



Universidad de Concepción
Facultad Farmacia

**EXPLORANDO LAS IMPLICACIONES EN EL
METABOLISMO GLUCÍDICO DE LAS VESÍCULAS
EXTRACELULARES DE PACIENTES DIABÉTICOS EN
CÉLULAS HEPÁTICAS**

**POR FRANCISCA MARIA GRACIELA VALENZUELA
MELLA**

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

Profesor Patrocinante y Guía

Valeska Alejandra Ormazábal Valladares
Facultad de Ciencias Biológicas,
Universidad de Concepción

Profesor co-Guía

Luis Alberto Briceño García
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Abril, 2024
Concepción, Chile

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

© 2024, Francisca María Graciela Valenzuela Mella

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecerle a mi familia, que siempre está para darme una palabra de aliento. A mi mamá Ana María por todas las herramientas, el esfuerzo y la confianza en mis capacidades, sin ella no habría logrado llegar hasta aquí. A mis abuelos Juan y Anita, que fueron mis pilares durante todas mis etapas académicas, que me mantienen fuerte y me inspiran a diario a ser una mejor persona.

A mis amigos de la Universidad, en especial a Óscar, Francisca, Valentina, Emilio, Bruno y Rodrigo por acompañarme en mi etapa universitaria, aconsejarme y dar apoyo siempre. A mis amigas de magíster, en especial a Karin y Karla por acompañarme en mi etapa de tesista, siempre darme apoyo, compañía y por sobre todo hacer que esta última etapa fuera mucho más amena. A mis amigas del colegio, pero por sobre todo a María José por ser mis fan número uno, quererme sin y apoyarme hasta el día de hoy.

A todos los profesores que participaron en mi formación académica pero en especial a la Dra. Valeska por darme la oportunidad de trabajar en el laboratorio, por guiarme, aconsejarme y mostrarme lo increíble que es la ciencia. Al Dr. Felipe Zúñiga por permitirme trabajar en su laboratorio y apoyarme en este proceso. A mi querido laboratorio BIOTER con el cual he crecido y aprendido mucho, son una fuente de inspiración constante, gracias por apoyarme en esta etapa.

TABLA DE CONTENIDOS

Tabla de Contenidos.....	iv
Índice de Figuras	vii
Índice de Tablas.....	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	i
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Diabetes Mellitus	1
1.1.1 Panorama mundial.....	1
1.1.2 Diabetes y Salud pública.....	2
1.1.3 Clasificación de la Diabetes	5
1.1.4 Diabetes Mellitus Tipo II.....	6
1.1.4.1 Fisiopatología.....	6
1.1.4.2 Patogenia	7
1.1.4.3 Seguimiento y control	10
1.2. Metabolismo	13
1.2.1 Generalidades	13
1.2.2 Vía de señalización de Insulina.....	14
1.2.3 Metabolismo Hepático y diabetes	15
1.2.4 Glicólisis	16
1.2.5 Gluconeogénesis	18
1.2.6 Glucogenogénesis y Glucogenólisis	20
1.2.7 Regulación del Metabolismo	21
1.3. Vesículas extracelulares	24
1.3.1 Generalidades	24
1.3.1 Biogénesis	26
1.3. 2 Composición	27
1.3.4 Vesículas extracelulares y Diabetes Mellitus.....	29
1.4 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	35
1.5 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	35
1.6 HIPÓTESIS	35
1.7 OBJETIVO GENERAL	36
1.8 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
2. METODOLOGÍA.....	37

3. Materiales y métodos	39
1. Objetivo 1:.....	39
a. Recolección de muestras.....	39
b. Determinación de tamaño muestral para lograr confiabilidad estadística.	40
d. Criterios de Inclusión y Exclusión.....	42
e. Aislamiento de Vesículas extracelulares	43
j.Reclutamiento de pacientes y separación por grupos	48
l. Cuantificación	49
f. Caracterización.....	53
a) DLS.....	53
b)Fluorescencia para medir niveles de Glicosilación	54
c) Citometría de flujo	54
2. Objetivo 2:.....	55
a. Cultivo de las células HepG2:	56
b. Ensayo Sulforodamina B	56
3. Objetivo 3:.....	57
a. RT-qPCR	58
1. b. Captación de Glucosa.....	59
c. Captación de Glucógeno.....	60
Objetivo 4:	62
a. Análisis de Componentes principales	62
4. RESULTADOS.....	66
4.1 Objetivo 1. Caracterizar las vesículas extracelulares (VE) de pacientes con niveles crecientes de HbA1c.	66
a. Cuantificación de Proteínas Totales y Vesículas Extracelulares	66
b. Caracterización de vesículas extracelulares a través de Citometría de Flujo y Dynamic light Scattering (DLS)	68
c. Caracterización del Tamaño de las vesículas extracelulares (VE)	69
4.2 Evaluar el efecto de las vesículas extracelulares (VE) de pacientes con niveles crecientes de HbA1c en la viabilidad celular.....	72
a. Ensayo de Viabilidad células HEPG2	72
4.3 Determinar el efecto de las VE de pacientes con niveles crecientes de HbA1c en la expresión de enzimas clave de la vía glucolítica en células HepG2.	73
a. Expresión de enzimas, transportadores y sustratos de las vías metabólicas relacionadas a la glucosa a través de RT-qPCR.....	73
a.1 Evaluación de la expresión de mRNA de proteínas claves de la glucogenogenesis y glucogenolisis.	73

