

Veá las discusiones, estadísticas y perfiles de autores de esta publicación en: <https://www.researchgate.net/publication/344340669>

La influencia del pH en la infección por SARS-CoV-2 y la gravedad de covid-19

Preimpresión · Septiembre 2020
DOI: 10.1101/2020.09.10.20179135

CITAS

5

24 Autores incluyendo:



Bacalao
Universidad de Colorado

22 PUBLICACIONES 587 CITAS

VER E



Antonio Edson Rocha Oliveira
Universidad de São Paulo

20 PUBLICACIONES 330 CITAS

VER E

LEE

860



Vanderson Sampaio
Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado

184 PUBLICACIONES 2.336 CITAS

VER E



Gustavo Davaraz
Universidad de Campina

23 PUBLICACIONES 698 CITAS

VER E

Algunos de los autores de esta publicación también están trabajando en estos proyectos relacionados:



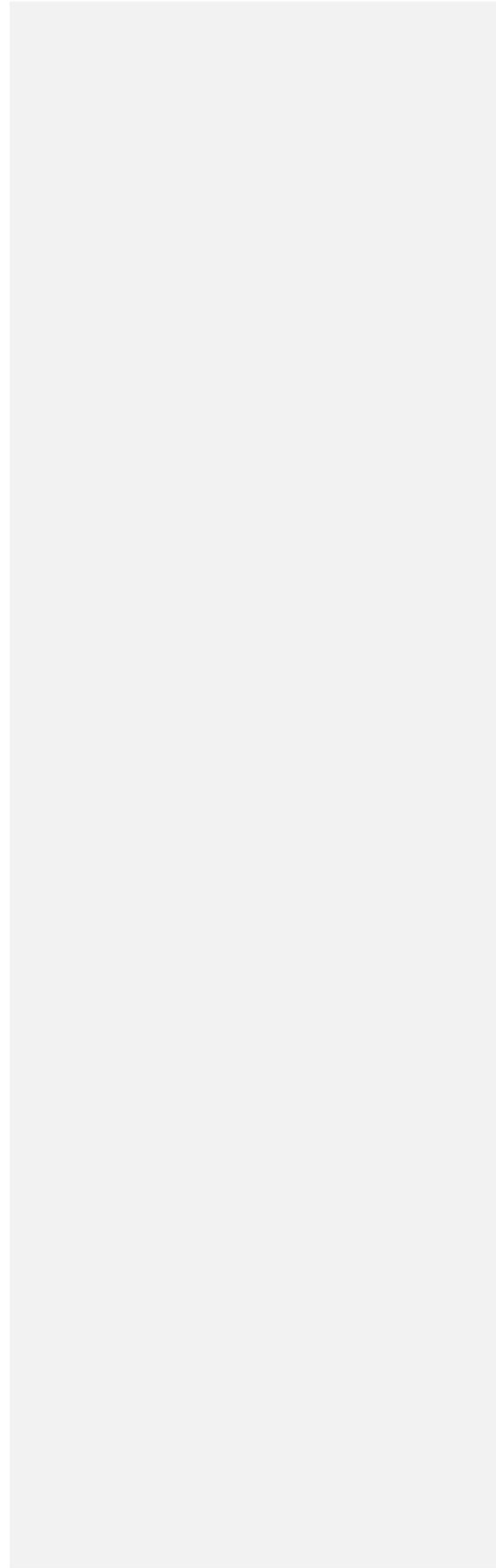
Adyuvantes de vacunas [Ver proyecto](#)



Señalización y metabolismo de células B en la diferenciación celular secretora de anticuerpos in vitro y en pacientes con dengue [Ver proyecto](#)

Todo el contenido que sigue a esta página fue subido por [Pedro Moraes-Vieira](#) el 22 de septiembre de 2020.

El usuario ha solicitado la mejora del archivo descargado.



La influencia del pH en la infección por SARS-CoV-2 y la gravedad de covid-19

Autores:

Leandro^{Jimenez} 1,2, Ana Campos Codo³, Vanderson de Souza Sampaio^{4,5,6,7}, Antonio E.R. Oliveira¹, Lucas Kaoru Kobo Ferreira¹, Gustavo Gastão Davanzo³, Lauar de Brito Monteiro³, João Victor Virgilio-da-Silva³, Mayla Gabriela Silva Borba⁴, Gabriela Fabiano de Souza³, Nathalia Zini⁸, Flora de Andrade Gandolfi⁸, Stéfanie Primon Murano³, José Luiz ProençaModena³, Fernando Almeida Val^{4,5,7}, Gisely Cardoso Melo^{4,5}, Wuelton Marcelo Monteiro^{4,5}, Maurício Lacerda Nogueira⁸, Marcus Vinícius Guimarães Lacerda^{4,5,9}, Pedro M. MoraesVieira^{3,10,11}, Helder I Nakaya^{1,2,*}

Afiliaciones:

- ¹ Departamento de Análisis Clínicos y Toxicológicos, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Universidad de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- ² Plataforma Científica Pasteur-Universidad de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- ³ Departamento de Genética, Evolución, Microbiología e Inmunología, Instituto de Biología, Universidad de Campinas, SP, Brasil.
- ⁴ Fundação de Medicina Tropical Dr Heitor Vieira Dourado, Manaus, Brasil
- ⁵ Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Brasil
- ⁶ Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas, Manaus, Brasil
- ⁷ Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brasil, UFAM Amazonas, Manaus, Brasil
- ⁸ Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil
- ⁹ Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brasil, UFAM Amazonas, Manaus, Brasil
- ¹⁰ Centro de Investigación de Obesidad y Comorbilidades (OCRC), Universidad de Campinas, SP, Brasil.
- ¹¹ Clúster de Investigación en Medicina Experimental (EMRC), Universidad de Campinas, SP, Brasil.

