

TRABAJO FIN DE GRADO



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

FACULTAD DE MEDICINA

Estudio de la influencia de la variabilidad de los genes ACE2 e IL6
en la infección por COVID-19

ALUMNA 1: Elisa Muñoz de Diego

ALUMNA 2: Alba Saiz Miguel

TUTOR: Jose Pablo Miramontes

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	2
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. MATERIAL Y MÉTODOS	8
3.1. Comité de ética.....	8
3.2. Sujetos.....	8
3.3. Variables.....	8
3.4. Muestras.....	9
3.5. Discriminación alélica mediante PCR con sondas TaqMan.....	9
3.6. Análisis estadístico.....	9
4. RESULTADOS.....	10
4.1. Resultados del estudio clínico.....	10
4.2. Resultado del análisis de polimorfismos.....	12
5. DISCUSIÓN.....	13
6. CONCLUSIONES.....	17
7. BIBLIOGRAFÍA.....	17
8. PÓSTER.....	21

1. RESUMEN

Introducción

La pandemia ocasionada por el coronavirus respiratorio SARS-CoV-2 iniciada en China en diciembre de 2019 ha supuesto un reto sociosanitario no conocido en las últimas décadas. Desde su inicio se han centrado esfuerzos en conocer la fisiopatología que subyace a las vías de contagio y las posibles opciones terapéuticas. Dentro de los mecanismos de infección es necesario mencionar el papel de la proteína S, que es una proteína estructural del virus que le permite adherirse a las células hospedadoras tras su unión con su receptor; ACE2. Esta enzima a la que el SARS-CoV-2 se une con gran afinidad, se localiza en la membrana celular y está presente en múltiples tejidos del organismo, lo que ayuda a explicar, en parte, la clínica sistémica de la infección por COVID19.

De igual modo se ha estudiado el papel de la inflamación derivada de la infección. Uno de los mediadores más importantes es la interleucina 6, y los mecanismos que median en la respuesta inflamatoria exacerbada. Además su importante papel en esos mecanismos de amplificación de la respuesta inmune ha supuesto que se considerase una de las dianas terapéuticas en el tratamiento de la fase aguda de la enfermedad.

El objetivo de este trabajo es conocer si la existencia de parámetros analíticos, clínicos y la variabilidad genética de polimorfismos de los genes de ACE2 e IL6 puede influir en la mortalidad por la infección 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 Hortega. 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 positiva y clínica compatible. La discriminación alélica de los polimorfismos rs2074192 de ACE2 y rs1800795 de IL6 ha sido producida mediante reacción en cadena de la polimerasa con sondas TaqMan. El análisis estadístico se ha realizado mediante el programa SPSS.

Resultados:

Se ha encontrado una correlación entre los valores de PCR (proteína C reactiva) y el riesgo de muerte ($p < 0.001$). De la misma manera ocurre con los valores de creatinina y la asociación con el riesgo directo de muerte ($p < 0.001$). Se observa también relación estadísticamente significativa entre padecer enfermedad neoplásica maligna y la posibilidad

de muerte. Aunque no era el objetivo del trabajo, se analizó la respuesta a distintos tratamientos pautados durante el ingreso, demostrándose una tendencia a la mejoría en aquellos pacientes tratados con corticoides y/o Tocilizumab. Por otro lado, el análisis de los polimorfismos que hemos estudiado no ha revelado que exista una relación significativa entre éstos y muerte por COVID19.

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

2. INTRODUCCIÓN

La pandemia originada por un coronavirus el último trimestre del año 2019 en la ciudad China de Wuhan ha supuesto un reto sanitario desde su inicio, con un rápido devenir de los acontecimientos. La enfermedad que comenzó como una neumonía vírica pronto se extendió a otros territorios llegando a considerarse una pandemia en apenas unos meses; de hecho en Marzo de 2020 la OMS admitió que estábamos ante una nueva pandemia mundial. Para esas fechas se había nombrado al coronavirus causante de la enfermedad como SARS-CoV-2 de acuerdo con los análisis filogenéticos y taxonómicos, el comité internacional de taxonomía de virus (ICTV) y por ser las siglas de la descripción del síndrome respiratorio agudo severo causado por coronavirus^{1,2}.

