplificación se utilizó una región del gen FGFR3. Las secuencias del juego de cebadores fueron: 5'-AGGAGCTGGTGGAGGCTGA-3' y 5'-GGAGATCTTGTGCACGGTGG-3', con un producto de 164 pares de bases.

Se prepararon 25 µl de la mezcla de reacción del PCR con un contenido de:

Reactivos	Concentración final
Buffer 10x	1x
dNTP	0,15 mM
Cebador TNF (D&R)	0,53 µM
Cebador Control Interno	0,16 µM
Enzima Hot Start Polimerasa (MgCl <sub>2</sub> )	1,5 U
H <sub>2</sub> O estéril	-

### Programa del termociclador.

Los microtubos fueron colocados en un Controlador Térmico Programable modelo PTC-100 (MJ Research Inc., MA) para llevar a cabo la amplificación del ADN. El programa que se utilizó se presenta a continuación:

Pasos	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización	95 °C	15 minutos
2	Desnaturalización	94 °C	45 segundos
3	Hibridación	65 °C	45 segundos
4	Elongación	72 °C	45 segundos
	Ir al paso 2 por 24 ciclos		
5	Extensión final	72 °C	5 minutos
	Mantener a 4 °C.		

### Electroforesis de ADN.

Los productos de PCR se aplicaron en una electroforesis de gel de agarosa al 3 %. Las condiciones de la corrida fueron ajustadas en la fuente acoplada a la unidad de electroforesis: voltaje de 180 V y un tiempo de corrida de 60 minutos.

Al concluir la corrida se colocaron los geles bajo luz ultravioleta, para la visualización de las bandas en el analizador de imágenes.

### Interpretación de los resultados

Si los alelos de interés estaban presentes se observaron bandas de 184 pb según corresponda en el carril de corrida, así como una banda de 164 pb correspondiente al control interno de amplificación.

## **4.4 Principales variables de medición de la respuesta y procesamiento. Operacionalización. Definición de escalas.**

## Operacionalización de las variables

Variable	Clasificación	Escala	Descripción	Indicador	
Sociodemográfica	Edad	Cuantitativa continua	Edad en años cumplidos	Teniendo en cuenta la fecha de nacimiento se obtendrá en el momento de la aplicación de la encuesta.	Media Mediana Desviación estándar Rango Cuantiles
	Sexo	Cualitativa nominal dicotómica	Masculino Femenino	Fenotipo según sexo biológico.	Frecuencia Porcentaje Razón
	Color de la piel	Cualitativa nominal politómica	Blanca Mestiza Negra	Color de la piel identificado por el propio individuo entrevistado o sus tutores legales.	Frecuencia Porcentaje
	Grado de escolaridad	Cualitativa ordinal	No escolarizado Primaria Secundaria Técnico medio Preuniversitario Universidad	Nivel de educación alcanzado por el entrevistado, o aportado por sus tutores legales.	Frecuencia Porcentaje
	Talla	Cuantitativa continua	m	Estatura emitida por el individuo entrevistado o sus tutores legales.	Media Mediana Desviación estándar Rango Cuantiles
Mediciones individuales resultantes del examen físico y antropométrico	Peso	Cuantitativa continua	Kg	Peso emitido por el individuo entrevistado o sus tutores legales.	Media Mediana Desviación estándar Rango Cuantiles
	Índice de Masa Corporal	Cualitativa ordinal	Bajo peso: <18,5 Peso normal: 18,5 – 24,9 Sobrepeso: 25,0 – 29,9 Obesidad clase I: 30,0 – 34,9	Indicador de la relación entre el peso y la talla, calculado al dividir el peso en kilogramos por el cuadrado de la talla en metros (kg/m <sup>2</sup> ).	Frecuencia Porcentaje Proporción

Antecedentes y Estilos de vida	Antecedentes patológicos personales	Cualitativa nominal politómica	Obesidad clase II: 35,0 – 39,9 Obesidad clase III: ≥40,0 Enfermedades referidas.	Historia de enfermedades crónicas no transmisibles de evolución lenta y larga duración, tienen un origen poco conocido y multifactorial, se manifiestan en la clínica por sus complicaciones, alta letalidad y altas tasas de incapacidad.	Frecuencia Porcentaje Proporción
	Hábito de fumar	Cualitativa nominal politómica	Fumador activo Fumador pasivo Exfumador Nunca fumó	Práctica de inhalar sustancias resultantes del consumo de cigarrillos o tabaco.	Frecuencia Porcentaje Proporción
	Consumo de cigarrillos	Cualitativa nominal politómica	Menos de 5 De 6-15 Más de 16	Cantidad de cigarrillos consumidos como promedio al día por fumadores activos y exfumadores.	Frecuencia Porcentaje Proporción
	Consumo de tabaco	Cualitativa nominal politómica	Uno 2-3 Más de 3	Cantidad de tabacos consumidos al día.	Frecuencia Porcentaje Proporción
	Tiempo fumando	Cuantitativa continua	Cantidad de años	Tiempo en años de práctica de inhalar sustancias resultantes del consumo de cigarrillos o tabaco, en fumadores activos y exfumadores.	Media Mediana Desviación estándar Rango Cuantiles
	Consumo de bebidas alcohólicas	Cualitativa nominal dicotómica	Si No	Acción de ingerir bebidas compuestas por alcohol.	Frecuencia Porcentaje Proporción
	Frecuencia de ingestión alcohólica	Cualitativa nominal politómica	Todos los días 4 a 6 veces por semana 1 a 3 veces por semana 1 a 4 veces por mes 3 a 10 veces por año	Consumo de alcohol por unidad de tiempo.	Frecuencia Porcentaje
	Cantidad de alcohol ingerido	Cualitativa nominal politómica	Menos de 3 De 3-4 Más de 4	Número de tragos consumidos.	Frecuencia Porcentaje
	Consumo de Café	Cualitativa nominal dicotómica	Si No	Acción de ingerir café.	Frecuencia Porcentaje Proporción

Cantidad de café ingerido	Cualitativa nominal dicotómica	Hasta 3 tazas Más de 3 tazas	Número de tazas de café ingeridas al día.	Frecuencia Porcentaje
Estrés mantenido	Cualitativa nominal dicotómica	Si No	Reacción fisiológica referida por el individuo entrevistado o sus tutores legales, dada por el afrontamiento a una situación que se percibe como amenazante o de demanda incrementada, días previos al diagnóstico de COVID-19.	Frecuencia Porcentaje
Tipo de estrés	Cualitativa nominal dicotómica	Laboral Personal	Variedades de estrés según su relación o no, al ámbito laboral.	Frecuencia Porcentaje Proporción
Actividad física	Cualitativa nominal politómica	Caminar Correr Ejercicios físicos Bailoterapia Otro	Práctica de movimientos corporales que resultan en un gasto energético superior a la tasa de metabolismo basal.	Frecuencia Porcentaje
Tiempo de actividad física	Cualitativa nominal politómica	Menos de 30 Entre 30-60 Más de 60	Cantidad de minutos al día dedicado a la actividad física.	Frecuencia Porcentaje
Consumo de grasas saturadas	Cualitativa nominal dicotómica	Si No	Consumo de alimentos ricos en grasa animal.	Frecuencia Porcentaje
Consumo de vegetales	Cualitativa nominal politómica	Si No	Ingestión de vegetales cinco o más días de la semana.	Frecuencia Porcentaje
Forma de presentación de la COVID19	Cualitativa nominal dicotómica	Sin síntomas Con síntomas	Forma de presentación de la COVID-19 al realizar el PCR.	Frecuencia Porcentaje Proporción
Manifestaciones clínicas	Cualitativa nominal politómica	Según manifestaciones referidas.	Síntomas y signos presentados por los pacientes con diagnóstico confirmado de COVID-19.	Frecuencia Porcentaje Proporción
Días con síntomas	Cuantitativa continua	Días	Cantidad de días con manifestaciones clínicas de la enfermedad.	Media Mediana Desviación estándar Rango Cuantiles

Evolución y manejo clínico

Resultados obtenidos a partir de exámenes de laboratorio	Severidad clínica	Cualitativa nominal politómica	No complicado Grave Crítico	Estado de pacientes enfermos de la COVID-19 según las manifestaciones clínicas.	Frecuencia Porcentaje
	Complicaciones clínicas	Cualitativa nominal politómica	Complicaciones referidas	Complicaciones clínicas de la COVID-19 referidas en las historias clínicas de los pacientes con enfermedad complicada	Frecuencia Porcentaje
	Soporte respiratorio	Cualitativa nominal politómica	Oxígeno por cánula facial Oxígeno por máscara facial Ventilación asistida	Estrategia terapéutica para asistir la función respiratoria espontánea.	Frecuencia Porcentaje
	Tiempo de soporte respiratorio	Cuantitativa continua	Días	Cantidad de días recibiendo soporte respiratorio.	Media Mediana Desviación estándar Rango Cuantiles
	Tratamiento	Cualitativa nominal politómica	Azitromicina Kaletra Cloroquina Oseltamivir Interferón $\alpha$ -2b recombinante Biomodulina T Itolizumab Surfacen Antibióticos de amplio espectro Péptido CIGB258	Tratamiento recibido por cada individuo durante la estancia en un servicio de asistencia médica.	Frecuencia Porcentaje
	Grupo sanguíneo ABO	Cualitativa nominal politómica	A B O AB	Clasificación de grupos sanguíneos ABO mediante tipificación ABO.	Frecuencia Porcentaje Proporción
	TNF $\alpha$ (-308A>G)	Cualitativa nominal politómica	AA AG GG	Polimorfismo de simple nucleótidos en la posición -308 del gen TNF $\alpha$ .	Frecuencia alélica Frecuencia genotípica



## 4.5 Métodos de procesamiento y análisis de la información.

### 4.5.1 Análisis univariante.

Se empleó el paquete estadístico *IBM SPSS Statistics Base 22.0* que implementa diferentes métodos para el análisis de datos. Se computaron indicadores propios de la estadística descriptiva de las variables de interés. Se utilizaron medidas resúmenes como el porcentaje y la proporción para variables cualitativas, mientras que las variables cuantitativas fueron analizadas mediante medidas de tendencia central, de posición y de dispersión. Se calcularon los intervalos a un 95%. Se evaluó la distribución normal de las variables cuantitativas continuas mediante la prueba de Shapiro Wilks, para aplicar pruebas paramétricas o no paramétricas según corresponda en la variable de interés. Los resultados se expresaron en cuadros y gráficos estadísticos asociados cuando proceda.