*Correspondencia a: hnakaya@usp.br

Abstracto

El coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV-2) puede infectar una amplia gama de tejidos humanos mediante el uso de la enzima convertidora de angiotensina del receptor del huésped 2 (ACE2). Los individuos con comorbilidades asociadas con COVID-19 grave muestran niveles más altos de ACE2 en los pulmones en comparación con aquellos sin comorbilidades, y afecciones como el estrés celular, los niveles elevados de glucosa y la hipoxia también pueden aumentar la expresión de ACE2. Aquí mostramos que los pacientes con esófago de Barrett (BE) tienen una mayor expresión de ACE2 en los tejidos de BE en comparación con el esófago escamoso normal, y que el pH más bajo asociado con BE puede impulsar este aumento en la expresión. Los monocitos primarios humanos cultivados en pH reducido mostraron un aumento de la expresión de ACE2 y la carga viral tras la infección por SARS-CoV-2. También mostramos en dos cohortes independientes de pacientes con COVID-19 que el uso previo de inhibidores de la bomba de protones se asocia con un riesgo de muerte de 2 a 3 veces mayor en comparación con aquellos que no usan los medicamentos. Nuestro trabajo sugiere que el pH tiene una gran influencia en la infección por SARS-CoV-2 y la gravedad de COVID-19.

Palabras clave

COVID-19; pH; SARS-CoV-2; inhibidores de la bomba de protones; Esófago de Barrett.

Introducción

A partir de agosto de 2020, el coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV2) infectó a más de 20 millones de personas en todo el mundo (Organización Mundial de la Salud). La nueva enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) causada por el SARS-CoV-2 se caracteriza por una amplia gama de síntomas, desde respiratorios hasta problemas neurológicos y digestivos (1, 2). Si bien una pequeña fracción de los pacientes desarrollan neumonía altamente letal, al menos el 20% de los pacientes con COVID-19 pueden mostrar uno o más síntomas gastrointestinales (GI) (1), como diarrea, vómitos y dolor abdominal (2, 3).

El tropismo tisular del SARS-CoV-2 puede estar directamente relacionado con las diversas manifestaciones clínicas de COVID-19. El receptor utilizado por el virus para entrar en las células es la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2), que se encuentra en varios tejidos, incluidas las células epiteliales gastrointestinales y las células hepáticas (4, 5). El SARS-CoV-2 se detectó en biopsias de varios tejidos, incluyendo esófago, estómago,

duodeno y recto, y la endoscopia de pacientes hospitalizados reveló sangrado esofágico con erosiones y úlceras (2, 6).

Los niveles más altos de ACE2 en los tejidos pueden explicar en parte algunas de las comorbilidades asociadas con COVID-19 grave. Recientemente, demostramos que ACE2 estaba altamente expresado en los pulmones de personas con hipertensión arterial pulmonar y enfermedades obstructivas crónicas (7). Dado que la expresión de ACE2 cambia en condiciones de estrés celular, niveles elevados de glucosa e hipoxia (8, 9), otras comorbilidades relacionadas con el tracto gastrointestinal pueden asociarse con diferentes formas de COVID-19.

Aquí sugerimos que la enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE) y el esófago de Barrett (BE) pueden representar nuevas comorbilidades asociadas con COVID-19. En los Estados Unidos, se ha estimado que el 5,6% de los adultos tienen BE, una enfermedad en la que la ERGE daña la mucosa escamosa esofágica (10). **Aquí demostramos que ACE2 está altamente expresado en el esófago de pacientes con BE y que el pH ácido asociado con esta condición es un inductor clave de la expresión de ACE2. Los monocitos primarios humanos cultivados en pH reducido muestran una mayor expresión de ACE2 y un aumento de la carga viral tras la infección por SARS-CoV2. También mostramos que los pacientes que usan inhibidores de la bomba de protones, que se recomiendan para el tratamiento de la ERGE, tienen un mayor riesgo de desarrollar COVID-19 grave, observado por un mayor riesgo de ingreso en la UCI y muerte.**

Métodos Acidosis y meta-análisis del esófago de Barrett

Seleccionamos manualmente el repositorio Gene Expression Omnibus (GEO)

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) encontrar conjuntos de datos de transcriptoma de esófago relacionados con "esófago de Barrett" y conjuntos de datos de transcriptoma de línea celular relacionados con "acidosis" y "reducción de pH". Los valores de expresión y los metadatos normalizados por el autor de estos conjuntos de datos se descargaron utilizando el paquete GEOquery (11). Se realizaron análisis de expresión diferencial utilizando el paquete limma (12). El ID del estudio GEO y los grupos de ejemplos comparados se enumeran en la Tabla suplementaria 1. El paquete MetaVolcanoR (13) se utilizó para combinar los valores de P utilizando el método de Fisher. Para ajustar las comparaciones múltiples, se calculó la tasa de descubrimiento falso (FDR) utilizando el procedimiento de

Comentado [MI1]: Los niveles altos de ace2 isotipos largo (que tienen mas de 700 aminoácidos) y el péptido señal, que favorece la entrada del virus a la célula huésped por medio de la fusión. [Resumen de la expresión de la proteína ACE2 - The Human Protein Atlas](#)

Benjamini-Hochberg. Para los análisis de enriquecimiento, se utilizaron la herramienta EnrichR (14) y el paquete fgsea R (15) con conjuntos de genes de la base de datos Gene Ontology Biological Process. A continuación, seleccionamos vías con un valor de P ajustado para comparaciones múltiples inferiores a 0,10.

