

TRABAJO DE FIN DE GRADO



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD DE VALLADOLID

GRADO EN MEDICINA

Estudio de la influencia de la variabilidad de los genes ACE2 e IL6 en la infección por COVID19

AUTORAS: Elisa Muñoz De Diego y Alba Saiz Miguel

TUTOR: José Pablo Miramontes González

Curso 2022-2023

ÍNDICE

RESUMEN.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
MATERIAL Y MÉTODOS.....	8
Comité de ética.....	8
Sujetos.....	8
Variables.....	8
Muestras.....	9
Discriminación alélica mediante sondas Taman.....	9
Análisis estadístico.....	10
RESULTADOS.....	10
DISCUSIÓN.....	13
CONCLUSIONES.....	17
BIBLIOGRAFÍA.....	18

RESUMEN

Introducción:

El covid19 es una enfermedad infecciosa provocada por el virus SARS-CoV-2. Este virus perteneciente a la familia de los coronavirus fue identificado por primera vez en China, en la ciudad de Wuhan, en 2019 y desde entonces su expansión ha sido mundial. Desde los inicios de la pandemia se ha planteado la necesidad de conocer la fisiopatología que subyace a esta enfermedad para poder diseñar estrategias terapéuticas. Es el caso de conocer la importancia de ACE2 como receptor de entrada celular y la de IL6 como potente citocina que participa en la respuesta inflamatoria es imprescindible

El objetivo de este trabajo es investigar si la existencia de marcadores clínicos, analíticos o dentro de la variabilidad genética en ciertos polimorfismos de los genes de ACE2 e IL6 puede influir en la susceptibilidad de muerte por covid19 en pacientes ingresados en un servicio de M. Interna.

Métodos:

Se ha realizado un estudio retrospectivo de asociación en 338 pacientes ingresados por infección de covid19 en el Hospital Universitario Río Hortera. Las variables han sido extraídas de la base de datos de la historia clínica del hospital. Todos los pacientes participantes han sido diagnosticados mediante PCR y clínica compatible. La discriminación alélica de los polimorfismos rs2074192 de ACE2 y rs1800795 de IL6 ha sido hecha mediante reacción en cadena de la polimerasa con sondas toman. El análisis estadístico se ha realizado mediante el programa SPSS.

Resultados:

En el análisis de las variables clínicas y analíticas podemos afirmar que existe una correlación lineal entre los valores de PCR (proteína C reactiva) y el riesgo de muerte por COVID19 ($p < 0.001$). De la misma manera, ocurre igual con los valores de creatinina y la asociación con el riesgo directo de fallecer ($p < 0.001$). Se observa también relación estadísticamente significativa entre padecer enfermedad neoplásica maligna y una mayor vulnerabilidad en los infectados por COVID19. Aunque no era el objetivo del trabajo, se analizó la respuesta a distintos tratamientos pautados durante el ingreso, demostrándose tendencia a la mejoría en aquellos pacientes tratados con corticoides y/o Tocilizumab. Por otro lado, el análisis de los polimorfismos propuestos no ha revelado que exista una relación significativa entre muerte por covid19 y los mismos.

Conclusiones:

Se ha encontrado una asociación estadística entre el marcador de inflamación proteína C reactiva y la posibilidad de muerte por SARS-CoV-2, de igual modo con las cifras de creatinina y el padecer cáncer al ingreso se ha asociado con la posibilidad de muerte.

Los polimorfismos rs2074192 del gen que codifica ACE2 y rs1800795 del gen que codifica la IL6 no han mostrado una asociación estadística con la muerte por SARS-CoV-2 en la muestra analizada.

Palabras clave: covid19, ACE2, IL6, rs2074192 y rs1800795

INTRODUCCIÓN

En diciembre del 2019 un nuevo coronavirus (SARS-CoV-2) fue identificado como el causante de una neumonía de características víricas originada en la ciudad de Wuhan, China. La OMS (organización Mundial de la Salud) el 11 de febrero de 2020 nombró a esta nueva enfermedad como COVID-19¹, además de acuerdo con los análisis filogenéticos y taxonómicos, el comité internacional de taxonomía de virus (ICTV) decidió que el nombre del causante de la enfermedad que se estaba extendiendo sería SARS-CoV-2 por las siglas del síndrome respiratorio agudo severo por coronavirus². Debido a la rápida propagación y el aumento significativo número de casos y fallecimientos, tanto en China como en otras partes del mundo, la infección viral pasó de ser un brote localizado a una emergencia sanitaria de preocupación internacional, y finalmente, fue declarada como una pandemia, el 11 de marzo de 2020. En España, en apenas unos meses se llegó a un total de 13.845.825 casos notificados, y 120.964 fallecidos pese a las medidas adoptadas para el control de los contagios.

Los coronavirus pertenecen a la familia Coronaviridae. Son cuatro los géneros reconocidos que corresponden a alfacoronavirus, betacoronavirus, gamma-coronavirus y deltacoronavirus⁴. En este caso, el SARS-CoV-2 forma parte del género de los betacoronavirus. La gran parte de los virus de esta familia que infectan al ser humano causan enfermedades respiratorias leves, sin embargo, algunos de ellos han causado enfermedades respiratorias graves y potencialmente mortales, como es el Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS-CoV) y al Síndrome Respiratorio Medio Oriente (MERS-CoV), que fueron descritos en los años 2002 y 2012 respectivamente⁵. En descripción de la morfología, en la genética del SARS-CoV-2, está compuesto por una única cadena de

RNA monocatenario de polaridad positiva (+ssRNA) y, estructuralmente, por una nucleocápside (cuya función principal es proteger el material genético) y por una cubierta o envoltura externa dispuesta por proteínas estructurales principales (S, M y E) y proteínas accesorias⁶.

En el proceso por el cual los virus causan enfermedades, se describe que los coronavirus ingresan en las células hospedadoras mediante una proteína estructural principal llamada Spike (Proteína S) que se une al receptor conversor de angiotensina 2 (ACE2) presente en elevado número de tejidos. Por lo tanto, para llevar a cabo su mecanismo patogénico y por ende para la penetración de los coronavirus en las células es fundamental la proteína estructural principal Spike (Proteína S), que es además la que confiere la apariencia de corona solar característica a esta familia de virus y el receptor ACE2 que permite el proceso de endocitosis.