a.2 Evaluación de la expresión de mRNA de proteínas claves en gluconeogenesis.	74
a.4 Evaluación de la.....	78
b. Captación de glucosa 2-NBDG a través de Citometría de Flujo.	79
c. Almacenamiento de Glicógeno	80
4.4 Realizar un análisis estadístico completo de los datos clínicos y experimentales para evaluar los efectos de las vesículas extracelulares (VE) en la disfunción metabólica de las células HepG2.	81
1. a. Análisis de datos clínicos.....	82
b. Análisis estadísticos de datos de Ensayos Funcionales.....	90
5. DISCUSIÓN.....	99
Caracterización de las Vesículas extracelulares obtenidas de rangos crecientes de HbA1c.	99
Análisis Funcionales: Efecto de las VE de rangos crecientes de HbA1c en el metabolismo glucídico en células HEPG2.....	104
Análisis estadísticos de los datos clínicos y ensayos funcionales.....	111
6. CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES.....	116
7. GLOSARIO	118
8. REFERENCIAS.....	120
9. Anexo	126
1. Patrocinio.....	126
2. Ética	126
3. Ejemplo de Consentimiento informado	128
4. Carta Comité de Ética Facultad Ciencias Biológicas.....	134
5. Carta Comité de Ética Servicio de Salud Concepción.....	136
6. Residuos biológicos	138

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1 Esquema resumen consecuencias DMT2. Elaboración propia.....	4
Figura 1-2 Esquema resumido del Octeto Ominoso. Elaboración propia.....	9
Figura 1-3 Algoritmo tratamiento DMT2 para Debut estable e inestable (Debut Inestable/Inestabilidad: Sintomático (poliuria, polidipsia, baja de peso) y Glicemia >300 mg/dL o HbA1c >9%).Adaptado de guía MINSAL tratamiento farmacología de la DMT2 (2016)	11
Figura 1-4 Tabla adaptada de los niveles de hemoglobina glicosilada, la glicemia promedio dentro de un rango de 3 meses y las complicaciones de mantener este nivel en el tiempo. Adaptada de Understanding A1c de ADA (2010) y Recomendaciones sobre el uso de departamento laboratorio biomédico nacional y de referencia hemoglobina glicada A1c (HbA1c) en el diagnóstico de diabetes mellitus (2021).	12
Figura 1-5 Metabolización de la glucosa en el hígado para convertirse a glucógeno en donde la glucosa 6 fosfato (G6P), GK es glucoquinasa, GPa es la forma activa de la glucosa fosforilasa (GP) y GPb es la forma inactiva. A la inversa, GSb es la forma activa de la glucosa sintasa (GS) y GSa es su forma inactiva. Adaptado de Molecular Medicine Reports (2020).	23
Figura 1-6 Esquema de Clasificación vesículas extracelulares según su tamaño. Fuente: Elaboración propia.	25
Figura 1-7 Biogénesis formación y secreción de exosomas. Adaptado de Journal of Pharmacy and Healthcare Management (2015).....	26
Figura 1-8 Composición de la vesícula extra celular, adaptado de revista Alergia (2013).	28
Figura 1-9 Esquema resumen del impacto del contenido de las vesículas extracelulares según su origen. Fuente: Elaboración propia.	30

Figura 1-10 a y b) Elevación de mi-RNA por aumento de VE en Ratones NOD (Diabéticos) (c) Presencia de marcadores CD63 y CD9 en VE. Fuente: Elaboración propia.	31
Figura 1-11 La dieta rica en grasas (HFD) altera la composición lipídica de los exosomas liberados por las células epiteliales intestinales.....	33
Figura 1-12 Los exosomas CD63 A33 derivados de ratones HFD inducen resistencia a la insulina en ratones alimentados con una HFD.....	34
Figura 2-1 Esquema de Metodología resumida . Fuente: Elaboración propia..	38
Figura 3-1 Esquema Resumen de la separación de los grupos de estudio según rangos de Hemoglobina glicosilada y Diagnostico del paciente (Diabético, Pre diabético y normoglicémico) Fuente: Elaboración propia.....	48
Figura 3-2 Curva de calibración para la cuantificación de proteínas totales. Fuente: Elaboración propia.	51
Figura 3-3 Curva de calibración para la cuantificación de Vesículas Extracelulares. Fuente: Elaboración propia.	53
Figura 3-4 Funcionamiento DLS. Fuente: Elaboración propia.....	54
Figura 3-5 Curva de calibración para la cuantificación de Almacenamiento de glicógeno. Fuente: Elaboración propia.....	61
Figura 4-1 Cuantificación de proteínas/mL mediante kit DC Total Protein de Bio-Rad. Representación de datos en gráfico de barras mean with SEM de proteínas con RIPA Representación de datos en gráfico de barras mean with SEM de proteínas con RIPA. Realizado por triplicado (*) p 0.05 (**) p 0.01, (***) p 0.005 y (****) p < 0.0001. Fuente: Elaboración propia	66
Figura 4-2 Cuantificación de vesículas extracelulares pequeñas/ mL mediante kit ExoElisa-ULTRA CD63 de System Biosciences A) Representación de datos	