Análisis transcriptómico unicelular del esófago de Barrett

Los datos de ARN-seq unicelular (scRNA-seq) del esófago, el esófago de Barrett, las células gástricas y duodeno de pacientes con EB se adquirieron de Owen et al. 2018 (16). Las células con menos de 1.000 genes fueron excluidas del análisis utilizando Seurat v3 (17). Los recuentos de UMI en bruto se transformaron en registro y los genes variables se llamaron a cada conjunto de datos de forma independiente en el método VST. La función *AddModuleScore* se utilizó para eliminar los efectos por lotes entre muestras y se basó en los genes *C1orf43*, *CHMP2A*, *EMC7*, *GPI*, *PSMB2*, *PSMB4*, *RAB7A*, *REEP5*, *SNRPD3*, *VCP*, *VPS29*. Asignamos puntuaciones para las fases del ciclo celular S y G2/M basadas en conjuntos de genes previamente definidos utilizando la función *CellCycleScoring*. Las puntuaciones z escaladas para cada gen se calcularon utilizando la función *ScaleData* y retrocedieron contra el número de UMI por célula, el contenido de ARN mitocondrial, la puntuación de fase S, la puntuación de fase G2 / M y la puntuación de limpieza. Los datos a escala se utilizaron como entrada en la PCA basada en genes variables. Estos componentes de PCA se utilizaron para generar la visualización de reducción de UMAP. Para identificar el número de clústeres, se utilizaron recuentos de registros de UMI como entrada a SC3 (18). La variación técnica se probó utilizando BEARscc (19), que modela el ruido técnico a partir de mediciones de picos ercc. Los grupos se anotaron en función de genes previamente caracterizados.
(16).

Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

Los abrigos Buffy proporcionados por el Centro de Hematología y Hemoterapia de la Universidad de Campinas (SP-Campinas, Brasil) fueron utilizados para el aislamiento de PBMC como se describe (9). El estudio fue aprobado por el Comité Brasileño de Ética en Estudios Humanos (CAAE: 31622420.0.0000.5404). Brevemente, las capas de buffy se mezclaron y luego se diluyeron en solución salina tampón de fosfato (PBS) (1: 1) y cuidadosamente a un tubo de 50 ml que contenía Ficoll (Sigma-Aldrich) y centrifugado. Los

PBMC se cultivaron en RPMI 1640 durante 2-3h para permitir la adhesión celular. A continuación, las células se lavaron dos veces con PBS y las células adherentes, enriquecidas en monocitos, se incubaron aún más hasta la infección en RPMI 1640 que contenía un 10% de suero fetal bovino (FBS) y un 1% de penicilina-estreptomicina (Pen-Strep) a 37°C con un 5% de CO₂. Los monocitos se mantuvieron en diferentes niveles de pH (6, 6,5 y 7,4) durante 24 horas y posteriormente se infectaron con SARS-CoV-2, como se describe a continuación.

Virus e infección

HIAE-02 SARS-CoV-2/SP02/human/2020/BRA (GenBank MT126808.1) virus fue aislado como se describe (9). Las existencias de Sars-CoV-2 se prepararon en la línea celular Vero. El sobrenadante se cosechó a 2-3 dpi. Los títulos virales se obtuvieron mediante ensayos de placa en células Vero. Los monocitos se infectaron con SARS-CoV-2 en MOI 0.1 bajoagitación continua a 15 rpm durante 1 h. A continuación, los monocitos se lavaron dos veces y se incubaron en RPMI con 10% de FBS y 1% de Pen-Strep durante 24h a 37 ° C con 5% de CO₂ durante 24 horas.

Análisis de carga viral y expresión génica

La extracción total de ARN se realizó utilizando el agente TRIzol Re(Sigma-Aldrich). La concentración de ARN se midió con el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

El ARN se transcribió inversamente utilizando el kit de síntesis de ADNc de transcriptasa inversa de GoScript™ siguiendo las instrucciones del fabricante. El anuncio viral del SARS-CoV-2 se determinó con cebadores dirigidos a la región N1 y se generó una curva estándar como se describe (20). La carga viral y la expresión génica se realizaron utilizando SYBR Green Supermix en bio-RAD CFX394 Touch Real-Time PCR Detection System. El cambio de pliegue se calculó como $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Secuencias de imprimación utilizadas: 18S (Adelante: 5'-CCCAACTTCTTAGAGGGACAAG-3'; Reverso: 5'-CATCTAAGGGCATCACAGACC-3'); ACE2 (Delantero: 5'-GGACCCAGGAAATGTTTCAGA-3'; Reverso: 5'-GGCTGCAGAAAGTGACATGA-3'); SARS-CoV-2_IBS_N1 (Adelante: 5'-CAATGCTGCAATCGTGCTAC-3'; Reverso: 5'-GTTGCGACTACGTGATGAGG-3').

Análisis de datos clínicos

Se recuperaron datos clínicos de dos cohortes independientes de 551 y 806 pacientes con COVID-19 confirmados con RT-qPCR de 18 años o más que fueron a hospitales de referencia para COVID-19 en Manaus, Amazonas, Brasil (cohorte región Norte) y en la ciudad de São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil (cohorte de la región sureste), respectivamente. Fueron seguidos durante al menos 28 días (cohorte de la región norte) o 120 días (cohorte de la región sureste) después del reclutamiento. Se recopilaron información sobre los antecedentes de uso de inhibidores de la bomba de protones (por ejemplo, omeprazol y pantoprazol), una evidencia sustituta de enfermedades relacionadas con el pH gástrico bajo, el tiempo de hospitalización, el ingreso en la UCI y el tiempo hasta la muerte, así como la demografía, el uso previo de otros medicamentos, las variables clínicas, de laboratorio y de resultado. El protocolo fue aprobado por el Comité Brasileño de Ética en Investigación Humana (CAAE: 30152620.1.0000.0005 y 30615920.2.0000.0005 para la cohorte región Norte, y 31588920.0.0000.5415 para la cohorte región Sudeste). Los datos fueron recolectados y gestionados utilizando las herramientas electrónicas de captura de datos REDCap (v. 10.2.1) alojadas en *la Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado*.

