



**Universidad de Concepción
Facultad Farmacia**

ANÁLISIS DE LA NETOSIS EN PACIENTES QUE PADECIERON COVID-19 Y SU ASOCIACIÓN CON ALTERACIONES DEL PERFIL DEL METABOLISMO GLUCÍDICO POST INFECCIÓN

POR CAMILO DANIEL CABRERA GARCIA

Tesis presentada a la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción
para optar al grado de Magíster en Bioquímica Clínica e Inmunología

Profesor guía/Profesor patrocinante: Dra. Estefanía Andrea Nova Lamperti
Departamento Bioquímica Clínica e Inmunología
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Profesor co-guía: Dr. Ricardo Verdugo
Instituto de Investigación Interdisciplinaria
Escuela de Medicina
Universidad de Talca

Agosto, 2023

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a ANID por el financiamiento de esta tesis enmarcada en los proyectos COVID1005 y Anillo ACT210085. A mis compañeros por todo el apoyo entregado en instancias académicas y extraacadémicas, Camila Muñoz, Bárbara Antilef, Sergio Sanhueza y Romina Quiroga, su ayuda fue fundamental para el desarrollo del trabajo. También quiero agradecer la guía de mi tutora la Dr. Estefanía Nova-Lamperti por no sólo su guía académica, sino también por su apoyo constante y su preocupación por mi bienestar a lo largo del transcurso desde que comencé a trabajar bajo su tutoría hasta la fecha actual.

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN	5
3.1 SARS-CoV-2, aspectos generales	5
3.2 Neutrófilos y glicemia, una relación patológica en COVID-19	8
3.3 Neutrófilos y su importancia en el síndrome de distrés respiratorio agudo	12
3.4 Control glicémico y severidad del COVID-19	18
3.5 Secuelas metabólicas e inmunes post-COVID-19	23
3.6 Hipótesis	30
3.7 Objetivo General	31
3.8 Objetivos específicos	31
4. MATERIALES Y MÉTODOS	32
4.1 Caracterizar los parámetros del metabolismo glucídico 4 y 12 meses post infección en una cohorte de pacientes que cursaron COVID-19	32
4.1.1 Recolección de muestras	32
4.1.2 Etiquetado de muestras	32
4.2 Evaluar el porcentaje de NETosis basal y post estímulo en una cohorte de pacientes COVID-19, 4 meses post infección	33
4.2.1 Extracción de PMN por gradiente de ficoll	33
4.2.2 Cuantificación de NETosis mediante Live/Dead Dye y Sytox Blue por citometría de flujo.	36
4.3 Analizar el efecto del plasma de pacientes que cursaron COVID-19, 4 meses post infección, sobre la NETosis utilizando neutrófilos sanos como biosensor	37
4.3.1 Cuantificación de NETosis en neutrófilos humanos sanos expuesto a plasma COVID-19 por Incucyte	37
4.3.2 Evaluación del efecto de la glucosa en la producción de NETosis en neutrófilos humanos sanos en presencia y ausencia de insulina	38
4.4 Evaluar la relación entre el porcentaje de NETosis de la cohorte de pacientes que cursaron COVID-19 con parámetros clínicos, metabólicos e inflamatorios, 4 meses post infección	39
4.4.1 Análisis de datos	39
5. RESULTADOS	41

5.1 Caracterizar los parámetros del metabolismo glucídico 4 y 12 meses post infección en una cohorte de pacientes que cursaron COVID-19.....	41
5.2 Evaluar el porcentaje de NETosis basal y post estímulo en una cohorte de pacientes que cursaron COVID-19, 4 meses post infección.....	67
5.3 Evaluar la relación entre el porcentaje de NETosis de la cohorte de pacientes que cursaron COVID-19 con parámetros clínicos, metabólicos e inflamatorios, 4 meses post infección.....	90
6. DISCUSIÓN.....	104
7. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES	113
8. GLOSARIO	115
9. BIBLIOGRAFÍA	116
10. ANEXOS	125
10.1 1-A Consentimiento informado.....	125
10.2 Certificado UdeC cumplimiento de normas y bioética.....	127
10.3 1-B Manejo de residuos	130

INDICE DE TABLAS

3-1 Neutrofilia descrita en pacientes COVID-19 de diversos estudios.	7
5-1 Descripción física y de secuelas pulmonares de la cohorte de pacientes COVID-19	44
5-2 Descripción de la cohorte separada por sexo y comparaciones de parámetros físicos y variables categóricas.	46

INDICE DE ILUSTRACIONES

3-1 Formación de trampas extracelulares de Neutrófilo (NETs) con distintas condiciones del medio de cultivo.	10
3-2 Inhibición farmacológica de la glicolisis y de ATP sintasa disminuye la formación de NETs.	11
3-3 Esquema del proceso de formación de trampas extracelulares de neutrófilo (NETs) NETosis.	14
3-4 Producción de NETs en neutrófilos sanos expuestos a suero de pacientes COVID-19.	17
3-5 Resultados de CT de pacientes con y sin diabetes	20
3-6 Seguimiento del índice TyG como marcador de resistencia a la insulina).....	24
3-7 Alteraciones glicémicas en pacientes COVID-19 fase aguda y tras 4 meses del COVID-19	26
3-8 Insulina Plasmática e índice HOMA-IR en pacientes COVID-19 fase aguda y tras 4 meses	27
4-1 Esquema de separación de PMN mediante reactivo Polymorphprep (Extraído de protocolo Axis-Shield).	35
5-1 Descripción de la cohorte de 60 pacientes de COVID-19 provenientes del hospital Víctor Ríos-Ruiz	42
5-2 Distribución de alteraciones del metabolismo glucídico en la cohorte de 60 pacientes COVID-19.....	48
Comparación mediante análisis de varianza (ANOVA) entre grupos de estudio de la cohorte de pacientes COVID-19 en base a la cuantificación de citoquinas.....	51
5-3 Comparación mediante análisis de varianza (ANOVA) entre grupos de estudio de la cohorte de pacientes COVID-19 en base a la cuantificación de quimioquinas.. ..	52
5-4 Comparación mediante análisis de varianza (ANOVA) entre grupos de estudio de la cohorte de pacientes COVID-19 en base a la cuantificación de proteínas de complemento.....	54
5-5 Comparación mediante análisis de varianza (ANOVA) entre grupos de estudio de la cohorte de pacientes COVID-19 en base a la cuantificación de glicemia, insulina y HOMA-IR.....	56
5-6 Comparación mediante análisis de varianza (ANOVA) entre grupos de estudio de la cohorte de pacientes COVID-19 en base a la cuantificación de parámetros del perfil bioquímico	59
5-7 Comparación mediante análisis de varianza (ANOVA) entre grupos de estudio de la cohorte de pacientes COVID-19 en base a la cuantificación de parámetros del perfil lipídico.....	60
5-8 Comparación mediante análisis de varianza (ANOVA) entre grupos de estudio de la cohorte de pacientes COVID-19 en base a parámetros del perfil hepático ..	63
5-9 Comparación mediante análisis de varianza (ANOVA) entre grupos de estudio de la cohorte de pacientes COVID-19 en base a los parámetros del hemograma	65

5-10 Comparación mediante análisis de varianza (ANOVA) entre grupos de estudio de la cohorte de pacientes COVID-19 en base a la cuantificación de anticuerpos anti-SARS-CoV-2.....	66
5-11 Estrategia de gattering para la cuantificación de NETosis mediante citometría de flujo	70
5-12 Efecto de citoquinas (TNF-a e IL-6) en el porcentaje de NETosis total.....	71
5-13 Efecto de agonistas TLR 3 (HMW y LMW) en el porcentaje de NETosis total.....	72
5-14 Efecto de agonista TLR 7 (ImiQ) en el porcentaje de NETosis total.....	73
5-15 Efecto de agonistas TLR 7/8 (R848 y CL075) en el porcentaje de NETosis total	75
5-16 Efecto de agonistas TLR 8 (ssRNA40 y ssRNA41) en el porcentaje de NETosis total	76
5-17 Efecto de citoquinas (TNF-IL6) en el porcentaje de NETosis vital.....	77
5-18 Efecto de agonistas TLR 3 (HMW y LMW) en el porcentaje de NETosis vital.....	78
5-19 Efecto de agonista TLR 7 (ImiQ) en el porcentaje de NETosis vital	80
5-20 Efecto de agonistas TLR 7/8 (R848 y CL075) en el porcentaje de NETosis vital	81
5-21 Efecto de agonistas TLR 8 (ssRNA40 y ssRNA41) en el porcentaje de NETosis vital.....	82
5-22 Imagen representativa de NETosis a cuantificar mediante Incucyte y tinción Sytox Green.....	84
5-23 Curva cinética de formación de trampas extracelulares de neutrófilo por exposición a plasma de pacientes en fase aguda de COVID-19	85
5-24 Curva cinética de formación de trampas extracelulares de neutrófilo por exposición a plasma de pacientes 4 meses post COVID-19.....	87
5-25 Efecto de glucosa en el porcentaje de NETosis de neutrófilos humanos sanos con presencia y ausencia de insulina.....	89
5-26 Análisis de correlación de Pearson entre las variables de glucosa (mg/dL) y %NETosis a distintos tiempos.....	91
5-27 Análisis de correlación de Spearman entre las variables de insulina y %NETosis a distintos tiempos.....	93
5-28 Análisis de correlación de Pearson entre las variables de HOMA-IR y %NETosis a distintos tiempos.....	94
5-29 Análisis de correlación de Spearman entre las variables de IL-12 y %NETosis a distintos tiempos	95
5-30 Análisis de correlación de Spearman entre las variables de TNF y %NETosis a distintos tiempos	96
5-31 Análisis de correlación de Pearson entre las variables de IL-6 y %NETosis a distintos tiempos	97
5-32 Análisis de correlación de Spearman entre las variables de IL-8 y %NETosis a distintos tiempos	98
5-33 Análisis de correlación de Pearson entre las variables de IL-1 β y %NETosis a distintos tiempos.....	99

5-34 Análisis de correlación de Spearman entre las variables de CXCL-10 y %NETosis a distintos tiempos.....	100
5-35 Análisis de correlación de Spearman entre las variables de CCL-2 y %NETosis a distintos tiempos	101
5-36 Análisis de correlación de Spearman entre las variables de CXCL-9 y %NETosis a distintos tiempos.....	102
5-37 Análisis de correlación de Spearman entre las variables de CCL-5 y %NETosis a distintos tiempos.	103

RESUMEN

La enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) es una infección viral causada por el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo 2 (SARS-CoV-2), clasificada como pandemia en el año 2020. Estudios recientes han demostrado que pacientes de COVID-19 con mal pronóstico presentan una alta neutrofilia y la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETosis). Además, la diabetes y prediabetes se han descrito como factores de riesgo de COVID-19 severo y se han descrito alteraciones en el metabolismo glucídico como secuela post infección. La regulación del metabolismo glucídico es clave en la activación del neutrófilo, sin embargo, no está claro si estas alteraciones pueden afectar la función del neutrófilo post COVID-19 a largo plazo. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la NETosis en pacientes que padecieron COVID-19 y presentan alteraciones en el metabolismo glucídico 4 meses post infección. Por ello, en una cohorte de 60 pacientes de COVID-19 se identificaron aquellos que presentaron alteraciones en el metabolismo glucídico 4 meses post COVID-19 y se evaluó la NETosis basal y en respuesta a agonistas de TLR3/7/8 y el efecto del plasma de los pacientes sobre la NETosis utilizando un neutrófilo sano como biosensor. Los resultados revelaron que de los 36 pacientes que no poseían alteraciones del metabolismo glucídico al inicio del estudio, 24 (66,7%) desarrollaron insulinoresistencia (IR) 4 meses post COVID-19. Cuando se analizó la NETosis se observó que hay un incremento de la NETosis basal en

neutrófilos de un 3,5% ($p = 0,035$) en pacientes que desarrollaron IR, los cuales no fueron capaces de responder frente al agonista del TLR7/8, pero si frente a citoquinas, con respecto a los pacientes sin alteraciones. Además, se observó un aumento de la NETosis de neutrófilos sanos expuestos a plasma de pacientes post COVID-19 con IR respecto al plasma de los pacientes sin IR, incremento que se correlacionó positivamente con la insulina e IL-6 presente en el plasma. En conclusión, existe un desarrollo de IR post COVID-19 en pacientes sin alteraciones previas, los que además presentaron un aumento de NETosis basal, una disminución en la capacidad de respuesta a TLR 7/8 y un aumento en la capacidad de inducir la formación de NETs en neutrófilos sanos. Estos cambios podrían explicar la mayor predisposición a realizar trombosis en pacientes de COVID-19 con diabetes o prediabetes y su peor pronóstico de la enfermedad.

ABSTRACT

The infectious Coronavirus disease 2019 (COVID-19) caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) was classified as a pandemic in 2020. Recent studies have shown that COVID-19 patients with poor prognosis exhibit high neutrophilia and develop more neutrophil extracellular trap formation (NETosis). In addition, diabetes and prediabetes have been described as risk factors for severe COVID-19 and glucose metabolism alterations have been reported to emerge after infection. Regulation of glucose metabolism is critical for neutrophil activation; however, it is unclear whether these alterations can affect neutrophil function after COVID-19. The aim of this study was to analyze NETosis in recovered COVID-19 patients who presents alterations in glucose metabolism 4 months post infection. Therefore, in a cohort of 60 patients who suffered COVID-19, we determined alterations in glucose metabolism 4 months after acute COVID-19. We then evaluated NETosis at baseline and in response to TLR3/7/8 agonists and the effect of patients' plasma on NETosis using a healthy neutrophil as a biosensor. The results revealed that 24 patients of the 36 (66,7%) patients who had no alterations in glucose metabolism at baseline developed insulin resistance (IR) 4 months post COVID-19. When NETosis was analyzed, it was observed that there is an increase in 3,5% baseline NETosis in neutrophils of patients who developed IR, which were not able to respond to TLR7/8 agonists but did respond to cytokines, compared to patients without alterations. In addition,

we observed an increase in NETosis of healthy neutrophils exposed to plasma from post COVID-19 patients with IR compared to plasma from patients without IR, which was positively correlated with insulin and IL-6 present in plasma. In conclusion, there is an increased incidence of IR post COVID-19 in patients without previous alterations, who also presented increased basal NETosis, decreased capacity to respond to TLR 7 and increased capacity to induce NET formation in healthy neutrophils.

INTRODUCCIÓN

SARS-CoV-2, aspectos generales

El origen del SARS-CoV2 se remonta a un repentino brote de neumonía de origen desconocido en diciembre de 2019 en la ciudad de Wuhan, China. El aumento de los casos de neumonía en la región alertó a las autoridades locales, que luego de realizar la caracterización del agente causal, determinaron que correspondía a un β -coronavirus, un virus de ARN de cadena única, con un giro positivo (Kirtipal, Bharadwaj, & Kang, 2020). Este género de virus presenta un genoma de entre 27 a 32 kb y su genoma codifica para 4 a 5 proteínas, la proteína espiga (S), la proteína de membrana (M), la proteína de envoltura (E), la nucleocápside (N) y la hemaglutinina-esterasa (HE) (Rabaan et al., 2020). De acuerdo con el contexto clínico, se le ha dado mayor importancia a la proteína S, puesto que esta interactúa con la enzima convertidora de Angiotensina 2 (ACE-2) y es la vía de entrada del virus a las células humanas (Rabaan et al., 2020). Este nuevo coronavirus se denominó SARS-CoV-2 causante del COVID-19 y produjo una alerta a nivel internacional debido a su alta tasa de contagio, principalmente debido a la existencia de pacientes asintomáticos portadores del virus. Posteriormente, en febrero del 2020, la OMS alertó el potencial pandémico de este nuevo virus (Lai, Shih, Ko, Tang, & Hsueh, 2020). Los síntomas principales del COVID-19 son los de un resfriado común, pero pacientes con comorbilidades pueden desarrollar neumonía y posteriormente el síndrome de distrés respiratorio

agudo (ARDS), que aumentan su riesgo de muerte. El cuadro severo de la enfermedad se caracteriza por la hipoxemia severa y el paciente puede desarrollar daño multiorgánico, afectando principalmente a los riñones y al corazón (Zhou et al., 2020). El verdadero problema en la transmisión del SARS-CoV-2 recae en que este posee un periodo de incubación de entre 4-8 días post infección, por lo que pueden existir portadores infectantes del virus, pero asintomáticos, lo que contribuye a la expansión de la infección (Rabaan et al., 2020). Por esta preocupación internacional se canalizan los esfuerzos en descubrir los mecanismos por los cual el virus puede provocar una respuesta severa en algunos pacientes y en otros no.

Durante la infección por SARS-CoV-2 existe una dinámica documentada de las distintas células del sistema inmune, en donde se observa que existe linfopenia recurrente en los pacientes severos (Liu et al., 2020; Marhl, Grubelnik, Magdič, & Markovič, 2020; Qin et al., 2020; D. Wang et al., 2020). Otra célula a la que se le ha atribuido un rol importante es al neutrófilo puesto que este aumenta en circulación lo que se observa como neutrofilia en pacientes severos de COVID-19 (Tabla 1) (Bastug et al., 2020; C. Huang et al., 2020; Lei et al., 2020; Liu et al., 2020; Qin et al., 2020; Sun et al., 2020; D. Wang et al., 2020; Z. Wang, Yang, Li, Wen, & Zhang, 2020).

Tabla I: Neutrofilia descrita en pacientes COVID-19 de diversos estudios.

Autor, año	Leucocitos x10⁹/L	P value	Neutrófilos x10⁹/L	P value	%Neutrófilos	Pacientes
Bastug et al., 2020	8,7	<0,001	7,28	<0,001	83,68	46
Yuwei Liu et al., 2020	8,49	<0,001	7,38	<0,001	86,93	82
Chaolin Huang et al., 2020	11,3	0,011	10,6	0,00069	93,81	13
Chuan Qin et al., 2020	5,6	<0,001	4,3	<0,001	77,6	286
Zhongliang Wang et al., 2020	6,52	0.006	5,24	<0,001	80,36	14
Dawei Wang et al., 2020	6,6	0,003	4,6	<0,001	69,69	36
Chaomin Wu et al., 2020	8,32	<0,001	7,04	<0,001	84,62	84
Shaoqing Lei et al., 2020	8,5	0.049	7,9	0,02	92,94	15
Suyu Sun et al., 2020	7,44	<0,001	6,07	<0,001	81,59	27

Neutrófilos y glicemia, una relación patológica en COVID-19

Los neutrófilos son leucocitos polimorfonucleares encargados de la respuesta inmune innata, cuyo rol principal se encuentra mayormente en la inflamación aguda. Normalmente, son las primeras células reclutadas al sitio inflamatorio para eliminar la infección. Frente a DAMPS o PAMPS los macrófagos residentes producen una serie de procesos como el aumento de permeabilidad del endotelio de los capilares cercanos, la liberación de citoquinas y quimioquinas, lo que produce como efecto final el reclutamiento de neutrófilos a la zona, luego que éstos completan su labor, los macrófagos los eliminan y finaliza su participación en la respuesta inflamatoria (Kolaczkowska & Kubes, 2013). Esto ocurre con normalidad en pacientes leves de COVID-19, mientras que en pacientes severos, la cascada inflamatoria iniciada por el macrófago producirá IL-6 y IL-1 β y ocurrirá el reclutamiento de neutrófilos y células T citotóxicas, sin embargo, la respuesta no es resuelta por lo que se produce un fenómeno denominado tormenta de citoquinas, que es caracterizado por la alta concentración de citoquinas séricas como IL-6, IL-1 β e IL-8 (Soy et al., 2020).

En la médula ósea cuando hay un proceso inflamatorio, ocurre un aumento en la producción de neutrófilos y su liberación a sangre periférica (Liew & Kubes, 2019), lo que también se ha descrito durante la patología severa de COVID-19. Los neutrófilos migran al alvéolo y ejercen su acción biológica; fagocitando,

liberando enzimas proteolíticas y produciendo especies reactivas de oxígeno (ROS) para producir la muerte celular por trampas extracelulares de neutrófilos (NETosis) (Kolaczowska & Kubes, 2013). Para llevar a cabo estos efectos, el neutrófilo usa un metabolismo que depende mayoritariamente de la glicólisis (Curi et al., 2020), en donde por transformaciones enzimáticas convierten la glucosa finalmente en piruvato y obtienen ATP del proceso. Además, se ha descrito en un estudio de Rodríguez-Espinoza y colaboradores, que neutrófilos derivados de sangre periférica de donantes sanos cultivados en medios carentes de glucosa, disminuyen su producción de NETs casi al mínimo en estado basal y post activación con PMA (potente activador de la NETosis) (Rodríguez-Espinoza, Rojas-Espinoza, Moreno-Altamirano, Lopez-Villegas, & Sanchez-Garcia, 2015) (Figura 1). Dentro de este mismo estudio se describió que la inhibición de la glicolisis mediante 2-desoxi-D-Glucosa (2-DOG) disminuye significativamente la formación de NETs (Rodríguez-Espinoza et al., 2015) e igualmente cuando se realizó una incubación con oligomicina (inhibidor de ATP sintasa), se observó una reducción de la NETosis respecto al control con medio sin inhibidor (Figura 2) (Rodríguez-Espinoza et al., 2015), por lo que se han descrito a estas células como una diana potencial en ciertas enfermedades inflamatorias en donde ocurre una desregulación de la respuesta inmune innata, en casos como enfermedades autoinmunes y cáncer.

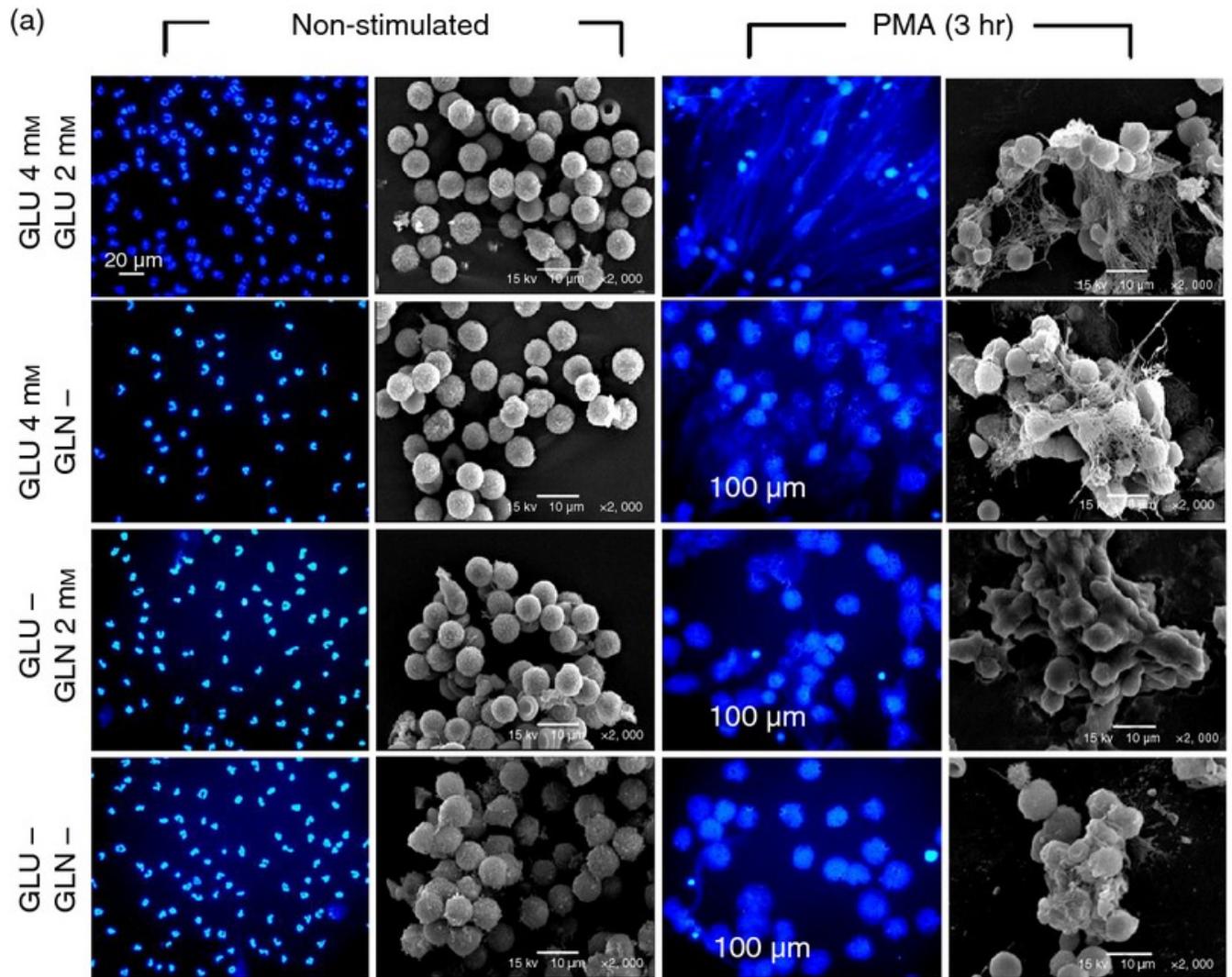


Figura 1: Formación de trampas extracelulares de Neutrófilo (NETs) con distintas condiciones del medio de cultivo. Glucosa 4nM (GLU), glutamina 2nM (GLN) en azul tinción DAPI para detección de ADN. Las dos columnas de la izquierda presentan neutrófilos sin estimular y las dos columnas de la derecha presentan neutrófilos estimulados por forbol miristato acetato (PMA) activador de $nF\kappa\text{-}\beta$ (vía de señalización inflamatoria) durante 3 horas. (Extraído de Rodríguez-Espinosa, Rojas-Espinosa, Moreno-Altamirano, Lopez-Villegas, & Sanchez-Garcia, 2015).

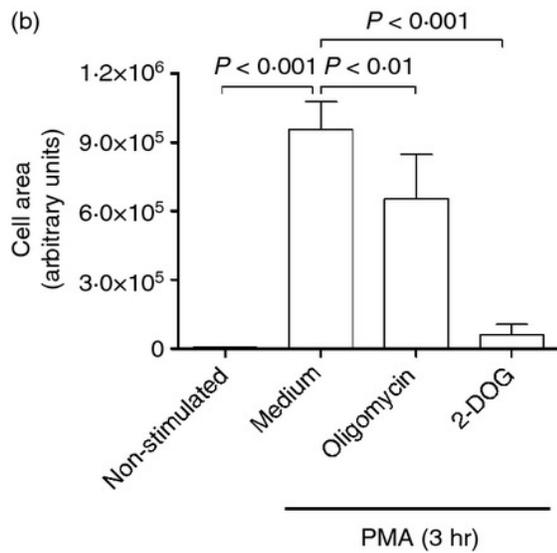
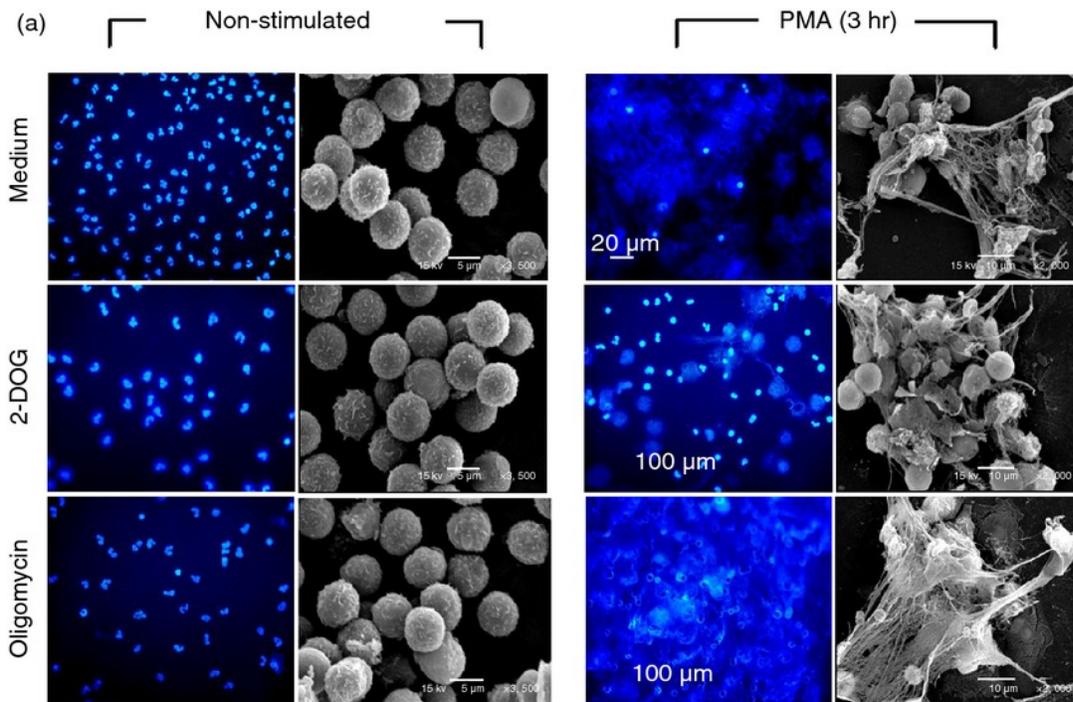


Figura 2: Inhibición farmacológica de la glicolisis y de ATP sintasa disminuye la formación de NETs. (a) Neutrófilos aislados en medio RPMI-1640 completo fueron incubados con 2-desoxiglucosa (2-DOG), oligomicina o medio solo, la columna de la izquierda

representa a células sin activar y la columna derecha representa neutrófilos activados por PMA 100 nm por 3h. (b) Medición de NETosis mediante medición del área del DNA con software de imagen y comparaciones mediante análisis de varianza. (Extraído de Rodríguez-Espinosa, Rojas-Espinosa, Moreno-Altamirano, Lopez-Villegas, & Sanchez-Garcia, 2015).

Neutrófilos y su importancia en el síndrome de distrés respiratorio agudo

La presencia de trampas extracelulares de neutrófilo (NETs) juega un rol importante dentro de la generación de ARDS, debido a que se ha demostrado que al extraer el fluido de lavado bronco alveolar (BALF), se han encontrado grandes infiltraciones de neutrófilos (Grommes & Soehnlein, 2011). En modelos BALB/c murinos se ha visto que al realizar la depleción de los neutrófilos en circulación, se genera una reducción significativa de las lesiones pulmonares asociadas a ARDS (Abraham, Carmody, Shenkar, & Arcaroli, 2000). El daño que producen los neutrófilos en el tejido pulmonar se basa en la liberación de enzimas proteolíticas como neutrófilo elastasa o la metaloproteinasa de matriz 9, y además la liberación de NETs (Adrover et al., 2020; Manzenreiter et al., 2012). Estos últimos en particular han sido descritos como una potencial causal de ciertas enfermedades como ARDS, fibrosis quística, entre otras, tanto en modelos murinos como humanos (Adrover et al., 2020; Manzenreiter et al., 2012). Las NETs son redes formadas por DNA descondensado, histonas citrulinadas (H3c), diversas enzimas como mieloperoxidasa (MPO) o neutrófilo elastasa (NE),

las NETs contribuyen en la opsonización de los patógenos y mediante este mecanismo facilitar la fagocitosis (Brinkmann et al., 2004). El proceso de liberación de NETs es dependiente de la glicólisis, donde se producirá glucosa-6-fosfato que entrará a la vía de las pentosas fosfato, provocando la producción de NADPH, que a su vez inducirá la activación de NADPH oxidasa, que provocará la liberación de ROS, activador de la enzima peptidil arginina deiminasa 4 (PAD4), que citrulina histonas y descondensa el DNA y libera las NETs, provocando o no la muerte celular del neutrófilo dependiendo del tipo de NETosis que ocurra, que puede ser del tipo suicida o vital (Figura 3) (Jorch & Kubes, 2017; Kumar & Dikshit, 2019; Liew & Kubes, 2019). El proceso de la NETosis igualmente se ve afectado por los receptores TLR (Toll Like Receptors) que influyen en la activación de células inmunes donde TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR 11 son receptores de superficie que poseen la capacidad de reconocer membranas de microorganismos y proteínas de complemento, también se han descrito a TLR7 y TLR8 los cuales tiene la capacidad de reconocer RNA extraños principalmente provenientes de virus, en neutrófilos se han descrito la presencia de todos estos TLR a excepción de TLR3 (Kawai & Akira, 2010).

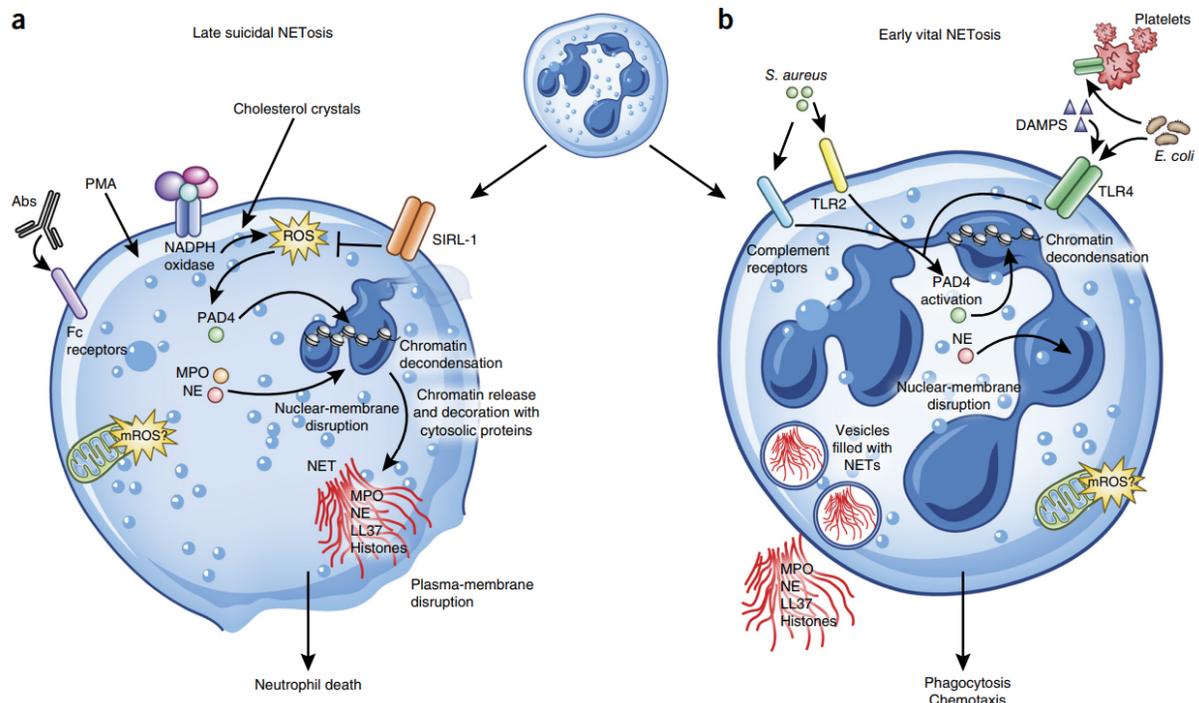


Figura 3: Esquema del proceso de formación de trampas extracelulares de neutrófilo (NETs) NETosis. (a) Diferentes estímulos tales como PMA, anticuerpos o cristales de colesterol, pueden inducir NETosis suicida, la que ocurre luego de horas de estimulación. Luego de la estimulación de NADPH oxidasa, se producen especies reactivas de oxígeno (ROS) y la enzima peptidil arginina deiminasa 4 (PAD4) se activa, lo que resulta en la descondensación de la cromatina. Después tanto neutrófilo elastasa (NE), como mieloperoxidasa (MPO) se translocan al núcleo para promover el despliegue de la cromatina, lo que provoca la ruptura de la membrana nuclear. La cromatina se libera al citosol y se adhieren a ella proteínas citosólicas y de gránulos, finalmente los NETs se liberan a través de la ruptura de la membrana plasmática y el neutrófilo muere. (b) La NETosis vital es inducida en minutos por *S. aureus*, a través de receptores del complemento, ligandos TLR2, por *E. coli* por TLR4 directo o indirectamente TLR4 vía

plaquetas. PAD4 se activa con o sin ROS e induce la descondensación de la cromatina, luego se transloca NE al núcleo para promover el despliegue de la cromatina y la disrupción de la membrana nuclear. Sin embargo, NETs se liberan mediante vesículas y el neutrófilo se mantiene viable para realizar más funciones como la fagocitosis y quimiotaxis. (Jorch & Kubes, 2017).

