

21-3-2022

# TRABAJO FIN DE GRADO

Modelo de predicción de Covid-19 grave basado en el uso de citocinas

---

TUTORES

---

DR. EDUARDO TAMAYO GÓMEZ  
DRA. MARTA MARTÍN FERNÁNDEZ



---

**Universidad de Valladolid**

**Facultad de Medicina**

Rodrigo Alegre Ballesteros  
UNIVERSIDAD DE VALLADOLID-FACULTAD DE  
MEDICINA

## Índice

RESUMEN .....	2
ABSTRACT .....	3
INTRODUCCIÓN .....	4
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	5
MATERIALES Y MÉTODOS .....	5
DISEÑO DEL ESTUDIO .....	5
ANÁLISIS DE CITOCINAS .....	6
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	6
RESULTADOS .....	7
CITOCINAS .....	9
ANÁLISIS DE LOS COMPONENTES PRINCIPALES (ACP) .....	10
ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE LOS COMPONENTES PRINCIPALES ASOCIADO A LA MORTALIDAD A 28 DÍAS .....	12
DISCUSIÓN .....	14
LIMITACIONES .....	17
CONCLUSIONES .....	17
BIBLIOGRAFÍA .....	17
ANEXOS .....	22
ANEXO 1 .....	22
ANEXO 2 .....	23
ANEXO 3 .....	24
ANEXO 4 .....	25

## RESUMEN

Introducción: La infección por COVID-19 se ha relacionado con el fenómeno “tormenta de citocinas”; esta situación favorece una liberación incontrolada de citocinas que produce un daño pulmonar grave. A pesar de esta relación entre citocinas y COVID-19, no se ha llevado a cabo ningún estudio de distintos perfiles de citocinas y su evolución en el tiempo en relación con el pronóstico del paciente. En este estudio, se busca encontrar la asociación entre los diferentes perfiles de citocinas y su evolución durante la hospitalización, con la mortalidad en pacientes hospitalizados por COVID-19.

Métodos: se realizó la medición en plasma de los niveles de 45 citocinas diferentes en de 108 pacientes infectados por COVID-19 en el primer, tercer y sexto día de ingreso así como en 28 controles sanos en el primer día. Se llevó a cabo un análisis de los componentes principales (ACP) para establecer los distintos perfiles de citocinas y se relacionó con la mortalidad a 28 días en pacientes hospitalizados.

Resultados: los niveles de IL-1 $\alpha$  y VEGFA (CP3), se encontraron más elevados en el grupo de los fallecidos únicamente en el día 1 post-ingreso. Por otra parte, las mediciones de HGF, MCP-1, IL-18, eotaxina, y SCF (CP2) mantuvieron valores más altos en el grupo de los fallecidos durante los tres días de medición, actuando como factor de riesgo; y por otro lado, los niveles de BDNF, IL-12 y IL-15 (CP1) se mantuvieron más bajos en el grupo de los fallecidos durante los tres días, actuando como factor protector. Ambos dos, CP2 y CP1, fueron incrementando sus diferencias entre grupos a lo largo del tiempo. La precisión de la probabilidad predicha para el modelo final de regresión logística para la estimación de la mortalidad basado en los valores de CP3 en el día 1, y CP2 y CP1 en el día 6 fue del 89,00 % ( $p < 0,001$ ).

Conclusiones: nuestros hallazgos revelan la evolución de las citocinas en relación con la mortalidad causada por la enfermedad COVID-19. Proponemos el uso de CP3 asociado a los datos clínicos como marcador de daño pulmonar grave, y la evolución de los valores de CP1 y CP2 para predecir el pronóstico y así personalizar el tratamiento

## ABSTRACT

Background: COVID-19 infection has been associated with the "cytokine storm" phenomenon; this situation favors an uncontrolled release of cytokines leading to severe lung damage. Despite this association between cytokines and COVID-19, no studies of different cytokine profiles and their evolution over time in relation to patient prognosis have been conducted. In this study, we sought to find the association between different cytokine profiles and their evolution during hospitalization with mortality in COVID-19 hospitalized patients.

Methods: plasma levels of 45 different cytokines were determined in 108 patients with COVID-19 on the first, third and sixth day of hospitalization as well as in 28 healthy controls at day of admission. A principal component analysis (PCA) was performed to establish the different cytokine profiles and was related to 28-day mortality in hospitalized patients.

Results: At day of admission non-survivors present significantly higher levels of IL-1 $\alpha$  and VEGFA (CP3) but not through follow up. However, the combination of HGF, MCP-1, IL-18, eotaxine, and SCF (CP2) are significantly higher in non-survivors at all three time-points presenting an increased trend in this group through time. On the other hand, BDNF, IL-12 and IL-15 (CP1) are significantly reduced in non-survivors at all-time points with a decreasing trend through time, though a protective factor. The accuracy of the predicted probability for the final logistic regression model for estimating mortality based on CP3 values at day 1, and CP2 and CP1 at day 6 was 89.00 % ( $p < 0.001$ ).

Conclusions: our findings reveal the evolution of cytokines in relation to mortality caused by COVID-19 disease. We propose the use of CP3 in association with clinical data as a marker of severe lung damage, and the evolution of CP1 and CP2 values to predict prognosis and thus personalize treatment.

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad por COVID-19 es una infección respiratoria aguda, potencialmente letal, que se produce por la infección del coronavirus SARS-CoV-2. Descubierta en 2019 y responsable de la pandemia actual, es una infección respiratoria que presenta una clínica muy variable, desde cuadros asintomáticos o cuadros catarrales leves, hasta cuadros que cursan con neumonías víricas bilaterales con una alta tasa de mortalidad por la producción de un síndrome de distrés respiratorio agudo (1).

Entre las manifestaciones clínicas que produce podemos incluir fiebre, tos, disnea, y otros síntomas pseudogripales. Entre las complicaciones más comunes y graves podemos destacar la insuficiencia multiorgánica, el shock séptico y el tromboembolismo pulmonar (1).

Algunos de los factores de riesgo que producen mayor susceptibilidad a la infección son la edad, el sexo masculino, la situación de institucionalización, el embarazo, las comorbilidades cardiovasculares (HTA, DM, tabaquismo, obesidad), enfermedades respiratorias crónicas o la inmunosupresión (1).

El coronavirus infecta a la célula huésped a través de una glucoproteína espiculada trimérica o peplómeros. Esta glucoproteína está formada por dos subunidades: S1 y S2. La parte final de la S1, llamada RBD, se une al receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2), en la superficie de la célula, mientras que la S2 se une a la membrana celular. En el momento en que la S1 se une al receptor, la proteína transmembrana TMPRSS2 activa a la glucoproteína y esta atraviesa el receptor de la ACE2, a través de la S2. Esta situación favorece la fusión de las membranas celulares y víricas, y la invasión (2). El virus a través de la neutralización de la ACE2, activa el sistema renina angiotensina, favoreciendo la adhesión y agregación plaquetaria, favoreciéndose los eventos tromboembólicos (3). La CCL2 estimulada por angiotensina II/ receptor de quimiocinas tipo 2 (CCR2) mediado por la activación de macrófagos, también induce un aumento de los niveles de IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , y otras citocinas, llegando a producir la "tormenta de citocinas", con un importante papel en la fisiopatología del COVID-19 (4).

El síndrome de liberación de citocinas, o tormenta de citocinas, es un término que se emplea para referirse a una inflamación a nivel sistémico como consecuencia de la liberación de una serie de mediadores de inflamación llamados citocinas, teniendo como desencadenante a estímulos como el uso de fármacos o la presencia de infecciones. El término "tormenta" se emplea en una situación de muy amplia producción, que produce una gran cantidad de fenómenos como mialgias, fiebre o afectación cardiopulmonar

suponiendo un riesgo vital (5). La gravedad de la COVID-19 se ha relacionado tanto con la tormenta de citocinas como con la producción y emparejamiento de los IFN de tipo alfa y beta (4).

Este fenómeno se ha descrito asociado a la infección por COVID-19, y es por ello por lo que se está trabajando en la formación de modelos predictores que nos permitan tanto el diagnóstico como el pronóstico (5). Son destacables especialmente el aumento de los niveles de IL-6, PCR, procalcitonina y ferritina, íntimamente relacionados con el desarrollo de COVID-19 grave y síndrome de distrés respiratorio agudo (6).