Las infecciones por coronavirus no son nuevas en el ser humano; de una forma general producen infecciones que causan cuadros leves como son cuadros respiratorios autolimitados, si bien en la historia reciente se han descrito infecciones graves a nivel respiratorio como es el Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS-CoV) y al Síndrome Respiratorio Medio Oriente (MERS-CoV), referidos en los años 2002 y 2012 respectivamente^{3,4}. En la familia Coronaviridae, se identifican cuatro géneros reconocidos: alfacoronavirus, betacoronavirus, gamma-coronavirus y deltacoronavirus. El SARS-CoV-2 pertenece al género de los betacoronavirus. Genéticamente, SARS-CoV-2 está formado

por una cadena única de RNA monocatenario de polaridad positiva (+ssRNA) y, morfológicamente, por una nucleocápside (donde se protege su material genético) y por una cubierta o envoltura externa dispuesta por proteínas estructurales principales (S, M y E) y proteínas accesorias^{5,6}.

Una de los retos a los que se ha tenido que enfrentar la comunidad científica en esta pandemia fue determinar las medidas socio-sanitarias para controlar las vías de contagio, además de establecer tratamientos eficaces, a la espera de la llegada de las vacunas que ayudaron a controlar la epidemia. Para poder elaborar las estrategias médicas es necesario conocer las vías de contagio y los mecanismos de enfermedad que median en la infección por el SARS-CoV-2. El coronavirus posee una proteína estructural principal Spike (Proteína S) que permite la unión a la célula que va a ser infectada, mediante su al receptor que es proteína del conversor de angiotensina 2 (ACE2). La proteína S, es una proteína grande de entre 1200 y 1400 aminoácidos, dependiendo del género del coronavirus. 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 fusión de las membranas y así la entrada del virus en la célula.^{7,8}

Como hemos comentado, el receptor presente en las células diana para la infección por el virus SARS-CoV es la enzima convertidora o convertidora de la angiotensina 2 (ACE2). Tras la unión con la proteína S, los virus realizan su entrada a estas células gracias a un proceso de endocitosis mediado por estos receptores. El grado de afinidad entre el dominio RBD de la proteína S y el receptor ACE2, es determinante para el ingreso del virus en la célula hospedadora⁹. Se ha demostrado que el dominio RBD de SARS-CoV-2 se une con una alta afinidad al receptor ACE2, este hecho se ha correlacionado con su eficiente propagación entre los humanos^{10,11}. Se ha podido evidenciar que el SARS-CoV-2 tiene una afinidad diez veces mayor por la ACE2 que el SARS-CoV, este hecho le confiere una mayor eficiencia de infección. Estos hallazgos indican que el receptor ACE2, además de ser importante para la infección, es también clave en la progresión y pronóstico de COVID-19^{12,13}.

Para entender la clínica es necesario conocer la expresión y distribución de ACE2 en los distintos tejidos, lo que nos puede ayudar a conocer los órganos y sistemas con mayor

susceptibilidad de infección por el SARS-CoV-2¹⁴. Por ejemplo la afectación pulmonar provocada por el Covid-19, viene en parte explicada por una alta existencia de ACE2 en células epiteliales alveolares tipo II del pulmón, además de ser la vía aérea la puerta de entrada y contagio. Para conocer mejor su distribución se realizaron estudios que evaluaban el perfil transcripcional total de expresión de RNA mensajero (mRNA) para ACE2 en 72 tejidos humanos mediante qRT-PCR; se encontró que la presencia de ACE2 estaba altamente expresada en testículos, tejidos renales, cardiovasculares y, de manera especial, en tejidos gastrointestinales (íleon, duodeno, yeyuno, ciego y colon). Se descubrió que en el íleon estaba la expresión más alta en comparación con todos los 72 tejidos evaluados¹⁵. Además, hallaron una destacable presencia, en todos los órganos estudiados, de ACE2 en células endoteliales de pequeños y grandes vasos arteriales y venosos, al igual que, en células del músculo liso de arterias¹⁶. Como se puede observar, se ha demostrado la presencia de ACE2 en distintos órganos y tejidos utilizando distintas técnicas de estudio, hecho que ayuda a explicar la amplia variabilidad clínica encontrada en los pacientes con infección por COVID19.

