

MÁSTER UNIVERSITARIO EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y SALUD INTERNACIONAL

ESPECIALIDAD: ENFERMEDADES INFECCIOSAS



UNIVERSITAS
Miguel Hernández

TRABAJO FIN DE MÁSTER

2020-2021

Título: Biopsias *post mortem* de pulmón, corazón e hígado en pacientes con la COVID-19: Estudio observacional de la correlación histológica y clínica

Autor: Cristian Herrera García

Tutor académico: Dr. José Manuel Ramos Rincón.



Biopsias *post mortem* de pulmón, corazón e hígado en pacientes con la COVID-19: Estudio observacional de la correlación histológica y clínica.

Cristian Herrera García

Tutor: José Manuel Ramos Rincón

Resumen

Introducción: El SARS-COV-2 ha generado una pandemia mundial. Los estudios anatomopatológicos *post-mortem* nos han ayudado a conocer la enfermedad, pero aún quedan muchos retos para acabar con ella.

Materiales y métodos: Estudio descriptivo analítico de los hallazgos histopatológicos de biopsias de pulmón, hígado y corazón en una muestra de 71 fallecidos del Hospital General Universitario de Alicante desde el 10 de marzo de 2020 al 30 de marzo de 2021.

Resultados: La población estudiada presentó edad avanzada y elevada fragilidad y comorbilidad. Se analizaron 62(87,3%) pacientes con biopsias pulmonares, 39(54,9%) con muestras cardiacas y 48(67,6%) con tejido hepático. Hallazgos más frecuentes: en pulmón los infiltrados intersticiales (80,6%), principalmente linfocíticos (75,8%); en hígado la esteatosis(30,8%) y en corazón la hipertrofia de fibras miocárdicas(47,9%). La RT-PCR de SARS-CoV-2 en pulmón fue positiva en el 84,8% de los pacientes en las que se realizó. La presencia de alteraciones pulmonares se asoció a la ferritina>650µg/l *pre-mortem*[OR4,854 (IC95% 1,217-19,230);p=0,031]. El daño alveolar difuso (DAD) y el DAD mixto se relacionaron con LDH>400U/l *pre-mortem*[ORa19,036 (IC95% 2,988-121,288);p=0,002],[OR5,684 (IC95% 1,084-29,803);p=0,038].

Conclusiones: Las alteraciones anatomopatológicas pulmonares se asociaron con la elevación de parámetros de inflamación previo al fallecimiento. En el resto de tejidos se ha evidenciado daño asociado a la COVID-19 en bajo porcentaje.

Palabras clave:

COVID-19, SARS-CoV-2, biopsias *post mortem*, estudio anatomopatológico, pulmón, hígado, corazón.

Abstract

Introduction: SARS-COV-2 has generated a global pandemic. *Post-mortem* pathological studies have helped us to understand the disease, but there are still many challenges to end it.

Materials and methods: Descriptive analytical study of the histopathological findings of lung, liver and heart biopsies in a sample of 71 deceased patients at the Hospital General Universitario de Alicante from March 10, 2020 to March 30, 2021.

Results: The studied population presented advanced age and high frailty and comorbidity. 62(87.3%) patients with lung biopsies, 39(54.9%) with cardiac samples and 48 (67.6%) with liver tissue were analyzed. Most frequent findings: in the lung interstitial infiltrates (80.6%), mainly lymphocytic(75.8%); in liver, steatosis(30.8%) and in heart, myocardial fiber hypertrophy (47.9%). SARS-CoV-2 RT-PCR in the lung was positive in 84.8% of the patients in whom it was performed. The presence of pulmonary alterations was associated with *pre-mortem* ferritin $>650\mu\text{g/l}$ [ORa 4,854 (95%IC 1.217-19.230); $p=0.031$]. Diffuse alveolar damage (DAD) and mixed DAD were related to LDH $>400\text{U/l}$ *pre-mortem* [ORa 19.036 (95%IC 2.988-121.288); $p=0.002$], [OR 5.684 (95%IC 1.084-29.803); $p=0.038$].

Conclusions: Pulmonary pathological alterations were associated with the elevation of inflammation parameters prior to death. In the rest of the tissues, damage associated with COVID-19 has been evidenced in a low percentage.

Keywords:

COVID-19, SARS-CoV-2, *post mortem* biopsies, pathological study, lung, liver, heart.

Índice

| | |
|--|-----------|
| 1. Introducción. Justificación del interés científico del tema elegido. Identificación del problema o de las hipótesis de partida. | 6 |
| Estado actual de la cuestión | 6 |
| Justificación del interés científico..... | 8 |
| Hipótesis y objetivos..... | 10 |
| 2. Metodología para el alcance de los objetivos definidos | 11 |
| Diseño del estudio, población y criterios de inclusión | 11 |
| Variables de estudio | 11 |
| Recogida de variables | 13 |
| Análisis de datos | 14 |
| Dificultades y Limitaciones | 15 |
| Consideraciones éticas | 16 |
| 3. Plan de Trabajo | 17 |
| 4. Resultados | 18 |
| Estudio descriptivo de la muestra | 18 |
| 5. Discusión | 29 |
| Análisis e interpretación de los resultados..... | 29 |
| Aplicabilidad y utilidad práctica de los resultados. Recomendaciones para futuras investigaciones..... | 33 |
| Consideraciones finales | 34 |
| Conclusiones..... | 35 |
| 5. Agradecimientos | 36 |
| 6. Bibliografía..... | 37 |
| 7. Anexos..... | 40 |

1. Introducción. Justificación del interés científico del tema elegido. Identificación del problema o de las hipótesis de partida.

Con la irrupción de la enfermedad por Coronavirus 2019 (COVID-19) en diciembre de 2019 en la provincia de Wuhan (China) causada por el nuevo coronavirus de 2019 (SARS-CoV-2) se inició una pandemia de magnitudes globales (1). Desde entonces la comunidad científica ha trabajado duro para desentrañar los misterios del nuevo patógeno y hacer frente a la enfermedad que ha puesto en jaque todos los sistemas sanitarios de los distintos países (2). A continuación, se resumen brevemente el conocimiento científico actual del virus y la enfermedad causante.

Estado actual de la cuestión

Importancia de los coronavirus para el ser humano

La familia de virus *Coronaviridae* son un grupo diverso de virus con cubierta y RNA unicatenario con polaridad positiva que suelen causar infecciones respiratorias leves en el ser humano (3). El mayor reservorio natural de los coronavirus se ubica en determinadas especies de murciélagos. En algunos casos, mediante adaptación genética del virus, se generan pasos a diferentes especies, incluidos los humanos (3).

Existen siete especies de coronavirus que provocan enfermedades en humanos, de las cuales cuatro especies (HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43 y HCoV-HKU1) causan infecciones respiratorias en individuos inmunodeprimidos, en bebés y en ancianos. Los otros tres son coronavirus humanos altamente patógenos, incluido el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV), el coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) y SARS-CoV-2 (4).

La enfermedad generada por la infección de este nuevo virus se conoce como COVID-19 (5). La definición de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de caso confirmado de COVID-19 se basa en la confirmación microbiológica de la infección por SARS-CoV-2 junto con un cuadro clínico de síntomas y signos compatibles (5,6)

Patogenia y transmisión del SARS-CoV-2

El SARS-CoV-2 se transmite principalmente a través de gotitas respiratorias durante el contacto cercano cara a cara (7). Los viriones de SARS-CoV-2 infectan las células humanas a través de la

unión a la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA 2) expresada en las células epiteliales del tracto respiratorio. Dichas enzimas se expresan también en las células endoteliales y en otros tipos de células. La proteína S (*Spike*), expresada en la superficie de las partículas virales es la encargada de interaccionar con la ECA 2 y desencadenar la fusión viral con la célula hospedadora (3,8,9)

La infección puede transmitirse por portadores asintomáticos, presintomáticos y sintomáticos (7). El tiempo promedio desde la exposición hasta el inicio de los síntomas es de 5 días, y el 97,5% de las personas que desarrollan síntomas lo hacen en 11,5 días (7).

A día de hoy sabemos que la infección por SARS-CoV-2 es una enfermedad multisistémica que causa daño en los diferentes órganos, tales como corazón, riñones e hígado, si bien afecta primordialmente al sistema respiratorio (2,6,10–12). La interferencia del SARS-CoV-2 con los procesos fisiológicos de la gran cantidad de células capaces de infectar explica la variedad de síntomas desencadenados. Los efectos inflamatorios secundarios a la respuesta inmune antiviral, también llamada “tormenta de citoquinas”, también contribuye a la clínica y las complicaciones asociadas (3,9).

COVID-19

Los estudios han establecido que la COVID-19 presenta un espectro clínico desde asintomáticos a enfermedad leve (80%), moderada (15%) y grave (5%) (5,13). Los síntomas comunes en son los típicos de las infecciones virales respiratorias (fiebre, tos seca, disnea, astenia, mialgias, náuseas/vómitos o diarrea, cefalea, etc.). La anosmia o la ageusia pueden ser el único síntoma de presentación en aproximadamente el 3% de las personas con COVID19 (5,13,14).

Las anomalías comunes de laboratorio entre los pacientes hospitalizados incluyen linfopenia, marcadores inflamatorios elevados (p. ej., Velocidad de sedimentación globular, proteína C reactiva, ferritina, factor de necrosis tumoral α , IL-1, IL-6) y parámetros de coagulación anormales. (p. ej., tiempo de protrombina prolongado, trombocitopenia, dímero D elevado, fibrinógeno bajo) (5,13,14).

Los patrones radiológicos descritos abarcan desde la ausencia de imágenes patológicas hasta el pulmón blanco bilateral pasando por opacidades parcheadas en vidrio deslustrado, infiltrados bilaterales intersticiales y consolidaciones con broncograma aéreo. Estas alteraciones del patrón suelen ser mayormente bilaterales y pueden estar presentes incluso en pacientes asintomáticos (1,8)

El síndrome de síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) y afectación multiorgánica son típicos de los casos graves de COVID-19 (10,12). La muerte acontece principalmente en varones (60% de las muertes), en paciente mayores y en aquellos con comorbilidades (10–12,15).

Según la *COVID19 Dashboard by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE) at Johns Hopkins University (JHU)*, a fecha 27 de agosto de 2021 había 214.890.686 casos de COVID-19 en el mundo y 4.478.754 fallecidos. Esto representa una tasa de mortalidad del 2,1% (16). En España hasta el 13 de agosto del mismo año se habían identificado 4.693.540 infectados y 82.470 fallecidos (17). En los pacientes que ingresan en centros hospitalarios por la COVID-19 la mortalidad es más elevada, especialmente a medida que aumenta la edad de los pacientes. Así en el Registro SEMi-COVID-19 con más de 15000 pacientes analizados, la mortalidad de los pacientes con edad comprendida entre 50-59 era del 4,7%, con edad 60-69 de 10,5%, de 70-79 de 26.7% y de 80-100 años del 46% (14).

Justificación del interés científico

Ante una enfermedad de tales envergaduras, transmisibilidad, espectro clínico y gravedad clínica, lo que ha condicionado millones de muertes por todo el mundo es necesario tener el máximo conocimiento posible de la enfermedad generada por el SARS-COV-2. Muchos han sido los estudios sobre epidemiología, manifestaciones clínicas o hallazgos radiológicos. Muchos menos han sido los reportes sobre hallazgos anatomopatológicos en autopsias o biopsias *post mortem* (12,18). Este hecho ha tenido lugar por varias cuestiones:

En las primeras fases de la pandemia, el valor de las autopsias fue infraestimado. Muchas organizaciones recomendaron la no realización de los estudios *post mortem* por falta de materiales adecuados de bioseguridad y por el poco conocimiento del riesgo infeccioso (12). Fueron pocos los valientes que se atrevieron a describir los hallazgos histopatológicos en los albores de la pandemia. Esto fue un craso error que retrasó el conocimiento de la patología y, en consecuencia, una correcta aproximación terapéutica (12).

En etapas posteriores, diferentes organizaciones científicas han realizado recomendaciones y guías en relación a las medidas de seguridad para realizar estudios *post mortem* de forma segura y efectiva (2). A pesar de ello, la gran carga laboral acaecida sobre los equipos médicos de todo el mundo ha generado grandes dificultades en el estudio anatomopatológico de los pacientes fallecidos (19). Las autopsias completas son procedimientos complejos que requieren gran dedicación, recursos técnico avanzados y de mano de obra experta. Es por ello que en algunos centros se ha optado por los

estudios anatomopatológicos mínimamente invasivos a través de biopsias de los órganos de estudio (6,15). La autopsia mínimamente es segura y efectiva para el estudio anatomopatológico de la COVID19, aunque con limitaciones, ya que no permiten determinar el conjunto patomorfológico y la causa de la muerte (15).

Aún con todas las limitaciones acontecidas, hay que enfatizar en la importancia de los estudios anatomopatológicos en esta pandemia. Los exámenes anatomopatológicos han contribuido al conocimiento de la patología (2,3,12). Gracias a ellos conceptualizamos la infección por SARS-COV-2 como una enfermedad multisistémica que genera alteraciones histopatológicas en diferentes órganos del cuerpo humano, principalmente en el pulmón, pero también en el resto de órganos (10,11).

El daño pulmonar parece estar asociado a la respuesta viral exacerbada a la infección viral. La tormenta de citocinas activa los procesos de defensa inmunológica que conducen a la producción de sustancias citotóxicas, marcadores de inflamación y alteraciones del tejido pulmonar (9). Se genera así un complejo escenario donde pueden asociarse diferentes lesiones histopatológicas, en general, asociadas al síndrome de distrés respiratorio agudo (3). En la mayoría de estudios se observa daño alveolar difuso (DAD), infiltrados celulares y edema intersticial, así como fenómenos de afectación vascular (6).

En el resto de órganos se han descrito alteraciones variables y en diferente porcentaje según los estudios. En el corazón se han observado alteraciones asociadas a isquemia, aterosclerosis e insuficiencia cardíaca, así como miocarditis y pericarditis (10,11). En prácticamente todos los estudios se describen diferentes alteraciones hepáticas (10,13). En ambos casos no existe consenso de si son debidas al efecto viral, la respuesta inmunológica o a las comorbilidades previas de los fallecidos (2,8,13). Además, los estudios en los que se interrelacionan los antecedentes médicos, la clínica y los resultados radiológicos y analíticos con los hallazgos obtenidos en autopsias y biopsias *post mortem* son escasos y de pequeñas series de pacientes.

En resumen, los daños en cada tejido, la fisiopatología y las causas y consecuencias de dichas lesiones no están del todo definidas. Es necesario, por tanto, ampliar el conocimiento científico aprendiendo de la muerte con mayor cantidad de estudios *post mortem* y de calidad científica (2,12,19). Los hallazgos anatomopatológicos pueden aportar nuevas vías de investigación con respecto a la fisiopatología, factores de riesgo, tratamiento y prevención de la COVID-19 (6,20).