en gráfico de barras mean with SEM. Realizado por triplicado(*) p 0.05 (**) p 0.01, (***) p 0.005 y (****) p < 0.0001Fuente: Elaboración propia. 67

Figura 4-3 Caracterización de marcadores de vesículas extracelulares pequeñas mediante citometría de flujo A) Dot plot control B) Dot plot vesículas extracelulares HbA1c <4.9 C) Dot plot vesículas extracelulares HbA1c 5.0-5.6 D) Dot plot vesículas extracelulares HbA1c 5.7-6.4 E) Dot plot vesículas extracelulares HbA1c 6.5-7.8 F) Dot plot vesículas extracelulares HbA1c 7.9-10 G) Dot plot vesículas extracelulares >10 Fuente: Elaboración propia..... 69

Figura 4-4 Caracterización de tamaño de vesículas extracelulares pequeñas utilizando z-sizer A) Representación de datos en gráfico por Z-Sizer. Fuente: Elaboración propia. 70

Figura 4-5 Caracterización de vesículas extracelulares pequeñas por tamaño mediante Dynamic Light Scattering utilizando Z-Sizer. Graficado en gráfico de barras. Las barras de error indican SEM. Realizado por triplicado (*) p 0.05 (**) p 0.01, (***) p 0.005 y (****) p < 0.0001. Fuente: Elaboración Propia..... 71

Figura 4-6 Nivel de fluorescencia de las Vesículas extracelulares pequeñas a través de Q-bit a 470 nm. Realizado por triplicado (*) p 0.05 (**) p 0.01, (***) p 0.005 y (****) p < 0.0001. Fuente: Elaboración Propia. 71

Figura 4-7 Ensayo de viabilidad de celular Sulforodamina B. Porcentaje de Sobrevivencia de células HEPG2 tratadas con vesículas extracelulares provenientes de pacientes con diferentes rangos de HbA1C. Gráfico mean + SEM. El experimento fue realizado por triplicado. Elaboración propia..... 72

Figura 4-8 Expresión de ARNm de GYS Y PYGM en HEPG-2 tratadas con vesículas extracelulares provenientes de pacientes con diferentes rangos de HbA1C. A) Expresión de ARNm de GYS. B) Expresión de ARNm de PYGM. Gráficos de barras Mean + SEM. Realizado por triplicado (*) p 0.05 (**) p 0.01, (***) p 0.005 y (****) p < 0.0001. Fuente: Elaboración propia. 74

Figura 4-9 Expresión de ARNm de PCK1 Y G6PC en HEPG-2 tratadas con vesículas extracelulares provenientes de pacientes con diferentes rangos de HbA1C. A) Expresión de ARNm de PCK1. B) Expresión de ARNm de G6PC. Gráficos de barras Mean + SEM. Realizado por triplicado (*) p 0.05 (**) p 0.01, (***) p 0.005 y (****) p < 0.0001. Fuente: Elaboración propia. 75

Figura 4-10 Expresión de ARNm de GLUT-4 Y GLUT-2 en HEPG-2 tratadas con vesículas extracelulares provenientes de pacientes con diferentes rangos de HbA1C. A) Expresión de ARNm de GLUT-4. B) Expresión de ARNm de GLUT-2. C) Expresión de ARNm de GLUT-1. Gráficos de barras Mean + SEM. Realizado por triplicado (*) p 0.05 (**) p 0.01, (***) p 0.005 y (****) p < 0.0001. Fuente: Elaboración propia. 76

Figura 4-11 Expresión de ARNm de PKF Y PKM en HEPG-2 tratadas con vesículas extracelulares provenientes de pacientes con diferentes rangos de HbA1C. A) Expresión de ARNm de HKII. B) Expresión de ARNm de PKF. C) Expresión de ARNm de PKM. Gráficos de barras Mean + SEM. Realizado por triplicado (*) p 0.05 (**) p 0.01, (***) p 0.005 y (****) p < 0.0001 Fuente: Elaboración propia. 77