En el caso de los pacientes con COVID-19 grave, el perfil de citocinas incluye un aumento de IL-2, IL-7, factor estimulante de colonias de granulocitos (g-CSF), proteína 10 inducible por interferón- $\gamma$ , proteína 1 quimio atractiva de monocitos, proteína inflamatoria de macrófagos 1- $\alpha$ , y TNF- $\alpha$ . La IL-6 y el dímero D están estrechamente relacionados con el pronóstico de COVID-19, siendo peor, y asociando mayores complicaciones y mayor riesgo de COVID-19 grave (5). Asimismo, Los niveles de IP-10, MCP-3, IL-2, IL-7, IL-10, G-CSF, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , y TNF- $\alpha$  e encuentran significativamente aumentados en los casos de pacientes con COVID-19 grave que requieren cuidados intensivos y ventilación mecánica (7).

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El trabajo que vamos a llevar a cabo tiene como misión principal la búsqueda de un modelo predictor de pronóstico en pacientes con COVID-19, basado en la detección de diversas citocinas, con el fin de anticiparse, adaptar el tratamiento en base a sus características clínicas y su pronóstico y, en última instancia, mejorar la supervivencia.

El objetivo principal del trabajo va a ser:

- Establecer los diferentes perfiles de citocinas en función de la mortalidad a 28 días y su evolución a lo largo del tiempo y evaluar su capacidad predictora de pronóstico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### DISEÑO DEL ESTUDIO

Se diseñó un estudio prospectivo llevado a cabo en el Hospital Clínico Universitario de Valladolid. Se incluyó en el estudio a un total de 108 pacientes infectados con Covid-19 y confirmados por RT-PCR, reclutados entre finales de marzo y el 11 de abril de 2020. Aquellos pacientes afectados por otras infecciones o enfermedades crónicas con un pronóstico terminal no fueron incluidos en el estudio.

Los pacientes fueron divididos en dos grupos en función de la mortalidad a 28 días. Además, se reclutaron 28 controles sanos con RT-PCR negativa de edad y sexo similar durante evaluaciones preanestésicas para cirugías programadas. Este estudio ha sido aprobado por el comité ético del Hospital Clínico de Valladolid (cod: PI 22-2683 TFG) y todos los participantes recibieron y firmaron un consentimiento informado por escrito.

Las muestras de plasma fueron recogidas en el primer, tercer y sexto día de ingreso hospitalario en tubos con citrato sódico al 3,2% y centrifugados a 2000 g durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las muestras de plasma fueron alicuotadas y conservadas a -80°C hasta su uso.

### ANÁLISIS DE CITOCINAS

Los niveles séricos de 45 citocinas fueron medidos usando un 45-plex Human XL Cytokine Luminex Performance Panel (R&D), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las citocinas analizadas fueron las siguientes: BDNF, EGF, eotaxina (también denominada CCL11), FGF-2, GM-CSF, GRO- $\alpha$  (CXCL1), HGF, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-12 p70, IL-13, IL-15, IL-17a (CTLA-18), IL-18, IL-1RA, IL-2, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IL-31, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8 (también denominada CXCL8), IL-9, IP-1 beta (CCL4), IP-10 (CXCL10), LIF, MCP-1 (CCL2), MIP-1 $\alpha$  (CCL3), NGF- $\beta$ , PDGF-BB, PIGF-1, RANTES (CCL5), SCF, SDF-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , VEGF-A, y VEGF-D.

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Dado que la mayoría de los datos obtenidos de las citocinas no siguen una distribución normal, las variables continuas fueron estudiadas y presentadas en función de la mediana y el rango intercuartílico, y la comparación entre grupos se llevó a cabo con el test de Mann-Whitney o la T-student. Las variables categóricas, por otro lado, fueron descritas como recuentos y porcentajes, y comparadas usando el test de Chi-cuadrado ( $X^2$ ), o el test exacto de Fischer, cuando procedía.

La distribución de los valores de citocinas fue estimada y transformada a escala logarítmica ( $\log_2$ ) para representar los componentes principales de análisis o PCA.

Los PCA, recogen todos los valores de las citocinas estudiadas que mostraron algún cambio significativo entre supervivientes y no supervivientes en al menos 1 de los 3 días (1º, 3º o 6º) en los que se midieron. Todos los pacientes cuyas variables de interés fueron medidas de manera adecuada fueron incluidos en el estudio, no se hicieron suposiciones respecto a los datos perdidos.

Antes de la extracción de los factores, se comprobó la medida de adecuación del muestreo Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) y la prueba de esfericidad de Bartlett para evaluar la idoneidad de los datos para el análisis factorial. La solución factorial se formó a partir de los valores propios, que representan la cantidad de varianza captada por los componentes determinados. Se conservaron los factores con valores propios  $>1,0$ , según el criterio de Kaiser-Guttman y el Scree Plot. A continuación, se optimizó la solución factorial mediante la rotación varimax. Se calculó una puntuación basada en el factor para cada componente, y estimamos las puntuaciones del factor en todos los pacientes del COVID-19 en el primer, tercer y sexto día de ingreso.

Para evaluar los cambios a lo largo del tiempo en las medidas de desenlace dentro de cada grupo, se utilizó la prueba de medidas repetidas de Friedman con la prueba de comparación múltiple de Dunn para los datos no paramétricos y un análisis de varianza de medidas repetidas (RM-ANOVA) con la prueba de comparación múltiple de Tukey para los datos paramétricos.

Por último, los factores obtenidos se incluyeron en un análisis logístico multivariante y las probabilidades resultantes se utilizaron para determinar la capacidad discriminante del modelo mediante la curva ROC. Además, el modelo de regresión logística se validó internamente mediante una distribución de remuestreo bootstrap basada en 1000 remuestreos.

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando el SPSS versión 25.0 para Windows (SPSS, Inc., Chicago, Ill). Un p-valor de menos de 0,05 fue determinado como estadísticamente significativo.

## RESULTADOS

### CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Fueron reclutados para el estudio un total de 108 pacientes infectados con SARS-CoV-2, de ellos, 20 fallecieron antes de los 28 días post-ingreso y formaron el grupo de los no supervivientes; los 88 pacientes restantes formaron el grupo de los supervivientes. Las características clínicas y comorbilidades que fueron estudiadas se recogen en la tabla 1. Respecto al grupo de los fallecidos, podemos destacar la mayor mediana de edad en el ingreso. No se observaron diferencias significativas en términos de sexo o de comorbilidades. Por otro lado, en cuanto a las variables clínicas en el ingreso, los no supervivientes presentaron mayores niveles de glucemia, creatinina, leucocitos, neutrófilos, procalcitonina, PCR, dímero D, y LDH. Finalmente, si tenemos en cuenta las estancias en el hospital, no existen diferencias significativas en las estancias en la UVI o en el hospital; en cambio, sí existe una diferencia importante en el uso de ventilación mecánica invasiva, siendo inferior en el grupo de los supervivientes (23,9%), que en el grupo de los fallecidos (60%).

**Tabla 1.** Características clínicas de los pacientes.

	Supervivientes (n=88)	Fallecidos (n=20)	p valor
EDAD (Me, RIC)	67 (17)	73,5 (14)	<b>0,017</b>
SEXO (M) [n (%)]	45 (53,6%)	12 (60,0%)	0,628
→Comorbilidades [n(%)]	Supervivientes (n=88)	Fallecidos (n=20)	p valor
FUMADOR	5 (5,7%)	4 (20,0%)	0,059
CARDIOPATÍA CORONARIA	8 (9,1%)	2 (10,0%)	1,000
FIBRILACIÓN AURICULAR	8 (9,1%)	4 (20,0%)	0,229
DIABETES MELLITUS	14 (15,9%)	5 (25,0%)	0,340
ENFERMEDAD NEUROLÓGICA	1 (1,1%)	1 (5,0%)	0,337
ICTUS	1 (1,1%)	0 (0,0%)	1,000
HTA	39 (44,3%)	11 (55,0%)	0,460
HEPATOPATÍA	1 (1,1%)	1 (5,0%)	0,337
OBESIDAD	8 (9,1%)	2 (10,0%)	1,000
EPOC	5 (5,7%)	2 (10,0%)	0,611
INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA	1 (1,1%)	2 (10,0%)	0,087
→Medidas de laboratorio (Me, RIC)	Supervivientes (n=88)	Fallecidos (n=20)	p valor
GLUCEMIA (mg/dL)	106,00 (67)	198,00 (227)	<b>&lt;0,001</b>
CREATININA (mg/dL)	0,815 (0,23)	0,995 (0,86)	<b>0,007</b>
BILIRRUBINA TOTAL (mg/dL)	0,5 (0,39)	0,5 (0,58)	0,482
LEUCOCITOS (x10 <sup>9</sup> /L)	6,41 (3,72)	8,16 (10,23)	<b>0,042</b>
LINFOCITOS (x10 <sup>9</sup> /L)	1 (0,56)	0,72 (0,74)	0,185
NEUTRÓFILOS (x10 <sup>9</sup> /L)	4,73 (3,27)	7,13 (9,59)	<b>0,016</b>
PROCALCITONINA TOTAL (ng/mL)	0,09 (0,2)	0,3 (0,57)	<b>&lt;0,001</b>
PLAQUETAS (x10 <sup>9</sup> /L)	208 (117)	195 (95)	0,512
CRP PLASMÁTICA (mg/dL)	76 (96)	160 (190)	<b>0,003</b>
FERRITINA (µg/L)	671 (1107)	1024 (1137)	0,126

