

Covid-19 y dolor: avances recientes en el efecto de SARS-CoV-2 sobre neuronas sensoriales primarias

Introducción

SARS-CoV-2 es el virus de simple cadena de ARN+ de la familia *Coronaviridae* causante del popularmente conocido Covid-19. Las principales manifestaciones clínicas serias de la enfermedad incluyen el síndrome de distrés respiratorio (SDR); las complicaciones por coagulopatías, estas últimas emergentes de las alteraciones en los niveles del dímero-D; y una respuesta inflamatoria exacerbada, caracterizada por un importante desbalance entre la liberación de citoquinas y quemoquinas pro-inflamatorias versus la producción de interferón gamma (fenómeno conocido como tormenta de citoquinas). Sin embargo, también hay reportes de efectos neurológicos asociados a Covid-19. La frecuencia de manifestaciones clínicas neurológicas llega hasta el 25% de los pacientes que son hospitalizados por la infección. Muchos de estos pacientes reportan síntomas no específicos tales como mareos, cefaleas y estados de confusión, mientras que otros exhiben alteraciones de la conciencia, convulsiones y otras disfunciones nerviosas (Gasmi et al. 2020).

Manifestaciones sensoriales y Covid-19

Las manifestaciones sensoriales más frecuentes involucran alteraciones de la quimio-sensibilidad, que se traducen en cuadros de anosmia y disgeusia (Cooper et al. 2020). Desde el punto de vista del dolor, el evento de mayor incidencia es la ocurrencia de cefaleas, descritas en su mayoría como cefaleas por presión (80%) con proporciones menores del tipo pulsátil y migrañoso (Talebeyan et al. 2020). Además, está cada vez más claro que los pacientes que se recuperan de Covid-19 sufren de síntomas persistentes tales como excesiva actividad tusiva, artralgias, mialgias y disnea, que al menos en parte involucran la participación activa de nociceptores.

Desentrañando los mecanismos de acción pro-nociceptiva del Covid-19

Una de las complicaciones importantes asociada al estudio de la relación entre Covid-19 y dolor proviene del sub-reporte de datos objetivos de la población de pacientes con dolor crónico patológico que sufrieron o sufren la enfermedad. En la práctica desconocemos si en dicha población la incidencia y gravedad de Covid-19 es igual, menor o mayor que en la población general y cómo se compara con otros factores de riesgo bien establecidos. Entonces, tenemos por un lado la observación clínica que muestra que el dolor asociado a Covid-19 existe y por el otro, no se sabe exactamente cómo se produce, aunque las causas posibles involucran varios mecanismos que no son mutuamente excluyentes. Estos incluyen: 1) neuroinvasión directa por el virus de las neuronas, células gliales y/o células satélite; 2) consecuencias derivadas de hipoxemia asociada a SDR con necrosis de tejido nervioso (que puede afectar las regiones de control respiratorio en el tallo cerebral) y 3) efectos derivados de la tormenta de citoquinas e incluso infiltración directa del tejido nervioso por neutrófilos y macrófagos que acarrean el virus. Para entender mejor estos mecanismos, repasaremos primero algunos aspectos de la biología de este patógeno.

REFERENTES DEL GIEID Y EL GRUPO AD-HOC “INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL EN DOLOR DEL RITS”

