



**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.

POR CAMILO DANIEL CABRERA GARCIA

Tesis presentada a la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción
para optar al título profesional de Bioquímico

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

Profesor co-guía: Dr. Gonzalo Labarca Trucios
Departamento Bioquímica Clínica e Inmunología
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Diciembre, 2021

Concepción, Chile

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

© 2021, Camilo Daniel Cabrera García

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a ANID por el financiamiento de esta tesis enmarcada en el proyecto COVID1005. A mis compañeros que me ayudaron en la realización de esta tesis 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 quien no sólo me apoyó y ofreció su guía académica sino se preocupó de mi bienestar personal durante todo el año.

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.	6
3.3 NETs y su importancia en el síndrome de distrés respiratorio agudo.	13
3.4 Control glicémico y severidad del COVID-19.	19
3.5 Hipótesis	27
3.6 Objetivo General	28
3.7 Objetivos específicos	28
4. MATERIALES Y MÉTODOS	29
4.1 Determinar las alteraciones del perfil del metabolismo glucídico en una cohorte de 60 pacientes que cursaron COVID-19 con distintos grados de severidad	29
4.1.1 Recolección de muestras	29
4.1.2 Etiquetado de muestras	30
4.2 Evaluar la NETosis en una cohorte de 60 pacientes que padecieron COVID-19 con distintos grados de severidad	31
4.2.1 Extracción de PMN por gradiente de ficoll	31
4.2.2 Cuantificación de NETosis mediante Live/Dead Dye y Sytox Blue por citometría de flujo.	32
4.3 Asociar la NETosis de la cohorte de 60 pacientes que cursaron COVID-19 con la severidad de la patología y las alteraciones del perfil del metabolismo glucídico.	34
4.3.1 Análisis de datos	34
5. RESULTADOS	36
5.1 Determinar las alteraciones del perfil del metabolismo glucídico en una cohorte de 60 pacientes que cursaron COVID-19 con distintos grados de severidad	36

5.2 Evaluar la NETosis en una cohorte de 60 pacientes que padecieron COVID-19 con distintos grados de severidad	72
5.3 Asociar la NETosis de la cohorte de 60 pacientes que cursaron COVID-19 con la severidad de la patología y las alteraciones del perfil del metabolismo glucídico.....	82
6. DISCUSIÓN	98
7. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES	105
8. GLOSARIO	107
9. BIBLIOGRAFÍA	108
10. ANEXOS	113
10.1 1-A Consentimiento informado	113
10.2 Certificado UdeC cumplimiento de normas y bioética.....	115
10.3 1-B Manejo de residuos	118

INDICE DE TABLAS

5-1 Descripción física de la cohorte de pacientes COVID-19.....	39
5-2 Descripción de la cohorte separada por sexo	41

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

3-1 Formación de NETs con distintas condiciones de cultivo.....	9
3-2 Inhibición farmacológica de la glicolisis y ATP sintasa.....	11
3-3 Esquema del proceso de formación de NETs	15
3-4 Presencia de NETs en suero agudo de pacientes COVID-19.....	18
3-5 Resultado de CT de pacientes con y sin diabetes	21
3-6 Seguimiento del índice TyG como marcador de insulino resistencia..	24
4-1 Esquema de separación de PMN mediante Polymorphprep.....	32
5-1 Descripción de la cohorte de 60 pacientes de COVID-19 del hospital Víctor Ríos-Ruiz	37
5-2 Distribución de grupos sanguíneos de cohorte de 50 pacientes COVID-19.....	43
5-3 Distribución de secuela pulmonares de pacientes COVID-19	45
5-4 Distribución de alteraciones del metabolismo glucídico en la cohorte de pacientes COVID-19.....	47
5-5 Comparación mediante ANOVA entre grupos de estudio en base a citoquinas	49
5-6 Comparación mediante ANOVA entre grupos de estudio en base a quimioquinas.....	53
5-7 Comparación mediante ANOVA entre grupos de estudio en base a proteínas de complemento	55
5-8 Comparación mediante ANOVA entre grupos de estudio en base a metabolismo glucídico	57
5-9 Comparación mediante ANOVA entre grupos de estudio en base a perfil bioquímico.....	60
5-10 Comparación mediante ANOVA entre grupos de estudio en base a perfil lipídico.....	62
5-11 Comparación mediante ANOVA entre grupos de estudio en base a perfil hepático	66

5-12 Comparación mediante ANOVA entre grupos de estudio en base a hemograma.....	69
5-13 Comparación mediante ANOVA entre grupos de estudio en base a anticuerpos anti-SARS-CoV-2.....	70
5-14 Estrategia de gatterring para cuantificación de NETs mediante citometría de flujo	73
5-15 Comparación mediante ANOVA entre grupos de estudio en base a NETosis	76
5-16 Imagen representativa de NETosis mediante Incucyte	78
5-17 Curva cinética de formación de NETs en neutrófilos sanos por exposición al plasma de pacientes en fase aguda	80
5-18 Curva cinética de formación de NETs en neutrófilos sanos por exposición al plasma de pacientes en fase secuelada.....	81
5-19 Análisis de correlación entre glicemia y %NETosis	83
5-20 Análisis de correlación entre insulina y %NETosis	85
5-21 Análisis de correlación entre HOMA-IR y %NETosis.....	87
5-22 Análisis de correlación entre IL-12 y %NETosis	89
5-23 Análisis de correlación entre TNF y %NETosis	91
5-24 Análisis de correlación entre IL-6 y %NETosis	93
5-25 Análisis de correlación entre IL-8 y %NETosis	95
5-26 Análisis de correlación entre IL-1 β y %NETosis	97

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 la pandemia el año 2020. Estudios recientes han demostrado que pacientes COVID-19 con peor pronóstico presentan una alta neutrofilia y la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETosis). Además, alteraciones en el metabolismo glucídico se han descrito como factores de riesgo de severidad en COVID-19 y como potencial 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. El objetivo de este trabajo fue analizar la NETosis de pacientes que padecieron COVID-19 y su relación con alteraciones del metabolismo glucídico. Parámetros del metabolismo glucídico como glicemia, insulina, HOMA-IR y la NETosis fueron medidos en 60 pacientes que cursaron con COVID-19. Los resultados revelaron que 19 pacientes tenían alteraciones metabólicas previo al COVID-19 y de los 41 pacientes que no presentaron esta comorbilidad, 26 pacientes desarrollaron insulinoresistencia (IR) 6 meses posterior al COVID-19. Al analizar la NETosis, se observó que los pacientes que desarrollaron IR a los 6 meses presentaron un aumento significativo de NETosis basal con respecto a los 2 grupos. Además, se observó un aumento de la NETosis de neutrófilos sanos expuestos al plasma de pacientes COVID-19 con

IR respecto a pacientes sin IR, lo que se correlacionó positivamente con los niveles de insulina en el plasma. En conclusión, existe un aumento de incidencia IR 6 meses-post-COVID-19 en pacientes sin alteraciones previas, los que además presentaron un aumento de NETosis vital basal y un aumento en la capacidad de inducir la formación de NETs en neutrófilos sanos.

ABSTRACT

The infectious Coronavirus disease 2019 (COVID-19) caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has been classified a pandemic during 2020. Recent studies have shown that COVID-19 patients with worse prognosis exhibit high neutrophilia and develop more neutrophil extracellular trap formation (NETosis). In addition, glucose metabolism alterations have been considered risk factor for severe COVID-19 and potential sequelae after infection. Regulation of the glucose metabolism is key 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 and the relationship between alterations in glucose metabolism and NETosis post COVID-19. Parameters of glucose metabolism such as glycemia, insulin, HOMA-IR and NETosis were measured in 60 patients, 6 months after COVID-19. The results revealed that 19 patients had metabolic alterations prior COVID-19 and from the 41 patients who did not present this comorbidity, 26 patients developed insulin resistance (IR) 6 months after COVID-19. NETosis was the analyzed, and patients who developed IR at 6 months presented a significant increment in baseline NETosis with than the other two groups. In addition, we observed higher percentages of NETosis in healthy neutrophils exposed to plasma from COVID-19 patients with IR compared to patients without IR, which correlated positively with the amount of insulin in

plasma. In conclusion, there is an increased incidence of IR 6 months-post-COVID-19 in patients without previous alterations, who also exhibited increased baseline NETosis and a higher potential to induce NETosis 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. 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 hemaglutinin-esterasa (HE). 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 (Liu et al., 2020; Marhl et al., 2020; Qin et al., 2020; D. Wang et al., 2020; Zhou et al., 2020).

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 estos completan su labor los macrófagos los eliminan y finaliza la respuesta inflamatoria (Kolaczowska & Kubes, 2013). Esto ocurre con normalidad en pacientes leves de COVID-19, y 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 de producción de neutrófilos y liberación a la sangre periférica (Liew & Kubes, 2019) y se puede observar también durante la patología severa de COVID-19. Los neutrófilos migran al alvéolo y ejercen su acción biológica fagocitando, liberando enzimas proteolíticas, produciendo especies reactivas de oxígeno (ROS) y realizar la muerte celular por trampas extracelulares de neutrófilos (NETosis) (Kolaczowska & Kubes, 2013). Para llevar a cabo estos efectos usa un metabolismo que depende de su mayoría de la glicolisis (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, neutrófilos derivados de sangre periférica de donantes sanos frente a medios carentes de glucosa estos neutrófilos disminuyen su producción de NETs casi al mínimo aún siendo activados mediante 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 (2DG) 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. Además, se ha descrito un rol importante en la sepsis, en donde cúmulos de éstos en circulación contribuyen a la falla multiorgánica promoviendo daño tisular diseminado (Hoesel et al., 2005).

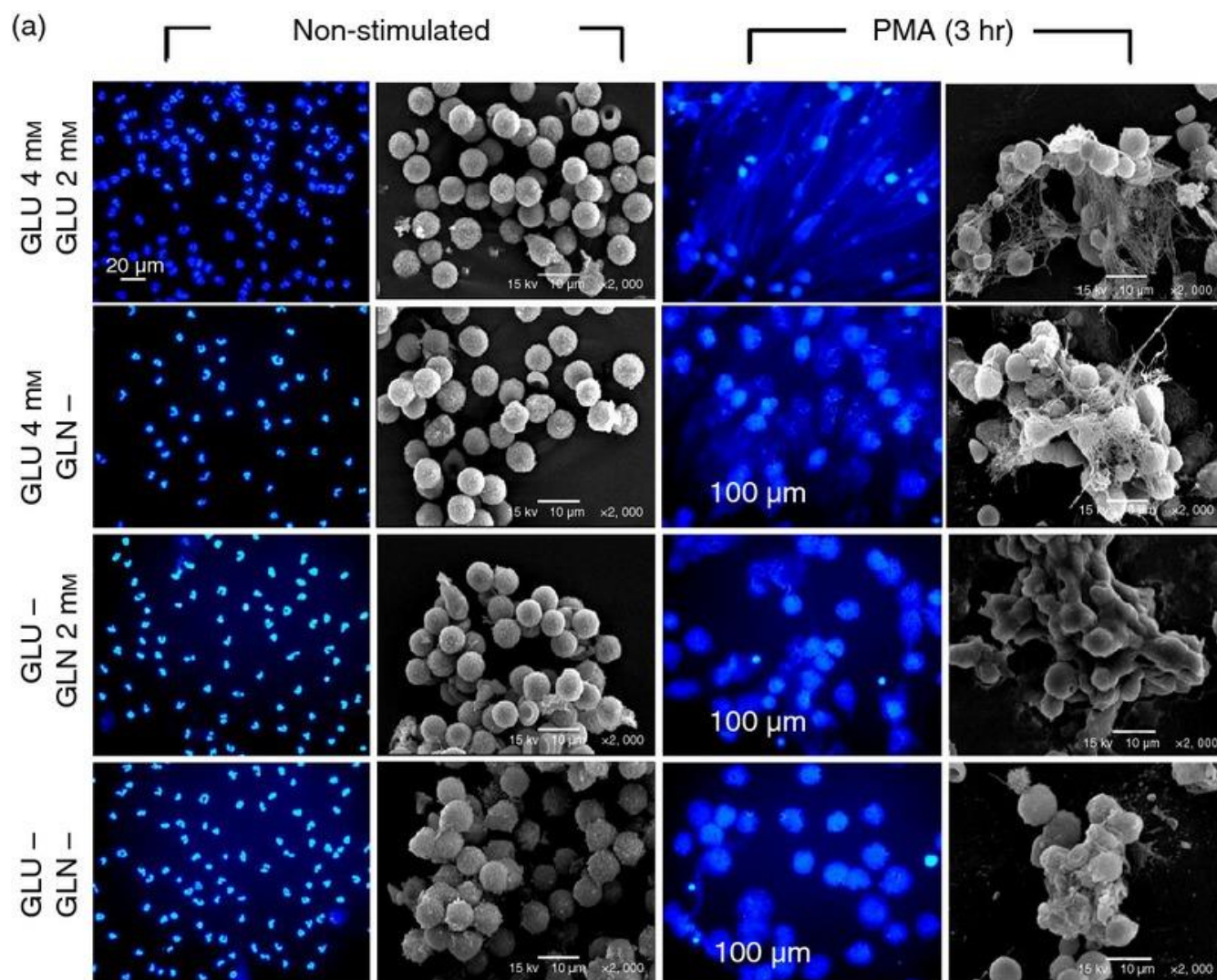


Figura 1: Formación de trampas extracelulares (NETs) con distintas condiciones del medio de cultivo glucosa 4mM (GLU), glutamina 2mM (GLN) en azul tinción DAPI para detección de ADN. Las dos columnas de la izquierda se tratan de neutrófilos sin estimular y las dos columnas de la derecha, estimulados por un forbol miristato acetato (PMA) activador de $\text{nF}\kappa\text{-}\beta$ (vía de señalización inflamatoria) durante 3 horas. (Extraído de

Rodriguez-Espinosa, Rojas-Espinosa, Moreno-Altamirano, Lopez-Villegas, & Sanchez-Garcia, 2015)

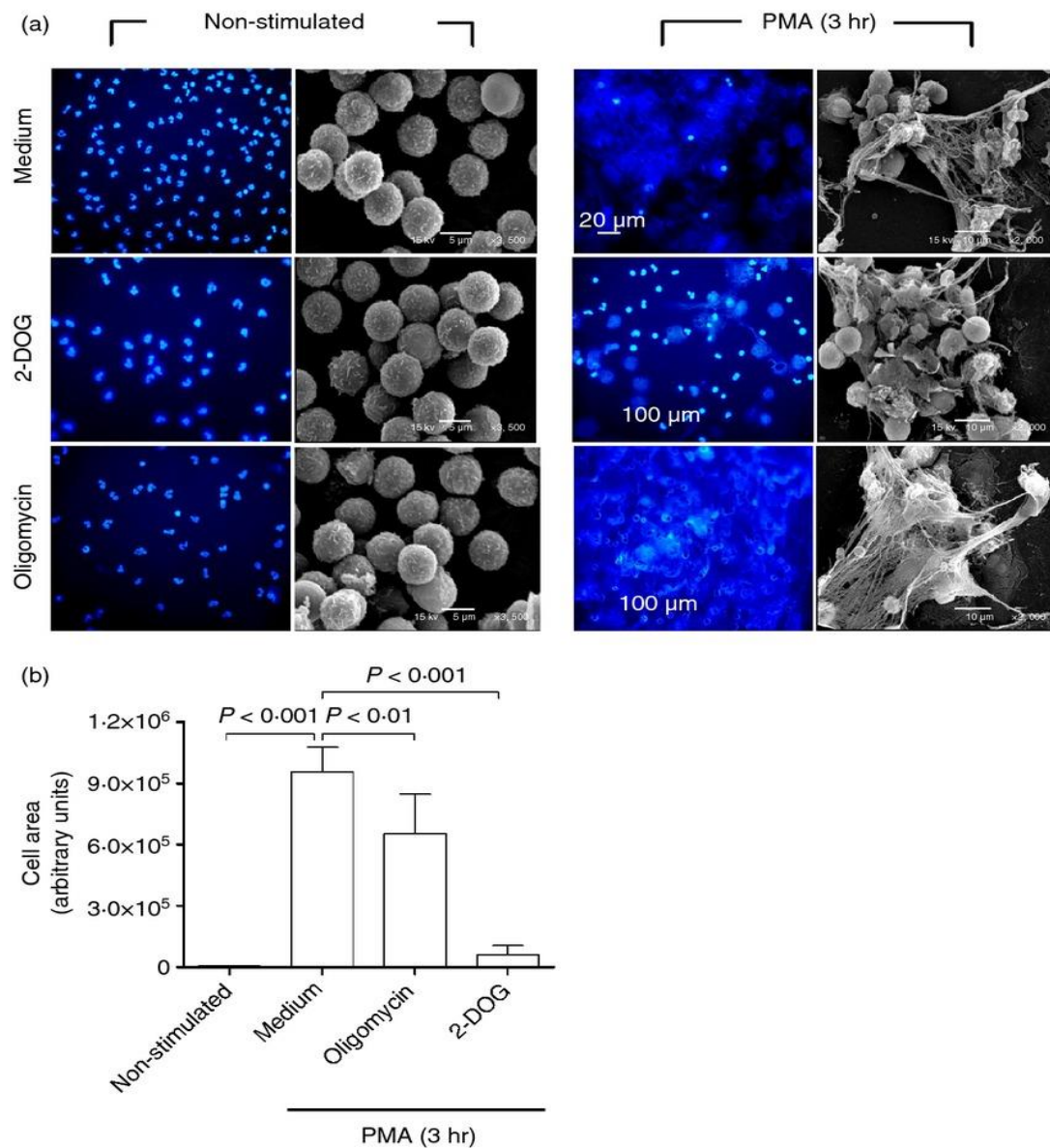


Figura 2: Inhibición farmacológica de la glicolisis y de ATP sintasa disminuye la formación de NETs. (a) Neutrófilos aislados en medio RPMI-1640 completo fueron incubados con 2-desoxiglucosa, oligomicina o medio solo, la columna de la izquierda representa a células sin activar y la columna derecha representa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

NETs y su importancia en el síndrome de distrés respiratorio agudo.