Esto puede provocar desregulación puesto que se ha demostrado que las NETs en exceso pueden ejercer una activación de la cascada inflamatoria que promueve y gatilla la cascada de coagulación lo que lleva a una excesiva trombosis vascular (Fuchs et al., 2010). En estudios *in vitro* en células EA.yh926 (células de endotelio vascular inmortalizadas) se ha demostrado la citotoxicidad de los NETs frente a distintos tipos de histonas extracelulares, en donde una de las que más acción citotóxica tiene es la H3 (Xu et al., 2009), coincidentemente siendo la histona más expresada en las trampas extracelulares de neutrófilo. La citotoxicidad de los NETs ha sido ampliamente investigado en varios tipos de tejidos en donde ha sido asociado con sepsis, daño renal, aterosclerosis, daño agudo pulmonar y retrasar la cicatrización (Hidalgo et al., 2021), sin embargo, no existe suficiente evidencia sobre cual tipo de NETosis puede ser la causal de las patologías. Recientemente en un estudio de 26 mujeres embarazadas sanas y con preeclampsia buscó determinar una relación entre el mecanismo de NETosis y el aumento de NETs en mujeres embarazadas con preeclampsia, donde observaron un aumento significativo en NETs en mujeres con preeclampsia y demostraron que existe una mayor proporción de NETs provenientes de NETosis suicida (Guillotín et al., 2023).

Las NETs también se han analizado en el COVID-19 con un estudio de 50 pacientes en el hospital académico de la Universidad de Michigan donde se determinó la cantidad de NETs en suero de 50 pacientes con COVID-19, en el estado agudo de la enfermedad. También, se analizó la NETosis de neutrófilos

control sanos gatillada por suero de pacientes COVID-19 frente a un suero control y se observó un aumento significativo en la producción de NETs respecto a aquellos que fueron expuestos a suero control sano (Figura 4) (Zuo et al., 2020).

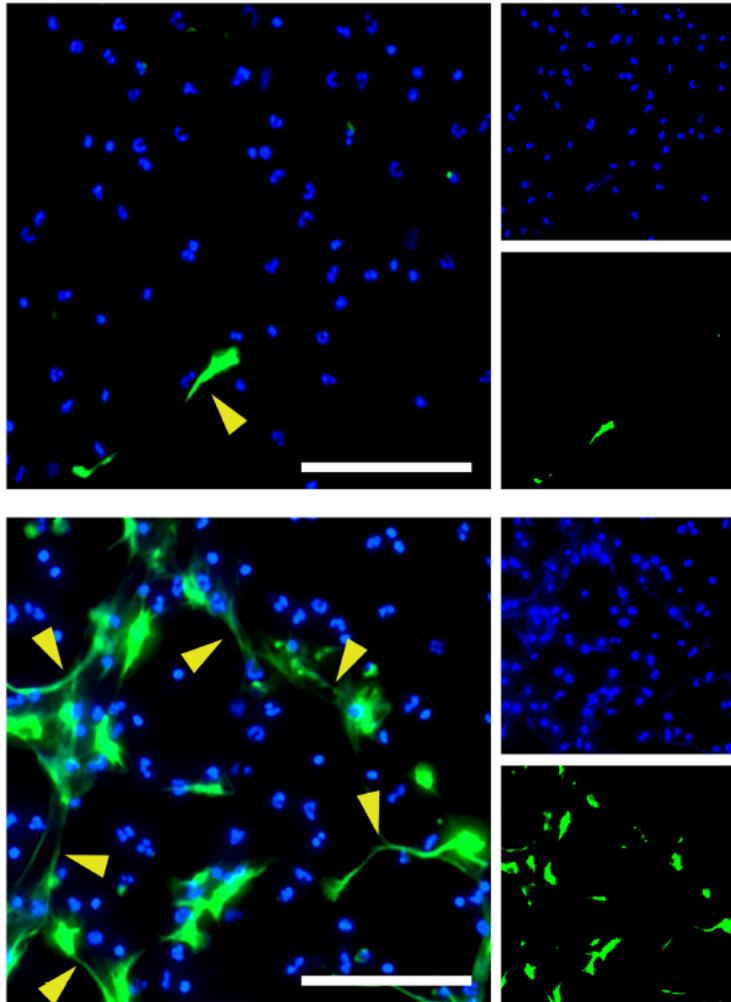


Figura 4: Producción de NETs en neutrófilos sanos expuestos a suero de pacientes COVID-19. Imagen superior neutrófilos incubados en suero control sano e imagen inferior neutrófilos incubados con suero paciente COVID-19. Con DAPI representado de

color azul se marca el DNA y con verde la enzima neutrófilo elastasa, las flechas amarillas indican NETosis (Extraído de Zuo et al., 2020).

En pacientes de COVID-19 severos es común observar daño en riñones y a nivel cardíaco, los cuales contribuyen directamente a la mortalidad de la enfermedad (Bonow, Fonarow, O'Gara, & Yancy, 2020) y se podrían relacionar con un aumento de NETs en el suero de pacientes de COVID-19. Los NETs inducen agregación plaquetaria y formación de trombos, lo que lleva a la oclusión de pequeños vasos sanguíneos y daña a órganos altamente irrigados por microvasculatura como el corazón, los pulmones y los riñones (Bonow et al., 2020).

Control glicémico y severidad del COVID-19

Otro eje importante para el mal pronóstico de la enfermedad y el posterior desarrollo de ARDS son las comorbilidades, las más comunes a nivel nacional e internacional son la hipertensión, la diabetes y la obesidad (Liu et al., 2020; D. Wang et al., 2020; C. Wu et al., 2020). En un estudio realizado por Zhou y cols. se analizaron los datos demográficos y clínicos de pacientes hospitalizados del hospital de Wuhan y Jinyintan y se encontró que de la población total de 191 adultos hospitalizados con diagnóstico COVID-19 positivo, un 30% del total presentaba hipertensión y de los pacientes que fallecieron un 48% tenían hipertensión, al analizar el riesgo de mortalidad obtuvieron un Odds Ratio (O.R) de 3,05. Además, un 19% de estos pacientes padecían diabetes y del total de

fallecidos, un 31% padecía diabetes, que al realizar el análisis de riesgo de fallecimiento encontraron un O.R de 2,85 (Zhou et al., 2020). En ese contexto se realizó un estudio para determinar la relación entre la diabetes y el mal pronóstico de COVID-19 en el hospital Union de Wuhan. El estudio separó 50 pacientes COVID-19 en 2 grupos; diabéticos y no diabéticos, y los resultados arrojaron diferencias significativas en parámetros inflamatorios como el dímero-D, velocidad de sedimentación eritrocitaria, entre otros. Dentro del mismo estudio se comparó la tomografía computarizada (CT) de ambos grupos, cuantificándolo como CT score, y se observó un aumento significativo de daño y anormalidades en pacientes diabéticos (Figura 5) (Guo et al., 2020).

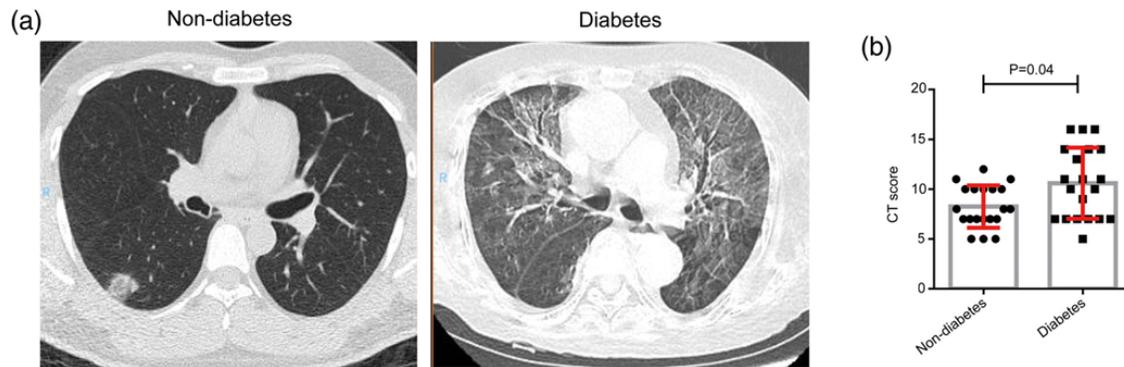


Figura 5: Resultados de CT de pacientes con y sin diabetes. (a) Imágenes representativas de CT de pacientes con y sin diabetes, en pacientes con diabetes se observa aumento de la opacidad vitral a nivel bilateral, lo que indica una disminución de aire en los tejidos pulmonares. (b) Gráfico de comparación del CT score de pacientes con y sin diabetes. $p < 0,05$ es considerado significativo. CT: tomografía computarizada (Extraído de Guo et al., 2020).

Sin embargo, la diabetes no es el único ejemplo de un estado con control glicémico alterado, ya que pacientes prediabéticos también presentan alteraciones del control glicémico, sin alcanzar el diagnóstico de diabetes, es decir la glucosa en un rango entre 100-125 mg/dL. Se ha descrito que con esta condición de prediabetes existe un peor pronóstico relacionado a la infección por SARS-CoV-2 y la posterior enfermedad por COVID-19. En China de un estudio de Li y colaboradores en población de 453 pacientes hospitalizados, 129 padecían prediabetes y su condición se asoció con un aumento del riesgo de mortalidad con un Hazard ratio de 3,3 (Li et al., 2020). Esta tendencia se repite en un estudio en New Jersey en el hospital Saint Barnabas Medical Center con 184 pacientes hospitalizados por COVID-19, donde 44 poseían una previa prediabetes (Smith et al., 2021). Un extenso metaanálisis realizados con diversos estudios y un total de 3027 pacientes, se reportó que la relación entre la severidad del COVID-19 y la prediabetes se ve estadísticamente significativa con un OR de 2,58 (95% CI, 1,46-4,56) por lo que pacientes prediabéticos son casi 2,6 veces más propensos de padecer un cuadro severo de COVID-19 (Heidarpour, Abhari, Sadeghpour, Shafie, & Sarokhani, 2021). En Austria se realizó un estudio multicentro con 247 pacientes de los cuales se desarrolló un modelo de riesgo de mortalidad en base a los parámetros clínicos en pacientes diabéticos y prediabéticos, en donde se observó que no existe diferencia significativa entre el riesgo de mortalidad de ambos grupos de pacientes, siendo en ambos grupos de pacientes mortalidad elevada (Sourij et al., 2021).

No obstante, este tópico ha sido extensamente revisado y existen resultados contradictorios en este sentido puesto que se ha visto en un metaanálisis de 46.248 pacientes de Yang y cols que el OR para el cuadro de COVID-19 severo no era significativamente mayor en pacientes diabéticos con COVID-19 (OR =2,07) a diferencias de otras comorbilidades como la hipertensión (J. Yang et al., 2020).

Por lo que se han propuesto mecanismos para asociar la diabetes con la patogenicidad y la predisposición al COVID-19 severo. Uno de éstos es el rol de la hiperglicemia, que en ciertos sujetos podría producir un patrón aberrante de glicosilación del receptor de ACE-2 lo que aumentaría su actividad y a su vez capacidad de unión del SARS-CoV-2 a la célula (Corrao, Pinelli, Vacca, Raspanti, & Argano, 2021), lo que se ve sustentado en hallazgos en modelos murinos diabéticos, donde se observó que al controlar la glicemia con insulina se lograba reducir la actividad de ACE-2 (Roca-Ho, Riera, Palau, Pascual, & Soler, 2017). No obstante, no hay estudios en humanos que demuestren la hipótesis de la glicosilación aberrante para ello.

Otro mecanismo relacionado a la glicosilación aberrante que se ha barajado es la hipótesis del bucle paracrino donde el virus infecta al páncreas y a los pulmones, lo que induce un estado de estrés hiperglicémico y un aumento de la expresión de ACE-2 glicosilado de manera aberrante en el pulmón lleva al aumento de la unión del virus en los pulmones y mayor inflamación (Brufsky,

2020). Se ha visto evidencia que relaciona la glicemia con la severidad en pacientes COVID-19, sin embargo, falta evidencia que sustente los mecanismos por los cuales la hiperglicemia puede llevar a cuadros severos de COVID-19

Secuelas metabólicas e inmunes post-COVID-19

Debido a la relación de la prediabetes y la severidad, investigadores han hipotetizado sobre cuál puede ser el rol de la resistencia a la insulina dentro de estos pacientes, puesto que un parámetro importante dentro de los pacientes prediabéticos es la presencia de resistencia a la insulina. En un estudio en el hospital de Wuhan de 151 pacientes se observó una relación entre el marcador de resistencia a la insulina denominado índice de triglicéridos y glucosa (TyG) y la severidad del COVID-19, en donde se observó una asociación significativa en un índice alterado y el incremento de riesgo de severidad y mortalidad, con un OR de 2,9 (Ren et al., 2020). Se ha descrito que pacientes sin diabetes o prediabetes previo al COVID-19 presentan un mayor riesgo a desarrollar resistencia a la insulina y por consiguiente alteraciones del metabolismo glucídico post infección (M. Chen et al., 2021). En un estudio del hospital de Wenzhou se realizó el seguimiento de 64 pacientes sin diabetes o prediabetes antes del COVID-19 a 3 y 6 meses luego de la infección, en donde observaron un aumento de marcadores de resistencia a la insulina como el péptido C, el índice HOMA-IR, el índice TyG, entre otros a 3 y 6 meses del seguimiento respecto a la condición inicial de los pacientes (Figura 6) (M. Chen et al., 2021).

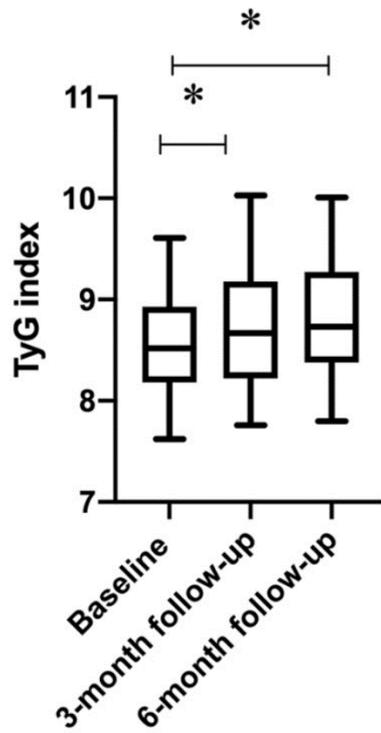


Figura 6: Seguimiento del índice TyG como marcador de resistencia a la insulina. Al realizar la comparación entre la condición inicial de los pacientes se puede observar un aumento significativo del índice de Triglicéridos y Glucosa (TyG) a los 3 y 6 meses de seguimiento mediante análisis de Varianza $P < 0,05$. (Extraído de Chen et al., 2021)

En un estudio de Montefusco y colaboradores, en 551 pacientes admitidos en el hospital de ASST FBF-Sacco Milán, se determinó que un 46% del total de los pacientes que cursaron con COVID-19 en su fase aguda presentaron cuadros de hiperglicemia, sin tener reporte de alteraciones previas (Figura 7a)(Montefusco et al., 2021). Luego tras 6 meses realizar el seguimiento en 57 pacientes provenientes del total que presentaron hiperglicemia sin alteraciones previas, se observó que un 35% mantuvo la condición de hiperglicemia y un 63% regularizó su condición glicémica (Figura 7b)(Montefusco et al., 2021). Durante el mismo estudio, Montefusco y colaboradores realizaron la determinación de secreción de insulina y marcadores de resistencia a la insulina en 20 pacientes, tanto en su fase aguda COVID-19 como 6 meses post COVID-19, donde se observó que la insulina plasmática, e índice HOMA-IR estaban significativamente aumentados en ambos casos (Figura 8)(Montefusco et al., 2021).

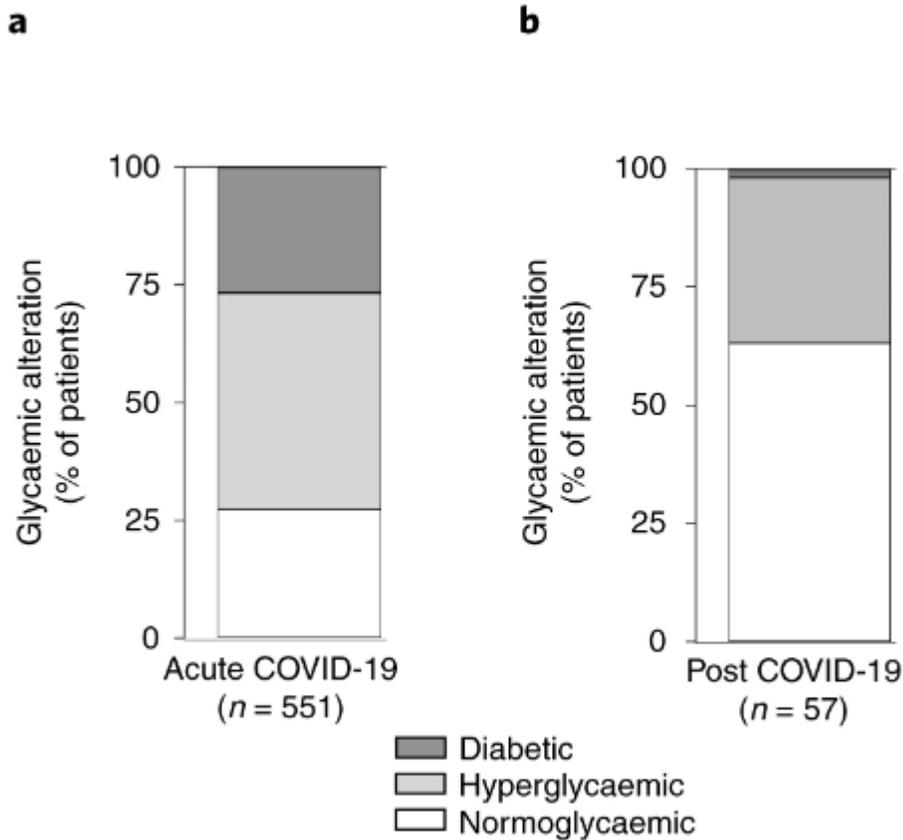


Figura 7: Alteraciones glicémicas en pacientes COVID-19 fase aguda y tras 4 meses del COVID-19. A la izquierda se observa distribución de pacientes por sus alteraciones glicémicas en la infección aguda por COVID-19, donde 151 pacientes padecían diabetes mellitus tipo 2 (27%), 253 pacientes presentaron hiperglicemia sin antecedentes previos (46%) y 147 no presentaron alteraciones glicémicas en la fase aguda de COVID-19 (27%). A la derecha se observa distribución de 57 pacientes que presentaron hiperglicemia por COVID-19 agudo tras 6 meses, donde un 2% fue diagnosticado con diabetes mellitus tipo 2, un 35% mantuvo una hiperglicemia persistente y un 63% de pacientes retorno a su condición de normoglicemia. (Extraído de Montefusco et al., 2021)

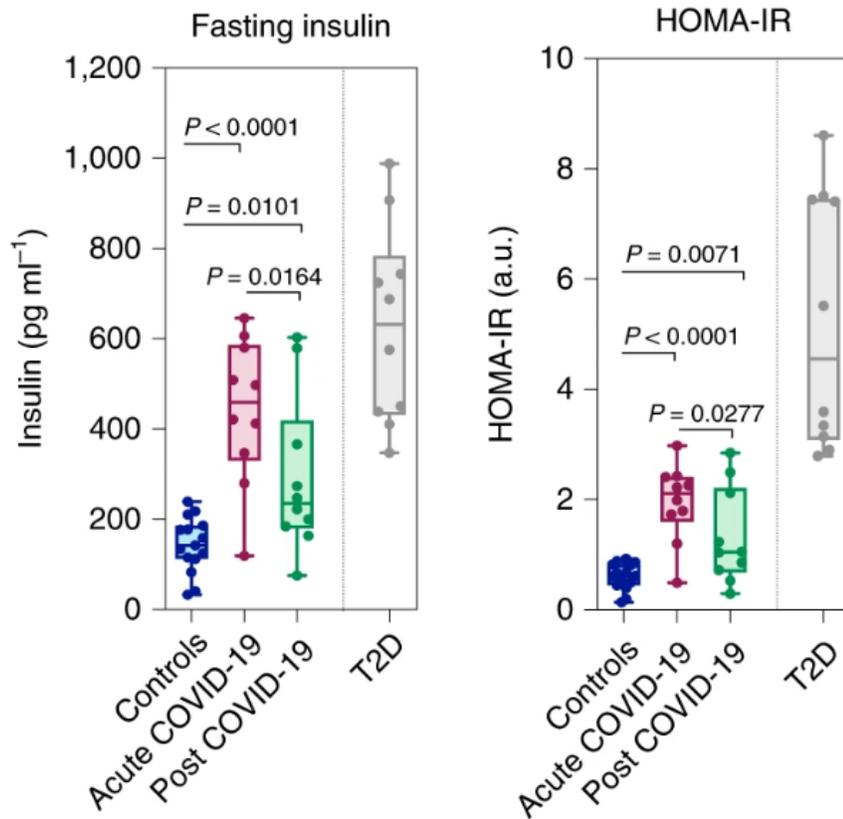


Figura 8: Insulina Plasmática e índice HOMA-IR en pacientes COVID-19 fase aguda y tras 4 meses. La figura de la izquierda gráfica la insulina plasmática de 10 controles sanos, 10 pacientes COVID-19 en su fase aguda y 10 pacientes COVID-19 luego de los 4 meses de la infección inicial. La figura de la derecha muestra el índice HOMA-IR de 10 controles sanos, 10 pacientes COVID-19 en fase aguda y 10 pacientes COVID-19 luego de 4 meses de la infección inicial.

Los antecedentes presentados sugieren la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuál es la relación entre el control glicémico de los pacientes y la severidad de la enfermedad? Se ha propuesto la hiperglicemia como un mecanismo

fisiopatológico para la severidad del COVID-19, puesto que estudios previos de SARS-CoV, otro coronavirus responsable del síndrome respiratorio agudo grave (SARS) previo a la pandemia de 2019, demostraron que hay un aumento en la distribución de ACE-2 en distintos órganos, dentro de los cuales se encuentra el páncreas. Se ha reportado que los pacientes hospitalizados por SARS-CoV cursaban con diabetes producto de la inflamación pancreática al padecer SARS en su fase aguda y remitió tras 3 años de seguimiento en la mayoría de pacientes (J. K. Yang, Lin, Ji, & Guo, 2010). Estos hallazgos pueden sugerir que el SARS-CoV-2 al poseer similitudes al SARS-CoV, podría provocar estrés hiperglicémico en pacientes sin alteraciones metabólicas previas.

Finalmente, para determinar si la prediabetes o la diabetes son factores de desregulación inmune es importante evaluar su impacto en los distintos linajes celulares que están involucrados en la severidad en la enfermedad. En la actualidad, hay carencia de datos que relacionen la alteración del perfil glicémico y la NETosis en pacientes post COVID-19.

Problema y pregunta de investigación

Actualmente con la información obtenida de las investigaciones acerca del SARS-CoV-2, existe evidencia que relaciona preexistencia de diabetes con la severidad y un peor pronóstico de la enfermedad de COVID-19 y que pacientes severos presentan mayor infiltración de neutrófilos y NETosis a nivel pulmonar. Sin embargo, no se ha descrito si existe algún efecto provocado por alteraciones del perfil de metabolismo glucídico post infección por SARS-CoV-2 y si estas alteraciones afectan a la NETosis.

La presente propuesta busca abordar la siguiente pregunta de investigación: ¿qué efecto tiene la alteración del metabolismo glucídico post infección sobre la NETosis de pacientes que padecieron COVID-19?

Hipótesis

Pacientes que padecieron COVID-19 y presentan alteraciones en el metabolismo glucídico post infección presentan un mayor porcentaje de NETosis respecto de pacientes COVID-19 sin alteraciones.

Objetivo General

Evaluar la NETosis en pacientes que padecieron COVID-19 y presentan alteraciones en el metabolismo glucídico 4 meses post infección.

Objetivos específicos

1. Caracterizar los parámetros del metabolismo glucídico 4 y 12 meses post infección en una cohorte de pacientes que cursaron COVID-19.
2. Evaluar el porcentaje de NETosis basal y post estímulo en una cohorte de pacientes que cursaron COVID-19, 4 meses post infección.
3. Analizar el efecto del plasma de pacientes que cursaron COVID-19, 4 meses post infección, sobre la NETosis utilizando neutrófilos sanos como biosensor.
4. Evaluar la relación entre el porcentaje de NETosis de la cohorte de pacientes que cursaron COVID-19 con los parámetros clínicos, metabólicos e inflamatorios, 4 meses post infección.

MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterizar los parámetros del metabolismo glucídico 4 y 12 meses post infección en una cohorte de pacientes que cursaron COVID-19

Recolección de muestras

Las muestras de este estudio provienen de un reclutamiento realizado por el estudio COVID1005, aprobado por del comité de ética del servicio de salud del Biobío. El estudio COVID1005 contó con 60 pacientes que padecieron COVID-19 con distinto grado de severidad.

Se obtuvieron muestras de sangre periférica mediante venopunción a los 4 meses post-COVID-19 y se enviaron a procesar al laboratorio PreveGen, en donde se realizaron exámenes de perfil bioquímico, perfil lipídico, proteínas de complemento, anticuerpos anti-SARS-CoV-2 y hemograma. El plasma de las muestras asociadas a los pacientes se mantuvo a -80°C para su utilización en el ensayo de Incucyte como se describe en los siguientes puntos.

Etiquetado de muestras

Mediante el código de muestra de los pacientes se organizó la información relacionada a la comparación del perfil bioquímico y otros parámetros de los pacientes.

Primero se realizó la estadística descriptiva de la población de datos para la data física de los pacientes (edad, altura, peso, circunferencia de cintura, BMI), e

igualmente los pacientes se separaron en aquellos que presenten alteraciones a 4 meses en su perfil de metabolismo glucídico ya sean pacientes diabéticos o con parámetros alterados en donde se consideró la glucosa elevada en su perfil bioquímico con un valor >100 mg/dL (5,55 mmol/L) o con insulina > 16 mUI/L y el índice HOMA-IR $> 2,5$ considerándose al paciente insulinoresistente. Todo aquel paciente que no posea alguna de las condiciones anteriormente mencionada se considerará paciente sin alteración del metabolismo glucídico. Además, se evaluó la progresión en las alteraciones del perfil glucídico 12 meses post infección.

Evaluar el porcentaje de NETosis basal y post estímulo en una cohorte de pacientes COVID-19, 4 meses post infección.

Extracción de PMN por gradiente de ficoll.

El aislamiento de PMN se realizó a partir de sangre periférica que se obtuvo mediante punción venosa de los 60 pacientes COVID-19 y 14 controles sanos, siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante (Axis-Shield). Para ello, se colectó por punción venosa 5 mL de sangre por cada donante; empleando tubos limpios, estériles y con EDTA. Estos 5 mL de sangre total se adicionarán cuidadosamente sobre 2 mL del reactivo de separación Polymorphprep (Axis-Shield), previamente alicuotados en tubo falcón esterilizado de 15 mL. Luego las muestras se centrifugaron a 702 g por 30 min a temperatura ambiente en una centrifuga de rotor oscilante (Changsha Xiangyi centrifuge L-550). Posterior a la

centrifugación se obtuvieron 2 anillos de leucocitos el superior corresponde a células mononucleares y el inferior a células polimorfonucleares (PMN) y los eritrocitos se encontrarán como pellet (Figura 7), se extrajo el anillo superior y se descartó, luego se extrajo el anillo de PMN y se traspasó a otro tubo estéril al que se le lavó con el doble de volumen del extraído en PBS estéril 10 mM pH 7,2 y se sometió a otra centrifugación a 400 g por 15 min, aquí se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 1 mL medio X-vivo con Ca^{2+} 2pM tibio.

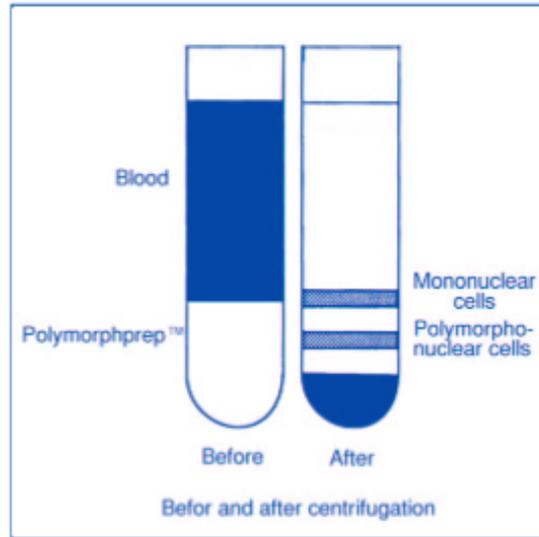


Figura 9: Esquema de separación de PMN mediante reactivo Polymorphprep (Extraído de protocolo Axis-Shield).

Cuantificación de NETosis mediante Live/Dead Dye y Sytox Blue por citometría de flujo.

Se trabajó mediante el protocolo descrito en el trabajo de tesis de magíster de Daniela Flores del año 2020. Se tomarán las PMN aisladas del paso anterior y se realizó el conteo de células viables mediante cámara de Neubauer y azul de tripán, obteniendo el total de células viables, se extrajo 1×10^5 para determinar pureza de la muestra mediante citometría de flujo por marcaje de SIGLEC8 y CD16+. 1×10^6 células serán centrifugadas a $400 \times g$ por 5 min, el sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en 300 μL de una solución en medio X-vivo sin suero, con CaCl_2 2 μM . Las muestras se incubaron durante 30 minutos a 37°C y 5% CO_2 en condiciones basales y utilizando agonistas TLR3 (HMW y LMW), TLR7 (CL075, ImiQ y R848) y TLR8 (ssRNA40 y 41). A continuación, las células fueron lavadas con 1 mL de PBS 10 nM y sometidas a centrifugación a $400 \times g$ por 5 min. Se descartó el sobrenadante y el pellet fue marcado con 500 μL de una solución 1:3000 de LIVE/DEAD™ Far Red durante 10 min a 4°C en oscuridad. Posteriormente las células fueron lavadas del modo descrito anteriormente y resuspendidas en 150 μL de PBS 10 nM. 15 min antes de la lectura por citometría, a cada muestra se le adicionó 150 μL de una solución 1:500 de Sytox Blue (Invitrogen) y se mantuvo a temperatura ambiente y oscuridad, transcurrido este tiempo se procesó inmediatamente. Las muestras fueron adquiridas en el equipo de citometría de flujo LSR Fortessa X20 (BD Biosciences, USA) y los datos fueron analizados empleando el programa FlowJo

(Tree Star Inc.), en donde se analizaron las poblaciones de células PMN y se determinó la población de neutrófilos que estaban realizando NETosis, y se consideró neutrófilos realizando “NETosis vital” con marcaje Sytox Blue+ y Live Dead-. El segundo término que se utilizó para categorizar poblaciones fue el de “NETosis total” donde se incluyó a los neutrófilos realizando NETosis vital como se mencionó previamente y aquellos con Live Dead+ que se considerarían como neutrófilos realizando NETosis suicida, sin embargo, debido a limitaciones técnicas de este método no se diferenciaron los neutrófilos que hicieron NETosis suicida de la población de neutrófilos que hicieron apoptosis.

Analizar el efecto del plasma de pacientes que cursaron COVID-19, 4 meses post infección, sobre la NETosis utilizando neutrófilos sanos como biosensor

Cuantificación de NETosis en neutrófilos humanos sanos expuesto a plasma COVID-19 por Incucyte

En este ensayo se utilizó 2 donantes sanos a los cuales se les extraerá sangre por punción venosa y se aislaron PMN según lo descrito previamente en esta metodología. Se añadió 50 μ L que contenían 1×10^4 de PMN en medio X-vivo suplementado con CaCl_2 2 pM a cada pocillo de una placa de 96 totales, transparente de fondo plano. Posteriormente, se agregó 50 μ L de los diferentes plasmas de controles o pacientes COVID-19 en su fase aguda y secueledos. Finalmente, se adicionó el marcaje de ADN Sytox Green (Thermofisher) a una

concentración final de 30 nM y la placa fue puesta al interior del equipo Incucyte S3 (Essen Bioscience, Sartorius) para su seguimiento microscópico en tiempo real, durante 24 h a 37°C y 5% CO₂. Luego del seguimiento se realizó el conteo de neutrófilos mediante las imágenes tomadas por el equipo por lo que se calculó el porcentaje de NETosis en base a el conteo total de células que fue entregado por el equipo automáticamente. En esta categorización se utilizó el concepto de NETosis debido que mediante imagen con solo el marcador Sytox Green no es factible diferenciar un neutrófilo que hace NETosis vital de NETosis suicida.

Evaluación del efecto de la glucosa en la producción de NETosis en neutrófilos humanos sanos en presencia y ausencia de insulina.

Se utilizó el mismo protocolo descrito previamente en la cuantificación de NETosis mediante Live/Dead Dye y Sytox Blue por citometría de flujo, en este caso se utilizó medio DMEM sin suplementar con glucosa y se utilizó 8 poblaciones iguales de 1×10^6 células expuestas a diferentes concentraciones de glucosa 4 mmol/L (72 mg/dL), 5,5 mmol/L (100 mg/dL), 7,5 mmol/L (135 mg/dL) y 25 mmol/L (450 mg/dL), estos 8 grupos de neutrófilos fueron divididos en neutrófilos expuestos a insulina 10 mUI/L y no expuestos a insulina, y la incubación se realizó durante 1 hora a 37°C y 5% CO₂. El resto del protocolo de marcaje con Live/Dead Dye y Sytox Blue se realizó igual que en los métodos previamente descritos de la cuantificación mediante citometría de flujo. La

estrategia de gattering para la población de NETosis fue la descrita previamente con Sytox Blue+ y Live Dead- (NETosis vital).

Evaluar la relación entre el porcentaje de NETosis de la cohorte de pacientes que cursaron COVID-19 con parámetros clínicos, metabólicos e inflamatorios, 4 meses post infección

Análisis de datos

Primero los datos se sometieron a un análisis de outliers por el método de ROUT con un Q=1% cuando se observaron datos con una desviación mayor al valor absoluto de 3σ . Se realizó el análisis estadístico de los datos mediante el software de análisis estadístico GraphPad Prism. Se determinó la normalidad de la población de datos mediante las pruebas de Anderson-Darling, D'Angostino & Pearson, Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, la data que pase cualquiera de las pruebas mencionadas se consideró normal con un $p > 0,05$.

Previo a la determinación de diferencias entre grupos de estudio se realizó la conversión del porcentaje de NETosis mediante la función de arcoseno para la obtención de una distribución normal. Luego, la determinación de diferencias entre grupos se empleó análisis de varianza (ANOVA) paramétricos o no paramétricos (Kruskall-Wallis) según correspondiese, e incluyendo corrección de Welch para desviaciones estándar diferentes entre datos y con un $p < 0,05$ considerándose estadísticamente significativo en la realización de las

comparaciones estadísticas mediante ANOVA. Para comparaciones múltiples se realizó corrección de pruebas múltiples de Dunnett T3. En el caso de comparaciones de variables categóricas se realizó mediante prueba de Chi cuadrado.