Cristian Acosta

Mariano Asla

José Biurrún Manresa

Pablo R. Brumovsky

Cecilia Catanesi

María Florencia Coronel

Juan Carlos Flores

Susana Gonzalez

Fernando Kasanetz

Eduardo Marchevsky

Tomás Maresca

Miguel Miceli

Cristian Mista

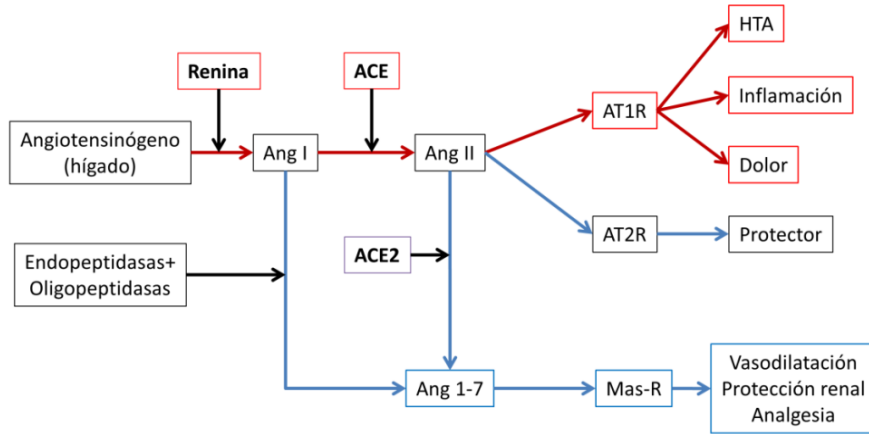
Sean Patterson

Patricia Setton

Marcelo J. Villar

ACE2 es uno de los receptores identificados de SARS-CoV-2

Zhao y colaboradores (Zhao et al. 2020) demostraron que la enzima convertora de angiotensina-II (ACE2) es el receptor funcional al que se une la proteína Spike del virus SARS-CoV-2. La ACE2 es una isoforma de la enzima convertora de angiotensina (ACE) y una proteína integral de la membrana plasmática. La **figura 1** ilustra las 2 vías metabólicas más importantes de las que participan ambas enzimas. En términos generales, la vía que lleva a la síntesis de Ang II y la subsecuente activación de su receptor de tipo 1 (AT1R) se asocia con la ocurrencia de hipertensión arterial (HTA), inflamación e incluso dolor. Por el contrario, la vía complementaria mediada por ACE2 lleva a la síntesis de Ang 1-7 y a la activación del receptor Mas, lo que resulta en vasodilatación (es anti-hipertensivo), protección renal y también analgesia. Es importante señalar que estas 2 vías actúan de manera coordinada y estrictamente regulada, por lo que un desbalance entre las actividades de ACE y ACE2 tiene consecuencias patológicas. De interés, el 83% de la ACE2 pulmonar se encuentra en los neumocitos de tipo II (Zhao et al. 2020), donde el virus se replica



activamente, lo que ocasionará dificultad respiratoria y posiblemente un aumento en la mortalidad. No obstante, la ACE2 se expresa también en los miocitos ventriculares, las arterias coronarias, los hepatocitos, las células del túbulo contorneado distal, proximal y el glomérulo, los islotes pancreáticos, las células parietales gástricas, las células epiteliales del intestino delgado y las neuronas del sistema nervioso central, entre otros (Santos et al. 2018). Todos estos tejidos son potenciales blancos para la invasión por parte de SARS-CoV-2.

Figura 1. Vías metabólicas en las que participan ACE y ACE2, sus productos metabólicos y blancos moleculares, y principales impactos fisiológicos y patológicos.

Por otro lado, se ha propuesto una hipótesis general, sintetizada en la **figura 2**, de una posible manera en la que el virus podría causar dolor persistente. La neuroinvasión afectaría a neuronas y microglia de la médula espinal que expresan ACE2. Dado que la unión de Spike a ACE2 causa una disminución en los niveles de la enzima en ambos tipos celulares, esto derivaría en que haya un predominio en la actividad de ACE. Estos 2 eventos simultáneos resultan en un aumento en los niveles de Angiotensina II (Ang II) y a la vez una disminución en los niveles de Ang 1-7. Ang II puede entonces unirse a AT1R, con efectos pro-inflamatorios y pro- algésicos, en detrimento de la actividad

