



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

INFORME DEL SERVICIO SOCIAL:

**COVID-19 Y AFECIONES NEUROLÓGICAS: DESCRIPCIÓN Y RELEVANCIA DE LA
RESPUESTA INFLAMATORIA EN SU OCURRENCIA**

REALIZADO EN: INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROLOGÍA

PRESENTA:

TANIA MONSERRAT DELGADILLO HERNÁNDEZ

2173029137

FECHA DE ELABORACIÓN

08/08/2022 AL 08/02/2023

Abraham Faustino Vega

Asesor interno

Andrea Toledo Rojas

Asesor externo

Índice

1. Resumen	3
2. Introducción	4
3. Antecedentes	6
4. Objetivos	12
5. Material y métodos	13
6. Resultados	19
7. Análisis y discusión de resultados	26
8. Conclusiones	28
9. Referencias bibliográficas	29

Resumen

La pandemia actual de COVID 19 es producida por una cepa mutante de coronavirus, SARS-CoV-2. El virus SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Síndrome-Corona virus-2) fue detectado por primera vez en Wuhan, China, en diciembre 2019 (Hamid et al., 2020). Las manifestaciones principales del SARS-CoV-2 son respiratorias, pero en algunos de los pacientes presentan manifestaciones neurológicas agudas. Eso en relación con la afectación directa del Sistema Nervioso Central por el virus o por la reacción neuro inflamatoria asociada. Se propone mediante este proyecto ahondar en los conocimientos de las complicaciones agudas y a mediano plazo del COVID-19, evaluando en particular el papel de la inflamación en su ocurrencia. Se evalúa el estado inmunoinflamatorio de los pacientes a través de la evaluación de perfil de las citocinas IL-1, IL-6, IL10, IL12P40, IL12P70, IL17, INF- γ , de las moléculas de adhesión endoteliales solubles ICAM, VCAM y E-Selectina a través de la técnica ELISA. Si bien el este proyecto forma parte de un proyecto de mayor envergadura los resultados preliminares arrojan que las personas infectadas con COVID-19 tienden a aumentar más el nivel de las citocinas antes mencionadas, aunque existen excepciones.

Introducción

El virus SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Síndrome-Corona virus-2) es un coronavirus perteneciente a una gran familia de virus (Coronaviridae) que infectan diferentes aves y mamíferos. Esta familia a su vez se subdivide en 4 géneros: alfa, beta, gama y delta coronavirus. Siendo el SARS-CoV-2 sumamente relacionado con los beta-coronavirus (Mohamadian, 2021). Los coronavirus tienen una forma esférica o irregular con un diámetro entre 125nm. Su genoma es ARN monocatenario de sentido positivo. La longitud del genoma es de aproximadamente 30.000 ribonucleótidos en el cual hay 15 marcos abiertos (ORFs) que le permiten formar hasta 28 proteínas. También poseen una cápside helicoidal constituida por la proteína de nucleocápside (N), la cual se une al genoma viral en forma de rosario. Tienen envoltura lipídica con 3 proteínas ancladas a ella E (Envoltura), la cual es el componente más pequeño en la estructura del SARS-CoV-2 y facilita la producción, maduración y liberación de viriones, M (Membrana) y S (Spike) que se compone de subunidades de unión de receptor (S1) y de fusión de membrana celular (S2), siendo esta la más importante ya que además de darle al virión la apariencia de corona facilita la unión de la envoltura viral a los receptores de la enzima convertidora angiotensina 2 (ACE2) (Díaz 2020). En la figura 1 se puede apreciar una imagen del virus y sus partes.

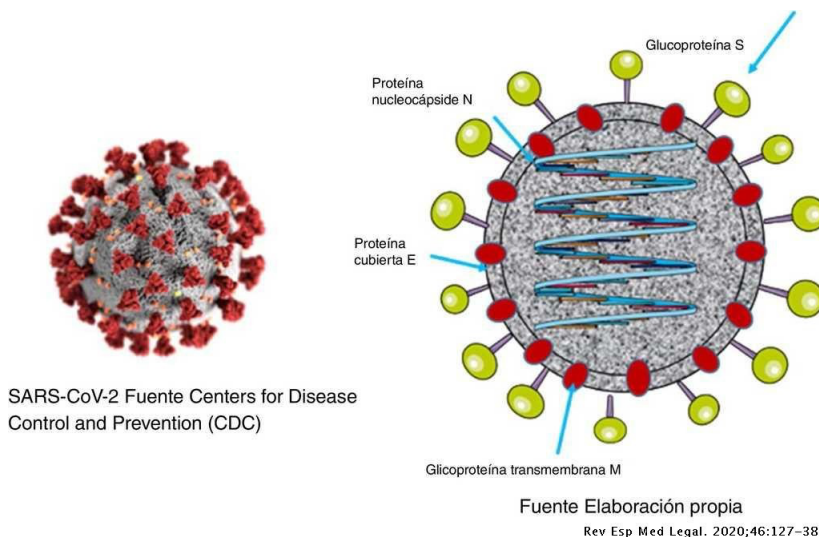


Figura 1. Imagen del SARS-CoV-2

La proteína ACE2 se encuentra principalmente en los pulmones, los riñones, el tracto gastrointestinal, el corazón, el hígado y los vasos sanguíneos (Mohamadian, 2021). Es un virus

bastante contagioso que se transmite rápidamente de persona a persona a través de la tos o secreciones respiratorias, y por contactos cercanos. El SARS-CoV-2 puede causar infección en múltiples órganos como se ha mostrado en estudios *in vitro* e *in vivo* además puede afectar el sistema nervioso central debido a los efectos indirectos de la tormenta de citoquinas o sospecha de invasión directa del virus (Kai-Wang, 2021). Además de la afectación neurológica aguda que puede ocurrir en pacientes con o sin enfermedades neuropsiquiátricas previas, es posible que los pacientes neuropsiquiátricos afectados presenten a mediano plazo una agravación de su enfermedad. Considerando esta situación queremos mediante este proyecto aumentar los conocimientos acerca de la relación COVID /Inflamación sistémica / neuro inflamación / manifestaciones neurológicas. También permitirá generar nuevos datos para entender mejor la patogenia de las manifestaciones neurológicas asociadas con la COVID-19, así como posiblemente, orientar hacia cual manejo terapéutico es el más adecuado para estos pacientes.

Antecedentes

COVID-19 (Coronavirus disease 2019)

La enfermedad causada por el SARS CoV-2 es la COVID-19 (Coronavirus disease 2019). La COVID 19 es una enfermedad altamente contagiosa por lo que el 11 de marzo de 2020 la OMS la declaro una enfermedad pandémica. Sus manifestaciones clínicas varían desde leves a graves, la mayoría de las personas desarrollan una enfermedad leve o asintomática (Bchetnia, 2020). Su presentación más frecuente es la afección del tracto respiratorio, pudiendo quedarse localizado en las vías aéreas altas (lo más frecuente, generalmente muy benigna) pero pudiendo también afectar los pulmones con distintos grados de gravedad. Provocando tos (67.7%), fiebre (87.9%) y fatiga (38.1%). En un estudio con numerosos pacientes afectados por COVID-19 (n= 44672), 80.9% fueron clasificados como leve/moderado, 13.8% como severo y 4.7% como críticos (Epidemiology Working Group for NCIP Epidemic Response, 2020). Estos últimos presentan neumonía severa, síndrome de dificultad respiratoria aguda, falla multiorgánica y muerte. En estos casos, se observó que la respuesta inflamatoria exacerbada es el mecanismo fisiopatológico principal que se asocia con la gravedad (Ye et al., 2020).

La COVID 19 afecta principalmente a adultos mayores y las personas con problemas de salud subyacentes como enfermedades cardiovasculares y diabetes están más expuestas a padecer un cuadro clínico grave de la enfermedad (Bchetnia, 2020).

Curiosamente los coronavirus están asociados con enfermedades del sistema nervioso central (SNC) como encefalomiелitis diseminada, la esclerosis múltiple, las convulsiones febriles y la encefalitis epilepsia. Varios estudios han demostrado que el coronavirus OC43 puede acceder al SNC a través del transporte axonal y la migración viral a través de las neuronas en el cerebro y algunos estudios han demostrado que particularmente el SARS-CoV puede ingresar al SNC a través de la circulación sanguínea (Amruta, 2021). Un estudio realizado en Wuhan informó que algunos pacientes mostraron manifestaciones neurológicas los síntomas más frecuentes incluyeron dolor de cabeza, alteración de la conciencia, anosmia y parestesia entre muchos otros. (Bchetnia,2022)

Afectaciones neurológicas en COVID

Las respuestas inflamatorias e inmunitarias al SARS-CoV-2 dan como resultado cambios en el sistema inmunitario provocando lesiones pulmonares y complicaciones en el SNC (Amruta,2021). En una serie de pacientes, provenientes de Wuhan China, se reportó de manera precisa la prevalencia de síntomas / patologías neurológicas en 214 pacientes afectados por COVID-19 (Mao et al., 2020). Los autores reportaron una prevalencia de alteraciones neurológicas de 36.4% (78 pacientes). Las alteraciones neurológicas más frecuentes fueron causadas por la afectación del sistema nervioso central, (53 pacientes, 67.9%), seguido por la afectación del sistema muscular (23 pacientes, 29.5%) y finalmente por afectaciones del sistema nervioso periférico (19 pacientes, 24.3%). Los principales síntomas reportados fueron mareos (16.8%), cefaleas (13.1%), afectaciones musculares (10.7%), alteraciones de la consciencia (7.5%), disgeusias (5.6%) y alteraciones del olfato (5.1%). Es de notar que 2.8% de los pacientes presentaron afecciones cerebrovasculares y 0.5% crisis epilépticas.