Otro de los aspectos importantes en la fisiopatología y la clínica de la infección por COVID19 es presencia de una activación inflamatoria muy aumentada. Se ha evidenciado que entre los mecanismos que determinan la gravedad está el grado de activación de los procesos inflamatorios que el virus provoca en cada individuo. Se ha visto que niveles de citocinas proinflamatorias elevados se ha correlacionado con el pronóstico de los pacientes infectados, tanto en el momento agudo como en fases más crónicas de la enfermedad⁽¹⁷⁾. Es por ello que el estudio de las citoquinas que participan de los mecanismos de afectación en la infección por SARS-CoV-2 es de gran interés tanto para poder conocer la enfermedad como para el diseño de estrategias terapéuticas.

Las citoquinas (o citocinas) son proteínas que participan en muchos procesos fundamentales del organismo; como 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, la inflamación está bien controlada; no siendo éste el caso en la inflamación crónica y en la tormenta de citoquinas, en donde vemos una inflamación fuera de control. Ésta tormenta de citoquinas es importante por su relación con la patología ocasionada por el COVID-19. En dicha "tormenta" se induce de

manera aguda y no existe una regulación de la producción masiva de citoquinas inflamatorias en respuesta a la infección.

Las citocinas proinflamatorias como IL-6 (también TNF α o IL-1 β) cumplen un papel trascendente en el proceso inflamatorio. La IL-6 es un miembro de la familia de citocinas IL-6, que está compuesta por 10 miembros (IL-6, IL-11, IL-27, OSM, LIF, CNTF, CT-1, IL-35, IL-39). Su efecto se ejerce principalmente a través de la vía del transductor de señales y activador de la transcripción 3 (STAT3) de IL-6.¹⁷

Los estudios realizados en la década de 1980 también demostraron que la IL-6 es producida por las células del mixoma cardíaco y por las células del centro germinal de Castleman, y está presente en grandes cantidades en el líquido sinovial de los pacientes con artritis reumatoide (AR), sugiriendo su papel en enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias crónicas. En consecuencia, se propuso una hipótesis de trabajo que explica los posibles mecanismos de las enfermedades inflamatorias crónicas y las enfermedades autoinmunes. Desde entonces, la hipótesis original se ha actualizado y ahora se denomina modelo de iniciación local, que enfatiza la importancia de los iniciadores locales, como la infección, la lesión y el estrés, en la promoción de interacciones entre células no inmunitarias y células inmunitarias en la enfermedad.¹⁷

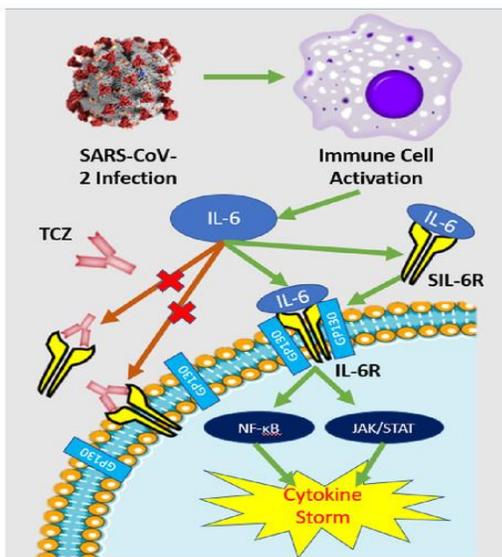


Imagen 1: Importancia de IL-6 como mediador inflamatorio en la enfermedad por Covid 19. Tomado de Kaye AG et al.

El SDRA en la enfermedad por SARS-CoV-2 se considera el resultado de una tormenta de citoquinas, similar a la enfermedad causada por el SARS-CoV-1 y el MERS-CoV. La tormenta de citoquinas es una inflamación descontrolada y que progresa rápidamente acompañada de la producción masiva de citoquinas proinflamatorias, quimioquinas y

factores de crecimiento. De acuerdo con esto, la gravedad de la 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.