La presencia de trampas extracelulares de neutrófilo juega un rol importante dentro de la generación de ARDS, debido que al extraer el fluido de lavado broncoalveolar (BALF) se ha encontrado grandes cantidades 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 trampas extracelulares de neutrófilo 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 depende en su mayoría de la glicolisis, producto de la glicolisis se producirá glucosa-6-fosfato que entrará a la vía de las pentosas fosfato, lo que provocará la producción de NADPH, que a su vez inducirá la activación de NADPH oxidasa, que provocará la liberación de ROS, que activarán

a 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 (Figura 3) (Jorch & Kubes, 2017; Kumar & Dikshit, 2019; Liew & Kubes, 2019).

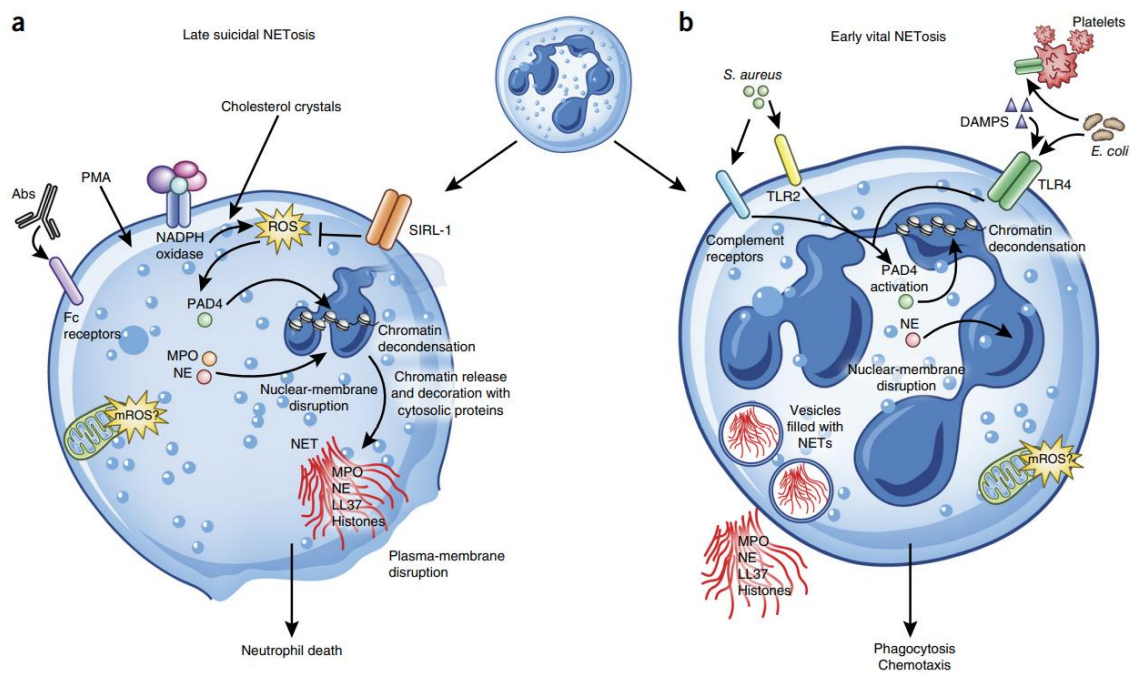


Figura 3: Esquema del proceso de formación de trampas extracelulares de neutrófilo (NETs) NETosis. (a) Diferentes estímulos tales como PMA, anticuerpos o cristales de colesterol, pueden inducir NETosis suicida, la que ocurre luego de horas de estimulación. Luego de la estimulación de NADPH oxidasa, se 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.(Extraído de 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 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.

Un estudio de 50 pacientes en el hospital académico de la Universidad de Michigan determinó la cantidad de NETs en suero de 50 pacientes con COVID-19, en el estado agudo de la enfermedad. Los pacientes presentaron un aumento significativo de NETs respecto a controles sanos (Figura 4) (Zuo et al., 2020).

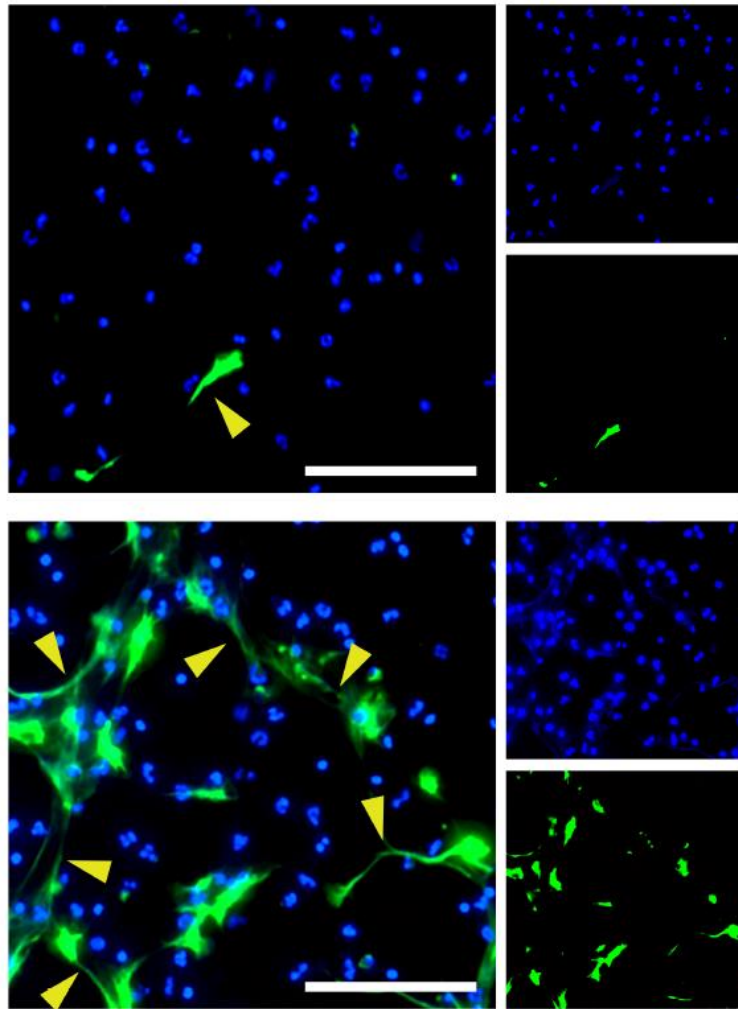


Figura 4: Presencia de NETs en suero de pacientes COVID-19. Imagen superior suero de pacientes control sanos e imagen inferior con suero paciente COVID-19. Con DAPI representado de color azul se marca el DNA y con verde la enzima neutrófilo elastasa, las flechas amarillas indican NETosis (Extraído de 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.

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 con diagnóstico COVID-19 positivo, un 30% del total presentaba hipertensión y de los pacientes que fallecieron un 48% tenían hipertensión. Además, un 19% de estos pacientes padecían diabetes y del total de fallecidos, un 31% padecía diabetes (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 significantes 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).

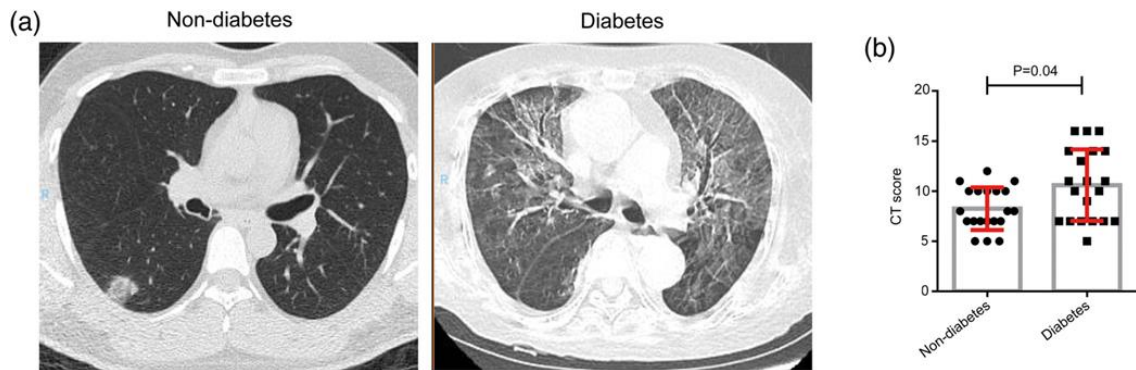


Figura 5: resultados de CT de pacientes con y sin diabetes. (a) Imágenes representativas de CT de pacientes con y sin diabetes, en pacientes con diabetes se observa aumento de la opacidad vitral a nivel bilateral, lo que indica una disminución de aire en los tejidos pulmonares. (b) Gráfico de comparación 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 100-124 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 que eleva a 16,6 comparado con pacientes normoglicémicos (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 O.R 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 realizó 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).

Cabe destacar que producto de 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 con el incremento de riesgo de severidad y mortalidad O.R 2,9 para ambos casos (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 (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) (Chen et al., 2021).

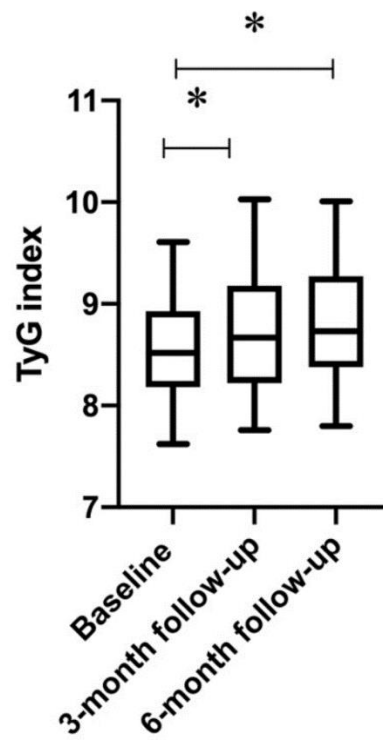


Figura 6: Seguimiento del índice TyG como marcador de insulino resistencia. Al realizar la comparación entre la condición inicial de los pacientes se puede observar un aumento significativo del índice de Triglicéridos y Glucosa (TyG) a los 3 y 6 meses de seguimiento mediante análisis de Varianza $P 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

Por lo que hay una pregunta frecuente entre investigadores, ¿Hay alguna relación entre el control glicémico de los pacientes y la severidad de la enfermedad? A esta pregunta se ha propuesto la hiperglicemia como un mecanismo fisiopatológico para la severidad del COVID-19, puesto que estudios previos de SARS-CoV, virus de la familia de los coronavirus, se demostró 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 (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. Igualmente se ha descrito que al activar células mononucleares de sangre periférica con agonistas de receptores tipo Toll 3 (TLR3), en concentraciones crecientes de glucosa se produce una disminución en la producción de IFN del tipo I conforme aumenta la concentración de glucosa (Hu, Xia, Butfiloski, & Clare-Salzler, 2018). Y en el contexto actual, se ha descrito que frente a niveles elevados de glucosa los monocitos infectados por SARS-CoV-2 presentan un aumento en la expresión de ACE-2 y de IL-1 β (Codo et al., 2020).

Por lo que, si la glucosa es un factor determinante en la desregulación inmune es importante determinar su implicancia en los distintos linajes que provocan la severidad en la enfermedad, de esta forma hay carencia de datos que relacionen

la alteración del perfil glicémico en pacientes COVID-19 y la actividad de NETosis de los neutrófilos.

Problema y pregunta de investigación

Actualmente con la información obtenida de las investigaciones acerca del SARS-CoV-2 existe evidencia del pobre control glicémico y su relación con la severidad y a un peor pronóstico de la enfermedad, pero, no se conoce, ni se ha descrito si existe alguna asociación entre las alteraciones del perfil de metabolismo glucídico de los pacientes que sufrieron COVID-19 y su efecto en la NETosis, respecto a pacientes sin alteraciones.

¿Cuál es la relación entre la NETosis de pacientes que padecieron COVID-19 y su asociación con alteraciones del metabolismo glucídico?

Hipótesis

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

Objetivo General

Analizar la NETosis de pacientes que padecieron COVID-19 y su relación con alteraciones del metabolismo glucídico.

Objetivos específicos

1. Determinar las alteraciones del perfil del metabolismo glucídico en una cohorte de 60 pacientes que cursaron COVID-19 con distintos grados de severidad.
2. Evaluar la NETosis en una cohorte de 60 pacientes que cursaron COVID-19 con distintos grados de severidad.
3. Asociar la NETosis de la cohorte de 60 pacientes que cursaron COVID-19 con la severidad de la patología y las alteraciones del perfil del metabolismo glucídico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Determinar las alteraciones del perfil del metabolismo glucídico en una cohorte de 60 pacientes que cursaron COVID-19 con distintos grados de severidad

Recolección de muestras

Las muestras de este estudio son provenientes 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. De acuerdo con la información recopilada de su grado de severidad, 26 pacientes presentaron estado severo de la enfermedad, 16 pacientes presentaron un estado moderado y los 18 restantes presentaron un estado leve. Todas las muestras de los pacientes poseen una ficha clínica asociados a la fase aguda de la enfermedad del hospital.

Además, las muestras de sangre periférica obtenidas mediante venopunción a 6 meses post-COVID-19 se enviaron a procesar al laboratorio PreveGen, en donde se obtuvieron los datos del perfil bioquímico de los pacientes, 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 en base a 4 grupos principalmente para la realización de este estudio.

El primer grupo consiste en 19 pacientes COVID-19 con metabolismo glucídico alterado al inicio del estudio por el reporte médico obtenido de la fase aguda de los pacientes COVID-19 ya sean pacientes con resistencia a la insulina o diabetes mellitus II.

Un segundo grupo de 26 pacientes que presentaron alteraciones a 6 meses en su perfil de metabolismo glucídico en donde se consideró la glucosa elevada en su perfil bioquímico con un valor >100 mg/dL (5,55 mmol/L), insulina y el índice HOMA-IR $> 2,5$ considerándose al paciente insulinoresistente y de esta forma paciente con metabolismo glucídico alterado.

Un tercer grupo de pacientes que no presentó alteraciones del metabolismo glucídico en su fase aguda de COVID-19 y tampoco a los 6 meses post-COVID-19 respecto a los criterios recientemente mencionados. Finalmente, el último grupo de 14 sujetos se trata de un grupo de controles sanos que no contrajeron COVID-19 desde el inicio del estudio y a los 6 meses, e igualmente no presentan alteraciones del perfil del metabolismo glucídico.

Evaluar la NETosis en una cohorte de 60 pacientes que padecieron COVID-19 con distintos grados de severidad

Extracción de PMN por gradiente de ficoll.