Para investigar la relación entre el alelo TNF $\alpha$  -308.A y el riesgo de desarrollar síntomas de COVID-19, se utilizó análisis univariados y regresiones logísticas multivariadas para calcular las razones de probabilidad (OR) y los IC del 95% de los genotipos del polimorfismo TNF $\alpha$ -308A> G y gravedad de la infección por SARS CoV-2.

### 4.5.2 Análisis de datos genéticos.

Las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo TNF -308A> G se calcularon utilizando GENEPOP 4.4 para Windows / Linux / MacOSX (2015). Los datos se probaron para determinar su ajuste al equilibrio de Hardy-Weinberg calculando las frecuencias esperadas de cada genotipo y comparándolas con los valores observados. Se utilizó un Chi cuadrado para probar la bondad del ajuste entre los valores observados y esperados. Todos los datos de frecuencia para genotipos y alelos se compararon con los de las frecuencias de referencia de la población de Cuba y su provincia utilizando la prueba z con la corrección de Yates. Los datos de la población de referencia incluyeron novecientos ochenta y cuatro (984) individuos y fueron tomados de las bases de datos del Centro Nacional de Genética Médica (CNGM).

## 4.6. Aspectos éticos

Se informó a los pacientes sobre el propósito de la investigación. Se recibió su aprobación para ser incluidos en el estudio, a través de la firma del consentimiento informado anexado al cuestionario, documento que previamente fue elaborado y aprobado por todas las instancias y organismos correspondientes. Su contenido fue leído y explicado por el jefe del proyecto a los participantes, resaltando las medidas de seguridad en la recolección de muestras, el grado de privacidad y confidencialidad de la información obtenida y el compromiso de que, al publicar los datos, esto se realizará de forma agregada; además se dio respuesta a dudas o inquietudes que surgieron, dejando claro que los participantes tenían plena libertad de entrar o no en la investigación, así como de abandonar la misma a voluntad, garantizando el cumplimiento de las normas bioéticas establecidas para estos casos. Se les explicó que la extracción de 7mL de sangre no tenía riesgos para su salud y en caso de que ocurriera alguna situación adversa serían atendidos con las condiciones requeridas en el momento.

## RESULTADOS

### 3.1 Características demográficas

Como se muestra en la Tabla 1, la edad media (IQR) de las personas con infección por SARS-CoV-2 fue de 46 años. Se encontraron diferencias importantes en la edad entre los diferentes grupos de gravedad clínica de la infección por SARS-CoV-2 con una mediana de 41 años (IC 95%: 39,1-42,9), 46 años (IC 95%: 43,1-46,4) y 60 años (95% IC: 39,1-42,9). % IC: 56,3-64,4) a pacientes asintomáticos (AS), sintomáticos leves (SL) y sintomáticos graves (SG), respectivamente. Observamos diferencias relevantes en subgrupos de individuos mayores de 60 años según el incremento de la gravedad clínica (AS = 15,3%; IC 95%: 11,8-18,8; SL = 21,6%; IC 95%: 18,2-25,0; SG = 51,5 %; IC del 95%: 39,5-63,6). La proporción de pacientes varones fue del 45,9% (472), mientras que el 54,1% (556) eran mujeres. La población tuvo un aumento en el número de pacientes de color de piel blanca con 649 (63,1%) inscritos, mientras que el número de individuos mestizos es el doble de personas con color de piel negro, que incluyeron 241 (23,4%) y 131 (12,7%), respectivamente. La comorbilidad más frecuente de todos los grupos de pacientes en el momento del aislamiento fue la hipertensión (HTA), que afectó al 35,5% (365) de todas las personas estudiadas. Los síntomas más comunes entre 618 pacientes sintomáticos en el momento del aislamiento fueron fiebre (301 [29,3%]), tos (247 [24,0%]), trastornos del olfato (187 [18,2%]) y alteraciones del gusto (187 [18,2%]), seguido de dificultad para respirar (163 [15,9%]), fatiga (156 [15,2%]), dolor de garganta (147 [14,3%]), diarrea (140 [13,6%]), dolor de cabeza (59 [5,7%]) y síntomas neurológicos (43 [4,2%]) y dolor respiratorio (38 [3,7%]).

Tabla 1. Características basales de los grupos de pacientes con infección por SARS-CoV-2

Características	Grupos de pacientes No. (%)		
	Asintomático (n=411)	Sintomático leve (n=551)	Sintomático severo (n=66)

<b>Edad</b>			
<20	60 (14.6)	56 (10.2)	0 (0,0)
20-29	66 (16.1)	90 (16.3)	5 (7.6)
30-39	73 (17.8)	79 (14.3)	2 (3.0)
40-49	57 (13.9)	92 (16.7)	9 (13.6)
50-59	92 (22.4)	115 (20.9)	16 (24.2)
≥60	63 (15.3)	119 (21,6)	34 (51.5)
Median (IQR) *	41 (26.0-54.0)	46 (29.0-58.0)	60 (50.5-71.5)
<b>Sexo</b>			
Masculino	193 (47.0)	251 (45.6)	28 (42.4)
Femenino	218 (53.0)	300 (54.4)	38 (57.6)
<b>Color de la piel <sup>a</sup></b>			
Blanco	256 (62.3)	347 (63.0)	46 (69.7)
Mestizo	103 (25.1)	125 (22.7)	13 (19.7)
Negro	51 (12.4)	73 (13.2)	7 (10.6)
<b>Comorbilidades</b>			
Hipertensión **	108 (26.3)	217 (39.4)	40 (60.6)
Asma	51 (12.4)	93 (16.9)	10 (15.2)
Diabetes **	22 (5.4)	61 (11.1)	15 (22.7)
Obesidad	22 (5.4)	34 (6.2)	6 (9.1)
<b>Enfermedades</b>			
Cardiovasculares ** (No HT)	18 (4.4)	39 (7.1)	13 (19.7)
Hipercolesterolemia	12 (2.9)	19 (3.4)	3 (4.5)
Cáncer	7 (1.7)	14 (2.5)	3 (4.5)
EPOC**	6 (1.5)	15 (2.7)	6 (9.1)
Bronquiectasias**	1 (0.2)	3 (0.5)	2 (3.0)
Apnea del sueño**	0 (0.0)	1 (0.2)	1 (1.5)

Abreviatura: IQR, rango intercuartílico; HT, hipertensión; EPOC, enfermedad pulmonar obstructiva crónica; NS, no significativo. a Valor faltante: 0,7%;

\* Principales diferencias según la prueba de Kruskal Wallis; \*\* Principales diferencias según la prueba de la  $\chi^2$ .

### 3.2 Características genéticas de las poblaciones

Las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo TNF $\alpha$  -308A> G en la población de referencia se muestran en la Tabla 2. El análisis de Hardy-Weinberg de los datos indicó que estaba en equilibrio ( $p > 0.05$ ). Las frecuencias de genotipos en la población de estudio se ajustaron a las de la población de referencia, excepto en la provincia de Holguín. En comparación con las frecuencias locales de referencias, la población de estudio de Holguín presentó una mayor frecuencia del genotipo TNF $\alpha$ -308.GG y una menor frecuencia del genotipo TNF $\alpha$  -308.AG.