La concentración de IL-6 es, por lo tanto, un predictor fiable de la gravedad de la COVID-19, ya que está significativamente elevada en los casos mortales⁽¹⁸⁾. La IL-6 tiene efectos pleiotrópicos participando en la hematopoyesis, la regulación metabólica, la inflamación, la autoinmunidad y las respuestas de fase aguda¹⁹. Algunos procesos dependientes de IL-6 ayudan a evitar infecciones, como dirigir la migración de neutrófilos al sitio de la infección, aumentar la capacidad citolítica de las células T CD8+ y regular las reacciones termostáticas antivirales. Sin embargo, la IL-6 también está implicada en la progresión de la enfermedad por infección viral, ya que conduce a la permeabilidad de los tejidos y al edema, reduce la producción de IFN- γ , impulsa moléculas antiapoptóticas y promueve una supervivencia excesiva de los neutrófilos. Los efectos adversos anteriores promueven una inflamación aumentada y permiten la infiltración viral a órganos distantes. Además, la IL-6 sérica elevada se asocia con una actividad citotóxica deficiente de las células NK, lo que debilita su capacidad para matar virus²⁰. Se sabe que la IL-6 aumenta la tasa de formación de coágulos fibróticos, por lo que también puede desempeñar un papel en las complicaciones trombóticas observadas en la COVID-19. El sistema renina-angiotensina, que controla la presión arterial y el equilibrio electrolítico, es un factor adicional importante en la modulación de la IL-6 y la patología de la COVID-19. A medida que el virus se une a ACE2, lo que reduce su disponibilidad, hay un aumento de angiotensina II en pacientes con COVID-19, lo que crea un ciclo de retroalimentación positiva que promueve la señalización proinflamatoria²¹; hecho a destacar en los mecanismos fisiopatológicos que convergen en la infección por COVID-19. Esto ha llevado a probar algunos de los tratamientos empleados en el COVID-19, como es el caso del Tozilizumab, anticuerpo monoclonal que se une al receptor celular que utiliza la IL-6.

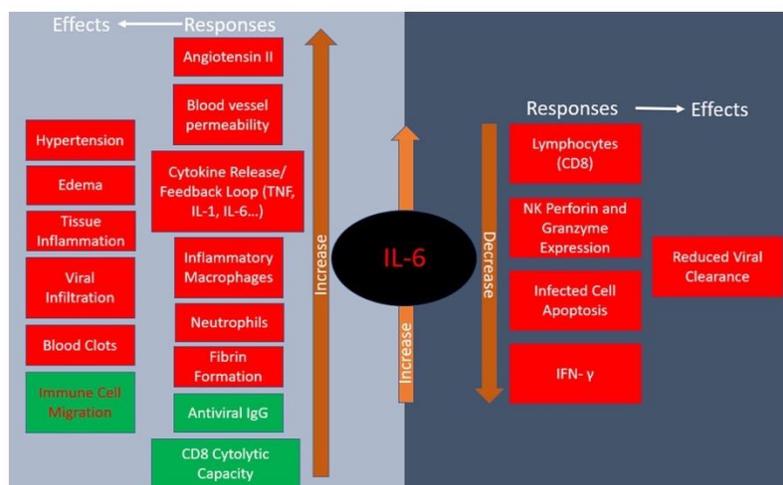


Imagen 2: efectos de IL-6 y repuestas fisiológicas asociadas. Tomado de Kaye AG et all.

Objetivo:

El objetivo de este Trabajo de Fin de Grado es conocer si la existencia de parámetros analíticos, clínicos y la variabilidad genética de polimorfismos de los genes de ACE2 e IL6 puede influir en la mortalidad por la infección por COVID19 en pacientes ingresados en un servicio de M. Interna.

3. 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 COVID-19 ingresados en el Hospital Clínico Universitario Río Hortega durante los meses de marzo y abril de 2020.