Finalmente, se establecerán análisis de correlación de Pearson o Spearman según correspondiese de la data entre parámetros del metabolismo glucídico, citoquinas y quimioquinas del plasma de pacientes COVID-19 en su fase aguda, secuelada y la NETosis cuantificada por Incucyte considerando una correlación estadísticamente significativa con un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Caracterizar los parámetros del metabolismo glucídico 4 y 12 meses post infección en una cohorte de pacientes que cursaron COVID-19

La cohorte de 60 pacientes presentó distintos grados de severidad de COVID-19, distinguiéndose 3 grupos: 18 pacientes leves, 16 pacientes moderados y 26 pacientes severos, como se puede observar en la Figura 11a. Dentro del total de pacientes, la distribución por género correspondió a 32 varones y 28 mujeres. Además, al relacionar la severidad con el sexo se observa que los pacientes hombres tienen mayor prevalencia de un cuadro severo-moderado y en el estado leve la mayoría de los pacientes se trata de mujeres como se observa en la Figura 11b.

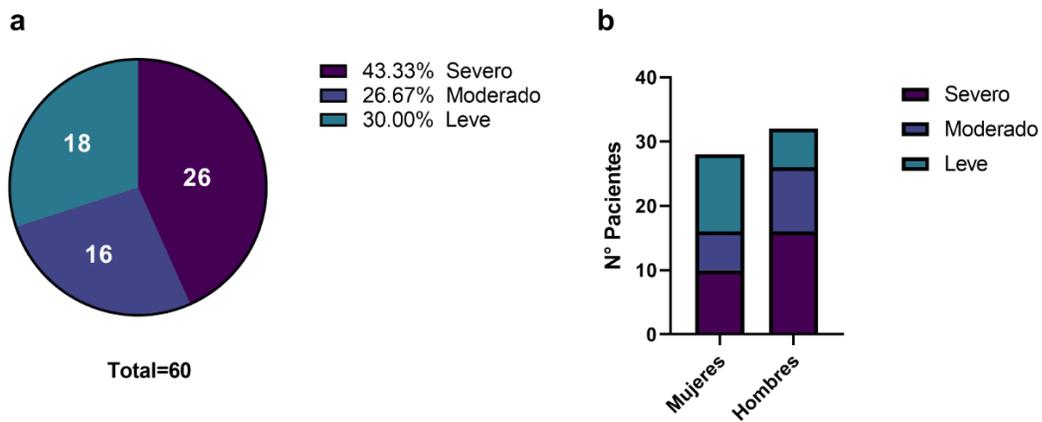


Figura 10: Descripción de la cohorte de 60 pacientes de COVID-19 provenientes del hospital Víctor Ríos-Ruiz en base: (a) Severidad del cuadro agudo de COVID-19. (b) Severidad asociada a pacientes masculinos y pacientes femeninas.

De la data obtenida de reporte médico del total de 60 pacientes, se obtuvo que la media de edad para los pacientes ronda los 46,4 años, la media de peso ronda los 84,3 kg, la altura promedio de la cohorte corresponde a 1,65 m, el índice de masa corporal (BMI) promedio corresponde a 31,1 kg/m², y el promedio de circunferencia de cintura es de 103,7 cm como se puede observar en la tabla II. También se logra observar una mayoría de casos severos en hombres con un 61,5% del total de casos severos y una mayoría de casos leves en mujeres con un 66,7% del total de casos leves. En el caso del grupo sanguíneo se logró observar que la mayoría de la cohorte posee grupo O con un 63,6% del total de la cohorte, distribución mayoritaria que se mantuvo para los casos de pacientes severos, moderados y leves. Finalmente se logró observar que a nivel de secuelas pulmonares no hay una mayoría destacada, sin embargo al ser divididos en base a la severidad se logró observar que en los pacientes severos la mayoría poseía alteraciones sólo de tomografía computarizada (TC) abdominal con un 57,7%, en el caso de los pacientes moderados se observó mayoría del 43,8% en pacientes con alteraciones en la prueba de capacidad de difusión de monóxido de carbono (DLCO) en conjunto con alteraciones de TC, en el caso de los pacientes leves la mayoría no presentó secuelas pulmonares con un 72,2% del grupo.

Tabla II: Descripción física y de secuelas pulmonares de la cohorte de pacientes COVID-19 reclutados del hospital Víctor Ríos Ruíz de Los Ángeles.

Parámetros	Total Pacientes (n = 60)	Severos (n = 26)	Moderados (n = 16)	Leves (n = 18)	Valor p
Edad (años)	46,4 ± 1,7 (43,03 - 49,81)	51,2 ± 2,2 (46,55 - 55,91)	46,6 ± 2,7 (40,82 - 52,43)	39,3 ± 3,3 (32,14 - 46,42)	0,0155
Peso (kg)	84,3 ± 1,9 (80,32 - 88,28)	86,5 ± 3,4 (79,57 - 93,48)	86,9 ± 3,0 (80,54 - 93,41)	78,7 ± 3,4 (71,48 - 85,95)	0,1593
Altura (m)	1,65 ± 0,012 (1,62 - 1,67)	1,64 ± 0,020 (1,600 - 1,684)	1,67 ± 0,018 (1,628 - 1,702)	1,63 ± 0,025 (1,580 - 1,685)	0,6029
BMI (kg/m²)	31,1 ± 0,6 (29,78 - 32,35)	32,1 ± 1,1 (29,79 - 34,44)	31,17 ± 0,7 (29,76 - 32,57)	29,5 ± 1,2 (26,92 - 32,02)	0,2031
Circunferencia de cintura (cm)	103,7 ± 1,6 (100,4 - 106,9)	107,4 ± 2,6 (102,1 - 112,7)	103,8 ± 2,4 (98,68 - 108,8)	98,1 ± 3,2 (91,46 - 104,8)	0,7053
Sexo					
Hombre (%)	32 (53,3)	16 (61,5)	10 (62,5)	6 (33,3)	0,1264
Mujer (%)	28 (46,7)	10 (38,5)	6 (37,5)	12 (66,7)	
Grupo Sanguíneo					
A (%)	14 (23,3)	7 (26,9)	2 (12,5)	5 (27,8)	0,4878
B (%)	6 (10)	4 (15,4)	1 (6,3)	1 (5,6)	0,4765
AB (%)	2 (3,3)	1 (3,9)	1 (6,2)	0	0,5878
O (%)	38 (63,3)	14 (53,8)	12 (75)	12 (66,6)	0,3621
Secuelas Pulmonares					
Sin alteraciones (%)	22 (36,7)	5 (19,2)	4 (25)	13 (72,2)	0,0014
TC alterado (%)	23 (38,3)	15 (57,7)	4 (25)	4 (22,2)	0,0260
DLCO alterado (%)	2 (3,3)	0	1 (6,2)	1 (5,6)	0,4505
DLCO y TC alterado (%)	13 (21,7)	6 (23,1)	7 (43,8)	0	0,0082

Valores informados para variables continuas en media ± error estándar (Intervalo de confianza).

Además, se realizó la misma estadística descriptiva de la cohorte entre hombres y mujeres. En la cohorte masculina se observó que la edad promedio trata de 45,6 años, la media del peso es de 89,9 kg, la altura es de 1,71 m, el BMI es de 30,6 kg/m² y finalmente la circunferencia de cintura es de 107,9 cm. En el caso de la cohorte femenina, se observó que la edad promedio es de 47,4 años, el peso medio es de 77,9 kg, la media de altura es de 1,57 m, el promedio de BMI es de 31,6 kg/m² y finalmente la circunferencia de cintura es de 109,3 cm, como se puede observar en la tabla III. Al comparar mediante grupos sanguíneos no se observaron diferencias significativas, en ambos grupos se observó una mayoría de pacientes con grupo O. Cuando se comparó las secuelas respiratorias no se observaron diferencias significativas entre hombres y mujeres.

Tabla III: Descripción de la cohorte separada por sexo y comparaciones de parámetros físicos y variables categóricas.

Parámetros	Hombres (n = 32)	Mujeres (n = 28)	Valor p
Edad (años)	45,6 ± 2,4 (40,75 - 50,44)	47,4 ± 2,4 (42,34 - 52,37)	0,6069
Peso (kg)	89,3 ± 2,7 (84,28 - 95,49)	77,9 ± 2,4 (72,98 - 82,85)	0,0018
Altura (m)	1,71 ± 0,011 (1,687- 1,733)	1,57 ± 0,013 (1,545 - 1,598)	<0,0001
BMI (kg/m²)	30,6 ± 0,8 (29,01 - 32,21)	31,6 ± 1,0 (29,44 - 33,74)	0,4549
Circunferencia de cintura (cm)	107,9 ± 2,2 (110,0 - 101,2)	109,3 ± 2,5 (96,26 - 106,5)	0,2057
Grupo Sanguíneo			
A (%)	8 (25)	6 (21,4)	0,744
B (%)	3 (9,3)	3 (10,7)	0,863
AB (%)	2 (6,3)	0	0,179
O (%)	19 (59,4)	19 (67,9)	0,496
Secuelas Pulmonares			
Sin alteraciones (%)	12 (37,5)	10 (35,7)	0,886
TC alterado (%)	14 (43,8)	9 (32,2)	0,356
DLCO alterado (%)	0	2 (7,1)	0,124
DLCO y TC alterado (%)	6 (18,7)	7 (25)	0,558

Valores expresados en media ± error estándar (Intervalo de confianza).

Una vez terminada la descripción de la cohorte, se clasificó mediante alteraciones del perfil del metabolismo glucídico, en cuyo caso al inicio del estudio se determinó mediante reporte médico las comorbilidades y alteraciones de los 60 pacientes, de los cuales 24 pacientes presentaban alteraciones ya sea diabetes mellitus tipo II, o resistencia a la insulina, mientras que los 36 pacientes restantes se trataban de pacientes sin alteraciones del metabolismo glucídico reportadas, tal y como se puede observar en la Figura 11.

Luego de la obtención de datos provenientes de PreveGen acerca del perfil bioquímico, se clasificó nuevamente estos pacientes para observar la diferencia de la distribución en este caso 4 meses post-COVID-19, en donde se observó que el grupo de los 36 pacientes que no presentaban alteraciones al inicio del estudio se dividió en 2 grupos, un grupo que se mantenía sin alteraciones del metabolismo glucídico y un nuevo grupo que desarrolló IR a 4 meses de su fase aguda de COVID-19 como se puede observar en la Figura 11

Al hacer el seguimiento de los pacientes tras 12 meses del estadio agudo del COVID-19 se observó una disminución de los pacientes que desarrollaron IR post-COVID-19 de 10 pacientes que volvieron a su condición normal, sin embargo 16 pacientes aún persisten con IR tras la fase aguda de COVID-19 como se observa en la Figura 11.

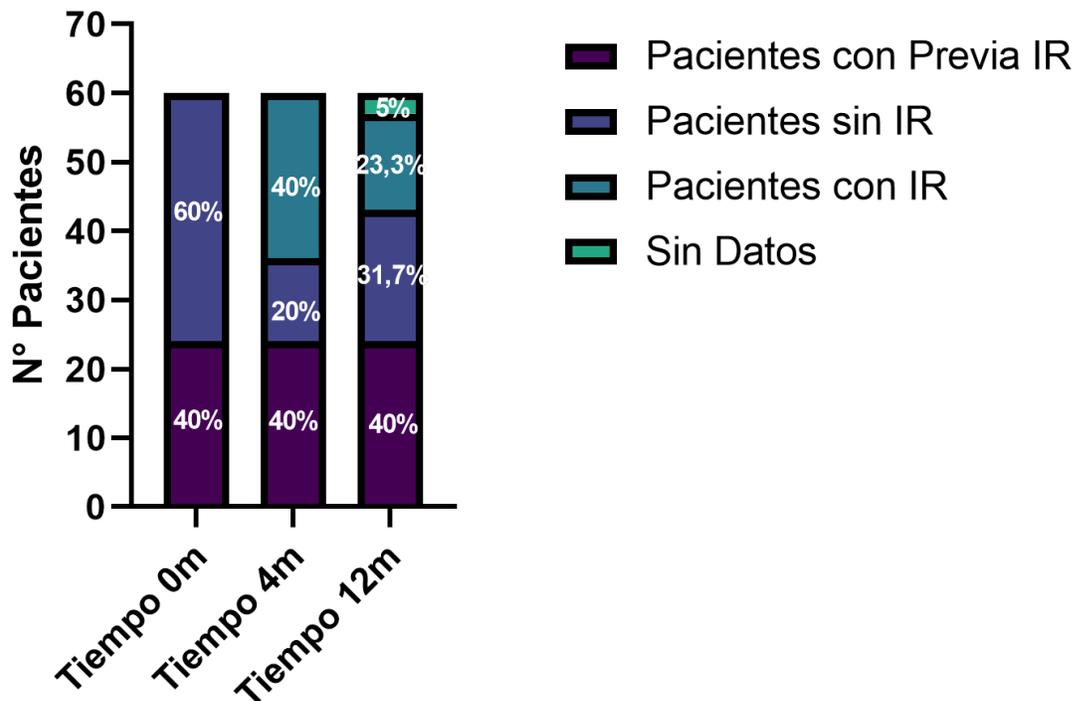


Figura 11: Distribución de alteraciones del metabolismo glucídico en la cohorte de 60 pacientes COVID-19. En la condición inicial del estudio, en fase aguda de COVID-19, posterior a 4 meses de la fase aguda de COVID-19 y tras 12 meses de la fase aguda de COVID-19.

Sabiendo que la cohorte se dividió en 3 grupos, se añadió un grupo control de 14 sujetos que no padecieron COVID-19. Luego se realizó la comparación entre distintos parámetros de laboratorio en estos 4 grupos de estudio para ello se realizó un análisis de varianza (ANOVA), comenzando con el análisis de un panel de citoquinas séricas las cuales son IL-12, TNF α , IL-6, IL-1 β e IL-8 en el cual se

puede observar que para IL-12, TNF α e IL-1 β no existen diferencias significativas entre los 4 grupos de estudio (Figura 12a-b-d). En el caso de IL-6 se puede observar que existe aumento significativo de esta citoquina de los pacientes que presentaban IR desde el comienzo del estudio respecto a los pacientes que no desarrollaron IR, y también se puede observar que el grupo que desarrolló IR 4 meses post-COVID-19 presentó un aumento significativo respecto al grupo de pacientes que no desarrolló IR (Figura 12c). Finalmente se observó que los pacientes que tenían previa IR y los que desarrollaron IR, presentaron un aumento significativo de IL-8 respecto al grupo control y el grupo de pacientes que no desarrollaron IR (Figura 12e).

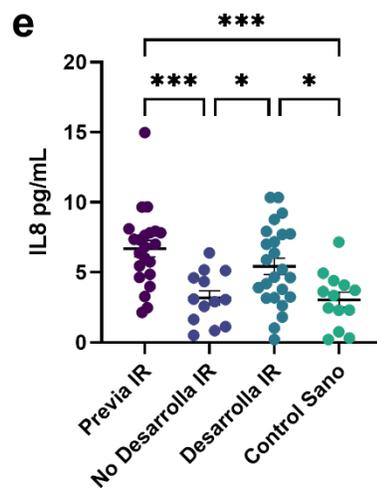
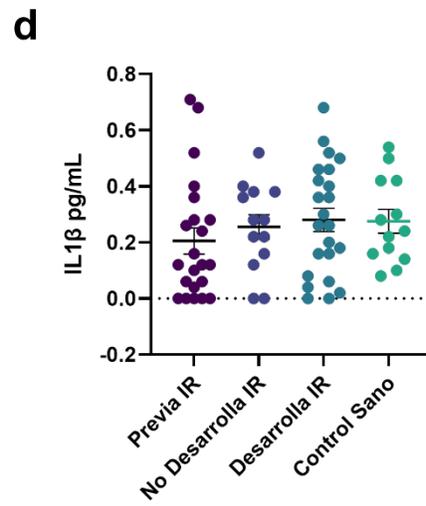
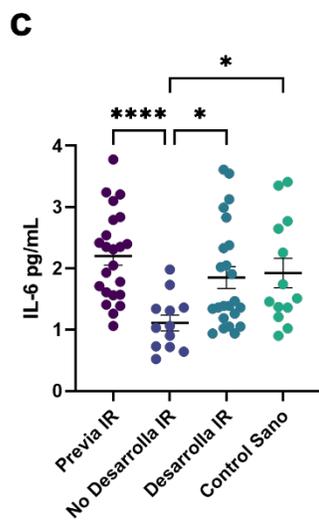
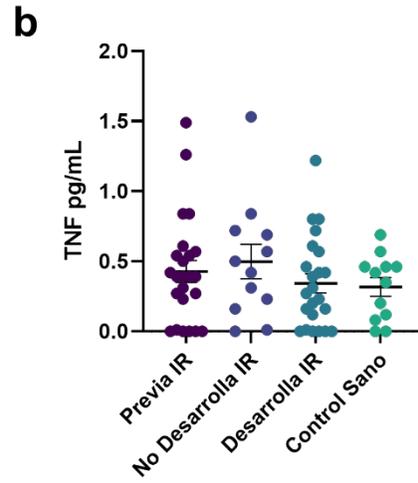
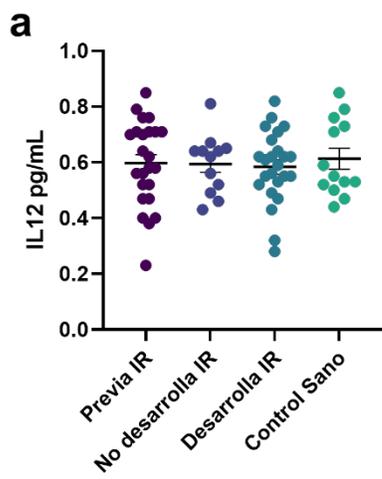


Figura 12: Comparación mediante análisis de varianza (ANOVA) entre grupos de estudio de la cohorte de pacientes COVID-19 en base a la cuantificación de citoquinas. (a) IL-12. (b) TNF. (c) IL-6. (d) IL-1 β . (e) IL-8. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

A continuación, se realizó la comparación de la medición del panel de quimioquinas CXCL-10, CCL-2, CXCL-9 y CCL-5 entre los grupos de estudio, de igual forma mediante un ANOVA. En el caso de CXCL-10 se observó que el grupo de pacientes con previa IR presentaron un aumento significativo de la quimioquina sérica, respecto al grupo control (Figura 13a). CCL-2 se encuentra significativamente aumentada en pacientes con IR previa o post COVID-19, respecto al grupo control (Figura 13b). En CXCL-9 se observó que tanto en el grupo de pacientes con previa IR y los pacientes que desarrollaron IR post-COVID-19 presentan un aumento significativo respecto al grupo control (Figura 13c). Finalmente, para la quimioquina CCL-5 se observó que pacientes que presentan nueva IR post COVID-19 y pacientes que no desarrollaron IR poseen un aumento significativo respecto al grupo control (Figura 13d).

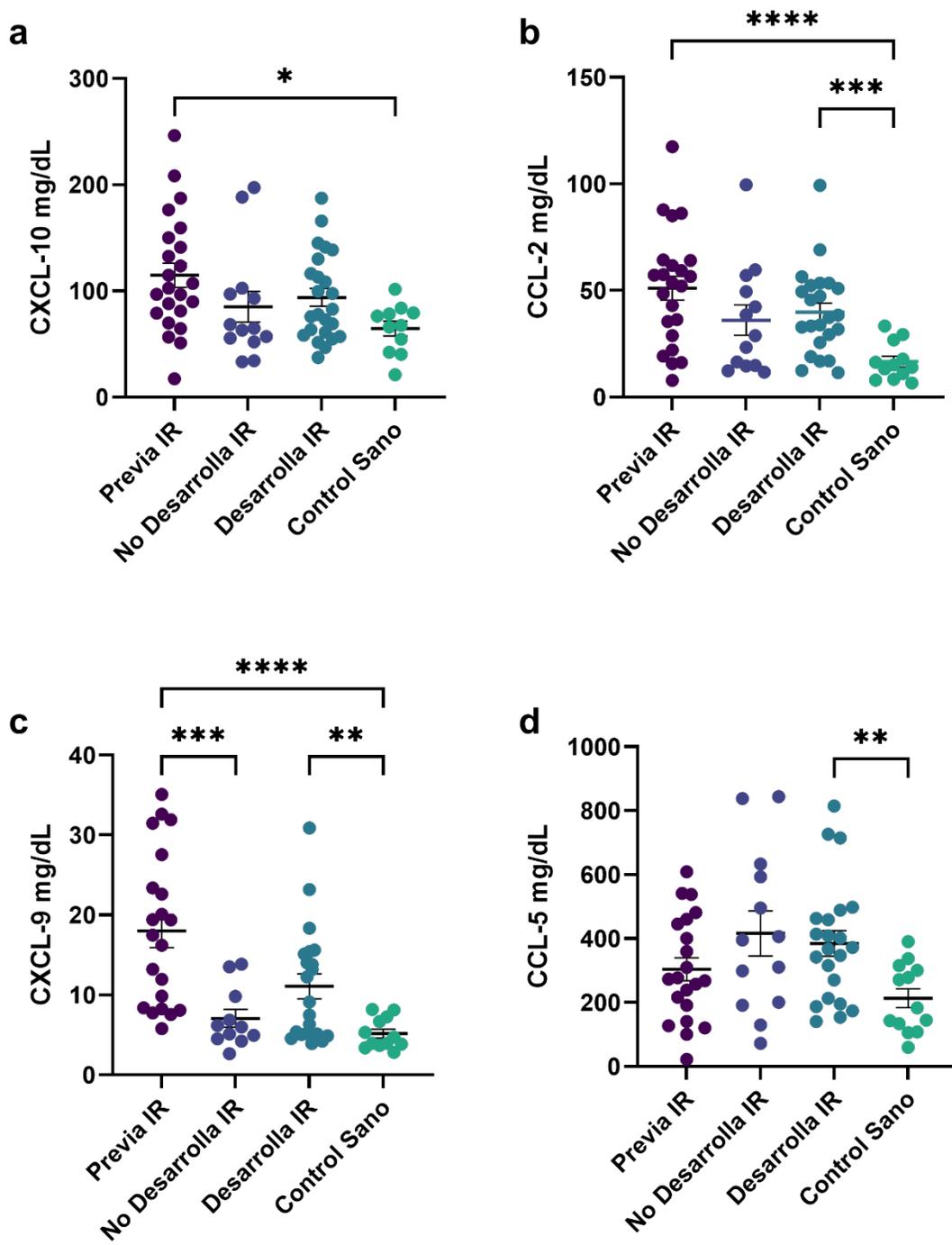


Figura 13: Comparación mediante análisis de varianza (ANOVA) entre grupos de estudio de la cohorte de pacientes COVID-19 en base a la cuantificación de quimioquinas. (a)

CXCL-10. (b) CCL-2. (c) CXCL-9. (d) CCL-5. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Los siguientes resultados comparados entre grupos corresponden a las proteínas del complemento, por lo que se realizó un ANOVA para los niveles séricos de anafilotoxinas C3a, C4a y C5a. En el caso de las proteínas C3a, C4a y C5a no se observan diferencias significativas entre grupos (Figura 14a-c).

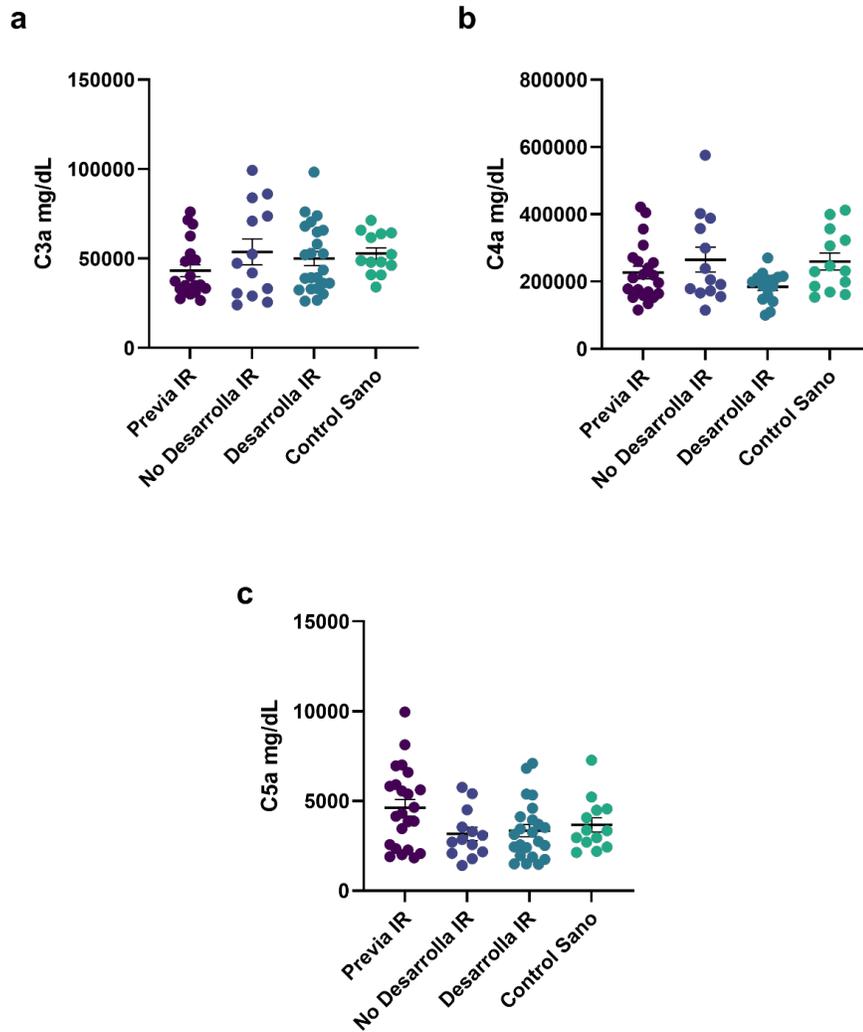


Figura 14: Comparación mediante análisis de varianza (ANOVA) entre grupos de estudio de la cohorte de pacientes COVID-19 en base a la cuantificación de proteínas de complemento. (a) C3a. (b) C4a. (c) C5a.

Respecto al perfil glicémico se realizaron las mismas comparaciones entre grupos mediante una prueba de ANOVA, comparando glicemia, insulina y HOMA-IR. Se observó que la glicemia se encuentra significativamente

aumentada en el grupo de pacientes con previa IR, respecto a los pacientes que no desarrollaron IR y el grupo control, sin embargo, no se observan diferencias significativas entre el grupo de pacientes que desarrollaron IR con los pacientes que no desarrollaron IR y el grupo control (Figura 15a). Luego respecto a la insulina, se puede observar un aumento significativo entre ambos grupos de pacientes con IR, ya sea previa o nueva, respecto a los pacientes que no desarrollaron IR y el grupo control (Figura 15b). Finalmente, en el índice HOMA-IR se pueden observar las mismas diferencias que en la insulina sérica, viéndose que ambos grupos de pacientes con IR presentan un aumento significativo respecto al grupo que no desarrolló IR y los sujetos controles (Figura 15c). Estos datos sugieren que los pacientes que desarrollarlo IR post COVID-19, son capaces de mantener niveles estables de glucosa a costa de un aumento en la secreción de insulina, la que permite el ingreso de la glucosa a los tejidos. Esto no es uniforme en todos los casos, ya que se presentan algunos pacientes con niveles de glucosa entre los 120-150mg/dL.

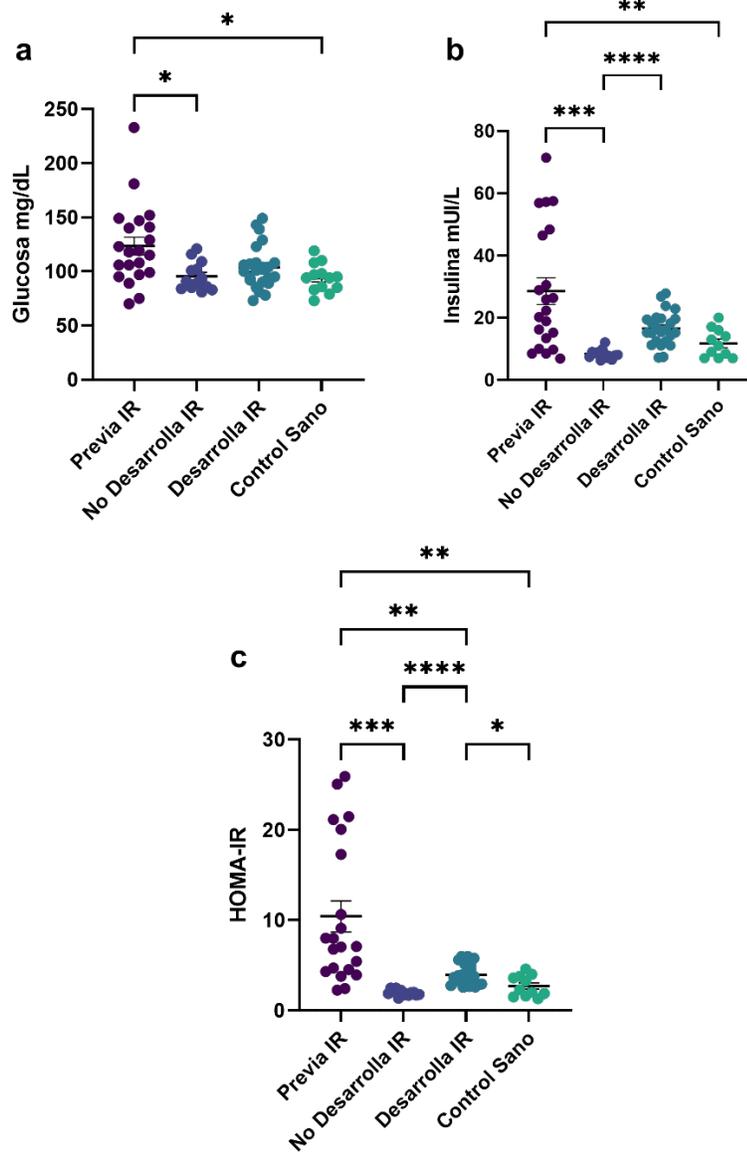


Figura 15: Comparación mediante análisis de varianza (ANOVA) entre grupos de estudio de la cohorte de pacientes COVID-19 en base a la cuantificación de glicemia, insulina y HOMA-IR. (a) Glicemia. (b) Insulinemia. (c) HOMA-IR. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Luego se realizó el análisis de los distintos parámetros asociados al perfil bioquímico entregado por PreveGen de la cohorte de pacientes. Para ello se comenzó con la urea, creatina, ácido úrico, en donde no se observan diferencias significativas entre los 4 grupos (Figura 16a-c). En el caso del calcio se puede observar una tendencia a la disminución de todos los grupos de pacientes respecto al grupo control, sin embargo, no se observa significancia estadística (Figura 16d). Se observó un aumento significativo para el fósforo en el grupo de pacientes con previa IR respecto a los pacientes que no desarrollaron IR y el grupo control (Figura 16e). Para la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), se observó que no existen diferencias significativas entre grupos (Figura 16f). Finalmente, para la creatina quinasa total (CK total), se pudo observar que existe un aumento significativo en el grupo de pacientes con nueva IR respecto de los pacientes que no desarrollaron IR y el grupo control (Figura 16g).

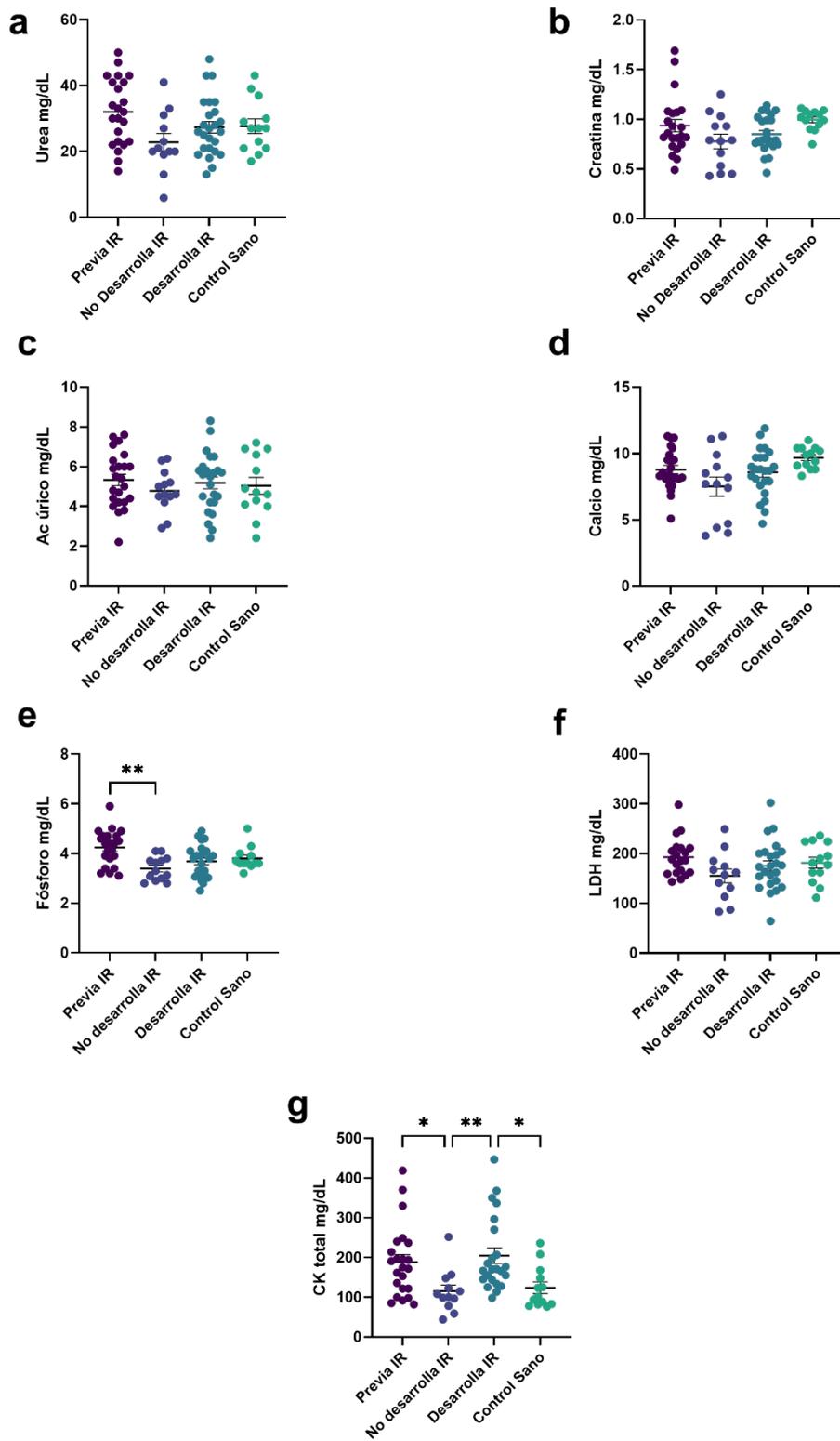


Figura 16: Comparación mediante análisis de varianza (ANOVA) entre grupos de estudio de la cohorte de pacientes COVID-19 en base a la cuantificación de parámetros del perfil bioquímico. (a) Urea. (b) Creatina sérica. (c) Ácido úrico. (d) Calcio. (e) Fósforo. (f) Lactato deshidrogenasa (LDH). (g) Creatina quinasa total (CK Total). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Seguido del perfil bioquímico se realizaron las comparaciones mediante ANOVA del perfil lipídico. Para el colesterol total, no se observaron diferencias significativas entre los 4 grupos de pacientes (Figura 17a). Para el colesterol de alta densidad HDL, se observó que pacientes con previa IR o que desarrollaron IR post COVID-19, presentaron un valor significativamente menor respecto al grupo control. En el caso del colesterol de baja densidad (LDL), no se observaron diferencias significativas entre grupos (Figuras 17b-c). Finalmente, para los triglicéridos, no se observaron diferencias significativas entre los 4 grupos de estudio (Figura 17d).