La proteína S es una proteína de gran tamaño que varía entre 1200 y 1400 aminoácidos, dependiendo del tipo específico de coronavirus. Es un trímero, que quiere decir que está formada por tres cadenas que comparten la misma secuencia de aminoácidos. Tiene dos subunidades funcionales, conocidas como S1 y S2; en S1 se encuentra el dominio de unión al receptor a través del cual el virus es capaz de unirse a las células del huésped (RBD), y la subunidad S2 contiene el péptido de fusión, necesario para lograr la unión de las membranas y poder efectuar así la entrada del virus en la célula. Para que pueda ocurrir la fusión, se requiere que la proteína spike o proteína S sea escindida a través de proteasas presentes en las células a las que va a infectar y el posterior cambio de conformación.

Como hemos comentado en el caso del virus SARS-CoV, se ha identificado que la enzima convertidora de la angiotensina 2 (ACE2) actúa como el receptor necesario para la entrada viral. La interacción entre el RBD y ACE2 es esencial para el proceso de infección viral. Los virus logran ingresar a estas células mediante un proceso conocido como endocitosis, que es facilitado por la interacción de los receptores virales con los receptores celulares. El coronavirus emplea la proteína S para establecer una unión con los receptores específicos presentes en las células huésped, como ACE2, y así conseguir su ingreso mediante la fusión de membranas (Figura 1). Una vez que se ha llevado a cabo el acoplamiento de la proteína S al receptor ACE2, ésta es procesada proteolíticamente por una serina proteasa transmembrana de tipo II (TMPRSS2)^{6,4}. La enzima TMPRSS2 realiza

una escisión en dos sitios distintos del dominio S2, lo que resulta en la separación del dominio RBD, la activación de la proteína Spike y, finalmente, la fusión de ambas membranas⁶. De este modo, la partícula viral logra penetrar en la célula huésped y se lleva a cabo la liberación de su material genético en el citoplasma de la célula infectada^{7,8,6}. Este hecho es de gran importancia desde una perspectiva fisiopatológica, ya que se ha planteado que las células que presentan tanto ACE2 como TMPRSS2 de manera simultánea son más susceptibles a la entrada de SARS-CoV-2⁴.

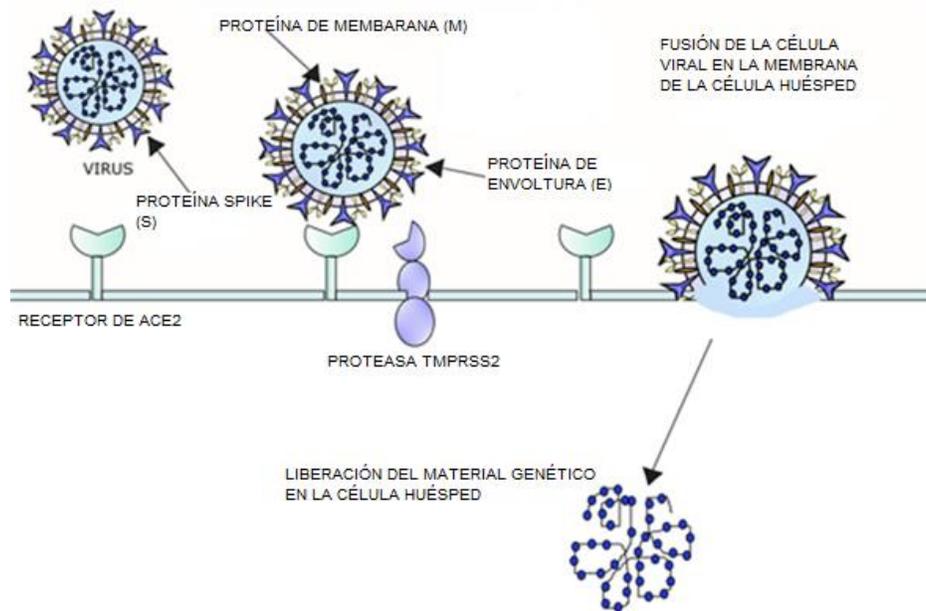


Figura 1: Interacción del receptor del huésped con la proteína spike del SARS-CoV-2 y posterior fusión de la célula viral con la membrana de la célula huésped. Tomada y modificada de Salían et Al.

La eficiencia con la que el virus ingresa a la célula huésped está determinada por el grado de afinidad entre el dominio de unión del receptor de la proteína S y el receptor ACE2⁹. Se ha comprobado que el dominio RBD del SARS-CoV-2 muestra una fuerte unión al receptor ACE2, lo que está relacionado con su capacidad de propagarse eficientemente entre los humanos¹⁰. Investigaciones han relevado que SARS-CoV-2 presenta una afinidad diez veces mayor por el receptor ACE2 en comparación con SARS-CoV, lo cual concuerda con su mayor actividad infectiva. Estos hallazgos indican que el receptor ACE2 podría ser crucial para la infección, progresión y pronóstico de COVID-19^{11,12}.