Figura 4-12 Expresión de ARNm de INSR Y IRS-2 en HEPG-2 tratadas con vesículas extracelulares provenientes de pacientes con diferentes rangos de HbA1C. A) Expresión de ARNm de INSR. B) Expresión de ARNm de IRS-2. Gráficos de barras Mean + SEM. Experimento Realizado por triplicado (*) p 0.05 (**) p 0.01, (***) p 0.005 y (****) p < 0.0001. Fuente: Elaboración propia. 78

Figura 4-13 Captación de glucosa 2NBDG a través de citometría de flujo. A) Porcentaje de captación de glucosa 2NBDG en células HEPG2 tratadas con vesículas extracelulares provenientes de pacientes con diferentes rangos de HbA1C. Realizado en triplicado (*) p 0.05 (**) p 0.01, (***) p 0.005 y (****) p < 0.0001. Fuente: Elaboración propia 79

Figura 4-14 Almacenamiento de Glicógeno en células. Acumulación de glicógeno en μg por número de células HEPG2 tratadas con vesículas extracelulares provenientes de pacientes con diferentes rangos de HbA1C. Realizado por triplicado (*) p 0.05 (**) p 0.01, (***) p 0.005 y (****) p < 0.0001. Fuente: Elaboración Propia.....	81
Figura 4-15 Score plot de valores individuales obtenidos de cada rango. Gráfica de elaboración propia	84
Figura 4-16 Gráfico de loadings de las variables en los planos 1-2 . Elaboración propia.....	88
Figura 4-17 Dendrograma ordenado en clúster de la información individual de los pacientes. Gráfica de elaboración propia.	90
Figura 4-18 Score plot de valores individuales obtenidos de cada rango. Gráfica de elaboración propia.	94
Figura 4-19 Gráfico de loadings de las variables en los planos 1-2 . Elaboración propia.....	96
Figura 4-20 Dendrograma ordenado en cluster de la información individual de los pacientes. Gráfica de elaboración propia.	98
Figura 5-1 Esquema resumen de la expresión de las vías relacionadas a la glucosa y almacenamiento de glicógeno del Rango 3. Fuente: Elaboración Propia	110
Figura 5-2 Esquema resumen de la expresión de las vías relacionadas a la glucosa y almacenamiento de glicógeno del Rango 6. Fuente: Elaboración Propia	111

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3-1. Muestras ordenadas según rangos de Hemoglobina Glicosilada (HbA1C).....	41
Tabla 3-2 Número de pacientes reclutados en cada Grupo y el porcentaje de cada subdivisión.	49
Tabla 4-1 Resumen de los resultados obtenidos por rango de cada uno de los parámetros clínicos relacionados a glicemia y perfil lipídico	83
Tabla 4-2 Resumen de los resultados obtenidos por rango de cada uno de los ensayos funcionales.	91
Tabla 3-1. Muestras ordenadas según rangos de Hemoglobina Glicosilada (HbA1C).....	41
Tabla 3-2 Número de pacientes reclutados en cada Grupo y el porcentaje de cada subdivisión.	49
Tabla 4-1 Resumen de los resultados obtenidos por rango de cada uno de los parámetros clínicos relacionados a glicemia y perfil lipídico	83
Tabla 4-2 Resumen de los resultados obtenidos por rango de cada uno de los ensayos funcionales.	91

RESUMEN

La Diabetes Mellitus es una enfermedad crónica que afecta a una gran cantidad de personas en todo el mundo y su incidencia continúa aumentando. Se caracteriza por niveles elevados de glucosa en la sangre debido a problemas en la producción o utilización de insulina. La clasificación incluye diabetes tipo I, gestacional y tipo II (DMT2), siendo esta última la más común y se caracteriza por resistencia a la insulina periférica. La insulina es crucial en la regulación de la glucosa, especialmente en el hígado, donde se ven afectados procesos como la glicólisis y la gluconeogénesis bajo condiciones de resistencia a la insulina. La hemoglobina glicosilada (HbA1c), indicador de glucemia a largo plazo, es vital para el diagnóstico y control de la diabetes, con niveles elevados asociados a mayores riesgos de complicaciones.

Las vesículas extracelulares (VE) desempeñan un papel importante en la comunicación celular y contienen moléculas bioactivas que pueden modular el metabolismo de la glucosa y los lípidos por lo que proponemos que las VE de pacientes con altos niveles de HbA1c inducen disfunción metabólica en células hepáticas HepG2, manifestada por cambios en la expresión de ARNm de proteínas metabólicas y en la captación de glucosa y acumulación de glucógeno. El objetivo de este trabajo fue Evaluar el efecto de las vesículas extracelulares de pacientes con diferentes niveles de HbA1c en el metabolismo de la glucosa en células hepáticas HepG2.

La metodología incluyó la obtención de VE de pacientes con diferentes niveles de HbA1c y su exposición a células HepG2 para evaluar la expresión génica y la captación de glucosa y glucógeno.