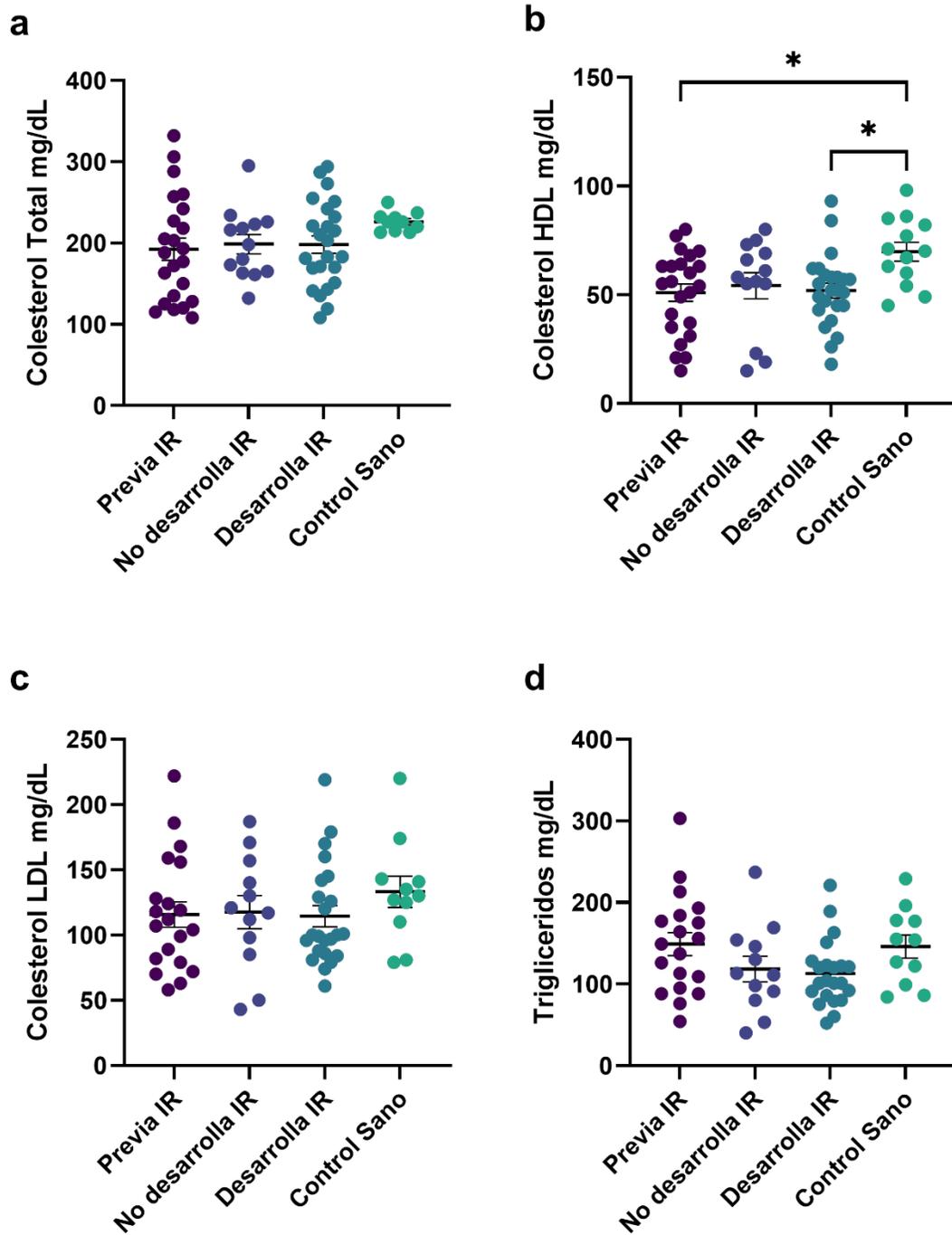


Figura 17: Comparación mediante análisis de varianza (ANOVA) entre grupos de estudio de la cohorte de pacientes COVID-19 en base a la cuantificación de parámetros del perfil

lipídico. (a) Colesterol total (Col Total). (b) Colesterol HDL (Col HDL). (c) Colesterol LDL (Col LDL). (d) Triglicéridos. * $p < 0,05$.

Seguido al perfil lipídico, se realizó la comparación de los parámetros del perfil hepático, mediante ANOVA. El primer parámetro analizado por comparación fue la bilirrubina total, en donde no se observaron diferencias significativas entre los grupos de estudio (Figura 18a). Se continuó el análisis con la medición de la bilirrubina directa y la indirecta, y en ambos casos no se observaron diferencias significativas (Figuras 18b-c). Luego se analizaron las proteínas totales, las cuales no presentaron diferencias significativas entre los 4 grupos, resultado que se mantuvo en el análisis de albumina y globulinas, y de igual forma no se encontró diferencias entre la relación albumina/globulinas (Figura 18d-g). Respecto a las enzimas hepáticas, se observó que las transaminasas, tanto la alanina aminotransferasa (GOT) como la aspártica aminotransferasa (GPT), no presentan diferencias significativas (Figura 18h-i). En el caso de la gamma glutamil transferasa (GGT), se observó un aumento significativo para el grupo de los pacientes con previa IR respecto a los pacientes que no desarrollaron IR (Figura 18j) y finalmente en la fosfatasa alcalina no se observaron diferencias significativas (Figura 18k).

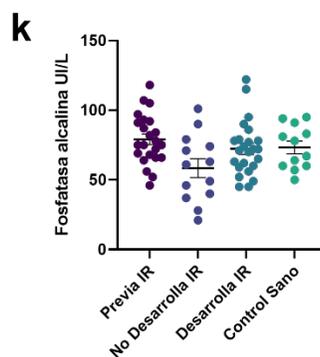
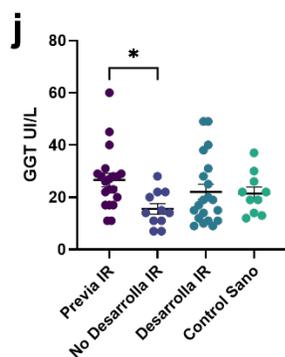
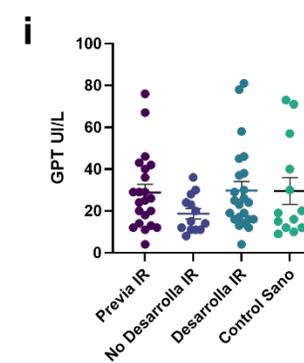
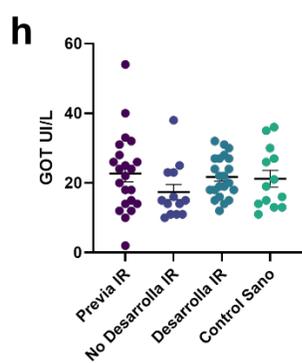
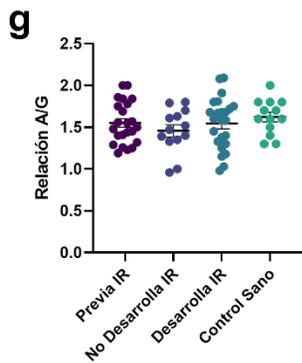
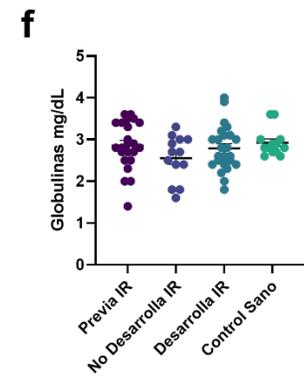
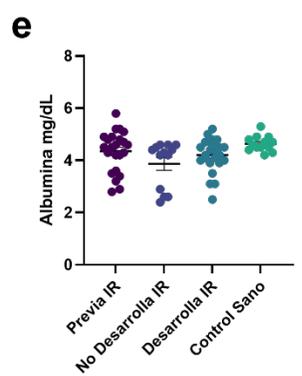
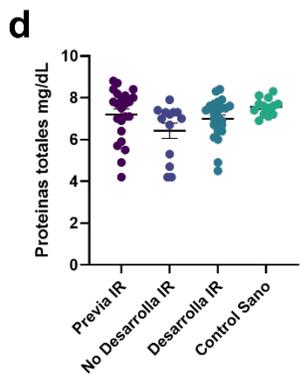
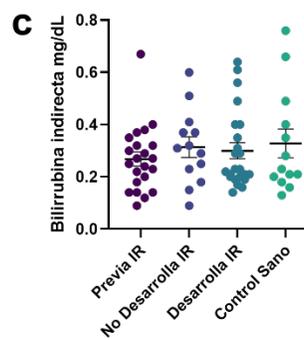
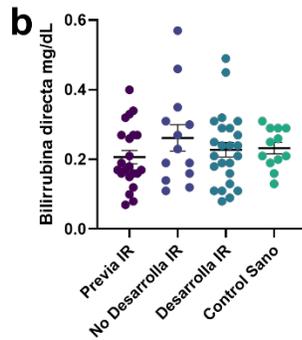
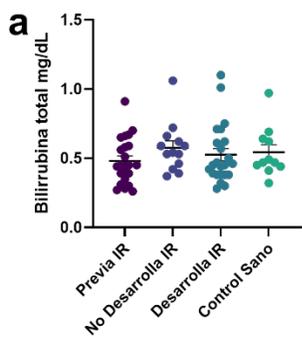


Figura 18: Comparación mediante análisis de varianza (ANOVA) entre grupos de estudio de la cohorte de pacientes COVID-19 en base a parámetros del perfil hepático. (a) Bilirrubina total. (b) Bilirrubina directa. (c) Bilirrubina indirecta. (d) Proteínas totales. (e) Albúmina. (f) Globulinas. (g) Relación A/G. (h) Alanina aminotransferasa (GOT). (i) Aspártica aminotransferasa (GPT). (j) Gamma glutamil transferasa (GGT). (k) Fosfatasa Alcalina. * $p < 0,05$.

Se analizó el hemograma mediante ANOVA entre los 4 grupos de estudios. Se comenzó con el hematocrito en donde no se observaron diferencias significativas, al igual que la hemoglobina, y el conteo de eritrocitos (Figura 19a-c). Para los índices relacionados al eritrocito se observó que no hay diferencias significativas en el volumen corpuscular medio (VCM) y la hemoglobina corpuscular media (HCM), entre los 4 grupos, sin embargo, en el caso de la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) se observó una disminución significativa en los pacientes con previa IR y aquellos que no desarrollaron IR respecto al grupo control (Figura 19d-f). Luego se analizó el conteo de leucocitos, en donde se observó que existe un aumento significativo en leucocitos en el grupo de pacientes con previa IR, respecto a los pacientes que no desarrollaron IR (Figura 19g). En los porcentajes de los leucocitos, no se observaron diferencias significativas entre linfocitos, monocitos y granulocitos entre los 4 grupos (Figura 19h-j).

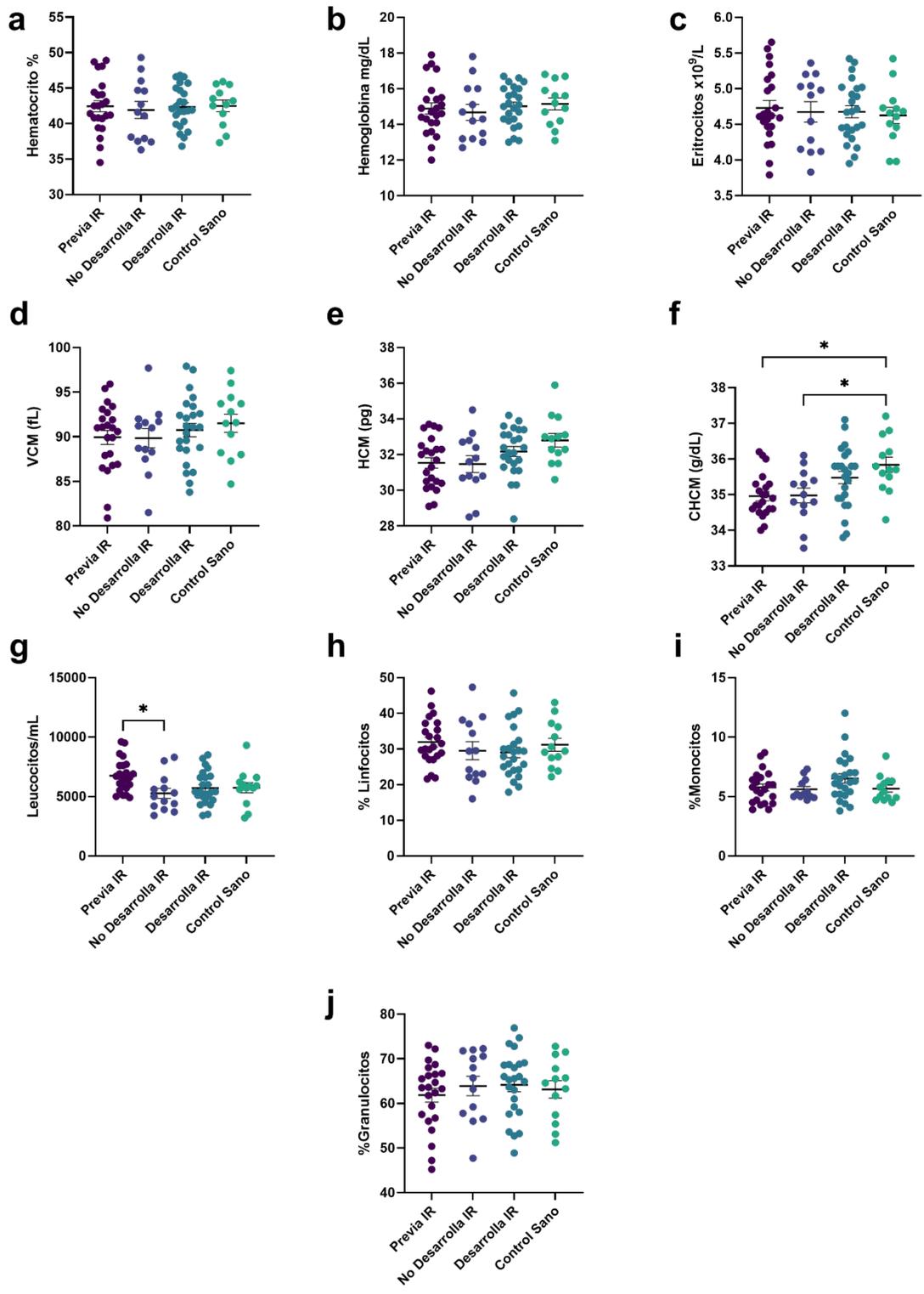


Figura 19: Comparación mediante análisis de varianza (ANOVA) entre grupos de estudio de la cohorte de pacientes COVID-19 en base a los parámetros del hemograma. (a) Hematocrito. (b) Hemoglobina. (c) Conteo de eritrocitos. (d) Volumen corpuscular medio (VCM). (e) Hemoglobina corpuscular media (HCM). (f) Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM). (g) Conteo de leucocitos. (h) %Linfocitos. (i) %Monocitos. (j) %Granulocitos. * $p < 0,05$.

Finalmente, el último análisis de comparación entre grupos de los parámetros de laboratorios fueron los anticuerpos anti-SARS-CoV-2. En el caso de la IgM, no se observan diferencias significativas (Figura 20a). Para la IgG se observó que el grupo de pacientes con previa IR presenta un aumento significativo respecto a los pacientes que desarrollaron IR 4 meses post-COVID-19 (Figura 20b).

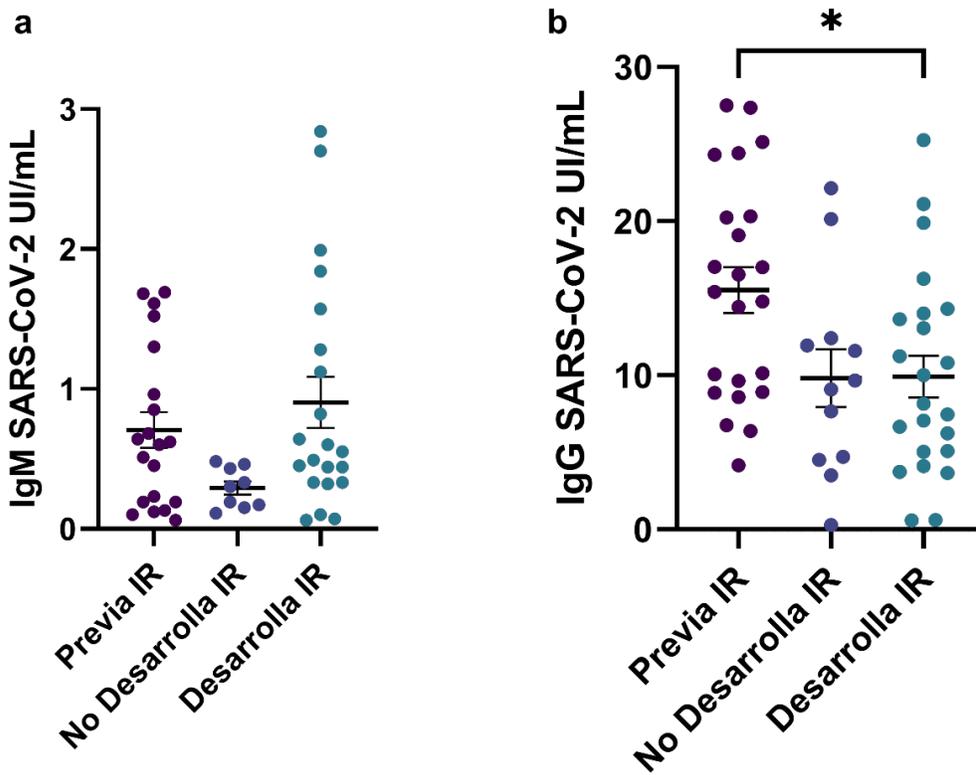


Figura 20: Comparación mediante análisis de varianza (ANOVA) entre grupos de estudio de la cohorte de pacientes COVID-19 en base a la cuantificación de anticuerpos anti-SARS-CoV-2. (a) IgM anti-SARS-CoV-2. (b) IgG anti-SARS-CoV-2. * $p < 0,05$ (En colaboración con tesis de bioquímica de Romina Quiroga).

Evaluar el porcentaje de NETosis basal y post estímulo en una cohorte de pacientes que cursaron COVID-19, 4 meses post infección.

Se evaluó la NETosis en condiciones basales y con agonistas TLR3/7/8 de neutrófilos provenientes de los pacientes a los 4 meses post COVID-19. Antes de realizar la determinación de NETosis se caracterizó primero la población de neutrófilos de la muestra, mediante un análisis en el software FlowJo. Lo primero que se realizó fue la determinación de la población de neutrófilos en la muestra de PMN. Se comenzó con la separación de las poblaciones celulares mediante side scatter (SSC) y forward scatter (FSC), en los cuales se determinó la población de granulocitos (Figura 21a) y luego se seleccionaron las células individuales o singletes (Figura 21b). Finalmente se identificó la población de neutrófilos mediante el marcaje con un anticuerpo anti-CD16, el cual es expresado en alta densidad por los neutrófilos y el anti-Siglec8, el cual es expresado por eosinófilos, pero no por neutrófilos. Las células que se observaron CD16+ Siglec8- fueron clasificadas como neutrófilos (Figura 21c).

Luego, siguiendo los mismos pasos de población de granulocitos por separación de singletes, se realizó la separación mediante marcaje con Live/Dead Dye y Sytox Blue de las muestras, observándose una población de neutrófilos que no estaban realizando NETosis y viables puesto que son Live/Dead dye- Sytox Blue-, una población de células que está realizando NETosis, puesto son Sytox Blue+ y de esta población se pueden separar las células viables es decir Live/Dead dye-

y en proceso de NETosis por lo que son Sytox Blue+, esta población se trataría de neutrófilos pasando por el proceso denominado NETosis vital (Figura 21d).

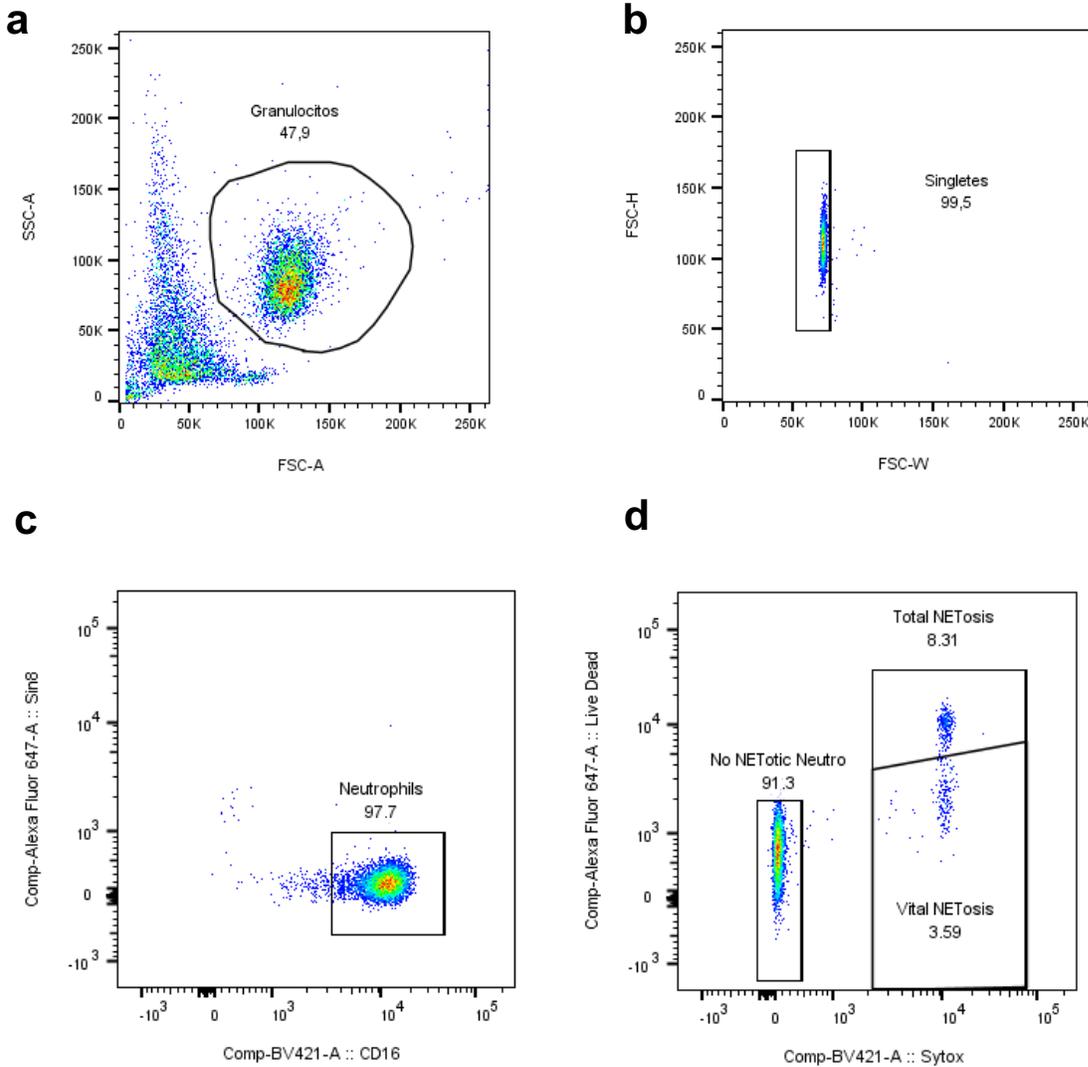


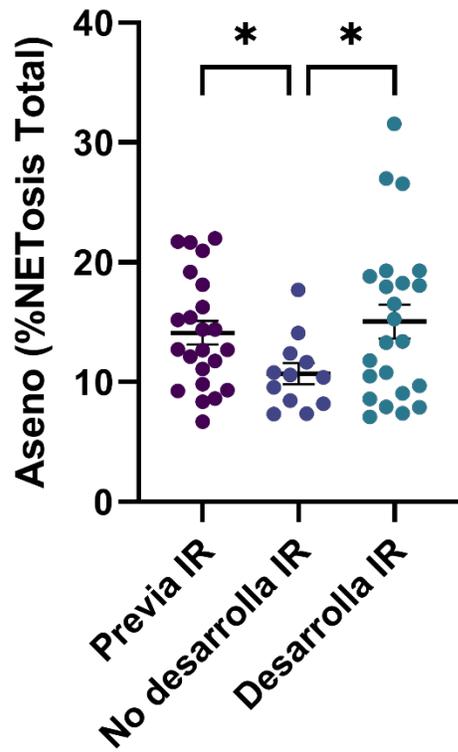
Figura 21: Estrategia de gating para la cuantificación de NETosis mediante citometría de flujo. (a) Selección de células polimorfonucleares mediante SSC y FSC. (b) Selección de células únicas y eliminación de células en doblete. (c) Determinación de la población de

neutrófilos puros en muestra de células PMN aisladas. (d) Método de cuantificación de NETosis mediante Sytox Blue y Live/Dead Dye.

Una vez definida la estrategia para determinar las poblaciones de células realizando NETosis total y vital, se realizó la comparación mediante ANOVA entre 3 grupos, pacientes con previa IR, pacientes que desarrollaron IR y pacientes que no desarrollaron IR.

Mediante esta estrategia se evaluó primero la NETosis total en condiciones basales y con agonistas TLR. Se comenzó evaluando la NETosis basal donde se observó que para la NETosis total y vital existe un aumento significativo en los neutrófilos provenientes de pacientes con IR previa al COVID-19 y con IR post COVID-19 (Figura 22a-b). Luego a evaluar la NETosis con agonistas se utilizaron las citoquinas TNF- α e IL-6 como estímulo para la NETosis, donde se observó que para la activación con citoquinas existe un aumento significativo en el porcentaje de NETosis para el grupo de pacientes con IR pre y post COVID-19 y también en el grupo de pacientes sin IR (Figura 23).

a



b

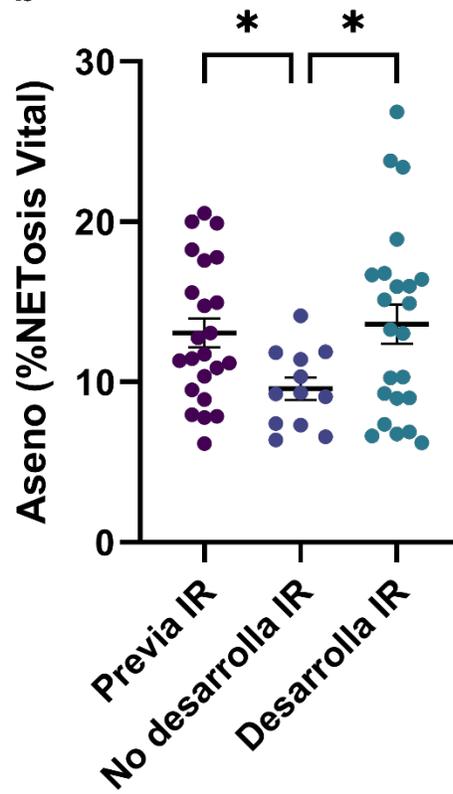


Figura 22: Comparación de porcentaje de NETosis basal total (a) y vital (b). * $p < 0,05$.

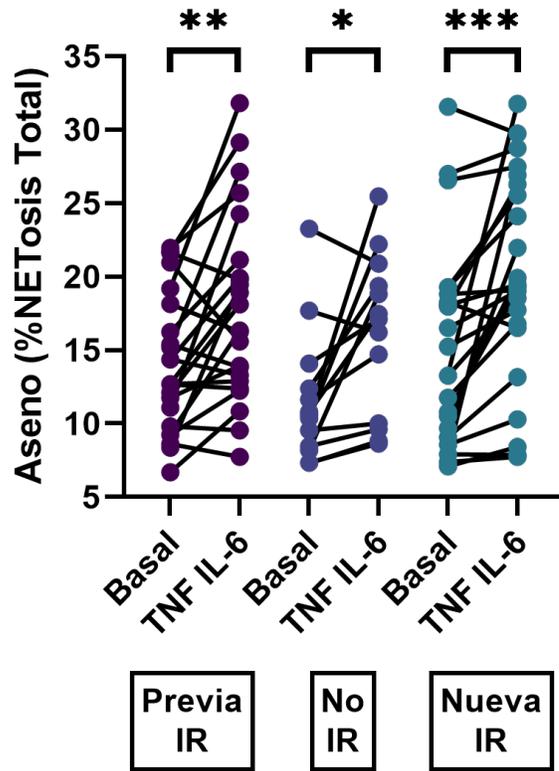


Figura 23: Efecto de citoquinas (TNF-a e IL-6) en el porcentaje de NETosis total. Neutrófilos provienen de: pacientes con IR previo al COVID-19 (cuadro izquierdo); pacientes sin IR post COVID-19 (cuadro medio); pacientes con IR post COVID-19 (cuadro derecho). En cada columna se comparan la NETosis total de neutrófilos en condiciones basales (izquierda) y activados con TNF-a e IL-6 (derecha). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Al evaluar la NETosis total en respuesta a High Molecular Weight Poly I:C (HMW) y Low Molecular Weight Poly I:C (LMW), agonistas TLR3 se logró observar que tras activar los neutrófilos con HMW y LMW no se observan diferencias significativas en ninguno de los grupos de estudio (Figura 24a-b).

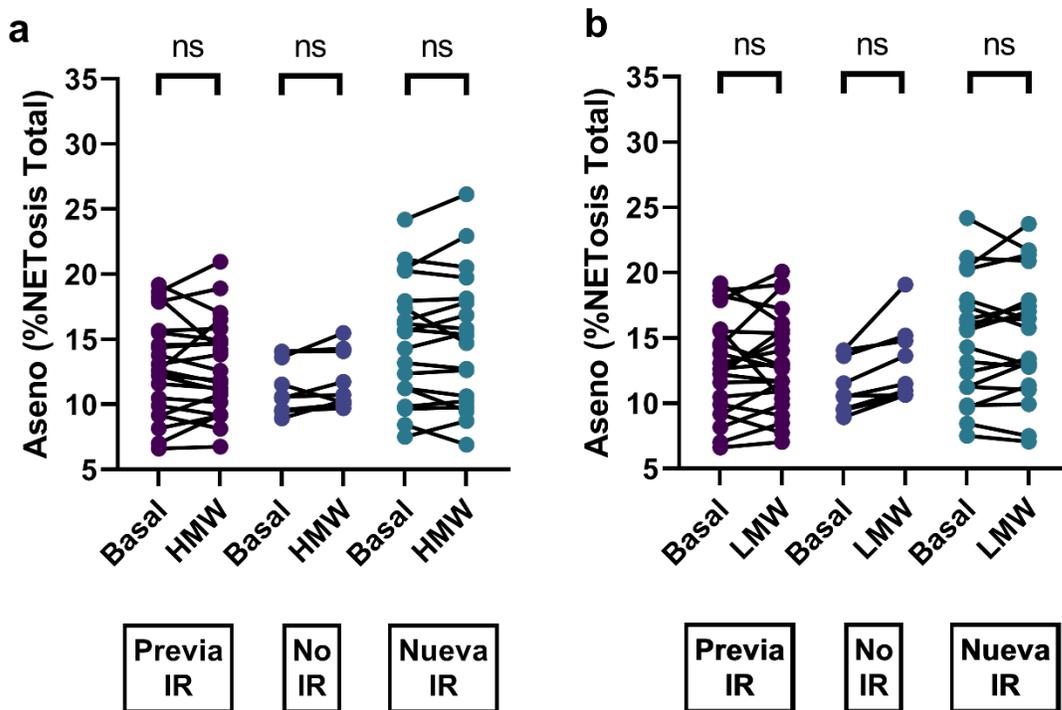


Figura 24: Efecto de agonistas TLR 3 (HMW y LMW) en el porcentaje de NETosis total. (a) Efecto de HMW en porcentaje de NETosis total (b) Efecto de LMW en porcentaje de NETosis total. Neutrófilos provienen de: pacientes con IR previo al COVID-19 (cuadro izquierdo); pacientes sin IR post COVID-19 (cuadro medio); pacientes con IR post COVID-19 (cuadro derecho). En cada columna se comparan la NETosis total de

neutrófilos en condiciones basales (izquierda) y activados con HMW (a) o LMW (b) (derecha).

Al evaluar la NETosis total en respuesta a Imiquimod (ImiQ), agonista TLR7 se puede observar que existe un aumento significativo en el porcentaje de NETosis total en los neutrófilos provenientes de todos los grupos de pacientes (Figura 25).

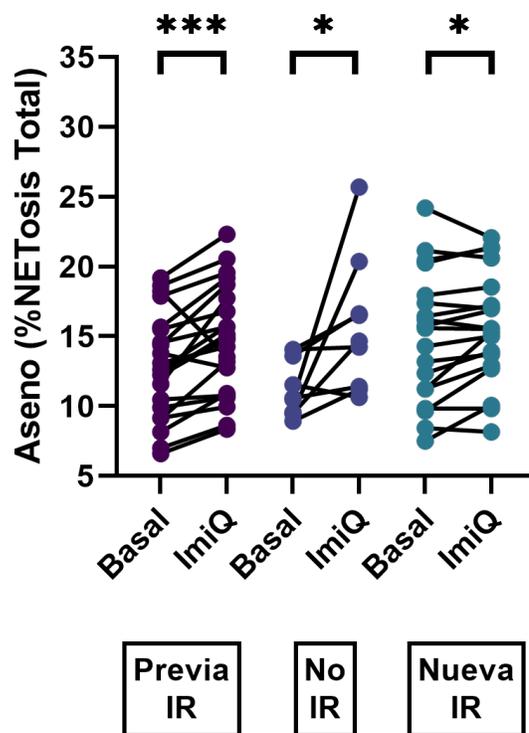


Figura 25: Efecto de agonista TLR 7 (ImiQ) en el porcentaje de NETosis total. Neutrófilos provienen de: pacientes con IR previo al COVID-19 (cuadro izquierdo); pacientes sin IR post COVID-19 (cuadro medio); pacientes con IR post COVID-19 (cuadro derecho). En

cada columna se comparan la NETosis total de neutrófilos en condiciones basales (izquierda) y activados con ImiQ (derecha). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Luego, se evaluó la NETosis total en respuesta a Resiquimod (R848) y CL075 agonistas simultáneos de TLR7 y TLR8, y se observó un aumento significativo del porcentaje de NETosis en neutrófilos provenientes de los pacientes con IR pre-COVID-19 para R848, sin embargo, en los 2 grupos restantes no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de NETosis tras la activación (Figura 26a). Para CL075 se observó un aumento significativo del porcentaje de NETosis en neutrófilos provenientes de todos los grupos de pacientes (Figura 26b).