Por otro lado, comprender la expresión y distribución de ACE2 en los diversos tejidos nos permite identificar los órganos y sistemas que tienen una mayor susceptibilidad a la

infección por el SARS-CoV-2³. Este hecho explica la afectación pulmonar provocada por el Covid19, ya que se ha visto una alta presencia de ACE2 en células epiteliales alveolares tipo II de pulmón, además de ser la vía aérea la puerta de entrada y contagio. Un análisis que examinó el perfil de expresión de ARN mensajero (mRNA) de ACE2 en 72 tejidos humanos mediante la técnica de qRT-PCR, reveló que la presencia de ACE2 se encuentra ampliamente expresada en tejidos renales, cardiovasculares, testículos y, especialmente, en tejidos gastrointestinales como el íleon, el duodeno, el yeyuno, el ciego y el colon. Se comprobó además que el íleon mostraba la expresión más alta de ACE2 en comparación con los otros 72 tejidos evaluados^{13,14}. Mediante técnicas de inmunohistoquímica, para determinar la localización de ACE2 en varios órganos humanos, incluyendo mucosa oral y nasal, nasofaringe, pulmón, estómago, intestino delgado, colon, piel, ganglios linfáticos, timo, médula ósea, bazo, hígado, riñón y cerebro, se llevó a cabo este estudio, encontrando una abundante tinción de ACE2 en células epiteliales alveolares tipo I y II de pulmón así como en los enterocitos que recubren todo el intestino delgado. De igual manera, se observó una destacable presencia de ACE2 en células endoteliales tanto de pequeños como de grandes vasos arteriales y venosos en todos los órganos analizados. También se encontró expresión de dicho receptor en las células del músculo liso de las arterias. Mediante el análisis bioinformático de técnicas de secuenciación de ARN unicelular y la exploración de transcriptomas unicelulares de bases públicas, se investigó el patrón de expresión de ARN relacionado con ACE2. Los resultados revelaron una alta expresión de ACE2 en varios tipos celulares. Es relevante para este trabajo mencionar que uno de ellos fue las células epiteliales alveolares tipo II (pulmón). Otros tipos como las células epiteliales estratificadas del esófago superior, enterocitos del íleon y colon, colangiocitos del tracto biliar, células miocárdicas, células del túbulo proximal del riñón y células uroteliales de la vejiga también fueron hallados ^{12,15}. Por lo tanto, mediante diversas técnicas de investigación se ha confirmado la presencia de ACE2 en numerosos órganos y tejidos del cuerpo.

Un aspecto importante de la fisiopatología de esta enfermedad es la marcada respuesta inflamatoria que se desencadena. Se ha comprobado que el nivel de inflamación inducida por el virus juega un papel crucial en la determinación de la gravedad de la enfermedad en cada individuo. Es un hecho que niveles de citocinas proinflamatorias elevados se han correlacionado con el pronóstico de los pacientes infectados, tanto en la fase aguda como en fases más crónicas de la enfermedad¹⁶. Por tanto, el análisis de las

citoquinas implicadas en los mecanismos de daño en la infección por SARS-CoV-2 resulta de gran importancia, tanto para comprender la enfermedad como para el desarrollo de enfoques terapéuticos. Las citoquinas son proteínas que participan en muchos procesos fundamentales del organismo; en la inmunidad, en el desarrollo embrionario, en la regeneración, en la angiogénesis, en la inflamación, en el envejecimiento, etc. Entre estos, destaca la inflamación, por su relación con la patogenia de múltiples enfermedades. La inflamación interviene en las reacciones de fase aguda y en las respuestas inmunitarias contra agentes infecciosos. En estas ocasiones, está bien controlada, no siendo éste el caso en la inflamación crónica y la tormenta de citoquinas, en donde vemos un estado inflamatorio fuera de control. Esta tormenta de citoquinas es importante por su relación con la patología ocasionada por el COVID-19. Podemos hablar de una cascada que se induce de manera aguda y no se produce una regulación de la producción masiva de citoquinas inflamatorias en respuesta a la infección.

La IL-6 es una citocina pleiotrópica implicada, no solo en las respuestas inmunitarias, sino también en la inflamación, la hematopoyesis, el metabolismo óseo, el desarrollo embrionario y otros procesos fundamentales¹⁷. Como hemos comentado, desempeña una función importante en las enfermedades inflamatorias, como ocurre en la enfermedad por COVID19, tal como pretendemos ilustrar en la Figura 2.

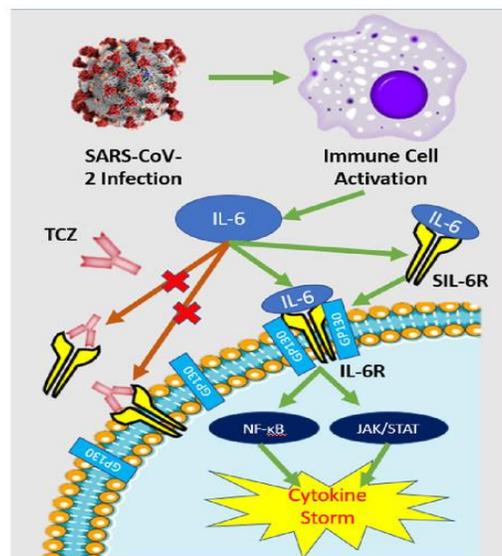


Figura 2: Importancia de IL-6 como mediador inflamatorio en la enfermedad por Covid 19. Tomado de Kaye AG et al.

De acuerdo con los conocimientos sobre que la enfermedad por COVID-19 grave existe una respuesta exacerbada inflamatoria con una tormenta de citoquinas, la severidad del COVID-19 se asocia con un mayor nivel de citocinas inflamatorias, como IL-6, GM-CSF y TNF α . Entre los mediadores inflamatorios elevados, el nivel de IL-6 en sangre está altamente correlacionado con la mortalidad por enfermedad y predice la necesidad de ventilación mecánica. En particular, se sabe que los niveles séricos de IL-6 y TNF α son predictores significativos de la gravedad de la enfermedad^{18,19,20}.

El objetivo de este Trabajo de Fin de Grado es conocer la influencia de la variabilidad en los genes ACE2 e IL-6 en la infección por COVID-19, mediante el estudio funcional de los polimorfismos rs2074192 del gen que codifica la ACE2 y el polimorfismo rs1800795 localizado en la región del promotor del gen que codifica la IL6.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha realizado un estudio retrospectivo de asociación, para ello se ha utilizado la base de datos de los pacientes con infección por COVID19 ingresados en el Hospital Clínico Universitario Río Hortega durante los meses de marzo y abril de 2020.

- Comité de ética:

El presente estudio ha sido aprobado por el comité de ética del Hospital Clínico Universitario Río Hortega Ref.: PI078-20.