El aislamiento de PMN se realizó a partir de sangre periférica extraída por punción venosa de los 60 pacientes COVID-19 y 14 controles sanos, siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante (Axis-Shield). Para ello, se colectará por punción venosa 5 mL de sangre por cada donante; empleando tubos limpios, estériles y con EDTA. Estos 5 mL de sangre total se adicionan cuidadosamente sobre 2 mL del reactivo de separación Polymorphprep (Axis-Shield), previamente alicuotados en tubo falcón esterilizado de 15 mL. Luego las muestras se centrifugarán 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 obtendrán 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 extraerá el anillo superior y se descartará, luego se extraerá el anillo de PMN y se traspasará a otro tubo estéril al que se le lavará con el doble de volumen del extraído en PBS estéril 10 mM pH 7,2 y se someterá a otra centrifugación a 400 g por 15 min, aquí se descartará el sobrenadante y se resuspenderá en 1 mL medio X-vivo con Ca^{2+} 2pM tibio.

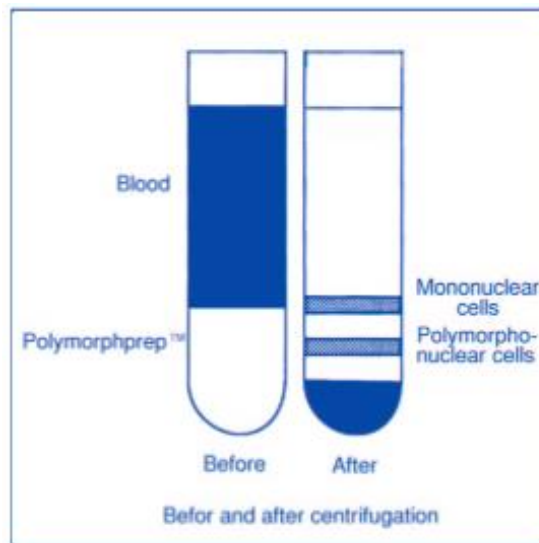


Figura 7: Esquema de separación de PMN mediante reactivo Polymorphprep (Extraído de protocolo Axis-Shield)

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

Se trabajó mediante un protocolo descrito en el trabajo de tesis de magíster de Daniela Flores del año 2020. Se tomaron las PMN aisladas del paso anterior y se realizó conteo de células viables mediante cámara de Neubauer y azul de tripán, obteniendo el total de células viables, se extrajeron 1×10^5 para determinar pureza de la muestra mediante citometría de flujo por marcaje de CD16+. 1×10^6 células fueron centrifugadas a $400 \times g$ por 5 min, el sobrenadante fue descartado y el pellet se resuspendió en 300 μL de una solución en medio Xvivo sin suero, con CaCl_2 2 pM. Las muestras fueron incubadas durante 30 minutos a 37°C y 5%

CO₂. A continuación, las células fueron lavadas con 1 mL de PBS 10 nM y sometidas a centrifugación a 400 x 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 mantuvieron a temperatura ambiente y oscuridad, transcurrido este tiempo se procesaron 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.).

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

En este ensayo se utilizó a 2 donantes sanos a los cuales se les extrajo sangre por punción venosa y se aislaron PMN según lo descrito previamente en esta metodología. Se añadieron 50 µL en que contenían 1×10^4 de PMN en medio X-vivo suplementado con CaCl₂ 2 pM a cada pocillo de una placa de 96 totales, transparente de fondo plano. Posteriormente, se agregaron 50µL 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.

Asociar la NETosis de la cohorte de 60 pacientes que cursaron COVID-19 con la severidad de la patología y las alteraciones del perfil del metabolismo glucídico.

Análisis de datos

Se realizó el análisis estadístico de los datos mediante el software de análisis estadístico GraphPad Prism, por el cual 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 para los parámetros de laboratorio. Luego 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 pasó cualquiera de las pruebas mencionadas se consideró normal con un $p > 0,05$.

Para la determinación de diferencias entre grupos se empleó análisis de varianza (ANOVA) paramétricos o no paramétricos (Kruskal-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.

Finalmente, se estableció un 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

Determinar las alteraciones del perfil del metabolismo glucídico en una cohorte de 60 pacientes que cursaron COVID-19 con distintos grados de severidad

La cohorte de 60 pacientes presentó distintos grados de severidad de COVID-19, distinguiéndose 3 grupos: primero 18 pacientes leves, luego 16 pacientes moderados y finalmente un grupo de 26 pacientes severos, como se puede observar en la Figura 8a, dentro del total de pacientes se observó que la mayoría de los pacientes son hombres siendo 32, respecto a 28 mujeres como se puede observar en la Figura 8b. Además, al relacionar la severidad con el sexo se observa que los pacientes hombres tienen mayor prevalencia de un cuadro severo-moderado, sin embargo, en el estado leve la mayoría de los pacientes se trata de mujeres. De los 26 pacientes severos 16 corresponden a hombres, de los 16 pacientes moderados 10 son hombres y finalmente en el caso de los 18 pacientes leves 6 son hombres tal y como se puede observar en la Figura 8c. Por lo que se observa que los pacientes de sexo masculino presentan mayor prevalencia de severidad en la enfermedad respecto a las pacientes de sexo femenino.

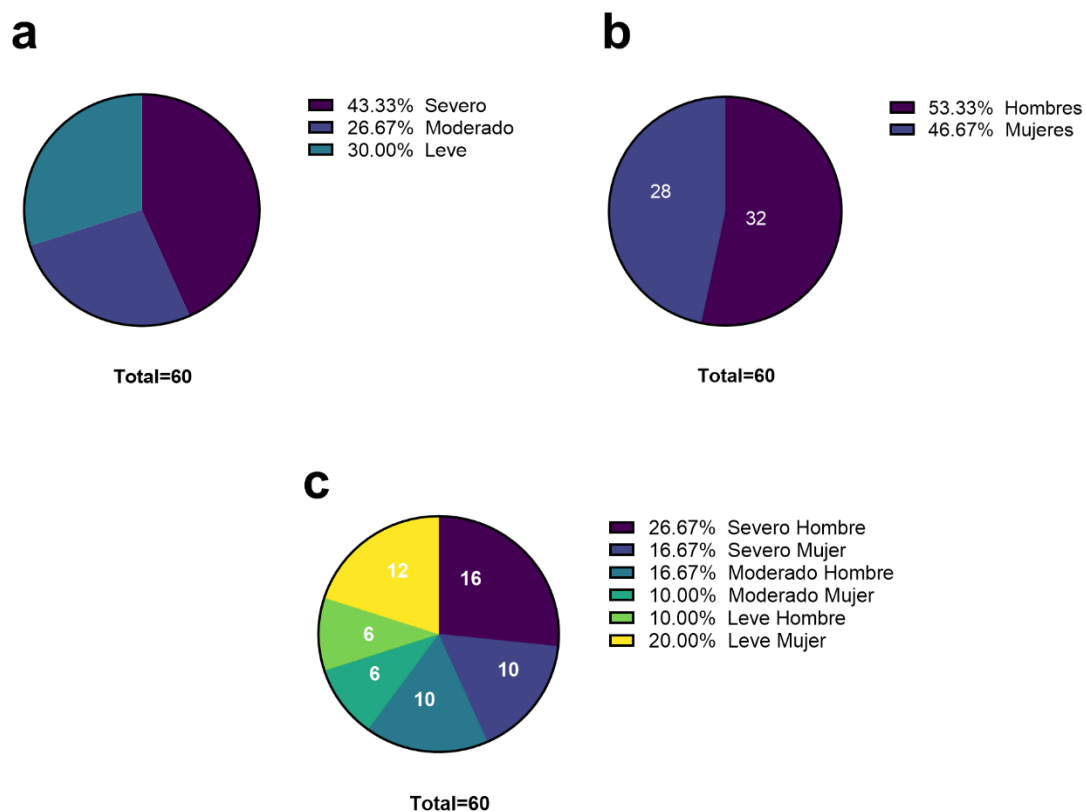


Figura 8: Descripción de la cohorte de 60 pacientes de COVID-19 provenientes del hospital Víctor Ríos-Ruiz. En base: (a) Severidad del cuadro agudo de COVID-19. (b) Distribución de pacientes por sexo. (c) Severidad asociada al sexo del paciente.

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, en el caso de la media de peso son 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 finalmente el promedio de circunferencia de cintura es de 108,6 cm como se puede observar en la tabla I.

Tabla 1: Descripción física de la cohorte de pacientes COVID-19 reclutados del hospital

Víctor Ríos Ruíz de Los Ángeles.

Parámetros	Pacientes
N	60
Edad (años)	42,4 ± 13,3 (20 - 74)
Peso (kg)	84,3 ± 15,4 (48 -130)
Altura (m)	1,65 ± 0,10 (1,45 - 1,82)
BMI (kg/m ²)	31,1 ± 4,97 (18,5 - 42,5)
Circunferencia de cintura (cm)	108,6 ± 9,5 (88 -130)

Valores informados en media ± desviación estándar (valor mínimo – valor máximo).

Además, se realizó la misma estadística descriptiva, pero, se hizo la separación de la cohorte entre hombres y mujeres, para observar las diferencias entre ambos grupos de pacientes. En el caso de la cohorte femenina, se observó que la edad promedio se trata 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 todo como se puede observar en la tabla 2. En comparación 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 tal y como se puede observar en la tabla II.

Tabla II: Descripción de la cohorte separada por sexo y comparaciones de parámetros físicos.

Parámetros	Hombres	Mujeres
N	32	28
Edad (años)	45,6 ± 13,4 (20 -74)	47,4 ± 12,9 (23 -71)
Peso (kg)	89,3 ± 15,6 (61 -130)	77,9 ± 12,7 (48 -104)*
Altura (m)	1,71 ± 0,06 (1,59 - 1,82)	1,57 ± 0,07 (1,45 - 1,68)*
BMI (kg/m²)	30,6 ± 4,42 (20,9 - 41,9)	31,6 ± 5,55 (18,5 - 42,5)
Circunferencia de cintura (cm)	107,9 ± 8,4 (92 - 130)	109,3 ± 10,7 (88 - 128)

Valores expresados en media ± desviación estándar (valor mínimo – valor máximo).* p < 0,05

Finalmente se analizó los grupos sanguíneos de 50 de los 60 pacientes en donde se determinó la distribución en la cual se puede observar que del total 33 pacientes son del grupo O siendo la mayoría, luego la distribución continua con 10 pacientes del grupo A, 5 pacientes del grupo B y finalmente 2 pacientes del grupo AB tal y como se puede observar en la Figura 9.

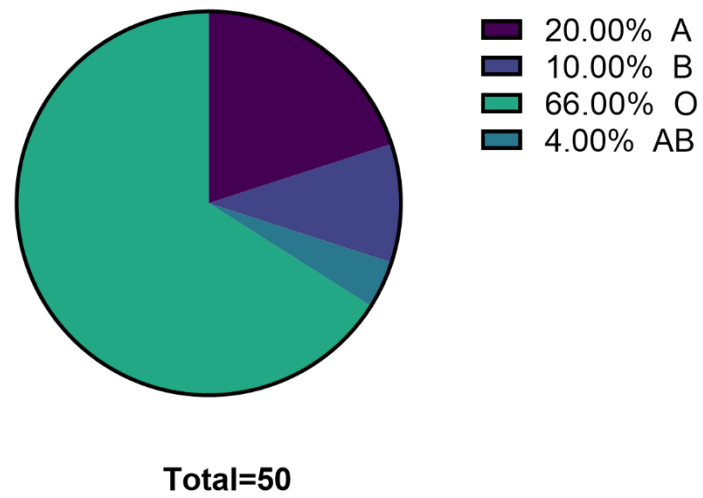


Figura 9: Distribución de grupos sanguíneos de cohorte de 50 pacientes COVID-19.

En el caso de las secuelas pulmonares se puede observar la cohorte presenta una distribución heterogénea con una mayoría con solo la tomografía computarizada (TC) abdominal alterada siendo 23 pacientes de los 60, en el caso de DLCO alterada son 5 pacientes, los pacientes que presentan ambos valores alterados son un total de 14, y finalmente aquellos que no presentaron ninguno de estos valores alterados son 18 pacientes tal y como se puede observar en la Figura 10.

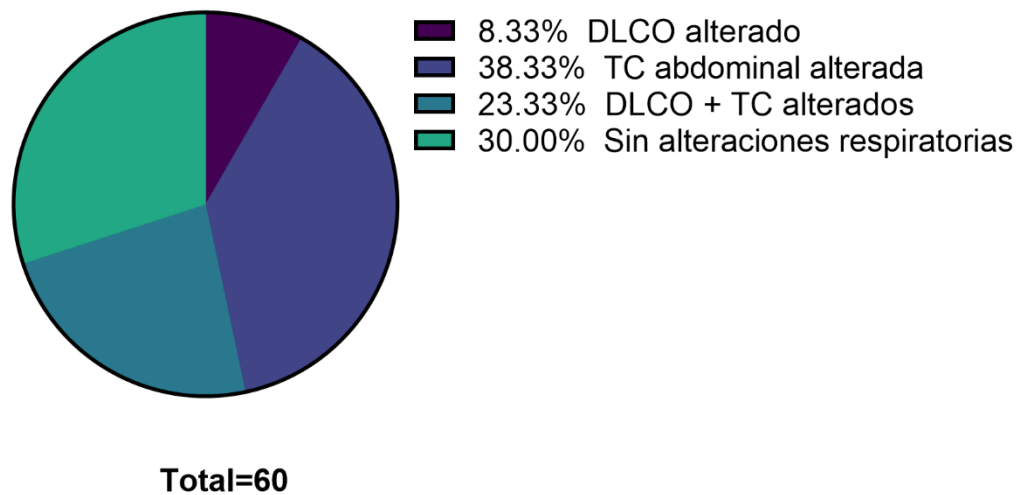


Figura 10: Distribución de secuelas pulmonares tanto del test de difusión del monóxido de carbono (DLCO) y de la tomografía computarizada (TC) abdominal de los 60 pacientes COVID-19.(En colaboración con Tesis de Bioquímica de Sergio Sanhueza)

Una vez terminada la descripción de la cohorte en términos generales, 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 la cual se reportó 19 pacientes que presentaban alteraciones ya sea diabetes mellitus tipo II, o resistencia a la insulina, mientras que los 41 pacientes restantes se trataban de pacientes sin alteraciones del metabolismo glucídico reportadas, tal y como se puede observar en la Figura 11a.

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 6 meses post-COVID-19, en donde se observó que el grupo de los 41 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 resistencia a 6 meses de su fase aguda de COVID-19 como se puede observar en la Figura 11b.

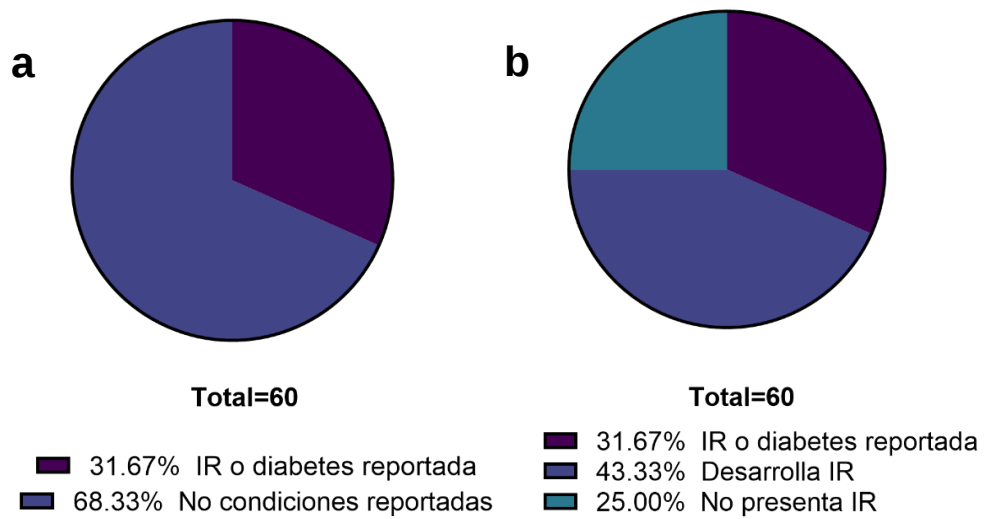


Figura 11: Distribución de alteraciones del metabolismo glucídico en la cohorte de 60 pacientes COVID-19. (a) En la condición inicial del estudio, en fase aguda de COVID-19. (b) Posterior a 6 meses de la fase aguda de COVID-19.