3.1. Comité de ética:

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

3.2. Sujetos:

Los 338 pacientes que se han estudiado pertenecen a la cohorte de pacientes ingresados por infección COVID19 en el Hospital Clínico 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.

3.3. 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, entendiéndose 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) se 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).

3.4. 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.

3.5. Discriminación alélica mediante PCR con sondas TaqMan:

La discriminación alélica se realiza 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 alelos 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.

3.6. 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.

En los estudios de asociación de polimorfismos y en el caso de variables clínicas cualitativas se analiza la distribución mediante el test X² 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.

4. RESULTADOS

4.1. Resultados del análisis de las variables clínicas

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. En el análisis de la influencia de las variables recogidas en el momento del ingreso y la muerte por COVID-19 se halló una correlación lineal clara entre los valores de PCR con el riesgo de muerte ($p < 0.001$). Asimismo, este riesgo sobre todo aumenta cuando se coge un punto de corte de PCR > 100 mg/dL. Existe una correlación también lineal con los valores de creatinina ($p < 0.001$). Aumenta el riesgo sobre todo si cogemos punto de corte de 1 mg/dL. En el estudio con prueba de chi-cuadrado se observa una

correlación estadísticamente significativa $p < 0.04$ entre la presencia de cáncer y la muerte por COVID19.

Si bien no era el objetivo del trabajo se analizó la respuesta a tratamientos pautados en el momento de ingreso, encontrándose una tendencia hacia el beneficio en los tratamientos con corticoides y en fármacos como Tozilizumab, aunque es cierto que 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 al ingreso que pudieran influir en la evolución se encontró relación entre la dependencia grave, la insuficiencia renal y los pacientes diagnosticados de cáncer y una peor evolución. (Ver Tabla 1)

	VARIABLE	NÚMERO	PORCENTAJE	ASOCIACIÓN
	Varón	182	53,8	
	Mujer	156	56,2	
Grado Dependencia (Dep.)	Independiente	80	23,6	
	Dep. leve	169	50	
	Dep. Moderada	47	13,9	
	Dep. Grave	42	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

4.2. 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. (Ver tabla 2)

			Muerte por Covid		Total
			CT No	TT Si	
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

- Genotipado del SNP rs1800795:

No se ha encontrado una correlación significativamente estadística entre la presencia de este polimorfismo de IL-6 y la mayor mortalidad por COVID-19. P 0,206. (Ver Tabla 3)

			Muerte por Covid		Total
			GC	GG	
rs1800795	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.

5. DISCUSIÓN

La pandemia ocasionada por el virus SARS-CoV-2 ha supuesto un reto global a muchos niveles, siendo evidente la afectación en la práctica sanitaria, donde algunos de los cambios introducidos como consecuencia del COVID-19 serán permanentes, al menos por el momento, tales como el uso de mascarilla en los centros sanitarios. Desde el inicio de los primeros casos se comenzaron a realizar estudios sobre las características del virus y la enfermedad, tratando de explicar y entender la fisiopatología y así poder lograr una estrategia de tratamiento eficaz, tanto de manera preventiva, a través del diseño de las vacunas como de tratamiento médico y sintomático de la infección.

En nuestro trabajo se ha mostrado una clara correlación entre los niveles en sangre de Proteína C Reactiva de los pacientes estudiados y el riesgo de muerte por Covid19, siendo este riesgo sustancialmente mayor cuando los valores de PCR son superiores a 100mg/dL. Esta asociación es lógica desde un punto de vista fisiopatológico, ya que esta proteína es un reactante de fase aguda, lo que indica que cuanto mayores son sus niveles, mayor es la inflamación en el organismo, y, por tanto, la gravedad de la infección. Éste es uno de los principales resultados de nuestro estudio; no obstante, existen otras publicaciones que establecen esta misma correlación, como por ejemplo el estudio publicado en Noviembre de 2021 por L. M. Vaquero Roncero y colaboradores, en el cual concluyeron que los pacientes con infección por COVID-19 con niveles de PCR iguales o superiores a 9,1 mg/dL podrían tener un riesgo superior de requerir cuidados intensivos²², hecho concordante con nuestros hallazgos. En la misma línea en el estudio de cohortes retrospectivo realizado por Wei Hou y colaboradores, se observó que la edad avanzada, los niveles de PCR y el recuento de linfocitos al ingreso son factores de riesgo para la progresión de la enfermedad²³.