Otro estudio de más de 50 pacientes en Estrasburgo, Francia ingresados a cuidados intensivos y con presunto Covid-19, encontró características neurológicas asociadas a la infección en el 14% de los pacientes que ingresaron a cuidados intensivos mientras que un 67% con sedación. Los pacientes presentaron agitación (69%), confusión (65%) y signos del tracto corticoespinal (67%). Igual se encontró que el 33% de los pacientes dados de alta presentaron síndrome de disfunción ejecutiva como falta de atención o movimientos mal organizados (Aghagoli, 2021).

Otro estudio informó de pacientes que desarrollaron accidente cerebrovascular isquémico en personas que presentaban infección por SARS-CoV-2 grave. Otra afectación neurológica que se reportó con frecuencia fue el síndrome de Guillian-Barré (Payus,2020).

La presencia de la mayoría de las manifestaciones neurológicas era más frecuente en pacientes graves a nivel respiratorio, particularmente la alteración de la consciencia, la enfermedad cerebrovascular y la patología muscular. Los pacientes con patologías severas presentaban un estado inflamatorio más marcado con un aumento significativo de la de la proteína C reactiva (CRP). Asimismo, comparando pacientes con y sin patologías del sistema nervioso central, los pacientes neurológicos presentaban una disminución significativa en el número de plaquetas y de linfocitos.

La importancia de estudiar el aspecto neurológico en los pacientes con COVID-19 reside también en el hecho que la afectación neurológica podría tener repercusiones sobre el estado

respiratorio de los pacientes. Estudios realizados previamente con el virus SARS-CoV han mostrado que este virus tenía un tropismo particular hacia el tallo cerebral, donde se ubican los centros de control del sistema cardiorrespiratorio (Li et al., 2020). Conociendo las grandes similitudes que han mostrado estos 2 virus es factible pensar que podría ocurrir lo mismo con SARS-CoV-2. Así la afectación neurológica podría explicar, en parte, la gravedad de ciertos cuadros respiratorios que desarrollan los pacientes.

La anosmia y la ageusia son las manifestaciones neurológicas más comúnmente reportadas por una infección por Covid-19 (Aghagoli, 2021).

Respuesta inmunoinflamatoria periférica en COVID

La entrada celular del SARS-CoV-2 depende de las proteínas S que cubren la superficie del virión al receptor celular ACE2. Y del cebado de la proteína S por TMPRSS1. Durante la infección por SARS-CoV-2 se activan principalmente las células como las células T, células B, monocitos, macrófagos y las Natural Killer para combatir la infección al mismo tiempo se activa una respuesta débil de interferón (INF). Después de que se produzcan interacciones receptor-ligando entre estas células con el virus se inicia una cascada de citocinas proinflamatorias que puede propagarse por todo el cuerpo (Amruta,2021).

El SARS-CoV-2 activa rápidamente las células Th1 patógenas para secretar citocinas proinflamatorias. Los receptores inmunitarios unidos a la membrana pueden contribuir a una respuesta inflamatoria desequilibrada y la inducción débil de INF- γ puede ser un amplificador para producción de citoquinas (Hub, 2021).

La respuesta inmune del paciente en contra del virus parece mediada principalmente por citocinas y quimiocinas producidas por células de la respuesta inflamatoria, macrófagos y neutrófilos (Astuti & Ysrafil, 2020). Pocos estudios han evaluado su composición. En un estudio de 99 pacientes en China se observó un aumento de la IL-6 en 52% de los pacientes COVID-19 (Chen et al., 2020). En otro estudio (Huang et al., 2020), se notó un aumento de diferentes citocinas y quimiocinas (IL1B, IL1RA, IL7, IL8, IL9, IL10, basic FGF, GCSF, GMCSF, INF- γ , IP10, MCP1, MIP1A, MIP1B, PDGF, TNF α , and VEGF) en pacientes COVID-19 comparado con controles sanos. Así mismo IL2, IL7, IL10, GCSF, IP10, MCP1, MIP1A, y TNF α eran más elevados en pacientes con cuadros severos vs. cuadros más leves.

El síndrome respiratorio agudo grave (SARS) es la principal causa de muerte en los pacientes COVID-19, asociándose con fallas multiorgánicas. La tormenta de citocinas, enfermedad inmunitaria potencialmente mortal que es caracterizada por la activación de alto nivel de las células inmunitarias y la producción excesiva de citocinas inflamatorias masivas y mediadores químicos (Hu b, 2021), es considerada una de las causas más evidente de este síndrome, relacionado con una agravación súbita de los pacientes (Fu et al., 2020). Se ha mostrado que los niveles séricos de citocinas en estos pacientes están estrechamente vinculados con el desarrollo y la progresión del SARS, así como con la tasa de mortalidad de los pacientes (Ye et al., 2020).

Citocinas pro y antiinflamatorias

La activación de la respuesta inmune innata aguda da como resultado la liberación de mediadores proinflamatorios. TNF-a, IL1B, IL-6 e IL-17 son las citocinas efectoras clave que aumentan la permeabilidad de la barrera hematoencefálica a través de la activación y proliferación de la microglía. (Hu B, 2021)

IL1B: Es un polipéptido implicado como mediador de enfermedades infecciosas, inflamatorias y autoinmunes (Di Giovani, 1991). Después de una infección por COVID los niveles de IL1-B aumentan (Ramasamy, 2021)

IL-6: Los pacientes con COVID-19 han mostrado niveles altos de IL-6. Citocina que se crea a partir de monocitos y macrófagos los cuales son estimulados al principio de la infección. Algunos estudios arrojan que tener niveles elevados de IL-6 está relacionado con el daño pulmonar en pacientes con dicha enfermedad. Existe la posibilidad de bloquear su receptor para volverlo inactivo con la finalidad de aliviar los problemas asociados con esta citocina (Amruta, 2021).

IL-10: Citocina antiinflamatoria. Los pacientes con COVID-19 grave igual presentan niveles altos de IL-10. Es producida por las células T reguladoras. Por lo general, las infecciones virales en el pulmón provocan que la IL-10 disminuya la respuesta inflamatoria innata y evita que las células que producen IL-17 destruyan el tejido y la reducción de IL-6. Los niveles altos de citoquinas podrían hacer que la inmunidad adaptativa sea ineficaz provocando la exacerbación de los efectos del SARS-CoV-2 en la inflamación pulmonar (Amruta, 2021).

IL12P40: la IL-12 se cree que actúa para aumentar la secreción de NK (Wang, 2020) y aumentan notablemente los niveles durante una infección por COVID-19 en comparación con infecciones como SARS-CoV y MERS-CoV (Yingxia, 2020).

IL12P70: Es una citocina proinflamatoria (Garcia,2021). Durante la infección por SARS-COV-2 aumenta sus niveles (Pons, 2021). Un estudio demostró que los niveles altos de la interleucina 12 (P70), combinados con dos o tres comorbilidades cardiovasculares son asociados con una progresión de la gravedad de la enfermedad COVID-19 (Moll, 2021).

IL-17: Durante una infección por COVID 19, esta citocina IL-17 puede inducir la expresión del ligando 1 de la proteína quimioatrayente de monocitos y de la quimiocina (motivo CXC) en las células endoteliales neurovasculares, lo que da como resultado la migración trans endotelial de las células Th17 al parénquima cerebral. También puede desencadenar aún más la activación de mediadores proinflamatorios. Esta citocina junto con IL1B y TNF- γ pueden activar la actividad de la IL-6 (Hu B, 2021).

INF- γ : Durante la infección de SARS-CoV-2 se producen niveles elevados de esta citocina, son producidas por las células epiteliales, protege a las células cercanas al estimular la expresión genética estimulada por INF- γ al mismo tiempo que activa células inmunocompetentes como las células NK (Wang, 2020).