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, $\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-1 β e IL-8 en el cual se puede observar que para IL-12 y $\text{TNF}\alpha$ no existen diferencias significativas entre los 4 grupos de estudio (Figura 12a-b). En el caso de IL-6 se puede observar que existe un 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 6 meses post-COVID-19 presentó un aumento significativo respecto al grupo de pacientes que no desarrolló IR (Figura 12c). Luego en el caso de IL-1b, se puede observar que el grupo de pacientes que presentaba IR al inicio del estudio presentó una disminución significativa de esta citoquina respecto a los pacientes que desarrollaron IR y el grupo control (Figura 12d). 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 los que tenían previa IR, presentaron un aumento significativo respecto a los 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. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

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 a los pacientes que no desarrollaron IR y al grupo control (Figura 13a). CCL-2 se encuentra significativamente aumentada en todos los grupos de pacientes, 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 presentan un aumento significativo respecto al grupo control, sin embargo, los pacientes con IR previa presentan además un aumento significativo frente a pacientes que no desarrollaron IR (Figura 13c). Finalmente, la última quimioquina CCL-5 se observó que pacientes que presentan nueva IR y pacientes que no desarrollaron IR poseen un aumento significativo respecto al grupo control (Figura 13d).

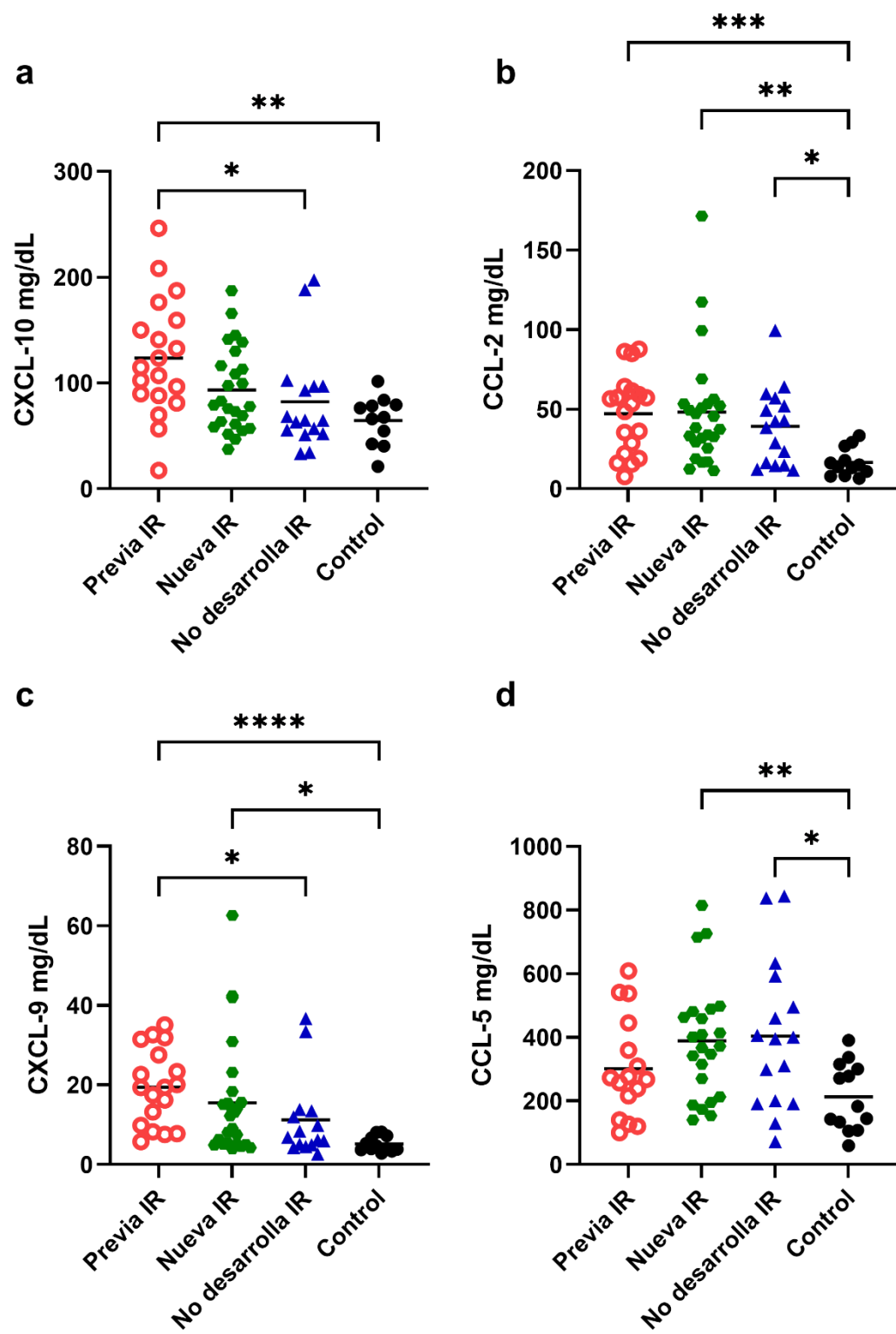


Figura 13: Comparación mediante análisis de varianza (ANOVA) entre grupos de estudio de la cohorte de pacientes COVID-19 en base a la cuantificación de quimioquinas. (a) CXCL-10. (b) CCL-2. (c) CXCL-9. (d) CCL-5. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Los siguientes resultados comparados entre grupos corresponden a las proteínas del complemento para observar si existe alguna relación entre estos grupos, por lo que se realizó un ANOVA para las proteínas C3a, C4a y C5a. En el caso de las proteínas C3a y C4a no se observan diferencias significativas entre grupos (Figura 14a-b). Y en el caso de C5a se puede observar un aumento significativo del grupo de pacientes con previa IR, respecto a los pacientes que desarrollaron IR 6 meses post-COVID-19 (Figura 14c).

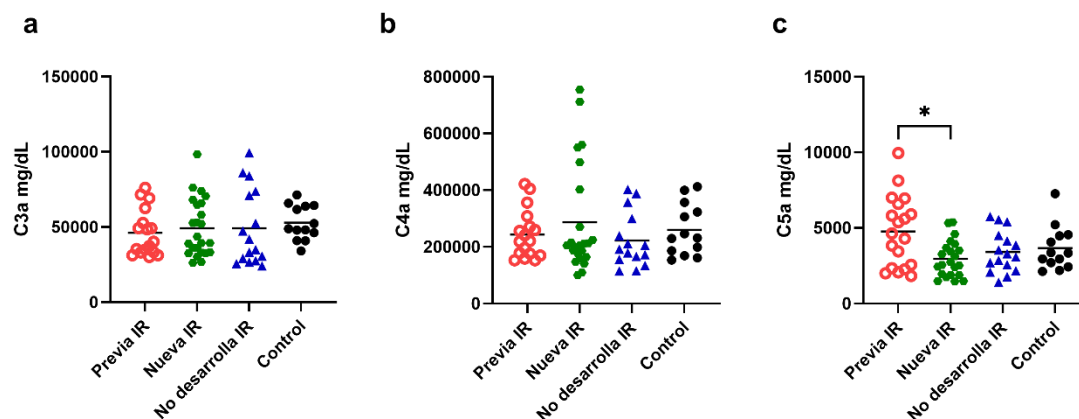


Figura 14: Comparación mediante análisis de varianza (ANOVA) entre grupos de estudio de la cohorte de pacientes COVID-19 en base a la cuantificación de proteínas de complemento. (a) C3a. (b) C4a. (c) C5a. * $p < 0,05$.

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 aumentó significativamente 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).

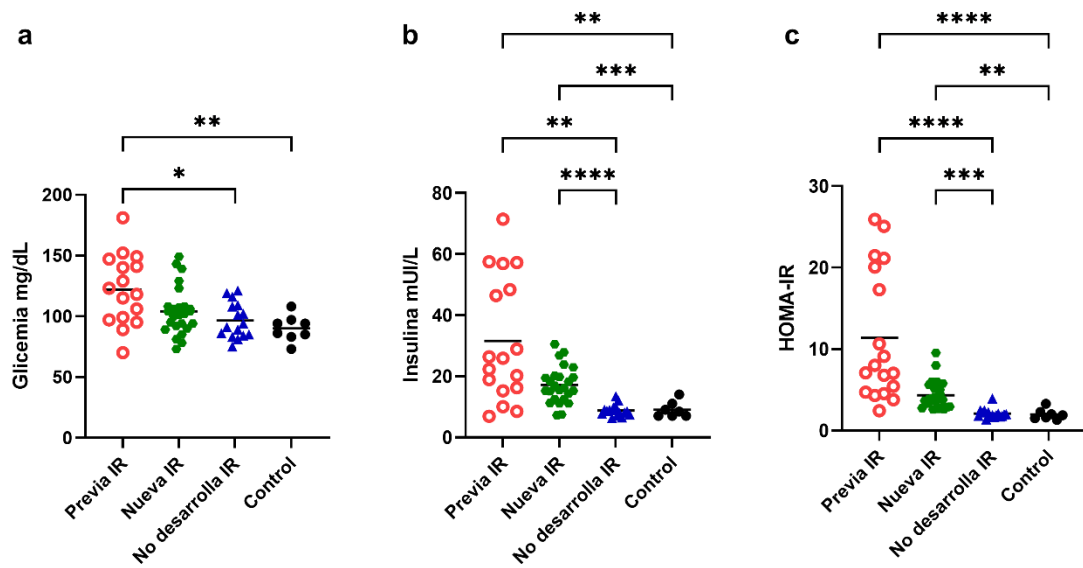


Figura 15: Comparación mediante análisis de varianza (ANOVA) entre grupos de estudio de la cohorte de pacientes COVID-19 en base a la cuantificación de glicemia, insulina y HOMA-IR. (a) Glicemia. (b) Insulinemia. (c) HOMA-IR. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

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 en donde no se observan diferencias significativas entre los 4 grupos (Figura 16a). Luego en la creatinemia se puede observar que existe una disminución significativa entre los pacientes con nueva IR respecto al grupo control y en el resto de los grupos se observó la misma tendencia, sin embargo, sin significancia estadística (Figura 16b). En el caso del ácido úrico no se observaron diferencias significativas entre grupos (Figura 16c). 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). En el fósforo se observó un aumento significativo 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). Y 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 a 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) Creatinemia. (c) Ácido úrico. (d) Calcio. (e) Fósforo. (f) Lactato deshidrogenasa (LDH). (g) Creatina quinasa total (CK Total). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Seguido del perfil bioquímico se realizaron las comparaciones mediante ANOVA del perfil lipídico. Para este análisis se comenzó con el colesterol total, en donde no se observaron diferencias significativas entre los 4 grupos de pacientes (Figura 17a). Luego se realizó la comparación de los dos tipos de colesterol, comenzando por el colesterol de alta densidad HDL, en donde se observó que pacientes con previa IR y que desarrollaron IR presentaron una disminución significativa respecto al grupo control y en el caso del colesterol de baja densidad (LDL) no se observaron diferencias entre grupos (Figuras 17b-c). Finalmente, en los triglicéridos no se observaron diferencias significativas entre los 4 grupos de estudio (Figura 17d).

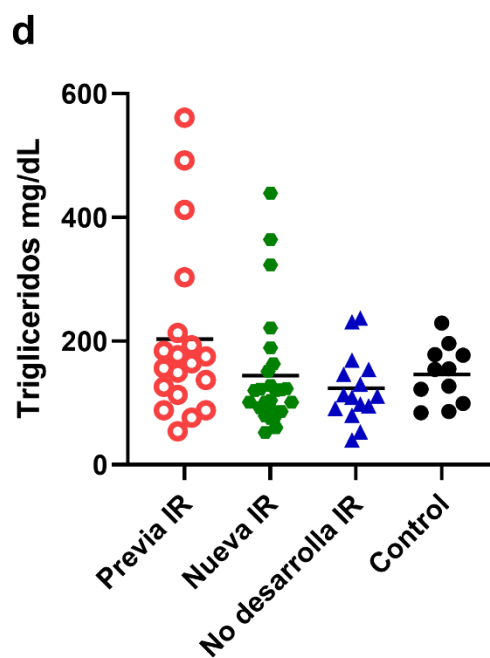
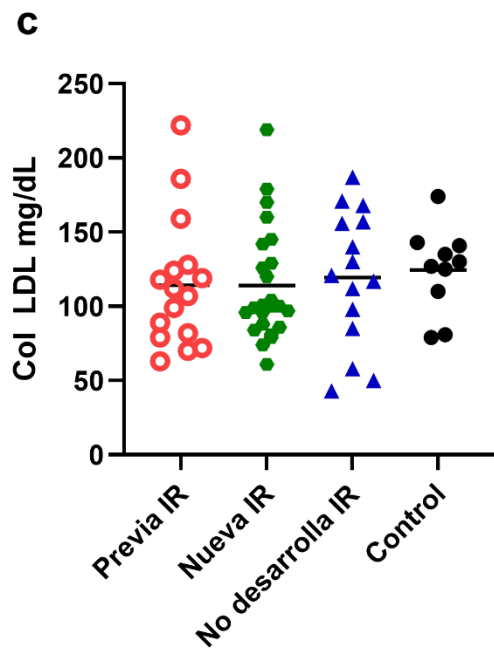
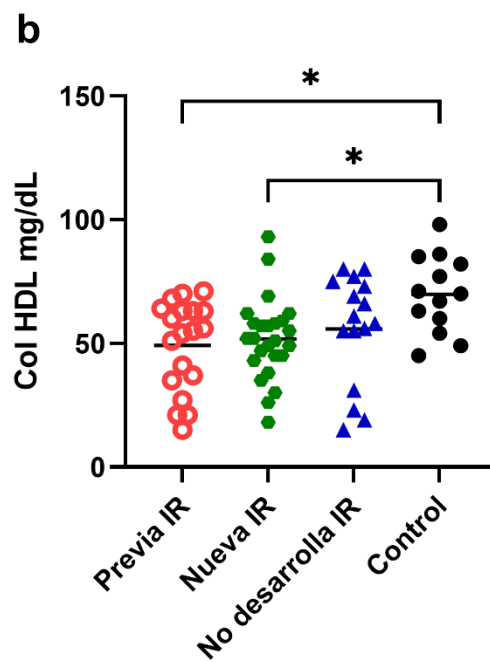
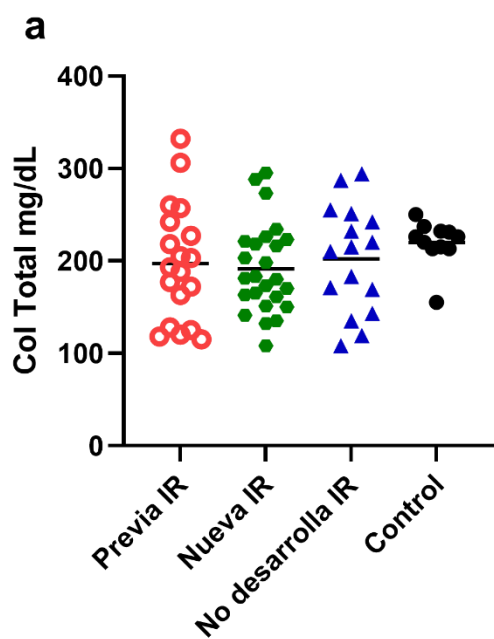


Figura 17: Comparación mediante análisis de varianza (ANOVA) entre grupos de estudio de la cohorte de pacientes COVID-19 en base a la cuantificación de parámetros del perfil lipídico. (a) Colesterol total (Col Total). (b) Colesterol HDL (Col HDL). (c) Colesterol LDL (Col LDL). (d) Triglicéridos. * $p < 0,05$.

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 continuo el análisis mediante la bilirrubina directa y la indirecta, que en ambos casos no se observaron diferencias significativas (Figuras 18b-c). Luego se analizó las proteínas totales que no presentó 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, resultado que se repite con la gamma glutamil transferasa (GGT) y la fosfatasa alcalina (Figura 18h-k).