Tabla 2. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo TNF $\alpha$  -308A> G †

Localización de la muestra		Frecuencias poblacionales de referencia		Frecuencias población en estudio	
<b>Cuba</b>		<b>n = 948</b>		<b>n = 1028</b>	
Genotipo	GG	76.7	79.7		
	AG	21.7	18.4		
	AA	1.6	1.9		
Alelo	G	0.88	0.89		
	A	0.12	0.11		
<b>Isla de la Juventud</b>		<b>n = 2</b>		<b>n = 34</b>	
Genotipo	GG	50.0	76.5		
	AG	50.0	23.5		
	AA	0.0	0.0		
Alelo	G	0.75	0.88		
	A	0.25	0.12		
<b>Pinar del Río</b>		<b>n = 79</b>		<b>n = 36</b>	
Genotipo	GG	75.9	88.9		
	AG	19.0	11.1		
	AA	5.1	0.0		
Alelo	G	0.85	0.94		
	A	0.15	0.06		
<b>Artemisa</b>		<b>n = 29</b>		<b>n = 22</b>	
Genotipo	GG	72.4	72.7		
	AG	27.6	27.3		
	AA	0.0	0.0		
Alelo	G	0.86	0.86		
	A	0.14	0.14		
<b>Mayabeque</b>		<b>n = 28</b>		<b>n = 27</b>	
Genotipo	GG	85.7	74.1		
	AG	14.3	25.9		
	AA	0	0.0		
Alelo	G	0.93	0.87		
	A	0.07	0.13		
<b>La Habana</b>		<b>n = 74</b>		<b>n = 363</b>	
Genotipo	GG	73.0	79.6		
	AG	23.0	18.2		
	AA	4.0	2.2		
Alelo	G	0.84	0.89		
	A	0.16	0.11		
<b>Matanzas</b>		<b>n = 68</b>		<b>n = 116</b>	
Genotipo	GG	73.5	82.7		
	AG	25.0	14.7		
	AA	1.5	2.6		
Alelo	G	0.86	0.90		
	A	0.14	0.10		
<b>Villa Clara</b>		<b>n = 101</b>		<b>n = 133</b>	
Genotipo	GG	79.2	78.2		
	AG	19.8	20.3		
	AA	1.0	1.5		
Alelo	G	0.89	0.88		
	A	0.11	0.12		
<b>Cienfuegos</b>		<b>n = 29</b>		<b>n = 18</b>	
Genotipo	GG	72.4	77.8		
	AG	27.6	22.2		
	AA	0	0.0		
Alelo	G	0.86	0.89		
	A	0.14	0.11		
<b>Sancti Spíritus</b>		<b>n = 58</b>		<b>n = 54</b>	
Genotipo	GG	70.7	74.1		
	AG	29.3	24.1		
	AA	0	1.8		
Alelo	G	0.85	0.86		
	A	0.15	0.14		
<b>Ciego de Ávila</b>		<b>n = 34</b>		<b>n = 74</b>	
Genotipo	GG	70.6	71.6		
	AG	29.4	24.3		
	AA	0	4.05		
Alelo	G	0.85	0.84		
	A	0.15	0.16		
<b>Camagüey</b>		<b>n = 44</b>		<b>n = 31</b>	
Genotipo	GG	88.6	77.4		
	AG	9.1	19.4		
	AA	2.3	3.2		
Alelo	G	0.93	0.87		
	A	0.07	0.13		
<b>Las Tunas</b>		<b>n = 43</b>		<b>n = 13</b>	
Genotipo	GG	81.4	84.6		
	AG	18.6	15.4		
	AA	0	0.0		
Alelo	G	0.91	0.92		
	A	0.09	0.08		
<b>Holguín</b>		<b>n = 116</b>		<b>n = 54</b>	
Genotipo	GG	73.3	88.9*		
	AG	25.0	11.1*		
	AA	1.7	0.0		
Alelo	G	0.86	0.94		
	A	0.14	0.06		
<b>Granma</b>		<b>n = 88</b>		<b>n = 8</b>	
Genotipo	GG	84.1	100.0		
	AG	14.8	0.0		
	AA	1.1	0.0		
Alelo	G	0.91	1.00		
	A	0.09	0.00		
<b>Santiago de Cuba</b>		<b>n = 98</b>		<b>n = 32</b>	
Genotipo	GG	74.5	84.4		
	AG	23.5	12.5		
	AA	2.0	3.1		
Alelo	G	0.86	0.91		
	A	0.14	0.09		
<b>Guantánamo</b>		<b>n = 57</b>		<b>n = 13</b>	
Genotipo	GG	78.9	84.6		
	AG	21.1	7.7		
	AA	0	7.7		
Alelo	G	0.89	0.88		
	A	0.11	0.12		

Abreviatura: n = número de sujetos

† Las frecuencias de los genotipos TNF $\alpha$  -308 se presentan en porcentaje y las frecuencias de los alelos se muestran en proporciones.

\* Principales diferencias según la prueba z.

El estudio sobre las frecuencias genotípicas y alélicas según la gravedad clínica mostró que las tasas de prevalencia de homocigosidad AA en el polimorfismo TNF $\alpha$  -308A> G fue de 1,2% y 0,8% en sujetos sintomáticos y grupo de comparación asintomático, respectivamente. Además, las respectivas tasas de distribución de prevalencia de AG para pacientes sintomáticos y asintomáticos fueron 11,9% y 6,5%. Sin embargo, las frecuencias genotípicas de los individuos portadores del alelo A se calcularon como 7,3% en pacientes asintomáticos, 11,8% en pacientes sintomáticos leves y 1,3% en pacientes sintomáticos graves (tabla 3). Cuando los pacientes fueron analizados según el estrato de gravedad de la enfermedad, encontramos una mayor probabilidad de portar el genotipo AG en los individuos que desarrollaron síntomas leves (OR = 1,26, IC del 95%: 0,91-1,73). Sin embargo, no hubo un mayor riesgo de genotipo AG entre los pacientes con la enfermedad leve en comparación con los pacientes con COVID-19 grave (110 de 551 pacientes versus 12 de 66 pacientes; OR = 0,89, IC del 95%: 0,46–1,72). Asimismo, la frecuencia del genotipo GG no fue mayor en los pacientes con enfermedad leve y grave en comparación con la forma asintomática de infección por SARS-CoV-2, pero pudimos encontrar una mayor probabilidad de portar el genotipo GG en individuos que no desarrollaron síntomas (336 de 411; OR = 1,24, IC del 95%: 0,91-1,70).

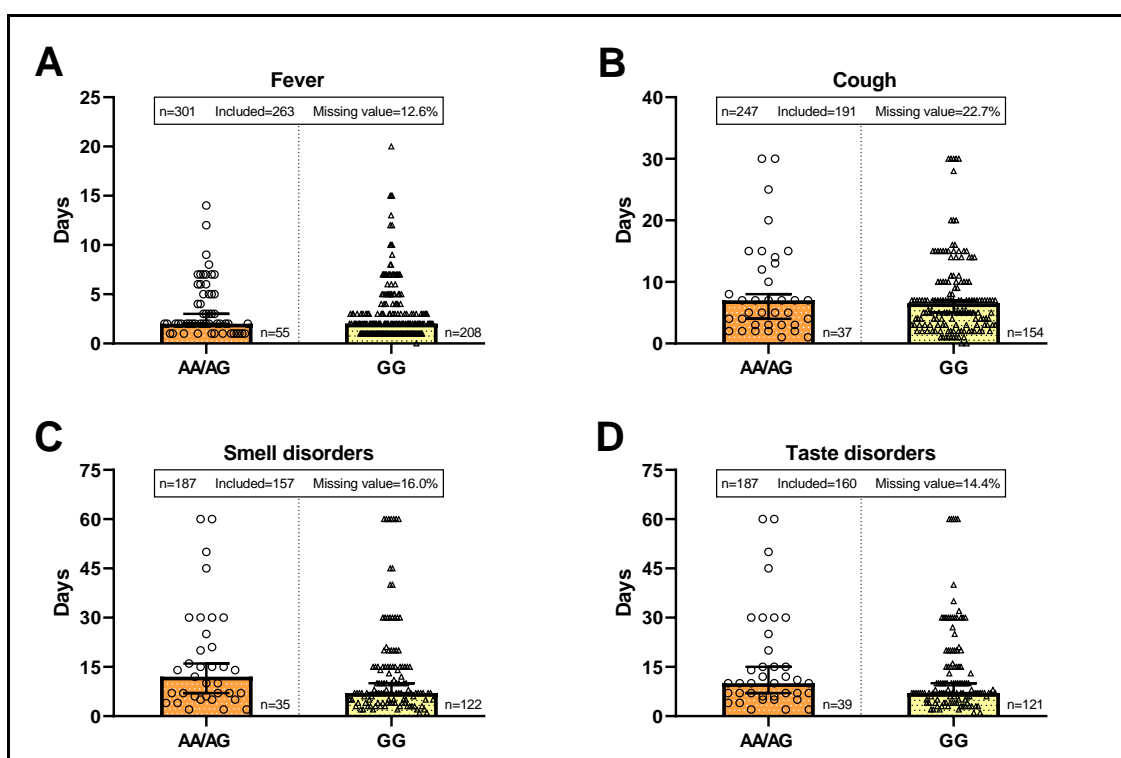
Tabla 3. Gravedad clínica de infección por SARS-CoV-2 según genotipos del polimorfismo TNF $\alpha$ -308A> G †

Características	Genotipos					
	GG	OR (95% CI)	AG	OR (95% CI)	AA	OR (95% CI)
Severidad de la enfermedad						
<b>SL (n=551)</b>	430 (78.0)	0.81 (0.59-1.09)	110 (20.0)	1.26 (0.91-1.73)	11 (2.0)	1.06 (0.44-2.58)
<b>SG (n=66)</b>	53 (80.3)	1.04 (0.56-1.95)	12 (18.2)	0.99 (0.52-1.88)	1 (1.5)	0.76 (0.10-5.79)
Formas Clínicas						
<b>SL&amp;SG (617)</b>	483 (78.3)	0.81 (0.59-1.10)	122 (19.8)	1.27 (0.91-1.76)	12 (1.9)	0.99 (0.41-2.47)
<b>AS (n=411)</b>	336 (81.8) *	1.24 (0.91-1.70)	67 (16.3) *	0.79 (0.57-1.10)	8 (1.9)	1.00 (0.41-2.47)

† Las frecuencias de los genotipos TNF $\alpha$  -308 se presentan en valor absoluto y porcentaje. \* Principales diferencias por prueba z cuando se compara con la población de referencia cubana.