Los cocientes de riesgos instantáneos ajustados y los cocientes de riesgos con los respectivos intervalos de confianza (IC) del 95% se estimaron para el tiempo hasta la muerte y el ingreso en la UCI, respectivamente mediante regresión de Cox y modelos de modelo lineal generalizado logarítmico-binomial. Para ajustar los factores de confusión, las edades superiores a 60 años y la obesidad, definida tanto por el IMC como por la porcentaje grasa, se utilizaron como covariables en los análisis multivariados. Se utilizó el análisis De Wilcoxon Rank-Sum para probar las diferencias en los días de hospitalización. Un P de 2 *colas* < 0,05 se consideró significativo. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando Stata v. 13.0 (StataCorp LP, College Station, TX).

Resultados

Para evaluar si los pacientes con EB pueden tener mayores probabilidades de infectarse con SARS-CoV-2 en comparación con los pacientes sin la enfermedad, se realizó un metanálisis de 8 estudios transcriptómicos de BE (Figura 1A, Tabla S1). Un total de 304 y 256 genes mostraron, respectivamente, una expresión más alta y más baja de BE en comparación con el tejido normal del esófago en al menos 7 de estos estudios (Figura 1B).

ACE2 fue uno de los genes consistentemente regulados al alza en el BE en comparación

con el esófago normal (Figura 1C). Si bien las vías relacionadas con la diferenciación de queratinocitos y el desarrollo de la epidermis se enriquecieron con genes regulados a la baja, encontramos que el transporte de bicarbonato y la regulación de las vías de pH intracelular se enriquecieron con genes regulados al alza (Figura 1D), lo que sugiere que el pH puede influir en la expresión de ACE2. De hecho, cuando las células endoteliales de la arteria coronaria humana fueron tratadas con inhibidores de bomba de protones—omeprazol o lansoprazol—la expresión de ACE2 disminuyó en comparación con las células no tratadas (Figura 1E). El análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (GSEA) confirmó que los tejidos del esófago de Barrett tienen una mayor expresión de genes relacionados con las alteraciones del pH (Figura 1F).

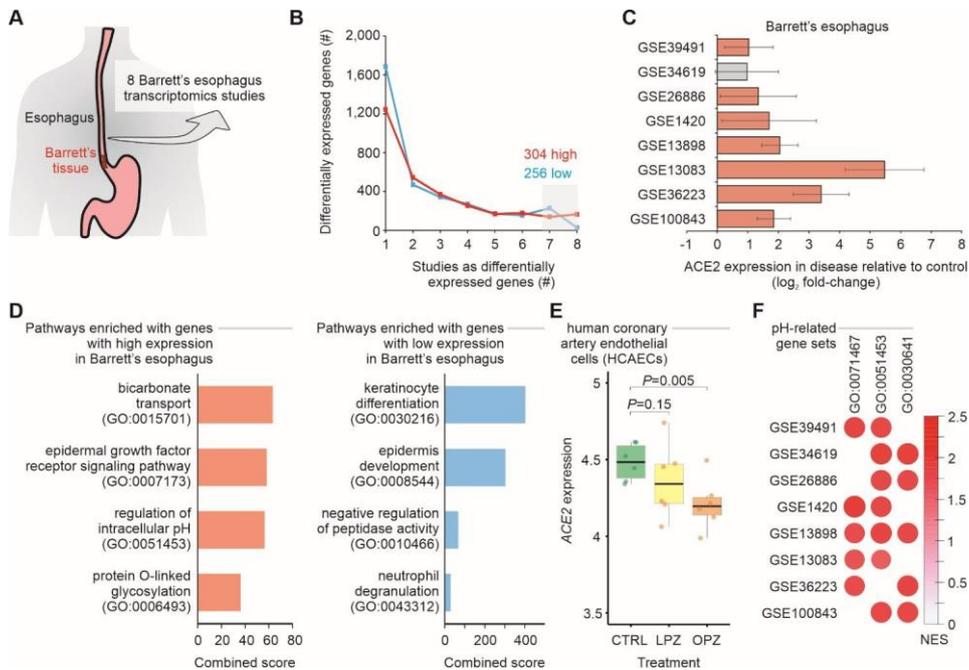


Figura 1. Meta-análisis de transcriptomas de la unión gastroesfágica de pacientes con Esófago de Barrett. A. Meta-análisis de 8 estudios de transcriptomas del esófago de Barrett.

B. Número de genes expresados diferencialmente en el esófago de Barrett en comparación con los no expresados.

Esófago de Barrett. Las líneas muestran el número de genes (eje y) considerados regulados al alza (líneas rojas) o down-regulados (líneas azules) en el esófago de Barrett (valor $P <$

0,05; \log_2 foldchange > 1; FDR combinado < 0,01) en uno o más conjuntos de datos (eje x). Se indica el número de genes regulados al alza y regulados a la baja en al menos 7 estudios.