Es por ello que, con el presente estudio se desea ampliar el conocimiento actual del daño histológico generado por la COVID-19 en los tejidos pulmonares, cardiacos y hepáticos y su relación con la clínica, sus comorbilidades y los resultados de las pruebas radiológicas y analíticas en una cohorte de pacientes a los que se les ha realizado biopsias de dichos órganos. Por tanto, se desea aportar una visión holística de los pacientes fallecidos por la infección del SARS-CoV-2.

Hipótesis y objetivos

Por tratarse de un estudio descriptivo y en cualquier caso exploratorio, no precisa hipótesis previa. Cabría preguntarse si ciertamente existe relación entre los datos clínicos, las comorbilidades y los resultados radiológicos y analíticos con los hallazgos anatomopatológicos obtenidos en los pacientes fallecidos por COVID-19 mediante biopsias *post mortem* pulmonares, cardiacas y hepáticas.

Objetivo general: Conocer la relación clínico-patológica de biopsias *post mortem* de pulmón, corazón e hígado en pacientes con infección por SARS-CoV-2.

Objetivos específicos:

1. Describir las características clínicas, las comorbilidades, los hallazgos radiológicos y de las pruebas analíticas en nuestra cohorte de pacientes fallecidos por COVID-19.
2. Analizar las características histopatologías del pulmón, corazón e hígado de los pacientes fallecidos a los que se les practico la biopsia *post mortem* de cada tejido.
3. Analizar la presencia de DNA del virus por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (PCR-RT) en las muestras pulmonares.
4. Relacionar los datos clínicos, analíticos y radiológicos con las alteraciones histopatológicas en las biopsias *post mortem* de pulmón obtenidas de pacientes fallecidos con la COVID-19.

2. Metodología para el alcance de los objetivos definidos

Diseño del estudio, población y criterios de inclusión

Estudio retrospectivo observacional descriptivo unicéntrico. La población a estudio incluyó a todos aquellos pacientes mayores de 18 años fallecidos en el Hospital General Universitario de Alicante desde el 10 de marzo de 2020 hasta el 30 de marzo de 2021 y que fueran diagnosticados de COVID-19 durante dicho ingreso. Los criterios de inclusión fueron: 1) Mayores de 18 años, 2) Pacientes fallecidos durante la hospitalización en el Hospital General Universitario de Alicante, 3) Al menos una determinación PCR-RT de SARS-CoV-2 en aspirado nasofaríngeo positiva durante el ingreso, 4) Firma del consentimiento informado escrito por parte de los familiares. Como criterios de exclusión se establecieron: 1) No obtener ningún cilindro de tejido válidos para el estudio.

VARIABLES DE ESTUDIO

Se recolectaron los datos demográficos, antecedentes médicos, historia médica durante el ingreso, diagnósticos realizados y pruebas de laboratorio e imágenes radiológicas torácicas al ingreso y previo al fallecimiento. Se obtuvieron:

VARIABLES EPIDEMIOLÓGICAS: fecha de nacimiento, edad, sexo, nacionalidad, consumo de tóxicos (etilismo en g/día, tabaquismo en índice paquetes/año y consumo de otras drogas) y otras variables de interés.

VARIABLES FÍSICAS como el peso, altura, índice de masa corporal (IMC) (>30 se considera obesidad).

VARIABLES CLÍNICAS: antecedentes médicos, comorbilidades, diagnósticos durante el ingreso, síntomas, comorbilidades, el tratamiento tanto farmacológico con corticoterapia y antibioterapia, así como terapias respiratorias recibidas, los días de ingreso y la causa del fallecimiento. Se recogieron las siguientes escalas e índices validados: Escala de Fragilidad Clínica de *Rockwood* (Clinical Frailty Scale, CFS; con rango entre 1 y 9), Índice de masa corporal (IMC) e Índice de comorbilidad de *Charlson* ajustado por edad obtenido de los datos de las historias clínicas siguiendo las instrucciones expuestas en el **anexo 1**.

En la variable “enfermedad pulmonar” se incluyen todos los tipos de obstrucción crónica del flujo aéreo, síndrome de apnea-hipopnea del sueño, fibrosis pulmonar o patología secundaria a inhalación de tóxicos (asbestosis, silicosis...). La variable “enfermedad cardiovascular” agrupa el infarto agudo de miocardio, angina estable e inestable, insuficiencia cardiaca congestiva, accidente cerebrovascular o enfermedad arterial periférica. En la variable “inmunosupresión” se incluyen trastornos primarios de la inmunidad y adquiridos (VIH...), tratamiento quimioterápico activo, portador de trasplante o tratamiento con corticoterapia crónica o inmunosupresor.

Variabes radiológicas: se recogieron la afectación pulmonar descrita por la afectación unilateral o bilateral y del tipo de afectación y distribución (condensación, infiltrado, unilateral o bilateral, periférico...) en la última radiografía simple de tórax realizada.

Variabes analíticas de mayor interés al ingreso y previa al fallecimiento, como es el caso de los reactantes de fase aguda (proteína C reactiva -PCR-, procalcitonina, lactato deshidrogenasa – LDH y ferritina), parámetros cardiacos (pro-BNP y troponina), hepáticos (transaminasas, gamma-glutamyl transferasa, fosfatasa alcalina) y renales (creatinina y filtrado glomerular calculado con la fórmula CKD-EPI), hemograma (leucocitos, neutrófilos y hemoglobina y plaquetas) y coagulación (dímero D). En los pacientes en los que se encontraba disponible también se recogió la Interleuquina-6 (IL-6).

Variabes microbiológicas: primera RT-PCR positiva previa al ingreso o durante el mismo.

Variabes anatomopatológicas: se estudiaron y describieron las alteraciones anatomopatológicas observadas en la COVID19 en los diferentes órganos:

Pulmón: Sin alteraciones relevantes, daño alveolar difuso (exudativo, proliferativo o mixto), neumonía organizada (aguda y crónica), sobreinfección bacteriana, necrosis, hiperplasia, fibrosis, inflamación, neumonitis intersticial, capilaritis y daños asociados al tabaco.

Hígado: sin alteraciones relevantes, necrosis centrolobulillar, colestasis, fibrosis, esteatosis, cirrosis, presencia de neoplasia e infiltrado mononuclear.

Corazón: sin alteraciones relevantes, hipertrofia de fibras, fibrosis, edema, hiperplasia mesotelial, infiltrado linfocitario, necrosis y sustitución adiposa.

En los tejidos de pulmón se realizó RT-PCR de SARS-CoV-2.

Recogida de variables

Obtención de biopsias

En primer lugar, se identificaron a los pacientes candidatos de participar en el estudio en el momento del fallecimiento. En ese momento se informaba a los familiares y/o tutores legales y se les solicitaba el consentimiento informado escrito. Tras la aceptación, se obtuvieron biopsias de pulmón, corazón e hígado en la primera hora tras el fallecimiento, con equipos de protección individual y con medidas de protección de alto riesgo (grupo 3 de riesgo -*hazard group* 3, HG3-) según los protocolos del momento (19,21).

Las muestras realizadas en jornada ordinaria (de 8 a 15 horas de lunes a viernes) se realizaron ecoguiadas por radiólogos expertos y el resto por médicos clínicos mediante referencias anatómicas y la última prueba de imagen del paciente. Se recogieron entre 4 y 8 cilindros por cada paciente con pistola de biopsias 14G.

En el **Anexo 2** se encuentra el “Anexo2: Procedimiento toma biopsia pulmonar *post mortem*”, del Protocolo Manejo Clínico COVID-19, versión 8.0.1, elaborado por la Comisión de Infecciones, Profilaxis y Política Antibiótica del HGUA, así como imágenes del material empleado para la toma de biopsias (**Imagen 1 y 2**).

Procesamiento y análisis de las muestras obtenidas

Las muestras se enviaron en frascos precintados y correctamente identificados en formol al BioBanco del Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante (ISABIAL), integrado en la Red Nacional de Biobancos de España y en la Red Valenciana de Biobancos.

En el laboratorio de Anatomía Patológica se procesaron siguiendo procedimientos operativos estándar con la correspondiente aprobación de los Comités Ético y Científico. Los tejidos se fijaron en formalina y procesaron en las primeras 24 horas tras la recepción bajo las medidas estándar de bioseguridad. Se prepararon tinciones de hematoxilina-eosina, tricrómico de Masson, y otras técnicas como inmunohistoquímica (IHQ), anti-fibroblasto y anti-CD8. En las muestras se determinó la PCR de SARS-CoV-2 y se realizó un estudio anatomopatológico de los tejidos por dos patólogos expertos de la unidad de Anatomía Patológica.

Recogida de los datos clínicos

Los datos médicos y demográficos fueron recogidos de forma retrospectiva mediante revisión de la historia clínica digital presente en los programas ORION Clinic® (Hospitalización) y ABUCASIS® (Atención primaria). Los resultados analíticos recogidos fueron la primera determinación de cada variable en urgencias o al ingreso en las primeras 48 horas, y la última en una analítica sanguínea realizada en las 72 horas previas al fallecimiento. Las pruebas radiológicas fueron descritas un radiólogo experto del Servicio de Radiodiagnóstico del Hospital General Universitario de Alicante (JA). Los informes anatomopatológicos fueron descritos y sistematizados en una base de datos por parte de anatomopatólogos expertos del Servicio de Anatomía Patológica del mismo centro.

Realización de la RT-PCR de SARS-CoV-2

El diagnóstico de COVID en nuestro centro se llevó a cabo mediante RT-PCR en aspirado nasofaríngeo mediante el sistema qPCR Mx3000P utilizando el kit de detección de ácido nucleico 2019-nCoV (Coronavirus -COVID-19- ensayo Genesig® Real-Time PCR, Primerdesign Ltd, Chandler's Ford, Reino Unido) según el protocolo del fabricante. Se realizó la amplificación y monitorización simultánea del objetivo FAM (465-510).

En los tejidos, el ARN se obtuvo de dos secciones de tejido embebidas en parafina de 10 μ m mediante el kit MagCore total RNA One-Step Kit® (RBCBioscience, Dublín, Irlanda). La técnica PCR-RT utilizada sobre las muestras de ARN de tejidos fue la misma que se realizó en el aspirado nasofaríngeo realizado en el diagnóstico de la enfermedad.

Análisis de datos

Los intervalos de confianza se establecieron tanto para medias como para proporciones al 95%. El nivel de significación acepta en $p < 0,05$. El análisis de datos se llevó a cabo con el programa IBM-SPSS 23.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, EE.UU.). Para evitar sesgos los investigadores que recogieron las variables han sido diferentes a los encargados del análisis estadístico.

En primer lugar, se realizó un análisis descriptivo de nuestra población de pacientes. Algunas variables analíticas se categorizaron para su mejor expresión e interpretación. Se verificó la distribución de las variables por medio de la prueba Kolmogorov-Smirnov. A continuación, se obtuvieron para las variables cualitativas las frecuencias y los porcentajes; y las medias y desviaciones estándar para las variables cuantitativas paramétricas. En el caso de variables cuantitativas paramétricas, se obtuvieron Ms y rangos intercuartílicos. El análisis descriptivo se

realizó para todas las variables del estudio. La presentación de los datos histológicos se realiza de forma separada en función del tejido.

La estadística analítica incluye tanto análisis bivariante como multivariante. Se realizó análisis bivariante de los hallazgos histológicos más frecuentes y relevantes según la bibliografía de las biopsias de pulmón: la normalidad de la muestra y el daño alveolar difuso, así como sus variantes. Para las muestras hepáticas y cardíacas se planteó el estudio, pero debido al escaso número de muestra y a que las variables más relevantes según la bibliografía se presentaron en número muy reducido (hiperplasia mesotelial e infiltrado de linfocitos en los tejidos cardíacos e infiltrados mononucleares y necrosis centrolobulillar) se descartó su realización. En el análisis bivariante se utilizan las técnicas oportunas en cada momento en función del tipo de variable. En nuestro estudio se ha aplicado la prueba de la χ^2 o el test exacto de Fisher para las diferentes variables.

Se realizó un análisis multivariante y estratificado para estudiar las relaciones simultáneas entre una variable dependiente y varias variables independientes y determinar los posibles factores de confusión y/o modificación del efecto. Al ser todas las variables estudiadas cualitativas se ha llevado a cabo un análisis de regresión logística multivariante.

Dificultades y Limitaciones

Como en todo estudio retrospectivo, en el que los datos se recogen de los sistemas disponibles y no de primera mano, han existido datos perdidos o inexactos que se han desechado. La base de datos obtenida se ha revisado por diferentes participantes del estudio y depurado de la forma más exhaustiva posible para evitar sesgos.

En el estudio se realiza el análisis de las alteraciones tisulares de los órganos dañados mediante biopsias de los tejidos diana. En comparación con las biopsias de órgano completos la técnica es más sencilla y el riesgo de exposición al SARS-CoV-2, los costes y tiempo de dedicación mucho menores. Por contraposición, no permite evidenciar todas las alteraciones tisulares, pudiendo, en caso de afectación parcheada, no detectar las lesiones de forma adecuada. Tampoco se puede conocer la extensión de las mismas.

Al ser un estudio anatomopatológico de paciente fallecidos no es posible comparar los resultados con supervivientes de la enfermedad. Tampoco se han comparado los resultados con una muestra de pacientes fallecidos con características similares por otras patologías. Por ello, es posible que ciertos hallazgos histopatológicos u otras variables clínicas, analíticas y radiológicas no sean debidas a la

COVID19, sino a la edad, las comorbilidades u otros factores confusores. Para presentar una mejor comprensión e interpretación de los resultados se ha hecho una revisión bibliográfica de las alteraciones histológicas observadas en pacientes fallecidos por patologías similares (SARS-CoV-1, MERS-CoV y otras etiologías del SDRA).

Consideraciones éticas

El Comité de Ética del Hospital General Universitario de Alicante ha aprobado el proyecto de las biopsias *post mortem* (PI2020-067). Todos los familiares firmaron el consentimiento informado antes de proceder a la biopsia *post mortem*. Para la confidencialidad de los datos, el estudio se llevó a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki (2013), las normas de Buena Práctica Clínica y la legislación vigente en España relativa a este tipo de estudios. La información clínica será anonimizada, es decir, en el momento de la recogida de datos se asignará un código numérico independiente a cada sujeto. La recogida de dichos datos se realizará de acuerdo a lo establecido por la Ley Orgánica 3/2018 de 5 de diciembre de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales y el Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento Europeo.

También ha sido aprobado por el Comité de Ética e Integridad en la Investigación de la Universidad Miguel Hernández de Elche con el Código de Investigación Responsable (COIR) TFM.MELJMRR.CHG.210414.

3. Plan de Trabajo

El proyecto de investigación se comenzó a planear y redactar en marzo de 2020 tras alcanzar la pandemia nuestro país. En ese inicio existía una escasa información de la patología generada por el SARS-CoV-2 y muchos menos datos sobre los hallazgos patológicos tisulares y los órganos afectos. El reclutamiento de pacientes y obtención de biopsias se llevó a cabo desde el 10 de marzo de 2020 al 30 de mayo de 2021. A medida que se realizaron las muestras, se procesaron y posteriormente analizaron por el equipo de anatomía patológica y se transcribieron en una base de datos anonimizada. De forma progresiva se obtuvieron el resto de las variables mediante consulta de los datos de las historias clínicas.