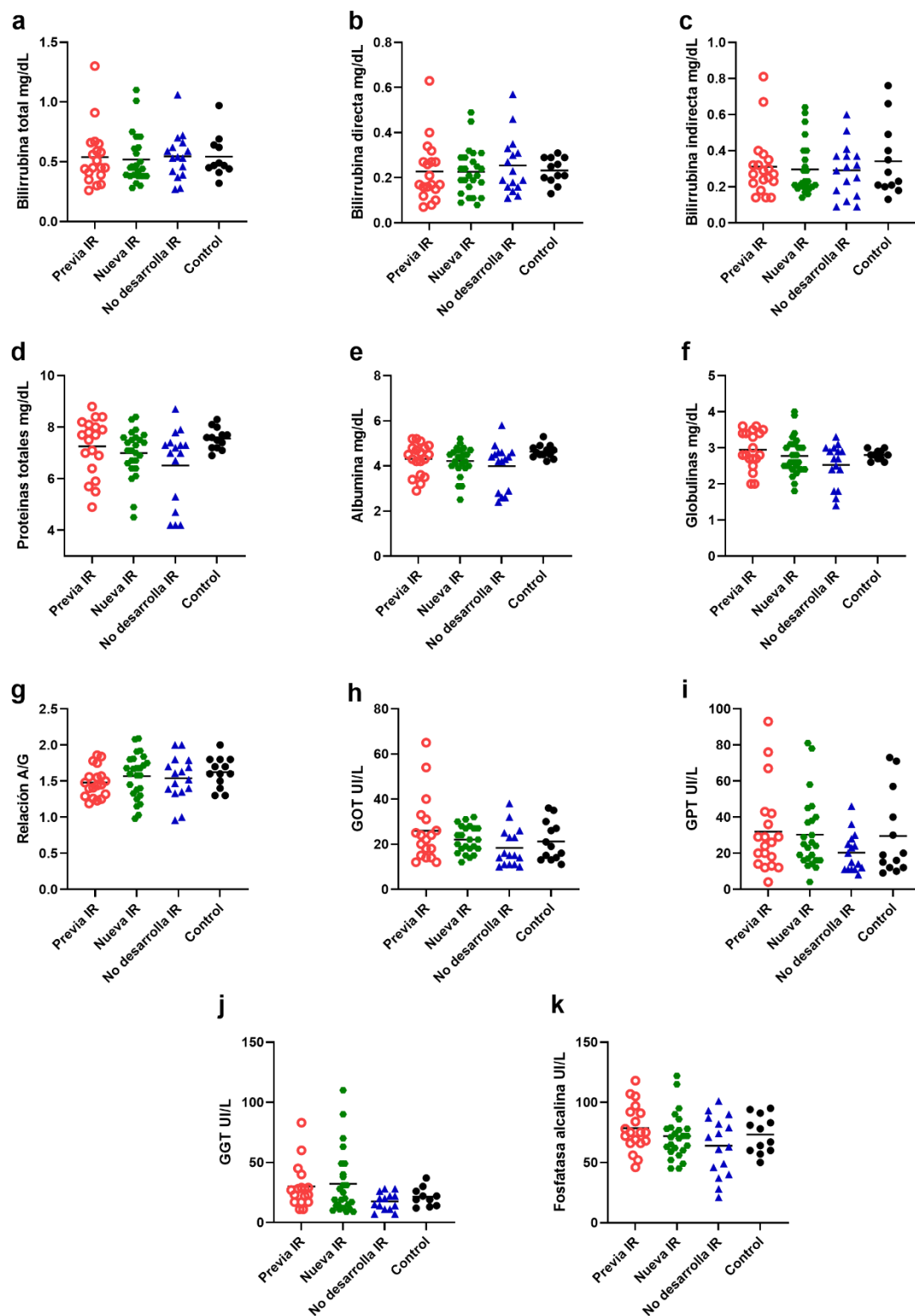


Figura 18: Comparación mediante análisis de varianza (ANOVA) entre grupos de estudio de la cohorte de pacientes COVID-19 en base a parámetros del perfil hepático. (a) Bilirrubina total. (b) Bilirrubina directa. (c) Bilirrubina indirecta. (d) Proteínas totales. (e) Albúmina. (f) Globulinas. (g) Relación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

Lo siguiente que se analizó fue el hemograma, mediante ANOVA entre los 4 grupos de estudios tal y como se ha realizado con el resto de los parámetros. 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 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). Y en los porcentajes de los leucocitos, no se observaron diferencias significativas entre linfocitos, monocitos y granulocitos entre los 4 grupos (Figura 19h-j).

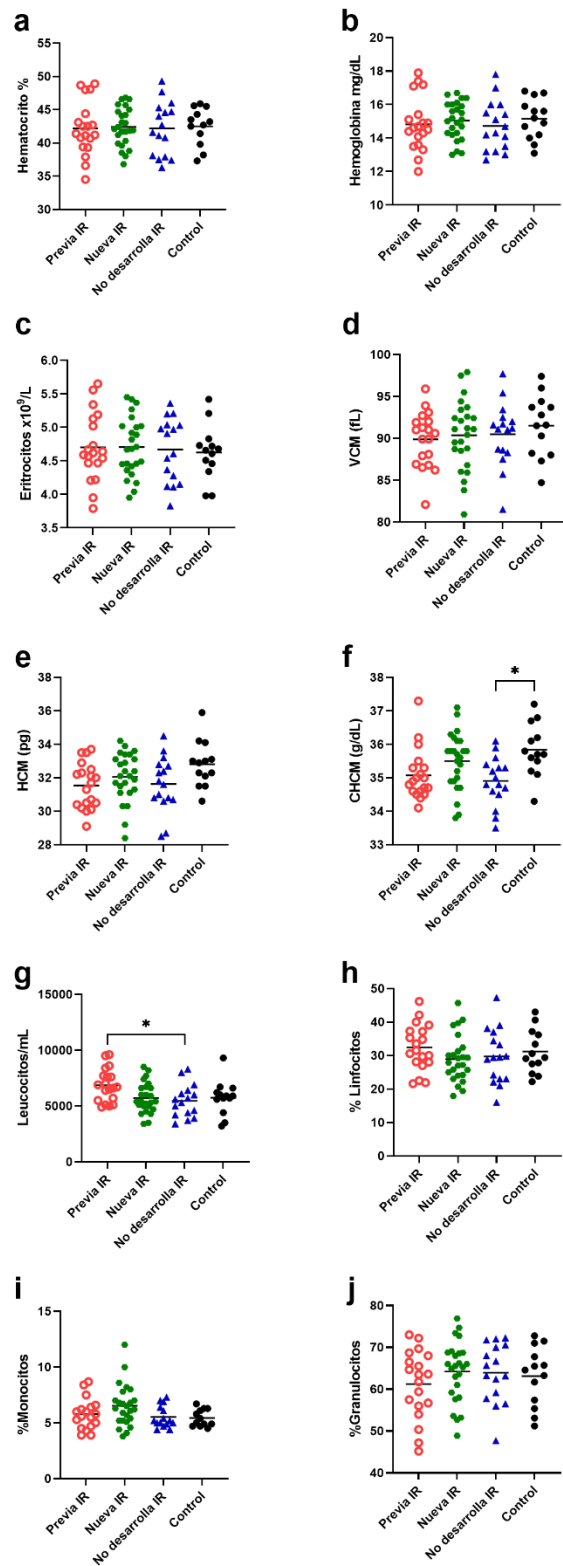


Figura 19: Comparación mediante análisis de varianza (ANOVA) entre grupos de estudio de la cohorte de pacientes COVID-19 en base a los parámetros del hemograma. (a) Hematocrito. (b) Hemoglobina. (c) Conteo de eritrocitos. (d) Volumen corpuscular medio (VCM). (e) Hemoglobina corpuscular media (HCM). (f)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

Finalmente, el ultimo análisis de comparación entre grupos de los parámetros de laboratorios fueron los anticuerpos anti-SARS-CoV-2. En el caso de la IgM, se puede observar un aumento significativo de IgM en pacientes con nueva IR respecto al grupo control (Figura 20a). Para la IgG se observó que todos los grupos de pacientes poseen un aumento significativo respecto al grupo control, y también el grupo de pacientes con previa IR presenta un aumento significativo respecto a los pacientes que desarrollaron IR 6 meses post-COVID-19 (Figura 20b).

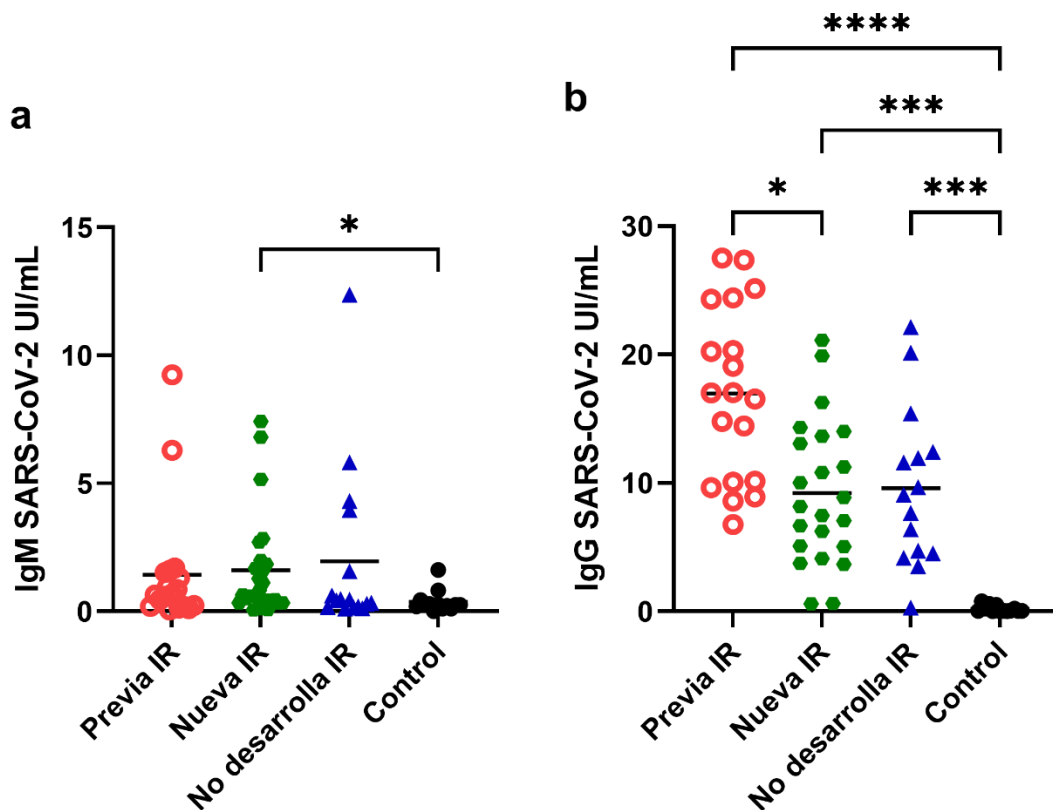


Figura 20: Comparación mediante análisis de varianza (ANOVA) entre grupos de estudio de la cohorte de pacientes COVID-19 en base a la cuantificación de anticuerpos anti-SARS-CoV-2. (a) IgM anti-SARS-CoV-2. (b) IgG anti-SARS-CoV-2. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (En colaboración con tesis de bioquímica de Romina Quiroga).

Evaluar la NETosis en una cohorte de 60 pacientes que padecieron COVID-19 con distintos grados de severidad

La evaluación de la NETosis se realizó mediante 2 métodos, el primero se enfocó en observar la respuesta de NETosis en los neutrófilos aislados de la cohorte de pacientes en condiciones basales y frente a citoquinas (TNF, IL-6). Primero se antes de realizar la determinación de NETosis, se determinó primero la población de neutrófilos de la muestra, por lo que se realizó el análisis en el software FlowJo. Por lo que, lo primero que se realizó fue determinar la población de neutrófilos en la muestra de PMN. Por lo que 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), luego se seleccionaron las células individuales o singletes (Figura 21b) y finalmente se separó la población de células mediante CD16 y Siglec8, por lo que las células que se observaron CD16+ Siglec8- se tratan de Neutrófilos (Figura 21c).

Luego siguiendo los mismos pasos de población de granulocitos, 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).

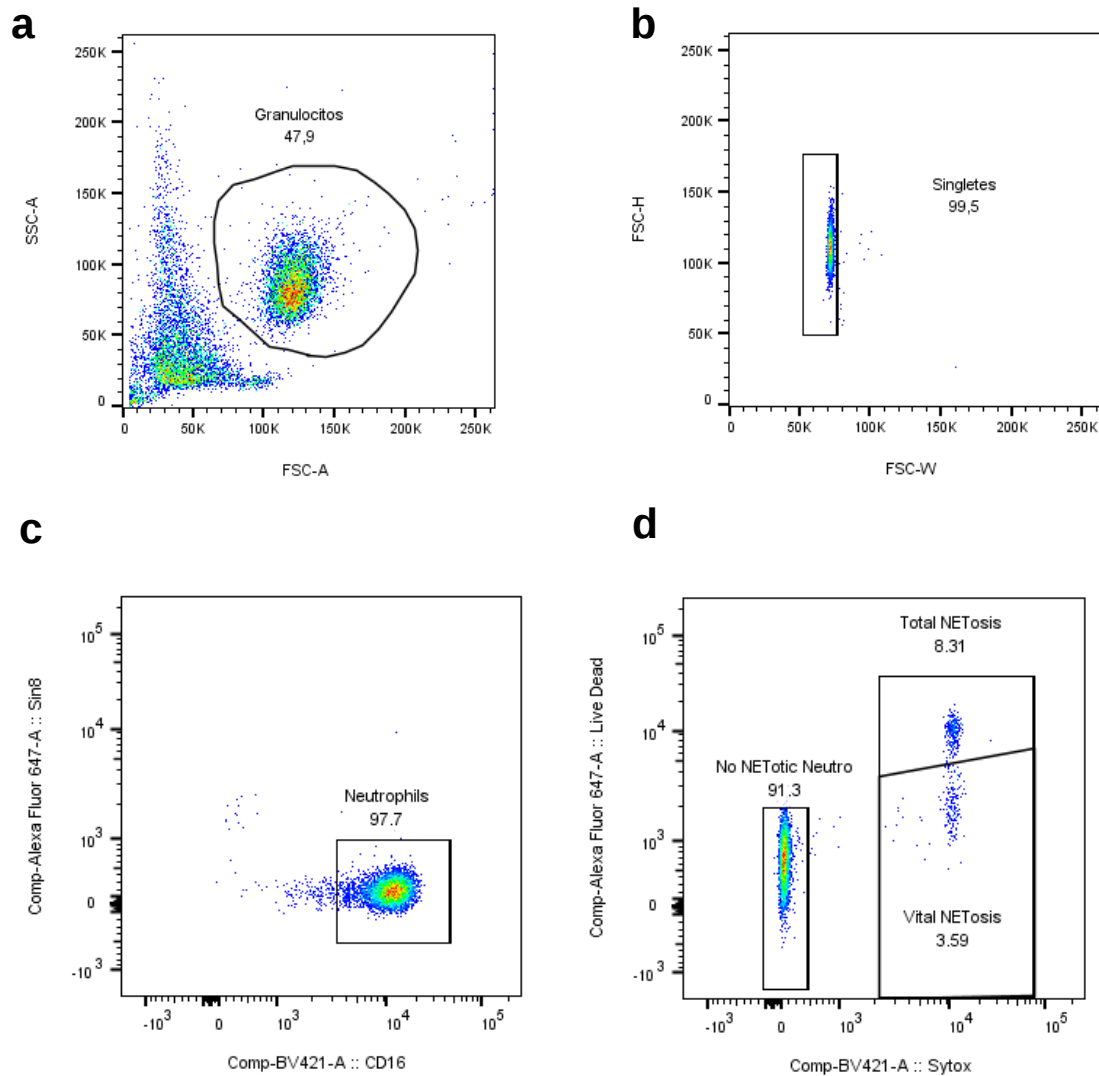


Figura 21: Estrategia de gattering para la cuantificación de NETosis mediante citometría de flujo. (a) Selección de células polimorfonucleares mediante SSC y FSC. (b) Selección de células únicas y eliminación de células en doblete. (c) Determinación de la población

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 tal y como se habían determinado en el objetivo anterior. En el caso de la NETosis basal se pudo observar que existe un aumento significativo de NETosis total basal en ambos grupos de pacientes con IR, respecto a los pacientes que no desarrollaron IR (Figura 22a). Sin embargo, en el caso de la comparación de NETosis vital se observó un aumento significativo de la NETosis vital basal de los pacientes que desarrollaron IR 6 meses post-COVID-19 respecto a los 2 otros grupos de pacientes (Figura 22b). En la activación con TNF e IL-6 se observó que en NETosis total y vital se observa un aumento significativo del grupo de pacientes que desarrolló IR respecto a los pacientes que no desarrollaron IR (Figura 22c-d).