C. ACE2 está regulado al alza en pacientes con esófago de Barrett. Cada barra representa el cambio de pliegue de la expresión \log_2 entre los pacientes y los individuos de control. Las barras de error indican el intervalo de confianza del 95%. Las barras en rojo representan un valor de $P < 0,05$ y en gris un valor de P no significativo. **D.** Análisis de enriquecimiento de vías utilizando los genes regulados hacia arriba y hacia abajo en al menos 7 estudios. Las barras representan la puntuación combinada (eje x) calculada por la herramienta Enrichr para conjuntos de genes seleccionados de Gene Ontology (eje y). **Expresión de E.** ACE2 en células tratadas con inhibidores de la bomba de protones. Cada diagrama de caja representa la expresión \log_2 de células no tratadas (CTRL) y células tratadas con omeprazol (OPZ) o lansoprazol (LPZ). **F.** Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (GSEA) de los 8 estudios de transcriptomas del esófago de Barrett utilizando conjuntos de genes relacionados con el pH. El tamaño y el color de los círculos son proporcionales a la puntuación de enriquecimiento normalizado (NES) de los conjuntos de genes (columnas) en cada estudio (filas). Los ID de Ontología Génica están indicados en la parte superior.

También investigamos la expresión de ACE2 en el esófago de Barrett a nivel unicelular. Nuestro análisis mostró que las células individuales de los pacientes con esófago de Barrett son distintas de las células normales del esófago, así como las células del duodeno y los tejidos gástricos (Figura 2A). Mientras que una gran acción fr de las células duodeno expresa ACE2 (21), sólo el 11% de las células individuales de las muestras de Barrett tienen una expresión ace2 superior a 0 (Figura 2B). Sin embargo, entre las células que expresan ACE2, se encontraron niveles más altos del gen en las células gástricas, de Barrett y duodeno en comparación con las células del esófago (Figura 2C). Usando GSEA, encontramos que los genes asociados con la regulación del pH celular se enriquecieron entre los genes regulados al alza en las células gástricas, de Barrett y duodeno en comparación con las células del esófago (Figura 2D).

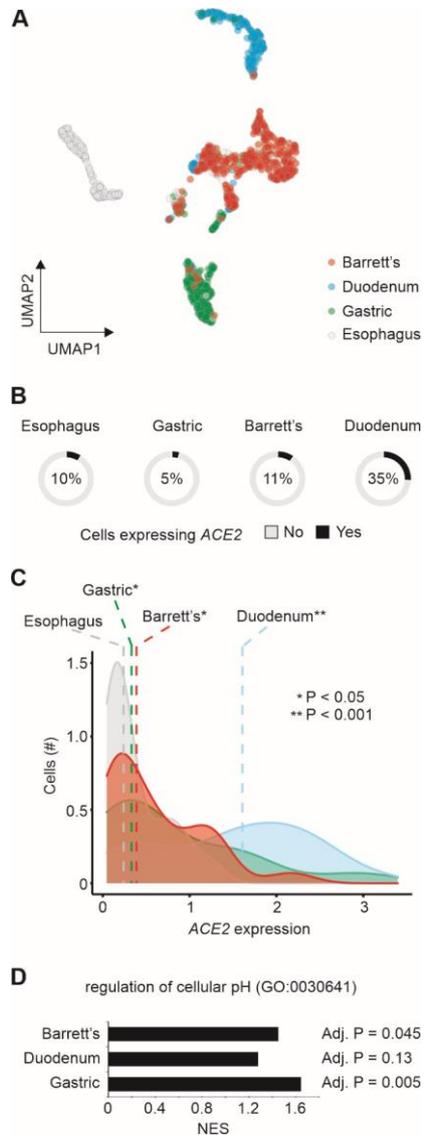


Figura 2. Transcriptómica unicelular del esófago de Barrett. Un. Reducción de dimensiones de celdas individuales mediante Aproximación y Proyección de Variedad Uniforme (UMAP). Se muestran células de 4 pacientes con esófago de Barrett ($n = 1.168$). Los colores representan los tipos de tejido. **B. Expresión** de ACE2 por tipo de tejido. Los gráficos circulares muestran el número de células individuales con (negro) o sin (gris) expresión ACE2 (valores de expresión > 0). Se indican las fracciones de células que

expresan ACE2. **C.** Distribución de la expansión de ACE2 por células de diferentes tipos de tejidos. Los colores de los histogramas representan los tipos de tejido. La línea vertical discontinua muestra los valores medios de cada tipo de tejido. Está indicado el valor P de la prueba t del estudiante entre los tipos de tejido versus el esófago. **D.** Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (GSEA) de los 3 tipos de tejido en comparación con el esófago utilizando la regulación del conjunto de genes de pH celular. La puntuación de enriquecimiento normalizado (NES) se muestra en el eje X para cada uno de los tipos de tejido.

El valor P ajustado del enriquecimiento se muestra justo al lado de la barra correspondiente.

Para evaluar más a fondo si el pH puede influir en la expresión de *ACE2*, analizamos estudios transcriptómicos disponibles públicamente de células bajo acidosis inducida experimentalmente. Las células cultivadas a pH más bajo mostraron niveles de expresión más altos de *ACE2* en comparación con las cultivadas a pH más alto (Figura 3A y B). Validamos este hallazgo con monocitos p rimarios humanos cultivados a pH 7,4, 6,5 y 6,0 bajo normoxia. La expresión de *ACE2* aumentó significativamente a pH 6.5 y 6.0 en comparación con pH 7.4 (Figura 3C). La reducción del pH por sí sola también aumentó significativamente la infección por SARS-CoV-2 de monocitos humanos (Figure 3D), lo que indica que el pH desempeña un papel en la infección por SARS-CoV-2 mediada por *ACE2*.