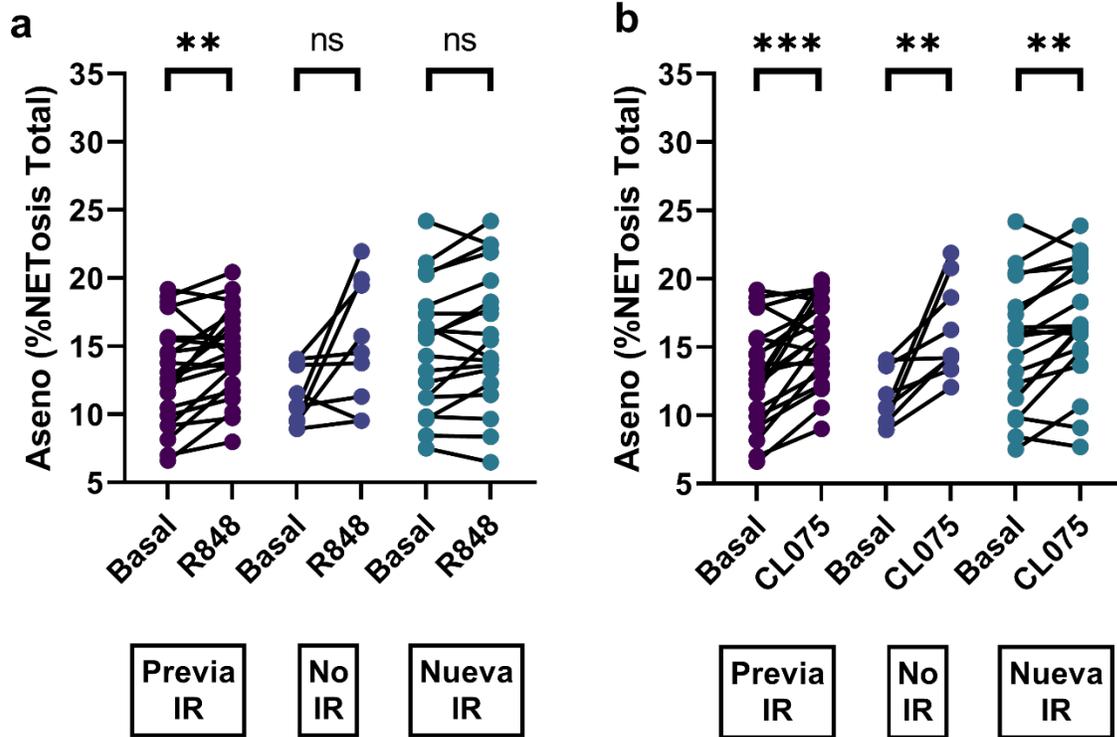


Figura 26: Efecto de agonistas TLR 7/8 (R848 y CL075) en el porcentaje de NETosis total. (a) Efecto de R848 en porcentaje de NETosis total (b) Efecto de CL075 en porcentaje de NETosis total. Neutrófilos provienen de: pacientes con IR previo al COVID-19 (cuadro izquierdo); pacientes sin IR post COVID-19 (cuadro medio); pacientes con IR post COVID-19 (cuadro derecho). En cada columna se comparan la NETosis total de neutrófilos en condiciones basales (izquierda) y activados con R848 (a) o CL075 (b) (derecha). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Lo siguiente que se evaluó fue la NETosis total en respuesta a ssRNA40 y ssRNA41 agonistas TLR8, donde se observó en que tras el estímulo con ambos agonistas un aumento significativo de la NETosis para el grupo con IR previa al COVID-19 (Figura 27a-b).

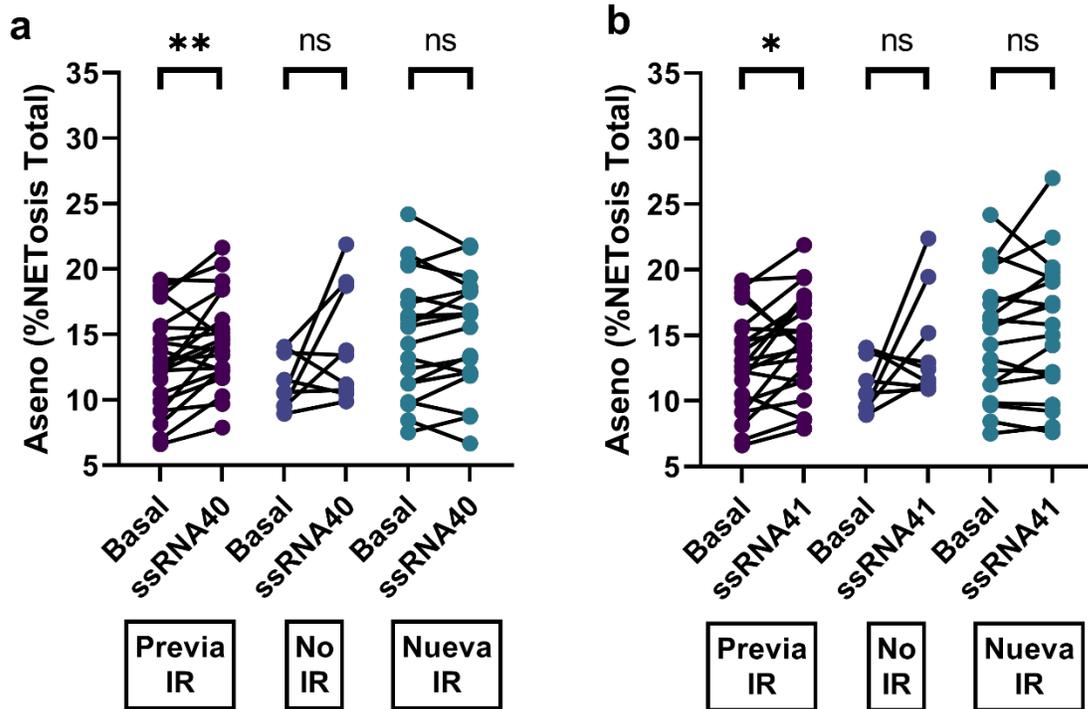


Figura 27: Efecto de agonistas TLR 8 (ssRNA40 y ssRNA41) en el porcentaje de NETosis total. (a) Efecto de ssRNA40 en porcentaje de NETosis total (b) Efecto de ssRNA41 en porcentaje de NETosis total. Neutrófilos provienen de: pacientes con IR previo al COVID-19 (cuadro izquierdo); pacientes sin IR post COVID-19 (cuadro medio); pacientes con IR post COVID-19 (cuadro derecho). En cada columna se comparan la NETosis total de

neutrófilos en condiciones basales (izquierda) y activados con ssRNA40 (a) o ssRNA41 (b) (derecha). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Tras evaluar la NETosis total, se realizó el mismo procedimiento, pero evaluando NETosis vital bajo los mismos agonistas descritos previamente. Por lo que se comenzó con el control positivo con citoquinas TNF- α e IL-6, donde se observó un aumento significativo en el porcentaje de NETosis vital en neutrófilos provenientes de todos los grupos de pacientes (Figura 28).

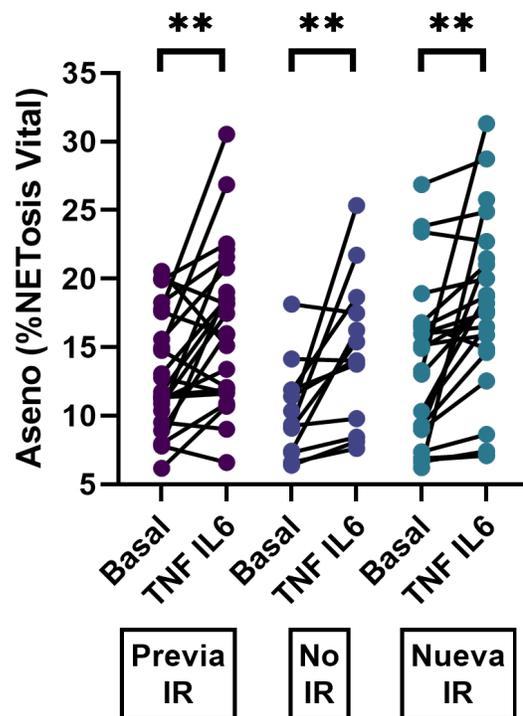


Figura 28: Efecto de citoquinas (TNF-IL6) en el porcentaje de NETosis vital. Neutrófilos provienen de: pacientes con IR previo al COVID-19 (cuadro izquierdo); pacientes sin IR

post COVID-19 (cuadro medio); pacientes con IR post COVID-19 (cuadro derecho). En cada columna se comparan la NETosis vital de neutrófilos en condiciones basales (izquierda) y activados con TNF IL-6 (derecha). ** $p < 0,01$.

Al evaluar la NETosis vital en respuesta a HMW y LMW (TLR3) solo se observó que tras estimular los neutrófilos con HMW y LMW ocurrió un aumento significativo de la NETosis vital en los neutrófilos de los pacientes que no tenían IR con LMW (Figura 29a-b).

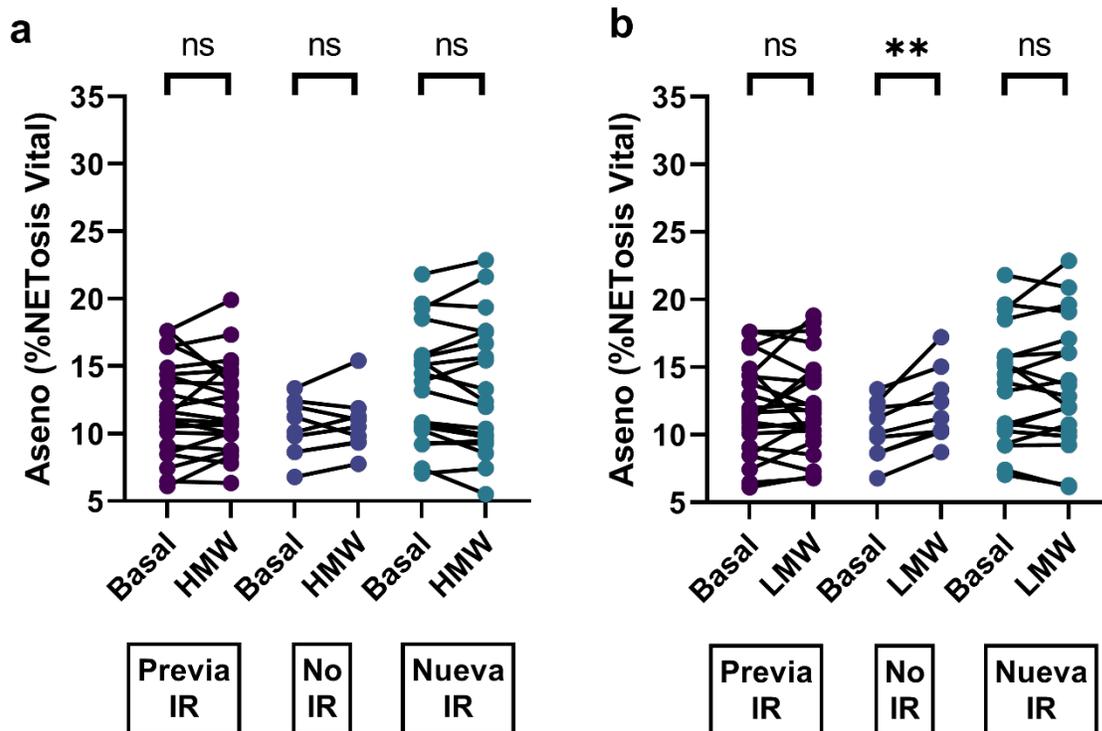


Figura 29: Efecto de agonistas TLR 3 (HMW y LMW) en el porcentaje de NETosis vital.

(a) Efecto de HMW en porcentaje de NETosis vital (b) Efecto de LMW en porcentaje de

NETosis vital. Neutrófilos provienen de: pacientes con IR previo al COVID-19 (cuadro izquierdo); pacientes sin IR post COVID-19 (cuadro medio); pacientes con IR post COVID-19 (cuadro derecho). En cada columna se comparan la NETosis vital de neutrófilos en condiciones basales (izquierda) y activados con HMW (a) o LMW (b) (derecha). ** $p < 0,01$.

Al evaluar la NETosis vital en respuesta a ImiQ (TLR7), se puede observar que existe un aumento significativo en el porcentaje de NETosis vital en los neutrófilos provenientes de pacientes que no desarrollaron IR, y en los neutrófilos de pacientes con IR pre-COVID-19 (Figura 30).

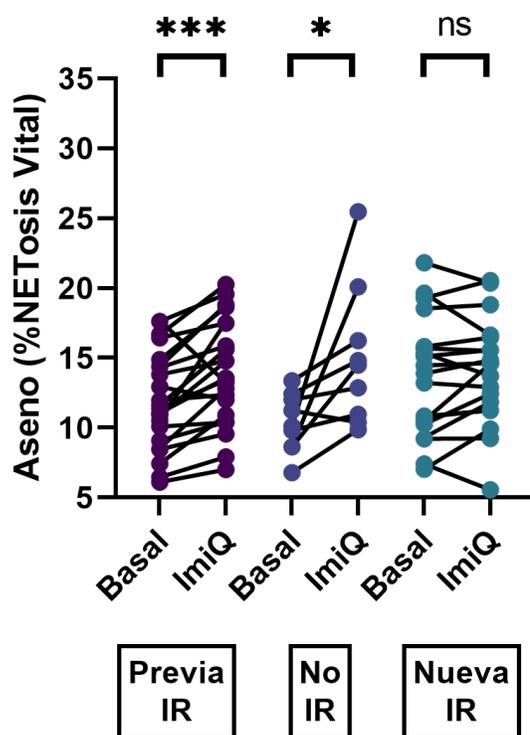


Figura 30: Efecto de agonista TLR 7 (ImiQ) en el porcentaje de NETosis vital. Neutrófilos provienen de: pacientes con IR previo al COVID-19 (cuadro izquierdo); pacientes sin IR post COVID-19 (cuadro medio); pacientes con IR post COVID-19 (cuadro derecho). En cada columna se comparan la NETosis vital de neutrófilos en condiciones basales (izquierda) y activados con ImiQ (derecha). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Luego, se evaluó la NETosis vital en respuesta a R848 y CL075 (TLR7/8), y se observó un aumento significativo del porcentaje de NETosis en neutrófilos provenientes de los pacientes que tenían IR pre-COVID-19 y de los pacientes que no tenían IR para R848 (Figura 31a) y para CL075, se observó un aumento

significativo del porcentaje de NETosis en neutrófilos provenientes de todos los grupos de pacientes (Figura 31b).

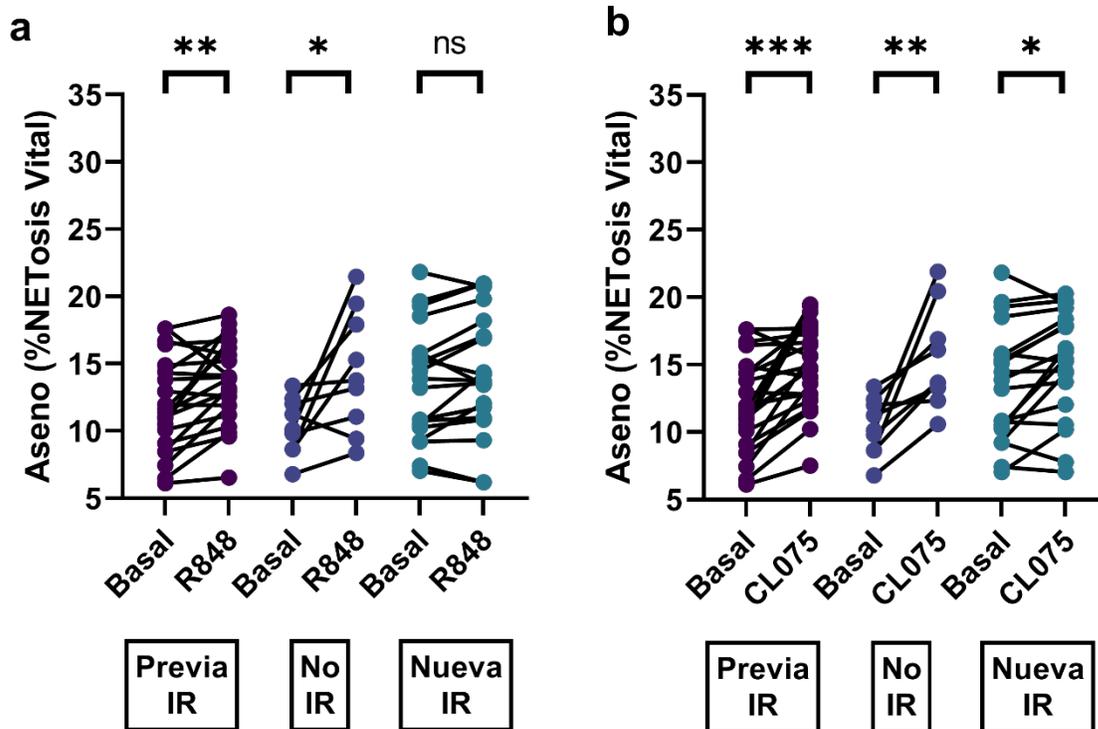


Figura 31: Efecto de agonistas TLR 7/8 (R848 y CL075) en el porcentaje de NETosis vital. (a) Efecto de R848 en porcentaje de NETosis vital (b) Efecto de CL075 en porcentaje de NETosis vital. Neutrófilos provienen de: pacientes con IR previo al COVID-19 (cuadro izquierdo); pacientes sin IR post COVID-19 (cuadro medio); pacientes con IR post COVID-19 (cuadro derecho). En cada columna se comparan la NETosis vital de neutrófilos en condiciones basales (izquierda) y activados con R848 (a) o CL075 (b) (derecha). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Finalmente, se evaluó la NETosis vital en respuesta a ssRNA40/41 (TLR8), donde se observó en que tras el estímulo con ambos agonistas sólo hay aumento del porcentaje de NETosis vital de neutrófilos de pacientes con IR pre-COVID-19 (Figura 32a-b).

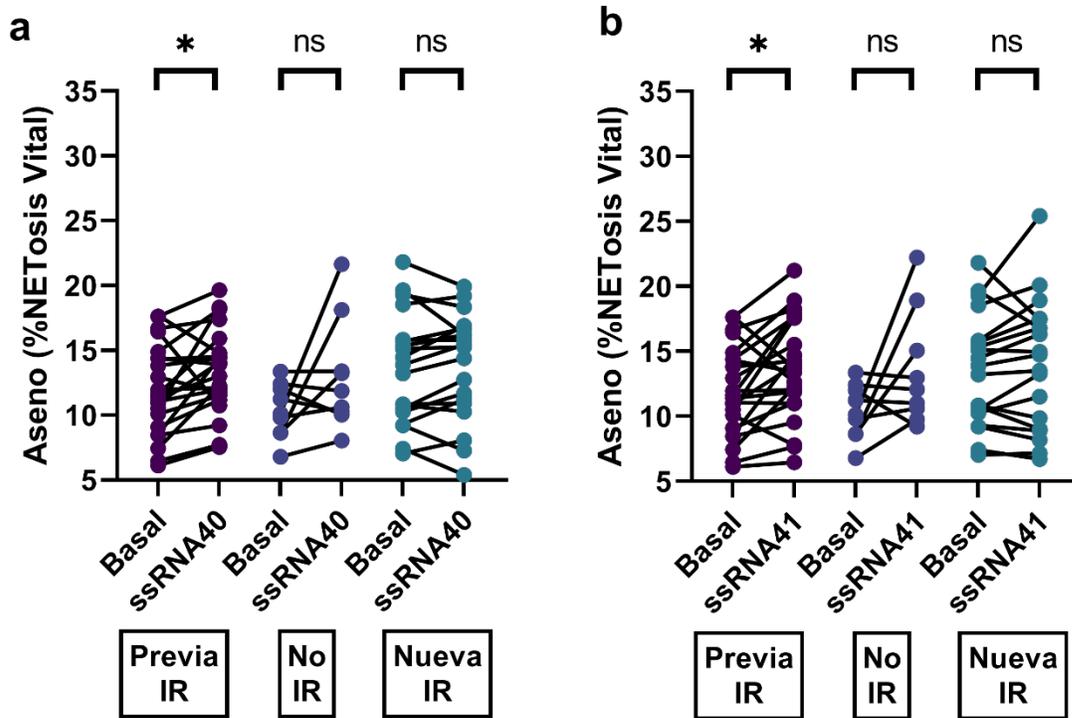


Figura 32: Efecto de agonistas TLR 8 (ssRNA40 y ssRNA41) en el porcentaje de NETosis vital. (a) Efecto de ssRNA40 en porcentaje de NETosis vital (b) Efecto de ssRNA41 en porcentaje de NETosis vital. Neutrófilos provienen de: pacientes con IR previo al COVID-19 (cuadro izquierdo); pacientes sin IR post COVID-19 (cuadro medio); pacientes con IR post COVID-19 (cuadro derecho). En cada columna se comparan la NETosis vital de neutrófilos en condiciones basales (izquierda) y activados con ssRNA40 (a) o ssRNA41 (b) (derecha). * $p < 0,05$.

Analizar el efecto del plasma de pacientes que cursaron COVID-19, 4 meses post infección, sobre la NETosis utilizando neutrófilos sanos como biosensor.

Se determinó la influencia del ambiente en la NETosis utilizando neutrófilos sanos como biosensores, por lo que se expuso neutrófilos de un donante sano al plasma de pacientes post COVID-19 con IR y sin IR, además de que se incluyó un plasma de sujeto control sano según el protocolo descrito en la metodología mediante el equipo Incucyte. Es por ello por lo que se realizó la exposición de neutrófilos humanos sanos de plasma de pacientes en fase aguda, secuelada. La medición de NETosis se realizó de forma manual mediante la observación de fotos tomadas por el equipo en intervalos de una hora y se realizó la discriminación de las células en NETosis en base a la observación de la tinción Sytox Green al exterior de la célula (Figura 33) se obtiene el porcentaje con relación al conteo total de células del equipo.

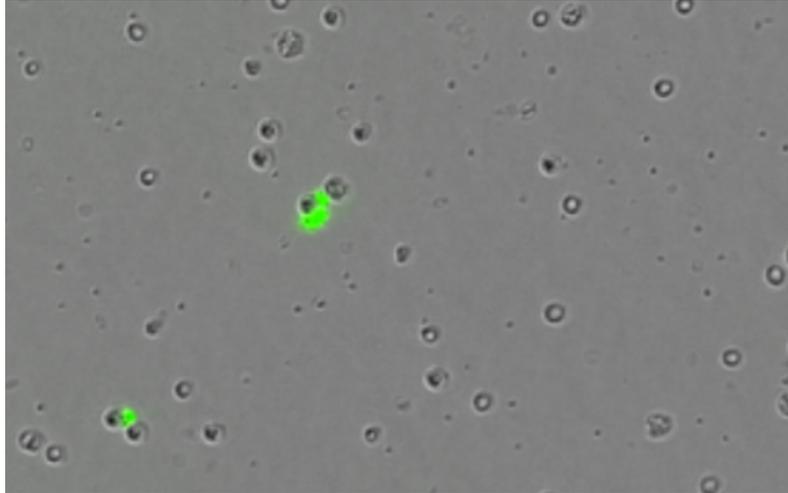


Figura 33: Imagen representativa de NETosis a cuantificar mediante Incucyte y tinción Sytox Green.

Al realizar la determinación de la NETosis se observó que tras 6 horas aumenta la cantidad de células apoptóticas y no se observan diferencias en la NETosis en pacientes control por lo que se realizó la cuantificación y una curva de cinética de NETosis desde 0 horas hasta las 6 horas en base a esa curva se realizó un ANOVA en modelo mixto para la curva de cinética y las comparaciones entre grupos.

Primero se realizó la curva relacionada al plasma de fase aguda de la COVID-19 en donde se observó un aumento significativo a 5, 6 horas tras la exposición inicial respecto al grupo control y a los pacientes sin IR respecto al plasma del grupo control (Figura 34 a-d).

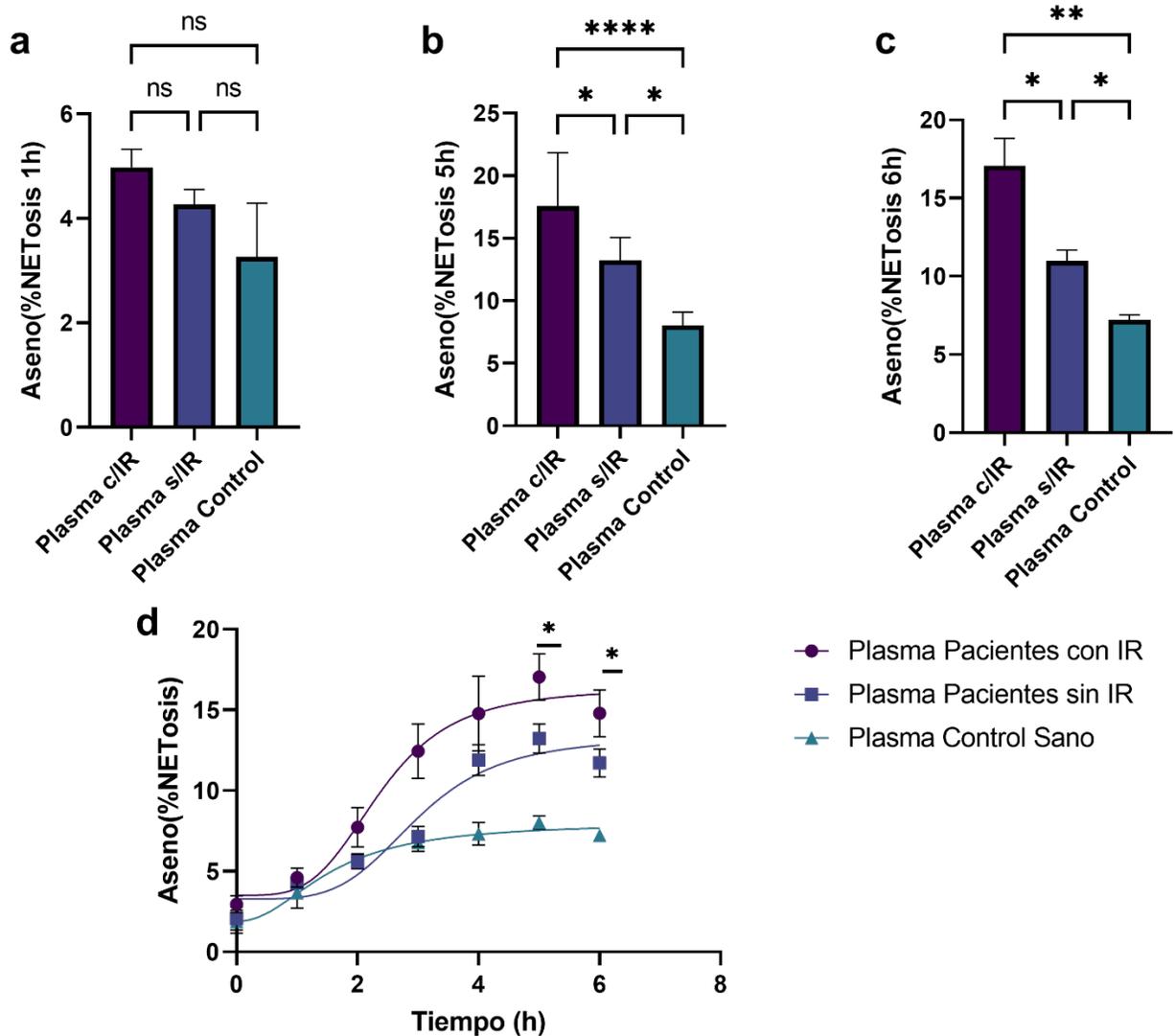


Figura 34: Curva cinética de formación de trampas extracelulares de neutrófilo por exposición a plasma de pacientes en fase aguda de COVID-19. En neutrófilos de donantes sanos por la exposición al plasma de fase aguda (COVID-19) de los grupos de estudio, en cuantificación mediante fotografías de Incucyte y análisis de varianza (ANOVA) de dos vías. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

Luego se realizó la comparación entre la NETosis en el tiempo en neutrófilos sanos frente a la exposición de plasma en estado secuestrado de los pacientes COVID-19 con IR, sin IR y el plasma de sujetos control. Se observó que existe un aumento significativo de la NETosis en los neutrófilos sanos desde 1 hasta 6 horas, además se observó un aumento significativo de la NETosis producto del plasma de pacientes con IR respecto a pacientes sin IR a 1, 5 y 6 horas (Figura 35a-d).

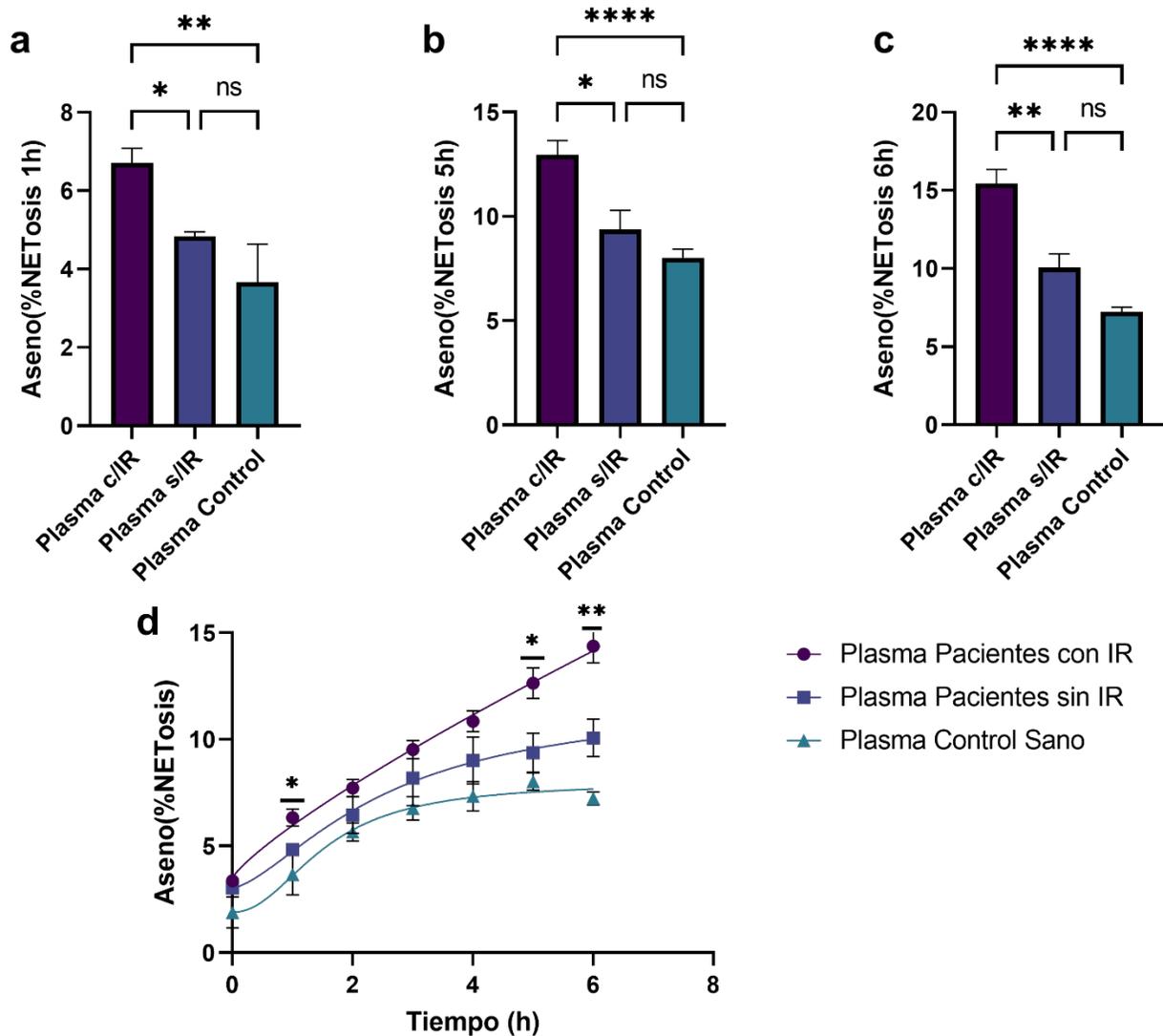


Figura 35: Curva cinética de formación de trampas extracelulares de neutrófilo por exposición a plasma de pacientes 4 meses post COVID-19. En neutrófilos de donantes sanos por la exposición al plasma de fase secueada (COVID-19) de los grupos de estudio, en cuantificación mediante fotografías de Incucyte y análisis de varianza (ANOVA) de dos vías. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

Para comprobar la influencia de la glucosa e insulina en la producción de NETs utilizando neutrófilos sanos como biosensor, se utilizaron 4 diferentes concentraciones que emulan las condiciones de glucosa en el plasma en presencia y ausencia de insulina. Una vez cultivadas con las distintas condiciones, las muestras fueron adquiridas en el citómetro tras 5 minutos, y luego se volvieron a adquirir a 10 y 15 minutos. Al realizar la comparación del porcentaje de NETosis vital se pudo observar que a 5 minutos de la adquisición en el citómetro no hay diferencias significativas entre la NETosis vital en neutrófilos expuestos o no a insulina (Figura 36a), sin embargo, tras 10 y 15 minutos, se puede observar que existe una diferencia significativa en el porcentaje de NETosis vital en los neutrófilos que fueron expuestos a insulina, respecto a los que no fueron expuestos a insulina (Figura 36b-c). Aquí se observó que en ausencia de insulina a mayores concentraciones de glucosa existe un aumento de producción de NETs en el tiempo, a en todas las concentraciones de glucosa (Figura 36d). En el caso de los neutrófilos que si fueron suplementados con insulina, se observa un aumento en la producción de NETs en el tiempo para todas las concentraciones excepto a 25mmol/L. Sin embargo, se observó que tras 15 minutos, los neutrófilos expuestos a glucosa en concentraciones 5,5 mmol/l y 7,5 mmol/L sobrepasan el porcentaje de NETosis respecto a los expuestos a 4 mmol/L y 25mmol/L de glucosa (Figura 36e).

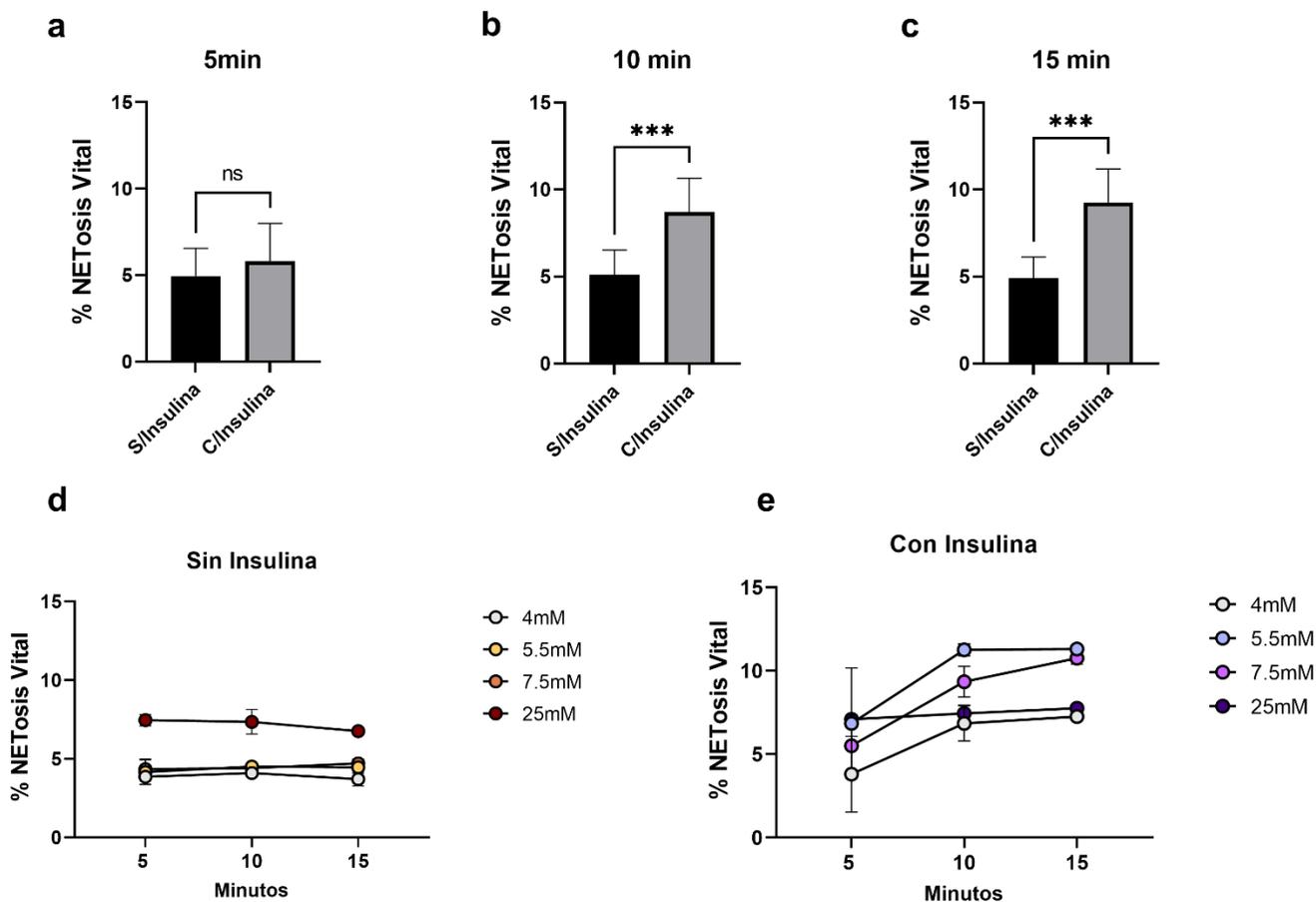


Figura 36: Efecto de glucosa en el porcentaje de NETosis de neutrófilos humanos sanos con presencia y ausencia de insulina. Comparación de porcentaje NETosis a 5 minutos de la adquisición (a), 10 minutos de la adquisición(b) y 15 minutos de la adquisición (c). Curva de porcentaje de NETosis respecto al tiempo en ausencia de insulina (d) y en presencia de insulina (e). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Evaluar la relación entre el porcentaje de NETosis de la cohorte de pacientes que cursaron COVID-19 con parámetros clínicos, metabólicos e inflamatorios, 4 meses post infección.