Los resultados mostraron una correlación positiva entre los niveles de HbA1c y el tamaño de las VE, junto con cambios en la expresión génica y en los niveles de glucosa y glucógeno en las células hepáticas. Estos hallazgos resaltan el potencial de las VE como biomarcadores tempranos de disfunción metabólica y sugieren nuevas vías para el diagnóstico y tratamiento de la diabetes. En resumen, las VE ejercen una influencia metabólica significativa en el tejido hepático, lo que podría sugerir nuevas estrategias de tratamiento para la diabetes.

ABSTRACT

Diabetes Mellitus is a prevalent chronic disease, significantly impacting global healthcare systems with over 400 million diagnosed cases worldwide. The classification includes type I, gestational and type II diabetes (T2DM), the latter being the most common and is characterized by peripheral insulin resistance. Insulin is crucial in glucose regulation, especially in the liver, where processes such as glycolysis and gluconeogenesis are affected under conditions of insulin resistance. Glycosylated hemoglobin (HbA1c), an indicator of long-term glycemia, is vital for the diagnosis and control of diabetes, with elevated levels associated with increased risk of complications.

Extracellular vesicles (EVs) play an important role in cellular communication and contain bioactive molecules capable of modulating glucose and lipid metabolism. This thesis posits that EVs from patients with elevated HbA1c levels induce levels dysfunction in HepG2 liver cells, manifested by changes in mRNA expression of metabolic proteins and in glucose uptake and glycogen accumulation. The aim of this work was to evaluate the effect of extracellular vesicles from patients with different HbA1c levels on glucose metabolism.

The project aims to evaluate the impact of EVs from patients with differing HbA1c levels on glucose metabolism in Hepatic cells (HepG2). Findings reveal a correlation between elevated glycosylated hemoglobin levels and altered

extracellular vesicle characteristics, alongside impaired glucose uptake and glycogen storage. Statistical analyses underscore the significance of glycemia and glycosylated hemoglobin parameters in explaining clinical variations, supporting functional test outcomes.

The methodology included obtaining EVs from patients with different HbA1c levels and exposing them to HepG2 cells to assess gene expression and glucose and glycogen uptake.

The results showed a positive correlation between HbA1c levels and EV size, along with changes in gene expression and glucose and glycogen levels in liver cells. These findings highlight the potential of EVs as early biomarkers of metabolic dysfunction and suggest new avenues for the diagnosis and treatment of diabetes. In summary, EVs exert significant metabolic influence on liver tissue, which may suggest new treatment strategies for diabetes.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Diabetes Mellitus

1.1.1 Panorama mundial

La Diabetes Mellitus (DM) es una de las patologías crónicas con mayor prevalencia a nivel mundial, alrededor de 537 millones de personas la padecen. Las cifras relacionadas a esta patología han aumentado de forma preocupante en las últimas décadas. En el año 1980 cerca de 108 millones de personas la padecían, ya para el año 2014 este número había aumentado su valor 4 veces. Se estima que en el año 2030 esta cifra aumente a 643 millones de personas (Federartion, 2021).

En el año 2019 la Diabetes Mellitus fue la causa directa de la muerte de 1.5 millones de personas a nivel mundial, donde el 48% de ellas fueron pacientes mayores a 70 años. Chile no está exento a este tipo de cifras, el año 2014 se estimaba que más del 12% de la población padecía de Diabetes Mellitus, siendo la prevalencia más alta en toda América Latina. (Srur, 2016). La Diabetes Mellitus tipo II (DMT2) es la forma más común de diabetes. Al respecto, en Chile la prevalencia de DMT2 pasó de 4.4% en 2006 a 12,6% en 2017 (Espinoza et al., 2022). Esta cifra representa una de las prevalencias más altas de diabetes en América Latina. Además, se proyecta que la prevalencia de la diabetes seguirá aumentando en el país debido a factores como el envejecimiento de la población, los cambios en los estilos de vida y el aumento de la obesidad. Se estima que

para el año 2045, la prevalencia de la diabetes en Chile alcanzará el 18,6% de la población adulta, lo que significaría un incremento significativo en comparación con las cifras actuales.

1.1.2 Diabetes y Salud pública

Debido a la preocupante alza en las cifras de la diabetes mellitus, el año 2016 la OMS generó un informe donde declaró que la diabetes mellitus es una de las 4 patologías no transmisibles en las que se debe intervenir de forma prioritaria (Chan, 2016). En este informe se destaca el por qué esta patología es un problema de salud pública, ya que además de tener una alta prevalencia, también existe una dificultad en el diagnóstico temprano, sumado a la baja o nula adherencia de los pacientes al tratamiento, lo cual afecta en las cifras de comorbilidades generadas por la diabetes. A pesar de esta alerta, las cifras no han descendido como se espera y los números siguen aumentando de forma considerable. Se estima que para el año 2045 existan más de 738 millones de diabéticos a nivel mundial.