### 3.3 TNF $\alpha$ -308.A alelo y momento de síntomas específicos del COVID-19

Aunque se ha informado que el alelo A se asocia con una enfermedad más agresiva, no observamos diferencias importantes en la duración de los síntomas más frecuentes entre los genotipos que portan el alelo A (AG / AA) y el genotipo que no lo porta (GG). en el grupo sintomático, con la respectiva mediana de duración de la fiebre a 2 días (rango, 1-14 días; 25% y 75% IQR: 2-5 días) y 2 días (rango, 1-35 días; 25% y 75% IQR : 1-4 días) (Fig.1A), de tos a 7 días (rango, 1-90 días; 25% y 75% IQR: 3-13 días) y 6.5 días (rango, 1-60 días; 25% y 75% IQR: 3-10 días) (Fig.1B), de los trastornos del olfato a 12 días (rango, 2-60 días; 25% y 75% IQR: 6-25 días) y 7 días (rango, 1- 120 días; 25% y 75% IQR: 5-15 días) (Fig.1C), de alteraciones del gusto a 10 días (rango, 2-180 días; 25% y 75% IQR: 6-25 días) y 7 días (rango, 1-90 días; 25% y 75% IQR: 6-18 días) (Fig.1D), de disnea a 8 días (rango, 2-30 días; 25% y 75% IQR: 3- 14 días) y 6 días (rango, 1-90 días; 25% y 7 5% IQR: 3-10 días) (Fig. 1E), de fatiga a 7 días (rango, 1-30 días; 25% y 75% IQR: 3-14 días) y 7 días (rango, 1-60 días; 25% y 75% IQR: 3-14 días ) (Fig.1F), de dolor de garganta a 5 días (rango, 1-30 días; 25% y 75% IQR: 3-7 días) y 4 días (rango, 1-90 días; 25% y 75% IQR : 2-7 días) (Fig.1G) y diarrea a 10 días (rango, 1-40 días; 25% y 75% IQR: 3-18 días) y 7 días (rango, 1-75 días; 25% y 75% IQR: 3-17 días) (Fig. 1H).



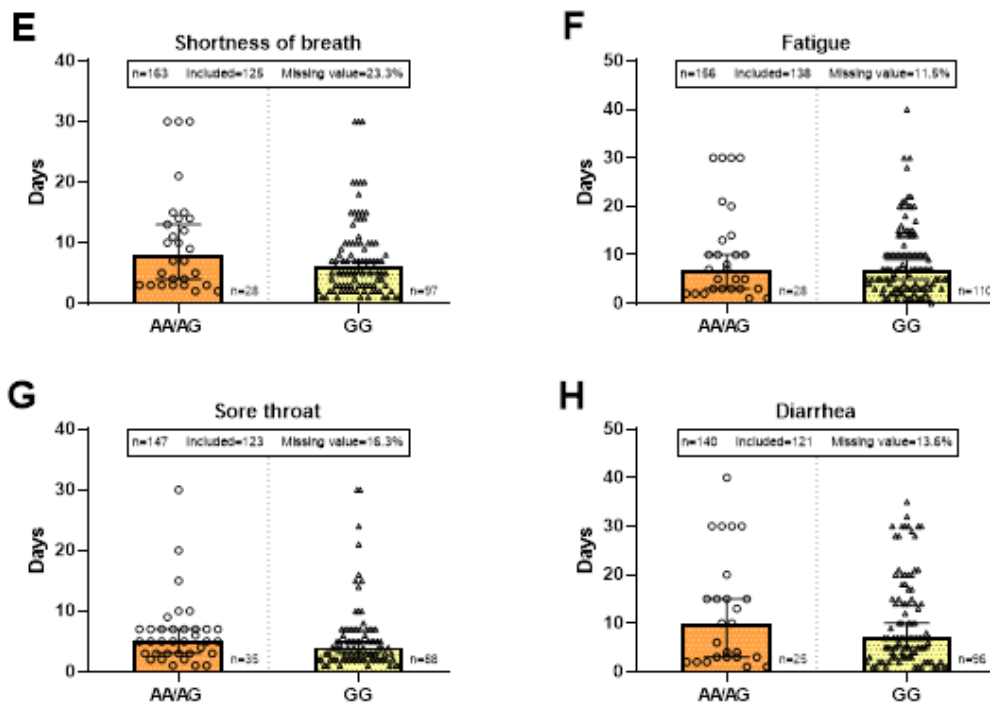


Figura 1. Temporización de los síntomas según genotipos de polimorfismo del gen TNF $\alpha$ -308A> G. Gráficos de barras que muestran los días desde la aparición de los síntomas de fiebre (A), tos (B), trastornos del olfato (C), trastornos del gusto (D), dificultad para respirar (E), fatiga (F), dolor de garganta (G) y diarrea (H). Los datos se expresan como mediana de días con IC del 95%. AA homocigotos y AG heterocigotos se agruparon en AA / AG. No se observaron diferencias mediante la prueba de Mann-Whitney.

### 3.4 Genotipos del polimorfismo TNF $\alpha$ -308 y días desde el hisopo positivo para SARS-CoV-2 hasta el alta hospitalaria

Se evaluó el papel del efecto del polimorfismo de TNF $\alpha$ -308 en el número de individuos infectados durante días desde el frotis positivo de SARS-CoV-2 hasta el alta hospitalaria de acuerdo con sus genotipos por regiones del país. El número de individuos infectados por el genotipo GG fue siempre el más importante, seguido de los infectados por AG y AA que se ajustaron según la distribución de los genotipos en la población cubana. En Cuba no se encontraron diferencias temporales según frecuencias genotípicas (Fig. 2A). La mediana de días según genotipos fue de 16 días (rango, 3-80 días; 25% y 75% IQR: 14-19 días), 15 días (rango, 3-50 días; 25% y 75% IQR: 13-19 días) y 15 días (rango, 6-21 días; 25% y 75% IQR: 14-17 días) a GG, AG y AA, respectivamente.

Para comprender mejor el papel del alelo A en el tiempo que media desde el hisopo positivo para SARS-CoV-2 hasta el alta hospitalaria, se analizó la mediana del número de días según su presencia o ausencia en individuos estratificados por regiones del país. Las respectivas medianas de días para los genotipos GG y AG / AA fueron de 16 días (rango, 3-80 días; 25% y 75% IQR: 14-19 días) y 15 días (rango, 5-50 días; 25% y 75% IQR: 14-18 días) en Occidente (Fig. 2B), 15 días (rango, 3-53 días; 25% y 75% IQR: 13-18 días) y 15 días (rango, 10-28 días; 25% y 75% IQR: 13-18 días) en el Centro (Fig.2C), y 19 días (rango, 3-44 días; 25% y 75% IQR: 16-21 días) y 21 días (rango, 3 -27 días; 25% y 75% IQR: 17-23 días) en el Este (Fig. 2D).

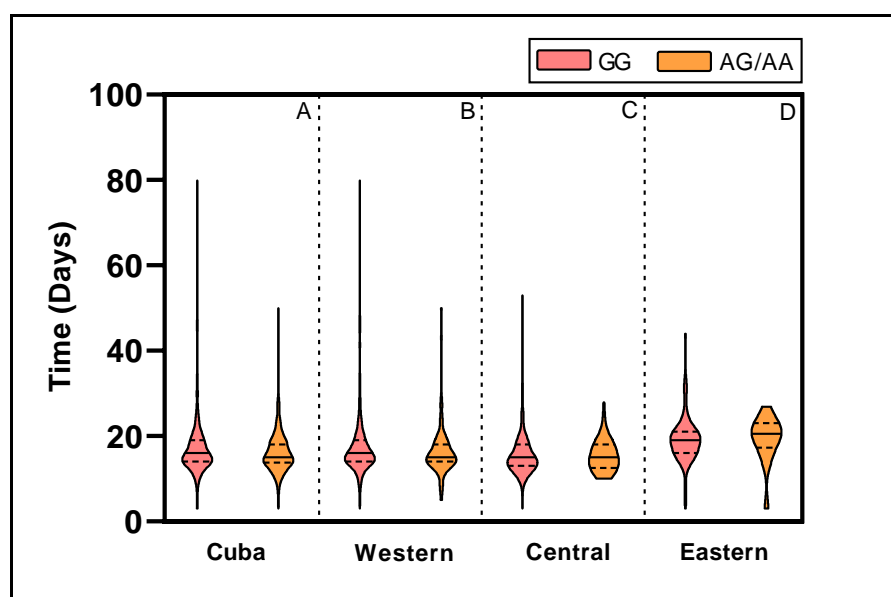


Figura 2. Días desde el hisopo positivo para SARS CoV-2 hasta el alta hospitalaria según genotipos de polimorfismo del gen TNF $\alpha$ -308A> G. Gráficos de violín que muestran estancia hospitalaria desde que el hisopo fue positivo por RT-PCR en Cuba (n = 1028, incluido = 955: GG = 761, AG / AA = 194; valor faltante = 7,1%) (A), región occidental (n = 598, incluido = 541: GG = 434, AG / AA = 107; valor faltante = 9.5%) (B), Región central (n =

310, incluido = 306: GG = 233, AG / AA = 73; valor faltante = 1,3%) (C) y región oriental (n = 120, incluido = 108: GG = 94, AG / AA = 14; valor perdido = 10,0%) (D). No se observaron diferencias de tiempo de acuerdo con las frecuencias de genotipos por regiones.