Las ICAM, VCAM, E-selectina: Son moléculas de adhesión celular, las cuales son inducidas por citocinas proinflamatorias. Un estudio mostró que en suero y plasma de pacientes con COVID-19 aumentan los niveles de expresión de estas moléculas también los niveles de ICAM-1 soluble y E-selectina se elevaron en el suero de los pacientes y se correlacionaron con la gravedad de la enfermedad (Shi, 2022).

Prueba de ELISA

La prueba de Elisa (Enzyme-linked immunosorbent assay) es una prueba inmunológica sensible que se utiliza para detectar y cuantificar sustancias como anticuerpos, antígenos, proteínas, glicoproteínas y hormonas. La interacción Anticuerpo-antígeno es la que utilizan las pruebas de ELISAs permitiendo identificar anticuerpos y antígenos específicos de proteínas específicas con pequeñas cantidades de muestra de problema. Los ensayos se realizan en placas de poliestireno de 96 pozos. Depende el tipo de Elisa se requiere un anticuerpo de detección

primario, un analito, anticuerpo de recubrimiento, un lavado y un sustrato. El anticuerpo primario es un anticuerpo específico dirigido a una proteína de interés, el anticuerpo de detección secundario es un segundo anticuerpo conjugado a enzima que se une a un anticuerpo primario que no está conjugado con enzima. (Alhaji, 2022).

Hay cuatro tipos principales de ELISA:

ELISA directo (placa recubierta de antígeno; detección de anticuerpos):

ELISA indirecto (placa recubierta de antígeno; detección de antígeno/anticuerpo): Los antígenos capturan a los anticuerpos y la reacción se evidencia por los conjugados anti-inmunoglobulina-enzima donde la cantidad de enzima enlazada indica la cantidad de anticuerpos en el suero y es medida por la degradación del sustrato (Ochoa, 2012)

Sándwich ELISA (placa recubierta de anticuerpo; detección de antígeno): Se pipetea la muestra de proteínas que se quiere analizar en el fondo de una placa de microvaloración que está revestida con el anticuerpo primario que actúa contra la proteína deseada. El analito primario “pesca” al analito de la mezcla. Después de lavar las proteínas no deseadas se vuelve a efectuar la detección mediante un anticuerpo secundario acoplado a la enzima que es específico para la proteína meta y no para el anticuerpo primario. El desarrollo de la coloración se mide con la ayuda de fotómetro. La cuantificación de la concentración de una proteína desconocida se determina mediante una curva patrón en donde se conocen las concentraciones preparadas del analito purificado que actúa como estándar (Bioquímica. Fundamento para la medicina y ciencias de la vida, 2008)

ELISA competitivo (anticuerpo de detección): Los anticuerpos o antígenos son inmovilizados sobre una fase sólida y es inhibida su unión con el conjugado antígeno-enzima anticuerpo-enzima por un analito no marcado en la muestra (Ochoa, 2012).

Objetivos

Objetivos general

Evaluar las consecuencias de la infección por SARS-CoV-2 y de la inflamación asociada con el estado neurológicos/ neuropsiquiátrico de pacientes con patologías neurológicas previas.

Objetivos particulares

Evaluar el estado inmunoinflamatorio periférico de los pacientes incluidos mediante la medición de citocinas anti y pro-inflamatorias.

Determinar la concentración de las citocinas: IL-1, IL-6, IL10, IL12P40, IL12P70, IL17, INF- γ , de las moléculas de adhesión endoteliales solubles ICAM, VCAM y E-Selectina en cada una de las muestras incluidas en el estudio.

Material y métodos

Población y tamaño de muestra

Se incluyeron (N=197) tres grupos de pacientes neurológicos/psiquiátricos seguidos en la consulta externa del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Manuel Velasco Suarez en la Ciudad de México:

Grupo 1: compuesto por pacientes neurológicos/psiquiátricos que tuvieron COVID-19 sintomático. N= 102

Grupo 2: compuesto por pacientes neurológicos/psiquiátricos que tuvieron COVID-19 asintomático. N= 41

Grupo 3: grupo control, compuesto por pacientes neurológicos/psiquiátricos sin antecedentes de infección por SARS-Cov-2. N=54

De cada uno de estos pacientes se ha tomado una muestra mediante venopunción previa firma de un consentimiento informado en el cual los pacientes aceptan participar en el estudio. Como el presente proyecto tiene contemplado la evaluación a mediano y largo plazo, en estos momentos se siguen recolectando las segundas tomas de muestras de estos pacientes (6-8 meses posteriores a la primera toma de muestra) las cuales también serán incluidas en las determinaciones del perfil inflamatorio.

A cada uno de los pacientes les fue y será practicado un cuestionario que incluyeron desde datos generales hasta variables demográficas como (sexo, edad) así como factores de riesgos (ej. peso, talla, IMC, tabaquismo, HTA, DMNID, etc.).

Toma de muestra

Como se ha mencionado, al momento de la inclusión y seguimiento de los pacientes se obtuvo una muestra de sangre periférica mediante venopunción. Las muestras fueron colectadas mediante el sistema de tubos BD Vacutainer® (número de catálogo 367863) con gel separador para poder obtener una muestra de suero. El suero fue obtenido mediante centrifugación a 2000 rpm durante 10 minutos. El suero fue fraccionado y rotulado en microtubos de 1.5 ml,

posteriormente fueron etiquetados adecuadamente y congelados a -80°C hasta su posterior utilización.

Evaluación del estado inmunoinflamatorio sistémico

La evaluación del perfil de citocinas fue mediante la técnica de ELISA mediante el uso de kits comerciales de la marca BIOLEGEND (Kit LEGEND MAX™) se llevó a cabo la determinación de IL1B, IL6, IL10, IL12P40, IL12P70, IL17 e INF- γ . Mientras que la evaluación del perfil de citocinas para ICAM, VCAM y E-Selectina se realizaron con el kit comercial de la marca R&D Systems abio-techne Brand en cada una de las muestras de sueros incluidas en el estudio.

ELISA IL1B, IL6, IL10, IL12 (P40), IL12 (P70), IL17 e INF- γ .

1. Se añadió 100 μl de anticuerpo de Captura (12 mL de coating buffer A 1X + 60 μl de anticuerpo de captura 200X) en cada pocillo de la placa y se dejó incubando durante la noche a temperatura de entre 2° y 8°C .
2. Al siguiente día se lavó la placa 4 veces con un amortiguador de lavado (PBS 1X + 500 μl de tween 20) en un lavador de microplacas (Thermo Scientific wellwash) y se bloqueó con 200 μl de Assay Diluent (12 mL de assay diluent A 5X + 48mL PBS 1X) y se dejó incubando una hora con agitación a temperatura ambiente.
3. Posteriormente se volvió a lavar 4 veces y se colocaron en cada pocillo 100 μl de las muestras problemas y de la curva estándar antes preparada, se incubó nuevamente 2 horas en agitación a temperatura ambiente.
4. Pasado el tiempo requerido se procedió a lavar 4 veces y se añadieron 100 μl a cada pocillo de anticuerpo de detección (60 μl Ac detección 200X + 12 mL de Assay Diluent A) y se dejó incubando 1 hora con agitación a temperatura ambiente.
5. Nuevamente se lavó 4 veces y se añadieron 100 μl de la solución de Advin-HRP (12 μl de Advin-HRP 1000X + 12 mL de Assay Diluent A) y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación.
6. Posteriormente se lavó nuevamente la placa 5 veces con un intervalo de tiempo entre cada lavado de 45 segundos y se le añadieron 100 μl de Sustrato Solución F (TMB) y se dejó a temperatura ambiente en la oscuridad durante 20 minutos.
7. A cada pocillo se le añadieron 100 μl de la solución de paro (H_2SO_4 2N), se leyó en un espectrofotómetro para microplacas (Thermo Scientific Multiskan FC) a 450 nm.