En mayo de 2020 se realizó un estudio de los casos recogidos hasta el 30 de abril de 2020 (11 pacientes) que sirvió para realizar el Trabajo Fin de Máster del Master Universitario en Investigación en Enfermedades Infecciosas y Salud Internacional de la Dra. Sempere Mira (22).

La obtención de todas las variables terminó en junio de 2021. El análisis de datos se realizó entre junio y julio de dicho año. La escritura del presente trabajo se redactó en agosto de 2021 junto con la transcripción de los resultados.

No se ha requerido presupuesto alguno para la elaboración de la investigación ni redacción del mismo. El trabajo ha sido realizado con el apoyo de los profesionales del Hospital General Universitario de Alicante y de ISABIAL y su inconmensurable y altruista dedicación.

4. Resultados

De los 2188 pacientes ingresados con infección por SARS-CoV-2 en el Hospital General Universitario de Alicante desde el 10 de marzo de 2020 al 30 de mayo de 2021, fallecieron 288 (13,2%). De los 288 pacientes fallecidos se realizaron biopsias *post mortem* a 72 de ellos (25,0%). Uno de los pacientes fue descartado del estudio al no obtener ningún cilindro válido para el estudio anatomopatológico, por lo que se analizaron las biopsias de 71 pacientes (24,7%).

Estudio descriptivo de la muestra

Los resultados del análisis descriptivo de la población se recogen en la **tabla 1**. La población estudiada tenía una edad avanzada, con una M (M) de 81 y rango intercuartílico (RIC) de [69;87]. 36 pacientes (50,7%) tenían más de 80 años al ingreso. El 67% fueron hombres, la gran mayoría de raza caucásica y con infección adquirida en la comunidad.

Con respecto a las comorbilidades, el 66,2% tenían sobrepeso y el 28,2% padecía obesidad. 24 pacientes (34,7%) eran fumadores o exfumadores, de los cuales 9 de ellos tenían un consumo acumulado de más de 40 años-paquete. El 71% eran hipertensos, el 33,8% tenían enfermedad pulmonar previa y el 39,4%, enfermedad cardiovascular. La población se caracteriza por tener elevada comorbilidad y ser frágil. El 80,3% de pacientes tenían una puntuación en el Índice de comorbilidad de *Charlson* ajustado por edad de más de 3 puntos y el 67,1% de los pacientes tenían un nivel de fragilidad medido por la Escala clínica de fragilidad de *Rockwood* mayor o igual a 4.

Los pacientes ingresaron alrededor del quinto día de síntomas. Los síntomas más frecuentes al ingreso fueron la disnea (71,8%), la fiebre (45,1) y la tos, predominantemente seca (49,3%). La anosmia y ageusia solo fue reportada por 3 pacientes al ingreso. Al medir las constantes vitales a su llegada 27 pacientes (40,9%) se encontraban desaturados, 29 (60,4) con taquipnea y 24 (33,8%) con taquicardia. Las tensiones arteriales y temperatura se establecieron en rango normal en la mayoría de los pacientes. 34 sujetos (50,7%) presentaron signos gasométricos de síndrome de distrés respiratorio en alguno de sus grados ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300$).

Tabla 1. Análisis descriptivo de la población a estudio.

| VARIABLES | PACIENTES (N = 71) |
|--|---------------------|
| VARIABLES DEMOGRÁFICAS | |
| Edad en años, M [RIC] | 81 [69;87] |
| > 80 años, n (%) | 36 (50,7) |
| Hombres, n (%) | 48 (67,6) |
| Raza | |
| Caucásica, n (%) | 65 (91,5) |
| Latina, n (%) | 5 (7,0) |
| Árabe, n (%) | 1 (1,4) |
| Institucionalizado en residencia, n (%) | 7 (9,9) |
| COVID-19 adquirido durante el ingreso, n (%) | 11 (15,5) |
| COMORBILIDADES | |
| Índice de masa corporal ^a en kg/m ² , media ± DS | 28,82 ± 4,43 |
| Sobrepeso (IMC > 25), n (%) | 47 (66,2) |
| Obesidad (IMC > 30), n (%) | 20 (28,2) |
| Fumador o exfumador ^b , n (%) | 24 (34,7) |
| > 40 años-paquete ^b , n (%) | 9 (12,7) |
| Hipertensión arterial, n (%) | 51 (71,8) |
| Diabetes mellitus, n (%) | 31 (43,7) |
| Enfermedad pulmonar, n (%) | 24 (33,8) |
| Enfermedad cardiovascular, n (%) | 28 (39,4) |
| Inmunosupresión, n (%) | 6 (8,5) |
| Índice de comorbilidad de <i>Charlson</i> ajustado por edad, M [RIC] | 6 [4;8] |
| Comorbilidad alta (>3), n (%) | 57 (80,3) |
| Escala clínica de fragilidad (CFS) ^c , M [RIC] | 4 [3-6] |
| Frágil (≥4), n (%) | 47 (67,1) |
| VARIABLES ADMINISTRATIVAS | |
| Días de clínica al ingreso, M [RIC] | 5 [2;7] |
| Días de clínica hasta el fallecimiento, M [RIC] | 17 [8;27] |
| >10 días de clínica al fallecimiento, n (%) | 50 (70,4) |
| Días de ingreso hospitalario, M [RIC] | 11 [5;20] |
| Ingreso en UCI, n (%) | 21 (29,6) |
| Días de ingreso en UCI, media ± DS | 20 ± 13 |
| Necesidad de IOT | 20 (28,2) |
| Días de IOT, media ± DS | 20 ± 13 |
| CLÍNICA AL INGRESO | |
| Fiebre, n (%) | 32 (45,1) |
| Tos seca, n (%) | 35 (49,3) |
| Tos productiva, n (%) | 12 (16,9) |
| Disnea, n (%) | 51 (71,8) |
| Astenia, n (%) | 22 (31) |
| Mialgias, n (%) | 5 (7,0) |
| Diarrea, n (%) | 5 (7,0) |
| Síndrome confusional, n (%) | 13 (18,3) |
| Anosmia o ageusia, n (%) | 3 (4,2) |
| CONSTANTES VITALES AL INGRESO | |
| Temperatura (T ^o) en °C, media ± DS | 36,8 ± 1,1 |
| T ^o >38 ^o , n (%) | 12 (16,9) |
| Saturación a aire ambiente ^d en % de O ₂ (SatO ₂), M [RIC] | 91,5 [84;94] |
| SatO ₂ <90%, n (%) | 27 (40,9) |
| Frecuencia respiratoria (FR) ^e en rpm, M [RIC] | 22 [20;31,5] |
| Taquipnea (>20 rpm), n (%) | 29 (60,4) |
| Tensión arterial sistólica (TAS) ^f en mmHg, media ± DS | 130 ± 26 |
| Hipotensión (TAS <100 mmHg), n (%) | 6 (8,6) |
| Tensión arterial diastólica (TAD) ^g en mmHg, M [RIC] | 71 [63;84] |
| Frecuencia cardíaca (FC) en lpm, media ± DS | 92 ± 24 |
| Taquicardia (>100 lpm), n (%) | 24 (33,8) |
| Ratio PaO ₂ /FiO ₂ ^h , media ± DS | 289 ± 109 |
| PaO ₂ /FiO ₂ <300, n (%) | 34 (50,7) |
| VARIABLES ANALÍTICAS AL INGRESO | |
| Filtrado glomerular (FG) por CKD-EPI, M [RIC] | 48,53 [25,61;79,13] |
| FG <60 por CKD-EPI, n (%) | 32 (45,1) |
| Urea en mg/dl, M [RIC] | 71 [50;107] |
| Potasio (K) en nmol/l, M [RIC] | 4,3 [3,9;4,9] |
| K > 4,5, n (%) | 28 (39,4) |
| Proteína C reactiva (PCR) ⁱ en mg/dl, M [RIC] | 10,22 [5,28;22,25] |

| | |
|---|-------------------|
| PCR > 10, n (%) | 37 (52,9) |
| Pro-BNP ^j en pg/ml, M [RIC] | 640 [406;7431] |
| Troponina T ^k en ng/dl, M [RIC] | 39 [19;60] |
| Procalcitonina ^l en ng/dl, M [RIC] | 0,28 [0,13;0,82] |
| Glutámico-oxalacética transaminasa (GOT) ^m en U/l, M [RIC] | 40 [27;56] |
| Glutámico-pirúvico transaminasa (GPT) ⁿ en U/l, M [RIC] | 20 [15;41,5] |
| Creatinina Kinasa (CK) ^ñ en U/l, M [RIC] | 78 [53;199] |
| Lactato deshidrogenasa (LDH) ^o en U/l, M [RIC] | 336 [260;500] |
| LDH > 400, n (%) | 25 (37,3) |
| Ferritina ^p en µg/l, M [RIC] | 1061 [381;2136] |
| Ferritina >650, n (%) | 45 (64,3) |
| Leucocitos ^q por µl, M [RIC] | 7285 [4847;10697] |
| Linfocitos por µl, M [RIC] | 670 [450;1110] |
| Linfopenia (<1000), n (%) | 50 (70,4) |
| Dímero D ^r en µg/dl, M [RIC] | 1,43 [0,87;4,32] |
| Dímero D > 2,5, n (%) | 21 (31,8) |
| Interleuquina 6 (IL-6) ^s en pg/ml, M [RIC] | 88 [51;180] |
| Hallazgos radiológicos <i>pre mortem</i>* | |
| Sin alteraciones patológicas agudas, n (%) | 8 (11,3) |
| Infiltrados intersticiales unilaterales o bilateral, n (%) | 36 (50,7) |
| Neumonía bilateral, n (%) | 25 (35,2) |
| Neumonía lobar, n (%) | 4 (5,6) |
| Edema agudo de pulmón, n (%) | 6 (8,5) |
| Variabes analíticas previas al fallecimiento | |
| Potasio ^t en nmol/l, media ± DS | 4,5 ± 0,7 |
| K > 4,5, n (%) | 36 (50,7) |
| Proteína C reactiva (PCR) ^u en mg/dl, M [RIC] | 8,74 [3,08;19,57] |
| PCR > 10, n (%) | 31 (44,3) |
| Pro-BNP ^v en pg/ml, M [RIC] | 3770 [901;10123] |
| Troponina T ^w en ng/dl, M [RIC] | 54 [30;88] |
| Glutámico-oxalacética transaminasa (GOT) ^x en U/l, M [RIC] | 36 [27;58] |
| Glutámico-pirúvico transaminasa (GPT) ^y en U/l, M [RIC] | 31 [20;58] |
| Creatinina Kinasa (CK) ^z en U/l, M [RIC] | 63 [31;130] |
| Lactato deshidrogenasa (LDH) ^{aa} en U/l, M [RIC] | 404 [325;572] |
| LDH > 400, n (%) | 31 (50,0) |
| Ferritina en µg/l ^{ab} , M [RIC] | 1596 [513;2524] |
| Ferritina >650, n (%) | 46 (68,7) |
| Dímero D ^{ac} en µg/dl, M [RIC] | 2,65 [1,24;5,08] |
| Dímero D > 2,5, n (%) | 31 (51,7) |
| Tratamiento | |
| Necesidad de VMNI, n (%) | 44 (62,0) |
| Tipo de VMNI** | |
| TAFN, n (%) | 34 (47,9) |
| CPAP, n (%) | 11 (15,5) |
| BiPAP, n (%) | 1 (1,4) |
| Antibioticoterapia (> 48 h), n (%) | 63 (88,7) |
| Corticoterapia, n (%) | 62 (87,3) |
| Dexametasona, n (%) | 55 (77,5) |
| Tocilizumab, n (%) | 30 (42,3) |
| Remdesivir, n (%) | 5 (7,0) |
| Plasma de convalciente, n (%) | 5 (7,0) |
| Causa de muerte | |
| Secundaria a COVID-19, n (%) | 63 (88,7) |
| Otras causas de muerte | |
| Cardiovascular, n (%) | 2 (2,8) |
| Infecciosa, n (%) | 4 (5,6) |
| Otras, n (%) | 2 (2,8) |

Leyenda: M = mediana. RIC; rango intercuartílico. DS desviación estándar. UCI: unidad de cuidados intensivos. IOT: intubación orotraqueal. VMNI: ventilación mecánica no invasiva. *Algunos pacientes presentaban más de un patrón radiológico. **Algunos pacientes recibieron más de un tipo de VMNI en diferente momento de la patología. Valores perdidos: ^a16, ^b1, ^c1, ^d5, ^e23, ^f1, ^g1, ^h4, ⁱ1, ^j8, ^k9, ^l3, ^m2, ⁿ1, ^o7, ^p4, ^q1, ^r1, ^s30, ^t1, ^u1, ^v12, ^w19, ^x1, ^y1, ^z2, ^{aa}9, ^{ab}4, ^{ac}10.

Los primeros valores analíticos recogidos en urgencias o planta de hospitalización mostraron que el 45,1% de los sujetos ingresaban con insuficiencia renal (filtrado glomerular menor de 60). La mayoría presentaban PCR mayor de 10 mg/dl (52,9), casi dos tercios tenía una ferritina mayor de 650

$\mu\text{g/l}$ y más del 70% de los pacientes presentaban linfopenia. La LDH resultó mayor de 400 U/l en 25 pacientes (37,3%). Los valores de potasio, transaminasas y procalcitonina tuvieron una mediana dentro del límite normal y los de la CK, pro-BNP y troponina T resultaron ligeramente elevados. El dímero D fue mayor de 2,5 $\mu\text{g/dl}$ en el 31,8% de los pacientes. La mediana de IL-6 fue de 88 pg/ml con un RIC de [51;180], si bien solo tuvimos disponible dicha determinación en 41 pacientes.

44 personas, el 62%, requirieron algún tipo de VMNI, de los cuales 34 recibió en algún momento TAFN. La mayoría de los pacientes recibieron antibioticoterapia y corticoterapia, 55 (77,5%) de ellos dexametasona y el resto otros corticoide. El tocilizumab solo se utilizó en 30 (42,3%) de ellos y el remdesivir y plasma de convaleciente en 5 pacientes cada uno.

Más del 70% fallecieron tras más de 10 días de clínica. El 29,6% requirió ingreso en UCI, con una media de 20 días. De ellos, todos menos 1 necesitaron de intubación orotraqueal. El 88,7% de las muertes fue debida a causas secundarias a la COVID-19.

Con respecto a las imágenes radiológicas previas a *exitus*, la mayoría presentaban alteraciones de distinta índole. El 50,7% presentaba el patrón típico de infiltrados intersticiales ya fuera unilateral o bilateral. En el 35,2% de los casos se observaban condensaciones bilaterales y solo 4 pacientes (5,6%) presentaban neumonía lobar. Se observaron hallazgos compatibles con edema agudo de pulmón previo al fallecimiento en 6 (8,5%) pacientes.