### 3.6 Asociación entre el alelo TNF $\alpha$ -308.A y el riesgo de desarrollar síntomas de COVID-19

Los resultados de la regresión logística para el riesgo de desarrollar síntomas en individuos infectados con SARS-CoV-2 según TNF $\alpha$ -308. La presencia del alelo A por regiones del país se presentan en la Figura 2. Los sujetos del estudio con alelo A en Cuba tenían aproximadamente una vez (OR = 1,24, IC del 95%: 0,91-1,70) mayor riesgo de desarrollar síntomas en comparación con los que tienen el alelo G. Al estratificar los estudios por regiones del país, los individuos del oeste y el este tenían más probabilidades de aumentar el riesgo de desarrollar síntomas (OR = 1,29, IC del 95%: 0,84-1,99 y OR = 4,00, IC del 95%: 0,86-18,66, respectivamente) que los individuos de la región central (OR = 1,15, IC del 95%: 0,68-1,93). Después de ajustar los factores de confusión en el análisis multivariado, obviamente se encontró un riesgo estadísticamente mayor de desarrollar síntomas de COVID-19 en sujetos de las regiones occidental y oriental del país (OR = 1,53, IC del 95%: 1,00-2,34 y OR = 4,64, IC del 95%: 1,03-21,66, respectivamente). Aunque no hubo una asociación importante, se observó una tendencia hacia un riesgo elevado de desarrollar síntomas en sujetos en todos los países, excepto en los individuos de la región central donde el riesgo disminuyó.

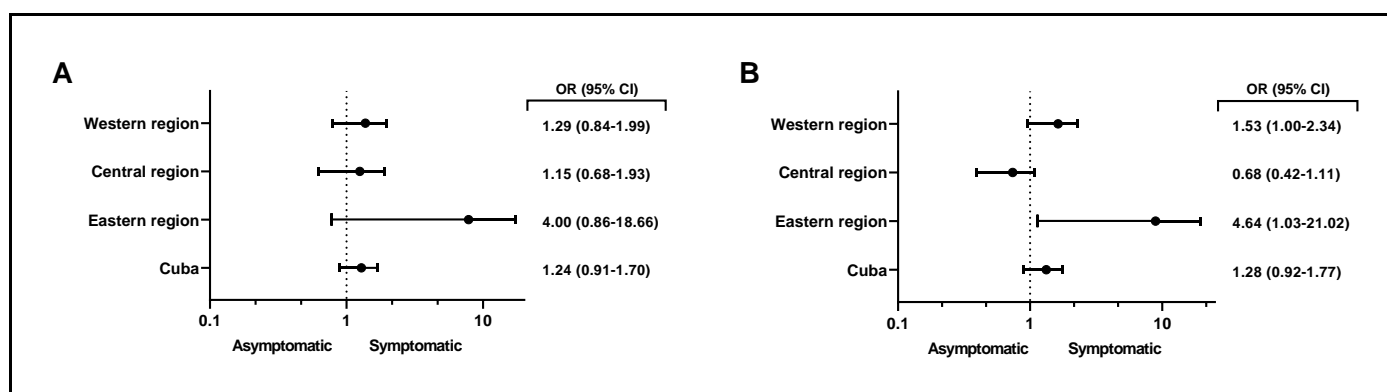


Figura 3. Riesgo de desarrollar síntomas en individuos infectados por SARS-CoV-2 según la interacción entre el alelo TNF $\alpha$  -308.A y las regiones del país. Odds ratio bruta con IC del 95% (A). Razón de posibilidades ajustada con IC del 95% para edad, grupo sanguíneo A, comorbilidades (hipertensión, asma, diabetes) (B)

## DISCUSIÓN

El COVID-19 se ha extendido rápidamente por todo el mundo, por lo que es necesario obtener datos para caracterizar la enfermedad y brindar opciones para trazar estrategias para su control. Varias investigaciones han identificado un espectro de factores de riesgo relacionados con la presentación de la enfermedad. Entre estos factores de riesgo, destaca la edad, con un mayor riesgo de desarrollar formas graves de la enfermedad en los ancianos. Estos resultados contrastan con nuestro estudio donde los pacientes mayores de 60 años fueron más de la mitad de los casos graves. El mayor riesgo de severidad en los ancianos puede explicarse en primer lugar, por una baja inmunocompetencia relacionada con la senescencia del propio sistema inmunológico, que al afectar ambas ramas de la inmunidad, innata y adaptativa, genera un impacto negativo en la respuesta inmune. de los ancianos y los predispone a enfermedades infecciosas. La mayor incidencia de comorbilidades relacionadas con la edad también se ha informado como una posible explicación del aumento de personas de edad avanzada con formas graves de la enfermedad, aunque otras investigaciones han descrito la edad avanzada y las condiciones preexistentes como factores de riesgo independientes para COVID-19.<sup>9-14</sup>

Hasta ahora, los hombres están registrados como infectados con una mayor prevalencia en comparación con las mujeres. De manera similar, los hombres mostraron aumentos en los indicadores graves de COVID-19, como los marcadores inflamatorios asociados con daño orgánico, lo que sugiere que los hombres son más susceptibles a desarrollar síntomas graves de COVID-19 que las mujeres.<sup>15-18</sup> Estos hallazgos difieren en el estudio, donde hubo un mayor número de individuos femeninos en los tres grupos de clasificación según la gravedad de la presentación clínica, aunque no se encontraron diferencias relevantes con respecto a los pacientes masculinos. Se pueden realizar nuevos estudios para explicar este comportamiento de la prevalencia de la enfermedad por sexo en Cuba.

La frecuencia de sujetos con color de piel blanca (63,1%) de la población de estudio no mostró diferencias importantes con respecto a la población general en Cuba (64,1%). Su prevalencia en la muestra puede estar relacionada con su alta frecuencia en la población general. Asimismo, se encontró que la frecuencia de pacientes mestizos (26,6%) y de piel negra (9,3%) de la población cubana es 3,2% mayor y 3,4% menor que la muestra estudiada, respectivamente.<sup>19</sup> No se observaron diferencias importantes en el color de la piel entre los grupos de clasificación de gravedad clínica. Si bien este estudio no controló los antecedentes genéticos según grupos étnicos, este hallazgo resalta la voluntad política y el alcance equitativo del Sistema de Salud cubano para la atención de los pacientes diagnosticados de infección por SARS-CoV-2.

Numerosos estudios han revelado que la mortalidad por COVID-19 en pacientes con comorbilidades tiende a ser mayor, lo que se ha relacionado con el hecho de que la enfermedad crónica aumenta el riesgo de infección. Se ha informado que los pacientes con antecedentes de hipertensión que desarrollan COVID-19 se han deteriorado clínicamente más rápido que los pacientes sin esta comorbilidad y desarrollan formas graves después de la infección por SARS-CoV-2. Se han observado resultados similares en epidemias de coronavirus anteriores, como las causadas por los virus respectivos para el síndrome respiratorio agudo severo (SARS) y el síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS). Estos resultados son similares a nuestra investigación, donde la hipertensión es también la comorbilidad más frecuente en pacientes con COVID-19 y en aquellos con enfermedad grave. Asimismo, se encontraron mayores diferencias entre las frecuencias de pacientes diabéticos en los tres grupos de clasificación, con un aumento en el número de pacientes con antecedentes de diabetes mellitus a medida que aumentaba el grado de gravedad clínica. Estos resultados contrastan con los reportados en otros estudios donde se encontró que en ausencia de otras comorbilidades, los pacientes diabéticos tienen un mayor riesgo de desarrollar neumonía severa, con una respuesta inflamatoria exagerada, niveles más altos de daño tisular y un estado de hipercoagulación aumentada. La enfermedad cardiovascular fue la tercera comorbilidad más frecuente en los casos que presentaron formas graves, lo que coincide con otras investigaciones en el hecho de que tener enfermedad cardiovascular se asocia con un aumento de más de tres veces en el riesgo de formas graves de COVID-19.<sup>20-26</sup> En resumen, las comorbilidades identificadas en el estudio no difieren de las reportadas por otros estudios. Si bien su frecuencia en pacientes con COVID-19 podría estar asociada, entre otros factores, con la frecuencia de aparición en la población general, estas comorbilidades se han relacionado con formas más graves de la enfermedad que podrían conducir a la muerte.