La preparación de las curvas estándar para cada una de las citocinas fue diferente, esto se resume en la siguiente tabla:

Tabla 1. Preparación de curvas estándar

IL1B	Para preparar 125 pg/mL del estándar, primero se prepara una solución 1:10 (10 μ l de stock estándar y 90 μ l de Assay Diluent A). Después se agregan 13.9 μ l de esta disolución a 986.1 μ l de Assay Diluent A 1X. Se preparan otros 5 tubos con 500 μ l de Assay Diluent 1X y se hacen diluciones en serie del tubo 1 al 5 sucesivamente.
IL6	Para preparar 500 pg/mL del estándar se agregan 3.3 μ l de stock estandar a 996.7 μ l de Assay Diluent A 1X. Se preparan otros 5 tubos con 500 μ l de Assay Diluent 1X y se hacen diluciones en serie del tubo 1 al 6 sucesivamente.
IL10	Para preparar 250 pg/mL del estándar, primero se prepara una solución 1:10 (10 μ l de stock estándar y 90 μ l de Assay Diluent A). Después se agregan 23.1 μ l de esta dilución a 976.9 μ l de Assay Diluent A 1X. Se preparan otros 5 tubos con 500 μ l de Assay Diluent 1X y se hacen disoluciones en serie del tubo 1 al 6 sucesivamente
1L12 P40	Para preparar 4000 pg/mL del estándar, se agregan 47.1 μ l del estándar stock reconstituido a 952.9 μ l de Assay Diluent A 1X. Se preparan otros 5 tubos con 500 μ l de Assay Diluent 1X y se hacen diluciones en serie del tubo 1 al 6 sucesivamente.
IL12 P70	Para preparar 1000pg/mL del estándar, primero se prepara una solución se agregan 14.8 μ l de estándar stock reconstituido a 985.2 μ l de Assay Diluent A 1X. Se preparan otros 5 tubos con 500 μ l de Assay Diluent 1X y se hacen diluciones en serie del tubo 1 al 6 sucesivamente.
IL17	Para preparar 250 pg/mL del estándar, se agregan 3.9 μ l del estándar stock reconstituido a 996.1 μ l de Assay Diluent A 1X. Se preparan otros 5 tubos con 500 μ l de Assay Diluent 1X y se hacen disoluciones en serie del tubo 1 al 6 sucesivamente.
INF- γ	Para preparar 500 pg/mL del estándar, se agregan 5.2 μ l de esta disolución a 994.8 μ l de Assay Diluent A 1X. Se preparan otros 5 tubos con 500 μ l de Assay Diluent 1X y se hacen disoluciones en serie del tubo 1 al 6 sucesivamente.

ELISA ICAM-1

1. Se diluyó el anticuerpo de captura en PBS 1X (83.3 μ l en 10 mL de PBS), se mezcló en un vortex y se colocaron 100 μ l a cada pocillo de la placa y se cubrió con una película. Se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente.
2. Al siguiente día se lavó 3 veces la placa con 300 μ l de amortiguador de lavado (500 μ l tween 20 en 1000 mL de PBS 1X) en un lavador de microplacas (Thermo Scientific wellwash).
3. Se bloqueó la placa con 300 μ l de Reagent Diluent (1g BSA en 100 mL de PBS 1X). Se incubó 1 hora a temperatura ambiente.
4. Se lavó como en el paso 2 y se adicionan las muestras problema con la curva estándar 100 μ l por pocillo. Se incubó por 2 horas a temperatura ambiente.
5. Se volvió a lavar como en el paso 2 y se adicionaron 100 μ l de Ac de detección a cada pocillo (166.6 μ l AC detección 10 ml de Reagent Diluent). Se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente.
6. Se lavó como en el paso 2 y se añaden 100 μ l de disolución de strptoavidina-HRP a cada pocillo (250 μ l de strptoavidina-HRP en 10ml de Reagent Diluent). Se cubrió la placa con papel aluminio y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente.
7. Se lavó como en al paso 2 y se adicionó 100 μ l de la solución de sustrato de TMB (5ml de sustrato TMB a + 5 mL de sustrato TMB B), se cubre de la luz y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente.
8. Se adicionaron 50 μ l de la solución de parada (H₂SO₄ 2N) y se leyó a 450 nm en un espectrofotómetro para microplacas (Thermo Scientific Multiskan FC).

Para obtener 2000 pg/ml de la curva estándar se preparó añadiendo 25 μ l de la solución de estándar stock reconstituido a 1 ml de Reagent Diluent y se prepararon 6 tubos más con 500 μ l Reagent Diluent, los cuales junto con la primera dilución se enumeran del 1 al 7 y se realizaron diluciones seriadas hasta tener un valor de detección mínimo de 31.3 pg/ml.

ELISA VCAM-1

1. Se diluyó el anticuerpo de captura en PBS 1X (83.3 μ l en 10 mL de PBS), se mezclaron en un vortex y se colocaron 100 μ l a cada pocillo de la placa y se cubrió la placa con una película. Se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente.

2. Al siguiente día se lavó 3 veces la palca con 300 μ l de amortiguador de lavado (500 μ l tween 20 en 1000 mL de PBS 1X) en un lavador de microplacas (Thermo Scientific wellwash).
3. Se bloqueó la placa con 300 μ l de Reagent Diluent (1g BSA en 100 mL de PBS 1X). Se incubó 1 hora a temperatura ambiente.
4. Se lavó como en el paso 2 y se adicionaron las muestras problema con la curva estándar 100 μ l por pocillo. Se incubó por 2 horas a temperatura ambiente
5. Se volvió a lavar como en el paso 2 y se adicionan 100 μ l de Ac de detección a cada pocillo (166.6 μ l AC detección 10 ml de Reagent Diluent). Se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente.
6. Se lavó como en el paso 2 y se añaden 100 μ l de disolución de streptoavidina-HRP a cada pocillo (250 μ l de estreptoavidina-HRP en 10 ml de reagent diluent). Se cubrió la placa con papel aluminio y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente.
7. Se lavó como en el paso 2 y se adicionan 100 μ l de la solución de sustrato de TMB (5 ml de sustrato TMB A + 5mL de sustrato TMB B). Se cubrió de la luz y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente.
8. Se adicionaron 50 μ l de la solución de parada (H_2SO_4 2N) y se leyó a 450 nm en un espectrofotómetro para microplacas (Thermo Scientific Multiskan FC).

Para obtener 1000 pg/ml de la curva estándar se prepararon añadiendo 15.6 μ l de la solución de estándar stock reconstituido a 1ml de Reagent Diluent y se prepararon 6 tubos más con 500 μ l Reagent Diluent, los cuales junto con la primera dilución se enumeraron del 1 al 7 y se realizaron diluciones seriadas hasta tener un valor de detección mínimo de 15.6 pg/ml.

ELISA E-SELECTINA

1. Se diluyó el Anticuerpo de captura en PBS 1X (83.3 μ l en 10 mL de PBS), se mezcló en un vortex y se colocaron 100 μ l a cada pocillo de la placa y se cubrió la placa con una película. Se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente.
2. Al siguiente día se lavó 3 veces la palca con 300 μ l de wash amortiguador de lavado (500 μ l tween 20 en 1000 mL de PBS 1X) en un lavador de microplacas (Thermo Scientific wellwash).

3. Se bloqueó la placa con 300 µl de Reagent Diluent (1g BSA en 100mL de PBS 1X). Se incubó 1 hora a temperatura ambiente.
4. Se lavó como en el paso 2 y se adicionan las muestras problema con la curva estándar 100µl por pocillo. Se incubó por 2 horas a temperatura ambiente.
5. Se volvió a lavar como en el paso 2 y se adicionan 100 µl de Ac de detección a cada pocillo (166.6 µl AC detección 10 ml de Reagent Diluent). Se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente.
6. Se lavó como en el paso 2 y se añaden 100 µl de disolución de estreptoavidina-HRP a cada pocillo (250 µl de estreptoavidina-HRP en 10 ml de Reagent Diluent). Se cubrió la placa con papel aluminio y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente.
7. Se lavó como en el paso 2 y se adicionan 100 µl de la solución de sustrato de TMB (5 ml de sustrato TMB a + 5 ml de sustrato TMB B). Se cubrió de la luz y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente.
8. Se adicionaron 50 µl de la solución de parada (H_2SO_4 2 N) y se leyó a 450 nm en un espectrofotómetro para microplacas (Thermo Scientific Multiskan FC).

Para obtener 6000 pg/ml de la curva estándar se prepara añadiendo 93.3 µl de la solución de estándar stock reconstituido a 1 ml de Reagent Diluent y se prepararon 6 tubos más con 500 µl Reagent Diluent, los cuales junto con la primera dilución se enumeraron del 1 al 7 y se realizaron diluciones seriadas hasta obtener un valor mínimo de detección de 93.3 µl.

Análisis estadístico

La información se recabó y agrupó en el programa Excel y mediante Prism® se evaluaron las diferencias significativas en las variables entre los 3 grupos mediante pruebas no paramétricas para comparar medias (Krukall Wallis Test Non parametric ANOVA). Los datos se presentaron como números y porcentajes en el caso de variables dicotómicas, o como media ± desviación estándar en el caso de variables continuas

Resultados

Entre agosto del 2021 y enero de 2022 se incluyeron en este estudio 197 pacientes del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Dr. Manuel Velasco Suárez (INNN), de los cuales 143 tuvieron antecedente de COVID-19 (102 sintomáticos y 41 asintomáticos) y 54 pacientes se incluyeron como controles (pacientes con enfermedad neurológica). Las principales características de los pacientes incluidos se presentan en la tabla 2. La mayoría fueron mujeres (74%), sin diferencias significativas entre los 3 grupos. La edad y el IMC no fueron significativamente diferentes entre los grupos. La mayoría de los pacientes incluidos en cada uno de los tres grupos no presentaban comorbilidades de interés, la frecuencia de factores de riesgo vascular (diabetes, hipertensión arterial, dislipidemia) fue significativamente diferente entre los 3 grupos ($p=0,03$), con mayor frecuencia en los pacientes COVID-19, sintomáticos y asintomáticos, en comparación con el control ($p= 0,01$).