-Sujetos:

Los 338 pacientes que se han estudiado pertenecen a la cohorte de pacientes ingresados por infección COVID19 en el Hospital Universitario Río Hortega. Todos los pacientes han sido diagnosticados en base a una clínica compatible con la infección y un test por PCR positivo realizado en los laboratorios de microbiología de dicho centro.

-Variables:

Las variables demográficas, antecedentes médicos, tratamientos farmacológicos y no farmacológicos, exploración física y evolución se han extraído de la base de datos de la historia clínica digital del Hospital Clínico Universitario Río Hortega a través del programa informático Jimena.

De igual modo, los datos correspondientes a la evolución de los pacientes con el resultado de ingresos y exitus se recogen de la historia clínica digital a fecha límite abril de 2023.

Las variables analíticas, entendiendo por tales las derivadas de las solicitadas de forma rutinaria, como hemograma, bioquímica, hemostasia y el perfil COVID19 (creado de manera específica para diagnóstico y seguimiento de pacientes con COVID19) extraen del programa informático de los laboratorios de referencia del Hospital Clínico Universitario Río Hortega.

Para el análisis de las variables clínicas de ingreso que pudieran influir en la evolución se escogió como posibles marcadores de riesgo el grado de dependencia, por ser pacientes más vulnerables, el deterioro cognitivo, el consumo de tabaco, la presencia de factores de riesgo vascular, y las comorbilidades más habituales en una unidad de M. Interna; enfermedad pulmonar obstructiva crónica, insuficiencia cardíaca, insuficiencia renal, hepatopatía, asma o enfermedad tumoral.

-Muestras:

Se ha generado una genoteca y seroteca con los pacientes que han ingresado con el diagnóstico de infección por COVID19. Las muestras se encuentran codificadas y almacenadas en los congeladores de la unidad de investigación del Hospital Clínico Universitario Río Hortega.

- Discriminación alélica mediante PCR con sondas TaqMan.

La discriminación alélica se realizará mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con sondas TaqMan o sondas de hidrólisis (Applied Biosystems); los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación. Los termocicladores para la PCR (StepOnePlus, Applied Biosystems) incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación; además, dispone de varios canales de lectura para detectar la emisión de distintos fluorocromos a la vez. De esa manera, se pueden usar varias sondas marcadas con distintos fluorocromos, para identificar los diferentes genotipos descritos en cada uno de los genes estudiados. Para la discriminación alélica se emplean sondas de hibridación

específicas (oligonucleótidos) marcadas con fluorocromos donadores en el extremo 5' (emiten fluorescencia al ser excitados) y fluorocromos aceptores en el extremo 3' (absorben la fluorescencia liberada por el donador). Para ello, las moléculas donadora y aceptora deben estar espacialmente próximas, y el espectro de emisión de la primera se ha de solapar con el espectro de absorción de la segunda.

- Análisis estadístico

El análisis estadístico se ha realizado con el programa informático SPSS (versión 21.0). Se considerará la existencia de significación estadística cuando se halle un p-valor menor de 0,05.

Para el análisis descriptivo de los datos, se ha calculado la distribución de frecuencias de los porcentajes de cada categoría para cada variable cualitativa y las variables cuantitativas se describen en términos de tendencia central (media) y de dispersión (desviación estándar).

En los estudios de asociación de polimorfismos y en el caso de variables clínicas cualitativas se analiza la distribución mediante el test χ^2 de Pearson o el test de Fisher. En aquellos casos en los que encontramos diferencias estadísticamente significativas, se realiza una regresión logística multivariante para conocer el riesgo que puede generar la presencia de un determinado genotipo. En el estudio de las variables cuantitativas se ha aplicado un test ANOVA en el caso de que los datos cumplan igualdad de varianzas (homozasticidad) y sigan una distribución normal. En el caso de que las variables que no cumplen la igualdad de varianzas ni siguen una distribución normal se aplicó el test de Mann Whitney (2 muestras independientes) o el test de Kruskal-Wallis (K muestras independientes). La homozasticidad y la distribución de las muestras se comprobará con la aplicación del test de Levene y con la aplicación del test de Kolmogorov-Smirnov respectivamente.

RESULTADOS

- Resultados de las variables clínicas y analíticas

Se ha estudiado una población de 338 pacientes con una edad media de 74,4 años (30-100 años). De estos pacientes ingresados han fallecido 76 pacientes. En el análisis de la influencia de las variables recogidas en el momento del ingreso y la muerte por covid19 solo se halló una correlación lineal clara entre los valores de PCR que son directamente proporcionales con el riesgo de muerte ($p < 0.001$).

Asimismo, este riesgo sobre todo aumenta cuando se coge un punto de corte de PCR >100. Correlación también línea con los valores de creatinina (p <0.001). Aumenta el riesgo sobre todo si cogemos punto de corte de 1. En el estudio con prueba de chi-cuadrado se observa una correlación estadísticamente significativa (p 0.04) entre cáncer y la muerte.

Si bien no era el objetivo del trabajo se analizó la respuesta a tratamientos pautados en el momento de ingreso, encontrándose una tendencia para el beneficio en los tratamientos con corticoides y en fármacos como Tocilizumab, si bien en este último caso la falta de un número elevado de pacientes en tratamiento impide extraer conclusiones claras. A modo de curiosidad y recordando los tratamientos pautados en un momento de falta de evidencia el uso de la cloroquina como tratamiento no se asocia con menor riesgo de muerte en la muestra que analizamos.

Para el análisis de las variables clínicas y comorbilidades de ingreso que pudieran influir en la evolución se instauró relación entre la dependencia grave, con la insuficiencia renal y en los pacientes diagnosticados de cáncer en el momento de ingreso.