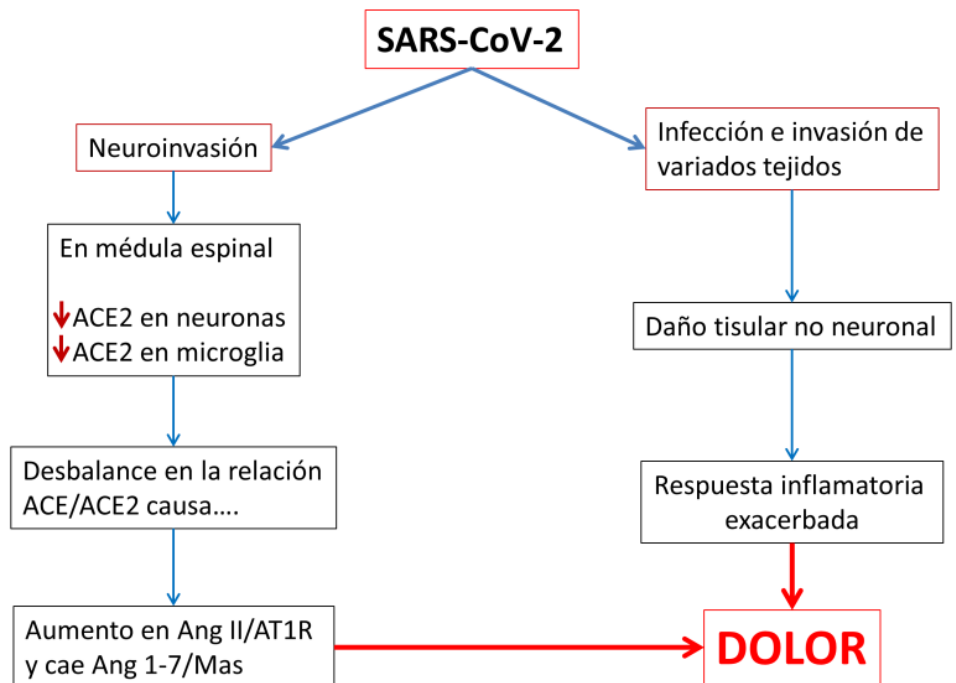


Figura 2. Hipótesis "espinal" y "tisular" de invasión por Sars-CoV-2 y dolor.

protectora y analgésica propia de la unión de Ang 1-7 a su receptor Mas. Sumado a los factores liberados por otros tejidos dañados por la actividad lítica del virus, se tiene un posible mecanismo de inducción de dolor a nivel medular resultante directamente de la neuroinvasión por SARS-CoV-2 (Su *et al.* 2020). Sin embargo, hay dudas respecto de los niveles de expresión de ACE2 en la médula espinal en humanos (Shiers *et al.* 2020). Esto abre la posibilidad de que el punto de entrada del virus sean las neuronas aferentes primarias del ganglio de la raíz dorsal (GRD) sensibles a estímulos nocivos o cuya disfunción causa dolor crónico patológico, esto es, los nociceptores.

Sin embargo, estas proposiciones, aunque plausibles, son solamente hipótesis y hay varias preguntas de interés en relación al dolor persistente en pacientes de Covid-19 que requieren respuesta. Por ejemplo, ¿Cómo podrá el virus infectar directamente a las neuronas sensoriales primarias o las células satélites o ambas? Para lograrlo, estas células deberían expresar alguna molécula que funcione como puerta de entrada, por ejemplo, la propia ACE2 y su molécula auxiliar TMPRSS2, tal como ocurre en la invasión viral de las células sustentaculares del epitelio olfatorio (Fodouljian *et al.* 2020). También podría implicar a otras proteínas receptoras (llamadas SCARFs o "SARS-CoV-2 and coronavirus-associated factors and receptors") de las cuales se ha completado recientemente un mapa molecular (Singh *et al.* 2020). Otro interrogante que surge es: aun si ocurriera neuroinvasión, ¿a qué población neuronal del GRD afecta? ¿Por qué la neuroinvasión no causa dolor crónico en todos los pacientes sino solamente en algunos?

SARS-CoV-2, interacciones neuroinmunes a nivel pulmonar y dolor

Varios estudios recientes han abordado estas preguntas y han arrojado resultados muy interesantes. El primer dato emergente fue que las neuronas de los GRD torácicos que inervan los pulmones expresan una variedad importante de potenciales efectores de la infección, aunque en este punto aún se desconocía si estas neuronas u otras del GRD en humanos expresan ACE2 (Ray *et al.* 2020). La **figura 3** resume los hallazgos principales de dicho estudio. Los autores identificaron que en fluido derivado de lavado broncoalveolar de pacientes internados con Covid-19: 1) hay un notable incremento en los niveles de varias citoquinas y quemoquinas pro-inflamatorias que utilizan una vía de señalización celular conocida por mediar la tormenta de citoquinas (llamada MNK-eIF4E) y 2) muchos de estos mediadores pro-inflamatorios interactúan con receptores potencialmente expresados (presentes) en neuronas sensoriales torácicas que inervan los pulmones. Finalmente, el estudio especula con que la activación de estas neuronas induce la liberación de neuropéptidos que causan vasodilatación, reclutamiento de células inmunes, inflamación neurogénica e incluso dolor al respirar.