Tabla 2. Características de pacientes

	COVID 19 (n=143)		Controles (n=54)
	Sintomáticos (n=102)	Asintomáticos (n=41)	
Sexo			
Femenino	64.7%	60.9%	59.3%
Masculino	35.3%	39.1%	40.7%
Edad (media)	41 años	46 años	42 años
Enfermedades			
Epilepsia	31.37%	39.02%	31.48%
Nervios y músculos	13.72%	19.51%	9.25%
Desmielinizante	11.76%	2.43%	12.96%
Patología psiquiátrica	12.74%	7.31%	5.5%
Degenerativas	8.8%	12.19%	16.66%
Cefalea	6.86%	7.31%	3.7%

Vascular	5.88%	2.43%	3.70%
Autoinmunidad	0%	4.87%	0%
Tumoral	0.98%	4.87%	1.85%
Neurocisticercosis	0.98%	0	1.85%

Respecto a los resultados obtenidos en la determinación de las citocinas y como se mencionó anteriormente, el presente trabajo está incluido en un proyecto de mayor envergadura, al momento del reporte del presente trabajo se llevaron a cabo la determinación de 7 citocinas pro y anti inflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-10, IL17 A, IL-12 P40, IL-12 P70, INF- γ) y tres moléculas de adhesión endotelial (VCAM-1, ICAM, E-selectina) mediante la técnica de ELISA en los tres grupos incluidos.

A continuación, se presentan los resultados graficados de dichas citocinas y factores endoteliales obtenidos hasta el momento de la redacción de presente escrito, las cuales se expresan en medias \pm DS. Se calcularon los vales de P para ver si había diferencias significativas entre los diferentes grupos (sintomático, asintomático y control) las cuales se indican (*).

Después de seis meses de la recolección de la primera muestra se comenzó a tomar una segunda muestra (mayo a diciembre 2022) a los pacientes para nuevamente evaluar el perfil de las citocinas, cabe destacar que hasta el momento solo se han recolectado 73 muestras: 57 provenientes de pacientes que tuvieron COVID-19, 46 de ellos pacientes sintomáticos, 11 asintomáticos y 16 controles sanos. La barra azul corresponde a los perfiles de cada citocina arrojados en la primera toma de muestra mientras que la barra naranja corresponde a la segunda toma de muestra.

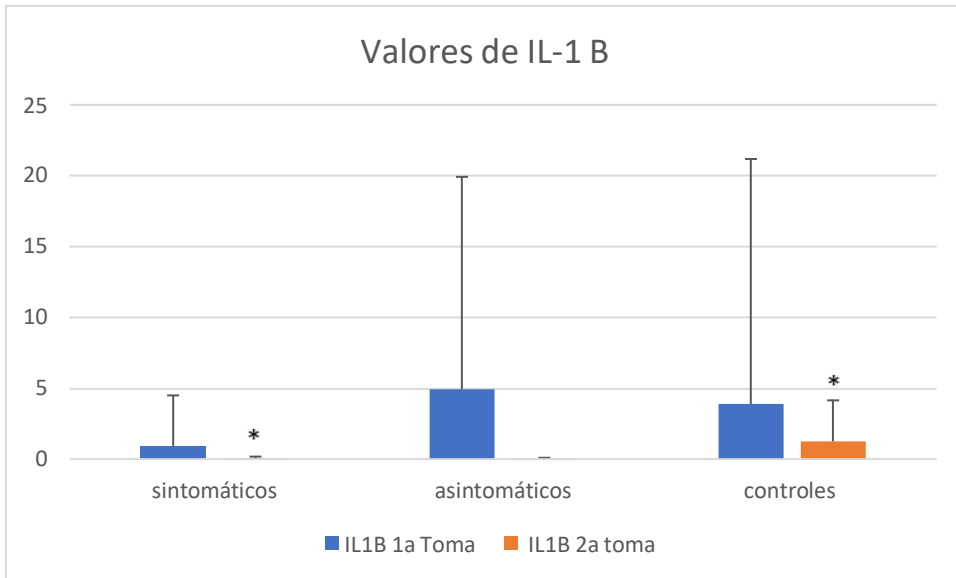


Gráfico 1. Perfil de citocina IL-1b. *P<0.05 Sintomáticos 2a vs controles 2^a

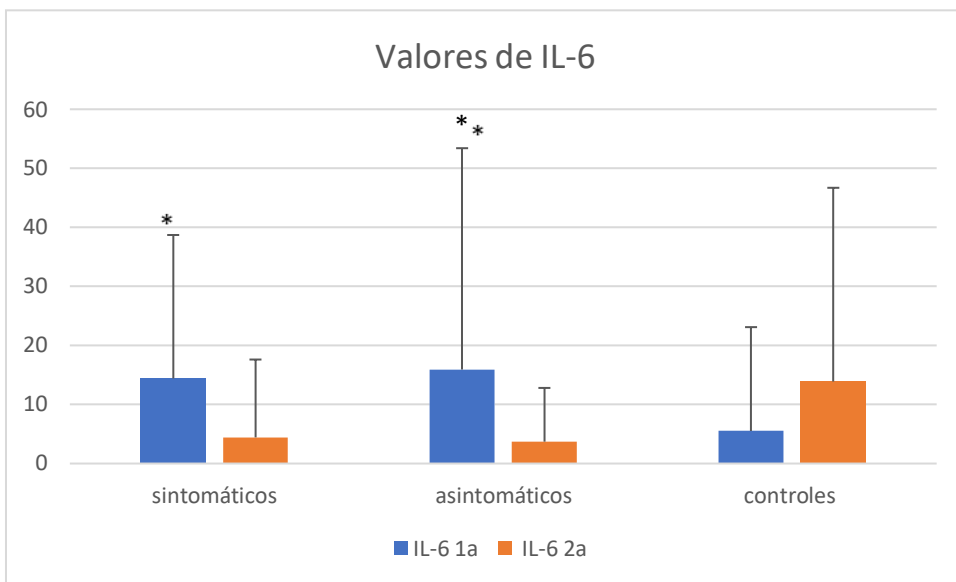


Gráfico 2. Perfil de citocina IL-6. **P<0.01 Asintomáticos 1a vs. controles 1a. * P<0.01 Sintomáticos 1a vs. controles 1^a.