Otra de las relaciones estadísticamente significativas que hemos encontrado se establece entre los valores por encima del límite normal de creatinina y el riesgo de muerte, el cual aumenta si tomamos como punto de corte el valor 1 mg/dL. Los niveles elevados de creatinina en sangre en la mayor parte de los casos indican alteración en la función renal, ya que éste es un metabolito de deshecho derivado del metabolismo de los músculos que se filtra y elimina a través de los riñones. Esta asociación es razonable desde un punto de vista fisiopatológico, pues la insuficiencia renal confiere una mayor fragilidad a los pacientes y una mayor comorbilidad. Al igual que en el caso anterior, hay diversos

estudios que establecen esta correlación. Un ejemplo es el estudio de Augusto Di Castelnuovo y colaboradores publicado en Octubre de 2020, en el que, según sus resultados, determinaron que de acuerdo con los datos de 701 pacientes chinos con COVID-19, la enfermedad renal se asoció con un mayor riesgo de muerte hospitalaria²⁴. Otros estudios encontraron también una asociación entre la presencia de enfermedad renal crónica con ingreso hospitalario y riesgo de enfermedad crítica por COVID-19, como la investigación de cohorte prospectiva de Christopher M. Petrilli y colaboradores²⁵.

Se ha observado una relación estadísticamente significativa entre la presencia de una enfermedad neoplásica maligna y la mayor gravedad de la infección, y un riesgo más elevado de muerte; observación que es lógica ya que la sola presencia de cáncer implica alteraciones en el organismo, lo cual unido a la presencia de una infección puede agravar el estado de salud. Esto se ha observado en otros estudios, como en el realizado en una población de China llamado "Pacientes con cáncer en la infección por SARS-CoV-2: un análisis nacional en China"²⁶.

Dentro de las observaciones que se consideraron en el trabajo ha estado la eficacia de los tratamientos; a modo de anécdota se ha reflejado la falta de eficacia de la cloroquina y la hidroxiclороquina, tratamientos pautados en base a sus mecanismos de control en la respuesta inmune, tradicionalmente utilizados en enfermedades reumáticas, como el lupus eritematoso sistémico. Misma observación se ha realizado en otras cohortes de pacientes de distintas poblaciones. ^(27,28)

Tal como se expuso en la introducción, la importancia del receptor de angiotensina ha hecho que considerase su estudio en los mecanismos de infección. Basándonos en la literatura previa se decidió plantear un estudio de asociación entre uno de los SNPs, rs2074192, que del gen que la codifica y la posibilidad de muerte por COVID19. Poniendo en contexto nuestro trabajo con la revisión de la literatura podemos observar como en el estudio publicado en Abril de 2023 por Valentina Pecoraro y colaboradores, en el cual analizaron el mismo polimorfismo que nosotros, tampoco observaron una asociación con mayor gravedad o mortalidad en los sujetos positivos para su presencia con respecto a los sujetos negativos²⁹, hecho que refuerza nuestros hallazgos.

En la misma línea de resultados se encuentra el estudio titulado "Las variantes del gen *ACE* y *ACE2* están asociadas con resultados graves de COVID-19 en hombres", que fue

publicado en Febrero de 2022, en el cual también está incluido el polimorfismo que hemos propuesto, y no se ha encontrado una relación con mayor gravedad/mortalidad de la infección, aunque si se ha relacionado la presencia de rs2074192 con hipertensión³⁰.