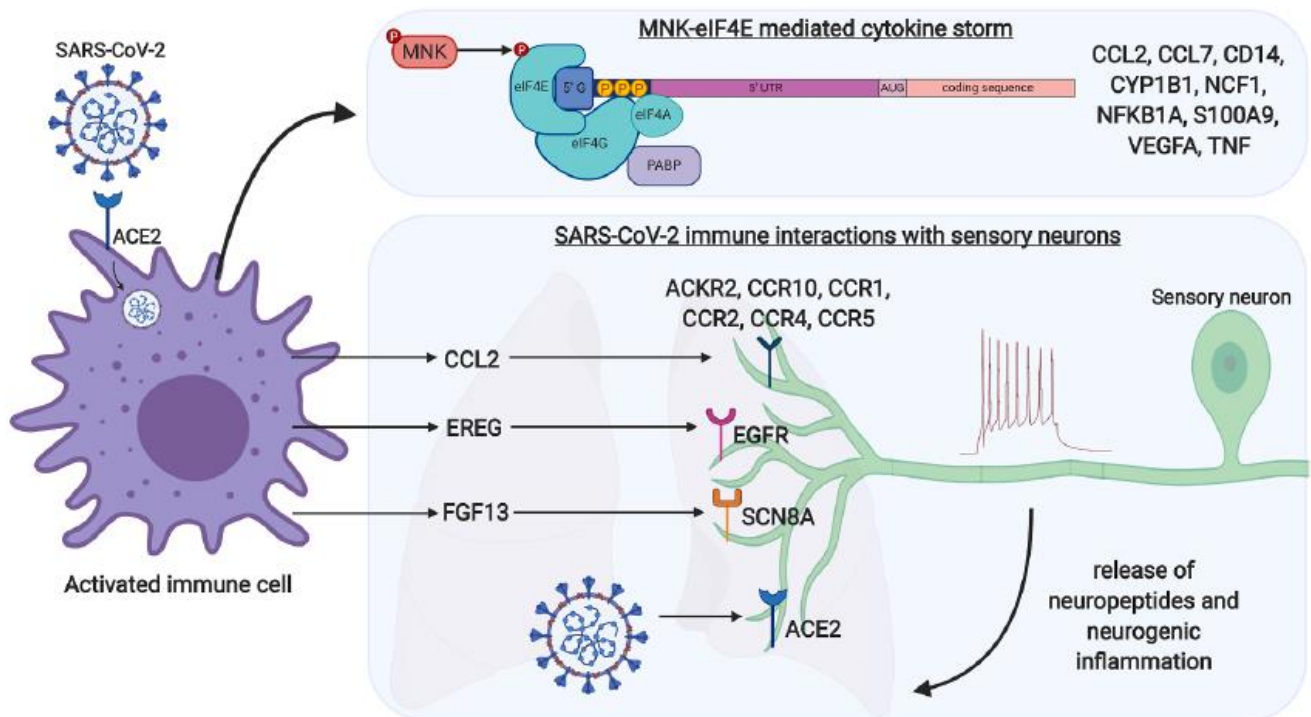


Figura 3. Hipótesis que podrían explicar, al menos en parte, la fisiopatología del dolor al respirar y otros fenómenos neuroinflamatorios a nivel pulmonar (Figura tomada de Ray *et al.*, 2020, Brain Behavior and Immunity 89, 559-568).