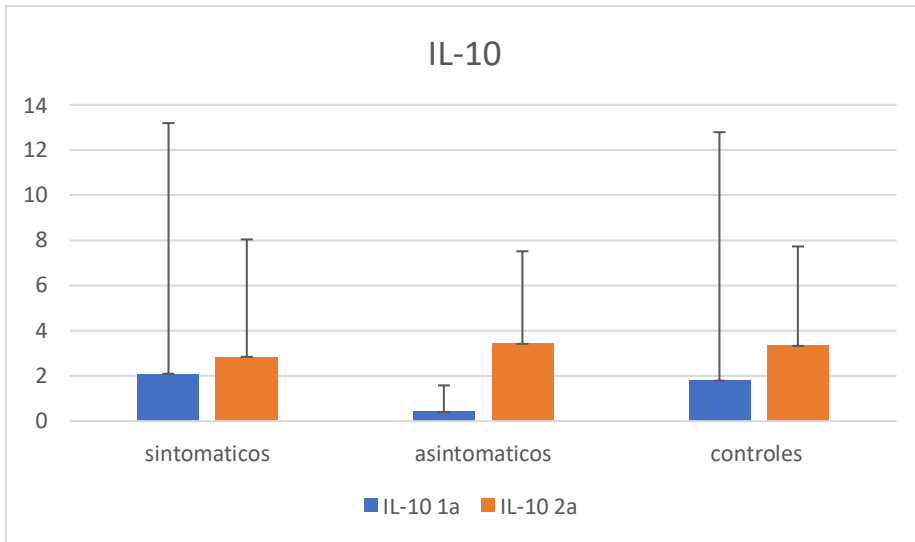


Gráfico 3. Perfil de citocina IL-10

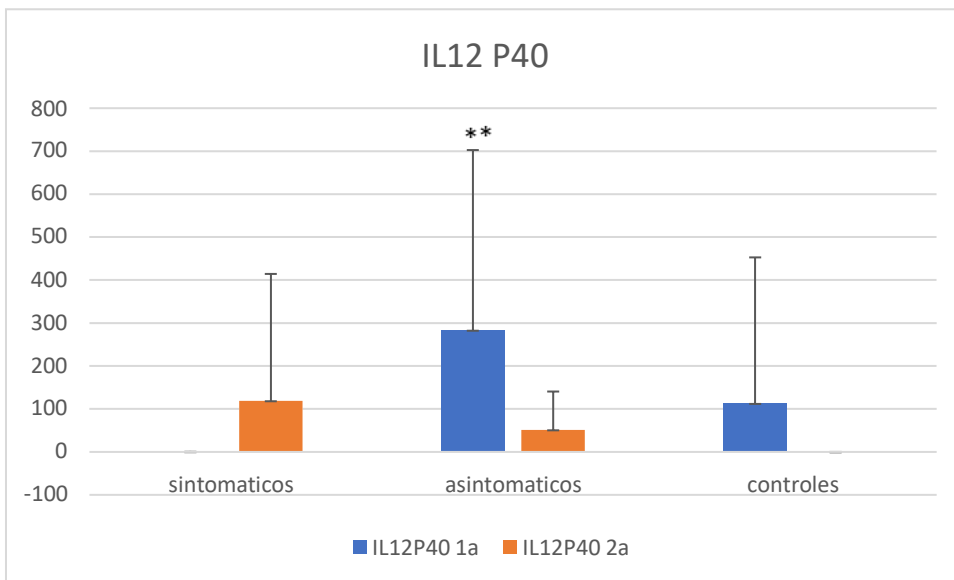


Gráfico 4. Perfil de citocina IL-12 P40. *P<0.001 Sintomáticos 1a vs asintomáticos 1ª. **P<0.001 asintomáticos 1a vs controles 1ª.

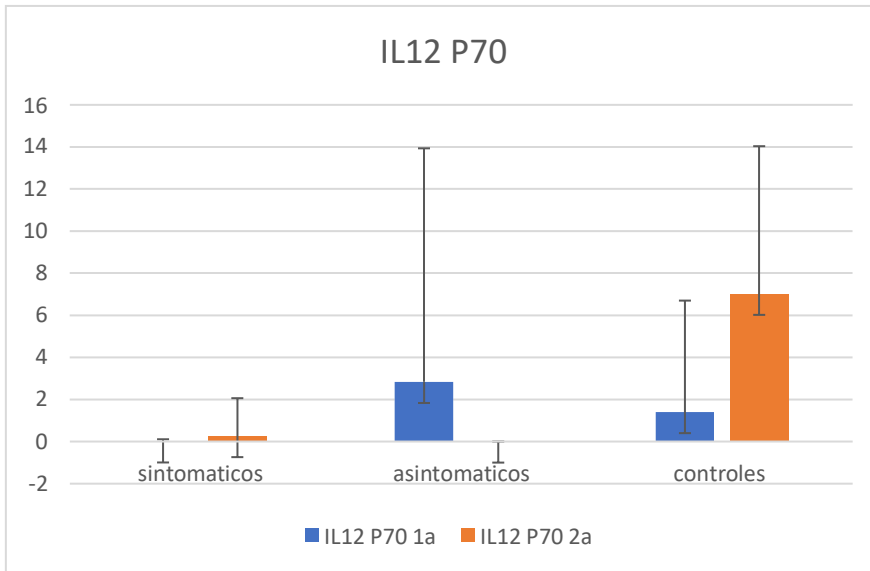


Gráfico 5. Perfil de citocina IL-12 P70

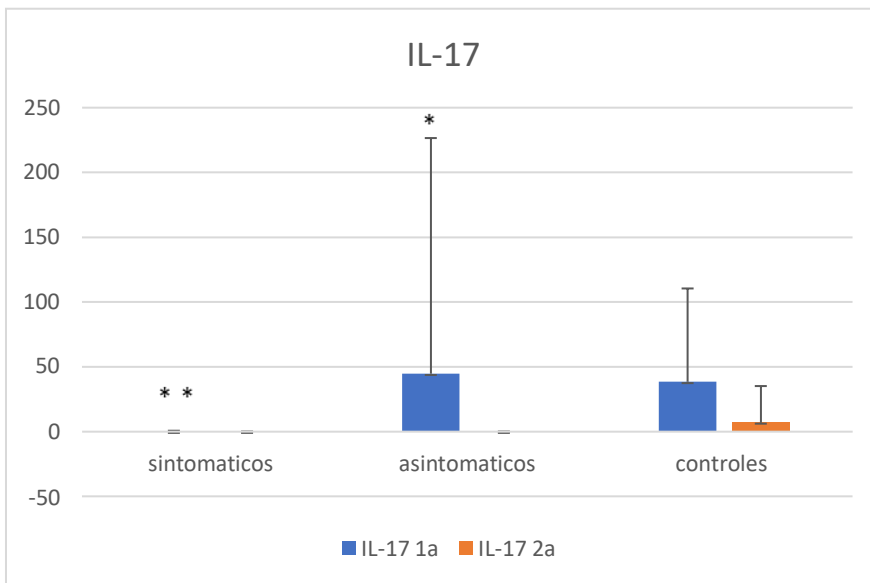


Gráfico 6. Perfil de citocina IL-17. **P<0.001 Sintomáticos 1a vs Controles 1a. *P<0.001 Asintomáticos 1a vs Controles 1a.

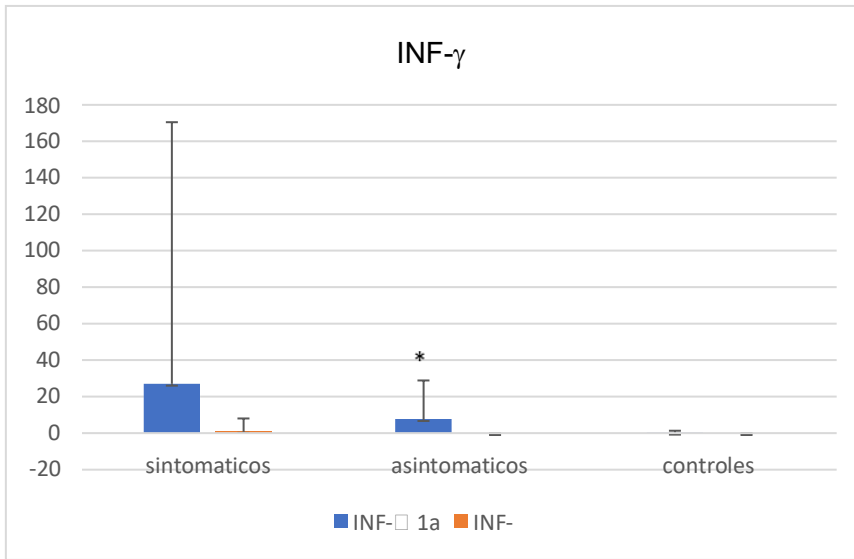


Gráfico 7. Perfil de citocina INF-γ. *P<0.01 Asintomáticos 1a vs control 1a.

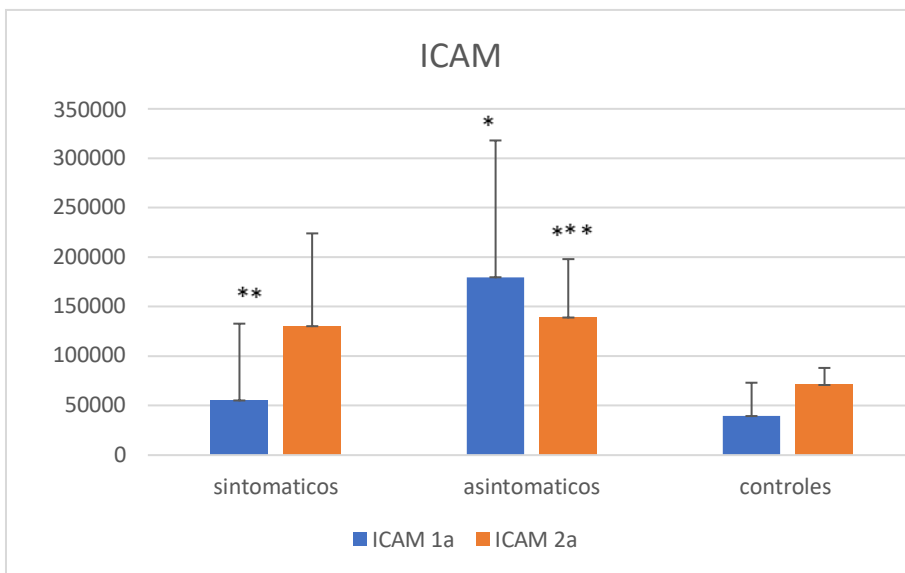


Gráfico 8. Perfil de ICAM. **P<0.001 Sintomáticos 1a vs asintomaticos1a. *P<0.001 Asintomáticos 1a vs control 1a. ***P<0.05 Asintomáticos 2a vs control 2^a.