Estudio de la influencia de la variabilidad del gen que codifica la L-6: en este se propuso el polimorfismo rs1800795 localizado en la región del promotor del gen que codifica la IL6. En esta ocasión, al igual que en la anterior, no hemos podido establecer una correlación estadísticamente significativa entre los distintos alelos de este polimorfismo y un aumento de la mortalidad o de la gravedad por Covid-19. Por tanto, podemos afirmar que, en la cohorte de pacientes analizados en este estudio, no se ha confirmado la asociación. Hecho dispar con los resultados que se han comunicado en la literatura que si han demostrado una relación entre el polimorfismo objeto de nuestro estudio y una mayor gravedad en la infección por Covid-19. Uno de estos estudios ha mostrado esta asociación en una población del Norte de India, no obstante, concluyen que la asociación debe investigarse más a fondo, con un tamaño muestral superior para proporcionar un resultado definitivo³¹. Otro estudio realizado en China por Zheng-Rong Mao y colaboradores estableció una correspondencia entre la presencia del polimorfismo rs1800795 y un riesgo aumentado de desarrollar una sepsis inducida por neumonía pero no en pacientes infectados por COVID19³².

6. 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 en sangre y también 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.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Pattern of early human-to-human transmission of Wuhan 2019 novel coronavirus (2019-nCoV), December 2019 to January 2020. Euro Surveill., 25 (2020), pp. 2000058

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.*, 12(1):9, 2020.
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.; Tan, K. S.; Wang, D. Y. & Yan, Y. The origin, transmission and clinical therapies on Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) outbreak - An update on the status. *Mil. Med. Res.*, 7(1):11, 2020.
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 JX, Agbana YL, Sun ZS, Fei SW, Zhao HQ, Zhou XN, Chen JH, Kassegne K. Increased interleukin-6 is associated with long COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Infect Dis Poverty*. 2023 Apr 24;12(1):43. doi: 10.1186/s40249-023-01086-z. PMID: 37095536; PMCID: PMC10123579.
17. Hirano T. IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer. *Int Immunol*. 18 de diciembre de 2020;33(3):127-48.
18. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, Xiang J, Wang Y, Song B, Gu X, Guan L, Wei Y, Li H, Wu X, Xu J, Tu S, Zhang Y, Den H, Cao B. 2020. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet* 395:1054–1062 DOI 10.1016/S0140-6736(20)30566-3.
19. Zhang C, Wu Z, Li J, Zhao H, Wang G. 2020. Cytokine release syndrome in severe COVID-19: interleukin-6 receptor antagonist tocilizumab may be the key to reduce mortality. *International Journal of Antimicrobial Agents* 55(5):105954 DOI 10.1016/j.ijantimicag.2020.105954.
20. Mazzone A, Salvati L, Maggi L, Capone M, Vanni A, Spinicci M, Mencarini J, Caporale R, Peruzzi B, Antonelli A, Trotta M, Zammarchi L, Ciani L, Gori L, Lazzeri C, Matucci A, Vultaggio A, Rossi O, Almerigogna F, Parronchi P, Fontanari P, Lavorini F, Peris A, Rossolini G, Baroloni A, Romaganani S, Liotta F, Annunziato F, Cosmi L. 2020. Impaired immune cell cytotoxicity in severe COVID-19 is IL-6 dependent. *Journal of Clinical Investigation* 130(9):4694–4703 DOI 10.1172/JCI138554.
21. Gubernatorova E, Gorshkova E, Polinova A, Drutskaya MS. 2020. IL-6: relevance for immunopathology of SARS-CoV-2. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 53:13–24 DOI 10.1016/j.cytogfr.2020.05.00
22. Vaquero-Roncero LM, Sánchez-Barrado E, Escobar-Macias D, Arribas-Pérez P, de Castro RG, 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.
23. Hou W, Zhang W, Jin R, Liang L, Xu B, Hu Z. Risk factors for disease progression in hospitalized patients with COVID-19: a retrospective cohort study. *Infectious Diseases*. 2 de julio de 2020;52(7):498-505.
 24. Di Castelnuovo A, Bonaccio M, Costanzo S, Gialluisi A, Antinori A, Berselli N, et al. Common cardiovascular risk factors and in-hospital mortality in 3,894 patients with COVID-19: survival analysis and machine learning-based findings from the multicentre Italian CORIST Study. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. octubre de 2020;30(11):1899-913.
 25. Petrilli CM, Jones SA, Yang J, Rajagopalan H, O'Donnell L, Chernyak Y, et al. Factors associated with hospital admission and critical illness among 5279 people with coronavirus disease 2019 in New York City: prospective cohort study. *BMJ*. 22 de mayo de 2020;m1966.
 26. Cancer patients in SARS-CoV-2 infection: a nationwide analysis in China. *The Lancet Oncology*. 1 de marzo de 2020;21(3):335-7.
 27. de Lima C. Efectividad y seguridad de la Hidroxicloroquina y Cloroquina en el tratamiento de la infección asintomática y casos leves de COVID-19.
 28. CHEN J, LIU D, LIU L, LIU P, XU Q, XIA L, et al. 硫酸羟氯喹治疗2019冠状病毒病 (COVID-19)普通型患者的初步研究. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 25 de abril de 2020;49(2):215-9.
 29. Pecoraro V, Cuccorese M, Trenti T. Genetic polymorphisms of ACE1, ACE2, IFTM3, TMPRSS2 and TNF α genes associated with susceptibility and severity of SARS-CoV-2 infection: a systematic review and meta-analysis. *Clin Exp Med*. 13 de abril de 2023;1-14.
 30. Martínez-Gómez LE, Herrera-López B, Martínez-Armenta C, Ortega-Peña S, Camacho-Rea M del C, Suarez-Ahedo C, et al. ACE and ACE2 Gene Variants Are Associated With Severe Outcomes of COVID-19 in Men. *Front Immunol*. 17 de febrero de 2022;13:812940.
 31. Verma S, Verma S, Khan FH, Siddiqi Z, Raza ST, Abbas M, et al. Genetic polymorphisms of IL6 gene -174G > C and -597G > A are associated with the risk of COVID-19 severity. *Int J Immunogenet*. febrero de 2023;50(1):5-11.