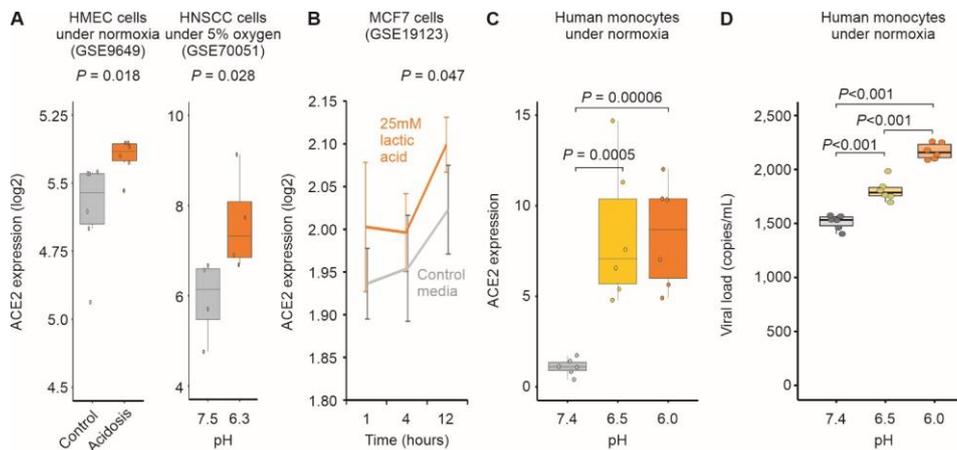


Figura 3. La acidosis aumenta la expresión de ACE2 y la infección por SARS-CoV-2. A. Células humanas expuestas a acidosis. Cada boxplot representa la expresión log2 de

muestras untreadas (gris) o tratadas con acidosis láctica (marrón) para dos estudios de microarrays (GSE9649 y GSE70051). Se indican los valores P de la prueba t del estudiante.

B. Las células MCF7 expuestas a la reducción del pH aumentan la expresión de ACE2. Las líneas grises y marrones representan, respectivamente, cells tratados con medios de control o con ácido láctico de 25mM durante 1, 4 y 12 horas (eje x). Cada punto representa la expresión media log2 y las barras de error la desviación estándar de las réplicas biológicas.

C. El pH ácido aumenta la expresión de ACE2 en los monocitos. Los monocitos de sangre periférica humana se incubaron en medio a 3 pH diferentes (6, 6,5, 7,4) durante 24 horas. Cada diagrama de caja representa la expresión ACE2 de cambio de pliegue. **D.** El pH ácido aumenta la carga viral del SARS-CoV-2. Los monocitos de sangre germinal humana se incubaron en medio a 3 pH diferentes (6, 6.5, 7.4) durante 24h. Las células se infectaron con CoV-2 (MOI 0.1) durante 1h bajo agitación continua. La carga viral de ARN se midió mediante qPCR.

Los inhibidores de la bomba de protones (IBP) disminuyen la cantidad de ácido producido en el estómago y a menudo se utilizan para tratar a sujetos con síntomas de ERGE o con ciertos problemas estomacales y de esófago (22). El uso de IBP antes de COVID-19 puede servir como un proxy para identificar sujetos con irritación tisular e inflamación causada por el ácido estomacal. En dos cohortes independientes de 551 y 806 pacientes con COVID-19 confirmados por RT-qPCR de las regiones norte y sudeste de Brasil, respectivamente, investigamos los efectos del malestar gastrointestinal y la gravedad de COVID-19y. El análisis de la curva de supervivencia mostró que las personas que usaban IBP tenían un riesgo de muerte de 2 a 3 veces mayor en comparación con aquellos que no usaban el medicamento (Figura 4A). Al controlar los posibles factores de confusión (es decir, la edad mayor de 60 años, la diabetes y la hipertensión), el cociente de riesgos instantáneos ajustado fue de 2,183 (95CI: 1,635 - 2,914; $P < 0,0001$) para la cohorte de la región Norte y 2.332 (95CI: 1,661 - 3,274; $P < 0,0001$) para la cohorte Sureste (Figura 4B). **Estos hallazgos clínicos indican que la reducción del pH fisiológico (causada por el ácido) puede desempeñar un papel importante en la infección por SARS-CoV-2 y la gravedad de COVID-19.**

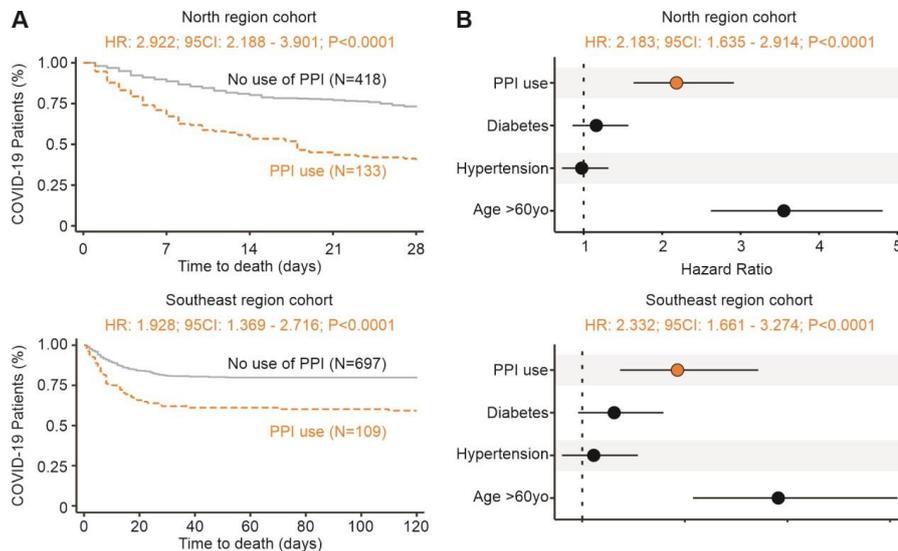


Figura 4. Aumentar el riesgo de muerte en individuos con COVID-19 usando inhibidores de la bomba de protones antes de la infección. A. Tiempo hasta la muerte. Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier muestran un mayor riesgo de muerte para el grupo de pacientes que usaron IBP (marrón) antes del ingreso en comparación con aquellos que no los usaron (gris). El resultado de la cohorte de la región Norte se muestra en la parte superior y el resultado de la cohorte de la región Sureste se muestra en la parte inferior. **B.** Riesgo de muerte. La parcela forestal presenta los cocientes de riesgo y los respectivos 95CI para la variable explicativa principal (marrón), así como los posibles factores de confusión (negro) utilizados en el modelo multivariante. El resultado de la cohorte de la región Norte se muestra en la parte superior y el resultado de la cohorte de la región Sureste se muestra en la parte inferior.