En los resultados analíticos previos al fallecimiento la PCR fue mayor de 10 mg/dl en 31 (44,3%) pacientes. El 50% de los pacientes tenían una LDH mayor de 400 U/l y el 68,7% (46 pacientes), una ferritina mayor de 650 $\mu\text{g/l}$. El dímero D fue mayor de 2,5 $\mu\text{g/dl}$ en 31 (51,7%) de los pacientes. Con respecto al resto de parámetros todos presentaban una mediana mayor que al ingreso salvo la CK que disminuía ligeramente.

Análisis de los resultados histopatológicos

Se realizaron biopsias de hígado, pulmón y corazón a todos los participantes del estudio, sin embargo, en muchos de ellos la cantidad recogida fue insuficiente para el análisis anatomopatológico, el tejido no se conservó de forma adecuada o no se obtuvieron las muestras del órgano deseado. En consecuencia, nos encontramos con 62 pacientes (87,3%) con muestra válida de pulmón, 39 (54,9%) con muestra de tejidos hepáticos y 48 pacientes (67,6%) con tejido cardiaco. Más de dos tercios de los pacientes con muestra pulmonares tenía dos o más cilindros válidos para el análisis, mientras que de hígado y corazón esa cifra baja alrededor del tercio. Se encontraron hallazgos patológicos pulmonares en 51 sujetos de estudio (82,3%), cardiacos en 29 (74,4%) y hepáticos en el 47,9% de los

pacientes (23). Se resumen los datos en la **tabla 2**. Una ampliación de las muestras recogidas en cada paciente queda recogida en el **anexo 3**.

Tabla 2. Resumen de las biopsias de pulmón, hígado y corazón realizadas.

| | Pulmón | Hígado | Corazón |
|--|-----------|-----------|-----------|
| Pacientes con biopsia, n (%) | 62 (87,3) | 39 (54,9) | 48 (67,6) |
| Muestras por paciente, M [RIC] | 2 [1;3] | 1 [1;2] | 1 [1;2] |
| Una, n (%) | 18 (29,0) | 25 (64,1) | 32 (66,7) |
| Dos o más, n (%) | 44 (71,0) | 14 (35,9) | 16 (33,3) |
| Hallazgos | | | |
| Sin alteraciones significativas, n (%) | 11 (17,7) | 10 (25,6) | 25 (51,2) |
| Hallazgos patológicos, n (%) | 51 (82,3) | 29 (74,4) | 23 (47,9) |

Leyenda: RIC: rango intercuartílico.

Resultados de los tejidos pulmonares

Se observan múltiples hallazgos patológicos en las biopsias pulmonares realizadas que quedan recogidos en la **tabla 3**, con una ampliación posterior en el **anexo 4**. La alteración más frecuente encontrada fue la infiltración intersticial en 50 (80,6) pacientes, la mayoría de ellos por linfocitos. La inflamación alveolar fue menos frecuente (41,9%) y principalmente por neutrófilos e histiocitos. La fibrosis, tanto intersticial se detecta en más de la mitad de los pacientes y la alveolar en el 50%.

Tabla 3. Análisis de los hallazgos histopatológicos de las biopsias de pulmón.

| Biopsias de pulmón* | N = 62 |
|---|-----------|
| Daño alveolar difuso (DAD), n (%) | 41 (66,1) |
| DAD exudativo, n (%) | 12 (19,4) |
| DAD mixto, n (%) | 10 (16,1) |
| DAD proliferativo, n (%) | 19 (30,6) |
| Hiperplasia difusa de neumocitos (HDN), n (%) | 40 (64,5) |
| Fibrosis intersticial, n (%) | 38 (61,3) |
| Infiltrados intersticiales, n (%)** | 50 (80,6) |
| Linfocitos, n (%) | 47 (75,8) |
| Neutrófilos, n (%) | 15 (24,2) |
| Células plasmáticas, n (%) | 11 (17,7) |
| Eosinófilos, n (%) | 1 (1,6) |
| Histiocitos, n (%) | 1 (1,6) |
| Macrófagos, n (%) | 0 (0,0) |
| Fibrosis alveolar, n (%) | 31 (50,0) |
| Inflamación alveolar, n (%)** | 26 (41,9) |
| Linfocitos, n (%) | 4 (6,5) |
| Neutrófilos, n (%) | 15 (24,2) |
| Células plasmáticas, n (%) | 2 (3,2) |
| Eosinófilos, n (%) | 0 (0,0) |
| Histiocitos, n (%) | 9 (14,5) |
| Macrófagos, n (%) | 2 (3,2) |
| Signos de sobreinfección bacteriana, n (%) | 12 (19,4) |
| Neumonía organizada fibrosa aguda (AFOP), n (%) | 10 (16,1) |
| Neumonía organizada crónica (NOrg), n (%) | 3 (4,8) |
| Necrosis, n (%) | 1 (1,6) |
| Capilaritis, n (%) | 1 (1,6) |
| Sin alteraciones relevantes (SAR), n (%) | 11 (17,7) |

Leyenda: *En un mismo paciente se pueden detectar varias alteraciones. **En un mismo paciente se pueden detectar varios tipos de células inflamatorias.

El DAD estuvo presente en el 66,1% de los pacientes con biopsias de pulmón válidas. De ellos, en 12 pacientes se encontraron hallazgos de DAD exudativo y en 19 signos de DAD proliferativo. 10 pacientes tenían cambios mixtos entre ambos tipos. La hiperplasia difusa de neumocitos se vio en 40 (64,5%) pacientes. Se encontraron signos de sobreinfección bacteriana en el 19,4% de los pacientes (12), AFOP en el 16,1% y neumonía organizada crónica en el 4,8%. La necrosis y la capilaritis fueron hallazgos recogido en un solo sujeto cada uno.

Resultados de los tejidos hepáticos

Al analizar los tejidos hepáticos nos encontramos que la alteración más frecuente fue la esteatosis, presente en el 30,8% (12) de los sujetos del estudio. Por orden de frecuencia los hallazgos detectados fueron la colestasis (15,4%), la necrosis centrolobulillar (NCL) (12,8%), la neoplasia (7,7%) y la fibrosis, cirrosis e infiltrados mononucleares vistos en dos (5,1%) pacientes cada uno de ellos. Los resultados se recogen en la **tabla 4** y se amplían en el **anexo 5**.

Tabla 4. Análisis de los hallazgos histopatológicos de las biopsias hepáticas.

| Biopsias hepáticas* | N = 39 |
|--|-----------|
| Esteatosis, n (%) | 12 (30,8) |
| Colestasis, n (%) | 6 (15,4) |
| Necrosis centrolobulillar (NCL), n (%) | 5 (12,8) |
| Neoplasia, n (%) | 3 (7,7) |
| Infiltrados mononucleares (IMN), n (%) | 2 (5,1) |
| Fibrosis, n (%) | 2 (5,1) |
| Cirrosis, n (%) | 2 (5,1) |
| Sin alteraciones relevantes (SAR), n (%) | 10 (25,6) |

*En un mismo paciente se pueden detectar varias alteraciones.

Resultados de los tejidos cardiacos

En los tejidos cardiacos se observó de forma predominante la hipertrofia de fibras miocárdicas (HFT) en el 47,9% de los pacientes. La fibrosis cardiaca se identificó en 9 (18,8%) pacientes, el edema en 3 (6,3%) y los infiltrados linfocitarios en 2 (4,2%) sujetos. Tanto la hiperplasia mesotelial, la necrosis y la sustitución adiposa del tejido cardiaco se constataron en 1 (2,1%) paciente. Se resumen los resultados en la **tabla 5** y se amplían en el **anexo 6**.

Tabla 5. Análisis de los hallazgos histopatológicos de las biopsias cardiacas.

| Biopsias cardiacas* | N = 48 |
|--|-----------|
| Hipertrofia de fibras (HTF), n (%) | 23 (47,9) |
| Fibrosis cardiaca, n (%) | 9 (18,8) |
| Edema, n (%) | 3 (6,3) |
| Infiltrado linfocitario (ILinf), n (%) | 2 (4,2) |
| Hiperplasia mesotelial (HPM), n (%) | 1 (2,1) |
| Necrosis, n (%) | 1 (2,1) |
| Sustitución adiposa (SAd), n (%) | 1 (2,1) |
| Sin alteraciones relevantes (SAR), n (%) | 25 (52,1) |

Leyenda: *En un mismo paciente se pueden detectar varias alteraciones.

Estudio de la presencia de SARS-CoV-2 en los tejidos pulmonares

Se realizó RT-PCR de SARS-CoV-2 en las muestras pulmonares recogidas. Las muestras de 16 pacientes no se pudieron procesar para realizar dicha prueba. Se llevó a cabo en 46 pacientes, de las cuales 39 (84,8%) resultaron positivas.

Se estudió la posible asociación de la positividad de RT-PCR con los principales hallazgos en las biopsias pulmonares. Los resultados se presentan en la **tabla 6**. No se ha detectado asociación estadística con ninguna de las alteraciones estudiadas.

Tabla 6. Análisis de los resultados de la RT-PCR en los tejidos pulmonares con respecto a los hallazgos anatomopatológicos.

| | PCR COVID en pulmón | | |
|-------------------------------|---------------------|-------------------|---------|
| | Positiva n (%) | Negativa n (%) | p-valor |
| | 39 (84,8) | 7 (15,2) | |
| Alteraciones relevantes | | | 1,000 |
| Sin alt. | 6 (85,7) | 1 (14,3) | |
| Con alt | 33 (84,6) | 6 (15,4) | |
| DAD | | | 0,658 |
| Si | 28 (87,5) | 4 (12,5) | |
| No | 11 (78,6) | 3 (21,4) | |
| DAD exudativo | | | 1,000 |
| Si | 9 (90) | 1 (10) | |
| No | 30 (83,3) | 6 (16,7) | |
| DAD mixto | | | 1,000 |
| Si | 5 (83,3) | 1 (16,7) | |
| No | 34 (85,0) | 6 (15,0) | |
| DAD proliferativo | | | 1,000 |
| Si | 14 (87,5) | 2 (12,5) | |
| No | 25 (83,3) | 5 (16,7) | |
| Hiperplasia difusa neumocitos | | | 0,193 |
| Si | 28 (90,3) | 3 (9,7) | |
| No | 11 (73,3) | 4 (26,7) | |
| Infiltrados intersticiales | | | 0,609 |
| Si | 32 (86,5) | 5 (13,5) | |
| No | 7 (77,8) | 2 (22,2) | |
| Infiltrados alveolares | | | 1,000 |
| Si | 18 (85,8) | 3 (14,3) | |
| No | 21 (84,0) | 4 (16,0) | |

Leyenda: Alt: alteraciones. DAD: daño alveolar difuso.

Estudio de asociación de los hallazgos pulmonares con los datos clínicos, analíticos y radiológicos

Se llevó a cabo un análisis bivariante de los resultados pulmonares de las variables más relevantes según la bibliografía relacionadas con los daños histológicos típicos asociadas a la COVID-19, en este caso el DAD y sus subtipos. Se incluyó también la normalidad o no de las muestras. Todos

los resultados se encuentran en la **tabla 7**. Se realizó también un análisis multivariante para observar los efectos de los factores de confusión, recogido en la **tabla 8**.

Con respecto a las muestras pulmonares con alteraciones relevantes solo se detectan diferencias significativas al compararlas con la ferritina *pre mortem* mayor a 650 $\mu\text{g/l}$ [7 (24,1%) vs 4 (10,0%); $p=0,031$] con una odd ratio (OR) de 4,854 e intervalo de confianza al 95% (IC95%) de (1,217-19,230). Dicho resultado implica que una cifra de ferritina superior a 650 $\mu\text{g/l}$ en la analítica previa a la muerte se asocia de forma estadísticamente significativa con presentar alteraciones en sus tejidos pulmonares.

Al analizar los resultados de los sujetos con DAD en sus tejidos pulmonares aparecen diferencias significativas al compararlos con la edad mayor de 80 años [25 (78,1%) vs 16 (53,3%); $p=0,039$], la LDH *pre mortem* mayor de 400 U/l [25 (92,6%) vs 14 (48,3%); $p<0,001$] y el tratamiento con Tocilizumab [24 (88,9%) vs 17 (48,6%); $p=0,001$]. La edad superior a 80 años sería un factor protector de presencia de DAD en las biopsias [OR 0,320 (IC95% 0,106-0,964); $p=0,039$, ORa 0,196 (IC95% 0,040-0,965); $p=0,045$] mientras que la LDH superior a 400 U/l previa al fallecimiento [OR 13,392 (IC95% 2,666-67,268); $p<0,001$, ORa 19,036 (IC95% 2,988-121,288); $p=0,002$] y el tratamiento con tocilizumab [OR 8,471 (IC95% 2,150-33,372); $p=0,001$, ORa 7,258 (IC95% 1,346-39,129); $p=0,021$] sería factores asociados a dicha alteración tisular. Al realizar el análisis multivariante, todas las OR se modificaron en más del 20% pero la significación no se vio alterada en ninguna de ellas.

En ninguno de los casos se constató asociación de las variables resultado con el sexo, los días de clínica, las comorbilidades, la clínica, los patrones radiográficos previos al fallecimiento estudiados o el resto de valores analíticos o tratamientos.