32. Mao ZR, Zhang SL, Feng B. Association of IL-10 (-819T/C, -592A/C and -1082A/G) and IL-6 -174G/C gene polymorphism and the risk of pneumonia-induced sepsis. *Biomarkers*. 2017;22(2):106-12.

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: Jose Pablo Miramontes González



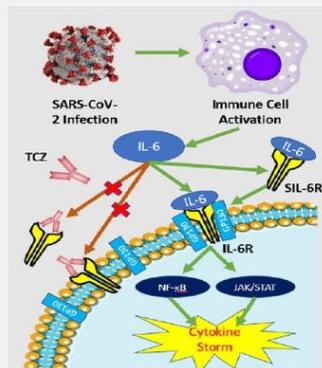
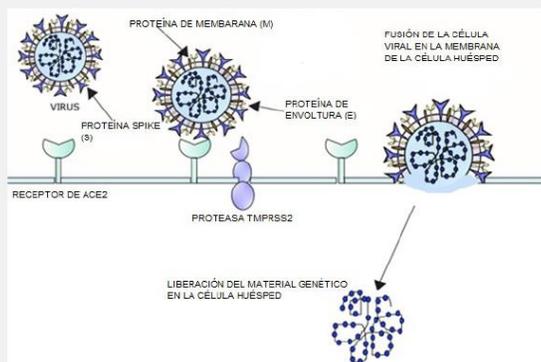
INTRODUCCIÓN



- **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	
	Moderada	47	13,9	
Grado cognitivo	Grave	42	12,4	p=0,048
	Demencia	41	12,1	
Tabaquismo	Activo	12	3,5	
	Ex Fumadores	57	16,8	
Factores de RV	No Fumadores	268	79,2	
	Dislipemia sí	133	39,3	
	HTA sí	196	57,9	
Comorbilidades	DM2 sí	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 IL6	Genotipos de rs1800795	Muerte por COVID			
		GC	GG	Total	
CC	Recuento	6	28	34	
	% rs1800795	17,6%	82,4%	100,0%	
	% muerte por COVID	7,9%	10,7%	10,1%	
	CG	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%	

CONCLUSIONES

No se encuentra una asociación estadísticamente significativa para los polimorfismos analizados de los genes de ACE2 e IL6. Por lo tanto, no podemos asegurar su relación con una infección más grave e incluso la muerte de los pacientes contagiados

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