El ultimo objetivo se realizó un análisis de correlación entre los distintos parámetros del metabolismo glucídico a los tiempos donde se observó diferencias significativas por Incucyte a 1, 5 y 6 horas. Se analizó primero la correlación entre la NETosis y la glucosa y no se observó correlación entre estos parámetros en los 3 tiempos analizados (Figura 37a-c).

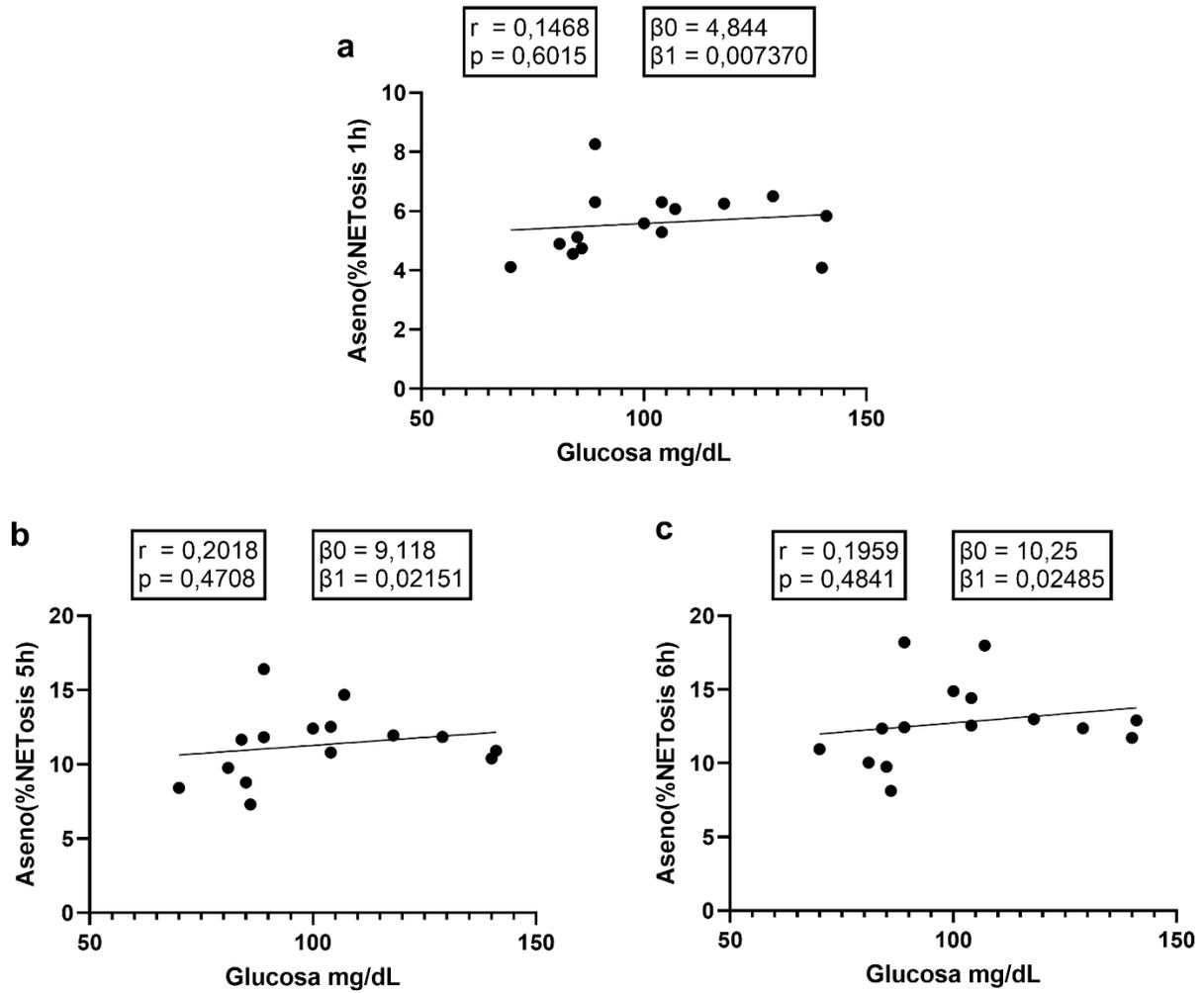


Figura 37: Análisis de correlación de Pearson entre las variables de glucosa (mg/dL) y %NETosis a distintos tiempos. (a) %NETosis a tiempo 1h. (b) %NETosis a tiempo 5h. (c) %NETosis a tiempo 6h.

Seguido, se realizó un análisis de correlación considerando la insulina presente en el plasma proveniente de pacientes post COVID-19 y se observó una correlación positiva y significativa a 1 hora entre la insulina y el porcentaje de NETosis en neutrófilos provenientes de un donante sano (Figura 38a). Tras 5h y 6h de la exposición de los neutrófilos sanos al plasma de pacientes COVID-19 se observa como la correlación se mantiene positiva y significativa (Figura 38b-c).

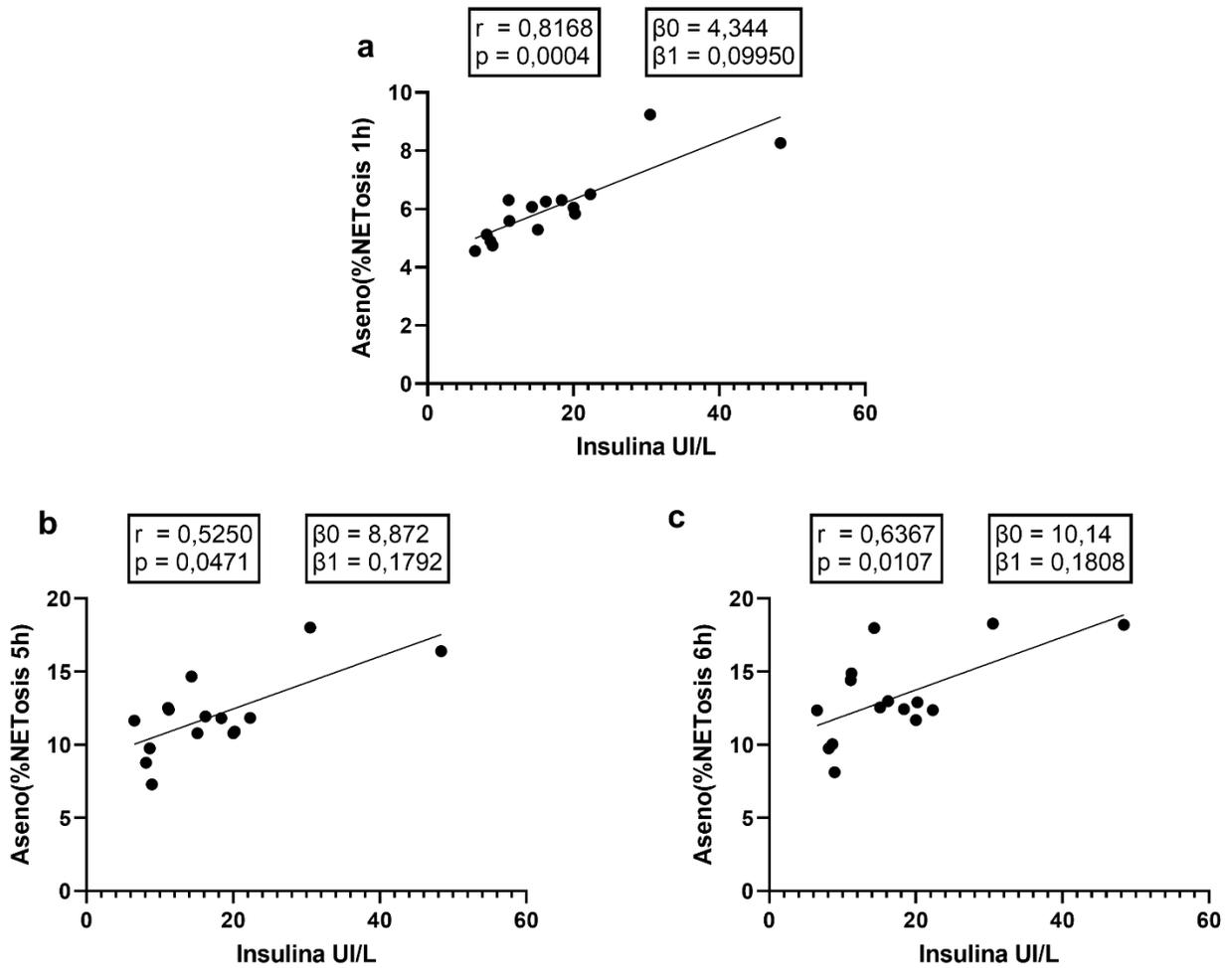


Figura 38: Análisis de correlación de Spearman entre las variables de insulina y %NETosis a distintos tiempos. (a) %NETosis a tiempo 1h. (b) %NETosis a tiempo 5h. (c) %NETosis a tiempo 6h.

En seguida se realizó la correlación con el índice HOMA-IR y el porcentaje de NETosis en neutrófilos sanos, donde se observó correlación positiva significativa tras 1 hora de la exposición, sin embargo, tras 5 horas la correlación pierde significancia estadística (Figura 39a-c).

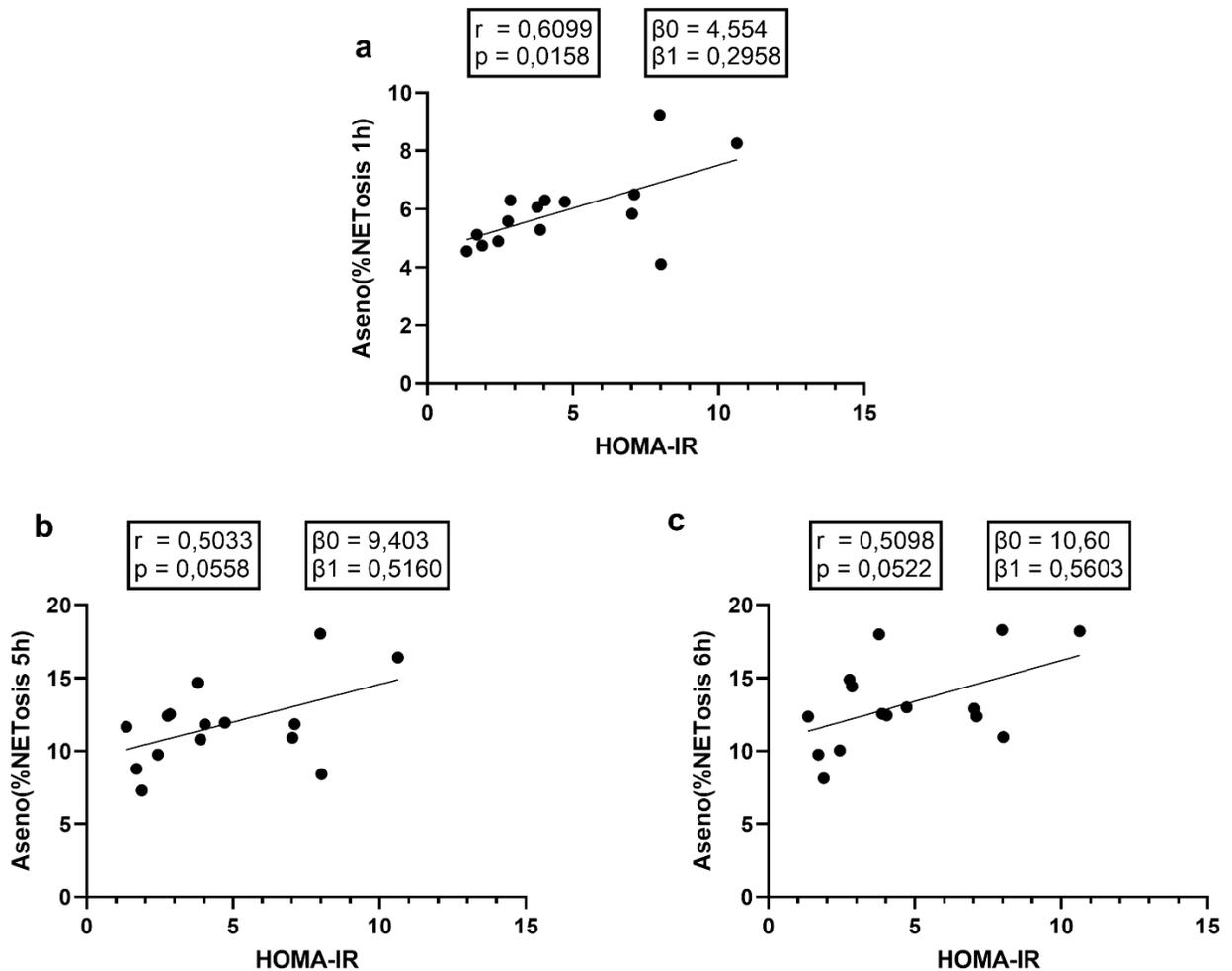


Figura 39: Análisis de correlación de Pearson entre las variables de HOMA-IR y %NETosis a distintos tiempos. (a) %NETosis a tiempo 1h. (b) %NETosis a tiempo 5h. (c) %NETosis a tiempo 6h.

Seguido del perfil glucídico se realizó un análisis de correlación entre el porcentaje de NETosis en neutrófilos sanos y la cantidad de distintas citoquinas contenidas en el plasma de los pacientes al que fueron expuestas estas células. Primero se determinó en IL-12 en donde se observó una correlación nula entre las dos variables (40a-c).

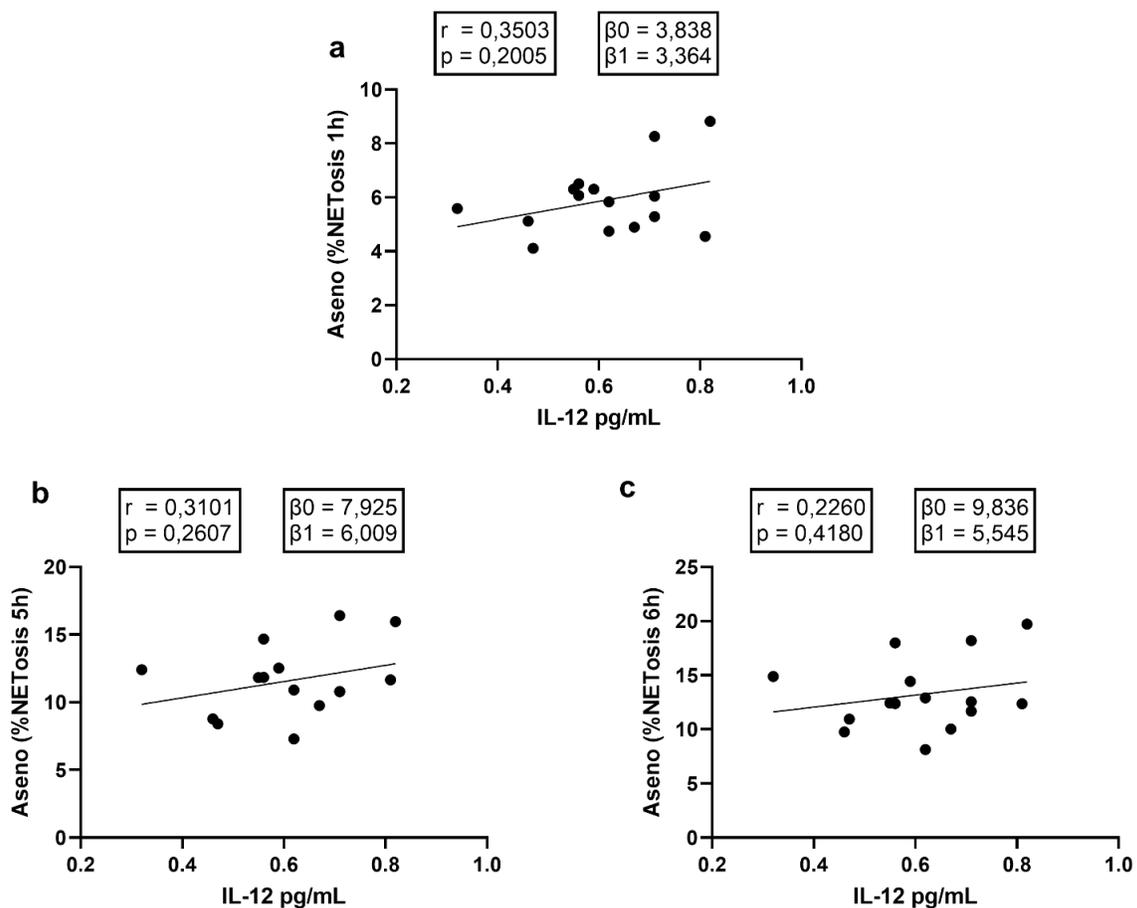


Figura 40: Análisis de correlación de Spearman entre las variables de IL-12 y %NETosis a distintos tiempos. (a) %NETosis a tiempo 1h. (b) %NETosis a tiempo 5h. (c) %NETosis a tiempo 6h.

La siguiente citoquina la cual fue analizada fue TNF-a en donde se observó que no existe correlación entre ésta y la liberación de NETs (Figura 41a-c)

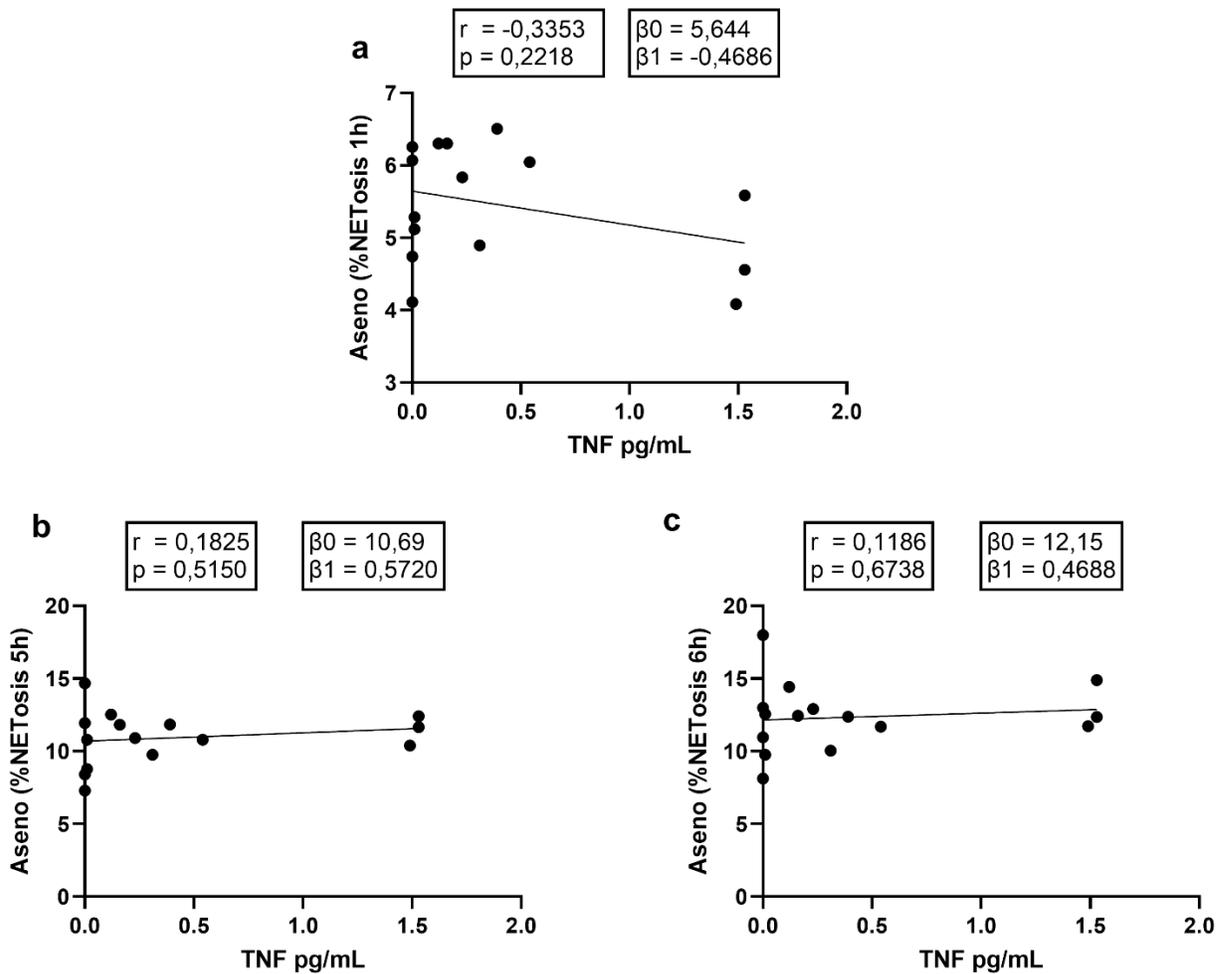


Figura 41: Análisis de correlación de Spearman entre las variables de TNF y %NETosis a distintos tiempos. (a) %NETosis a tiempo 1h. (b) %NETosis a tiempo 5h. (c) %NETosis a tiempo 6h.

Luego se realizó el análisis de correlación con IL-6 y el porcentaje de NETosis, en donde se observó una correlación positiva y estadísticamente significativa tras 1, 5 y 6 horas (Figura 42).

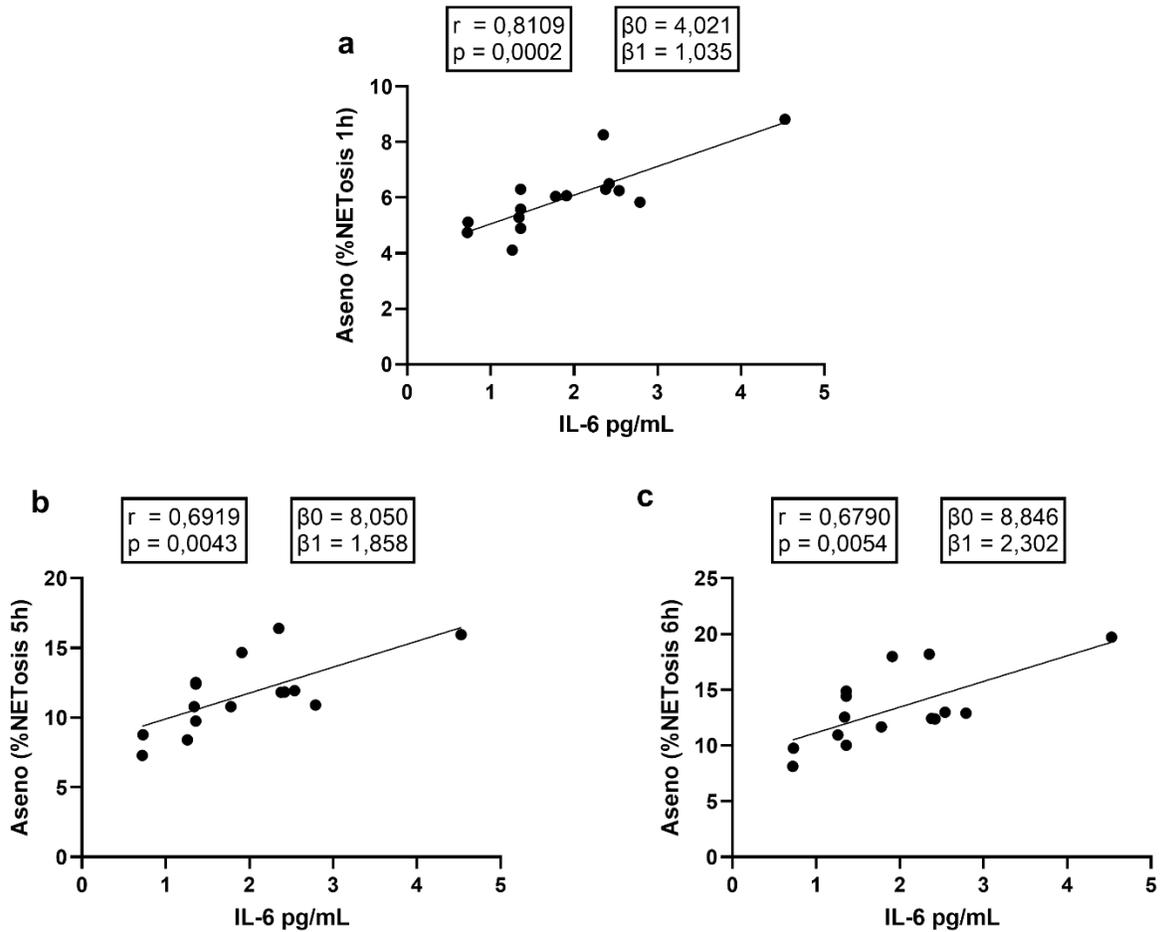


Figura 42: Análisis de correlación de Pearson entre las variables de IL-6 y %NETosis a distintos tiempos. (a) %NETosis a tiempo 1h. (b) %NETosis a tiempo 5h. (c) %NETosis a tiempo 6h.

Seguido se realizó la correlación del porcentaje de NETosis e IL-8 en donde se observó una correlación nula y no presenta significancia en todos los tiempos estudiados (Figura 43a-c).

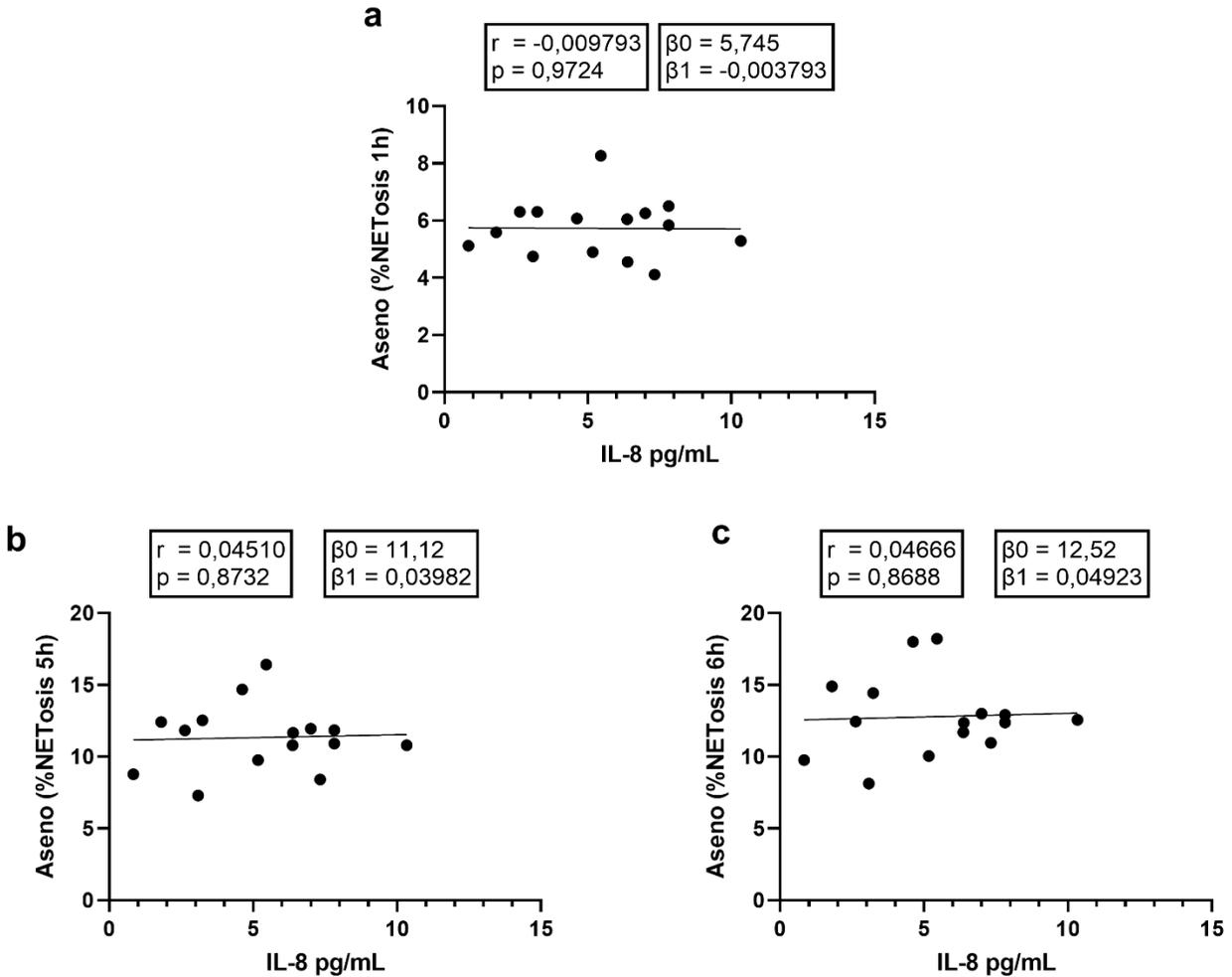


Figura 43: Análisis de correlación de Spearman entre las variables de IL-8 y %NETosis a distintos tiempos. (a) %NETosis a tiempo 1h. (b) %NETosis a tiempo 5h. (c) %NETosis a tiempo 6h.

Después se realizó la correlación con IL-1 β donde se observa una fuerte correlación negativa significativa tras 1 hora de exposición (Figura 44a). Sin embargo, tras 5 y 6 horas se vuelve nula la correlación y no es estadísticamente significativa (Figura 44b-c).

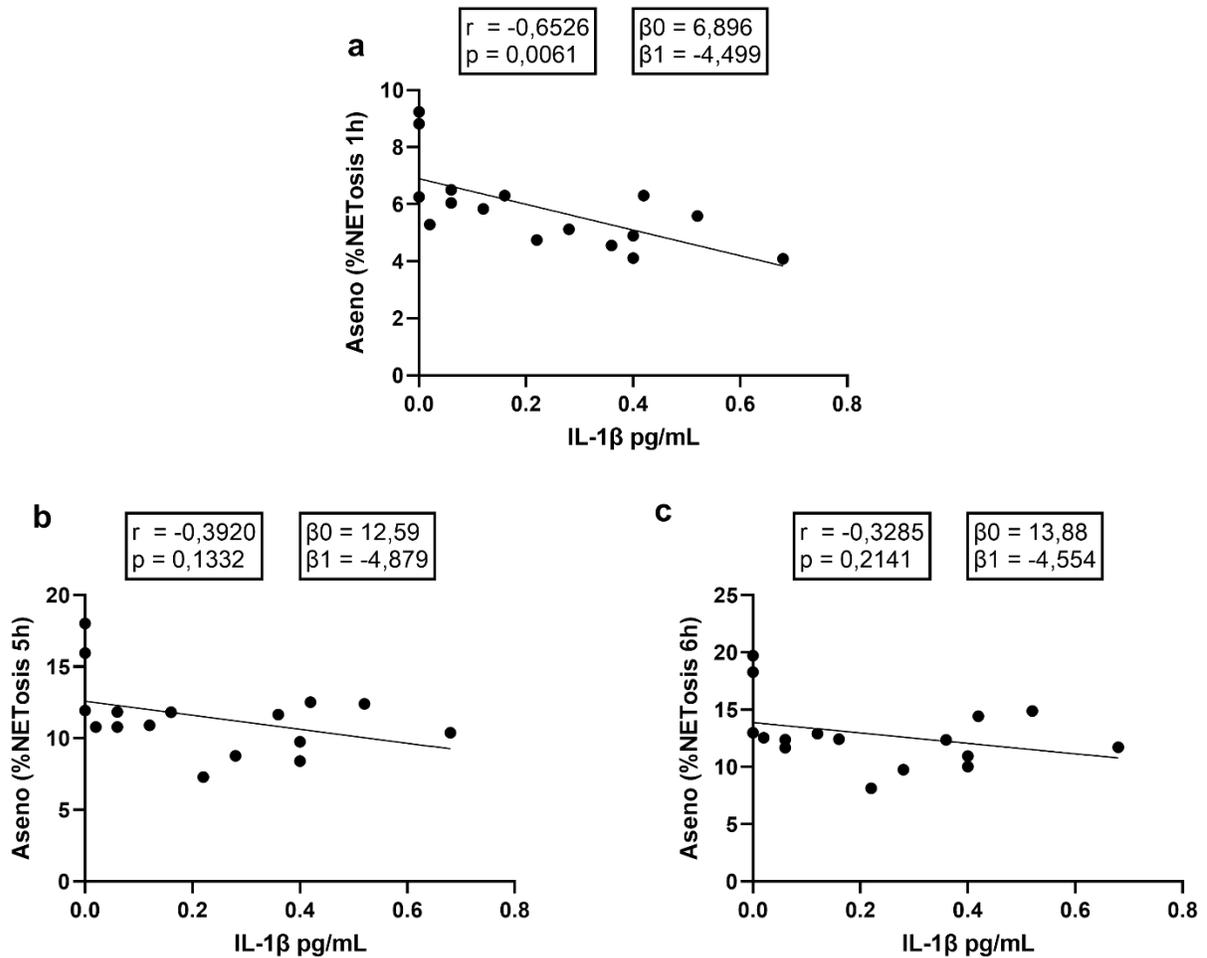


Figura 44: Análisis de correlación de Pearson entre las variables de IL-1 β y %NETosis a distintos tiempos. (a) %NETosis a tiempo 1h. (b) %NETosis a tiempo 5h. (c) %NETosis a tiempo 6h.

El último análisis de correlación fue entre el porcentaje de NETosis en neutrófilos sanos y la cantidad de quimioquinas contenidas en el plasma de los pacientes al que fueron expuestas estas células. Primero se determinó en CXCL-10 en donde se observó que no existe correlación entre las variables a los tiempos de estudio (Figura 46a-c).