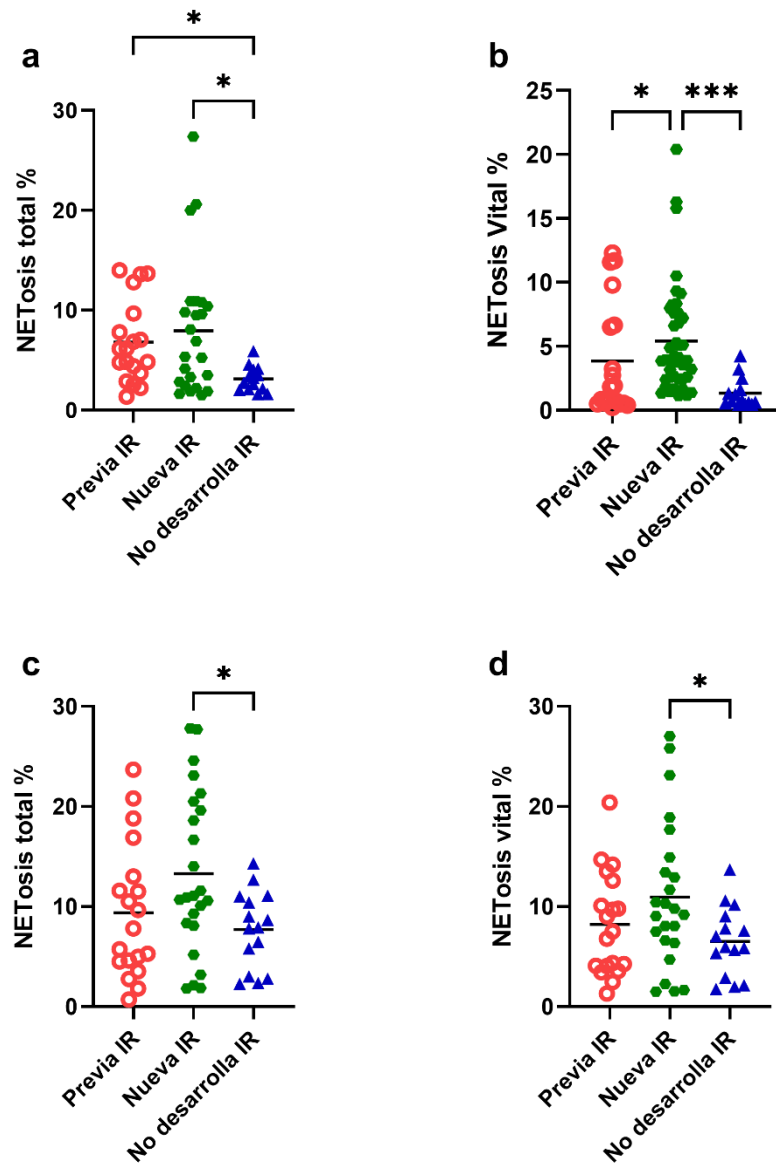


Figura 22: Comparación mediante análisis de varianza (ANOVA) entre grupos de estudio de la cohorte de pacientes COVID-19 en base a la cuantificación de NETosis. (a) NETosis total basal (%) (b) NETosis vital basal (%). (c) NETosis total TNF IL-6 (%). (d) NETosis vital TNF IL-6 (%). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Finalmente se determinó la influencia del ambiente en la NETosis de neutrófilos sanos, por lo que se expuso neutrófilos de un donante sano al plasma de pacientes COVID-19 según el protocolo descrito en la metodología, luego esto se evaluó 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 y también frente a plasma de pacientes control. 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 23) se obtiene el porcentaje con relación al conteo total de células del equipo.

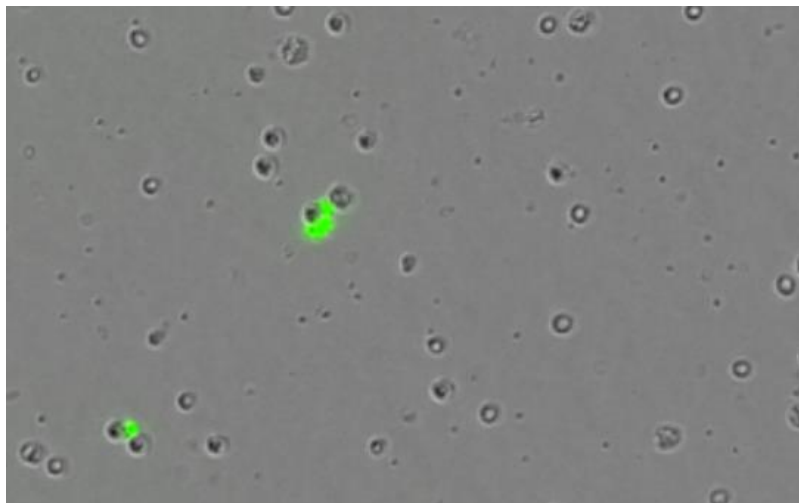


Figura 23: Imagen representativa de NETosis a cuantificar mediante Incucyte y tinción Sytox Green.

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 agudo en donde se observó que existe un aumento significativo en el grupo de pacientes con IR a las 4 horas respecto al plasma del grupo control y un aumento significativo a 5, 6 horas respecto al grupo control y a los pacientes sin IR (Figura 24).

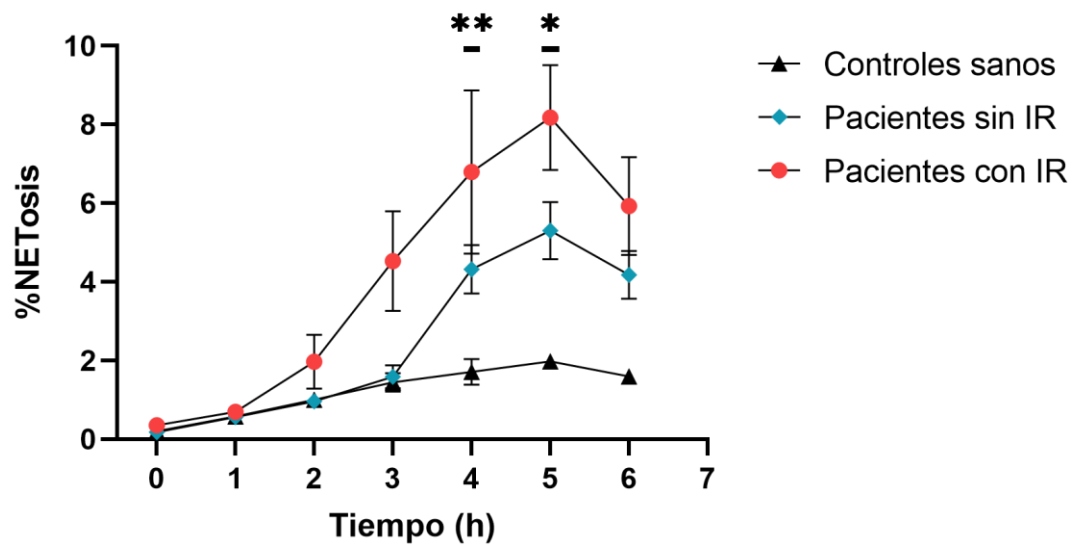


Figura 24: Curva cinética de formación de trampas extracelulares de neutrófilo en neutrófilos de donantes sanos por la exposición al plasma de fase aguda (COVID-19) de los grupos de estudio, en cuantificación mediante fotografías Incucyte y análisis de varianza (ANOVA) de dos vías. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Luego se realizó la comparación entre la NETosis en el tiempo en neutrófilos sanos frente a la exposición de plasma en estado secueado 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 25).

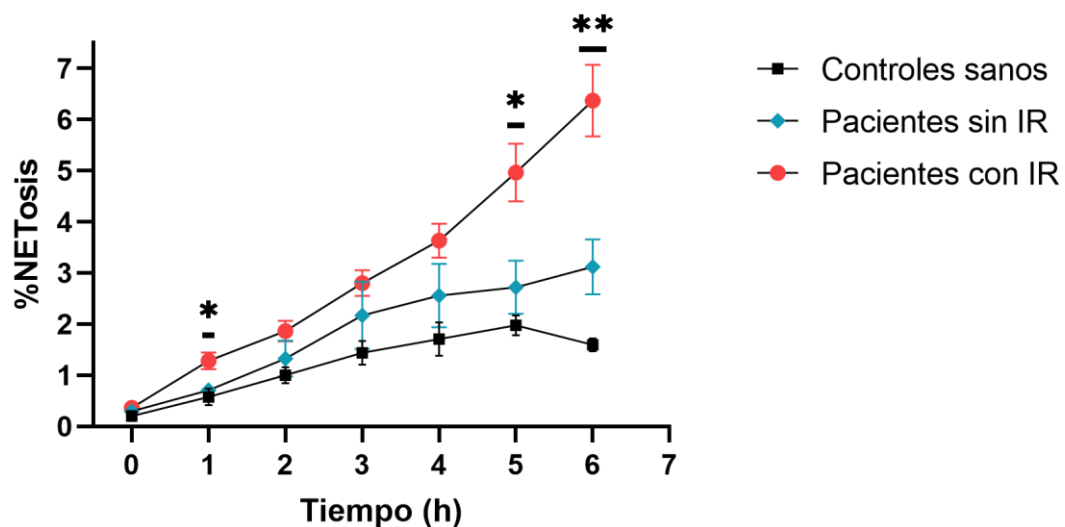


Figura 25: Curva cinética de formación de trampas extracelulares de neutrófilo en neutrófilos de donantes sanos por la exposición al plasma de fase secueada (COVID-19) de los grupos de estudio, en cuantificación mediante fotografías Incucyte y análisis de varianza (ANOVA) de dos vías. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Asociar la NETosis de la cohorte de 60 pacientes que cursaron COVID-19 con la severidad de la patología y las alteraciones del perfil del metabolismo glucídico.

Finalmente se realizó un análisis de correlación entre los distintos parámetros del metabolismo glucídico a 3 tiempos, 0, 2 y 6 horas. Se empezó por la glicemia en donde se observa correlación levemente positiva entre este parámetro y el porcentaje de NETosis en los 3 tiempos, sin embargo, no presenta significancia estadística (Figura 26a-c).

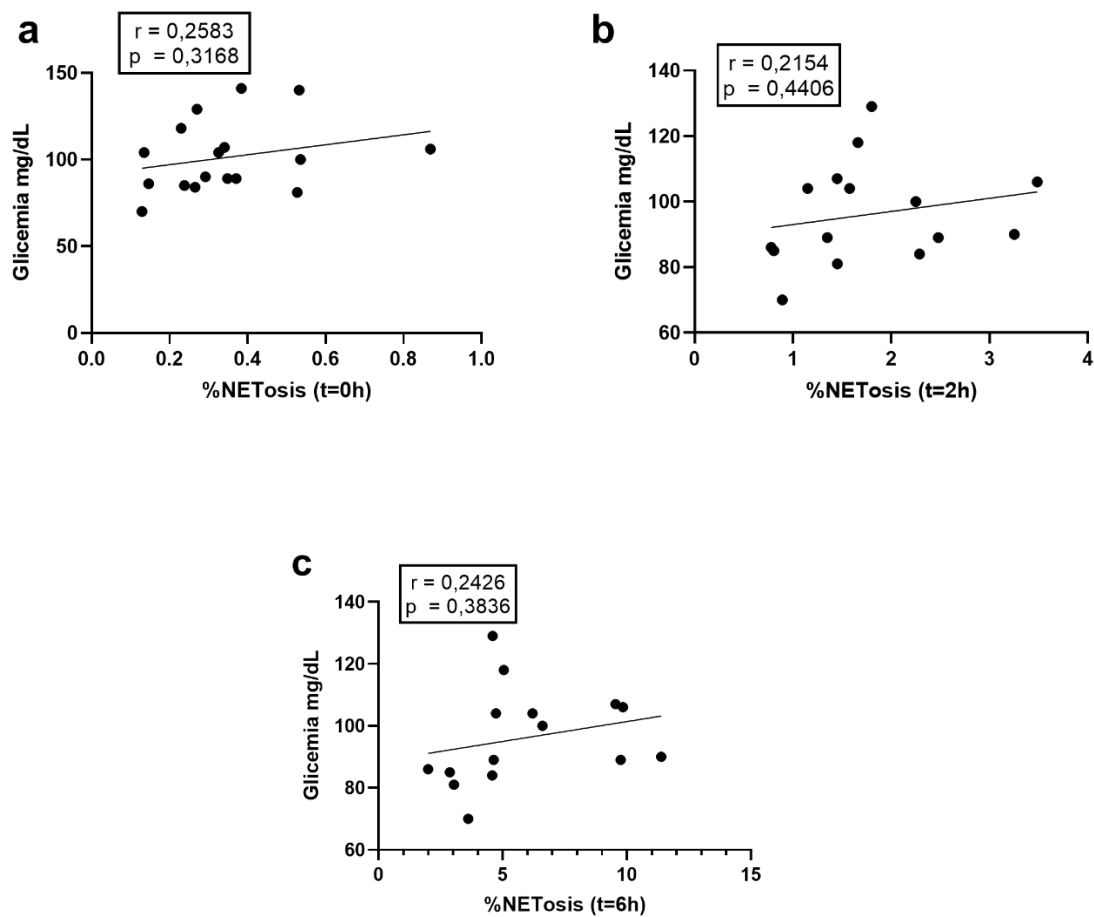


Figura 26: Análisis de correlación de Pearson entre las variables de glicemia y %NETosis a distintos tiempos. (a) %NETosis a tiempo 0h. (b) %NETosis a tiempo 2h. (c) %NETosis a tiempo 6h.

Seguido se realizó un análisis de correlación con la insulina y se observó una correlación positiva y significativa a 0, 2 y 6 horas entre los niveles de insulina y el porcentaje de NETosis en neutrófilos sanos (Figura 27a-c).

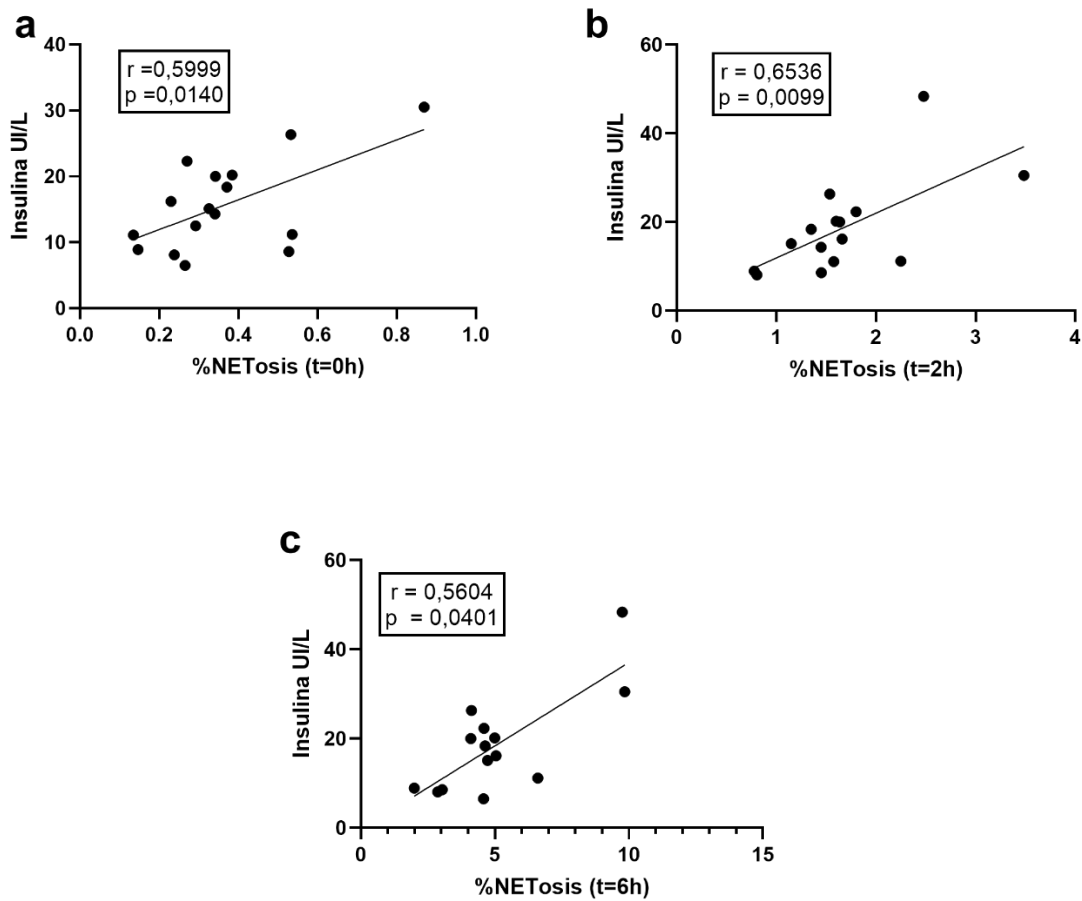


Figura 27: Análisis de correlación de Spearman entre las variables de insulina y %NETosis a distintos tiempos. (a) %NETosis a tiempo 0h. (b) %NETosis a tiempo 2h. (c) %NETosis a tiempo 6h.