		2029	
DÍMERO D (mg/dL)	711 (769,5)	(23629,25)	<b>0,015</b>
LDH (mmol/L)	306 (96)	385 (183)	<b>0,002</b>
Situaciones clínicas	Supervivientes (n=88)	Fallecidos (n=20)	p valor
TIEMPO DE HOSPITALIZACIÓN (días; Me, RIC)	11 (13,5)	15 (11,75)	0,153
TIEMPO DE ESTANCIA EN LA UCI (días; Me, RIC)	20 (19,5)	17,5(8,75)	0,253
VENTILACIÓN MECÁNICA INVASIVA [N (%)]	21 (23,9%)	12 (60,0%)	<b>0,003</b>

Datos expresados en mediana y rango intercuartil (Me y RIC) y en número respecto de total y porcentaje (N, %). HTA: hipertensión arterial; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; CRP: proteína C reactiva; LDH: lactato deshidrogenasa; UCI: unidad de cuidados intensivos.

## CITOCINAS

En el primer día de ingreso (Anexo 1), se observaron diferencias significativas respecto a los niveles de HGF, IL-2, IL-1 $\alpha$ , IL-15 y VEGFA. La IL-15 y la IL-2 fueron las únicas citocinas cuyos niveles se redujeron significativamente a la mitad en el grupo de no supervivientes a los 28 días. El resto de las citocinas aumentaron significativamente en este grupo. En concreto, la IL-1 $\alpha$  y el VEGFA cuadruplicaron y duplicaron sus niveles, respectivamente. En el tercer día de ingreso (Anexo 2), se encontraron diferencias entre los grupos en el caso del BDNF, la eotaxina, la IL-18 y, de nuevo, los niveles de HGF e IL-15. En los no supervivientes, los niveles de HGF e IL-18 eran significativamente más altos, y el HGF triplicaba los niveles en comparación con los supervivientes. Por otro lado, los niveles de BDNF, eotaxina e IL-15 fueron significativamente menores en este grupo.

Finalmente, en el sexto día de ingreso (Anexo 3), las citocinas significativamente elevadas en los no supervivientes fueron SCF, MCP-1, IL-18, VEGFA y HGF. La excepción volvió a ser la IL-15, que apenas mostró variación en el tiempo, y cuyos niveles en los no supervivientes se mantuvieron en la mitad de los de los supervivientes. La IL-18 aumentó sus niveles con respecto al tercer día de ingreso; y el VEGFA, que duplicó significativamente el nivel en el primer día de ingreso, triplicó los niveles en los no supervivientes en el sexto día. Sin embargo, el HGF destaca como la única citocina que se mantuvo significativamente elevada en el grupo de no supervivientes a lo largo

de los tres tiempos de medición, alcanzando su máximo pico y diferencia respecto a los supervivientes, el sexto día de ingreso.

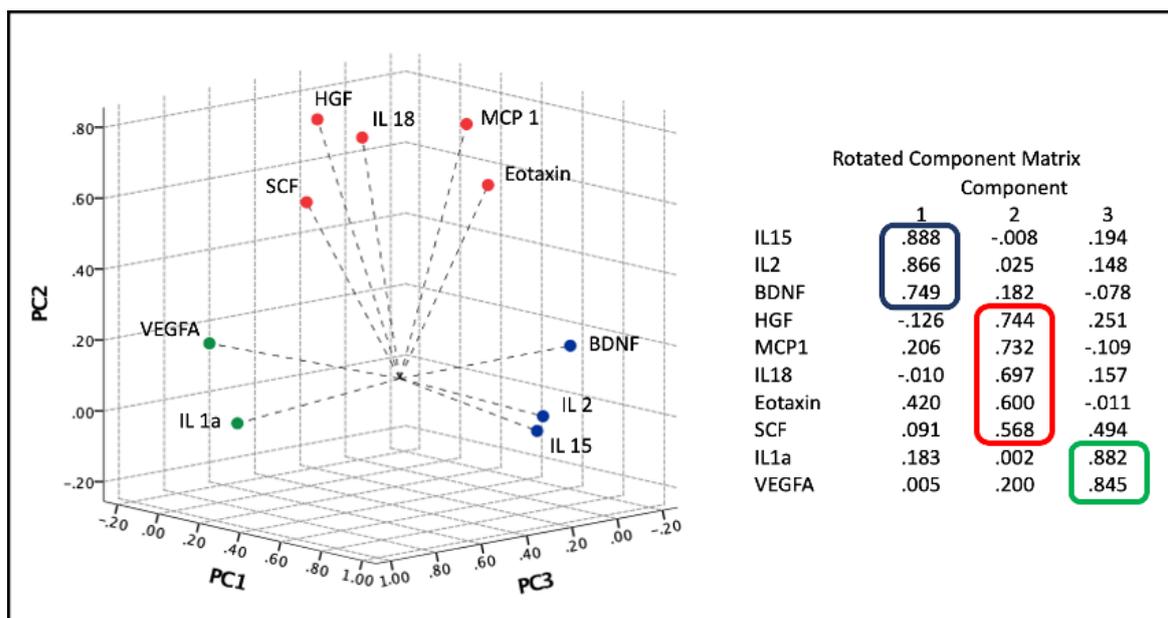
Tras observar estos resultados, se seleccionaron un total de 10 citocinas como significativas para realizar el análisis de los componentes principales: IL1- $\alpha$ , IL2, IL15, IL18, eotaxina, HGF, SCF, BDNF, MCP1 y VEGFA.

### ANÁLISIS DE LOS COMPONENTES PRINCIPALES (ACP)

La medida de adecuación del muestreo de Kaiser-Meyer-Olkin (0,7) y la prueba de esfericidad de Bartlett ( $p < 0,001$ ) indicaron que la matriz factorial era adecuada para los datos (Anexo 4).

El ACP dio como resultado tres componentes con valores propios superiores a uno que describen las relaciones entre los niveles de citocinas en pacientes con COVID-19. Los tres componentes explicaron el 66,09% de la varianza total. CP1, CP2 y CP3 representaron el 32,63%, 19,14% y 14,32% de la varianza, respectivamente. El CP1 está compuesto por IL-15, IL-2 y BDNF; el PC2 por HGF, MCP-1, IL-18, Eotaxina y SCF; y el CP3 por IL-1 $\alpha$  y VEGFA. La figura 1 muestra un gráfico de puntuación tridimensional que ilustra cómo se distribuyeron las citocinas en los CP.

Los algoritmos de los componentes principales se aplicaron a todos los pacientes y las puntuaciones calculadas se guardaron como nuevas variables CP1, CP2 y CP3 en el primer, tercer y sexto día de ingreso.