	Variable	Número	Porcentaje	Asociación
Sexo	Varón	182	53,8	
	Mujer	156	56,2	
Grado Dependencia	Independiente	80	23,6	
	Leve	169	50	
	Moderada grave	47 42	13,9 12,4	p=0,048
Grado cognitivo	Demencia	41	12,1	
Tabaquismo	Activo	12	3,5	
	Ex Fumadores	57	16,8	
	No Fumadores	268	79,2	
Factores de RV	Dislipemia si	133	39,3	
	HTA si	196	57,9	
	DM2 si	98	28,9	
Comorbilidades	EPOC	76	22,4	
	Hepatopatía	17	5	
	I. Cardíaca	106	31,6	
	I Renal 1-3	79	23,3	
	I Renal 4-5	39	11,5	p=0,032
	Asma	32	9,4	
	Cáncer/leucemia/Linfoma	51	15	p= 0,04

Tabla 1: características poblacionales y comorbilidades del estudio

- Resultados del análisis de polimorfismos

Genotipado del SNP rs2074192:

No se ha encontrado asociación significativamente estadística entre la muerte por COVID y el polimorfismo rs2074192 del gen que codifica ACE2. P: 0,12.

			Muerte por covid		Total
			CT	TT	
rs2074192 Genotipos	CC	Recuento	37	126	163
		% rs2074192	22,7%	77,3%	100,0%
		% muerte por covid	48,7%	48,1%	48,2%
	CT	Recuento	12	66	78
		% rs2074192	15,4%	84,6%	100,0%
		% muerte por covid	15,8%	25,2%	23,1%
	TT	Recuento	27	70	97
		% rs2074192	27,8%	72,2%	100,0%
		% muerte por covid	35,5%	26,7%	28,7%
Total		Recuento	76	262	338
		% rs2074192	22,5%	77,5%	100,0%
		% muerte por covid	100,0%	100,0%	100,0%

Tabla 2: descriptivo de la distribución de genotipos del SNP rs2074192: del en función y posibilidad de muerte por covid

Genotipado del SNP rs1800795:

No se ha encontrado una correlación significativamente estadística entre la presencia de este polimorfismo de IL-6y la mayor mortalidad por COVID-19. P: 0,206.

			Muerte por covid		Total
			GC	GG	
rs1800795 Genotipos	CC	Recuento	6	28	34
		% rs1800795	17,6%	82,4%	100,0%
		% muerte por covid	7,9%	10,7%	10,1%
	GC	Recuento	30	126	156
		% rs1800795	19,2%	80,8%	100,0%
		% muerte por covid	39,5%	48,1%	46,2%
	GG	Recuento	40	108	148
		%rs1800795	27,0%	73,0%	100,0%
		% muerte por covid	52,6%	41,2%	43,8%
Total		Recuento	76	262	338
		% rs1800795	22,5%	77,5%	100,0%
		% muerte por covid	100,0 %	100,0 %	100,0%

Tabla 3: descriptivo de la distribución de genotipos del SNP rs2074192: del en función y posibilidad de muerte por covid

DISCUSIÓN

Overview

La pandemia por Covid19 ha sido causa de numerosas muertes en todo el mundo, provocando además comorbilidad en aquellas personas que lo han padecido. Esta enfermedad ha supuesto un reto para los sanitarios, no solo a la hora de buscar un tratamiento, sino para entender su mecanismo fisiopatológico y la cascada de eventos sistémicos que afectan a órganos y tejidos. Desde su mecanismo de entrada a la célula, cuyo pilar fundamental es ACE2, hasta la inflamación masiva, en la que IL6 tiene un papel fundamental.

Tras analizar los resultados del estudio, se ha observado que existe una asociación lineal y significativa entre los valores de proteína C reactiva de los sujetos estudiados y el aumento del riesgo de muerte por Covid19. Asimismo, el riesgo aumenta de manera acentuada si el valor de la proteína C es superior a 100mg/dl. Esta proteína producida por el hígado se eleva cuando hay inflamación sistémica. Pertenece al grupo de proteínas denominados reactantes de fase aguda y participa en la respuesta inmunitaria innata. Desde el punto de vista fisiológico tiene sentido que cuanto mayor sea el valor de este parámetro nos encontremos ante una situación más grave, y, por tanto, aumente el riesgo de muerte.

Esta asociación es uno de los principales resultados obtenidos que demuestra, además, que puede ser usado como un biomarcador pronóstico en pacientes contagiados por coronavirus 19. Otras publicaciones como el estudio español realizado por L.M. Vaquero-Roncero y colaboradores la sobre Proteína C reactiva y escala SOFA²¹, establece la misma relación significativa entre los valores de la proteína C reactiva y el riesgo de muerte en pacientes con coronavirus. En este estudio observacional y retrospectivo se incluyen pacientes ingresados en las unidades de cuidados críticos menores de 75 años. En el estudio que hemos realizado nosotros, la edad media de los pacientes es de 70 años, y en este caso también hemos analizado pacientes ingresados en el hospital por Covid19. Otro hallazgo relevante de ese estudio es que casi el 70% de los pacientes que ingresaron con una PCR superior a 9,1 mg/dl y ferritina superior a 969 ng/ml requirieron cuidados críticos, lo cual refuerza la teoría de que esta proteína tiene elevado valor pronóstico²¹, como se ha visto en nuestro trabajo.

Por otro lado, nuestro estudio establece una asociación lineal también entre valores de creatinina y riesgo de muerte. Este riesgo se eleva de forma significativa sobre todo si se establece como punto de corte para este parámetro 1mg/dl, cifra que al elevarse indica peor función renal. Que esta asociación sea significativa tiene sentido ya que como he explicado anteriormente, demuestra un indicio de daño renal en este caso y por lo tanto un aumento del riesgo y de la gravedad de la situación en pacientes ingresados. Por otro lado, la insuficiencia renal es coherente, dado que es una de las principales comorbilidades que implican un mal pronóstico en pacientes ingresados. Existen estudios como el retrospectivo realizado en Hospital Tongji en Wuhan, China sobre las características clínicas de 113 pacientes fallecidos con enfermedad por coronavirus que establece que las concentraciones de creatinina fueron notablemente más elevadas en pacientes que finalmente acabaron falleciendo²², lo que apoya lo mencionado previamente. La correlación existente entre cáncer y muerte por coronavirus observada en nuestro estudio, tras analizar