Tabla 7. Análisis bivariante de los hallazgos histopatológicos en biopsias de pulmón más relevantes.

| | Sin alteraciones relevantes | | p-valor | DAD | | p-valor |
|-----------------------|-----------------------------|------------------|---------|-------------|-------------|---------|
| | Con alt n (%) | Sin alt n (%) | | Si n (%) | No n (%) | |
| Edad en años | | | 0,264 | | | 0,039 |
| > 80 años | 23 (76,7) | 7 (23,3) | | 16 (53,3) | 14 (46,7) | |
| ≤ 80 años | 28 (87,5) | 4 (12,5) | | 25 (78,1) | 7 (21,9) | |
| Sexo | | | 0,724 | | | 0,362 |
| Hombre | 36 (83,7) | 7 (16,3) | | 30 (69,8) | 13 (30,2) | |
| Mujer | 15 (78,9) | 4 (21,1) | | 11 (57,9) | 8 (42,1) | |
| Obesidad (IMC > 30) | | | 1,000 | | | 0,162 |
| Si | 14 (82,4) | 3 (17,6) | | 9 (52,9) | 8 (47,1) | |
| No | 27 (81,8) | 6 (18,2) | | 24 (72,7) | 9 (27,3) | |
| Hipertensión arterial | | | 0,724 | | | 0,800 |
| Si | 36 (83,7) | 7 (6,3) | | 28 (65,1) | 15 (34,9) | |
| No | 15 (78,9) | 4 (21,1) | | 13 (68,4) | 6 (31,6) | |
| Enfermedad pulmonar | | | 0,499 | | | 0,800 |
| Si | 17 (77,3) | 5 (22,7) | | 15 (68,2) | 7 (31,8) | |
| No | 34 (85,0) | 6 (15,0) | | 26 (65,0) | 14 (35,0) | |

| | | | | | | |
|-----------------------------|-----------|-----------|--------|-----------|-----------|--------|
| Comorbilidad alta | | | 1,000 | | | 0,346 |
| Si | 39 (82,3) | 9 (18,8) | | 30 (62,5) | 18 (37,5) | |
| No | 12 (85,7) | 2 (14,3) | | 11 (78,6) | 3 (21,4) | |
| Días clínica a muerte | | | 0,155 | | | 0,177 |
| ≤10 días | 12 (70,8) | 5 (29,4) | | 9 (52,9) | 8 (47,1) | |
| >10 días | 39 (86,7) | 6 (13,3) | | 32 (71,1) | 13 (28,9) | |
| Ingreso en UCI | | | 0,478 | | | 0,030 |
| Si | 18 (90,0) | 2 (10,0) | | 17 (85,0) | 3 (15,0) | |
| No | 33 (78,6) | 9 (21,4) | | 24 (57,1) | 18 (42,9) | |
| Disnea al ingreso | | | 0,452 | | | 0,722 |
| Si | 39 (84,8) | 7 (15,2) | | 31 (67,4) | 15 (32,6) | |
| No | 12 (75,0) | 4 (25,0) | | 10 (62,5) | 6 (37,5) | |
| SatO2 <90% al ingreso | | | 0,161 | | | 0,345 |
| Si | 19 (76,0) | 6 (24,0) | | 15 (60,0) | 10 (40,0) | |
| No | 29 (90,6) | 3 (9,4) | | 23 (71,9) | 9 (28,1) | |
| Taquipnea al ingreso | | | 0,112 | | | 0,632 |
| Si | 17 (73,9) | 6 (26,1) | | 15 (65,2) | 8 (34,8) | |
| No | 17 (94,4) | 1 (5,6) | | 13 (72,2) | 5 (27,8) | |
| Ratio PaO2/FiO2 al ingreso | | | 0,734 | | | 0,779 |
| <300 | 25 (80,6) | 6 (19,4) | | 21 (67,7) | 10 (32,3) | |
| ≥300 | 24 (85,7) | 4 (14,3) | | 18 (64,3) | 10 (35,7) | |
| SAR en Rx pre mortem | | | 0,552 | | | 0,599 |
| Sin alteraciones | 3 (75,0) | 1 (25,0) | | 2 (50,0) | 2 (50,0) | |
| Con alteraciones | 48 (82,8) | 10 (17,2) | | 39 (67,2) | 19 (32,8) | |
| Inf inters en Rx pre mortem | | | 0,445 | | | 0,658 |
| Si | 26 (78,8) | 7 (21,2) | | 21 (63,6) | 12 (36,4) | |
| No | 25 (86,2) | 4 (13,8) | | 20 (69,0) | 9 (31,0) | |
| PCR pre mortem mg/dl | | | 0,740 | | | 0,309 |
| > 10 | 23 (85,2) | 4 (14,8) | | 20 (74,1) | 7 (25,9) | |
| ≤ 10 | 27 (79,4) | 7 (20,6) | | 21 (61,8) | 13 (38,2) | |
| LDH pre mortem U/l | | | 0,146 | | | <0,001 |
| > 400 | 25 (92,6) | 2 (7,4) | | 25 (92,6) | 2 (7,4) | |
| ≤400 | 22 (75,9) | 7 (24,1) | | 14 (48,3) | 15 (51,7) | |
| Ferritina pre mortem µg/l | | | 0,031* | | | 0,116 |
| >650 | 36 (90,0) | 4 (10,0) | | 30 (75,0) | 10 (25,0) | |
| ≤650 | 13 (65,0) | 7 (35,0) | | 11 (55,0) | 9 (45,0) | |
| Necesidad de VMNI | | | 1,000 | | | 0,303 |
| Si | 31 (81,6) | 7 (18,4) | | 27 (71,1) | 11 (28,9) | |
| No | 20 (83,3) | 4 (16,7) | | 14 (58,3) | 10 (41,7) | |
| Dexametasona | | | 0,685 | | | 0,334 |
| Si | 41 (83,7) | 8 (16,3) | | 34 (69,4) | 15 (30,6) | |
| No | 10 (76,9) | 3 (23,1) | | 7 (53,8) | 6 (46,2) | |
| Tocilizumab | | | 0,094 | | | 0,001 |
| Si | 25 (92,6) | 2 (7,4) | | 24 (88,9) | 3 (11,1) | |
| No | 26 (74,3) | 9 (27,3) | | 17 (48,6) | 18 (51,4) | |
| Muerte por COVID-19 | | | 0,623 | | | 0,426 |
| Si | 45 (83,3) | 9 (16,7) | | 37 (68,5) | 17 (31,5) | |
| No | 6 (75,0) | 2 (25,0) | | 4 (50,0) | 4 (50,0) | |

Leyenda: DAD: daño alveolar difuso. Alt: alteraciones. RX: radiografía simple de tórax. Inf inters: infiltrados intersticiales. *Odd ratio de 4,854 (IC95% 1,217-19,230).

Tabla 8. Análisis multivariante de las variables significativas del estudio estadístico con la variable resultado de biopsias con daño alveolar difuso.

| | ORc | IC 95% | p-valor | ORa* | IC 95% | p-valor |
|-----------------------|--------|--------------|---------|--------|---------------|---------|
| Edad en años | | | 0,039 | | | 0,045 |
| > 80 años | 0,320 | 0,106-0964 | | 0,196 | 0,040-0,965 | |
| ≤ 80 años | 1,000 | | | 1,000 | | |
| LDH pre mortem en U/l | | | <0,001 | | | 0,002 |
| > 400 | 13,392 | 2,666-67,268 | | 19,036 | 2,988-121,288 | |
| ≤ 400 | 1,000 | | | 1,000 | | |
| Tocilizumab | | | 0,001 | | | 0,021 |
| Si | 8,471 | 2,150-33,372 | | 7,258 | 1,346-39,129 | |
| No | 1,000 | | | 1,000 | | |

Leyenda: ORc: Odd ratio cruda. ORa: Odd ratio ajustada. *Ajustado por las variables de la tabla.

En el análisis pormenorizado de los diferentes tipos de daño alveolar difuso, presente en la **tabla 9**, se constataron asociaciones estadísticamente significativas entre el DAD exudativo y ser varón frente a ser mujer [12 (27,9%) vs 0 (0,0%); $p=0,012$] y ente el DAD mixto y la LDH en analítica previa al *exitus* mayor de 400 U/l [8 (29,6%) vs 2 (6,9%); $p=0,038$]. En el primero de los casos es más probable encontrar DAD exudativa en muestras de hombres que en las de mujeres (OR no calculable). En el caso del DAD mixto, es más de 5 veces más probable detectarlo en las muestras histológicas de pacientes con LDH *pre mortem* mayor de 400 U/l [OR 5,684 (IC95% 1,084-29,803); $p=0,038$] que en pacientes con menor LDH a dicha cifra.

Al analizar el DAD proliferativo, las diferencias se hicieron notables en los pacientes mayores de 80 años [5 (16,7%) vs 14 (43,8%); $p=0,021$], en los individuos con mayor comorbilidad [11 (22,9%) vs 8 (57,1%); $p=0,022$], en aquellos con menos de 10 días de clínica hasta el fallecimiento [1 (5,9%) vs 18 (40,0%); $p=0,009$], en los que requirieron ingreso en UCI [12 (60,0%) vs 7 (16,7%); $p=0,001$] y en los pacientes que recibieron tocilizumab [13 (48,1%) vs 6 (17,1%); $p=0,009$].

Tabla 9. Análisis bivariente de los tipos de daño alveolar difuso en biopsias de pulmón.

| | Tipos de daño alveolar difuso | | | | | | | | |
|----------------------------|-------------------------------|-------------|--------------------------|-------------|-------------|--------------------------|-------------------|-------------|--------------|
| | DAD exudativo | | | DAD mixto | | | DAD proliferativo | | |
| | Si n (%) | No n (%) | p-valor | Si n (%) | No n (%) | p-valor | Si n (%) | No n (%) | p-valor |
| Edad en años | | | 0,901 | | | 1,000 | | | 0,021 |
| > 80 años | 6 (20,0) | 24 (80,0) | | 5 (16,7) | 25 (83,3) | | 5 (16,7) | 25 (83,3) | |
| ≤ 80 años | 6 (18,8) | 26 (81,3) | | 5 (15,6) | 27 (84,4) | | 14 (43,8) | 18 (56,3) | |
| Sexo | | | 0,012^a | | | 0,479 | | | 0,482 |
| Hombre | 12 (27,9) | 31 (72,1) | | 6 (14,0) | 37 (86,0) | | 12 (27,9) | 31 (72,1) | |
| Mujer | 0 (0,0) | 19 (100) | | 4 (21,1) | 15 (78,9) | | 7 (36,8) | 12 (63,2) | |
| Comorbilidad alta | | | 0,717 | | | 0,431 | | | 0,022 |
| Si | 10 (20,8) | 38 (79,2) | | 9 (18,8) | 39 (81,3) | | 11 (22,9) | 47 (77,1) | |
| No | 2 (14,3) | 12 (85,7) | | 1 (7,1) | 13 (92,9) | | 8 (57,1) | 6 (42,9) | |
| Días clínica a muerte | | | 0,283 | | | 1,000 | | | 0,009 |
| ≤10 días | 5 (29,4) | 12 (70,6) | | 3 (17,4) | 14 (82,4) | | 1 (5,9) | 16 (94,1) | |
| >10 días | 7 (15,6) | 38 (84,4) | | 7 (15,6) | 38 (84,4) | | 18 (40,0) | 27 (60,0) | |
| Ingreso en UCI | | | 0,735 | | | 0,478 | | | 0,001 |
| Si | 3 (15,0) | 17 (85,0) | | 2 (10,0) | 18 (90,0) | | 12 (60,0) | 8 (40) | |
| No | 9 (21,4) | 33 (78,6) | | 8 (19,0) | 34 (81,0) | | 7 (16,7) | 35 (83,3) | |
| LDH <i>pre mortem</i> U/l | | | 0,639 | | | 0,038^b | | | 0,184 |
| > 400 | 6 (22,2) | 21 (77,8) | | 8 (29,6) | 19 (70,4) | | 11 (40,7) | 16 (59,3) | |
| ≤400 | 5 (17,2) | 24 (82,8) | | 2 (6,9) | 27 (93,1) | | 7 (24,1) | 22 (75,9) | |
| Ferritina <i>preM</i> µg/l | | | 0,734 | | | 0,471 | | | 0,844 |
| > 650 | 9 (22,5) | 31 (77,5) | | 8 (20,0) | 32 (80,0) | | 13 (32,5) | 27 (67,5) | |
| ≤ 650 | 3 (15,0) | 17 (85,0) | | 2 (10,0) | 18 (90,0) | | 6 (30,0) | 14 (70,0) | |
| Dexametasona | | | 0,431 | | | 0,196 | | | 0,310 |
| Si | 11 (22,4) | 38 (77,6) | | 6 (12,2) | 43 (87,8) | | 17 (34,7) | 32 (65,3) | |
| No | 1 (7,7) | 12 (92,3) | | 4 (30,8) | 9 (69,2) | | 2 (15,4) | 11 (84,6) | |
| Tocilizumab | | | 0,250 | | | 1,000 | | | 0,009 |
| Si | 7 (25,95) | 20 (74,1) | | 4 (14,8) | 23 (85,2) | | 13 (48,1) | 14 (51,9) | |
| No | 5 (14,3) | 30 (85,7) | | 6 (17,1) | 29 (82,9) | | 6 (17,1) | 29 (82,9) | |

Leyenda: DAD: daño alveolar difuso. *PreM*: *pre mortem*. ^aOdd ratio no calculable. ^bOdd ratio 5,684 (1,084-29,803).

En la **tabla 10** se presenta el estudio multivariante, cuyos resultados se describen a continuación. La probabilidad de detectar DAD proliferativa en las biopsias de pulmón es mayor en los pacientes que requirieron ingreso en UCI [ORc 7,500 (IC95% 2,241-25,096); $p=0,001$, ORa

10,623 (IC95% 1,089-103,597); $p=0,042$] y en los que recibieron Tocilizumab [ORc 4,488 (IC95% 1,409-14,298); $p=0,009$, ORa 5,096 (IC95% 1,116-22,279); $p=0,030$]. En ambos casos la ORc varió más del 20% con respecto a la ORa en el análisis multivariante, por lo que probablemente existan factores modificadores del efecto. A pesar de ello la significación se mantiene en ambos casos. No es así en el resto de variables: la edad mayor de 80 años [ORc 0,257 (IC95% 0,078-0,843); $p=0,021$, ORa 0,483 (IC95% 0,088-2,632); $p=0,400$], los días de clínica [ORc 10,667 (IC95% 1,298-87,672); $p=0,009$, ORa 6,101 (IC95% 0,597-62,321); $p=0,127$] y la comorbilidad elevada [ORc 0,223 (IC95% 0,064-0,782); $p=0,022$, ORa 2,239 (IC95% 0,205-27,934); $p=0,486$] pierden la asociación, por lo que probablemente los efectos observados en el análisis bivariante se han visto afectados por un factor de confusión, posiblemente los días de ingreso en UCI.

Tabla 10. Análisis multivariante de las variables significativas del estudio estadístico con la variable resultado de biopsias con daño alveolar difuso proliferativo.

| | ORc | IC 95% | p-valor | ORa* | IC 95% | p-valor |
|-----------------------|--------|--------------|---------|--------|---------------|--------------|
| Edad en años | | | 0,021 | | | 0,400 |
| > 80 años | 0,257 | 0,078-0,843 | | 0,483 | 0,088-2,632 | |
| ≤ 80 años | 1,000 | | | 1,000 | | |
| Días clínica a muerte | | | 0,009 | | | 0,127 |
| ≤10 días | 1,000 | | | 1,000 | | |
| >10 días | 10,667 | 1,298-87,672 | | 6,101 | 0,597-62,321 | |
| Comorbilidad alta | | | 0,022 | | | 0,486 |
| Si | 0,223 | 0,064-0,782 | | 2,239 | 0,205-27,934 | |
| No | 1,000 | | | 1,000 | | |
| Ingreso en UCI | | | 0,001 | | | 0,042 |
| Si | 7,500 | 2,241-25,096 | | 10,623 | 1,089-103,597 | |
| No | 1,000 | | | 1,000 | | |
| Tocilizumab | | | 0,009 | | | 0,030 |
| Si | 4,488 | 1,409-14,298 | | 5,096 | 1,116-22,279 | |
| No | 1,000 | | | 1,000 | | |

Leyenda: ORc: Odd ratio cruda. ORa: Odd ratio ajustada *Ajustado por las variables de la tabla.

5. Discusión

Análisis e interpretación de los resultados

Interpretación de los resultados clínicos y analíticos de la población estudiada

La población estudiada, todos ellos pacientes fallecidos en el medio hospitalario, se caracteriza por ser una población añosa, en su mayoría masculina (67%), con sobrepeso (62,2%), hipertensión (71%) y otras comorbilidades asociadas. Más del 80% tiene una comorbilidad avanzada, medida como un Índice de *Charlson* mayor de 3 puntos. La fragilidad era también importante (67,1%). Todas estas variables se han asociado con la mortalidad del SARS-CoV-2 (1,7), por lo que es lógico pensar que una población de paciente fallecidos por COVID-19 tenga dichas características (11,23).