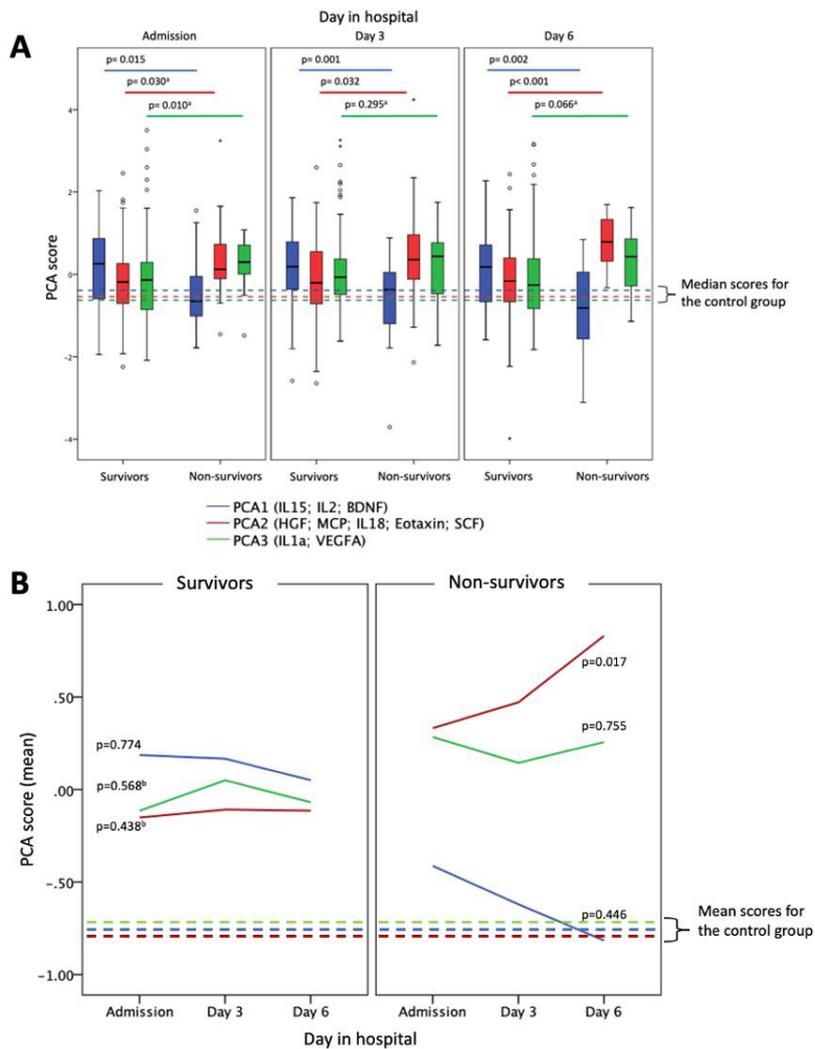
**Figura 1.** Gráfico de puntuación tridimensional. Resultados de los componentes principales (CP) analizados con rotación Varimax y normalización de Kaiser. Los tres componentes explicaron un total del 66.09% de toda la varianza.

#### PUNTUACIONES DE LOS COMPONENTES PRINCIPALES EN EL GRUPO DE PACIENTES COVID-19 VS EL GRUPO CONTROL

Además, se aplicaron los algoritmos de los componentes principales al grupo de control y se compararon las puntuaciones ACP (CP1, CP2 y CP3) entre los sujetos de COVID-19 y los controles sanos el día del ingreso. Las puntuaciones calculadas fueron mayores en los pacientes con COVID-19 que en los controles: CP1 ( $t(52,26) = 3,53$ ;  $p=0,001$ ); CP2 ( $U = 988,00$ ;  $p = 0,005$ ); CP3 ( $U = 1111,00$ ;  $p = 0,031$ ). Estos valores nos permiten confirmar que esas citocinas son diferentes entre los sujetos infectados y los sanos, enfatizando la importancia de estas citocinas en la infección por COVID-19.

#### PUNTUACIONES DE LOS COMPONENTES PRINCIPALES EN SUPERVIVIENTES VS FALLECIDOS

La figura 2 muestra las puntuaciones de CP1, CP2 y CP3 en el primer, tercer y sexto día de ingreso para los supervivientes y los no supervivientes. En la figura 2A se observan diferencias significativas entre ambos grupos. La mortalidad se asoció con puntuaciones más bajas de CP1 y más altas de CP2 y CP3. Esto indica que las puntuaciones más altas en CP1 son protectoras mientras que CP2 y CP3 representan factores de riesgo. En contraste con la CP3, que sólo está significativamente elevada en los no supervivientes en el primer día; las diferencias entre los supervivientes y los no supervivientes en las citocinas de la CP1 y la CP2 se intensificaron con el tiempo. En la Figura 2B, a pesar de que los supervivientes presentaron una elevación de citocinas debido a las infecciones por COVID-19, los niveles de CP1, CP2 y CP3 se mantuvieron estables a lo largo de los seis días evaluados. Sin embargo, lo que es notable en los no supervivientes es la fuerte tendencia de CP2 a aumentar significativamente a través del tiempo.



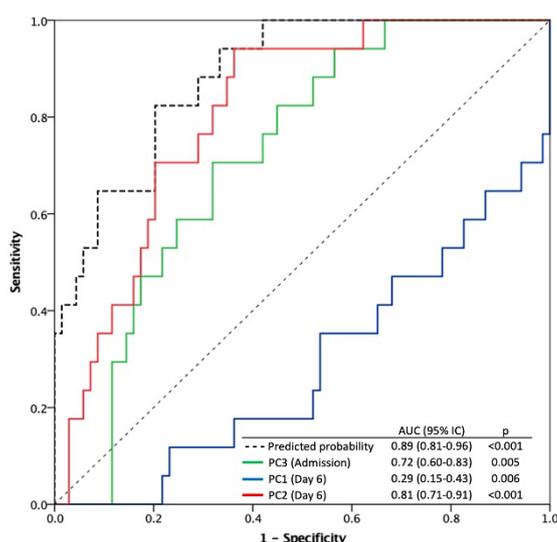
**Figura 2.** Puntuaciones de los CP para los pacientes con COVID (supervivientes y no supervivientes) y para los controles cuando se aplicaron los estimadores de los CP. **(A)** Gráficos de caja de las puntuaciones de los CP a través del tiempo: comparación de las puntuaciones de los CP entre los pacientes COVID ,supervivientes y no supervivientes, (mortalidad a 28 días); en el día 1, 3 y 6 de ingreso. T-student para las muestras independientes o prueba U de Mann-Whitney (a). **(B)** Tendencia temporal de las puntuaciones de los CP para los supervivientes y no supervivientes (RM-ANOVA o prueba de Friedman) (b)).

ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE LOS COMPONENTES PRINCIPALES ASOCIADO A LA MORTALIDAD A 28 DÍAS

El análisis de regresión logística (Tabla 2) mostró que, en el día de ingreso, sólo la combinación de citocinas definida por el CP3 era significativa [OR: 2,35, IC del 95%: 1,09-5,06,  $p=0,029$ ]. En el tercer día de ingreso, no hubo significación para ningún factor, ya que probablemente constituye un periodo de transición. Por el contrario, CP1 y CP2 fueron significativos en el sexto día de ingreso, donde las citocinas CP1 representaron un factor protector en relación con la mortalidad a los 28 días [OR: 0,273, IC 95%: 0,12-0,64,  $p=0,003$ ] mientras que CP2 se señaló como el principal factor de riesgo [OR: 5,24, IC 95%: 2,03-13,48,  $p=0,001$ ]. Las curvas ROC de los factores significativos y la probabilidad predicha para el modelo final de regresión logística se muestran en la Figura 3. El área bajo la curva (AUC= 0,89, IC 95%= 0,81-0,96,  $p <0,001$ ) muestra una buena capacidad de discriminación del modelo.

**Tabla 2.** Análisis de la regresión logística para todos los tiempos de muestreo de los componentes principales.

	B	Error estándar	Wald	P-valor	Odds ratio	Intervalo de confianza 95%	
						Límite inferior	Límite superior
<b>CP3 día 0</b>	-2.735	.600	20.789	0.029	2.35	1.09	5.06
<b>CP1 día 6</b>	.855	.391	4.790	0.003	0.273	0.12	0.64
<b>CP2 día 6</b>	-1.298	.436	8.853	0.001	5.24	2.03	13.48



**Figura 3.** Curvas ROC de la probabilidad predicha a través del modelo de regresión logística y los predictores de mortalidad a 28 días (CP3 en el día del ingreso, CP1 y CP2 en el día 6 de ingreso).

## DISCUSIÓN

La comparación de perfiles de citocinas ha sido llevada a cabo en una gran cantidad de estudios sobre el COVID-19 moderado y grave. (13–15) . No obstante, son pocos los estudios que han comparado las diferencias entre los grupos de fallecidos y supervivientes (16,18). Este es el primer estudio que analiza la evolución en el tiempo de los niveles de distintas citocinas en pacientes hospitalizados, y como se relacionan con la mortalidad a 28 días. La enfermedad grave por COVID-19 se caracteriza por producir un daño pulmonar agudo que puede conducir a un síndrome de distress respiratorio agudo con una gran letalidad, y a una tormenta de citocinas. (17). Otros estudios anteriores han relacionado los niveles en sangre de diversas citocinas, entre ellas IL-2, IL-7, IL-10, GSCF, IP-10, MCP-1, MIP-1a y TNF- $\alpha$ , con la gravedad de la enfermedad. Sobre todo, se han hecho estudios con IL-6, e IL-10, desembocando en la indicación de Tocilizumab en el caso de elevaciones patológicas de IL-6, bajo ciertas condiciones. (10,19). Sin embargo, nuestro estudio ha relacionado tres perfiles de citocinas diferentes con la mortalidad en pacientes COVID-19. Por una parte, los niveles de IL-2, IL-15 y BDNF (CP1) presentan una reducción significativa en el grupo de los fallecidos, lo que hace pensar que pueden actuar como un factor protector. En contraposición, las citocinas del CP2 (HGF, SCF, IL-18, MCP-1 y eotaxina) junto con las del CP3 (IL-1 $\alpha$  y VEGFA) presentan niveles elevados en el grupo de los fallecidos de manera significativa, lo que hace pensar en ellas como factores de riesgo en la mortalidad a 28 días. Es interesante observar, como, mientras que CP1 y CP2 bajan y aumentan respectivamente sus niveles de manera significativa en los tres periodos estudiados, CP3 únicamente mostró un aumento en el grupo de los fallecidos en el primer día post-ingreso. Además, no existe una tendencia firme en el CP1 ni en el CP3, no obstante, el CP2 muestra una tendencia ascendente a lo largo del tiempo.