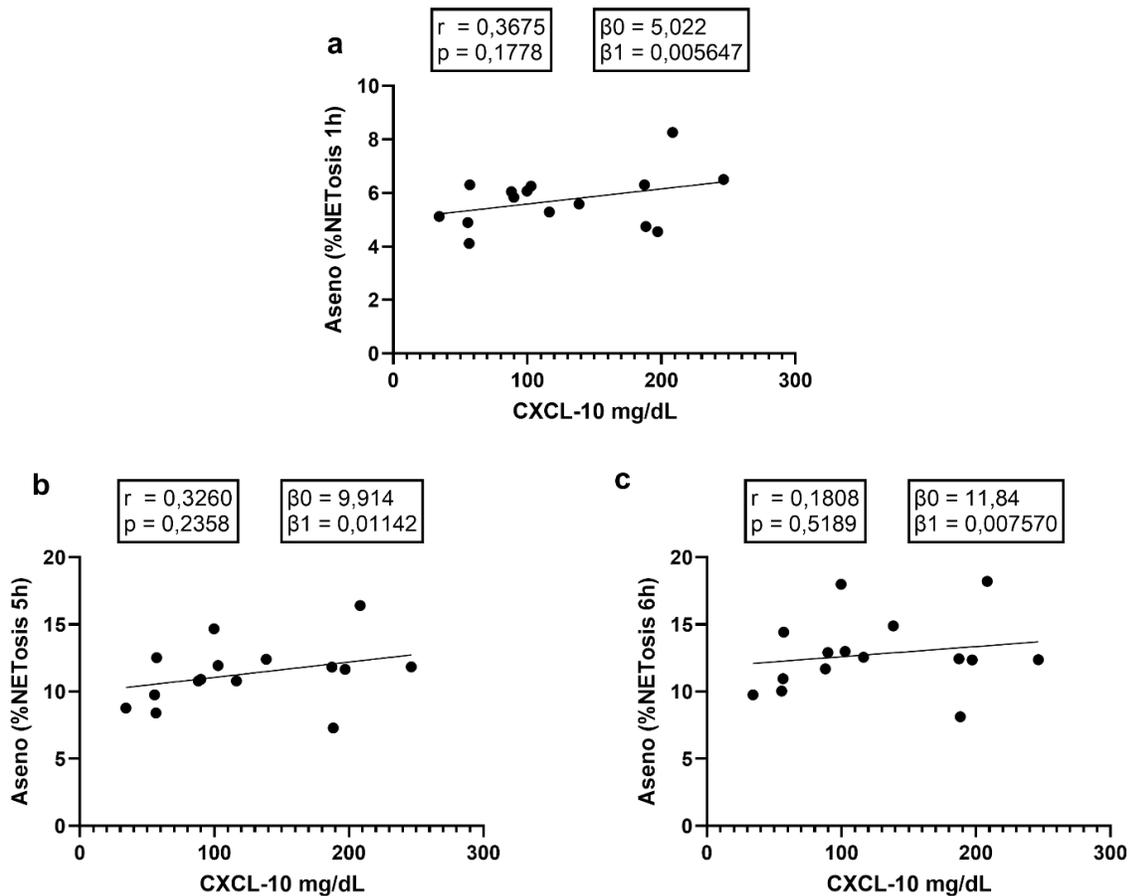


Figura 45: Análisis de correlación de Spearman entre las variables de CXCL-10 y %NETosis a distintos tiempos. (a) %NETosis a tiempo 1h. (b) %NETosis a tiempo 5h. (c) %NETosis a tiempo 6h.

La siguiente quimioquina que fue analizada fue CCL-2 en donde se observó una correlación positiva y significativa tras 1, 5 y 6 horas de la exposición al plasma (Figura 46).

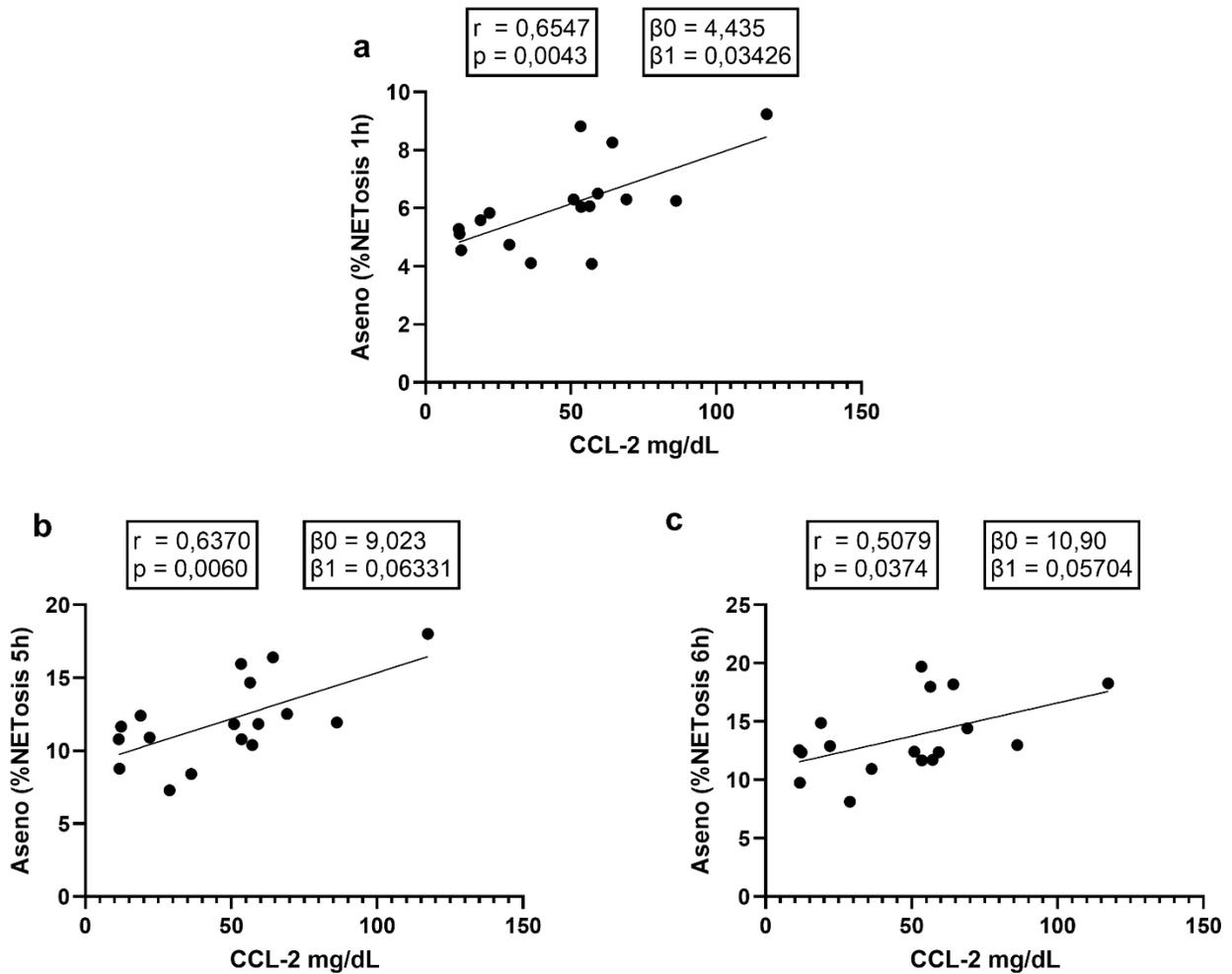


Figura 46: Análisis de correlación de Spearman entre las variables de CCL-2 y %NETosis a distintos tiempos. (a) %NETosis a tiempo 1h. (b) %NETosis a tiempo 5h. (c) %NETosis a tiempo 6h.

Luego al evaluar CXCL-9 se observó que no existía una relación entre las variables a los distintos tiempos de estudio (Figura 47a-c)

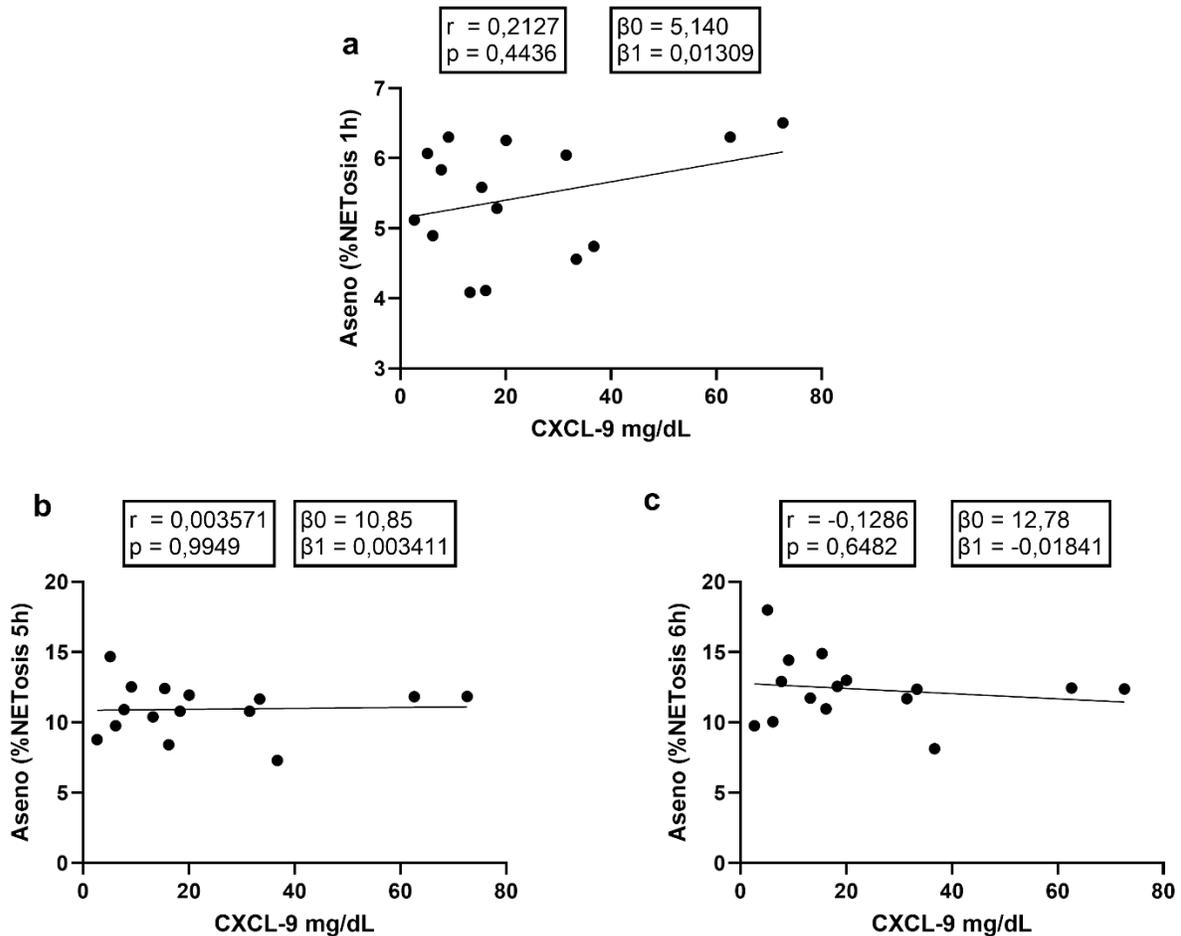


Figura 47. Análisis de correlación de Spearman entre las variables de CXCL-9 y %NETosis a distintos tiempos. (a) %NETosis a tiempo 1h. (b) %NETosis a tiempo 5h. (c) %NETosis a tiempo 6h.

Finalmente, al evaluar CCL-5 se observó una correlación nula y no significativa tras 1 hora de la exposición al plasma, situación que se mantiene tras 5 y 6 horas de la exposición al plasma de los pacientes COVID-19 (Figura 48).

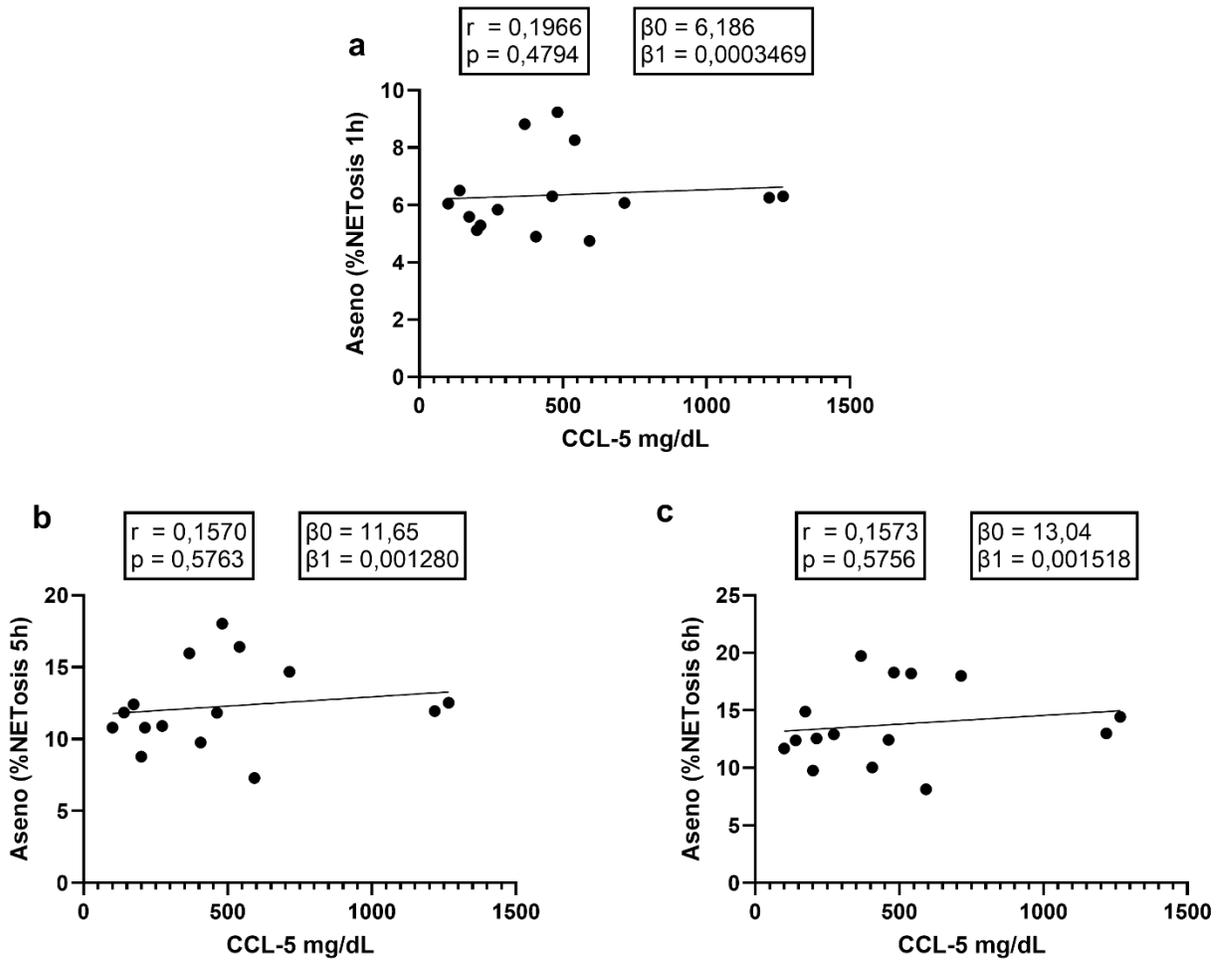


Figura 48: Análisis de correlación de Spearman entre las variables de CCL-5 y %NETosis a distintos tiempos. (a) %NETosis a tiempo 1h. (b) %NETosis a tiempo 5h. (c) %NETosis a tiempo 6h.

DISCUSIÓN

En base a los resultados obtenidos de la descripción de la cohorte, vale destacar que la mayoría de pacientes moderados y severos corresponden a hombres, como se puede observar en la Figura 10, lo que es esperable debido a que la infección por SARS-CoV-2 se trata de una infección que posee un riesgo mayor de severidad en hombres que en mujeres (Brodin, 2021). En promedio los pacientes masculinos presentan significativamente mayor peso y altura que las pacientes femeninas, pero con un nivel de obesidad similar al de las mujeres. Varios pacientes presentaron secuelas pulmonares, tanto estructurales observadas mediante el TC abdominal, como funcionales mediante DLCO (Tabla II), esto era lo esperado puesto que la mayoría de los pacientes se trataban de pacientes que cursaron la patología en estado severo o moderado tal y como se observó en la Figura 10.

En concordancia con lo reportado en la literatura, observamos que a nivel nacional también se reportan casos de insulino-resistencia en pacientes que padecieron COVID-19, sin antecedentes de alteraciones metabólicas previas a la infección (Figura 11). Por ejemplo, Chen y colaboradores en su seguimiento de 64 pacientes desde su estado inicial (M. Chen et al., 2021), también lo describe Montefusco y colaboradores en su seguimiento de 57 pacientes (Montefusco et al., 2021). Además, otros estudios mantienen que la hiperglicemia e IR son partes importantes y características del cuadro severo de COVID-19 y el ARDS

(Govender, Khaliq, Moodley, & Naicker, 2021; Logette et al., 2021; Reiterer et al., 2021). Nuestra cohorte de pacientes de COVID-19 que desarrolló IR tras 4 meses se clasificó mediante el HOMA-IR, lo que nos indica que estos pacientes son prediabéticos. Sin embargo, debido a que no se realizó un examen de PTGO no se pueden conocer si éstos poseen glucosa alterada en ayunas (GAA) o intolerancia a la glucosa oral (IGA); clasificaciones de la prediabetes establecidas por la guía clínica de la diabetes mellitus tipo 2 del ministerio de salud de Chile (Minsal, 2010).

En base a las comparaciones de los grupos de estudios planteados en nuestra investigación, no se logra observar diferencias en las mayorías de las citoquinas. Sin embargo, un resultado interesante es que existe un aumento de IL-6 circulante en pacientes con IR pre COVID-19 y post COVID-19, respecto a los pacientes sin IR (Figura 12). Varios estudios han demostrado que la IL-6 se relaciona con el fenómeno de hiperinflamación sistémica en COVID-19 y la severidad en cuadros agudos, la tormenta de citoquinas y la severidad en la fase aguda de la COVID-19 (Coomes & Haghbayan, 2020; Hu, Huang, & Yin, 2021; Potere et al., 2021; Queiroz et al., 2022). Sin embargo, a largo plazo no existe un rol definido para esta citoquina en el síndrome de post COVID-19, hay autores que describen que no hay diferencias significativas en esta citoquina, restándole importancia (Bonyek-Silva et al., 2022; Queiroz et al., 2022), y hay autores que asocian un aumento de IL-6 circulante con secuelas neuro-psiquiátricas en pacientes con síndrome post COVID-19 (Evans et al., 2022; Kappelmann,

Dantzer, & Khandaker, 2021; Lv et al., 2022). Otro factor para considerar en el análisis de IL-6 es que se ha descrito ampliamente que pacientes con prediabetes o diabetes presentan un aumento de IL-6 circulante (K. Huang et al., 2022; Stephens, Hurel, Lowe, Rumley, & Humphries, 2007; Tiftikcioglu, Duksal, Bilgin, Kose, & Zorlu, 2016). Debido a que IL-6 aumenta en sujetos con alteraciones metabólicas, es probable que el aumento encontrado en nuestra cohorte es debido a su condición de IR.

Observamos también un aumento de IL-8 en todos los grupos de pacientes respecto al control sano y en los pacientes con IR pre y post-COVID19 respecto a los pacientes sin IR. Esto es importante debido a que IL-8 se le asocia a un peor pronóstico en la condición aguda, relacionado con severidad, y mortalidad en pacientes (L. Chen et al., 2020; Del Valle et al., 2020; Melero et al., 2022). Igualmente, se ha visto asociada a daño neurológico en condiciones agudas, aunque no se le ha observado un rol a largo plazo (Guasp et al., 2022). Sin embargo, algunos autores describen que los pacientes que sufren de síndrome post COVID-19 presentan una deficiencia o disminución de citoquinas como IL-8 (Williams et al., 2022). IL-8 al igual que IL-6 se ha descrito como biomarcador de prediabetes por lo que se le ha asociado a resistencia a la insulina, diabetes mellitus y se plantea como una citoquina que puede desregular la inmunidad Por lo tanto, los resultados obtenidos nuevamente están más relacionados a la condición metabólica de los pacientes.

En el perfil glicémico se observó que los pacientes diabéticos o IR previos al estudio presentaron mayor glicemia e insulina respecto a los pacientes que desarrollaron IR producto de la infección (Figura 15), lo cual es de esperarse debido a que si la infección por SARS-CoV-2 empeora la condición metabólica, estos pacientes tienen tendencia a descompensarse. Respecto a los parámetros del perfil bioquímico, se observó un aumento significativo de CK total en los pacientes que desarrollaron IR, lo que puede indicar un proceso de necrosis de algunos tipos de órganos o glándulas. Algunos autores han hipotetizado como lesiones leves a nivel pancreático producto del SARS-CoV-2 podrían llevar a la resistencia a la insulina e incluso al desarrollo de T2DM (Hayden, 2020; Hunt et al., 2021). Algunos autores han descrito la expresión de ACE2 en el páncreas, lo que podría ser la vía de entrada del SARS-CoV-2 para la infección de este tejido, observaron que en modelos de células humanas *in vitro* el virus puede infectar células beta pancreáticas, e impedir su correcto funcionamiento (Szlachcic et al., 2022; C.-T. Wu et al., 2021). Igualmente se ha descrito que aunque la expresión de ACE2a es baja en las células del páncreas, ésta es responsable del mecanismo de daño directo post COVID-19 (C.-T. Wu et al., 2021). En este mismo contexto se ha observado que la infección por SARS-CoV-2 puede generar daño hepático, lo cual se ha asociado con un incremento de la severidad del COVID-19 (Cai et al., 2020; Phipps et al., 2020; Tian et al., 2020; Y. Wang et al., 2020). Tomando en cuenta que el hígado y el páncreas son órganos importantes en la regulación de la glicemia y la insulinemia, el daño por la

infección de SARS-CoV-2 podría haber inducido el estado de resistencia a la insulina en la cohorte estudiada.

Las diferencias en niveles de anticuerpos observadas entre los 3 grupos de pacientes en estudio, donde los pacientes con alteraciones metabólicas previas presentaron una mayor producción de IgG anti-SARS-CoV-2 respecto al resto de los pacientes (Figura 20), podría ser producto de una leve inflamación crónica. Esta puede ser producto del aumento en la secreción de citoquinas proinflamatorias y factores angiogénicos, lo que lleva a estos pacientes a una mayor activación celular y por consecuencia a una mayor cantidad de células plasmáticas productoras de IgG anti-SARS-CoV-2. En la bibliografía se ha determinado que la hiperglicemia en diabetes no parece influyente en la respuesta humoral anti-SARS-CoV-2 (Lampasona et al., 2020), sin embargo, se requieren más datos para entender la relación de la producción de anticuerpos y las alteraciones metabólicas.

En términos de la NETosis basal se puede observar primero que hay una tendencia en promedio de los pacientes con previa y nueva IR de tener mayor NETosis respecto a los pacientes que no desarrollaron IR (Figura 22). Esto es un posible indicativo de una reactividad basal de los neutrófilos y una tendencia a señalizar para la producción y liberación de NETs. Lo que se relaciona con lo observado en los ensayos de estimulación con TLR. Se observó que no habían diferencias significativas con los agonistas de TLR3, que era lo esperado porque

que los neutrófilos no expresan receptores TLR3. Sin embargo, al observar la activación mediante TLR7, se pudo observar una diferencia significativa del porcentaje de NETosis post activación en los pacientes que no desarrollaron IR, a diferencia de los pacientes con IR. Esto que implica que los pacientes que desarrollaron IR posee una capacidad de respuesta alterada de NETosis frente a patógenos mediante receptores intracelulares. Es importante destacar que la NETosis basal en los neutrófilos de pacientes con nueva IR se encuentra significativamente aumentada en comparación con el grupo control (Figura 22), por lo que es probable que la ausencia de significancia post estímulo se deba al aumento de la NETosis basal, indicando que el neutrófilo del paciente con nueva IR posee una activación exacerbada debido al ambiente de alta insulina en el cual se encuentra previo al experimento. Estos hallazgos pueden sugerir que los neutrófilos de los pacientes que desarrollaron IR presentan vías de señalización más activadas que otras, lo que abre una posibilidad de estudio a nivel de mecanismo.

Es interesante notar esto ya que se ha descrito ampliamente en la bibliografía que producto de la glucosa los neutrófilos tienden a liberar más NETs (Amini et al., 2018; Injarabian, Devin, Ransac, & Marteyn, 2020; Kumar & Dikshit, 2019; Rodriguez-Espinosa et al., 2015; L. Wang et al., 2019; Yousefi et al., 2019). En nuestros ensayos la glucosa por sí sola no pareciera ser clave en la inducción de la NETosis y se visualiza a la insulina como un nuevo modulador de la NETosis o directamente de la función del neutrófilo. Esto se suma a que el plasma de los

pacientes COVID-19 con IR en el ensayo de Incucyte indujeron mayor NETosis que los plasmas de los pacientes control (Figura 34 y 35). En ambos tipos de plasmas, tanto en la fase aguda como en la secuelada, se pudo observar ese resultado, indicando la gran relevancia que juega la insulina sobre la inducción de la NETosis, independiente del estado del neutrófilo. Además, cuando se compararon los resultados entre estas dos condiciones (fase aguda vs fase secuelada), no hubo diferencia entre ellas. Esto es muy relevante ya que en fase aguda observamos una gran cantidad de citoquinas y otros mediadores inflamatorios, y se ha descrito por diversos autores que citoquinas proinflamatorias pueden gatillar NETosis como TNF- α , IL-8, IL-6 (Barbu, Mendelsohn, Samsel, & Thein, 2020; Du et al., 2022; Keshari et al., 2012). Esto indicaría un rol muy relevante para la insulina, incluso sobre la inflamación mediada por citoquinas, en este contexto.

Es importante destacar que al realizar el análisis de producción de NETs en distintas condiciones de glucosa se pudo observar la importancia de la insulina en la producción de NETs. Los neutrófilos sanos que no fueron expuestos a insulina no mostraron un aumento del porcentaje de NETosis, mientras que sí aumentaron en los que fueron expuestos a insulina (Figura 36). Esto implica que la producción de NETosis depende igualmente de la presencia de la insulina propiamente tal, y no solo de la glicemia. Es importante destacar la insulina no ha sido descrita en literatura como un factor en la NETosis hasta la fecha de este escrito.

Estas diferencias motivaron el análisis de correlación entre las citoquinas, quimioquinas, parámetros del metabolismo glucídico y la NETosis provocada en neutrófilos sanos por el plasma de pacientes COVID-19 (Figuras 37-40). Dichos resultados son interesantes puesto que mostraron una fuerte correlación entre la insulina y el porcentaje de NETosis (Figura 38). Por lo tanto, observamos evidencia de un rol de la insulina, mientras que la glicemia sería un mediador regulado por la insulina (Figura 37). Respecto a las citoquinas, es necesario destacar dos observaciones de mayor relevancia. Primero, la IL-6 mostró una gran correlación durante los 3 tiempos evaluados, lo que lleva a pensar que ambos factores, la insulina y la IL-6 podrían actuar en sinergia para gatillar la NETosis ya que IL-6 se ha descrito como gatillante de liberación de NETs (Barbu et al., 2020; Du et al., 2022). Segundo, la IL-1 β presentó una correlación negativa tras 1 hora de la estimulación con plasma de pacientes COVID-19 (Figura 45), lo cual se puede relacionar con la tendencia observada a la disminución de IL-1 β sérica en los estimulados respecto al grupo control (Figura 12). Este dato es importante debido a que se ha visto que los neutrófilos activados pueden ser inmunoreguladores de la familia de las citoquinas IL-1, y se ha descrito que los neutrófilos al ser activados provocan un corte proteolítico que favorece a la activación IL-1 α , pero no a IL-1 β (Clancy et al., 2018).

Finalmente, al analizar y correlacionar las quimioquinas con la NETosis, se observó una fuerte correlación entre CCL-2 y el porcentaje de NETosis (Figura

44), lo que puede sugerir que dentro del proceso de la NETosis el neutrófilo también secreta activamente CCL-2, lo que puede implicar que a nivel de función los neutrófilos siguen manteniendo la capacidad de reclutar a otros neutrófilos y además monocitos. Este resultado es importante debido a que CCL-2 se ha visto relacionado con la migración patológica de neutrófilos/monocitos en ARDS en un modelo murino (Andrew et al., 2017), en humanos para la enfermedad pulmonar crónica obstructiva (Blidberg, Palmberg, Dahlén, Lantz, & Larsson, 2012), y también en pancreatitis aguda y pancreatitis asociada a lesión pulmonar en un modelo murino (Jean Louis et al., 2011). Debido a estas razones es posible postular que la secreción de CCL-2 por parte de los neutrófilos de manera activa durante el proceso de NETosis en un proceso inflamatorio desregulado puede llevar a posibles patologías por una infiltración no regulada.

CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

La pandemia causada por el COVID-19 afectó a millones de personas en todo el mundo y dejó a su paso numerosas víctimas fatales. Si bien la pandemia ya se dio por superada, es una realidad que la infección por SARS-CoV-2 no actúa como resfrío común y los reportes científicos son sólidos en demostrar los numerosos y diversos síntomas a largo plazo que ésta patología puede dejar. En este contexto, nuestra investigación realizada en población chilena da cuenta de la aparición de insulino resistencia en individuos que cursaron COVID-19 y que no presentaban alteraciones del metabolismo glucídico previo a la infección. Si bien ya son conocidos los efectos de la insulino resistencia a nivel de la salud de las personas, en este trabajo nos enfocamos en una relación con la respuesta inflamatoria, en particular la respuesta del neutrófilo mediada por NETosis. Es así, como nuestra investigación permite concluir que la desregulación en las vías mediadas por insulina post COVID-19, inducen una mayor producción de NETs por parte de los neutrófilos tanto *ex vivo*, como *in vitro*. Esta respuesta exacerbada podría favorecer la aparición de trombos debido a que los NETs inhiben los anticoagulantes naturales, además de promover daño renal y la aparición de enfermedades autoinmunes. Por otra parte, la actividad exacerbada del neutrófilo a nivel basal afectaría su correcto funcionamiento frente a estímulos patogénicos, como virus y bacterias. Si bien los componentes inflamatorios han sido propuestos como ejes claves en la regulación de la NETosis, demostramos

que la insulina tiene un factor más preponderante y asociado con altos niveles de glucosa, pueden llegar a ser claves en la estimulación de las vías moleculares asociadas a la formación de NETs. Por lo tanto, consideramos de alta relevancia, controlar clínicamente y con los cuidados respectivos en los que respecta a los hábitos de salud, a todas las alteraciones del metabolismo glucídico que se generen post COVID-19, a modo de evitar futuras patologías más complejas e irreversibles como la diabetes mellitus tipo 2 y sus patologías derivadas. Por otro lado, correcta una regulación en los niveles de insulina en los individuos, permitiría a su vez regular la actividad netótica del neutrófilo, evitando la formación de NETs en exceso, que puedan llegar a causar más daño que beneficio en un contexto de patologías derivadas de la infección por SARS-CoV-2.

GLOSARIO

SARS: Síndrome Respiratorio Agudo Severo.

SARS-CoV-2: Coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo 2.

COVID-19: Enfermedad por Coronavirus 2019.

NETs: Trampas Extracelulares de Neutrófilo.

NE: Neutrófilo Elastasa.

MPO: Mieloperoxidasa.

NETosis: Muerte celular por NETs.

ARDS: Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo.

IR: Insulino Resistencia.

T2DM: Diabetes Mellitus Tipo 2.

HOMA-IR: Modelo Homeostático de Evaluación de Resistencia a la Insulina.

PMN: Polimorfonucleares.

BALF: Fluido de lavado broncoalveolar.

CT: Tomografía computarizada.

BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, E., Carmody, A., Shenkar, R., & Arcaroli, J. (2000). Neutrophils as early immunologic effectors in hemorrhage- or endotoxemia-induced acute lung injury. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279(6), L1137-L1145. doi:10.1152/ajplung.2000.279.6.L1137
- Adrover, J. M., Aroca-Crevillen, A., Crainiciuc, G., Ostos, F., Rojas-Vega, Y., Rubio-Ponce, A., . . . Hidalgo, A. (2020). Programmed 'disarming' of the neutrophil proteome reduces the magnitude of inflammation. *Nat Immunol*, 21(2), 135-144. doi:10.1038/s41590-019-0571-2
- Almadhi, M. A., Abdulrahman, A., Alawadhi, A., Rabaan, A. A., Atkin, S., & AlQahtani, M. (2021). The effect of ABO blood group and antibody class on the risk of COVID-19 infection and severity of clinical outcomes. *Scientific Reports*, 11(1), 5745. doi:10.1038/s41598-021-84810-9
- Amini, P., Stojkov, D., Felser, A., Jackson, C. B., Courage, C., Schaller, A., . . . Simon, H.-U. (2018). Neutrophil extracellular trap formation requires OPA1-dependent glycolytic ATP production. *Nature Communications*, 9(1), 2958. doi:10.1038/s41467-018-05387-y
- Andrew, E. W., Ricardo, J. J., Paul, F. M., David, B., Dhruv, P., David, R. T., . . . Rachel, C. C. (2017). Evidence for chemokine synergy during neutrophil migration in ARDS. *Thorax*, 72(1), 66. doi:10.1136/thoraxjnl-2016-208597
- Barbu, E. A., Mendelsohn, L., Samsel, L., & Thein, S. L. (2020). Pro-inflammatory cytokines associate with NETosis during sickle cell vaso-occlusive crises. *Cytokine*, 127, 154933. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154933>
- Bastug, A., Bodur, H., Erdogan, S., Gokcinar, D., Kazancioglu, S., Kosovali, B. D., . . . Yilmaz, F. M. (2020). Clinical and laboratory features of COVID-19: Predictors of severe prognosis. *International Immunopharmacology*, 88, 106950. doi:<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106950>
- Blidberg, K., Palmberg, L., Dahlén, B., Lantz, A.-S., & Larsson, K. (2012). Chemokine release by neutrophils in chronic obstructive pulmonary disease. *Innate Immunity*, 18(3), 503-510. doi:10.1177/1753425911423270
- Bonow, R. O., Fonarow, G. C., O'Gara, P. T., & Yancy, C. W. (2020). Association of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) With Myocardial Injury and Mortality. *JAMA Cardiol*, 5(7), 751-753. doi:10.1001/jamacardio.2020.1105
- Bonyek-Silva, I., Cerqueira-Silva, T., Nunes, S., Machado, A. F. A., Cruz, M. R. S., Pereira, B., . . . Tavares, N. M. (2022). Prediabetes Induces More Severe Acute COVID-19 Associated With IL-6 Production Without Worsening Long-Term Symptoms. *Frontiers in Endocrinology*, 13. doi:10.3389/fendo.2022.896378
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., . . . Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303(5663), 1532-1535. doi:10.1126/science.1092385

- Brodin, P. (2021). Immune determinants of COVID-19 disease presentation and severity. *Nature Medicine*, 27(1), 28-33. doi:10.1038/s41591-020-01202-8
- Brufsky, A. (2020). Hyperglycemia, hydroxychloroquine, and the COVID-19 pandemic. *Journal of Medical Virology*, 92(7), 770-775. doi:<https://doi.org/10.1002/jmv.25887>
- Cai, Q., Huang, D., Yu, H., Zhu, Z., Xia, Z., Su, Y., . . . Xu, L. (2020). COVID-19: Abnormal liver function tests. *J Hepatol*, 73(3), 566-574. doi:10.1016/j.jhep.2020.04.006
- Chen, L., Wang, G., Tan, J., Cao, Y., Long, X., Luo, H., . . . Zhou, J. (2020). Scoring cytokine storm by the levels of MCP-3 and IL-8 accurately distinguished COVID-19 patients with high mortality. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 292. doi:10.1038/s41392-020-00433-y
- Chen, M., Zhu, B., Chen, D., Hu, X., Xu, X., Shen, W.-J., . . . Qu, S. (2021). COVID-19 May Increase the Risk of Insulin Resistance in Adult Patients Without Diabetes: A 6-Month Prospective Study. *Endocrine Practice*, 27(8), 834-841. doi:<https://doi.org/10.1016/j.eprac.2021.04.004>
- Clancy, D. M., Sullivan, G. P., Moran, H. B. T., Henry, C. M., Reeves, E. P., McElvaney, N. G., . . . Martin, S. J. (2018). Extracellular Neutrophil Proteases Are Efficient Regulators of IL-1, IL-33, and IL-36 Cytokine Activity but Poor Effectors of Microbial Killing. *Cell Reports*, 22(11), 2937-2950. doi:10.1016/j.celrep.2018.02.062
- Coomes, E. A., & Haghbayan, H. (2020). Interleukin-6 in Covid-19: A systematic review and meta-analysis. *Reviews in Medical Virology*, 30(6), e2141. doi:<https://doi.org/10.1002/rmv.2141>
- Corrao, S., Pinelli, K., Vacca, M., Raspanti, M., & Argano, C. (2021). Type 2 Diabetes Mellitus and COVID-19: A Narrative Review. *Frontiers in Endocrinology*, 12. doi:10.3389/fendo.2021.609470
- Curi, R., Levada-Pires, A. C., Silva, E. B. D., Poma, S. O., Zambonato, R. F., Domenech, P., . . . Pithon-Curi, T. C. (2020). The Critical Role of Cell Metabolism for Essential Neutrophil Functions. *Cell Physiol Biochem*, 54(4), 629-647. doi:10.33594/000000245
- Del Valle, D. M., Kim-Schulze, S., Huang, H.-H., Beckmann, N. D., Nirenberg, S., Wang, B., . . . Gnjatic, S. (2020). An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nature Medicine*, 26(10), 1636-1643. doi:10.1038/s41591-020-1051-9
- Du, J., Zhang, J., Chen, X., Zhang, S., Zhang, C., Liu, H., . . . Shi, J. (2022). Neutrophil extracellular traps induced by pro-inflammatory cytokines enhance procoagulant activity in NASH patients. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 46(1), 101697. doi:<https://doi.org/10.1016/j.clinre.2021.101697>
- Evans, R. A., Leavy, O. C., Richardson, M., Elneima, O., McAuley, H. J. C., Shikotra, A., . . . Zongo, O. (2022). Clinical characteristics with inflammation profiling of long COVID and association with 1-year recovery following hospitalisation in the UK: a prospective observational study. *The*

- Lancet Respiratory Medicine*, 10(8), 761-775.
doi:[https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(22\)00127-8](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(22)00127-8)
- Fuchs, T. A., Brill, A., Duerschmied, D., Schatzberg, D., Monestier, M., Myers, D. D., Jr., . . . Wagner, D. D. (2010). Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(36), 15880-15885. doi:10.1073/pnas.1005743107
- Govender, N., Khaliq, O. P., Moodley, J., & Naicker, T. (2021). Insulin resistance in COVID-19 and diabetes. *Primary Care Diabetes*, 15(4), 629-634. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pcd.2021.04.004>
- Grommes, J., & Soehnlein, O. (2011). Contribution of neutrophils to acute lung injury. *Mol Med*, 17(3-4), 293-307. doi:10.2119/molmed.2010.00138
- Guasp, M., Muñoz-Sánchez, G., Martínez-Hernández, E., Santana, D., Carbayo, Á., Naranjo, L., . . . , T. B. N.-C. S. G. (2022). CSF Biomarkers in COVID-19 Associated Encephalopathy and Encephalitis Predict Long-Term Outcome. *Frontiers in Immunology*, 13. doi:10.3389/fimmu.2022.866153
- Guillotin, F., Fortier, M., Portes, M., Demattei, C., Mousty, E., Nouvellon, E., . . . Bouvier, S. (2023). Vital NETosis vs. suicidal NETosis during normal pregnancy and preeclampsia. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10. doi:10.3389/fcell.2022.1099038
- Guo, W., Li, M., Dong, Y., Zhou, H., Zhang, Z., Tian, C., . . . Hu, D. (2020). Diabetes is a risk factor for the progression and prognosis of COVID-19. *Diabetes Metab Res Rev*, e3319. doi:10.1002/dmrr.3319
- Hayden, M. R. (2020). An Immediate and Long-Term Complication of COVID-19 May Be Type 2 Diabetes Mellitus: The Central Role of β -Cell Dysfunction, Apoptosis and Exploration of Possible Mechanisms. *Cells*, 9(11), 2475. doi:10.3390/cells9112475
- Heidarpour, M., Abhari, A. P., Sadeghpour, N., Shafie, D., & Sarokhani, D. (2021). Prediabetes and COVID-19 severity, an underestimated risk factor: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 15(6), 102307. doi:<https://doi.org/10.1016/j.dsx.2021.102307>
- Hidalgo, A., Libby, P., Soehnlein, O., Aramburu, I. V., Papayannopoulos, V., & Silvestre-Roig, C. (2021). Neutrophil extracellular traps: from physiology to pathology *Cardiovascular Research*, 118(13), 2737-2753. doi:10.1093/cvr/cvab329
- Hoiland, R. L., Fergusson, N. A., Mitra, A. R., Griesdale, D. E. G., Devine, D. V., Stukas, S., . . . Sekhon, M. S. (2020). The association of ABO blood group with indices of disease severity and multiorgan dysfunction in COVID-19. *Blood Advances*, 4(20), 4981-4989. doi:10.1182/bloodadvances.2020002623
- Hu, B., Huang, S., & Yin, L. (2021). The cytokine storm and COVID-19. *Journal of Medical Virology*, 93(1), 250-256. doi:<https://doi.org/10.1002/jmv.26232>
- Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., . . . Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China.