Curiosamente los síntomas al ingreso son todos ellos inferiores a estudios similares en los que se analizan pacientes ingresados mientras que las constantes vitales y los parámetros analíticos asociados a inflamación se encuentran elevados (leucopenia, PCR, LDH, ferritina, dímero D e IL-6). Es el caso de Wiersinga et al (2020) (7), un metaanálisis cuyos resultados en los síntomas al ingreso fueron fiebre (70%-90%), tos seca (60%-86%) y disnea (53%-80%). Lo mismo ocurren con los resultados de la serie española de Casas-Rojo et al (2020)(14) en los que la PCR > 10 mg/dl presenta una mediana de 6,02, la LDH mayor de 400 U/l aparece en el 30,7% de los pacientes y la ferritina >650 en el 47% frente a nuestro estudio (10,22, 37,3% y 64,3% respectivamente). A pesar de ser pacientes con hallazgos analíticos y signos vitales de gravedad no manifiestan una intensidad sintomatológica marcada. Es posible que se deba a que la comorbilidad y la fragilidad asociadas, junto con el probable deterioro cognitivo asociado a la edad les impida expresarse y manifestar la clínica igual de bien que los pacientes más jóvenes o menos frágiles. Esto puede llevarlos al hospital en un momento más evolucionado de la enfermedad. También es posible que algunas alteraciones basales sean secundarias a sus patologías de base.

No hay estudios actualmente que analicen los hallazgos radiológicos previos a la muerte. Comparados nuestros hallazgos con las radiografías de tórax al ingreso de otros estudios (8), los patrones son similares e incluso algo menores como es el caso de Casas-Rojas et al (2020) (14). Tampoco existen estudios de las alteraciones analíticas previas al fallecimiento. En nuestro estudio se evidencia un aumento de los parámetros de inflamación en los momentos finales de la vida excepto de la PCR que disminuye el porcentaje de pacientes con más de 10 de 52,9 a 44,3 que podría deberse al uso de Tocilizumab. También se detecta un aumento en el pro-BNP y el potasio con respecto a la analítica al ingreso.

Los tratamientos recibidos y las causas de muerte son similares a otras series. En nuestro estudio no se han estudiado las muertes asociadas a comorbilidades previas. Los estudios *post mortem* han revelado que en la mitad de los casos las causas de muerte de los pacientes con COVID-19 no fueron correctamente diagnosticadas en los pacientes mayores. Dichas causas no identificadas de forma clínica estaban en relación con la descompensación de las patologías crónicas de los pacientes (8). En nuestro estudio no se han estudiado.

Interpretación de los hallazgos pulmonares

Con respecto a los resultados histopatológicos de pulmón. En nuestra serie los hallazgos más frecuentes fueron la fibrosis intersticial con infiltrados asociados y la hiperplasia de neumocitos. Los infiltrados, tanto intersticiales como alveolares, son frecuentes, sobre todo aquellos causados por linfocitos y neutrófilos (2), al igual que en nuestra población de estudio. Todos estos hallazgos son típicos del DAD, que se detecta en el 66,1% de nuestros pacientes, pero no exclusivo (3,6). El daño alveolar difuso es la primera manifestación histológica detectada en los pacientes fallecidos por infección pulmonar grave por SARS-COV-2, tanto en centros hospitalarios como en la comunidad (11). También es la lesión característica de las neumonías virales como es el caso de la gripe, el SARS-CoV-1 o el MERS-COV (8,12).

La mayoría de nuestros pacientes recibieron corticoterapia y VMNI, sin embargo, no parece afectar a los patrones histológicos de DAD, tal y como se desprende de otros estudios (8,24).

La sobreinfección bacteriana se ha sospechado en el 19,4% de los casos. Según la bibliografía suele ser más frecuente en los pacientes ingresados en UCI (en nuestra población el 29,6%) y con días de ingreso elevados (en nuestra población mediana de 11 días, en el caso de pacientes en UCI la media es de 20 días) (6,11). En nuestra muestra la presencia de capilaritis (1,6%) y neumonía organizada (4,8%) fue anecdótica con respecto a otros estudios (12,25). Así mismo no se detectaron trombos (8). Esto puede deberse a que los hallazgos histopatológicos relacionados con el daño alveolar difuso se intercalan con áreas de pulmón normal (2). Puesto que nuestro estudio se realiza con muestras obtenidas por biopsias en lugar de por autopsias existe la limitación de que no podamos detectar los patrones limitados a áreas concretas si no se punciona dicha zona (15). Si bien, actualmente, la prevalencia de microtrombosis y capilaritis no está aún bien definida, abarcando desde hallazgos raros hasta encontrarlos en todos los pacientes de algunas series (21).

Interpretación de los hallazgos hepáticos

El daño hepático asociado a la COVID-19 ha sido evaluado en múltiples estudios con diferentes conclusiones según las fuentes. Es frecuente observar daño hepático leve asociado a la COVID-19, sin embargo, al analizar los tejidos hepáticos es difícil definir si las alteraciones observadas se deben al efecto del virus, a la toxicidad farmacológica o a daño hepático preexistente (10,23).

La necrosis centrolobulillar junto con inflamación e infiltrados son los hallazgos propios de la COVID-19 en el hígado (2). En nuestra serie hemos encontrado necrosis centrolobulillar en el 12,8% de los pacientes e infiltrados en solo el 5,1%, cifras inferiores a lo habitual, que oscilan entre el 14,8% y el 53% (12,13). No se ha detectado endotelitis linfocitaria ni trombosis luminal. Estos resultados pueden ser debidos a que, de similar forma que ocurre en el pulmón, estos hallazgos hepáticos suelen ser parcheados (2,12) y de menor intensidad que en el pulmón. Además, es posible que en la población más envejecida que fallece sea menor con respecto a series más jóvenes. Igualmente, dichas hipótesis requieren de estudios clínicos que los soporten.

La presencia de colestasis y esteatosis se han definido en otras series no queda claro si se trata de hallazgos relacionados con la COVID-19, los efectos tóxicos de los fármacos o con la comorbilidad, tanto conocida como desconocida (23). La cirrosis y la presencia de neoplasias son claramente hallazgos casuales independientes de la infección viral.

Las biopsias *post mortem* muestran esteatosis microvascular e inflamación lobulillar y portal leve, lo que indica que las lesiones podrían ser causada por la infección por SARS-CoV-2 o por inducida por fármacos. La lesión hepática ocurrida en pacientes con COVID-19 puede deberse al daño a las células del conducto biliar ya que tanto las células del hígado como las de las vías biliares expresan ACE2, pero las biliares en mayor proporción. Aún no queda claro si la tormenta de citocinas inflamatorias provoca daño hepático en los pacientes (13).

Interpretación de los hallazgos cardiacos

Al igual que ocurre con los tejidos hepáticos, es difícil establecer si las lesiones están en relación con la infección viral o por las condiciones preexistentes (2). Es vital considerar en estos casos las comorbilidades del paciente. En la mayoría de los pacientes se detecta cardiomegalia e hipertrofia ventricular en relación con historia previa de hipertensión arterial (11,12) al igual que ocurre en nuestra muestra de pacientes (hipertrofia de fibras miocárdicas (HFT) en el 47,9% de los pacientes y fibrosis cardiaca en el 18,8%).

En el corazón los hallazgos descritos asociados al daño viral (similar a los del SARS-CoV-1), son la necrosis parcheada de miocitos e infiltrados parcheados linfocitarios en relación con miocarditis linfocítica, descritos en proporción muy desigual en los diferentes estudios (2,8,10,12). En nuestro estudio los infiltrados linfocitarios (4,2%) y la necrosis (2,1%) fueron muy poco frecuentes. No se han detectado casos de pericarditis.

Estos hallazgos sugieren que podría ser necesario un seguimiento cardiológico en los supervivientes de la COVID-19.

Interpretación de presencia de SARS-CoV-2 en los tejidos pulmonares

En la gran mayoría de los pacientes con muestras pulmonares (84,5%) se demostró presencia del virus en dichos tejidos. A pesar de ello no se encontró asociación con las alteraciones tisulares descritas en dicho órgano, lo que implica que, posiblemente, el daño pulmonar no depende de la carga viral del SARS-CoV-2 en sus células.

Interpretación del estudio de asociación de los hallazgos pulmonares con los datos clínicos, analíticos y radiológicos

En la bibliografía actual de autopsias de pacientes fallecidos por SARS-COV se ha detectado que en los primeros 10 días predomina el patrón exudativo, mientras que a partir de los 10 días es más frecuente el patrón de daño alveolar difuso proliferativo y organizado (2,21). A pesar de ello, en nuestro estudio no se detectaron diferencias significativas entre los diferentes patrones de DAD y el tiempo de evolución de la enfermedad.

La asociación del DAD y el DAD mixto con una LDH mayor y la presencia de alteraciones relevantes histológicas con una ferritina elevada en la analítica previa a la muerte puede explicarse por el daño pulmonar asociado a la respuesta inmune exacerbada y a la “tormenta de citoquinas” secundaria (9,10). Siguiendo esta hipótesis, es posible que los pacientes más mayores, debido a la inmunosenescencia, tengan una menor respuesta inflamatoria y por tanto desarrollen el DAD en menor frecuencia e intensidad que los pacientes más jóvenes. Esto explicaría por qué en nuestro estudio fallecer con menos de 80 años se asocia con mayor presencia de DAD y de DAD proliferativo, y por qué, en este último caso al corregirlo por la comorbilidad se pierde esa relación. Estos pacientes, además, suelen fallecer más frecuentemente por la descompensación de sus comorbilidades que por los efectos propiamente dichos del SARS-COV-2 (11).

Sorprendentemente, el DAD y el DAD proliferativo se ha asociado en nuestra población con el uso de Tocilizumab. Este hallazgo no se describe en la bibliografía actual y podría deberse a que el uso de dicho fármaco ha estado restringido en el Sistema Nacional de Salud a los pacientes de mayor gravedad. Igualmente, el DAD proliferativo se presenta en mayor proporción y de forma significativa en los pacientes que requirieron ingreso en UCI, que presumiblemente sufrían una enfermedad más grave (1). Ser varón se presenta en la población estudiada como factor de riesgo para tener DAD exudativo con respecto a ser mujer. Los pacientes mayores tienen más riesgo de padecer una enfermedad grave y de fallecimiento, por lo que también podrían explicarse las diferencias detectadas a la hipótesis anterior (1). De cualquier manera, es necesario realizar nuevos estudios clínicos dirigidos y con tamaños de muestra elevados para comprobar dichas asociaciones y las hipótesis generadas.

Aplicabilidad y utilidad práctica de los resultados. Recomendaciones para futuras investigaciones

Sabemos que el SDRA y su manifestación histológica, el daño alveolar agudo, es la causa más frecuente de muerte en los pacientes con COVID-19. Pero no queda claro por qué ocurre en unos pacientes y en otros no y por qué al aparecer en unos pacientes resulta mortal y otros sobreviven (12). Se necesitan más estudios para detectar responder a estar incógnitas con seguridad.

Existen evidencias que sugieren que daño pulmonar está estrechamente asociado a la respuesta viral exacerbada a la infección viral. La tormenta de citocinas activa los procesos de defensa inmunológica que conducen a la producción de sustancias citotóxicas, marcadores de inflamación y alteraciones del tejido pulmonar (9,10). En nuestro estudio, la RT-PCR de SARS-CoV-2 en el pulmón fue del 84,8%, lo que confirma la presencia del virus en los tejidos. Las coinfecciones son poco habituales y principalmente en pacientes sometidos a ventilación mecánica invasiva y a ingresos prolongados (11). Es por ello que, un tratamiento antiviral precoz junto con fármacos con efecto inmunomodulador pueden ser la mejor baza para los casos más graves de la infección. El uso de antibióticos en los pacientes con COVID19 es discutido.

En el caso del resto de los órganos y sobre todo en los pacientes muy ancianos, la asociación del daño tisular con la tormenta de citoquinas es mucho más discutida (2,11,13). Los principales hallazgos extrapulmonares están en relación con la comorbilidad del paciente, como es el caso de la diabetes mellitus, la hipertensión arterial o la insuficiencia renal. Aunque es probable que algunos

cambios puedan ser atribuidos a la infección viral (dermatitis, miositis, orquitis, miocarditis, endotelitis, glomerulonefritis y encefalitis) (6). Para comprobar dicha relación son necesarios estudios científicos basados en inmunohistoquímica y microscopía electrónica.

Los exámenes *post mortem* son necesarios para entender la fisiopatología de la enfermedad y ayudar en las decisiones terapéuticas. Las biopsias han servido para describir las alteraciones patológicas de los pulmones y resto de órganos afectados, generando un conocimiento que ha servido para apoyar las decisiones terapéuticas (6). Aun así, no ha sido suficiente para acabar con la pandemia. Si que lo fue para controlar el SARS-CoV-1 y el MERS-COV (12), es por ello que debemos continuar con dichos estudios para general una mayor evidencia.

Se han hecho pocas autopsias, principalmente porque al inicio de la pandemia se recomendó la no realización de estudios *post mortem* y por la necesidad de materiales que aseguren la bioseguridad (12). No hay evidencias de infección por SARS-COV-2 en las investigaciones *post mortem*. Aun así, la seguridad y las medidas de aislamiento son necesarias. Siendo los estudios anatomopatológicos el patrón oro para para entender los mecanismos fisiopatológicos, clarificar los daños asociados al virus y sugerir aproximaciones terapéuticas y líneas de investigación, no hay excusa para no llevarlos a cabo siempre que sea posible y comunicar sus resultados a la comunidad internacional. Si no es posible realizar autopsias completas, la toma de muestras por biopsias puede ser una alternativa sencilla, barata y de alta rentabilidad.

Consideraciones finales

1. Los exámenes anatomopatológicos han contribuido intensamente al conocimiento de la infección por SARS-CoV-2. Hay que enfatizar en la importancia de continuar con los estudios anatomopatológicos en esta pandemia.

2. Las biopsias *post mortem* son un técnica útil, eficiente y rentable para obtener conocimiento de la muerte por COVID-19.

4. Parece existir cierta relación entre las alteraciones patológicas en los tejidos pulmonares y la elevación de reactantes de fase aguda. Lo que podría indicar que el daño pulmonar puede estar influido por un estado de hiperinflamación.

5. En los pacientes muy mayores (más de 80 años) es posible que la importancia del daño directamente asociado a la infección viral y a la “tormenta de citoquinas” cobre menor importancia. En estos pacientes la agudización de sus patologías previas pueden ser un factor determinante.