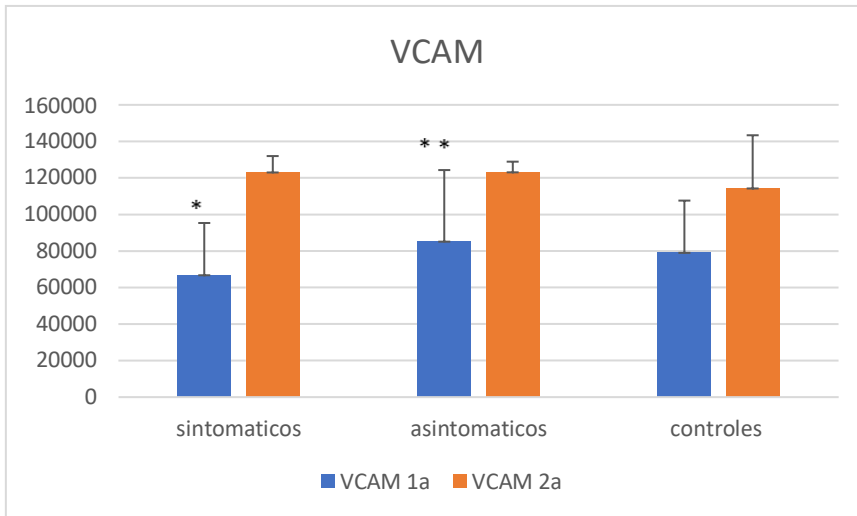


Gráfico 9. Perfil de VCAM. *P<0.05 Sintomáticos 1a vs asintomáticos y control 1a. **P<0.05 Asintomáticos 1a vs control 1a.

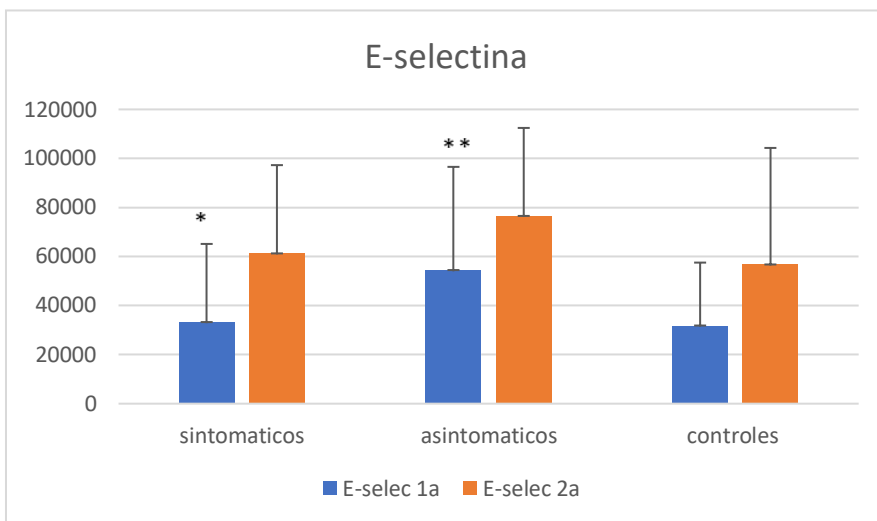


Gráfico 10. Perfil de E-selectina. *P<0.05 Sintomáticos 1a vs control 1a. **P<0.05 Asintomáticos 1a vs control 1a.

Análisis y discusión de resultados

Como se menciona anteriormente el presente proyecto forma parte de un proyecto de mayor envergadura y este aún no ha finalizado, los resultados vertidos en este reporte, así como los análisis realizados son parciales y se encuentran aún en desarrollo.

Como puede observarse en el grafico 1, no se encontraron diferencias significativas entre los valores de IL1B en las muestras iniciales de nuestros tres grupos de pacientes, pasados los 6 meses, en la segunda toma de muestra, se observa que disminuyeron los niveles de esta citocina en todos nuestros grupos respecto a la primera toma sin embargo solo encontramos diferencias significativas en el grupo de pacientes asintomáticos en relación con los controles ($p < 0.05$).

Respecto a la IL-6 encontramos valores mayores de esta citocina en nuestro grupo de pacientes sintomáticos y asintomáticos con respecto al grupo control ($p < 0.05$) en las primeras tomas de muestra, si bien estos valores disminuyeron en las segundas tomas, no encontramos diferencias entre los grupos, esto quizás podría deberse a la disminución en la N de nuestros pacientes, al momento de la realización del presente reporte aún no se contaban con todas las segundas muestras de los pacientes incluidos en el estudio.

IL-10 mostró un nivel muy similar en los tres grupos, en las primeras tomas de muestra, si bien en la segunda toma de muestra se observa que aumentan levemente los niveles tampoco se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

Los niveles de IL-12 P40 fueron altos para el grupo de asintomáticos y controles por lo cual hubo diferencia significativa de estos grupos con respecto a los sintomáticos, en donde los niveles de esta citocina fueron muy bajos. Por el contrario, en la segunda toma de muestra los niveles de IL-12 P40 de los pacientes sintomáticos subieron y los asintomáticos y controles bajaron.

En cuanto a IL-12 P70 los tres grupos presentaron bajos niveles de dicha citocina por lo que no se presentaron diferencias significativas y fue el mismo caso que para la segunda toma de muestra.

Respecto a IL-17 se encontró diferencia significativa entre el grupo de sintomáticos vs control y asintomáticos vs control, para la segunda toma de muestra todos los valores disminuyeron y en el caso de los grupos sintomático y asintomáticos no fue detectable en ninguno de los grupos.

Para INF- γ en el grupo de pacientes sintomáticos los niveles si bien fueron elevados no mostraron diferencias significativas respecto a los controles. El grupo de asintomáticos presentó diferencia significativa contra el grupo control. En ambos grupos hubo disminución de esta citocina después de los seis meses.

El grupo de asintomáticos presentó un nivel alto de ICAM-1 por lo que este grupo presentó diferencias significativas contra el grupo de asintomáticos y el grupo de controles tanto en la primera como en la segunda toma de muestra.

VCAM presentó diferencias significativas en todos los grupos de la primera toma de muestra, los niveles de esta aumentaron en la segunda toma de muestra en donde ya no se encontraron diferencias significativas dentro de los grupos.

Por último, en E-selectina hubo diferencias significativas dentro del grupo de pacientes sintomáticos contra asintomáticos y el grupo asintomáticos contra control, esto debido a que los niveles de E-selectina son más altos en el grupo de asintomáticos. Pasando los seis meses los niveles aumentaron en todos los grupos y ya no se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

Conclusiones

Desde diciembre del 2019, el SARS-CoV-2 ha evolucionado de manera trascendental, ocasionando no solo muertes, sino también diversas secuelas en algunos de los pacientes infectados.

Se evaluaron las consecuencias de la infección por SARS-CoV-2 en cuanto el estado inmunoinflamatorio periférico de los pacientes, al determinar las concentraciones de IL-1, IL-6, IL10, IL12P40, IL12P70, IL17, INF- γ , de las moléculas de adhesión endoteliales solubles ICAM, VCAM y E-Selectina.

En este estudio, en el caso IL-6 e INF- α aumentaron los niveles en los pacientes infectados respecto a los pacientes control, en algunos casos los pacientes asintomáticos presentaban los niveles más altos como en IL-12 P40 e IL-17, lo cual concuerda con la literatura.

ICAM, VCAM y E-selectina son moléculas de adhesión endotelial las cuales presentaron sus niveles más altos en pacientes con COVID-19 asintomático y con excepción de VCAM los niveles de pacientes infectados con COVID fueron más altos, tal como marca la literatura.

En el seguimiento a mediano plazo se observa que los niveles de IL-1 β , IL12 P40, IL17 e INF- γ disminuyeron pasando los seis meses de la infección por COVID-19, al igual que los niveles de IL-6 aunque esta citocina presentó un aumento en los pacientes control, esto podría ser debido a que estos pacientes se pudieron haber infectado por COVID-19 o por alguna otra infección. IL-10 e IL-12 P70 mantuvieron sus concentraciones y los niveles de las moléculas de adhesión endotelial aumentaron.

Los resultados preliminares permiten observar cambios en el perfil inflamatorio de los pacientes en aproximadamente 6-8 meses, una vez terminado todo el procesamiento de las muestras y ver el efecto que tuvieron estas en el perfil clínico de los pacientes se podrá determinar si la COVID-19 tuvo efectos en la desregulación del perfil neuroinflamatorio y como consecuencia en el estado neurológico de los pacientes incluidos. Si bien, ninguno de los pacientes incluidos presentó enfermedad severa de COVID19, se desconoce si un cambio en la condición inflamatoria periférica de los pacientes podría tener efectos a largo plazo cambiando las condiciones de la enfermedad neurológica preexistentes, este tipo de estudios nos permitirán sin duda alguna poder esclarecer este tipo de hallazgos.