Varios estudios han expuesto que la respuesta hiperinflamatoria inducida por el SARS-CoV-2 es una de las principales causas de gravedad de la enfermedad y muerte. Se han informado niveles de interleucina TNF- $\alpha$  en pacientes con COVID-19 grave, aunque otros informes sugieren que hay más citocinas involucradas en la patogénesis de la enfermedad. Con el fin de explorar más factores del huésped influyen en la progresión clínica de COVID-19, estudiamos el polimorfismo -308A> G del gen TNF $\alpha$  localizado en la región promotora, que se ha atribuido a polimorfismos dentro de las regiones reguladoras. Da como resultado dos formas alélicas, una en la que la guanina define el alelo común (TNF $\alpha$ .G) y la otra en la que la guanina es sustituida por la adenosina del alelo más raro (TNF $\alpha$ .A) en la posición -308. Se ha encontrado que la presencia del alelo más raro se correlaciona con una producción mejorada de TNF- $\alpha$  espontánea o estimulada.<sup>27-31</sup>

Cuando se compararon las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo TNF $\alpha$ -308A> G en individuos con infección por SARS-CoV-2 con la población de referencia de Cuba, no hubo diferencias relevantes. Esto nos permite inferir que las personas que portan el alelo A no son más susceptibles a la infección por SARS-CoV-2. Ahmed Saleh et al.<sup>32</sup> no informaron resultados similares, encontraron que el alelo A se expresa más en los pacientes que en los controles, y los individuos con genotipo AA y AG son más susceptibles al COVID-19. Se reconoce que nuestro estudio no controla el cálculo de frecuencias alélicas y genotípicas según el origen étnico.

Sin embargo, cuando se compararon las frecuencias de referencia en Holguín (población homogénea en Cuba) con las de la población de estudio en la misma provincia, la distribución de genotipos difirió, principalmente debido a una mayor frecuencia de homocigotos del alelo TNF $\alpha$ .G. La baja frecuencia del genotipo TNF $\alpha$ .AA en esta población puede deberse al hecho de que ha sido seleccionado fuera de la población debido a la alta secreción asociada de TNF $\alpha$ . Una implicación importante de la Ley de Hardy-Weinberg es que, para un alelo raro, la frecuencia de heterocigotos es mucho mayor que la de homocigotos inusuales. Este argumento demuestra la dificultad de eliminar los alelos recesivos deletéreos de las poblaciones, ya que la mayoría de ellas se encuentran en estado heterocigoto y la selección natural no puede actuar contra ellas.

Para comprender mejor las diferentes presentaciones clínicas de la infección por SARS-CoV-2, comparamos el genotipo del polimorfismo TNF $\alpha$ -308A> G en lo que respecta a la gravedad de la enfermedad. Nuestros resultados sugieren que el genotipo TNF $\alpha$ .AG parece estar relacionado con formas sintomáticas de la enfermedad, lo que podría explicarse considerando que el TNF $\alpha$  media muchos síntomas como fiebre, tos seca, debilidad muscular y disfunción multiorgánica, todos presentes en COVID-19.<sup>33-38</sup> Sin embargo, encontramos que el genotipo TNF $\alpha$ .AA puede no ser un factor relevante en formas más graves, aunque el número de homocigotos del alelo A fue muy bajo en individuos con enfermedad grave. Además, encontramos una mayor probabilidad de ser homocigotos para el alelo G en individuos asintomáticos con infección por SARS-CoV-2. Cuando se compararon los datos de frecuencias genotípicas del polimorfismo TNF $\alpha$  -308A> G en grupos asintomáticos, sintomáticos leves y sintomáticos severos con los de la población de referencia cubana, no se encontró distribución aleatoria en el clúster asintomático, donde la frecuencia del TNF $\alpha$  -308 El genotipo .AG fue menor y hubo un aumento del genotipo TNF $\alpha$  -308.GG. Estos datos nos permiten inferir que las personas homocigotas al alelo G son más susceptibles a desarrollar una forma asintomática de la infección por SARS-CoV-2.

Varios estudios han revelado que los pacientes con infección por SARS-CoV-2 pueden desarrollar una forma de presentación sintomática o asintomática, pero la mayoría de los casos de COVID-19 son sintomáticos con una tasa de mortalidad moderada. Una gran parte de los pacientes con COVID-19 presentan síntomas comunes que incluyen fiebre, tos, dolor de garganta, congestión nasal, debilidad, fatiga o mialgia, mareos, dificultad para respirar, dolor muscular, artralgias, opresión en el pecho, sobreproducción de moco con

expectoración, hemoptisis. y disnea. Nuestro estudio coincide con otras investigaciones en encontrar que la fiebre y la tos son, en ese orden, los síntomas más prevalentes de la enfermedad, aunque no encontramos resultados similares para la fatiga como tercer síntoma más frecuente. Los trastornos del olfato y del gusto también fueron síntomas frecuentes en la población de nuestro estudio, que es similar a algunas investigaciones que informan que son el cuarto síntoma más común de la infección por SARS-Cov-2. La proporción aproximada de pacientes sintomáticos severos versus leves en nuestro estudio se estimó en 1: 8, que difiere de lo informado por otras investigaciones con estimaciones de 1: 4.<sup>38-43</sup>

La dinámica temporal de los síntomas reportados por los pacientes reveló diferentes patrones de síntomas a lo largo del tiempo y su larga duración, específicamente pérdida del olfato y del gusto, fatiga, dificultad para respirar y diarrea, los cuales fueron reportados por individuos que estuvieron presentes entre el sexto y el octavo. día después del diagnóstico. La duración de los trastornos del gusto y olfato por SARS-CoV-2 fue mayor con respecto al resto de síntomas, y es similar en otros estudios que lo reportan aproximadamente entre 7,5 y 8 días. Los individuos que presentaban el alelo A del polimorfismo del gen TNF $\alpha$  en la posición -308 presentaron un aumento en la duración de los trastornos del olfato y del gusto en comparación con los que no portaban el alelo. Según un estudio anterior, la disosmia puede ocurrir como resultado de una inflamación, que puede matar las neuronas olfativas. Aunque se ha mencionado que el TNF $\alpha$  puede afectar la función de la neurona olfativa, otros estudios han mostrado un aumento considerable de la cantidad de TNF $\alpha$  en el tejido olfatorio, lo que puede ir acompañado de algunos resultados histopatológicos específicos. La infiltración inflamatoria ocurre en respuesta a la expresión local de TNF $\alpha$ , y este incidente puede conducir a una expansión considerable de la submucosa olfativa. En relación con los trastornos del gusto, se ha demostrado que los receptores de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2) se expresan preferentemente en un subconjunto de células de las papilas gustativas. Cuando el SARS-CoV-2 invade los receptores ACE2 para la entrada celular, se activan los mecanismos de inflamación local entre los que contribuyen al TNF $\alpha$ . Se ha informado experimentalmente que la señalización de TNF modula las respuestas de sabor amargo, lo que puede contribuir a la distorsión del gusto asociada con infecciones y algunas enfermedades inflamatorias crónicas. El daño a la mucosa lingual podría explicar los trastornos del gusto a los que se hace referencia en COVID-19.<sup>44-49</sup>

COVID-19 tiene una evolución natural de aproximadamente 6 semanas. Se observó una alta variabilidad en el curso clínico de los pacientes con COVID-19. El tiempo de recuperación fue muy variable, con una duración media de  $17,1 \pm 6,8$  días en el país, lo que difiere de otros estudios que han informado una duración media de más de 20 días.<sup>38,50,51</sup> Este hallazgo puede estar relacionado con el inicio temprano de protocolos de tratamiento en Cuba, como resultado de una eficiente investigación activa desarrollada durante el control epidemiológico de los casos activos y sus contactos. Sin embargo, llama la atención que en la región oriental del país, la mediana de los días transcurridos desde el diagnóstico hasta el alta hospitalaria asumida luego de un resultado negativo de la prueba de RT-PCR, es mayor que en el resto de las regiones del país. La presencia del alelo A del polimorfismo estudiado aumenta la estancia hospitalaria en esta región, aunque a partir de la muestra de este estrato se recomienda realizar nuevos estudios que incluyan un mayor número de individuos. Este resultado contrasta con lo informado por Angioni et al.<sup>29</sup> quien relaciona los niveles de TNF $\alpha$  con el tiempo de hospitalización. El análisis de riesgo de severidad en individuos con infección por SARS-CoV-2 por regiones del país según la presencia del alelo A, muestra que no existe relación entre el polimorfismo y la severidad de la enfermedad, la cual difiere de lo reportado en Mansoura (Egipto) donde se asoció con una enfermedad más agresiva. Asimismo, no hubo asociación de los polimorfismos TNF $\alpha$ -308 y la gravedad del SARS (síndrome respiratorio agudo severo), aunque se relacionó con la fibrosis pulmonar intersticial en comparación con la fibrosis pulmonar no intersticial en pacientes con SARS. Sin embargo, el riesgo de desarrollar síntomas de COVID-19 aumentó en pacientes portadores del alelo A en la región occidental y oriental del país, en concomitancia con otros factores de riesgo que se han asociado con la gravedad de la enfermedad, como la edad, el grupo sanguíneo. A y algunas comorbilidades. Se ha encontrado que los niveles plasmáticos de TNF $\alpha$  aumentan en pacientes de edad avanzada, lo que puede estar asociado con la senescencia de las células del sistema inmunológico. Aunque el nivel de TNF- $\alpha$  circulante podría estar bajo un proceso regulador multifactorial, la concentración local de TNF- $\alpha$  podría ser de mayor importancia y estar más controlada por el alelo A del polimorfismo -308. Se necesitan más estudios para recomendar la terapia anti-TNF en individuos con síntomas específicos de COVID-19, aunque esta terapia ya se ha recomendado en pacientes que desarrollaron síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) en los dos días posteriores al ingreso hospitalario. Se ha sugerido la consideración de su administración extrahospitalaria como tratamiento en individuos de alto riesgo con COVID-19, como pacientes ancianos con comorbilidades que pueden ser monitoreadas adecuadamente.<sup>21,29,32, 52-58</sup>