Conclusiones

1. La población estudiada presenta una edad avanzada, fragilidad elevada y alta comorbilidad. Suelen ingresar con una clínica no muy florida, pero con signos vitales que indican gravedad y con reactantes de fase aguda elevados, los cuales que empeoran previamente al fallecimiento.
2. Los infiltrados intersticiales, principalmente linfocíticos son las alteraciones más frecuentes de los tejidos pulmonares. La presencia de DAD en sus diferentes fases es el hallazgo más característico. En el resto de tejidos se ha evidenciado daño asociado a la COVID-19 en bajo porcentaje. Son especialmente relevantes los hallazgos asociados a la comorbilidad del paciente.
3. La RT-PCR de SARS-CoV-2 fue positiva en el 84,8% de las muestras pulmonares en las que se realizó. No se encontró asociación con las alteraciones tisulares descritas en dicho órgano.
4. Las alteraciones de los tejidos pulmonares se asocian a la elevación de los parámetros de inflamación como es la LDH y la ferritina, por lo que podría estar en relación con el estado de hiperinflación generado por la COVID-19.



5. Agradecimientos

Se agradece la labor realizada a los médicos residentes y adjuntos del Servicio de Medicina Interna, Neumología, Unidad de Enfermedades Infecciosas, Unidad de Cuidados Intensivos y Anestesia/Reanimación del HGUA que han participado en la realización de las biopsias *post mortem*. Cabe destacar a la Dra. Isabel Ribes, la Dra. Mar García, la Dra Pilar González de la Aleja, el Dr. Héctor Pinargote, la Dr. Julia Portilla, el Dr. Alejandro Cintas, el Dr Marouane Menchi, el Dr. Alex Scholz, el Dr. Antonio Amo, la Dra. Otero, la Dra. Ana Martí y en especial a la Dra. Azucena Sempere. También se agradece, también, su trabajo y disposición a los diferentes equipos de enfermería, auxiliares y celadores que han colaborado en el estudio. En especial al equipo de la planta 8º B.

También queremos agradecer al equipo de Radiología, por asistir en la toma de muestras ecoguiada cuando fue posible, en particular al Dr. Luis Concepción. Al servicio de Anatomía Patológica que han participado en el estudio microbiológico y la extracción del ARN del virus, y en especial al Dr. Ignacio Aranda, Dra. Cristina Alenda y Dra. Sandra Silvia Ortega. Al Servicio de Microbiología que voluntariamente han procesado el ARN de las muestras biológicas para identificación del virus, especialmente a la Dra. Inmaculada Vidal y al Dr. Juan Carlos Rodríguez.

Por último, agradecer al Dr. José Manuel Ramos por el planteamiento del estudio y tutorizar este Trabajo Fin de Máster.

6. Bibliografía

1. Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias. Información Científica-Técnica. Enfermedad por coronavirus, COVID-19 [Internet]. Ministerio de Sanidad, Igualdad y Asuntos Sociales. 2021 [cited 2021 Jul 1]. Available from: <https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/documentos/ITCoronavirus.pdf>
2. Sessa F, Salerno M, Pomara C. Autopsy Tool in Unknown Diseases: The Experience with Coronaviruses (SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2). *Medicina (B Aires)*. 2021 Mar 25;57(4):309.
3. Calabrese F, Pezzuto F, Fortarezza F, Hofman P, Kern I, Panizo A, et al. Pulmonary pathology and COVID-19: lessons from autopsy. The experience of European Pulmonary Pathologists. *Virchows Arch*. 2020 Sep 9;477(3):359–72.
4. Santoriello D, Khairallah P, Bomback AS, Xu K, Kudose S, Batal I, et al. Postmortem Kidney Pathology Findings in Patients with COVID-19. *J Am Soc Nephrol*. 2020 Sep 1;31(9):2158–67.
5. Organización Mundial de la Salud (OMS). Declaración sobre la segunda reunión del Comité de Emergencias del Reglamento Sanitario Internacional (2005) acerca del brote del nuevo coronavirus (19-nCoV) [Internet]. 30 de enero. 2020 [cited 2021 Mar 31]. Available from: [https://web.archive.org/web/20200220052100/https://www.who.int/es/news-room/detail/30-01-2020-statement-on-the-second-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)](https://web.archive.org/web/20200220052100/https://www.who.int/es/news-room/detail/30-01-2020-statement-on-the-second-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-(2019-ncov))
6. Duarte-Neto AN, Monteiro RAA, da Silva LFF, Malheiros DMAC, de Oliveira EP, Theodoro-Filho J, et al. Pulmonary and systemic involvement in COVID-19 patients assessed with ultrasound-guided minimally invasive autopsy. *Histopathology*. 2020 Aug 24;77(2):186–97.
7. Wiersinga WJ, Rhodes A, Cheng AC, Peacock SJ, Prescott HC. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. *JAMA*. 2020 Aug 25;324(8):782–93.
8. Mohanty SK, Satapathy A, Naidu MM, Mukhopadhyay S, Sharma S, Barton LM, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease 19

- (COVID-19) - anatomic pathology perspective on current knowledge. *Diagn Pathol*. 2020 Aug 14;15(1):103.
9. Silva Andrade B, Siqueira S, de Assis Soares WR, de Souza Rangel F, Santos NO, dos Santos Freitas A, et al. Long-COVID and Post-COVID Health Complications: An Up-to-Date Review on Clinical Conditions and Their Possible Molecular Mechanisms. *Viruses*. 2021 Apr 18;13(4):700.
 10. Falasca L, Nardacci R, Colombo D, Lalle E, Di Caro A, Nicastri E, et al. Postmortem Findings in Italian Patients With COVID-19: A Descriptive Full Autopsy Study of Cases With and Without Comorbidities. *J Infect Dis*. 2020 Dec 1;222(11):1807–15.
 11. Malézieux-Picard A, Ferrer Soler C, De Macedo Ferreira D, Gaud-Luethi E, Serratrice C, Mendes A, et al. Undetected Causes of Death in Hospitalized Elderly with COVID-19: Lessons from Autopsy. *J Clin Med*. 2021 Mar 24;10(7):1337.
 12. Satturwar S, Fowkes M, Farver C, Wilson AM, Eccher A, Girolami I, et al. Postmortem Findings Associated With SARS-CoV-2: Systematic Review and Meta-analysis. *Am J Surg Pathol*. 2021 May 1;45(5):587–603.
 13. Xu L, Liu J, Lu M, Yang D, Zheng X. Liver injury during highly pathogenic human coronavirus infections. *Liver Int*. 2020 May 30;40(5):998–1004.
 14. Casas-Rojo JM, Antón-Santos JM, Millán-Núñez-Cortés J, Lumbreras-Bermejo C, Ramos-Rincón JM, Roy-Vallejo E, et al. Características clínicas de los pacientes hospitalizados con COVID-19 en España: resultados del Registro SEMI-COVID-19. *Rev Clin Esp*. 2020 Nov;220(8):480–94.
 15. Edler C, Schröder AS, Aepfelbacher M, Fitzek A, Heinemann A, Heinrich F, et al. Dying with SARS-CoV-2 infection—an autopsy study of the first consecutive 80 cases in Hamburg, Germany. *Int J Legal Med*. 2020 Jul 1;134(4):1275–84.
 16. Dong E, Du H, Gardner L. An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time. *Lancet Infect Dis*. 2020 May 1;20(5):533–4.
 17. Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias. Actualización nº 440. Enfermedad por el coronavirus (COVID-19). 13.08.2021 [Internet]. Ministerio de Sanidad, Igualdad y Asuntos Sociales. 2021 [cited 2021 Jul 1]. Available from: <https://www.mschs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/documento>

s/Actualizacion_44_COVID_1200.pdf

18. Tian S, Xiong Y, Liu H, Niu L, Guo J, Liao M, et al. Pathological study of the 2019 novel coronavirus disease (COVID-19) through postmortem core biopsies. *Mod Pathol.* 2020;33(6):1007–14.
19. Barranco R, Ventura F. The role of forensic pathologists in coronavirus disease 2019 infection: The importance of an interdisciplinary research. *Med Sci Law.* 2020;60(3):237–8.
20. Sperhake J-P. Autopsies of COVID-19 deceased? Absolutely! *Leg Med.* 2020 Nov 1;47:101769.
21. Hirschbühl K, Schaller T, Kling E, Märkl B, Claus R. Autopsy of patients with COVID-19: A balance of fear and curiosity. *Pathol Res Pract.* 2020 Aug;216(8):153039.
22. Sempere AL, Ramos JM (dir) Estudio anatomopatológico y virológico en biopsias post mortem de pacientes con infección por SARS-CoV-2. [tesis doctoral]. [Alicante]: Universidad Miguel Hernández; 2020.
23. Campos-Varela I, Villagrasa A, Simon-Talero M, Riveiro-Barciela M, Ventura-Cots M, Aguilera-Castro L, et al. The role of liver steatosis as measured with transient elastography and transaminases on hard clinical outcomes in patients with COVID-19. *Therap Adv Gastroenterol.* 2021 Jan 30;14:175628482110165.
24. Konopka KE, Nguyen T, Jentzen JM, Rayes O, Schmidt CJ, Wilson AM, et al. Diffuse alveolar damage (DAD) resulting from coronavirus disease 2019 Infection is Morphologically Indistinguishable from Other Causes of DAD. *Histopathology.* 2020 Oct 12;77(4):570–8.
25. Ackermann M, Verleden SE, Kuehnel M, Haverich A, Welte T, Laenger F, et al. Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19. *N Engl J Med.* 2020 Jul 9;383(2):120–8.

7. Anexos

Anexo 1. Índice de comorbilidad de *Charlson* adaptado e instrucciones de llenado.

| Comorbilidad | Presente | Puntos | Extensión opcional | |
|--|----------|--------|----------------------------------|---|
| Infarto del miocardio | | 1 | Edad (años) | |
| Insuficiencia cardiaca congestiva | 1 | | 50-59 | 1 |
| Enfermedad vascular periférica | 1 | | 60-69 | 2 |
| Enfermedad vascular cerebral | | | 70-79 | 3 |
| (excepto hemiplejía) | 1 | | 80-89 | 4 |
| Demencia | 1 | | 90-99 | 5 |
| Enfermedad pulmonar crónica | 1 | | Total de la puntuación combinada | |
| Enfermedad del tejido conectivo | 1 | | (comorbilidad + edad) | |
| Enfermedad ulcerosa | 1 | | | |
| Enfermedad hepática leve | 1 | | Interpretación | |
| Diabetes (sin complicaciones) | 1 | | de la puntuación total + edad | |
| Diabetes con daño a órgano blanco | 2 | 0 | Riesgo relativo | |
| Hemiplejía | 2 | 1 | estimado (IC 95 %) | |
| Enfermedad renal moderada o severa | 2 | 2 | 1.00 | |
| Tumor sólido secundario (no metastásico) | 2 | 3 | 1.45 (1.25 - 1.68) | |
| Leucemia | 2 | 4 | 2.10 (1.57 - 2.81) | |
| Linfoma, mieloma múltiple | 2 | 5 | 3.04 (1.96 - 4.71) | |
| Enfermedad hepática moderada o severa | 3 | 6 | 4.40 (2.45 - 7.90) | |
| Tumor sólido secundario metastásico | 6 | 7 | 6.38 (3.07 - 13.24) | |
| Sida | 6 | ≥ 8 | 9.23 (3.84 - 22.20) | |
| | | | 13.37 (4.81 - 37.22) | |
| | | | 19.37 (6.01 - 62.40) | |

Comentarios:

Puntuación: _____

Cuadro II | Instrucciones para el llenado de la escala de comorbilidad de *Charlson*

| | |
|--|--|
| Infarto del miocardio | Historia de infarto del miocardio médicamente documentado |
| Insuficiencia cardiaca congestiva | ICC sintomática con respuesta a tratamiento específico |
| Enfermedad vascular periférica | Claudicación intermitente, puente arterial periférico para el tratamiento de la insuficiencia, gangrena, insuficiencia arterial aguda, aneurisma no tratado (≥ 6 cm) |
| Enfermedad vascular cerebral | Historia de AIT o EVC sin o con secuelas menores (excepto hemiplejía) |
| Demencia | Deterioro cognitivo crónico |
| Enfermedad pulmonar crónica | Disnea sintomática debido a condiciones respiratorias crónicas (incluye asma) |
| Enfermedad del tejido conectivo | LES, polimiositis, enfermedad mixta del tejido conectivo, polimialgia, AR severa o moderada |
| Enfermedad ulcerativa | Pacientes que han requerido tratamiento por enfermedad ulcerativa péptica |
| Enfermedad hepática leve | Cirrosis sin hipertensión portal, hepatitis crónica |
| Diabetes (sin complicaciones) | Diabetes en tratamiento médico |
| Diabetes con daño a órgano blanco | Retinopatía, neuropatía, nefropatía |
| Hemiplejía (paraplejía) | Hemiplejía o paraplejía |
| Enfermedad renal moderada | Creatinina > 3 mg/dL o severa (265 mmol/L), diálisis, transplantados, síndrome urémico |
| Tumor sólido secundario (no metastásico) | Inicialmente tratado en los últimos cinco años. Excluye cáncer de piel no melanomatoso y carcinoma de cérvix <i>in situ</i> |
| Leucemia | LMC, LLC, LAM, LAL, PV |
| Linfoma, MM | Linfoma no-Hodgkin y de Hodgkin, macroglobulinemia de Waldenström, mieloma múltiple |
| Enfermedad hepática moderada o severa | Cirrosis con hipertensión portal, con o sin hemorragia por várices esofágicas |
| Tumor sólido secundario (metastásico) | Sin comentarios |
| Sida | Sida y complejos relacionados con el sida |

Adaptación: no toma en cuenta los cánceres de piel no melanómicos o los carcinomas cervicales *in situ*.
 ICC = insuficiencia cardiaca congestiva, AIT = ataque isquémico transitorio, EVC = enfermedad vascular cerebral, LES = lupus eritematoso sistémico, LMC = leucemia mieloide crónica, LLC = leucemia linfocítica crónica, LAM = leucemia aguda mieloide, LAL = leucemia aguda linfoblástica, PV = policitemia vera, AR = artritis reumatoide

Anexo 2. Procedimiento toma biopsia pulmonar *post mortem*.

- Procedimientos parte A:

1. Hablar con la familia de la relevancia de la toma de la biopsia pulmonar post-mortem de su familiar y que firmen el consentimiento informado de biopsia que está relleno.
2. Dejar por escrito que la familia da el consentimiento verbal o escrito para la realización de una biopsia pulmonar post-mortem.
3. Coger un volante de solicitud de biopsia.
4. Coger la pistola (imagen 1) y el frasco de formol (imagen 2).



- Procedimiento parte B:

1. Vestirse con bata verde, si puede ser con la bolsa de plástico, gafas, mascarilla y visera de protección, y doble guante.
2. Entrar en la habitación con la pistola, el frasco de formol (con una bolsa de plástico) y una hoja de bisturí.
3. La punción se realizará en el 2-3 espacio intercostal de ambos hemitórax. Se procederá a recoger dos o tres biopsias por cada hemitórax.
4. Técnica de la pistola está recogido en este vídeo (bit.ly/agujabiopsia).