CP3, que incluye a IL-1 $\alpha$  y VEGFA solo está aumentado el día del ingreso. La importancia de incluir este día 0 radica en la respuesta inmune inicial a la infección por COVID-19 grave. Diversos estudios han revelado niveles elevados de IL-1 $\alpha$ , citocina implicada en las fases iniciales de la respuesta inmune innata (20). IL-1 $\alpha$  ha sido incluido de manera reciente como marcador temprano de mal pronóstico en pacientes con COVID-19 grave(22). Esto puede explicarse por el hecho de que el precursor de IL-1 $\alpha$ , a diferencia de IL-1 $\beta$  o IL-1ra, no necesita ser activado, y es capaz de desencadenar una potente respuesta inflamatoria cuando es liberada por las células dañadas (20). Sus principales funciones biológicas consisten en la activación de los linfocitos T y la proliferación de células B a través de la síntesis de inmunoglobulinas (21). Por otra parte, VEGFA juega un papel clave en el desarrollo del pulmón mediante la organización de la

red vascular pulmonar (23). VEGFA se puede secretar durante la hipoxia, en situaciones de inflamación en las que existe daño endotelial. Su efecto es mediado por VEGFR-1 and VEGFR-2, que contribuyen en la hematopoyesis y quimiotaxis de los monocitos, así como en el aumento de la permeabilidad, respectivamente. El componente CP3 se puede interpretar como una expresión inicial de la existencia de daño celular grave en el pulmón como consecuencia de la infiltración de macrófagos producida por la infección por COVID-19 (10), lo cual iniciaría la subsecuente patogénesis fatal y una exacerbación de la respuesta inmune observada en distintas fases de la infección. Como argumentos a favor de esto, nuestros resultados apoyan aquellos estudios previos que han demostrado la mejoría en la enfermedad mediante el uso de anti IL-1, como anakinra, que actúa bloqueando la tormenta de citocinas (24,25).

Nuestros resultados muestran que a pesar del aumento de los niveles de citocinas en ambos grupos de estudio, en el grupo de los supervivientes los niveles se mantienen estables durante el tiempo. Sin embargo, existe una tendencia ascendente en el CP2 en el grupo de los fallecidos, que podría destacar su importancia como marcador de mortalidad, ya que está especialmente elevado en el día 6 post-ingreso. Las citocinas de este CP2 son HGF, SCF, IL-18, MCP-1 y eotaxina. La importancia de CP2 radica en que, en conjunto, representa la intensidad e irreversibilidad del daño pulmonar como consecuencia de la infección y de la respuesta inmune desmedida. En primer lugar, IL-18, citocina de la familia de IL-1, es secretada tras la activación de los macrófagos en infecciones víricas, y cursa con daño endotelial en el tejido pulmonar (26). SCF, HGF y eotaxina son reguladas al alza por procesos inflamatorios y secretadas por los mastocitos tras la estimulación de citocinas, incluida IL-18. Todas ellas se han relacionado con el daño pulmonar grave. La eotaxina y SCF juegan un papel clave en la infiltración de mastocitos y eosinófilos y SCF, además, favorece la expresión y secreción de MCP-1 en los mastocitos pulmonares (27). Además, HGF, puede favorecer el desarrollo de varios linajes celulares, incluyendo trombocitos, para contribuir a la reparación de tejidos y para modular la respuesta inmune adaptativa para controlar la inflamación (28,29). Merece la pena destacar que niveles elevados tanto de HGF como de eotaxina fueron hallados en pacientes con gripe A (H1N1) y otras infecciones víricas, así como en pacientes con lesiones inflamatorias pulmonares (30,31). Para concluir, tenemos MCP-1, que se ha descrito con anterioridad como factor predictor de gravedad en la infección por COVID-19 como consecuencia de su actividad en el reclutamiento de monocitos hacia la pared arterial (27). Más de un 70% de las muertes por COVID-19 se han relacionado con desregulación de los sistemas que controlan la coagulación sanguínea, como parte de la respuesta inmune innata para limitar la diseminación del patógeno en un proceso conocido como inmunotrombosis (3). Además el ambiente

hipóxico subsecuente a la afectación pulmonar activa factores procoagulantes que pueden promover la trombosis (8). En nuestro estudio, tanto MCP-1 como el dímero-D se encuentran elevados en el grupo de los fallecidos, indicando que han tenido lugar fenómenos trombóticos. En conjunto, CP2 tiene potencial como marcador de mal pronóstico como consecuencia de la inflamación extrema y el daño pulmonar.

Según nuestro modelo de regresión logística, el factor que más contribuye a la supervivencia en este caso, son los niveles elevados en plasma de IL-2, IL-15 y BDNF en el grupo de supervivientes respecto al grupo de los fallecidos. El aumento de los niveles en plasma de alguna de estas tres citocinas aumentaría este factor protector. BDNF presenta un papel central en la neuroplasticidad, afectada de manera considerable en estados inflamatorios. Las citocinas proinflamatorias más comunes son IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  y IFN- $\gamma$ , y producen una disminución de la expresión génica de BDNF. (32). De hecho, niveles séricos disminuidos de BDNF se han relacionado con COVID-19 grave en un estudio reciente, en el que dichos niveles se iban reestableciendo según avanzaba la recuperación del paciente. Esto se ha relacionado con la linfopenia observada en pacientes críticos afectados por COVID-19, ya que, los linfocitos contribuyen en la secreción periférica de BDNF (33). IL-2 e IL-15 presentan varias funciones parecidas. Ambas citocinas se encargan de estimular la proliferación de células T, inducen la formación de linfocitos T citotóxicos, favorecen la proliferación de células B, así como la secreción de inmunoglobulinas e inducen la generación y persistencia de células natural killer (9). Por un lado, la IL-15 desempeña un papel fundamental en la eliminación de virus mediante respuestas de células T duraderas y de gran avidez frente a los patógenos invasores, asegurando la supervivencia de las células de memoria. En realidad, la gripe y otras infecciones respiratorias inducen una expresión local y periférica de IL-15, que es crítica para las respuestas antivirales de las diversas poblaciones linfocitarias. Los niveles bajos de IL-15 circulante se han asociado con una mayor viremia y un peor pronóstico de la enfermedad (34). Por otro lado, IL-2 está implicada en el mantenimiento de las células T reguladoras periféricas y la eliminación de las autorreactivas (9). La disminución progresiva de los niveles en plasma de BDNF, IL-15 e IL-2 debería constituir un factor de alerta del empeoramiento del estado de los pacientes graves con neumonía por COVID-19. En este sentido, se ha propuesto la administración de suplementos de IL-2 e IL-15 para mejorar el trastorno inmunitario y reducir la mortalidad (9,35).

El análisis de la curva ROC y el IC del 95% de los odds ratio muestran la solidez de las predicciones de mortalidad por componente. En conjunto, basándonos en 10 citocinas medidas al ingreso y al sexto día de hospitalización, obtuvimos una predicción de mortalidad altamente precisa del 89,0% ( $p < 0.001$ ).

## LIMITACIONES

Este estudio tiene algunas limitaciones que hay que abordar. Se ha realizado en un solo centro, por lo que sería necesario evaluar estos resultados en estudios multicéntricos que permitan validar el papel de los diferentes perfiles de citocinas identificados en el pronóstico de los pacientes con COVID-19.

## CONCLUSIONES

En resumen, nuestros hallazgos revelan la evolución de las citocinas en relación con la mortalidad causada por la enfermedad COVID-19. Proponemos el uso de CP3 asociado a los datos clínicos como marcador de daño pulmonar grave, y la evolución de los valores de CP1 y CP2 para predecir el pronóstico y así personalizar el tratamiento. Además, la inmunoterapia dirigida a la desregulación de las respuestas inmunitarias podría ser el mejor enfoque en los pacientes graves, ya que la terapia antiviral no podría ser útil en ese momento.