En seguida se realizó la correlación con el índice HOMA-IR y el porcentaje de NETosis en neutrófilos sanos, donde se observó correlación positiva a tiempo 0 y estadísticamente significativa, sin embargo, a 2 horas disminuye la correlación y pierde la significancia lo que se observa igualmente a las 6 horas (Figura 28a-c).

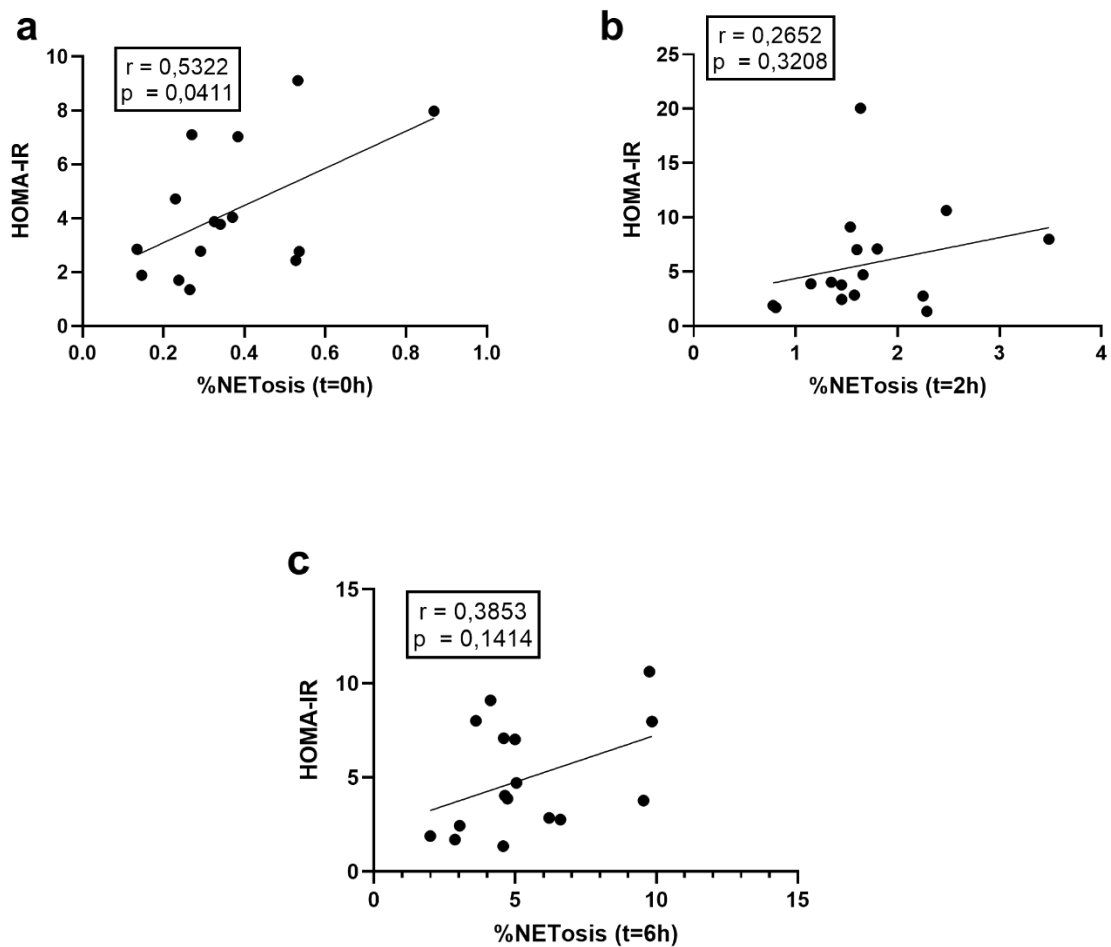


Figura 28: Análisis de correlación de Pearson entre las variables de HOMA-IR y %NETosis a distintos tiempos. (a) %NETosis a tiempo 0h. (b) %NETosis a tiempo 2h. (c) %NETosis a tiempo 6h.

Finalmente se realizó un análisis de correlación entre el porcentaje de NETosis en neutrófilos sanos y la cantidad de distintas citoquinas en el plasma de los pacientes al que fueron expuestas estas células. Primero se determinó en IL-12 en donde se observó una correlación levemente positiva entre las dos variables a 0 y 2 horas, sin embargo, no es significativa estadísticamente y a 6 horas la correlación disminuye donde se acerca a ser nula (Figura 29a-c).

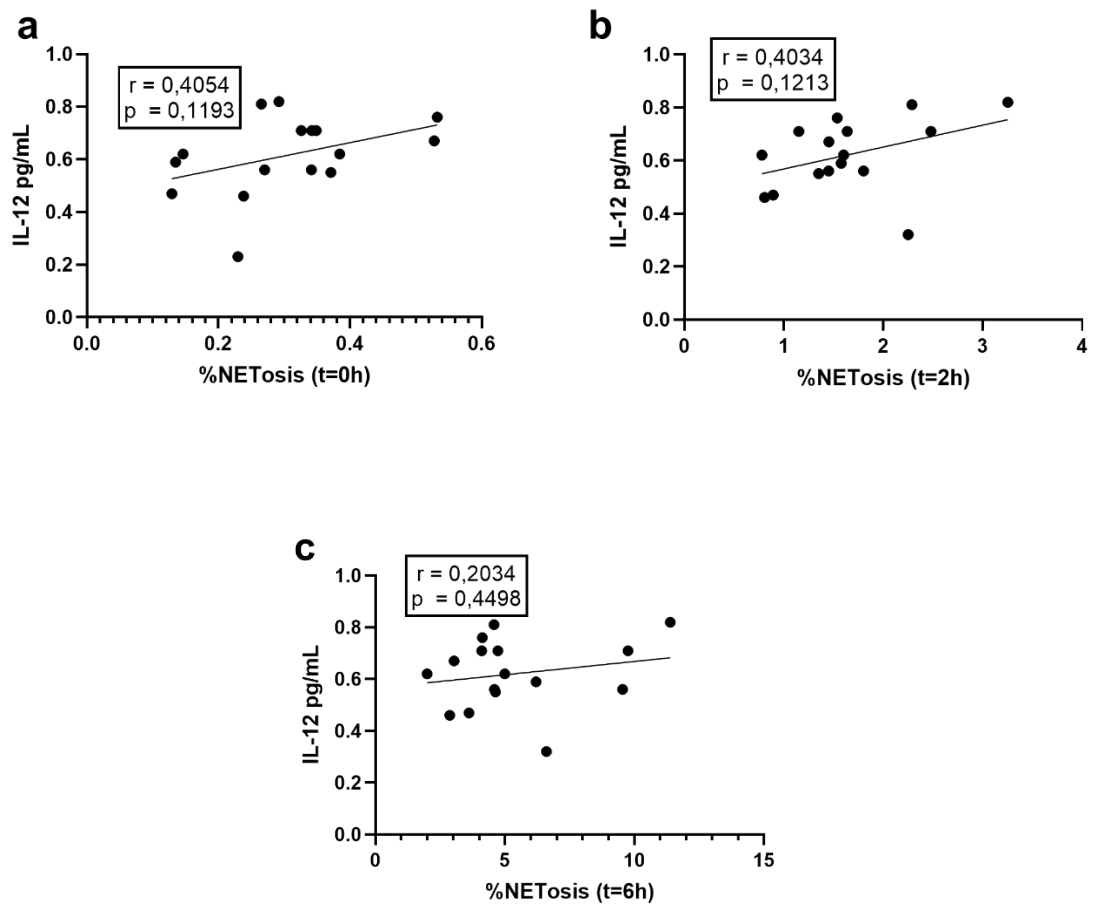


Figura 29: Análisis de correlación de Pearson entre las variables de IL-12 y %NETosis a distintos tiempos. (a) %NETosis a tiempo 0h. (b) %NETosis a tiempo 2h. (c) %NETosis a tiempo 6h.

La siguiente citoquina la cual fue analizada fue TNF en donde se observó una correlación positiva significativa a tiempo 0 y 2 horas con el porcentaje de NETosis en neutrófilos sanos, sin embargo, la correlación se vuelve nula a las 6 horas y pierde significancia estadística (Figura 30a-c).

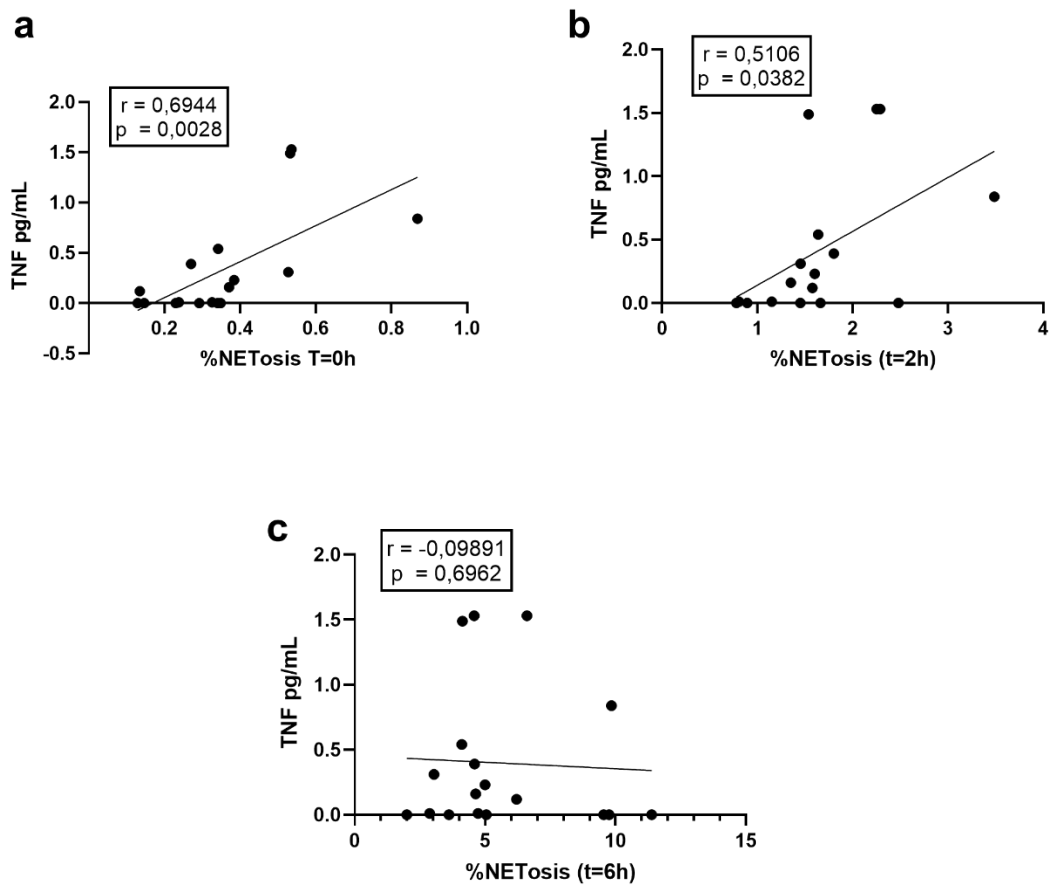


Figura 30: Análisis de correlación de Spearman entre las variables de TNF y %NETosis a distintos tiempos. (a) %NETosis a tiempo 0h. (b) %NETosis a tiempo 2h. (c) %NETosis a tiempo 6h.

Luego se realizó el análisis de correlación con IL-6 y el porcentaje de NETosis, en donde se observó una correlación nula a tiempo 0, sin embargo, a 2 horas se observa una correlación positiva elevada y significativa, que disminuye a 6 horas, pero, sigue siendo significativa (Figura 31a-c).

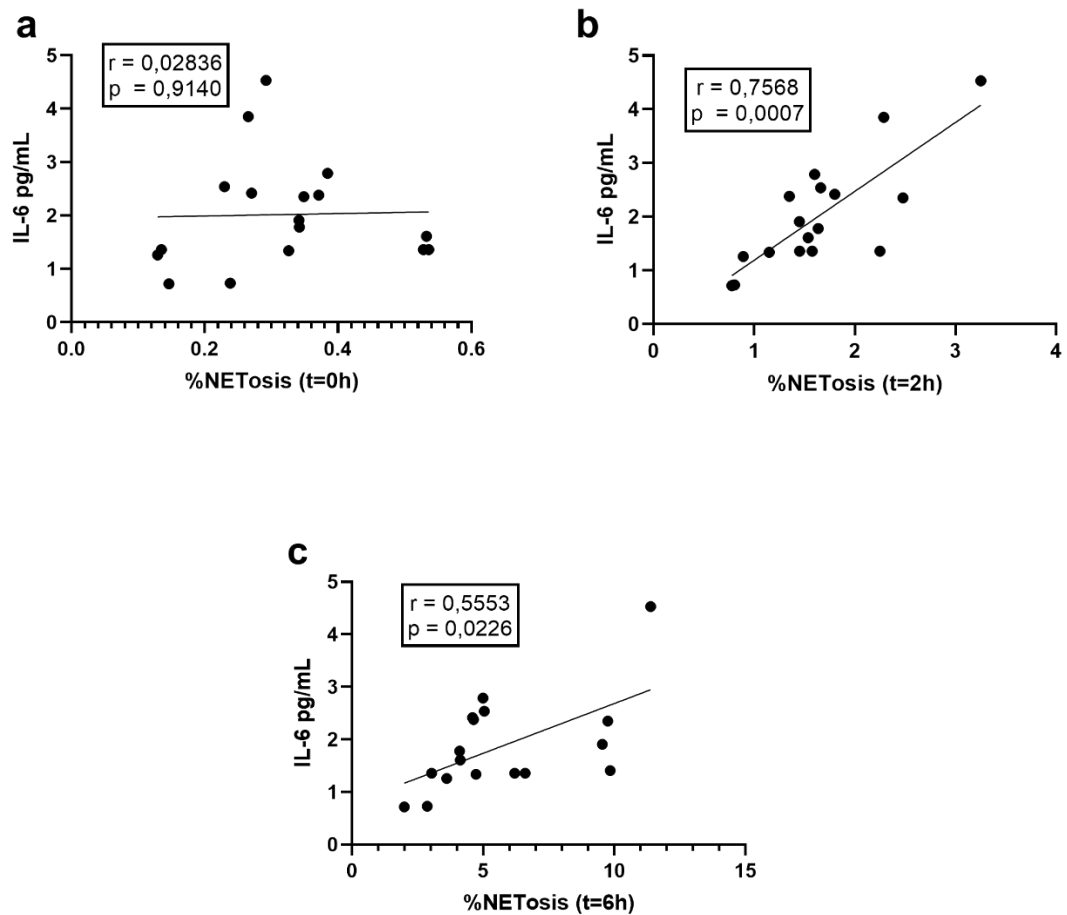


Figura 31: Análisis de correlación de Spearman entre las variables de IL-6 y %NETosis a distintos tiempos. (a) %NETosis a tiempo 0h. (b) %NETosis a tiempo 2h. (c) %NETosis a tiempo 6h.

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 32a-c).