Nota: cuando se recoge el cilindro a veces es necesario ayudarse con la hoja de bisturí para despegar el cilindro de la aguja.

- Procedimiento parte C:

1. Al finalizar hay que desechar la pistola, la hoja del bisturí (en las zonas de seguridad).
2. Salir de la habitación con las medidas de seguridad.
3. Poner el consentimiento y la solicitud dentro de la bolsa.
4. Remitir la bolsa con la biopsia a Anatomía Patológica.

Imagen 1. Aguja de biopsia 14 G

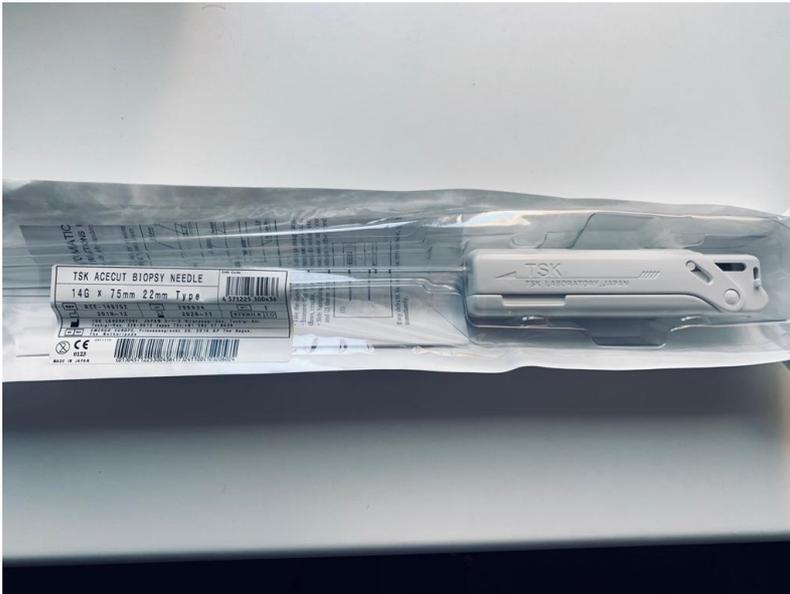


Imagen 2. Frasco de conservación con formol



Anexo 3. Biopsias procesadas de pulmón, hígado y corazón de cada paciente.

| Paciente | Biopsias pulmón | Biopsias hígado | Biopsias corazón |
|----------|-----------------|-----------------|------------------|
| 1 | X | | |
| 2 | X | | |
| 3 | | X | X |
| 4 | X | | |
| 5 | X | X | X |
| 6 | X | | |
| 7 | X | X | X |
| 8 | | | X |
| 9 | X | | X |
| 10 | X | X | X |
| 11 | X | X | X |
| 12 | X | | |
| 13 | X | X | X |
| 14 | X | | |
| 15 | X | X | X |
| 16 | | X | X |
| 17 | X | X | X |
| 18 | X | X | X |
| 19 | X | | |
| 20 | X | X | X |
| 21 | | X | |
| 22 | X | X | X |
| 23 | X | X | |
| 24 | X | | |
| 25 | X | | X |
| 26 | X | | X |
| 27 | X | X | X |
| 28 | X | X | X |

| Paciente | Biopsias pulmón | Biopsias hígado | Biopsias corazón |
|----------|-----------------|-----------------|------------------|
| 29 | | X | X |
| 30 | X | | |
| 31 | | X | X |
| 32 | | X | X |
| 33 | X | | |
| 34 | X | | |
| 35 | X | | |
| 36 | X | | |
| 37 | X | X | |
| 38 | X | X | X |
| 39 | X | | X |
| 40 | X | | |
| 41 | X | X | X |
| 42 | X | X | X |
| 43 | X | X | X |
| 44 | X | | |
| 45 | X | X | X |
| 46 | X | | X |
| 47 | X | | X |
| 48 | X | X | X |
| 49 | X | X | X |
| 50 | X | X | X |
| 51 | X | | X |
| 52 | X | | X |
| 53 | X | | X |
| 54 | X | | X |
| 55 | X | | |
| 56 | X | X | X |

| Paciente | Biopsias pulmón | Biopsias hígado | Biopsias corazón |
|--------------|------------------|------------------|------------------|
| 57 | X | X | X |
| 58 | X | | |
| 59 | X | | |
| 60 | X | X | X |
| 61 | X | X | X |
| 62 | X | X | X |
| 63 | X | X | X |
| 64 | X | X | X |
| 65 | X | | X |
| 66 | | X | |
| 67 | X | X | X |
| 68 | | | X |
| 69 | X | | X |
| 70 | X | X | X |
| 71 | X | X | |
| n (%) | 62 (87,3) | 39 (54,9) | 48 (67,6) |

Anexo 4. Resultados histopatológicos de las biopsias de pulmón por paciente.

| Paciente | PCR SARS-COV-2* | SAR | Daño alveolar difuso (DAD) | | | Sobreinfección bacteriana | Necrosis | AFOP | NORG crónica | HDN | Capilaritis | Fibrosis intersticial | Infiltrados intersticiales | | Fibrosis alveolar | Inflamación alveolar | |
|----------|-----------------|-----|----------------------------|-----------|-------------------|---------------------------|----------|------|--------------|-----|-------------|-----------------------|----------------------------|-------|-------------------|----------------------|-------------|
| | | | DAD exudativo | DAD mixto | DAD proliferativo | | | | | | | | Celularidad | | | | Celularidad |
| 1 | Positivo | | + | | | + | | | | + | | + | + | L | + | + | N |
| 2 | Positivo | | + | | | + | | | | + | | + | + | L | + | + | N |
| 4 | Positivo | | + | | | | | | | | | + | + | L, N | + | + | M |
| 5 | Positivo | + | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | Positivo | | | | | | | | | + | | + | + | L | + | | |
| 7 | Negativo | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | Positivo | | | | + | | | + | | | | + | + | L | + | | |
| 10 | Negativo | | + | | | | | | | + | | + | + | L | + | | |
| 11 | Positivo | | | | + | | + | | | + | | + | + | | | + | N |
| 12 | Negativo | | | | + | + | | | | | | + | + | L, N | + | + | N |
| 13 | Negativo | | | | + | + | | | | | | + | + | L | + | + | N |
| 14 | | | + | | | | | | | + | | + | + | L | + | | |
| 15 | | | | | + | | | | | + | | + | + | L | + | | |
| 17 | | + | | | | | | | | | | | | | | | |
| 18 | | | | | | + | | | | | | | | | | + | N |
| 19 | | | + | | | | | | | + | | + | + | L, N | | | |
| 20 | | | | | + | | | | | + | | + | + | L, CP | | | |
| 22 | | + | | | | | | | | | | | + | L | | | |
| 23 | Positivo | | | | + | + | | + | | + | | + | + | L | + | | |
| 24 | Positivo | | | | + | | | | | + | | + | + | L | + | | |
| 25 | Positivo | | | | + | + | | | | + | | + | + | L | + | + | N |
| 26 | Positivo | | | | | | | | | | | + | + | L | | | |
| 27 | | | | | | | | + | + | + | | + | + | L | | | |
| 28 | Positivo | | | + | | | | | | + | | + | + | L | | | |
| 30 | Positivo | | | | | | | | | + | | | + | L | | + | H |
| 33 | Positivo | | | | + | + | | + | | + | | + | + | L | | + | N |
| 34 | Positivo | | | | | | | + | | + | | + | + | L, N | | + | N, H |
| 35 | Positivo | | | | + | | | | | + | | + | + | L, N | | + | H, N |
| 36 | Positivo | | | | + | | | + | | + | | + | + | L, CP | | + | H |
| 37 | Positivo | | | | + | | | | | + | | + | + | L | | | |
| 38 | Positivo | | | | + | | | + | | + | | + | + | L | | | |
| 39 | Positivo | | | | | | | | | | | | + | L | | | |
| 40 | Positivo | | | + | | | | + | | + | | + | + | L, CP | | + | L, CP |
| 41 | | | | | | | | | | | | | + | L | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|---|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|---------|
| 42 | | | + | | | | | + | | + | | + | + | L, CP | | + | L, CP |
| 43 | Positivo | + | | | | | | | | | | | | | | | |
| 44 | Positivo | | | + | | | | | | + | | + | + | L, CP, N | + | | |
| 45 | | | | + | | + | | | | + | | | + | L, N | + | + | N |
| 46 | Positivo | | | + | | + | | | | + | | | + | L, CP, N | + | + | N |
| 47 | Positivo | | + | | | | | | | + | | + | + | L | + | + | H |
| 48 | Negativo | | | | | | | | | | | | + | L | | | |
| 49 | Positivo | + | | | | | | | | | | | | | | | |
| 50 | Positivo | | + | | | | | | | + | | + | + | L, CP | + | | |
| 51 | Positivo | | | + | | | | | | + | + | | + | N | + | | |
| 52 | Positivo | + | | | | | | | | | | | + | N | + | | |
| 53 | | + | | | | | | | | + | | | + | N | + | | |
| 54 | Positivo | + | | | | | | | | | | | | | | | |
| 55 | Positivo | + | | | | | | | | | | | | | | | |
| 56 | Positivo | | | | + | | | | | + | | + | + | L, N, H, E | + | + | L, H, N |
| 57 | Positivo | | | + | | + | | | | + | | | + | L, N | + | + | N |
| 58 | | + | | | | | | | | | | | | | | | |
| 59 | Positivo | | | + | | | | | | + | | + | + | L | + | | |
| 60 | | | | + | | | | | | + | | + | + | L | + | | |
| 61 | Positivo | | | + | | | | | | + | | | | | | | |
| 62 | Negativo | + | | | | | | | | | | | | | | | |
| 63 | Negativo | | | + | | + | | | | + | | + | + | L | + | + | N |
| 64 | Positivo | | | | + | | | | | + | | + | + | L, CP, N | + | | |
| 65 | Positivo | | | | + | | | | | + | | + | + | L | + | + | M |
| 67 | Negativo | | | | + | | | | | + | | + | + | L | + | + | L |
| 69 | Positivo | | | | + | | | | + | + | | | + | L, CP | + | + | H |
| 70 | Positivo | | | | + | | | | | | | + | + | L, CP, N | | + | H |
| 71 | | | + | | | | | + | + | | | | + | L, CP | + | + | H |
| n = 62 | 39 | 11 | 10 | 12 | 19 | 12 | 1 | 10 | 3 | 40 | | 38 | 50 | | 31 | 26 | |

Leyenda: AFOP: Neumonía organizada fibrosa aguda. SAR: Sin alteraciones relevantes. HDN: Hiperplasia difusa de neumocitos. NORG: neumonía organizada crónica. L: linfocitos, N: neutrófilos, CP: células plasmáticas/plasmocitos, H: histiocitos, E: eosinófilos. *Perdidos: 15.

Anexo 5. Resultados histopatológicos de las biopsias de hepáticas por paciente.

| Paciente | SAR | NCL | Colestasis | IMN | Fibrosis | Esteatosis | Cirrosis | Neoplasia |
|---------------|-----------|----------|------------|----------|----------|------------|----------|-----------|
| 3 | | | | | | | + | |
| 5 | + | | | | | | | |
| 7 | | | | | | | | + |
| 10 | | + | + | | | | | |
| 11 | | + | | | | | | |
| 13 | + | | | | | | | |
| 15 | | + | | | | | | |
| 16 | | + | | | | | | |
| 17 | | + | | | + | | | |
| 18 | + | | | | | | | |
| 20 | | | | | | + | | |
| 21 | | | | | | + | | |
| 22 | + | | | | | | | |
| 23 | | | | | | + | | |
| 27 | + | | | | | | | |
| 28 | + | | | | | | | |
| 29 | | | | + | | | | |
| 31 | | | | | | + | | |
| 32 | | | | | | + | | |
| 37 | | | | | | + | | |
| 38 | | | | | | | | + |
| 41 | | | | | | + | | |
| 42 | | | + | | | | | |
| 43 | + | | | | | | | |
| 45 | | | | | | + | | |
| 48 | | | | | | | | |
| 49 | | | | | + | + | | |
| 50 | + | | | | | | | |
| 56 | | | + | | | + | | |
| 57 | | | | | | | + | |
| 60 | | | | | | + | | |
| 61 | + | | | | | | | |
| 62 | | | + | | | | | |
| 63 | + | | | | | | | |
| 64 | | | | | | + | | |
| 66 | | | | | | | | + |
| 67 | | | + | | | | | |
| 70 | | | | | | | | |
| 71 | | | + | + | | | | |
| n = 39 | 10 | 5 | 6 | 2 | 2 | 12 | 2 | 3 |

Legenda: SAR: sin alteraciones relevantes. NCL: necrosis centrolobulillar. IMN: infiltrado mononuclear.

Anexo 6. Resultados histopatológicos de las biopsias de cardíacas por paciente.

| Paciente | SAR | HTF | Fibrosis | Edema | HPM | ILinf | Necrosis | SAd |
|---------------|-----|-----|----------|-------|-----|-------|----------|-----|
| 3 | | | | | | + | + | |
| 5 | + | | | | | | | |
| 7 | + | | | | | | | |
| 8 | + | | | | | | | |
| 9 | + | | | | | | | |
| 10 | + | | | | | | | |
| 11 | + | | | | | | | |
| 13 | + | | | | | | | |
| 15 | + | | | | | | | |
| 16 | | + | + | | | | | |
| 17 | | + | | + | | | | |
| 18 | + | | | | | | | |
| 20 | + | | | | | | | |
| 22 | + | | | | | | | |
| 25 | + | | | | | | | |
| 26 | | | | | + | | | |
| 27 | + | | | | | | | |
| 28 | | + | | | | | | |
| 29 | | + | | | | | | |
| 31 | | | | + | | | | |
| 32 | + | + | | | | | | |
| 38 | | | | | | | | + |
| 39 | | + | | | | | | |
| 41 | | + | + | | | + | | |
| 42 | | | | + | | | | |
| 43 | | + | | | | | | |
| 45 | | + | | | | | | |
| 46 | + | + | + | | | | | |
| 47 | | + | | | | | | |
| 48 | + | + | + | | | | | |
| 49 | | + | + | | | | | |
| 50 | + | | | | | | | |
| 51 | + | + | + | | | | | |
| 52 | | + | + | | | | | |
| 53 | + | | | | | | | |
| 54 | | + | | | | | | |
| 56 | + | | | | | | | |
| 57 | | | + | | | | | |
| 60 | + | | | | | | | |
| 61 | + | | | | | | | |
| 62 | | + | | | | | | |
| 63 | + | | | | | | | |
| 64 | | + | | | | | | |
| 65 | | + | + | | | | | |
| 67 | | + | | | | | | |
| 68 | | + | | | | | | |
| 69 | + | + | | | | | | |
| 70 | + | + | | | | | | |
| n = 48 | 25 | 23 | 9 | 3 | 1 | 2 | 1 | 1 |

Legenda: SAR: sin alteraciones relevantes. HTF: Hipertrofia de fibras. HPM: hiperplasia mesotelial. ILinf: infiltrado linfocitario. SAd: sustitución adiposa.