## BIBLIOGRAFÍA

1. COVID-19 SoNG v6.6\_CDNA endorsed.pdf [Internet]. [citado 12 de marzo de 2022]. Disponible en: [https://www1.health.gov.au/internet/main/publishing.nsf/Content/7A8654A8CB144F5FCA2584F8001F91E2/\\$File/COVID-19%20SoNG%20v6.6\\_CDNA%20endorsed.pdf](https://www1.health.gov.au/internet/main/publishing.nsf/Content/7A8654A8CB144F5FCA2584F8001F91E2/$File/COVID-19%20SoNG%20v6.6_CDNA%20endorsed.pdf)
2. Mouffak S, Shubbar Q, Saleh E, El-Awady R. Recent advances in management of COVID-19: A review. *Biomed Pharmacother.* noviembre de 2021;143:112107.
3. Lazzaroni MG, Piantoni S, Masneri S, Garrafa E, Martini G, Tincani A, et al. Coagulation dysfunction in COVID-19: The interplay between inflammation, viral infection and the coagulation system. *Blood Rev.* marzo de 2021;46:100745.

4. Ramasamy S, Subbian S. Critical Determinants of Cytokine Storm and Type I Interferon Response in COVID-19 Pathogenesis. *Clin Microbiol Rev.* 12 de mayo de 2021;34(3):e00299-20.
5. Kaur S, Bansal R, Kollimuttathuillam S, Gowda AM, Singh B, Mehta D, et al. The looming storm: Blood and cytokines in COVID-19. *Blood reviews.* 2021;46:100743.
6. Napoli C, Benincasa G, Criscuolo C, Faenza M, Liberato C, Rusciano M. Immune reactivity during COVID-19: Implications for treatment. *Immunol Lett.* marzo de 2021;231:28-34.
7. Taleghani N, Taghipour F. Diagnosis of COVID-19 for controlling the pandemic: A review of the state-of-the-art. *Biosens Bioelectron.* 15 de febrero de 2021;174:112830.
8. Asakura H, Ogawa H. COVID-19-associated coagulopathy and disseminated intravascular coagulation. *Int J Hematol.* 7 de noviembre de 2020;1-13.
9. T-cell immunobiology and cytokine storm of COVID-19 - PMC [Internet]. [citado 5 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7645942/>
10. Kaur S, Bansal R, Kollimuttathuillam S, Gowda AM, Singh B, Mehta D, et al. The looming storm: Blood and cytokines in COVID-19. *Blood Rev.* marzo de 2021;46:100743.
11. Lazzaroni MG, Piantoni S, Masneri S, Garrafa E, Martini G, Tincani A, et al. Coagulation dysfunction in COVID-19: The interplay between inflammation, viral infection and the coagulation system. *Blood Rev.* marzo de 2021;46:100745.
12. Yongzhi X. COVID-19-associated cytokine storm syndrome and diagnostic principles: an old and new Issue. *Emerg Microbes Infect.* 10(1):266-76.
13. Chen T, Wu D, Chen H, Yan W, Yang D, Chen G, et al. Clinical characteristics of 113 deceased patients with coronavirus disease 2019: retrospective study. *BMJ.* 26 de marzo de 2020;368:m1091.
14. Wang W, Liu X, Wu S, Chen S, Li Y, Nong L, et al. Definition and Risks of Cytokine Release Syndrome in 11 Critically Ill COVID-19 Patients With Pneumonia: Analysis of Disease Characteristics. *J Infect Dis.* 30 de junio de 2020;jiaa387.

15. Tamayo-Velasco Á, Martínez-Paz P, Peñarrubia-Ponce MJ, de la Fuente I, Pérez-González S, Fernández I, et al. HGF, IL-1 $\alpha$ , and IL-27 Are Robust Biomarkers in Early Severity Stratification of COVID-19 Patients. *Journal of Clinical Medicine*. enero de 2021;10(9):2017.
16. Distinct cytokine profiles associated with COVID-19 severity and mortality - PMC [Internet]. [citado 5 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8061091/>
17. Cytokine profiles in the detection of severe lung involvement in hospitalized patients with COVID-19: The IL-8/IL-32 axis - PMC [Internet]. [citado 5 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8765080/>
18. Pons MJ, Ymaña B, Mayanga-Herrera A, Sáenz Y, Alvarez-Erviti L, Tapia-Rojas S, et al. Cytokine Profiles Associated With Worse Prognosis in a Hospitalized Peruvian COVID-19 Cohort. *Front Immunol*. 1 de septiembre de 2021;12:700921.
19. Toniati P, Piva S, Cattalini M, Garrafa E, Regola F, Castelli F, et al. Tocilizumab for the treatment of severe COVID-19 pneumonia with hyperinflammatory syndrome and acute respiratory failure: A single center study of 100 patients in Brescia, Italy. *Autoimmun Rev*. julio de 2020;19(7):102568.
20. Dinarello CA, Simon A, van der Meer JWM. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat Rev Drug Discov*. agosto de 2012;11(8):633-52.
21. Berda-Haddad Y, Robert S, Salers P, Zekraoui L, Farnarier C, Dinarello CA, et al. Sterile inflammation of endothelial cell-derived apoptotic bodies is mediated by interleukin-1 $\alpha$ . *Proc Natl Acad Sci U S A*. 20 de diciembre de 2011;108(51):20684-9.
22. Lucas C, Wong P, Klein J, Castro TBR, Silva J, Sundaram M, et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature*. agosto de 2020;584(7821):463-9.
23. Ma Z, Yang KY, Huang Y, Lui KO. Endothelial contribution to COVID-19: an update on mechanisms and therapeutic implications. *J Mol Cell Cardiol*. marzo de 2022;164:69-82.

24. Early treatment of COVID-19 with anakinra guided by soluble urokinase plasminogen receptor plasma levels: a double-blind, randomized controlled phase 3 trial - PMC [Internet]. [citado 5 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8516650/>
25. Kyriakoulis KG, Kollias A, Poulakou G, Kyriakoulis IG, Trontzas IP, Charpidou A, et al. The Effect of Anakinra in Hospitalized Patients with COVID-19: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Med*. 28 de septiembre de 2021;10(19):4462.
26. Vora SM, Lieberman J, Wu H. Inflammasome activation at the crux of severe COVID-19. *Nat Rev Immunol*. 2021;21(11):694-703.
27. Singh S, Anshita D, Ravichandiran V. MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease. *Int Immunopharmacol*. diciembre de 2021;101:107598.
28. Zhao Y, Ye W, Wang YD, Chen WD. HGF/c-Met: A Key Promoter in Liver Regeneration. *Front Pharmacol*. 17 de marzo de 2022;13:808855.
29. Ilangumaran S, Villalobos-Hernandez A, Bobbala D, Ramanathan S. The hepatocyte growth factor (HGF)–MET receptor tyrosine kinase signaling pathway: Diverse roles in modulating immune cell functions. *Cytokine*. 1 de junio de 2016;82:125-39.
30. Bradford E, Jacobson S, Varasteh J, Comellas AP, Woodruff P, O'Neal W, et al. The value of blood cytokines and chemokines in assessing COPD. *Respir Res*. 2017;18:180.
31. Biomarkers Predictive of Exacerbations in the SPIROMICS and COPD Gene Cohorts - PMC [Internet]. [citado 5 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5378424/>
32. Anka AU, Tahir MI, Abubakar SD, Alsabbagh M, Zian Z, Hamedifar H, et al. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): An overview of the immunopathology, serological diagnosis and management. *Scand J Immunol*. 3 de diciembre de 2020;e12998.
33. Azoulay D, Shehadeh M, Chepa S, Shaoul E, Baroum M, Horowitz NA, et al. Recovery from SARS-CoV-2 infection is associated with serum BDNF restoration. *J Infect*. septiembre de 2020;81(3):e79-81.

34. Verbist KC, Klonowski KD. Functions of IL-15 in anti-viral immunity: Multiplicity and variety. *Cytokine*. 1 de septiembre de 2012;59(3):467-78.
35. Kandikattu HK, Venkateshaiah SU, Kumar S, Mishra A. IL-15 immunotherapy is a viable strategy for COVID-19. *Cytokine Growth Factor Rev*. agosto de 2020;54:24-31.

## ANEXOS

### ANEXO 1.

Comparativa de los valores de citocinas en el día 1 post- ingreso. Valores expresados en mediana y rango intercuartil (Me, RIC).