## CONCLUSIÓN

Este estudio identificó el papel del alelo TNF.-308A en la evolución clínica de la infección por SARS-CoV-2, al aumentar el riesgo de desarrollar síntomas de COVID-19 en las provincias orientales y occidentales del país. Estos hallazgos sugieren marcadores novedosos que pueden explorarse para identificar criterios novedosos para la estratificación de pacientes con COVID-19 en el país.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



1. Merad M, Martin JC. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2020 Jul 2];20(6):355–62. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41577-020-0331-4>
2. Gil del Valle L, Rabeiro Martinez CL, Bermúdez Alfonso Y, Hernández Glez-Abreu MC. El reposicionamiento terapéutico en el enfrentamiento a la pandemia de infección por SARS-COV 2. *Boletín Epidemiológico del IPK* [Internet]. 2020 Jul 7 [citado 10 Jul 2020];30(25):195–9. Disponible en: <https://files.sld.cu/ipk/2020/07/07/boletin-epidemiologico-del-ipk-no-25-2020/>
3. Dirección Nacional de Epidemiología (MINSAP). Boletín epidemiológico semanal. *Boletín Epidemiológico del IPK* [Internet]. 2020 [citado 10 Jul 2020];30(14): 105. Disponible en: <https://files.sld.cu/ipk/files/2020/04/Boi-14w-20-.pdf>
4. Singh AK, Gillies CL, Singh R, Singh A, Chudasama Y, Coles B, et al. Prevalence of comorbidities and their association with mortality in patients with COVID-19: A Systematic Review and Meta-analysis. *Diabetes, Obes Metab* [Internet]. 2020 Jun 23 [cited 2020 Jul 10];2020. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/dom.14124>
5. Chen XY, Yan BX, Man XY. TNF $\alpha$  inhibitor may be effective for severe COVID-19: learning from toxic epidermal necrolysis. *Ther Adv Respir Dis* [Internet]. 2020 [cited 2020 Jul 2];14. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7243041/>
6. Churchill BM. PP. CR. & IJK. TNF- $\alpha$ , TNF Receptors and Their Complex Implications in Therapy. *Asian J Immunol* [Internet]. 2020 [cited 2020 Jul 10];4(1):36–50. Available from: <http://www.journalaji.com/index.php/AJI/article/view/30127>
7. Wilson A, Symons J, McDowell T, McDevitt H, Duff. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* [Internet]. 1997 [cited 2020 Jul 10]; 94(7): 3195–3199. Available from: <https://www.pnas.org/content/pnas/94/7/3195.full.pdf>
8. Abraham L, Kroeger KM. Impact of the -308 TNF promoter polymorphism on the transcriptional regulation of the TNF gene: relevance to disease. *Journal of leukocyte biology* [Internet]. 1999 [cited 2020 Jul 10];66(4): 562–566. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/jlb.66.4.562>
9. Dhar Chowdhury S, Oommen AM. Epidemiology of COVID-19. *J Dig Endosc* [Internet]. 2020 Mar [cited 2021 Feb 1];11(01):03–7. Available from: <https://dx.doi.org/10.1055%2Fs-0040-1712187>
10. Italian National Institute of Health. Characteristics of COVID-19 patients dying in Italy Report based on available data on March 20th, 2020. 2020. [cited 2021 Jan 31]. Available from: <https://www.epicentro.iss.it/en/coronavirus/sars-cov-2-analysis-ofdeaths>
11. Saavedra Hernández D, García Verdecia B. Inmunosenescencia: efectos de la edad sobre el sistema inmune. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* [Internet]. 2014 [citado 11 Feb 2021]; 30(4):[aprox. 0 p.]. Disponible en: <http://www.revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/195>
12. Starke KR, Petereit-Haack G, Schubert M, Kämpf D, Schliebner A, Hegewald J, et al. The age-related risk of severe outcomes due to covid-19 infection: A rapid review, meta-analysis, and meta-regression. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 2020 Aug 2 [cited 2021 Mar 1];17(16):1–24. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijerph17165974>
13. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet* [Internet]. 2020 Mar 28 [cited 2021 Mar 1];395(10229):1054–62. Available from: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30566-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30566-3)
14. Wu C, Chen X, Cai Y, Xia J, Zhou X, Xu S, et al. Risk Factors Associated with Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients with Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern Med* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2021 Mar 1];180(7):934–43. Available from: <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2020.0994>
15. Jiang F, Deng L, Zhang L, Cai Y, Cheung CW, Xia Z. Review of the Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *J Gen Intern Med* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2021 Mar 1];35(5):1545–9. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11606-020-05762-w>
16. Guan WJ, Liang WH, Zhao Y, Liang HR, Chen ZS, Li YM, et al. Comorbidity and its impact on 1590 patients with COVID-19 in China: a nationwide analysis - PubMed. *Eur Respir J* [Internet]. 2020 May 14 [cited 2021 Mar 1];55(5). Available from: <https://doi.org/10.1183/13993003.00547-2020>
17. Park M, Cook AR, Lim JT, Sun Y, Dickens BL. A Systematic Review of COVID-19 Epidemiology Based on Current Evidence. *J Clin Med* [Internet]. 2020 Mar 31 [cited 2021 Feb 1];9(4):967. Available from: <https://dx.doi.org/10.3390%2Fjcm9040967>
18. Li X, Marmar T, Xu Q, Tu J, Yin Y, Tao Q, et al. Predictive indicators of severe COVID-19 independent of comorbidities and advanced age: A nested case-control study. *Epidemiol Infect* [Internet]. 2020 [cited 2021 Mar 1];148. Available from: <https://doi.org/10.1017/S0950268820002502>
19. Informe nacional Censo de Población y vivienda Cuba 2012. Oficina Nacional de Estadística e Información (ONEI). Cuba. Enero 2014. Disponible en: <http://www.onei.gob.cu/>
20. Emami A, Javanmardi F, Akbari A, Kojuri J, Bakhtiari H, Rezaei T, et al. Survival rate in hypertensive patients with COVID-19. *Clin Exp Hypertens* [Internet]. 2021 Jan 2 [cited 2021 Feb 1];43(1):77–80. Available from: <https://doi.org/10.1080/10641963.2020.1812624>