ACE2 en neuronas sensitivas: “El zorro entre las ovejas”

Por otro lado, en un avance significativo y utilizando muestras de GRD de pacientes obtenidas a partir de vertebrotomías, el grupo dirigido por Ted Price logró demostrar de manera fehaciente que ACE2 se expresa en una sub-población de neuronas del GRD que además expresan el receptor purinérgico P2X3, el canal de sodio Nav1.8, el péptido relacionado al gen de la calcitonina y el Mas-related G-protein receptor family member D. Estos marcadores son típicos de nociceptores que forman terminales nerviosas libres en la piel, en los órganos luminales (como el pulmón) y en las meninges (Shiers *et al.* 2020). En total, cerca del 25% de las neuronas del GRD expresan ACE2, y además presentan niveles robustos de proteasas esenciales para facilitar la invasión viral (TMPRSS2 y Furina8) (Yan *et al.* 2020). Así es muy probable que SARS-CoV-2 que se replica activamente en los pulmones tenga acceso a dichas terminales nerviosas y logre entonces la neuroinvasión de los nociceptores allí presentes. Cabe señalar que aún se carece de evidencia directa de la presencia de partículas virales en terminales nerviosas libres o en los somas de las neuronas del GRD de pacientes que cursan o cursaron Covid-19, ya sea que hayan o no experimentado síntomas consistentes con dolor crónico o persistente. Esta evidencia solamente podría obtenerse en estudios *post-mortem* examinando los ganglios y las terminales por métodos de microscopía electrónica, algo que aún no se ha hecho.

Blancos adicionales de Sars-CoV-2

Un tercer estudio publicado recientemente ofrece una explicación para el hecho de que no todos los pacientes de Covid-19 experimentan dolor. El grupo de Khanna y colaboradores mostró que el receptor de neuropilina-1 (NRP-1) puede unirse a la proteína Spike en el mismo sitio al que se une el factor de crecimiento vascular endotelial de tipo A (VEGF-A). Este factor es angiogénico y pro-nociceptivo. De hecho, VEGF-A induce el disparo de potenciales de acción repetitivos en las neuronas del GRD y causa alodinia en ratas. Ambos efectos fueron suprimidos por la unión de la proteína Spike a NRP-1 (Moutal *et al.* 2020). Este resultado sugiere que Spike (y por ende, SARS-CoV-2) puede causar un silenciamiento de los nociceptores (y por ende, del dolor) al desplazar la unión de VEGF-A al receptor NRP-1 presente en neuronas del GRD. Los autores especulan que a través de este mecanismo, el virus lograría que su presencia pase desapercibida, resultando en casos asintomáticos. Aunque no aportan pruebas al respecto, también sugieren que este fenómeno ayudaría a una mucha mayor y más eficiente dispersión de la infección en la población, aunque la evidencia muestra que la habilidad de los pacientes asintomáticos para contagiar a otros es inferior a lo que se creía inicialmente (Cao *et al.* 2020). De todos modos, esta estrategia no es nueva: otros patógenos liberan sustancias que actuando sobre el sistema renina-angiotensina “silencian” a los nociceptores, lo que permite que la infección progrese sin ser evidenciada. Tal es el caso de la liberación de micolactona por parte del agente causante de la úlcera de Buruli (Reynaert *et al.* 2019).

Finalmente, hay estudios *in silico* que muestran que la proteína Spike puede unirse con muy alta afinidad y efectividad a un componente clave de la respuesta inmune innata, que es el Toll-like receptor 4 (TLR-4) (Bhattacharya *et al.* 2020; Choudhury & Mukherjee 2020). Este receptor se expresa en neuronas peptidérgicas de los GRD (Acosta & Davies 2008) y también en las células satélite del ganglio, donde su activación por lipopolisacáridos causa la liberación de citoquinas pro-inflamatorias. Esta hipótesis debe aún demostrarse *in vivo*, pero ilustra la complejidad de la interacción entre el SARS-CoV-2 y las neuronas sensoriales periféricas.

Conclusiones

En resumen, una de las secuelas más debilitantes del Covid-19 es la persistencia de afecciones del sistema nervioso, incluyendo dolor crónico, que bien puede ser el resultado de una neuroinvasión por parte de SARS-CoV-2 de neuronas aferentes sensoriales primarias de tipo nociceptivo que expresan ACE2.