Citocinas	Supervivientes (n=88)	Fallecidos (n=20)	p valor
BDNF	63 (179,78)	56,33 (77,63)	0,462
EGF	2,25 (7,55)	2,16 (10,52)	0,918
EOTAXINA	14,28 (9,97)	13,65 (9,98)	0,629
FGF2	1,03 (2,63)	0,69 (1,86)	0,522
GMCSF	12,86 (31,34)	9,53 (7,56)	0,110
GROa	3,25 (4,24)	2,48 (4,19)	0,393
HGF	160,25 (208,48)	269,75 (636,25)	<b>0,020</b>
IFNa	0,51 (1,65)	0,44 (1,83)	0,931
IFNg	8,99 (6,67)	7,63 (11,83)	0,893
IL1a	1,83 (7,44)	7,52 (11,12)	<b>0,040</b>
IL1b	7,01 (10,62)	5,70 (5,85)	0,103
IL10	1,79 (2,56)	1,4 (2,54)	0,253
IL12p70	3,71 (3,21)	3,10 (2,43)	0,443
IL13	2,33 (3,10)	1,59 (1,55)	0,296
IL15	13,83 (19,10)	7,12 (17,09)	<b>0,033</b>
IL17a	7,36 (15,68)	3,87 (10,09)	0,054
IL18	45,58 (50,74)	58,98 (57,68)	0,319
IL1RA	604,75 (992,85)	627,42 (1358,75)	0,906
IL2	15,3 (21,01)	8,02 (10,86)	<b>0,037</b>
IL21	4,18 (13,04)	1,69 (6,18)	0,091
IL22	3,65 (20,56)	4,66 (46,68)	0,788
IL23	7,89 (9,84)	6,20 (6,64)	0,279
IL27	20,62 (38,20)	11,79 (20,92)	0,38
IL31	5,51 (8,45)	4,25 (6,30)	0,347
IL4	5,84 (7,43)	5,07 (4,85)	0,504
IL5	7,39 (20,88)	3,55 (6,10)	0,179
IL6	13,07 (21,79)	11,64 (30,23)	0,382
IL7	1,81 (3,03)	1,13 (2,64)	0,522
IL8	2,14 (3,57)	1,45 (4,66)	0,566
IL9	2,29 (3,97)	1,59 (2,23)	0,187
IP1b	49,78 (46,85)	43,675 (34,18)	0,506
IP10	45,4 (42,51)	48,78 (53,21)	0,710
LIF	16,15 (16,84)	11,26 (12,89)	0,329
MCP1	37,88 (30,85)	41,75 (71,28)	0,226
MIP1a	3,39 (11,96)	3,35 (11,01)	0,443
NGFb	4,37 (3,47)	3,61 (2,73)	0,275
PDGFBB	334,92 (718,30)	265 (564)	0,74
PIGF1	5,45 (49,81)	25,35 (162,61)	0,467
RANTES	22,15 (17,66)	23,43 (21,09)	0,731
SCF	6,46 (6,80)	9,06 (9,55)	0,319
SDF1a	669,5 (603)	649,25 (927,63)	0,943
TNFa	6,13 (11,42)	6,14 (7,58)	0,424
TNFb	3,41 (4,92)	2,48 (2,93)	0,176
VEGFA	113,25 (164,49)	262,25 (277,38)	<b>0,005</b>
VEGFD	12,75 (12,86)	6,72 (18,10)	0,192

## ANEXO 2.

Comparativa de los valores de citocinas en el día 3 post-ingreso. Valores expresados en mediana y rango intercuartil (Me, RIC).

Citocinas	Supervivientes (n=88)	Fallecidos (n=20)	p valor
BDNF	63,4 (201,05)	36,46 (54,84)	<b>0,029</b>
EGF	1,88 (4,25)	1,41 (2,24)	0,326
EOTAXINA	14,2 (10,08)	9,78 (12,60)	<b>0,046</b>
FGF2	0,92 (2,22)	0,67 (1,29)	0,237
GMCSF	12,96 (28,17)	11,95 (16,28)	0,612
GROa	2,39 (2,25)	2,78 (6,15)	0,462
HGF	212 (286,50)	573,75 (616,50)	<b>0,001</b>
IFNa	0,29 (0,50)	0,20 (0,38)	0,322
IFNg	9,04 (5,82)	9,33 (12,46)	0,487
IL1a	2,27 (6,78)	2,96 (6,22)	0,804
IL1b	7,28 (9,10)	5,24 (5,50)	0,079
IL10	1,41 (1,33)	1,37 (2,57)	0,930
IL12p70	3,76 (2,98)	3,08 (1,82)	0,150
IL13	2,41 (3,29)	2,04 (2,11)	0,761
IL15	15,55 (13,63)	8,85 (11,65)	<b>0,011</b>
IL17a	7,61 (12,13)	5,15 (6,75)	0,063
IL18	41,80 (56,30)	66,35 (106,95)	<b>0,030</b>
IL1RA	496 (951,50)	552,25 (1501,86)	0,707
IL2	15,70 (17,66)	12,15 (13,20)	0,086
IL21	3,66 (11,66)	2,06 (5,73)	0,174
IL22	3,77 (14,17)	1,62 (20,56)	0,592
IL23	7,26 (8,16)	7,28 (8,06)	0,655
IL27	20,48 (48,56)	16,40 (24,48)	0,338
IL31	5,08 (7,00)	4,57 (5,13)	0,587
IL4	5,55 (5,84)	4,65 (4,00)	0,288
IL5	5,07 (21,07)	4,20 (9,90)	0,523
IL6	9,16 (18,39)	6,66 (33,77)	0,879
IL7	1,80 (2,36)	1,74 (1,90)	0,952
IL8	2,07 (5,59)	1,20 (1,85)	0,119
IL9	2,10 (3,12)	1,80 (2,30)	0,322
IP1b	50,40 (47,70)	44,08 (46,63)	0,448
IP10	24,75 (32,05)	29,50 (53,14)	0,265
LIF	13,35 (13,62)	9,92 (17,33)	0,592
MCP1	31,90 (33,55)	34,78 (37,54)	0,149
MIP1a	3,21 (9,08)	2,52 (10,44)	0,615
NGFb	4,22 (3,40)	3,88 (3,03)	0,930
PDGFBB	409,75 (1153)	562,00 (752,85)	0,777
PIGF1	4,76 (61,51)	21,51 (77,97)	0,968
RANTES	27,15 (23,60)	25,98 (34,07)	0,180
SCF	7,16 (5,44)	11,24 (22,20)	0,360
SDF1a	724,50 (651,00)	579,25 (960,00)	0,584
TNFa	7,07 (8,97)	5,73 (11,38)	0,549
TNFb	3,34 (3,96)	2,76 (3,00)	0,314
VEGFA	101,30 (160,85)	173,37 (375,50)	0,072
VEGFD	11,30 (11,18)	7,27 (9,22)	0,065

### ANEXO 3.

Comparativa de los valores de citocinas en el día 6 post-ingreso. Valores expresados en mediana y rango intercuartil (Me, RIC).