los datos con la prueba chi-cuadrado, es estadísticamente significativa (p 0.04) entre los que padecían una neoplasia maligna y el aumento de la gravedad y el riesgo de muerte, que es un hecho no sorprendente por la comorbilidad elevada que presentan los pacientes con enfermedades tumorales. La infección por COVID19 y el cáncer son dos condiciones que por sí mismas pueden aumentar el riesgo de complicaciones graves, y en ciertos casos, el de muerte. La relación entre ambas enfermedades es complicada y depende de diferentes factores como el tipo de cáncer, el estadio en el que se encuentre, el propio estado de salud del paciente y el tratamiento usado. Lo expuesto con anterioridad se ve reforzado por diversos estudios como el realizado por Torres Carmona y colaboradores en la facultad de ciencias médicas de Bayamo-Granma²³, en el que efectuaron una consulta bibliográfica de 23 documentos. En su revisión llegan a la conclusión de que los pacientes con cáncer son un grupo mucho más vulnerable a la hora de poder sufrir complicaciones e incluso la muerte por una infección por COVID19 lo que apoya los resultados obtenidos en nuestro estudio. Otro estudio publicado por The Lancet en 2020 sobre pacientes con cáncer en la infección por SARS-CoV-2 realizado por WenhuaLiang y colaboradores, asegura que los pacientes con cáncer tenían un mayor riesgo de eventos graves (un criterio de valoración compuesto definido como el porcentaje de pacientes admitidos en la unidad de cuidados intensivos que requerían ventilación invasiva o muerte) en comparación con los pacientes sin cáncer²⁴.

Por último, no es en vano revisar aquellos procedimientos o tratamientos que se realizaron en la pandemia, y de una forma crítica y constructiva nos puede ayudar a aprender de errores. Es por ello por lo que es interesante comentar que en el estudio también se analizó el uso de la cloroquina como fármaco para el tratamiento del COVID19, obteniéndose como resultado que no se asocia con un menor riesgo de muerte en los pacientes. En el estudio publicado por H. Pineda Rivera y compañeros revisan otros artículos y aseguran que al examinar la literatura encuentran otros estudios que han demostrado que la hidroxiclороquina, con o sin azitromicina, carece de eficacia en la reducción de la mortalidad en periodos cortos para pacientes hospitalizados con COVID-19 o con riesgo de hospitalización²⁵. No solo no supone una disminución del riesgo de muerte, sino que, algunos autores relacionan el uso de la hidroxiclороquina con un empeoramiento del estado de dichos pacientes; Elavarasi et al. sugieren que el uso de la cloroquina o hidroxiclороquina no mejora los resultados clínicos en COVID19. Soto et al. corroboraron un efecto potencialmente dañino de la hidroxiclороquina, ivermectina, azitromicina y sus combinaciones. Además, detectaron un aumento constante

del riesgo de muerte, transferencia a la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) y de las necesidades de oxígeno con la combinación de hidroxiclороquina-azitromicina²⁶.

La finalidad de este trabajo, como su propio título indica, es conocer la influencia de la variabilidad en los genes ACE2 e IL-6 en la infección por COVID19 mediante el estudio de los polimorfismos rs2074192 del gen que codifica la ACE2 y el polimorfismo rs1800795 localizado en la región del promotor del gen que codifica la IL6.

El papel de ACE/ACE2 es clave en la fisiopatología de la infección por coronavirus. Diversos estudios como el publicado por la Revista Española de Cardiología²⁷ sobre el COVID y el diagnóstico bioquímico y moleculares para reducir el daño cardíaco y la cardiotoxicidad, indican que tras secuenciar el polimorfismo mencionado para ACE2 existe una asociación entre el mismo y el desarrollo de hipertensión esencial en pacientes infectados por coronavirus, lo que sostiene que sí es posible que exista la asociación planteada en nuestro estudio. En esa misma línea, encontramos otro estudio a cerca de las variantes del gen ACE y ACE2 y su asociación con resultados graves de COVID19²⁸. Para dicho estudio se incluyó un total de 481 personas que mostraron signos clínicos de COVID y fueron diagnosticadas con PCR, al igual que en nuestro estudio que, además, consta de una muestra similar en número de pacientes. El ADN genómico se extrajo de muestras de sangre periférica y en los SNP (rs2285666 y rs2074192) no se encontró una correlación significativa tampoco entre el polimorfismo estudiado y una mayor gravedad en la enfermedad por COVID19.

En cuanto a IL-6, el polimorfismo objeto de nuestro estudio fue rs1800795 localizado en la región del promotor del gen que codifica la IL6. De igual manera que con ACE2, en la cohorte de pacientes analizados podemos afirmar que no se ha corroborado que haya asociación entre el mismo y un aumento de la gravedad y mortalidad por COVID19 en nuestra muestra de estudio. Asimismo, en un artículo realizado por Shrikant Verma en el que se estudia la posible asociación entre la presencia de polimorfismos de nucleótido único (SNP) en la región promotora de IL-6 con la gravedad de covid19, no se objetiva ninguna asociación de aumento de riesgo con el polimorfismo rs1800797²⁹ que en concreto es el de nuestro estudio. Sin embargo, algunos artículos publicados en una revista latinoamericana³⁰ y la Facultad de Medicina de Indonesia³¹ valoran la posibilidad de que

otros polimorfismos y en otro tipo de poblaciones sí que puedan mantener algún tipo de relación con la severidad de la neumonía causada por COVID y ser portador de los mismos.

CONCLUSIONES

Nuestro estudio demuestra que entre valores analíticos como el de la proteína C reactiva se establece una relación lineal clara y directamente proporcional con el riesgo de muerte por COVID19. Por otro lado, se demuestra que los pacientes que presentan niveles elevados de creatinina, y, por tanto, comorbilidad renal tienen mayor riesgo de sufrir una enfermedad grave por coronavirus e incluso fallecer. Se confirma también una relación estadísticamente significativa ($p < 0.04$) entre el cáncer y el aumento de la vulnerabilidad de sufrir un evento grave en estos pacientes.

En cuanto a los polimorfismos estudiados, no se observa que exista una correlación clara que asocie mayor riesgo de muerte por COVID.

Por todo lo anteriormente expuesto y con los resultados obtenidos en nuestro estudio, considero que es interesante poder identificar gracias a estos parámetros a la población con mayor susceptibilidad patológica y poder brindar así un abordaje más preciso.