Encuestas más recientes, como la realizada por la federación internacional de Diabetes (Federation) en el año 2021, indica que 3 de cada 4 personas diabéticas son personas de escasos recursos y de países menos desarrollados. Es por esto, que la diabetes es considerada como una patología difícil de tratar. Se requiere que el paciente tenga buena alimentación y realice actividad física

de forma constante, además del tratamiento farmacológico. A veces estas medidas terapéuticas no son compatibles con el estilo de vida del paciente, por la situación económica personal y familiar. Junto con esto, aproximadamente el 40% de la población a nivel mundial cursa la enfermedad sin ser diagnosticada, lo que agrava el panorama actual. (Federartion, 2021).

El aumento de la diabetes conlleva desafíos para el sistema de salud, ya que esta enfermedad crónica tiene mayor riesgo de complicaciones graves, como enfermedades cardiovasculares, renal crónica, neuropatías y retinopatías (figura 1-1) (Ndisang et al., 2017). Estas complicaciones tienen un impacto significativo en la calidad de vida de los pacientes y generan una mayor carga económica para el sistema de salud.

En Chile, existen pocos reportes que mencionan esta patología y los desafíos que esta conlleva a nivel nacional, el más reciente es el compendio de Diabetes en Chile, publicado el año 2015. Según este reporte, alrededor de 1,5 millones de personas padecían Diabetes Mellitus para esa fecha y que las personas con menores niveles de educación tenían un 50% más de riesgo de padecer esta patología.

En nuestro país, la diabetes es una de las principales causas de aparición de complicaciones/comorbilidades debilitantes y costosas como lo es enfermedad renal. En el año 2014, Chile gastó 21,2 mil millones de dólares en asistencia sanitaria, de los cuales el 10,2% se destinó a la diabetes. Esto da un promedio

de 1.427 dólares por persona con diabetes. (Srur, 2016). A pesar de las altas cifras de diabetes, no se le está dando la relevancia que debería. Ante situación sanitaria, es fundamental implementar estrategias de prevención y control de la diabetes en Chile, incluyendo la promoción de estilos de vida saludables, la educación sobre la enfermedad, el acceso adecuado a servicios de atención médica y la detección temprana de la diabetes y sus complicaciones. De esta manera, se podría mitigar el impacto de la diabetes en la población y mejorar la salud y el bienestar de los chilenos.

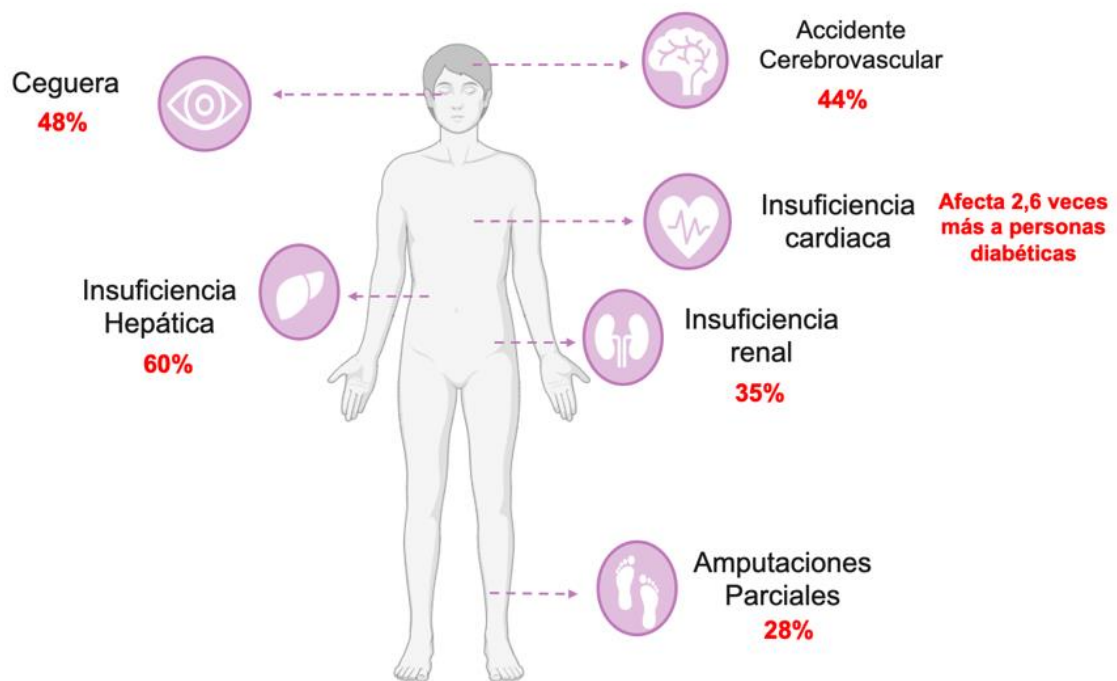


Figura 1-1 Esquema resumen consecuencias DMT2. Elaboración propia.