Discusión

Nuestros hallazgos sugieren que el pH ácido aumenta la infección por SARS-CoV-2 al regular al alza el receptor ACE2, y esto puede tener implicaciones clínicas para los pacientes con ERGE o esófago de Barrett. No existe un mecanismo claro que vincule las alteraciones en la expresión de pH y ACE2. Aunque la evidencia indica que las condiciones hipóxicas pueden aumentar la expresión de ACE2 (8, 9), la expresión de SIRT1 ni HIF1A parece estar asociada con el esófago de Barrett (Tabla S2). Encontramos que los reguladores conocidos de ACE2 – HNF1B (23) y FOXA2

(24) – fueron regulados al alza en 6 de cada 8 estudios transcriptómicos del esófago de Barrett (Tabla S2), lo que sugiere que pueden estar involucrados con la expresión de ACE2 inducida por pH en el esófago de Barrett.

El daño pulmonar, una de las principales características de la COVID-19 grave, puede provocar hipoxia aguda y acidosis respiratoria adicional. Es posible que la acidosis en sangre de pacientes con COVID-19 grave (25) empeore la enfermedad al aumentar los niveles de ACE2 y facilitar la entrada del SARS-CoV-2 en las células humanas. La hipoxia en sí misma puede contribuir a la regulación de ACE2 (9, 26). Además, los niveles elevados de la enzima lactato deshidrogenasa (que convierte el lactato de piruvato) se han asociado con peores resultados en pacientes con COVID-19 (27). El exceso de lactato puede alterar directamente el pH extracelular e intracelular, lo que a su vez puede afectar la expresión de ACE2. La medida en que la acidosis sistémica aguda contribuye a la gravedad de la COVID-19 es poco conocida y merece más investigación.

El medicamento famotidina suprime la producción de ácido gástrico al bloquear el receptor de histamina 2 en el estómago. Recientemente, Freedberg et al (28) han demostrado que el tratamiento temprano de pacientes que dieron positivo para SARS-CoV-2 mejoró significativamente los resultados clínicos entre los pacientes hospitalizados. Aunque los autores plantearon la hipótesis de que la famotidina puede tener efectos antivirales, es posible que el pH en sí mismo pueda desempeñar un papel importante en la regulación de la expresión de ACE2 y la limitación de la infección por SARS-CoV-2 en los pacientes.

Mostramos aquí que el uso previo de IBP se asocia con resultados desfavorables, como el momento de la hospitalización, el ingreso en la UCI y la muerte. Hasta donde sabemos, ninguna de estas asociaciones fue reportada previamente. Almarino et al. (29) describieron recientemente que las personas que usaban IBP tenían mayores probabilidades de dar positivo para COVID-19 en comparación con aquellos que no usaban IBP. La hipótesis es que los IBP podrían aumentar el riesgo de COVID-19 al socavar la barrera gástrica contra el SARS-CoV-2 y reducir la diversidad microbiana en el intestino (29). Más bien, creemos que los IBP son marcadores importantes de comorbilidades ocultas que involucran el daño causado por el exceso de ácido estomacal en los tejidos gastrointestinales.

A pesar de la enfermedad (esófago de Barrett) a la molécula (ACE2) en las células (experimentos in vitro) y de vuelta a los hallazgos clínicos (pacientes con COVID-19), demostramos que el pH puede tener una gran influencia en la infección por

SARS-CoV-2 y la gravedad de COVID-19. Se deben realizar estudios adicionales no solo para confirmar los hallazgos clínicos a mayor escala, sino también para evaluar el mecanismo molecular relacionado con la expresión de ACE2 inducida por pH.