Referencias bibliográficas

1. Aghagoli, G., Gallo Marin, B., Katchur, N. J., Chaves-Sell, F., Asaad, W. F., & Murphy, S. A. (2021). Neurological Involvement in COVID-19 and Potential Mechanisms: A Review. *Neurocritical care*, 34(3), 1062–1071. <https://doi.org/10.1007/s12028-020-01049-4>
2. Amruta, N., Chastain, W. H., Paz, M., Solch, R. J., Murray-Brown, I. C., Befeler, J. B., Gressett, T. E., Longo, M. T., Engler-Chiurazzi, E. B., & Bix, G. (2021). SARS-CoV-2 mediated neuroinflammation and the impact of COVID-19 in neurological disorders. *Cytokine & growth factor reviews*, 58, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2021.02.002>
3. Alhaji M, Farhana A. (2022). Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): Publicación de StatPearls. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555922>
4. Astuti I, Ysrafil. (2020). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. *Diabetes Metab Syndr.* 18;14(4):407-412. doi: 10.1016/j.dsx.2020.04.020.
5. Bchetnia M, Girard C, Duchaine C, Laprise C. (2020). The outbreak of the novel severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): A review of the current global status. *J Infect Public Health* (11):1601-1610. doi: 10.1016/j.jiph.2020.07.011. Epub 2020 Aug 4. PMID: 32778421; PMCID: PMC7402212.
6. Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, Qiu Y, Wang J, Liu Y, Wei Y, Xia J, Yu T, Zhang X, Zhang L. (2020). Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet.* 15;395(10223):507-513. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7
7. di Giovine, F. S., Symons, J. A., & Duff, G. W. (1991). Kinetics of IL1 beta mRNA and protein accumulation in human mononuclear cells. *Immunology letters*, 29(3), 211–218. [https://doi.org/10.1016/0165-2478\(91\)90172-7](https://doi.org/10.1016/0165-2478(91)90172-7)
8. Fu Y, Cheng Y, Wu Y. (2020). Understanding SARS-CoV-2-Mediated Inflammatory Responses: From Mechanisms to Potential Therapeutic Tools [published online ahead of print. *Virol Sin.* 2020;1-6. doi:10.1007/s12250-020-00207-4

9. Garcia, M. A., Barreras, P. V., Lewis, A., Pinilla, G., Sokoll, L. J., Kickler, T., Mostafa, H., Caturegli, M., Moghekar, A., Fitzgerald, K. C., & Pardo, C. A. (2021). Cerebrospinal fluid in COVID-19 neurological complications: no cytokine storm or neuroinflammation. medRxiv : the preprint server for health sciences, 2021.01.10.20249014. <https://doi.org/10.1101/2021.01.10.20249014>
10. Hu B, Huang S, Yin L. (2021). The cytokine storm and COVID-19. *J Med Virol.* 93(1):250-256. doi: 10.1002/jmv.26232. Epub 2020 Sep 30. PMID: 32592501; PMCID: PMC7361342.
11. Kai-Wang, K. (2021). Lessons learned 1 year after SARS-CoV-2 emergence leading to COVID-19 pandemic. Taylor & Francis. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/22221751.2021.1898291>
12. Li YC, Bai WZ, Hashikawa T. (2020). The neuroinvasive potential of SARS-CoV2 may play a role in the respiratory failure of COVID-19 patients. *J Med Virol.* 10.1002/jmv.25728.
13. Hamid S, Mir MY, Rohela GK. (2020). Novel coronavirus disease (COVID-19): a pandemic (epidemiology, pathogenesis and potential therapeutics). *New Microbes New Infect.* 35:100679. doi: 10.1016/j.nmni.2020.100679.
14. Mao L, Jin H, Wang M, Hu Y, Chen S, He Q, Chang J, Hong C, Zhou Y, Wang D, Miao X, Li Y, Hu B. (2020). Neurologic Manifestations of Hospitalized Patients With Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China. *JAMA Neurol.* 2020 Apr 10. doi: 10.1001/jamaneurol.2020.1127.
15. Mitchell P Wilson, Andrew S Jack Coronavirus disease (COVID-19) in neurology and neurosurgery: A scoping review of the early literature. *Clin Neurol Neurosurg.* 105866. doi: 10.1016/j.clineuro.2020.105866
16. Moll-Bernardes, R., de Sousa, A. S., Macedo, A. V. S., Lopes, R. D., Vera, N., Maia, L. C. R., Feldman, A., Arruda, G. D. A. S., Castro, M. J. C., Pimentel-Coelho, P. M., de Albuquerque, D. C., de Paula, T. C., Furquim, T. A. B., Loures, V. A., Giusti, K. G. D., de Oliveira, N. M., De Luca, F. A., Kotsugai, M. D. M., Domiciano, R. A. M., Santos, M. F., ... Medei, E. (2021). IL-10 and IL-12 (P70) Levels Predict the Risk of Covid-19 Progression in Hypertensive Patients: Insights From the BRACE-CORONA

17. Muller-Sterl, W. (2008). *Bioquímica. Fundamentos para Medicina y Ciencias de la Vida*. (s. f.).
GoogleBooks.://books.google.com.mx/books?id=X2YVG6Fzp1UC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=fals
18. Payus, A. O., Liew Sat Lin, C., Mohd Noh, M., Jeffree, M. S., & Ali, R. A. (2020). SARS-CoV-2 infection of the nervous system: A review of the literature on neurological involvement in novel coronavirus disease-(COVID-19). *Bosnian journal of basic medical sciences*, 20(3), 283–292. <https://doi.org/10.17305/bjbms.2020.4860>
19. Ramasamy S, Subbian S. (2021). Critical Determinants of Cytokine Storm and Type I Interferon Response in COVID-19 Pathogenesis. *Clin Microbiol Rev.* 12;34(3):e00299-20. doi: 10.1128/CMR.00299-20.
20. Shi, H., Zuo, Y., Navaz, S., Harbaugh, A., Hoy, C. K., Gandhi, A. A., Sule, G., Yalavarthi, S., Gockman, K., Madison, J. A., Wang, J., Zuo, M., Shi, Y., Maile, M. D., Knight, J. S., & Kanthi, Y. (2022). Endothelial Cell-Activating Antibodies in COVID-19. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)*, 74(7), 1132–1138. <https://doi.org/10.1002/art.42094>
21. Siddiqi HK, Mehra MR. (2020). COVID-19 Illness in Native and Immunosuppressed States: A Clinical-Therapeutic Staging Proposal. *J Heart Lung Transplant*.
22. Suchonwanit P, Leerunyakul K, Kositkuljorn C. (2020). Cutaneous manifestations in COVID-19: Lessons learned from current evidence. *J Am Acad Dermatol.* pii: S0190-9622(20)30710-6. doi: 10.1016/j.jaad.2020.04.094.
23. Pons, M. J., Ymaña, B., Mayanga-Herrera, A., Sáenz, Y., Alvarez-Erviti, L., Tapia-Rojas, S., Gamarra, R., Blanco, A. B., Moncunill, G., & Ugarte-Gil, M. F. (2021). Cytokine Profiles Associated With Worse Prognosis in a Hospitalized Peruvian COVID-19 Cohort. *Frontiers in immunology*, 12, 700921. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.700921>
24. Wang, J., Jiang, M., Chen, X., & Montaner, L. J. (2020). Cytokine storm and leukocyte changes in mild versus severe SARS-CoV-2 infection: Review of 3939 COVID-19 patients in China and emerging pathogenesis and therapy concepts. *Journal of leukocyte biology*, 108(1), 17–41. <https://doi.org/10.1002/JLB.3COVR0520-272R>

25. Ye Q, Wang B, Mao J. (2020). The pathogenesis and treatment of the 'Cytokine Storm' in COVID-19. *J Infect.* pii: S0163-4453(20)30165-1. doi: 10.1016/j.jinf.2020.03.037.
26. Yingxia Liu, Cong Zhang, Fengming Huang, Yang Yang, Fuxiang Wang, Jing Yuan, Zheng Zhang, Yuhao Qin, Xiaoyun Li, Dandan Zhao, Shunwang Li, Shuguang Tan, Zhaoqin Wang, Jinxiu Li, Chenguang Shen, Jianming Li, Ling Peng , Weibo Wu, Mengli Cao, Li Xing, Zhixiang Xu, Li Chen, Congzhao Zhou, William J Liu, Lei Liu, Chengyu Jiang. (2020). Los niveles plasmáticos elevados de citocinas selectivas en pacientes con COVID-19 reflejan la carga viral y la lesión pulmonar, *National Science Review*, volumen 7, número 6, páginas 1003–1011, <https://doi.org/10.1093/nsr/nwaa037>
27. Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi. (2020). Epidemiology Working Group for NCIP Epidemic Response, Chinese Center for Disease Control and Prevention. The epidemiological characteristics of an outbreak of 2019 novel coronavirus diseases (COVID-19) in China.