Citocinas	Supervivientes (n=88)	Fallecidos (n=20)	p valor
BDNF	49,75 (122,38)	33,45 (65,08)	0,094
EGF	1,77 (5,04)	1,49 (2,41)	0,661
EOTAXINA	14,10 (10,48)	16,90 (11,53)	0,645
FGF2	0,78 (1,15)	0,58 (0,92)	0,451
GMCSF	11,94 (33,29)	8,18 (22,89)	0,157
GROa	2,21 (1,82)	1,80 (1,54)	0,491
HGF	265,00 (359,75)	1022,00 (1398,75)	<b>&lt;0,001</b>
IFNa	0,24 (0,31)	0,22 (0,37)	0,833
IFNg	8,87 (5,78)	7,73 (10,49)	0,782
IL1a	1,72 (6,35)	2,76 (14,11)	0,377
IL1b	6,50 (7,41)	4,51 (9,25)	0,090
IL10	1,42 (1,17)	1,28 (2,11)	0,961
IL12p70	3,53 (2,28)	2,97 (1,18)	0,157
IL13	2,08 (2,80)	1,65 (1,99)	0,199
IL15	14,80 (16,42)	8,51 (14,84)	<b>0,035</b>
IL17a	6,59 (11,07)	4,65 (8,42)	0,117
IL18	38,25 (48,90)	74,10 (60,48)	<b>0,010</b>
IL1RA	473,00 (1072,49)	316,00 (1223,35)	0,786
IL2	14,75 (21,77)	8,32 (11,31)	0,064
IL21	3,20 (7,69)	1,93 (5,60)	0,547
IL22	3,23 (11,63)	1,59 (15,97)	0,961
IL23	7,04 (6,31)	5,59 (4,55)	0,321
IL27	16,31 (45,45)	11,54 (24,65)	0,316
IL31	4,88 (4,53)	3,79 (3,56)	0,326
IL4	5,37 (4,94)	4,22 (2,15)	0,151
IL5	3,64 (8,45)	3,05 (4,47)	0,458
IL6	9,01 (19,18)	12,85 (28,88)	0,909
IL7	1,64 (2,52)	1,14 (2,31)	0,180
IL8	2,12 (9,86)	2,30 (11,46)	0,692
IL9	1,99 (2,12)	1,61 (1,68)	0,471
IP1b	39,85 (46,63)	39,75 (49,93)	0,645
IP10	17,30 (14,05)	16,80 (21,58)	0,745
LIF	10,47 (14,10)	10,39 (22,01)	0,676
MCP1	24,60 (34,38)	49,50 (29,13)	<b>0,027</b>
MIP1a	2,72 (8,22)	2,26 (8,26)	0,522
NGFb	3,85 (2,38)	3,65 (1,28)	0,505
PDGFBB	401,50 (1043,50)	453,50 (881,45)	0,633
PIGF1	7,50 (64,49)	59,05 (102,22)	0,395
RANTES	30,15 (19,30)	27,85 (17,73)	0,892
SCF	6,16 (7,33)	16,15 (21,03)	<b>0,017</b>
SDF1a	571,00 (544,00)	917,50 (1309,50)	0,125
TNFa	6,19 (9,90)	6,78 (8,96)	0,733
TNFb	3,02 (2,81)	2,52 (2,20)	0,445
VEGFA	82,15 (146,28)	250,00 (293,10)	<b>0,017</b>
VEGFD	12,47 (9,88)	9,59 (5,30)	0,17

ANEXO 4.

Kaiser-Meyer-Olkin y prueba de Bartlett.

<b>Medida de adecuación del muestreo de Kaiser-Meyer-Olkin</b>		<b>0.697</b>
<b>Prueba de esfericidad de Bartlett</b>	Approx. Chi-cuadrado	1.066.383
	df	45
	Significación	<0,001

# MODELO DE PREDICCIÓN DE COVID-19 GRAVE BASADO EN EL USO DE CITOCINAS



Universidad de Valladolid

Facultad de Medicina

Autor: Rodrigo Alegre Ballesteros Tutores: Eduardo Tamayo G. Marta Martín F.

## INTRODUCCIÓN

LA INFECCIÓN POR COVID-19 SE HA RELACIONADO CON EL FENÓMENO “TORMENTA DE CITOCINAS” (1); ESTA SITUACIÓN FAVORECE UNA LIBERACIÓN INCONTROLADA DE CITOCINAS QUE PRODUCE UN DAÑO PULMONAR GRAVE (2).

## OBJETIVO

Establecer los diferentes perfiles de citocinas en función de la mortalidad a 28 días y su evolución a lo largo del tiempo para evaluar su capacidad predictora de pronóstico en pacientes hospitalizados por COVID-19.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó la medición en plasma de los niveles de 45 citocinas en 28 controles en el primer día de ingreso, y de 108 pacientes infectados por COVID-19 en el primer, tercer y sexto día de ingreso. Se llevó a cabo un análisis de los componentes principales (CP) para establecer los distintos perfiles de citocinas y se relacionó con la mortalidad a 28 días y supervivencia en pacientes hospitalizados.

## RESULTADOS

En el primer día de ingreso, únicamente la combinación de citocinas definida por el CP3 se observó elevado en fallecidos. CP1 y CP2 por otra parte, se mantuvieron disminuidos y elevados respectivamente en fallecidos todos los días, especialmente en el sexto; donde las citocinas del CP1 actúan como factor protector respecto a la mortalidad a 28 días, mientras que CP2 se señaló como principal factor de riesgo (Tabla 1.).

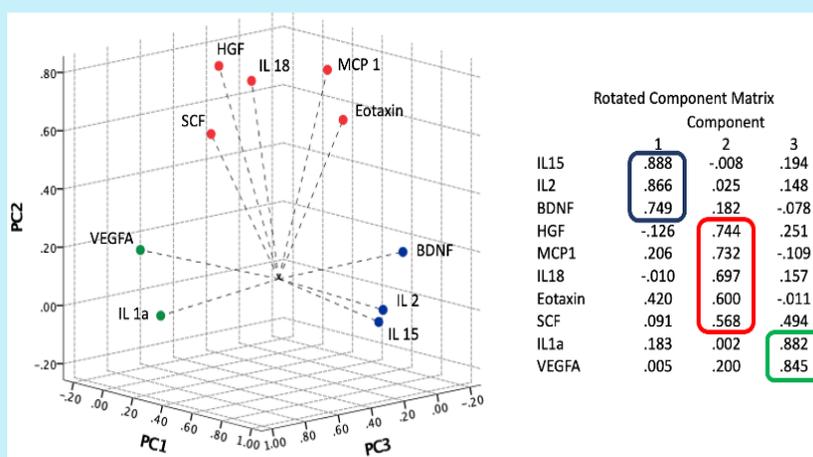


Figura 1. Resultados de los componentes principales (PC) mediante análisis por rotación Varimax y normalización de Kaiser.

Tabla 1. Análisis de la regresión logística para todos los tiempos de muestreo de los componentes principales entre grupos. Precisión del modelo del 89,00% (p<0,001).

	B	Err. Est.	Wald	P-valor	Odds ratio	IC 95%	
						Lím. Inf.	Lím. Sup.
CP3 día 0	-2.735	.600	20.789	0.029	2.35	1.09	5.06
CP1 día 6	.855	.391	4.790	0.003	0.273	0.12	0.64
CP2 día 6	-1.298	.436	8.853	0.001	5.24	2.03	13.48

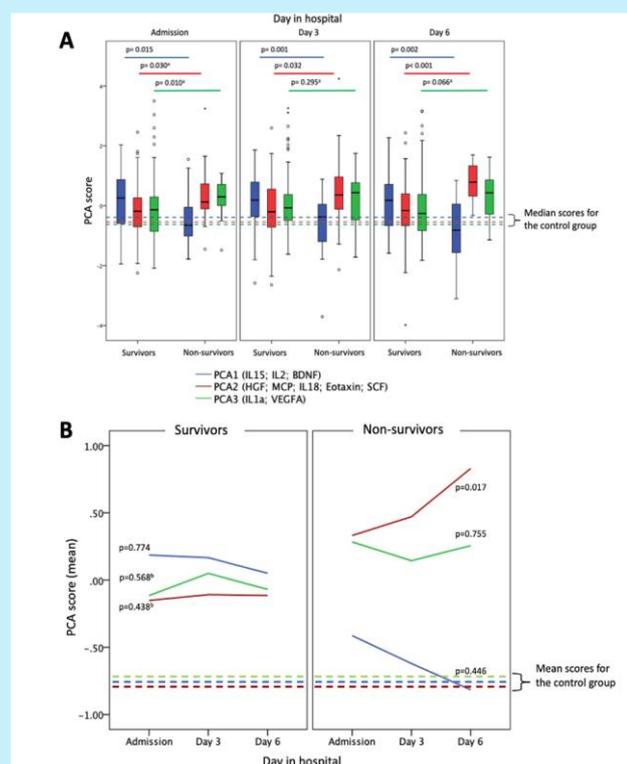


Figura 2. Resultados de los PC entre los grupos (fallecidos vs no fallecidos). Prueba U de Mann-Whitney y tendencia temporal de los grupos RM-ANOVA

## CONCLUSIONES

NUESTROS HALLAZGOS REVELAN LA EVOLUCIÓN DE LAS CITOCINAS EN RELACIÓN CON LA MORTALIDAD CAUSADA POR LA ENFERMEDAD COVID-19. PROPONEMOS EL USO DE CP3 ASOCIADO A LOS DATOS CLÍNICOS COMO MARCADOR DE DAÑO PULMONAR GRAVE, Y LA EVOLUCIÓN DE LOS VALORES DE CP1 Y CP2 PARA PREDECIR EL PRONÓSTICO Y ASÍ PERSONALIZAR EL TRATAMIENTO.

- Ramasamy S, Subbian S. Critical Determinants of Cytokine Storm and Type I Interferon Response in COVID-19 Pathogenesis. Clin Microbiol 2021
- Kaur S, Bansal R, Kollimuttathuillam S, Gowda AM, Singh B, Mehta D, et al. The looming storm: Blood and cytokines in COVID-19. Blood reviews