- The Lancet*, 395(10223), 497-506. doi:[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
- Huang, K., Liang, Y., Ma, Y., Wu, J., Luo, H., & Yi, B. (2022). The Variation and Correlation of Serum Adiponectin, Nesfatin-1, IL-6, and TNF- α Levels in Prediabetes. *Frontiers in Endocrinology*, 13. doi:10.3389/fendo.2022.774272
- Hunt, R. H., East, J. E., Lanas, A., Malfertheiner, P., Satsangi, J., Scarpignato, C., & Webb, G. J. (2021). COVID-19 and Gastrointestinal Disease: Implications for the Gastroenterologist. *Digestive Diseases*, 39(2), 119-139. doi:10.1159/000512152
- Injarabian, L., Devin, A., Ransac, S., & Marteyn, B. S. (2020). Neutrophil Metabolic Shift during Their Lifecycle: Impact on Their Survival and Activation. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1), 287. Retrieved from <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/1/287>
- Jean Louis, F., Sébastien, L., Fabrizio, M., Sabine, S., Katia, G., Graziano, P., . . . Antoine, H. (2011). Role of CCL-2, CCR-2 and CCR-4 in cerulein-induced acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *Journal of Clinical Pathology*, 64(5), 387. doi:10.1136/jcp.2010.088500
- Jorch, S. K., & Kubes, P. (2017). An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nature Medicine*, 23(3), 279-287. doi:10.1038/nm.4294
- Kappelmann, N., Dantzer, R., & Khandaker, G. M. (2021). Interleukin-6 as potential mediator of long-term neuropsychiatric symptoms of COVID-19. *Psychoneuroendocrinology*, 131, 105295. doi:<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2021.105295>
- Kawai, T., & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*, 11(5), 373-384. doi:10.1038/ni.1863
- Keshari, R. S., Jyoti, A., Dubey, M., Kothari, N., Kohli, M., Bogra, J., . . . Dikshit, M. (2012). Cytokines Induced Neutrophil Extracellular Traps Formation: Implication for the Inflammatory Disease Condition. *PLOS ONE*, 7(10), e48111. doi:10.1371/journal.pone.0048111
- Kirtipal, N., Bharadwaj, S., & Kang, S. G. (2020). From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. *Infection, Genetics and Evolution*, 85, 104502. doi:<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104502>
- Kolaczowska, E., & Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 13(3), 159-175. doi:10.1038/nri3399
- Kumar, S., & Dikshit, M. (2019). Metabolic Insight of Neutrophils in Health and Disease. *Front Immunol*, 10, 2099. doi:10.3389/fimmu.2019.02099
- Lai, C. C., Shih, T. P., Ko, W. C., Tang, H. J., & Hsueh, P. R. (2020). Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus

- disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges. *Int J Antimicrob Agents*, 55(3), 105924. doi:10.1016/j.ijantimicag.2020.105924
- Lampasona, V., Secchi, M., Scavini, M., Bazzigaluppi, E., Brigatti, C., Marzinotto, I., . . . Piemonti, L. (2020). Antibody response to multiple antigens of SARS-CoV-2 in patients with diabetes: an observational cohort study. *Diabetologia*, 63(12), 2548-2558. doi:10.1007/s00125-020-05284-4
- Lei, S., Jiang, F., Su, W., Chen, C., Chen, J., Mei, W., . . . Xia, Z. (2020). Clinical characteristics and outcomes of patients undergoing surgeries during the incubation period of COVID-19 infection. *EClinicalMedicine*, 21, 100331. doi:<https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2020.100331>
- Li, H., Tian, S., Chen, T., Cui, Z., Shi, N., Zhong, X., . . . Zheng, J. (2020). Newly diagnosed diabetes is associated with a higher risk of mortality than known diabetes in hospitalized patients with COVID-19. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 22(10), 1897-1906. doi:<https://doi.org/10.1111/dom.14099>
- Liew, P. X., & Kubes, P. (2019). The Neutrophil's Role During Health and Disease. *Physiological Reviews*, 99(2), 1223-1248. doi:10.1152/physrev.00012.2018
- Liu, Y., Du, X., Chen, J., Jin, Y., Peng, L., Wang, H. H. X., . . . Zhao, Y. (2020). Neutrophil-to-lymphocyte ratio as an independent risk factor for mortality in hospitalized patients with COVID-19. *J Infect*, 81(1), e6-e12. doi:10.1016/j.jinf.2020.04.002
- Logette, E., Lorin, C., Favreau, C., Oshurko, E., Coggan, J. S., Casalegno, F., . . . Markram, H. (2021). A Machine-Generated View of the Role of Blood Glucose Levels in the Severity of COVID-19. *Frontiers in Public Health*, 9(1068). doi:10.3389/fpubh.2021.695139
- Lv, Y., Zhang, T., Cai, J., Huang, C., Zhan, S., & Liu, J. (2022). Bioinformatics and systems biology approach to identify the pathogenetic link of Long COVID and Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome. *Frontiers in Immunology*, 13. doi:10.3389/fimmu.2022.952987
- Manzenreiter, R., Kienberger, F., Marcos, V., Schilcher, K., Krautgartner, W. D., Obermayer, A., . . . Hartl, D. (2012). Ultrastructural characterization of cystic fibrosis sputum using atomic force and scanning electron microscopy. *J Cyst Fibros*, 11(2), 84-92. doi:10.1016/j.jcf.2011.09.008
- Marhl, M., Grubelnik, V., Magdič, M., & Markovič, R. (2020). Diabetes and metabolic syndrome as risk factors for COVID-19. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 14(4), 671-677. doi:<https://doi.org/10.1016/j.dsx.2020.05.013>
- Melero, I., Villalba-Esparza, M., Recalde-Zamacona, B., Jiménez-Sánchez, D., Teijeira, Á., Argueta, A., . . . de Andrea, C. E. (2022). Neutrophil Extracellular Traps, Local IL-8 Expression, and Cytotoxic T-Lymphocyte Response in the Lungs of Patients With Fatal COVID-19. *Chest*, 162(5), 1006-1016. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chest.2022.06.007>
- Montefusco, L., Ben Nasr, M., D'Addio, F., Loretelli, C., Rossi, A., Pastore, I., . . . Fiorina, P. (2021). Acute and long-term disruption of glycometabolic control

- after SARS-CoV-2 infection. *Nature Metabolism*, 3(6), 774-785. doi:10.1038/s42255-021-00407-6
- Muñiz-Diaz, E., Llopis, J., Parra, R., Roig, I., Ferrer, G., Grifols, J., . . . Contreras, E. (2021). Relationship between the ABO blood group and COVID-19 susceptibility, severity and mortality in two cohorts of patients. *Blood Transfus*, 19(1), 54-63. doi:10.2450/2020.0256-20
- Phipps, M. M., Barraza, L. H., LaSota, E. D., Sobieszczyk, M. E., Pereira, M. R., Zheng, E. X., . . . Verna, E. C. (2020). Acute Liver Injury in COVID-19: Prevalence and Association with Clinical Outcomes in a Large U.S. Cohort. *Hepatology*, 72(3), 807-817. doi:10.1002/hep.31404
- Potere, N., Batticciotto, A., Vecchié, A., Porreca, E., Cappelli, A., Abbate, A., . . . Bonaventura, A. (2021). The role of IL-6 and IL-6 blockade in COVID-19. *Expert Review of Clinical Immunology*, 17(6), 601-618. doi:10.1080/1744666X.2021.1919086
- Qin, C., Zhou, L., Hu, Z., Zhang, S., Yang, S., Tao, Y., . . . Tian, D. S. (2020). Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clin Infect Dis*, 71(15), 762-768. doi:10.1093/cid/ciaa248
- Queiroz, M. A. F., Neves, P. F. M. d., Lima, S. S., Lopes, J. d. C., Torres, M. K. d. S., Vallinoto, I. M. V. C., . . . Vallinoto, A. C. R. (2022). Cytokine Profiles Associated With Acute COVID-19 and Long COVID-19 Syndrome. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. doi:10.3389/fcimb.2022.922422
- Rabaan, A. A., Al-Ahmed, S. H., Haque, S., Sah, R., Tiwari, R., Malik, Y. S., . . . Rodriguez-Morales, A. J. (2020). SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV: A comparative overview. *Infez Med*, 28(2), 174-184. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32275259>
- Reiterer, M., Rajan, M., Gómez-Banoy, N., Lau, J. D., Gomez-Escobar, L. G., Ma, L., . . . Lo, J. C. (2021). Hyperglycemia in acute COVID-19 is characterized by insulin resistance and adipose tissue infectivity by SARS-CoV-2. *Cell Metabolism*, 33(11), 2174-2188.e2175. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.09.009>
- Ren, H., Yang, Y., Wang, F., Yan, Y., Shi, X., Dong, K., . . . Zhang, S. (2020). Association of the insulin resistance marker TyG index with the severity and mortality of COVID-19. *Cardiovascular Diabetology*, 19(1), 58. doi:10.1186/s12933-020-01035-2
- Roca-Ho, H., Riera, M., Palau, V., Pascual, J., & Soler, M. J. (2017). Characterization of ACE and ACE2 Expression within Different Organs of the NOD Mouse. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3), 563. Retrieved from <https://www.mdpi.com/1422-0067/18/3/563>
- Rodriguez-Espinosa, O., Rojas-Espinosa, O., Moreno-Altamirano, M. M., Lopez-Villegas, E. O., & Sanchez-Garcia, F. J. (2015). Metabolic requirements for neutrophil extracellular traps formation. *Immunology*, 145(2), 213-224. doi:10.1111/imm.12437

- Shelton, J. F., Shastri, A. J., Ye, C., Weldon, C. H., Filshtein-Sonmez, T., Coker, D., . . . The 23andMe, C.-T. (2021). Trans-ancestry analysis reveals genetic and nongenetic associations with COVID-19 susceptibility and severity. *Nature Genetics*, 53(6), 801-808. doi:10.1038/s41588-021-00854-7
- Smith, S. M., Boppana, A., Traupman, J. A., Unson, E., Maddock, D. A., Chao, K., . . . Connor, R. I. (2021). Impaired glucose metabolism in patients with diabetes, prediabetes, and obesity is associated with severe COVID-19. *Journal of Medical Virology*, 93(1), 409-415. doi:<https://doi.org/10.1002/jmv.26227>
- Sourij, H., Aziz, F., Bräuer, A., Ciardi, C., Clodi, M., Fasching, P., . . . group, f. t. C.-i. d. i. A. s. (2021). COVID-19 fatality prediction in people with diabetes and prediabetes using a simple score upon hospital admission. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 23(2), 589-598. doi:<https://doi.org/10.1111/dom.14256>
- Soy, M., Keser, G., Atagündüz, P., Tabak, F., Atagündüz, I., & Kayhan, S. (2020). Cytokine storm in COVID-19: pathogenesis and overview of anti-inflammatory agents used in treatment. *Clinical Rheumatology*, 39(7), 2085-2094. doi:10.1007/s10067-020-05190-5
- Stephens, J. W., Hurel, S. J., Lowe, G. D. O., Rumley, A., & Humphries, S. E. (2007). Association between plasma IL-6, the IL6 -174G>C gene variant and the metabolic syndrome in type 2 diabetes mellitus. *Molecular Genetics and Metabolism*, 90(4), 422-428. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2006.10.004>
- Sun, S., Cai, X., Wang, H., He, G., Lin, Y., Lu, B., . . . Hu, X. (2020). Abnormalities of peripheral blood system in patients with COVID-19 in Wenzhou, China. *Clinica Chimica Acta*, 507, 174-180. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.04.024>
- Szlachcic, W. J., Dabrowska, A., Milewska, A., Ziojła, N., Blaszczyk, K., Barreto-Duran, E., . . . Borowiak, M. (2022). SARS-CoV-2 infects an *in vitro* model of the human developing pancreas through endocytosis. *iScience*, 25(7). doi:10.1016/j.isci.2022.104594
- Tian, S., Xiong, Y., Liu, H., Niu, L., Guo, J., Liao, M., & Xiao, S.-Y. (2020). Pathological study of the 2019 novel coronavirus disease (COVID-19) through postmortem core biopsies. *Modern Pathology*, 33(6), 1007-1014. doi:10.1038/s41379-020-0536-x
- Tiftikcioglu, B. I., Duksal, T., Bilgin, S., Kose, S., & Zorlu, Y. (2016). Association between the Levels of IL-6, sE-Selectin and Distal Sensory Nerve Conduction Studies in Patients with Prediabetes. *European Neurology*, 75(3-4), 124-131. doi:10.1159/000444661
- Wang, D., Hu, B., Hu, C., Zhu, F., Liu, X., Zhang, J., . . . Peng, Z. (2020). Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA*, 323(11), 1061-1069. doi:10.1001/jama.2020.1585

- Wang, L., Zhou, X., Yin, Y., Mai, Y., Wang, D., & Zhang, X. (2019). Hyperglycemia Induces Neutrophil Extracellular Traps Formation Through an NADPH Oxidase-Dependent Pathway in Diabetic Retinopathy. *Frontiers in Immunology*, 9(3076). doi:10.3389/fimmu.2018.03076
- Wang, Y., Liu, S., Liu, H., Li, W., Lin, F., Jiang, L., . . . Zhao, J. (2020). SARS-CoV-2 infection of the liver directly contributes to hepatic impairment in patients with COVID-19. *J Hepatol*, 73(4), 807-816. doi:10.1016/j.jhep.2020.05.002
- Wang, Z., Yang, B., Li, Q., Wen, L., & Zhang, R. (2020). Clinical Features of 69 Cases With Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China. *Clinical Infectious Diseases*, 71(15), 769-777. doi:10.1093/cid/ciaa272
- Williams, E. S., Martins, T. B., Shah, K. S., Hill, H. R., Coiras, M., Spivak, A. M., & Planelles, V. (2022). Cytokine Deficiencies in Patients with Long-COVID. *J Clin Cell Immunol*, 13(6).
- Wu, B.-B., Gu, D.-Z., Yu, J.-N., Yang, J., & Shen, W.-Q. (2020). Association between ABO blood groups and COVID-19 infection, severity and demise: A systematic review and meta-analysis. *Infection, Genetics and Evolution*, 84, 104485. doi:<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104485>
- Wu, C.-T., Lidsky, P. V., Xiao, Y., Lee, I. T., Cheng, R., Nakayama, T., . . . Jackson, P. K. (2021). SARS-CoV-2 infects human pancreatic β cells and elicits β cell impairment. *Cell Metabolism*, 33(8), 1565-1576.e1565. doi:10.1016/j.cmet.2021.05.013
- Wu, C., Chen, X., Cai, Y., Xia, J., Zhou, X., Xu, S., . . . Song, Y. (2020). Risk Factors Associated With Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients With Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern Med*, 180(7), 934-943. doi:10.1001/jamainternmed.2020.0994
- Xu, J., Zhang, X., Pelayo, R., Monestier, M., Ammollo, C. T., Semeraro, F., . . . Esmon, C. T. (2009). Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med*, 15(11), 1318-1321. doi:10.1038/nm.2053
- Yang, J., Zheng, Y., Gou, X., Pu, K., Chen, Z., Guo, Q., . . . Zhou, Y. (2020). Prevalence of comorbidities and its effects in patients infected with SARS-CoV-2: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Infectious Diseases*, 94, 91-95. doi:10.1016/j.ijid.2020.03.017
- Yang, J. K., Lin, S. S., Ji, X. J., & Guo, L. M. (2010). Binding of SARS coronavirus to its receptor damages islets and causes acute diabetes. *Acta Diabetol*, 47(3), 193-199. doi:10.1007/s00592-009-0109-4
- Yousefi, S., Stojkov, D., Germic, N., Simon, D., Wang, X., Benarafa, C., & Simon, H.-U. (2019). Untangling "NETosis" from NETs. *European Journal of Immunology*, 49(2), 221-227. doi:<https://doi.org/10.1002/eji.201747053>
- Zhou, F., Yu, T., Du, R., Fan, G., Liu, Y., Liu, Z., . . . Cao, B. (2020). Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*, 395(10229), 1054-1062. doi:10.1016/S0140-6736(20)30566-3

Zuo, Y., Yalavarthi, S., Shi, H., Gockman, K., Zuo, M., Madison, J. A., . . . Knight, J. S. (2020). Neutrophil extracellular traps (NETs) as markers of disease severity in COVID-19. *medRxiv*. doi:10.1101/2020.04.09.20059626

ANEXOS

1-A Consentimiento informado



N° 98

Ref.: Respuesta Solicitud de Aprobación Protocolo
**“Neumonía Viral Secundaria a Corona Virus en el
Complejo Asistencial Dr. Víctor Ríos Ruiz”**

Los Ángeles, 06 de Abril de 2020

A: Investigador Principal Sr. Gonzalo Labarca Trucios

DE: Comité Ético de Investigación

Estimado Investigador:

El Comité Ético Científico del Servicio de Salud Biobío, en su sesión ordinaria de fecha 26.03.2020 ha analizado los antecedentes remitidos por Ud. en relación a solicitud de aprobación protocolo en referencia, resolviendo lo siguiente:

1. **Valor del estudio:** La investigación aportara nuevos antecedentes sobre los atributos clínicos del COVID-19, perfiles demográficos de los pacientes con diagnóstico de neumonía, desenlaces a corto y largo plazo según nivel de severidad del cuadro. Acumulando evidencia objetiva, que a futuro contribuirá a reforzar las medidas de prevención primaria y de manejo posterior de pacientes hospitalizados con diagnóstico de neumonía secundario a Covid-19 en un establecimiento de salud pública a nivel local.
1. **Validez científica:** Estudio observacional, prospectivo de corte transversal.
2. **Discriminación arbitraria:** Se ajusta a criterios de inclusión y exclusión delimitados en el marco de la investigación.
3. **Relación riesgo-beneficio:** La probabilidad de que ocurra un efecto nocivo a consecuencia de la implementación de la investigación es baja.
4. **Consentimiento informado:** Se debe ajustar a lo indicado los artículos 8°, 10°, 14° y 15° de la Ley N° 20.584 sobre consentimiento informado (CI) con sus exigencias y excepciones y el Derecho de las personas a decidir informadamente.



EN CONSECUENCIA,

En virtud de los antecedentes tenidos a la vista, y toda vez que el procedimiento puesto en marcha, se ajuste a los artículos mencionados en el punto 4, este Comité ha resuelto "aprobar" la realización del protocolo de investigación en referencia.

Tomó conocimiento de:

- ✓ Formulario Acceso CEC.
- ✓ Protocolo de Investigación.
- ✓ Consentimiento Informado.
- ✓ Carta de autorización de: Director Complejo Asistencial Dr. Víctor Ríos Ruiz.
- ✓ Currículo Vitae Investigador Principal.

Sin otro particular, les saluda muy atentamente,

**CARLOS VILLARROEL INOSTROZA
PRESIDENTE
COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO**

En respuesta a su solicitud el CEC (Comité Ético Científico) se reunió en sesión ordinaria con fecha 26.03.2020 estando presente Dr. Carlos Villarroel, A.S (MC) Patricia Messenger, E.U. Cecilia Alvarado y B.Q. Felipe Riquelme.

DISTRIBUCION:

- Interesado.
- Archivo

Certificado UdeC cumplimiento de normas y bioética.



Universidad de Concepción
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo
Comité de Ética, Bioética y Bioseguridad

CEBB 676-2020.

Concepción, julio de 2020.

CERTIFICADO

El Comité de Ética, Bioética y Bioseguridad de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Concepción ha revisado el **PROYECTO CÓDIGO COVID1005**, adjudicado en la **CONVOCATORIA DE LA SUBDIRECCIÓN DE REDES, ESTRATEGIA Y CONOCIMIENTO - AGENCIA NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO 2020**, titulado **“EL EFECTO COLATERAL DE LA DEFENSA FRENTE AL COVID-19: ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA Y SU ASOCIACIÓN CON UN POTENCIAL DAÑO PULMONAR EN PACIENTES RECUPERADOS QUE CURSARON COVID-19 SEVERO, MODERADO Y ASINTOMÁTICO”**, presentado por la **DRA. ESTEFANÍA NOVA LAMPERTI**, en calidad de Investigadora Responsable, académica adscrita al Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción, comprobando que cumple con las normas y principios éticos y bioéticos y con los procedimientos de bioseguridad, establecidos nacional e internacionalmente para investigación científica que contempla manipulación de material biológico de origen humano (sangre) y sus residuos, tanto biológicos como químicos, así también datos de salud.

Considerando que los casos de personas con infección por SARS-CoV-2 leve o moderada y los casos de pacientes hospitalizados con infecciones severas en nuestra población chilena es relevante en el contexto actual de emergencia sanitaria por la pandemia declarada por la Organización Mundial de la Salud (marzo/2020), los estudios contemplados en el marco de este proyecto de investigación suponen analizar la respuesta inmune efectiva a SARS-CoV-2 en pacientes recuperados a COVID-19 a 1, 2 y 10 meses post infección. Para esto buscará determinar la asociación entre mecanismos inmunológicos humorales y celulares y parámetros inflamatorios sistémicos con un potencial daño pulmonar a corto y mediano plazo en una cohorte de pacientes que cursaron COVID-19 con cuadro asintomático, moderado o severo, conforme se indica como objetivo general.

El desarrollo metodológico del **PROYECTO CÓDIGO COVID1005** detalla de manera rigurosa la ejecución de las actividades descritas en 05 (cinco) objetivos específicos, a saber: inicialmente pretende medir el título y la especificidad de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 de clase IgG/IgM en una cohorte de 50 pacientes recuperados de COVID-19 a 1, 2 y 10 meses post infección; después prevé analizar la activación molecular y la producción de citoquinas de neutrófilos, monocitos y linfocitos B en esta muestra de pacientes recuperados para, a continuación, determinar los parámetros sistémicos de inflamación de la misma muestra; con los datos obtenidos propone evaluar la función pulmonar y la progresión del estado

Barrio Universitario s/n,
Edificio Empreudec
Fono (56-41) 2204302
Casilla 160 C - Correo 3, secrevrid@udec.cl
Concepción, Chile



100 AÑOS
DE
DESARROLLO
LIBRE DEL
ESPIRITU





Universidad de Concepción
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo
Comité de Ética, Bioética y Bioseguridad

de salud de los pacientes para, finalmente, asociar los parámetros inmunológicos humorales y celulares y parámetros sistémicos de inflamación con la severidad de la patología cursada y un potencial daño pulmonar en la muestra de pacientes.

En este estudio para identificar la asociación entre parámetros inflamatorios celulares y sistémicos y su relación con el daño pulmonar a 1, 2 y 10 meses post-infección, la participación de cada sujeto – pacientes mayores de 18 años, cuya atención fue realizada en el Centro de Salud Familiar (CESFAM) de Hualqui y en el Complejo Asistencial “Dr. Víctor Ríos Ruiz”, de Los Ángeles (Provincia de Concepción y del Biobío), que desarrollaron COVID-19 asintomático (n=10), moderado (n=20) o severo (n=20), provenientes del sistema público como privado, urbano y rural, además de controles sanos (n=10) desde el Laboratorio Clínico PreveGen de Concepción- estará basada en el proceso de Consentimiento Informado. Este proceso será documentado, conforme modelo presentado a este Comité institucional, y regularmente firmado.

Para el estudio, observacional de carácter básico-traslacional, se requiere la obtención de datos clínicos y por esto se realizará la toma de muestra de sangre de los participantes, las que se utilizarán para hemograma, inmunofenotipo y ensayos funcionales, y la fracción de suero, para medir anticuerpos y parámetros sistémicos de inflamación. Aún considera el estudio de la función respiratoria y evolución clínica que se realizará mediante un examen por tomografía computarizada de torax de alta resolución, espirometría basal y posterior a broncodilatación. Además, se entregarán encuestas generales del estado de salud con escala de depresión de BECK, escala de ansiedad y ánimo de HDAS y formulario de calidad de vida mediante *Saint George Respiratory Questionnaire*. Por último, prevé estudio de sueño con la escala de Epworth y una poligrafía respiratoria + Actigrafía.

Toda la información y los resultados de los estudios enmarcados en este **PROYECTO CÓDIGO COVID1005**, serán custodiados por la Investigadora Responsable, Dra. Estefanía Nova Lamperti.

La ejecución de las actividades descritas en el proyecto en pauta asegura que no vulnera los derechos y la dignidad de los participantes en el estudio, garantizando la autonomía, la libertad, la voluntariedad y la privacidad de los mismos, presentando para ello los métodos de protección que aseguran la confidencialidad de los datos de investigación y de custodia estricta de la información obtenida, observando todas las características formales y necesarias para su validez.

Todos los aspectos del trabajo metodológico, se encuentran detalladamente descritos en la propuesta del proyecto y las actividades serán realizadas por el personal científico, profesional y de apoyo del Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción y de las instituciones asociadas. El equipo de investigadores de la Universidad de Concepción cuenta con la calificación y destrezas necesarias para llevar a buen término los diferentes ensayos que se tiene contemplado, bajo la rigurosa aplicación de protocolos de trabajo establecidos y de carácter rutinario en las respectivas dependencias de nuestra Casa de Estudios superiores. Por tanto, si bien se utilizará material biológico y químico para los estudios previstos en la propuesta, su respectiva manipulación estará bajo los cuidados adecuados y necesarios, así como también observando las normas pertinentes.

Barrio Universitario s/n,
Edificio Empredec
Fono (56-41) 2204302
Casilla 160 C – Correo 3, secrevrid@udec.cl
Concepción, Chile



100 AÑOS
DE
DESARROLLO
LIBRE DEL
ESPIRITU





Universidad de Concepción
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo
Comité de Ética, Bioética y Bioseguridad

El tratamiento y disposición de los residuos biológicos y químicos generados en el desarrollo del presente proyecto dentro del Laboratorio de Inmunología Molecular e Translacional, en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción, proyecto de investigación titulado **“EL EFECTO COLATERAL DE LA DEFENSA FRENTE AL COVID-19: ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA Y SU ASOCIACIÓN CON UN POTENCIAL DAÑO PULMONAR EN PACIENTES RECUPERADOS QUE CURSARON COVID-19 SEVERO, MODERADO Y ASINTOMÁTICO”** observa los derechos asegurados en la Declaración Universal de los Derechos Humanos, los derechos y principios de la Declaración Universal sobre Bioética y Derechos Humanos, las Normas Éticas de la Organización Panamericana de la Salud para Investigaciones con Sujetos Humanos, la Constitución de la República de Chile, la Ley N° 20.120 “Sobre la Investigación Científica en el Ser Humano, su Genoma y Prohíbe la Clonación Humana”, la Ley N° 20.584 que “Regula los derechos y deberes que tienen las personas en relación con acciones vinculadas a su atención en salud” y la Ley N°19.628, “Sobre Protección de la Vida Privada”. Así también, sigue las Sugerencias para Escribir un Consentimiento Informado en Estudios con Personas, del Comité Asesor de Bioética FONDECYT/CONICYT. Además, cumple con el Manual de Normas de Bioseguridad y Riesgos Asociados (Versión 2018), normas formalizadas por la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica – CONICYT y adoptadas por la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo – ANID, con el Reglamento de Manejo de Residuos Peligrosos de la Vicerrectoría de Asuntos Económicos y Administrativos de la Universidad de Concepción y su respectivo Plan de Manejo de Sustancias y Residuos Peligrosos (MATPEL), así también con los principios y normas obligatorias delineadas con base en la Declaración de Singapur sobre la Integridad en la Investigación (2010) para investigadores de proyectos CONICYT, (conforme lo establecido por la Resolución Exenta N° 157, del 24 de enero de 2013) y no muestra elementos que puedan transgredir las normas y principios éticos rectores de nuestra Institución Universitaria, este Comité resuelve aprobarlo, confiriendo el presente Certificado.



DRA. M. ANDREA RODRÍGUEZ TASTETS
PRESIDENTA
COMITÉ DE ÉTICA, BIOÉTICA Y BIOSEGURIDAD
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

Barrio Universitario s/n,
Edificio Empreudec
Fono (56-41) 2204302
Casilla 160 C – Correo 3, secrevrid@udec.cl
Concepción, Chile



100 AÑOS
DE
DESARROLLO
LIBRE DEL
ESPIRITU

1-B Manejo de residuos

Eliminación de material con residuos biológicos, químicos o radioactivos.

Toda gestión, manejo, acopio temporal y eliminación de residuos provenientes del proyecto se registrarán por el manual de manejo de residuos peligrosos de la universidad de concepción y cumpliéndose el decreto supremo N°148/2003 – “Reglamento sanitario sobre manejo de residuos peligrosos”. Y siguiendo las indicaciones para el retiro por RESPEL.



CLASIFICACIÓN Y MANEJO DE RESIDUOS BIOLÓGICOS



Tipo de Residuo	Definición	Almacenamiento y Retiro	Contenedor o bolsa
Residuos biológicos (tipo 1)	Corresponden SOLO a tejidos humanos, restos de tejidos humanos, materiales contaminados con fluidos humanos (sangre, orina) y restos de animales contaminados con bacterias o virus patógenos.	Deben ser almacenados a temperaturas inferiores a 4°C hasta ser retirados por la unidad RESPEL o empresa externa*.	Bolsa de autoclave amarilla 
Residuos cortopunzantes biológicos (tipo 2)	Corresponden a materiales cortopunzantes (agujas, lancetas, hojas de bisturí, escalpelos) que se han utilizado con fluidos y tejidos humanos o en disecciones de animales contaminados con bacterias o virus patógenos.	Deben ser almacenados a temperaturas inferiores a 4°C hasta ser retirados por la unidad RESPEL o empresa externa*.	Caja cortopunzante amarilla 
Residuos bio-inertes (tipo 3)	Corresponden a animales o restos de animales de experimentación que NO están contaminados con bacterias o virus patógenos u otras sustancias peligrosas.	Deben ser almacenados en bolsas para residuos inertes color negro, resistente al volumen y peso del residuo, a temperaturas inferiores a 4°C hasta ser retiradas por la unidad RESPEL para su disposición final. En caso de que el residuo corresponda a una muestra preservada, se debe separar de la fracción líquida (ej. formalina, alcohol), la que debe ser almacenada como residuo químico.	Bolsa para residuos inertes color negro 
Residuos cortopunzantes inertes (tipo 4)	Corresponden a materiales cortopunzantes (agujas, lancetas, hojas de bisturí, escalpelos) que NO han estado en contacto con tejidos humanos, restos de tejidos humanos, fluidos humanos (sangre, orina), ni restos de animales contaminados con bacterias o virus patógenos.	Deben ser almacenados en contenedores plásticos de 4 u 8 kg, etiquetados como “Cortopunzante inerte”, hasta ser retirados por la unidad RESPEL para su disposición final	Contenedor plástico 4 u 8 kg 
Residuos microbiológicos (tipo 5)	Corresponden a materiales de cultivo que han estado en contacto con bacterias no patógenas y que han sido inactivados por esterilización con autoclave o por desinfección en un baño con solución de hipoclorito de sodio.	Deben ser entregados a la unidad RESPEL, SOLO después de ser inertizados mediante autoclave o desinfectados en un baño con solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 1 hora. En caso contrario, no se procederá con el retiro. La unidad RESPEL entregará bolsas de autoclave solo cuando éste sea el método utilizado de inactivación.	Bolsa de autoclave transparente o blanca (solo para autoclave) 

(*) El retiro desde la Facultad de Medicina, Facultad de Odontología, DISE y Centro RAI, será una vez a la semana a través de empresa externa Stericycle y la unidad RESPEL. El resto de las facultades que generen este tipo de residuos deberá gestionar retiro mensual a través de la unidad RESPEL.