Referencias

1. R. Tariq et al., Prevalencia y mortalidad de pacientes con COVID-19 con síntomas gastrointestinales: una revisión sistemática y un metanálisis. *Mayo Clin Proc* 95, 1632-1648 (2020).
2. L. Zhang et al., Diarrea y patrón de citoquinas inflamatorias alteradas en la enfermedad grave por coronavirus 2019: Impacto en el curso de la enfermedad y la mortalidad hospitalaria. *J Gastroenterol Hepatol*, (2020).
3. K. S. Cheung et al., Manifestaciones gastrointestinales de la infección por SARS-CoV-2 y carga de virus en muestras fecales de una cohorte de Hong Kong: revisión sistemática y metanálisis. *Gastroenterología* 159, 81-95 (2020).
4. A. R. Bourgonje et al., Enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2), SARS-CoV-2 y la fisiopatología de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19). *J Pathol*, (2020).
5. X. Zou et al., El análisis de datos de ARN-seq unicelular sobre la expresión del receptor ACE2 revela el riesgo potencial de diferentes órganos humanos vulnerables a la infección por 2019-nCoV. *Frente Med* 14, 185-192 (2020).
6. L. Lin et al., Síntomas gastrointestinales de 95 casos con infección por SARS-CoV-2. *Gut* 69, 997-1001 (2020).
7. B. G. G. Pinto et al., La expresión de ACE2 aumenta en los pulmones de pacientes con comorbilidades asociadas con COVID-19 grave. *J Infect Dis* 222, 556-563 (2020).
8. N. E. Clarke, N. D. Belyaev, D. W. Lambert, A. J. Turner, Regulación epigenética de la enzima convertidora de angiotensina2 (ACE2) por SIRT1 en condiciones de estrés energético celular. *Clin Sci (Lond)* 126, 507-516 (2014).
9. A.C. Codo et al., Elevated Glucose Levels Favor SARS-CoV-2 Infection and Monocyte Response through a HIF-1 α /Glycolysis-Dependent Axis. *Celda Metab*, (2020).
10. S. J. Spechler, R. F. Souza, esófago de Barrett. *N Engl J Med* 371, 836-845 (2014).
11. S. Davis, P. S. Meltzer, GEOquery: a bridge between the Gene Expression Omnibus (GEO) and BioConductor. *Bioinformática* 23, 1846-1847 (2007).
12. M. E. Ritchie et al., limma potencia los análisis de expresión diferencial para la secuenciación de ARN y los estudios de microarrays. *Ácidos nucleicos Res* 43, e47 (2015).
13. C. Prada, D. Lima, H. I. Nakaya. (Bioconductor, 2019).
14. E. Y. Chen et al., Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformática* 14, 128 (2013).
15. A. Alexeyenko et al., Network enrichment analysis: extension of gene-set enrichment analysis to gene networks. *BMC Bioinformática* 13, 226 (2012).
16. R. P. Owen et al., Single cell RNA-seq revela una profunda similitud transcripcional entre el esófago de Barrett y las glándulas submucosas esofágicas. *Nat Commun* 9, 4261 (2018).
17. T. Stuart et al., Comprehensive Integration of Single-Cell Data. *Celda* 177, 1888-1902.e1821 (2019).
18. V. Y. Kiselev et al., SC3: consensus clustering of single-cell RNA-seq data. *Métodos Nat* 14, 483-486 (2017).
19. D. T. Severson, R. P. Owen, M. J. White, X. Lu, B. Schuster-Böckler, BEARsccl determina la robustez de los grupos de una sola célula utilizando réplicas técnicas simuladas. *Nat Commun* 9, 1187 (2018).
20. J. Won et al., Desarrollo de un protocolo de detección seguro y de bajo costo para el SARS-CoV-2 de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19). *Exp Neurobiol* 29, 107-119 (2020).
21. M. Y. Li, L. Li, Y. Zhang, X. S. Wang, Expresión del gen del receptor celular del SARS-CoV-2 ACE2 en una amplia variedad de tejidos humanos. *Infect Dis Poverty* 9, 45 (2020).
22. D. E. Freedberg, B. Lebowitz, J. A. Abrams, El impacto de los inhibidores de la bomba de protones en el microbioma gastrointestinal humano. *Clin Lab Med* 34, 771-785 (2014).
23. S. Senkel, B. Lucas, L. Klein-Hitpass, G. U. Ryffel, Identification of target genes of the transcription factor HNF1 β and HNF1 α in a human embryonic kidney cell line. *Biochim Biophys Acta* 1731, 179-190 (2005).

24. K.B. Pedersen, H. Chodavarapu, E. Lazartigues, Forkhead Box Transcription Factors of the FOXA Class Are Required for Basal Transcription of Angiotensin-Converting Enzyme 2. *J Endocr Soc* 1, 370-384 (2017).
25. T. Chen et al., Características clínicas de 113 pacientes fallecidos con enfermedad por coronavirus 2019: estudio retrospectivo. *BMJ* 368, m1091 (2020).
26. R. Zhang et al., Papel de HIF-1alpha en la regulación de la expresión de ACE y ACE2 en células hipoxicas del músculo liso de la arteria pulmonar humana. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297, L631-640 (2009).
27. B.M. Henry et al., Los niveles de lactato deshidrogenasa predicen la gravedad y mortalidad de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19): un análisis combinado. *Am J Emerg Med* 38, 1722-1726 (2020).
28. D. E. Freedberg et al., Famotidine Use is Associated with Improved Clinical Outcomes in Hospitalized COVID-19 Patients: A Propensity Score Matching Retrospective Cohort Study. *Gastroenterología*, (2020).
29. C. V. Almario, W. D. Chey, B.M. R. Spiegel, Aumento del riesgo de COVID-19 Among Usuarios de inhibidores de la bomba de protones. *Revista Americana de Gastroenterología NA, NA* (2020).

Financiación:

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico de Brasil (número de subvención 313662/2017-7); la Fundación de Investigación de São Paulo (números de subvención 2018/14933-2; 2018/21934-5; 2017/27131-9; 2013/08216-2; 2020/04836-0); y CAPES.

Declaración del autor

Los autores no declaran intereses contrapuestos.

Contribuciones de los autores

L.J., A.E.R.O., L.K.K.F., H.I.N. realizaron los análisis del transcriptoma. A.C.C., G.G.D., L.B.M., J.V.V., G.F.S., S.P.M., J.L.P., P.M.M. realizaron el trabajo experimental. V.S.S., M.G.S.B., N.Z., F.A.G., M.L.N., F.A.V., G.C.M., W.M.M., M.V.G.L. realizó el análisis clínico. H.I.N. coordinó el estudio. L.J. y H.I.N. escribieron el manuscrito con aportes de todos los coautores.

Materiales complementarios:

Cuadros S1 y S2

medRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.09.10.20179135>. esta versión publicada el 11 de septiembre de 2020. El titular de los derechos de autor de esta preimpresión **(que no fue certificado por revisión por pares)** es el autor/financiador, que ha concedido medRxiv una licencia para mostrar la preimpresión a perpetuidad.
Se pone a disposición bajo un [CC-BY-NC-ND 4.0 Internacional licencia](#) .

[Ver estadísticas de publicación](#)