Dr. Cristian Acosta

Investigador Adjunto – CONICET
Instituto de Histología y Embriología
Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza

Bibliografía

- Acosta, C. and Davies, A. (2008) Bacterial lipopolysaccharide regulates nociceptin expression in sensory neurons. *J Neurosci Res* **86**, 1077-1086.
- Bhattacharya, M., Sharma, A. R., Mallick, B., Sharma, G., Lee, S. S. and Chakraborty, C. (2020) Immunoinformatics approach to understand molecular interaction between multi-epitopic regions of SARS-CoV-2 spike-protein with TLR4/MD-2 complex. *Infect Genet Evol* **85**, 104587.
- Cao, S., Gan, Y., Wang, C. et al. (2020) Post-lockdown SARS-CoV-2 nucleic acid screening in nearly ten million residents of Wuhan, China. *Nat Commun* **11**, 5917.
- Cooper, K. W., Brann, D. H., Farruggia, M. C. et al. (2020) COVID-19 and the Chemical Senses: Supporting Players Take Center Stage. *Neuron* **107**, 219-233.
- Choudhury, A. and Mukherjee, S. (2020) In silico studies on the comparative characterization of the interactions of SARS-CoV-2 spike glycoprotein with ACE-2 receptor homologs and human TLRs. *J Med Virol* **92**, 2105-2113.
- Fodoulian, L., Tuberosa, J., Rossier, D. et al. (2020) SARS-CoV-2 Receptors and Entry Genes Are Expressed in the Human Olfactory Neuroepithelium and Brain. *iScience* **23**, 101839.
- Gasmi, A., Tippairote, T., Mujawdiya, P. K., Gasmi Benahmed, A., Menzel, A., Dadar, M. and Bjorklund, G. (2020) Neurological Involvements of SARS-CoV2 Infection. *Mol Neurobiol*.
- Moutal, A., Martin, L. F., Boinon, L. et al. (2020) SARS-CoV-2 Spike protein co-opts VEGF-A/Neuropilin-1 receptor signaling to induce analgesia. *Pain*.
- Ray, P. R., Wangzhou, A., Ghneim, N. et al. (2020) A pharmacological interactome between COVID-19 patient samples and human sensory neurons reveals potential drivers of neurogenic pulmonary dysfunction. *Brain Behav Immun* **89**, 559-568.
- Reynaert, M. L., Dupoirion, D., Yeramian, E., Marsollier, L. and Brodin, P. (2019) Could Mycolactone Inspire New Potent Analgesics? Perspectives and Pitfalls. *Toxins (Basel)* **11**.
- Santos, R. A. S., Sampaio, W. O., Alzamora, A. C., Motta-Santos, D., Alenina, N., Bader, M. and Campagnole-Santos, M. J. (2018) The ACE2/Angiotensin-(1-7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1-7). *Physiol Rev* **98**, 505-553.
- Shiers, S., Ray, P. R., Wangzhou, A. et al. (2020) ACE2 and SCARF expression in human dorsal root ganglion nociceptors: implications for SARS-CoV-2 virus neurological effects. *Pain* **161**, 2494-2501.
- Singh, M., Bansal, V. and Feschotte, C. (2020) A Single-Cell RNA Expression Map of Human Coronavirus Entry Factors. *Cell Rep* **32**, 108175.
- Su, S., Cui, H., Wang, T., Shen, X. and Ma, C. (2020) Pain: A potential new label of COVID-19. *Brain Behav Immun* **87**, 159-160.
- Tolebeyan, A. S., Zhang, N., Cooper, V. and Kuruvilla, D. E. (2020) Headache in Patients With Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection: A Narrative Review. *Headache* **60**, 2131-2138.
- Yan, R., Zhang, Y., Li, Y., Xia, L., Guo, Y. and Zhou, Q. (2020) Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science* **367**, 1444-1448.
- Zhao, Y., Zhao, Z., Wang, Y., Zhou, Y., Ma, Y. and Zuo, W. (2020) Single-Cell RNA Expression Profiling of ACE2, the Receptor of SARS-CoV-2. *Am J Respir Crit Care Med* **202**, 756-759.