BIBLIOGRAFÍA

1. Riou J, Althaus CL. Pattern of early human-to-human transmission of Wuhan 2019 novel coronavirus (2019-nCoV), December 2019 to January 2020. *Euro Surveill* [Internet]. 2020;25(4).
2. Peng X, Xu X, Li Y, Cheng L, Zhou X, Ren B. Transmission routes of 2019-nCoV and controls in dental practice. *Int J Oral Sci* [Internet]. 2020;12(1):9.
3. Zou, X.; Chen, K.; Zou, J.; Han, P.; Hao, J. & Han, Z. Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. *Front. Med.*, 14(2):185-92, 2020.
4. Rabi, A. F.; Al Zoubi, M. S.; Kasasbeh, G. A.; Salameh, D. M. & Al-Nasser, A. D. SARS-CoV-2 and coronavirus disease 2019: what we know so far. *Pathogens*, 9(3):231, 2020.
5. Han, Q.; Lin, Q.; Jin, S. & You, L. Coronavirus 2019-nCoV: A brief perspective from the front line. *J. Infect.*, 80(4):373-7, 2020.
6. Rabaan, A. A.; Al-Ahmed, S. H.; Haque, S.; Sah, R.; Tiwari, R.; Malik, Y. S.; Dhama, K.; Yattoo, M. I.; Bonilla-Aldana, D. K. & Rodriguez-Morales, A. J. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-COV: a comparative overview. *Infez. Med.*, 28(2):174-84, 2020.
7. Chen, Y.; Guo, Y.; Pan, Y. & Zhao, Z. J. Structure analysis of the receptor binding of 2019-nCoV. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 525:(1):135-40, 2020
8. Guo Y-R, Cao Q-D, Hong Z-S, Tan Y-Y, Chen S-D, Jin H-J, et al. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak - an update on the status. *Mil Med Res* [Internet]. 2020;7(1):11.
9. Wan, Y.; Shang, J.; Graham, R.; Baric, R. S. & Li, F. Receptor recognition by the novel coronavirus from wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus. *J. Virol.*, 94:(7):e00127-20, 2020.
10. Wong, S.; Lui, R. N. S. & Sung, J. J. Y. Covid-19 and the digestive system. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 35(5):744-8, 2020.
11. Li, Y.; Zhou, W.; Yang, L. & You, R. Physiological and pathological regulation of ACE2, the SARS-CoV-2 receptor. *Pharmacol. Res.*, 157:104833, 2020.
12. D'Amico, F.; Baumgart, D. C.; Danese, S. & Peyrin-Biroulet, L. Diarrhea during COVID-19 infection: pathogenesis, epidemiology, prevention, and management. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, 2020.

13. Harmer, D.; Gilbert, M.; Borman, R. & Clark, K. L. Quantitative mRNA expression profiling of ACE 2, a novel homologue of angiotensin converting enzyme. *FEBS Lett.*, 532(1-2):107-10, 2002.
14. Hamming, I.; Timens, W.; Bulthuis, M.; Lely, A.; Navis, G. & Van Goor, H. Tissue Distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J. Pathol.*, 203(2):631-7, 2004.
15. Xu, H.; Zhong, L.; Deng, J.; Peng, J.; Dan, H.; Zeng, X.; Li, T. & Chen, Q. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *Int. J. Oral Sci.*, 12:8, 2020a.
16. Yin J-X, Agbana YL, Sun Z-S, Fei S-W, Zhao H-Q, Zhou X-N, et al. Increased interleukin-6 is associated with long COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Infect Dis Poverty* [Internet]. 2023;12(1).
17. Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol* [Internet].
18. Murakami M, Kamimura D, Hirano T. Pleiotropy and specificity: Insights from the interleukin 6 family of cytokines. *Immunity* [Internet]. 2019;50(4):812–31.
19. Hirano T, Matsuda T, Turner M, Miyasaka N, Buchan G, Tang B, et al. Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* [Internet]. 1988 [citado el 24 de mayo de 2023];18(11):1797–801.
20. Grivennikov SI, Karin M. Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010;21.
21. Vaquero-Roncero LM, Sánchez-Barrado E, Escobar-Macias D, Arribas-Pérez P, González de Castro R, González-Porrás JR, et al. C-Reactive protein and SOFA scale: A simple score as early predictor of critical care requirement in patients with COVID-19 pneumonia in Spain. *Rev Esp Anesthesiol Reanim* [Internet].
22. 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* [Internet].
23. Jesús A, Yanet M, Evelin L, Cancer Y Coronavirus GP. NUEVA META EN ESTUDIO. 2020;
24. Liang W, Guan W, Chen R, Wang W, Li J, Xu K. Cancer patients in SARS-CoV-2 infection: a nationwide analysis in China. *The Lancet Oncology.* 2020.

25. Kashour Z, Riaz M, Garbati MA, AIDosary O, Tlayjeh H, Gerberi D, et al. Efficacy of chloroquine or hydroxychloroquine in COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2020 Oct
26. Pineda Rivera H, Tataje-Lavanda L. Evidencia sobre efectividad en el manejo farmacológico de los pacientes con COVID-19. *Semergen* [Internet]. 2021.
27. Eiras S, Álvarez E, Brión M, González-Juanatey JR. COVID-19 y tratamiento guiado con tests de diagnóstico bioquímicos y moleculares para reducir el daño cardiaco y la cardiotoxicidad. *Rev Esp Cardiol* [Internet]. 2020
28. Martínez-Gómez LE, Herrera-López B, Martínez-Armenta C, Ortega-Peña S, Camacho-Rea MDC, Suarez-Ahedo C, et al. ACE and ACE2 gene variants are associated with severe outcomes of COVID-19 in men. *Front Immunol* [Internet]. 2022;13:812940.
29. Verma S, Verma S, Faizan Haider Khan, Siddiqi Z, Syed Tasleem Raza, Abbas M, et al. Genetic polymorphisms of IL6 gene –174G > C and –597G > A are associated with the risk of COVID-19 severity. 2022 Nov 2
30. Tenesaca Serpa A, Andrade Campoverde D. Genes implicados en la gravedad de la infección por SARS-cov- 2. *Revista Vive* [Internet].
31. Ulhaq ZS, Soraya GV. Anti-IL-6 receptor antibody treatment for severe COVID-19 and the potential implication of IL-6 gene polymorphisms in novel coronavirus pneumonia. *Med Clin (Barc)* [Internet]. 2020