21. Yang J, Zheng Y, Gou X, Pu K, Chen Z, Guo Q, et al. Prevalence of comorbidities and its effects in coronavirus disease 2019 patients: A systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2021 Mar 1];94:91–5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.03.017>
22. Hosseinzadeh R, Goharrizi MASB, Bahardoust M, Alvanegh AG, Ataee MR, Bagheri M, et al. Should all patients with hypertension be worried about developing severe coronavirus disease 2019 (COVID-19)? *Clin Hypertens* [Internet]. 2021 Dec 15 [cited 2021 Feb 1];27(1):3. Available from: <https://clinicalhypertension.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40885-021-00161-7>
23. Badawi A, Ryou SG. Prevalence of comorbidities in the Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): a systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2016 [cited 2021 Mar 1];49:129–33. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.06.015>
24. Pal R, Bhadada SK. COVID-19 and diabetes mellitus: An unholy interaction of two pandemics. *Diabetes Metab Syndr* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2020 Jul 14];14(4):513–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871402120301144?via%3Dihub>
25. Kumar A, Arora A, Sharma P, Anikhindi SA, Bansal N, Singla V, et al. Is diabetes mellitus associated with mortality and severity of COVID-19? A meta-analysis. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2020 Jul 14];14(4):535–45. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871402120301090?via%3Dihub>
26. Salazar M, Barochiner J, Espeche W, Ennis I. COVID-19, hipertensión y enfermedad cardiovascular. *Hipertens y Riesgo Vasc* [Internet]. 2020 Jun 18 [citado 20 Jul 2020];30(20). Disponible en: <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.hipert.2020.06.003>
27. Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet* [Internet]. 2020 Mar 28 [cited 2021 Mar 1];395(10229):1033–4. Available from: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30628-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30628-0)
28. Song P, Li W, Xie J, Hou Y, You C. Cytokine storm induced by SARS-CoV-2. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2021 Mar 1];509:280–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.06.017>
29. Angioni R, Sánchez-Rodríguez R, Munari F, Bertoldi N, Arcidiacono D, Cavinato S, et al. Age-severity matched cytokine profiling reveals specific signatures in Covid-19 patients. *Cell Death Dis* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2021 Mar 1];11(11):1–12. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03151-z>
30. Del Valle DM, Kim-Schulze S, Huang HH, Beckmann ND, Nirenberg S, Wang B, et al. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nat Med* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2021 Mar 1];26(10):1636–43. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41591-020-1051-9>
31. Wilson AG, Symons JA, Mcdowell TL, Mcdevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor  $\alpha$  promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1997 Apr 1 [cited 2021 Mar 7];94(7):3195–9. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.94.7.3195>
32. Saleh A, Sultan A, Elashry M a., Farag A, Mortada MI, Ghannam MA, et al. Association of TNF- $\alpha$  G-308 a Promoter Polymorphism with the Course and Outcome of COVID-19 Patients. *Immunol Invest* [Internet]. 2020 [cited 2021 Mar 1];12. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7711738/>
33. Stefferl A, Hopkins SJ, Rothwell NJ, Luheshi GN. The role of TNF- $\alpha$  in fever: opposing actions of human and murine TNF- $\alpha$  and interactions with IL- $\beta$  in the rat. *Br J Pharmacol* [Internet]. 1996 Aug 1 [cited 2021 Mar 1];118(8):1919–24. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1476-5381.1996.tb15625.x>
34. Jatakanon A, Laloo UG, Lim S, Chung KF, Barnes PJ. Increased neutrophils and cytokines, TNF- $\alpha$  and IL-8, in induced sputum of non-asthmatic patients with chronic dry cough. *Thorax* [Internet]. 1999 [cited 2021 Mar 1];54(3):234–7. Available from: <https://dx.doi.org/10.1136%2Fthx.54.3.234>
35. Reid MB, Li YP. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and muscle wasting: A cellular perspective. *Respir Res* [Internet]. 2001 [cited 2021 Mar 7];2(5):269–72. Available from: <https://dx.doi.org/10.1186%2Frr67>
36. Reid MB, Lännergren J, Westerblad H. Respiratory and limb muscle weakness induced by tumor necrosis factor- $\alpha$ : Involvement of muscle myofilaments. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2002 Aug 15 [cited 2021 Mar 7];166(4):479–84. Available from: <https://doi.org/10.1164/rccm.2202005>
37. Burdon D, Tiedje T, Pfeffer K, Vollmer E, Zabel P. The role of tumor necrosis factor in the development of multiple organ failure in a murine model. *Crit Care Med* [Internet]. 2000 [cited 2021 Mar 1];28(6):1962–7. Available from: [https://journals.lww.com/ccmjournal/Abstract/2000/06000/The\\_role\\_of\\_tumor\\_necrosis\\_factor\\_in\\_the.45.aspx](https://journals.lww.com/ccmjournal/Abstract/2000/06000/The_role_of_tumor_necrosis_factor_in_the.45.aspx)
38. Baj J, Karakuła-Juchnowicz H, Teresiński G, Buszewicz G, Ciesielka M, Sitarz E, et al. COVID-19: Specific and Non-Specific Clinical Manifestations and Symptoms: The Current State of Knowledge. *J Clin Med* [Internet]. 2020 Jun 5 [cited 2021 Mar 7];9(6):1753. Available from: <https://dx.doi.org/10.3390%2Fjcm9061753>

39. Nishiura H, Kobayashi T, Miyama T, Suzuki A, Jung S mok, Hayashi K, et al. Estimation of the asymptomatic ratio of novel coronavirus infections (COVID-19). *Int J Infect Dis* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2021 Mar 1];94:154–5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.03.020>
40. Fu L, Wang B, Yuan T, Chen X, Ao Y, Fitzpatrick T, et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in China: A systematic review and meta-analysis. *J Infect* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2021 Mar 1];80(6):656–65. Available from: <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.jinf.2020.03.041>
41. Sun P, Qie S, Liu Z, Ren J, Li K, Xi J. Clinical characteristics of hospitalized patients with SARS-CoV-2 infection: A single arm meta-analysis. *J Med Virol* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2021 Mar 1];92(6):612–7. Available from: <https://doi.org/10.1002/jmv.25735>
42. Gautier JF, Ravussin Y. A New Symptom of COVID-19: Loss of Taste and Smell. *Obesity* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2021 Mar 1];28(5):848. Available from: <https://doi.org/10.1002/oby.22809>
43. Xydakis MS, Dehghani-Mobaraki P, Holbrook EH, Geisthoff UW, Bauer C, Hautefort C, et al. Smell and taste dysfunction in patients with COVID-19. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2021 Mar 1];20(9):1015–6. Available from: [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(20\)30293-0](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(20)30293-0)
44. Tian S, Hu N, Lou J, Chen K, Kang X, Xiang Z, et al. Characteristics of COVID-19 infection in Beijing. *J Infect* [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2021 Mar 1];80(4):401–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.02.018>
45. Beltrán-Corbellini Á, Chico-García JL, Martínez-Poles J, Rodríguez-Jorge F, Natera-Villalba E, Gómez-Corral J, et al. Acute-onset smell and taste disorders in the context of COVID-19: a pilot multicentre polymerase chain reaction based case–control study. *Eur J Neurol* [Internet]. 2020 Sep 16 [cited 2021 Mar 1];27(9):1738–41. Available from: <https://doi.org/10.1111/ene.14273>
46. Tenforde MW, Kim SS, Lindsell CJ, Billig Rose E, Shapiro NI, Files DC, et al. Symptom Duration and Risk Factors for Delayed Return to Usual Health Among Outpatients with COVID-19 in a Multistate Health Care Systems Network — United States, March–June 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* [Internet]. 2020 Jul 31 [cited 2021 Mar 1];69(30):993–8. Available from: [http://www.cdc.gov/mmwr/volumes/69/wr/mm6930e1.htm?s\\_cid=mm6930e1\\_w](http://www.cdc.gov/mmwr/volumes/69/wr/mm6930e1.htm?s_cid=mm6930e1_w)
47. Vaira LA, Salzano G, Fois AG, Piombino P, De Riu G. Potential pathogenesis of ageusia and anosmia in COVID-19 patients. *Int Forum Allergy Rhinol* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2021 Mar 1];10(9):1103–4. Available from: <https://doi.org/10.1002/alr.22593>
48. Torabi A, Mohammadbagheri E, Akbari Dilmaghani N, Bayat AH, Fathi M, Vakili K, et al. Proinflammatory Cytokines in the Olfactory Mucosa Result in COVID-19 Induced Anosmia. *ACS Chem Neurosci* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2021 Mar 1];11(13):1909–13. Available from: <https://dx.doi.org/10.1021/acschemneuro.0c00249>
49. Xu H, Zhong L, Deng J, Peng J, Dan H, Zeng X, et al. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *Int J Oral Sci* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2021 Mar 1];12(1):1–5. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41368-020-0074-x>
50. Feng P, Jyotaki M, Kim A, Chai J, Simon N, Zhou M, et al. Regulation of bitter taste responses by tumor necrosis factor. *Brain Behav Immun* [Internet]. 2015 Oct 1 [cited 2021 Mar 1];49:32–42. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.04.001>
51. Mizrahi B, Shilo S, Rossman H, Kalkstein N, Marcus K, Barer Y, et al. Longitudinal symptom dynamics of COVID-19 infection. *Nat Commun* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2021 Mar 1];11(1):1–10. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20053-y>
52. Wang S, Wei M, Han Y, Zhang K, He L, Yang Z, et al. Roles of TNF-alpha gene polymorphisms in the occurrence and progress of SARS-Cov infection: a case-control study. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2008 Dec 29 [cited 2021 Mar 8];8(1):27. Available from: <http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2334-8-27>
53. Davies NG, Klepac P, Liu Y, Prem K, Jit M, Eggo RM, et al. Age-dependent effects in the transmission and control of COVID-19 epidemics. *medRxiv* [Internet]. 2020 May 3 [cited 2021 Mar 1];2020.03.24.20043018. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0962-9>
54. Dudley JP, Lee NT. Disparities in age-specific morbidity and mortality from sars-cov-2 in China and the republic of Korea. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2021 Mar 1];71(15):863–5. Available from: <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa354>
55. Hoiland RL, Fergusson NA, Mitra AR, Griesdale DEG, Devine D V., Stukas S, et al. The association of ABO blood group with indices of disease severity and multiorgan dysfunction in COVID-19. *Blood Adv* [Internet]. 2020 Oct 14 [cited 2021 Mar 1];4(20):4981–9. Available from: <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020002623>
56. Pourali F, Afshari M, Alizadeh-Navaei R, Javidnia J, Moosazadeh M, Hessami A. Relationship between blood group and risk of infection and death in COVID-19: a live meta-analysis. *New Microbes New Infect* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2021 Mar 1];37. Available from: <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.nmni.2020.100743>
57. Remuzzi A, Remuzzi G. COVID-19 and Italy: what next? *Lancet* [Internet]. 2020 Apr 11 [cited 2021 Mar 1];395(10231):1225–8. Available from: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30627-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30627-9)

58. Feldmann M, Maini RN, Woody JN, Holgate ST, Winter G, Rowland M, et al. Trials of anti-tumour necrosis factor therapy for COVID-19 are urgently needed. *Lancet* [Internet]. 2020 May 2 [cited 2021 Mar 1];395(10234):1407–9. Available from: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30858-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30858-8)