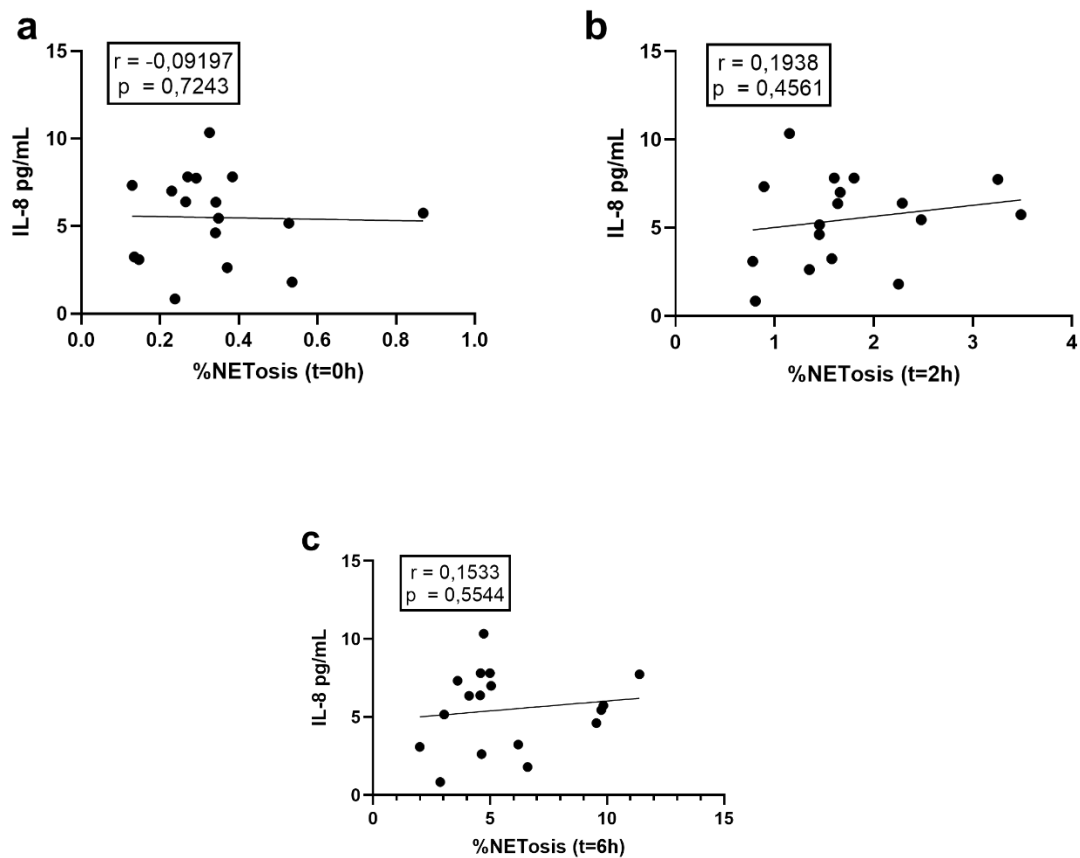


Figura 32: Análisis de correlación de Spearman entre las variables de IL-8 y %NETosis a distintos tiempos. (a) %NETosis a tiempo 0h. (b) %NETosis a tiempo 2h. (c) %NETosis a tiempo 6h.

Finalmente se realizó la correlación con IL-1 β donde se observa una correlación negativa a los tres tiempos de estudio, sin embargo, no es estadísticamente significativa (Figura 33a-c).

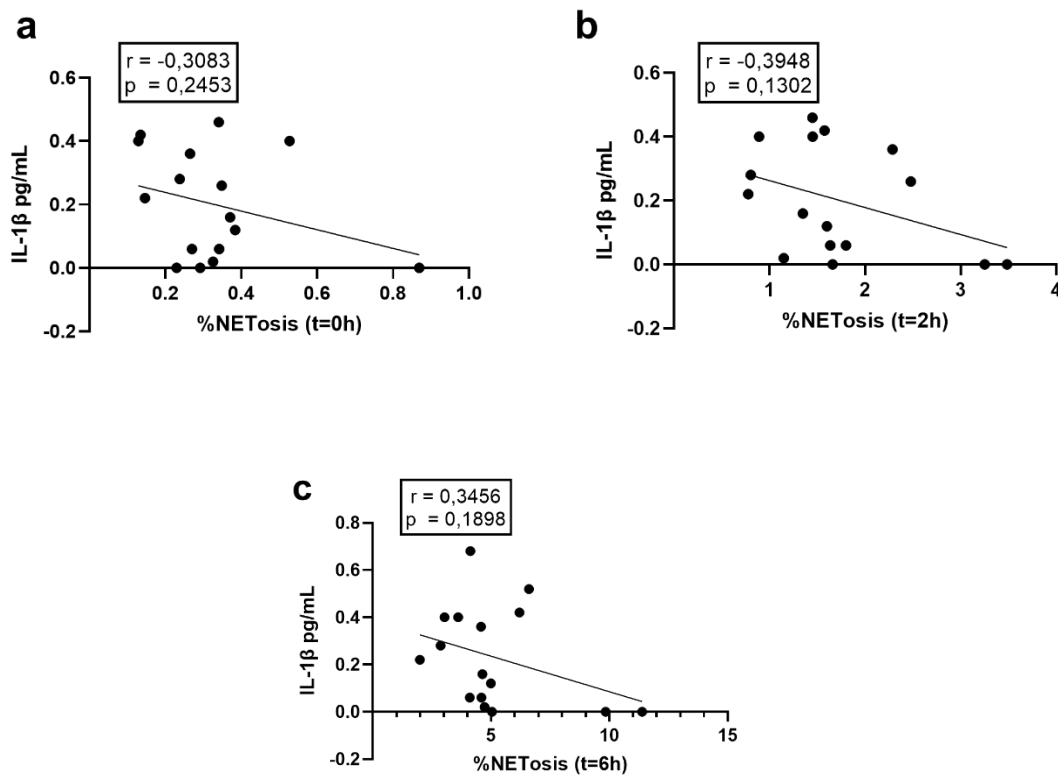


Figura 33: Análisis de correlación de Pearson entre las variables de IL-1 β y %NETosis a distintos tiempos. (a) %NETosis a tiempo 0h. (b) %NETosis a tiempo 2h. (c) %NETosis a tiempo 6h.

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 8, 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, sin embargo, al realizar la medición de BMI y circunferencia de cintura no se observa significancia, por lo que se puede observar una cohorte homogénea y en promedio con obesidad tanto hombres como mujeres. En base a la información de los grupos sanguíneos se puede destacar un dato importante puesto que según bibliografía existen metaanálisis asociados a la probabilidad de contagio y el grupo ABO (Almadhi et al., 2021; Muñiz-Díaz et al., 2021; Wu, Gu, Yu, Yang, & Shen, 2020), en este caso la mayoría de pacientes de la cohorte poseen el grupo O (Figura 9), lo que se contrasta con bibliografía, en donde se observó mayor probabilidad de contagio en grupo A y menor en grupo O. Un metaanálisis de 31.100 personas a lo largo del mundo determinó que había menor probabilidad de contagio en pacientes con grupo sanguíneo O (B.-B. Wu et al., 2020), de igual forma en el mismo estudio se observó un aumento de la tendencia a cuadros severos en individuos con grupo AB y menor severidad en pacientes con grupo O (B.-B. Wu et al., 2020). Estas tendencias se pueden

observar en más estudios en donde se observó un mayor riesgo de severidad para el grupo A y AB, respecto a pacientes grupo O (Almadhi et al., 2021; Hoiland et al., 2020; Muñiz-Díaz et al., 2021; Shelton et al., 2021). La distribución ABO observada podría diferenciar la población chilena de población en otros países, sin embargo, en base a la cohorte tan pequeña esas conclusiones no se pueden alcanzar. Varios pacientes presentaron secuelas pulmonares, tanto estructurales observadas mediante el TC abdominal, como funcionales mediante DLCO, 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.

Un resultado interesante que se relaciona con la data proveniente de la bibliografía es que los pacientes que no presentaban alteraciones metabólicas, ya sea diabetes o prediabetes 6-meses-post infección aguda de SARS-CoV-2 comenzaron a padecer resistencia a la insulina y alteraciones de la glucosa en ayunas (Figura 11) tal y como describe Chen y colaboradores en su seguimiento de 64 pacientes desde su estado inicial (Chen 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). La cohorte de pacientes COVID-19 que desarrolló IR luego de 6 meses, mediante un examen de tolerancia a la glucosa oral (PTGO) podrían haber sido clasificado en pacientes con glucosa alterada en ayunas (GAA) si presenta glucosa entre 100-

125mg/dL en ayunas y < 140mg/dL a las 2h post-carga, o podrían ser clasificados en pacientes con intolerancia a la glucosa oral (IGO) si presenta < 126mg/dL de glucosa en ayunas y entre 140-199mg/dL a las 2h post-carga, ambas clasificaciones por sí mismas o combinadas corresponden a prediabetes según lo establecido en la guía clínica de la diabetes mellitus tipo 2 del ministerio de salud de Chile (Minsal, 2010). Debido a que tal examen no se realizó no se puede realizar la confirmación de que tipo de alteración poseen los pacientes.

En base a las comparaciones de los grupos de estudios planteados en nuestra investigación, no se logran observar diferencias en las mayorías de las citoquinas sin embargo un resultado interesante es que tal y como se observó en la Figura 12 los pacientes que poseían resistencia a la insulina o una condición metabólica crónica como la diabetes presentan menor IL-1 β respecto a los pacientes que presentan IR post-6 meses lo que diferencia a ambos grupos. Esta citoquina es secretada principalmente por los monocitos, lo que puede indicar un cambio de secreción de los monocitos a nivel basal en los pacientes con alteraciones crónicas previas a la infección. Sin embargo, esta cantidad de IL-1 β reducida sumada al hecho de que posee en general una mayor cantidad de quimioquinas con efecto quimio-atrayente a monocitos como se puede observar en la Figura 11, podría sugerir que el reclutamiento y quimiotaxis está funcionando correctamente, sin embargo, la secreción de citoquinas se encuentra alterada.

En el perfil glicémico se observó lo esperado ya que los pacientes diabéticos o IR previos al estudio presentaron mayor glicemia e insulina respecto a los pacientes que desarrollaron de novo (Figura 15), 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 por ejemplo podría ser el páncreas, y es interesante puesto que 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), sin embargo, para comprobar ese vínculo se requieren de más estudios y antecedentes ya que no hay estudios que hagan la comprobación de la hipótesis.

El análisis de anticuerpos es destacable puesto que nuevamente se observa una diferencia significativa entre los 3 grupos de pacientes en estudio, en donde se observa que los pacientes con previas alteraciones metabólicas presentan una mayor producción de IgG anti-SARS-CoV-2 respecto al resto de los pacientes (Figura 20) lo que podría ser producto de la baja inflamación de grado crónico producto del aumento en la secreción de citoquinas proinflamatorias y factores angiogénicos, que lleva a estos pacientes a una mayor activación celular y por consecuencia mayor cantidad de células plasmáticas productoras de IgG anti-SARS-CoV-2. En 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 se puede observar primero que hay una tendencia en promedio de los pacientes con nueva IR de tener mayor NETosis respecto a ambos grupos (Figura 22). Sin embargo, es destacable que existe un aumento significativo en la NETosis de los pacientes con nueva IR en condiciones basales respecto a los pacientes con previa IR. Esto es un posible indicativo de una reactividad basal de los neutrófilos y una tendencia a señalizar para la producción y liberación de NETs. 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), lo que en este caso no se cumple puesto que los pacientes con previa IR presentan glicemia significativamente mayor que los pacientes con nueva IR (Figura 15), por lo que puede ser un indicador del rol de la insulina como un modulador de la NETosis o directamente de la función del neutrófilo. Esto se suma al antecedente que el plasma de los pacientes COVID-19 con IR en el ensayo de Incucyte presentaron mayor NETosis en neutrófilos sanos que los plasmas de los pacientes que no

poseen la condición y el plasma de los controles sanos (Figura 24 y 25), en ambos tipos de plasmas, en la fase aguda como en la secuelada se puede observar ese resultado, sin embargo, en fase aguda era esperable puesto que el plasma de estos pacientes poseen 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). Sin embargo, en el caso del plasma secuelado en donde hay niveles de citoquinas proinflamatorias menores que en fase aguda se mantiene esa tendencia.

Producto de esta diferencia se propuso el análisis de correlación entre las citoquinas, parámetros del metabolismo glucídico y la NETosis provocada en neutrófilos sanos por el plasma de pacientes COVID-19 (Figuras 26-33). Dichos resultados son interesantes puesto que presenta una correlación significativa la insulina con el porcentaje de NETosis observado (Figura 27). Por lo que se observa un rol de la insulina y la glicemia se ve en segundo plano puesto que no presenta una correlación tan pronunciada, ni significativa (Figura 26). Respecto a las citoquinas hay 2 datos interesantes y es cómo la IL-6 posee una gran correlación a 2h, pero disminuye con el tiempo, lo que lleva a pensar que ambos factores la insulina y la IL-6 actúan 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). Finalmente, la IL-1 β se ve con una correlación negativa, que no es significativa (Figura 33). Pero, se puede relacionar con el dato que observamos

en la comparación entre grupos, donde disminuía IL-1 β (Figura 12). Debido a que gran parte de los sueros de pacientes del análisis de Incucyte se presentaban en el grupo de los pacientes con previa IR esto puede sugerir un rol contrario a la NETosis en los neutrófilos.

CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

Es importante concluir que, frente al análisis de la cohorte, tendencias como la prevalencia masculina en la severidad de COVID-19 es coincidente en nuestra población de pacientes como lo observado en bibliografía. Se observa que la data no cumple con lo analizado internacionalmente en la relación entre el grupo ABO y la propensión a la infección y severidad, en la cohorte de estudio por lo que proyectar un estudio a nivel nacional de este dato relacionado a la severidad es una potencial determinante para esclarecer si el vínculo es conservado en la población general o si existe alguna diferencia con la población chilena.

Existe una mayor incidencia de IR post-6 meses de la fase aguda del COVID-19 en la cohorte de pacientes, lo que es importante puesto que una potencial forma de controlar las huellas metabólicas del COVID-19 serían realizar tratamientos anticipados a pacientes con sobrepeso o obesidad e infección con SARS-CoV-2, de igual forma proyectar un análisis de secuelas respiratorias relacionadas con las alteraciones metabólicas puede ser un foco de estudio emergente dado los datos que se observan en el análisis de esta cohorte.

Existe una mayor NETosis en pacientes COVID-19 tanto con previa como nueva IR respecto al grupo sin alteraciones, por lo que se puede concluir primero que la hipótesis de este estudio se cumple. Además, se genera otra oportunidad y proyección de estudio y es la posibilidad de analizar las vías de señalización

asociada a la insulina debido a su correlación con la NETosis observada en los resultados.

Finalmente, concluir que la NETosis se observó no sólo depende del ambiente inflamatorio como tal, depende también del ambiente metabólico como se pudo observar en los análisis de correlación.

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
- 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>
- 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
- 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
- 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>
- Codo, A. C., Davanzo, G. G., Monteiro, L. B., de Souza, G. F., Muraro, S. P., Virgilio-da-Silva, J. V., . . . Moraes-Vieira, P. M. (2020). Elevated Glucose Levels Favor SARS-CoV-2 Infection and Monocyte Response through a HIF-1 α /Glycolysis-Dependent Axis. *Cell Metab*, 32(3), 437-446 e435. doi:10.1016/j.cmet.2020.07.007
- 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

- 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>
- Flores Flores, D. A. (2020) Evaluación de NETosis en células polimorfonucleares y su asociación con el genotipo de riesgo PADI4 en pacientes chilenos diagnosticados con artritis reumatoide [Tesis de magíster, Universidad de Concepción].
- 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
- 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>
- Hoesel, L. M., Neff, T. A., Neff, S. B., Younger, J. G., Olle, E. W., Gao, H., . . . Ward, P. A. (2005). Harmful and protective roles of neutrophils in sepsis. *Shock*, 24(1), 40-47. doi:10.1097/01.shk.0000170353.80318.d5
- 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, R., Xia, C. Q., Butfiloski, E., & Clare-Salzler, M. (2018). Effect of high glucose on cytokine production by human peripheral blood immune cells and type I interferon signaling in monocytes: Implications for the role of hyperglycemia in the diabetes inflammatory process and host defense against infection. *Clin Immunol*, 195, 139-148. doi:10.1016/j.clim.2018.06.003

- 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>
- 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
- 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
- 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
- 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

- 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>
- MINISTERIO DE SALUD. GUÍA CLÍNICA DIABETES MELLITUS TIPO 2. SANTIAGO: Minsal, 2010.
- Muñiz-Díaz, 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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., 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. 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



Nº 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 Nº 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 Empreudec
Fono (56-41) 2204302
Casilla 160 C – Correo 3, secrevrid@udec.cl
Concepción, Chile





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, confirmando 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 regirán 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.

Instructivo elaborado en colaboración con la Facultad de Ciencias Biológicas.

Revisado 15-01-2016