Figura 1: Salian VS, Wright JA, Vedell PT, Nair S, Li C, Kandimalla M, et al. COVID-19 transmission, current treatment, and future therapeutic strategies. *Mol Pharm* [Internet]. 2021

Figura 2: Kaye AG, Siegel R. The efficacy of IL-6 inhibitor Tocilizumab in reducing severe COVID-19 mortality: a systematic review. *PeerJ* [Internet]. 2020

ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA VARIABILIDAD DE LOS GENES DE ACE2 E IL6 EN LA INFECCIÓN POR COVID19



ALUMNAS: Elisa Muñoz de Diego y Alba Saiz Miguel
TUTOR: José Pablo Miramontes González



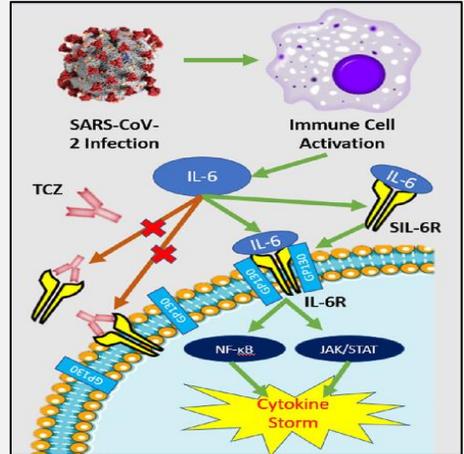
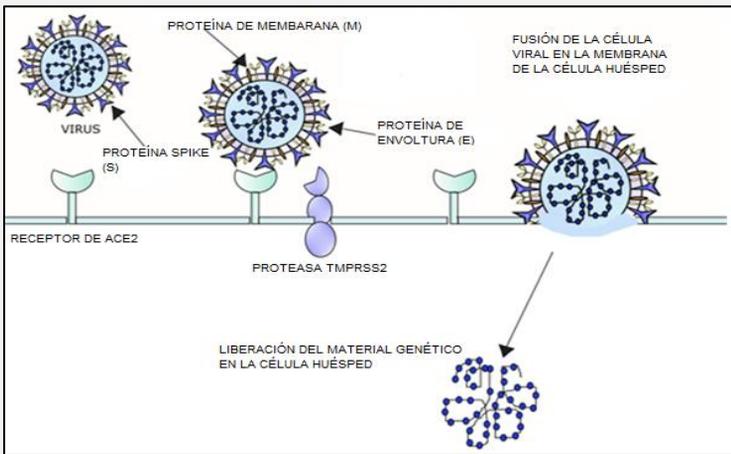
INTRODUCCIÓN



- **COVID19:** es una enfermedad infecciosa provocada por SARS-CoV-2
- **ACE2:** receptor necesario para la entrada viral en la célula huésped
- **IL6:** citocina pleiotrópica implicada en inmunidad e inflamación

OBJETIVO

Análisis de la relación entre la presencia del polimorfismo rs2074192 de ACE2 y rs1800795 de il6 y la mayor gravedad y mortalidad por COVID19



MATERIAL Y MÉTODOS

→ Estudio retrospectivo de cohortes



Meses marzo y abril de 2020

338 pacientes ingresados con PCR + covid19



La discriminación alélica se hizo mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) con sondas TaqMan



	Variable	Número	Porcentaje	Asociación
Sexo	Varón	182	53,8	
	Mujer	156	56,2	
Grado Dependencia	Independiente	80	23,6	
	Leve	169	50	
	Grave	42	12,4	p=0,048
Grado cognitivo	Demencia	41	12,1	
Tabaquismo	Activo	12	3,5	
	Ex Fumadores	57	16,8	
Factores de RV	No Fumadores	268	79,2	
	Dislipemia si	133	39,3	
	HTA si	196	57,9	
Comorbilidades	DM2 si	98	28,9	
	EPOC	76	22,4	
	Hepatopatía	17	5	
	I. Cardíaca	106	31,6	
	I Renal 1-3	79	23,3	
	I Renal 4-5	39	11,5	p=0,032
	Asma	32	9,4	
	Cáncer/leucemia/Linfoma	51	15	p= 0,04

POLIMORFISMO ESTUDIADO PARA EL GEN QUE CODIFICA ACE2			Muerte por COVID		Total
			CT	TT	
Genotipos de rs2074192	CC	Recuento	37	126	163
		% rs2074192	22,7%	77,3%	100,0%
	CT	Recuento	12	66	78
		% rs2074192	15,4%	84,6%	100,0%
	TT	Recuento	27	70	97
		% rs2074192	27,8%	72,2%	100,0%
Total		Recuento	76	262	338
		% rs2074192	22,5%	77,5%	100,0%
		% muerte por COVID	100,0%	100,0%	100,0%

CONCLUSIONES

-Se ha encontrado un asociación estadística entre el marcador de inflamación proteína C reactiva y la posibilidad de muerte por SARS-CoV-2. De igual modo sucede con las cifras de creatinina y el padecer cáncer al ingreso.

-Los polimorfismos rs2074192 del gen que codifica ACE2 y rs1800795 del gen que codifica la IL6 no han mostrado una asociación estadística con la muerte por SARS-CoV-2 en la muestra analizada.

BIBLIOGRAFÍA



>Salian VS, Wright JA, Vedell PT, Nair S, Li C, Kandimalla M, et al. COVID-19 transmission, current treatment, and future therapeutic strategies. Mol Pharm [Internet]. 2021

>Kaye AG, Siegel R. The efficacy of IL-6 inhibitor Tocilizumab in reducing severe COVID-19 mortality: a systematic review. PeerJ [Internet]. 2020