1.1.3 Clasificación de la Diabetes

La Diabetes Mellitus (DM) se clasifica en tres subtipos: Diabetes Mellitus Gestacional (DMG), diabetes Mellitus Tipo I (DMT1) y diabetes Mellitus Tipo II (DMT2). En las tres condiciones de DM existe un estado de hiperglucemia crónica, sin embargo, los orígenes que conducen a cada tipo de diabetes son diferentes. En términos simples, podemos decir que:

La Diabetes Mellitus Gestacional se define como cualquier grado de intolerancia a la glucosa, que aparece en el embarazo por primera vez (Medina-Pérez, 2017).

La Diabetes Mellitus Tipo I DMT1 es una patología crónica autoinmune, que cursa con la destrucción de las células β del páncreas. Como respuesta se produce muy poca o nada de insulina, imposibilitando la metabolización de glucosa y por ende generando una hiperglucemia (Federartion, 2021).

La Diabetes Mellitus tipo 2 (DMT2) es la forma más común de diabetes, afectando cerca del 90 % de la población diabética. Esta enfermedad se caracteriza por una respuesta inadecuada a la insulina o insulino-resistencia (IR), lo que significa que las células del organismo no responden de manera efectiva a la insulina.

Independiente del tipo de diabetes, el control de los niveles de glucosa en sangre, adoptar una dieta saludable, realizar actividad física regular y, en algunos casos, el uso de medicamentos son parte integral del tratamiento de la diabetes (Federartion, 2021).

1.1.4 Diabetes Mellitus Tipo II

1.1.4.1 Fisiopatología

La diabetes tipo II (DMT2) es una enfermedad metabólica caracterizada por resistencia a la insulina y deficiencia relativa de esta hormona. En condiciones normales, la insulina facilita la absorción de glucosa en las células, donde se utiliza como fuente de energía o se almacena como glucógeno. Sin embargo, en DMT2, las células no responden adecuadamente a la insulina, lo que provoca un aumento de los niveles de glucosa en sangre (hiperglucemia). En un intento de compensar la falta de respuesta a la insulina, las células beta del páncreas aumentan la producción de insulina para promover una mayor captación de glucosa. Con el tiempo, el páncreas puede disminuir la producción de insulina, empeorando la situación. Aunque ambos signos existen en etapas tempranas de la DMT2 y contribuyen al desarrollo y amplificación de la patología, la disfunción de las células β del páncreas suele ser más grave que la IR cuando se observan por separado (Galicia-Garcia et al., 2020).

La obesidad, el estilo de vida sedentario y la predisposición genética e historial familiar son factores de riesgo comunes. Estudios demuestran que los antecedentes familiares aumentan la predisposición a la enfermedad. Aunque influyen, no determinan por completo su desarrollo, ya que factores modificables como una dieta equilibrada, ejercicio y peso saludable también inciden (Leiva et al., 2018).

1.1.4.2 Patogenia

La incapacidad de los tejidos periféricos para responder adecuadamente a la insulina o estado de insulina resistencia, especialmente en el músculo esquelético, el tejido adiposo y el hígado es el eje angular de la DMT2. No obstante, existen otros actores que contribuyen a la hiperglicemia crónica y a la patogenia de la DMT2.

La patogenia de la DMT2 también se puede resumir en el octeto ominoso también conocido como el “octeto del mal agüero” (figura 1-2) que explica los 8 mecanismos que suelen caracterizar a esta patología (Cipriani-Thorne & Quintanilla, 2010). Estos incluyen:

1. **Hiperproducción hepática de glucosa:** El hígado aumenta la producción de glucosa en exceso, exacerbando la hiperglicemia (DeFronzo, 2018).
2. **Disminución de la captación periférica de glucosa:** Las células periféricas muestran una reducción en la captación de glucosa, exacerbando la resistencia a la insulina (DeFronzo, 2018).
3. **Hipersecreción de glucagón:** Las células alfa del páncreas aumentan la secreción de glucagón, promoviendo la producción y liberación de glucosa por el hígado (DeFronzo, R. 2018).

4. **Disminución de la secreción de insulina:** Las células beta pancreáticas pierden gradualmente su capacidad para secretar insulina en respuesta a la glucosa, contribuyendo a la hiperglicemia (DeFronzo, R. 2018).
5. **Incremento de la lipólisis:** La liberación aumentada de ácidos grasos libres desde el tejido adiposo aumenta la producción hepática de glucosa y la resistencia a la insulina (DeFronzo, R. 2018).
6. **Disminución del efecto incretina:** Se produce una respuesta inadecuada de las hormonas incretinas gastrointestinales, como el péptido similar al glucagón-1 (GLP-1) y el péptido insulíntrópico dependiente de glucosa (GIP), a la ingesta de alimentos. La disminución de la secreción de incretinas conduce a una respuesta insuficiente de la insulina en el páncreas y una mayor producción de glucagón en las células alfa pancreáticas. Esto contribuye a un aumento de la producción hepática de glucosa y una disminución de la captación periférica de glucosa, exacerbando así la hiperglucemia crónica (DeFronzo, R. 2018).
7. **Aumento de la reabsorción renal de glucosa:** Se incrementa la reabsorción de glucosa en los túbulos renales, contribuyendo a la hiperglicemia (Solis-Herrera et al., 2021).
8. **Disfunción de la secreción de neurotransmisores.** Esta disfunción involucra la alteración de los neurotransmisores en el cerebro que regulan la utilización de glucosa y la ingesta de alimentos, como la serotonina y la dopamina (DeFronzo, R. 2018).

Si bien, estos mecanismos se entrelazan y se potencian mutuamente, contribuyendo a la progresión de la hiperglicemia crónica y la patología asociada en la DMT2. La resistencia a la insulina hepática es un factor clave del octeto, el que resulta en una incapacidad del hígado para suprimir la producción de glucosa mediante la gluconeogénesis y la glucogenólisis, contribuyendo directamente a niveles elevados de glucosa en sangre. Además, la acumulación de lípidos hepáticos, parte del proceso conocido como esteatosis hepática, agrava aún más la resistencia a la insulina y promueve la sobreproducción de glucosa. Estos mecanismos son fundamentales en la patogénesis de la hiperglicemia crónica en la DMT2, integrándose crucialmente en el complejo entramado del octeto ominoso.

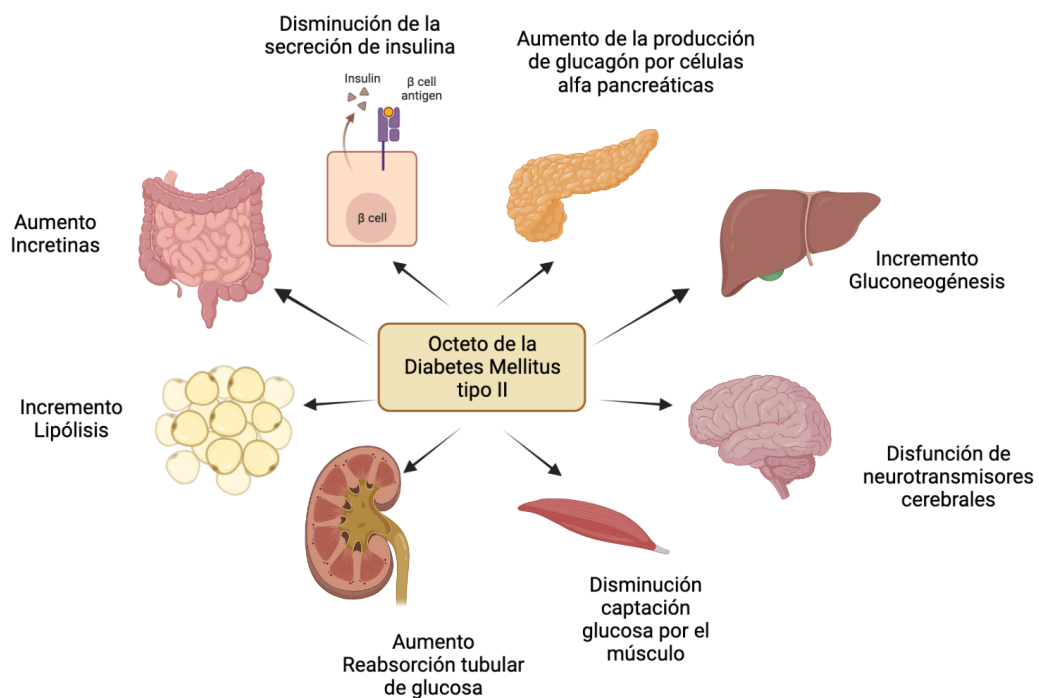


Figura 1-2 Esquema resumido del Octeto Ominoso. Elaboración propia.

1.1.4.3 Seguimiento y control

Para evaluar la progresión de la patología y diseñar estrategias de intervención, se establecen planes de alimentación personalizados y se prescribe tratamiento farmacológico según la necesidad del paciente. La guía clínica establecida por el Ministerio de Salud (Maiz.) en 2017 para el diagnóstico y tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), define un algoritmo para orientar el manejo de los pacientes después del diagnóstico (figura 1-3). En esta guía, se enfatiza la importancia de la actividad física regular como parte integral del manejo de la enfermedad. Además, se recomienda realizar seguimientos clínicos periódicos para monitorear la evolución de la enfermedad y ajustar el tratamiento según sea necesario.

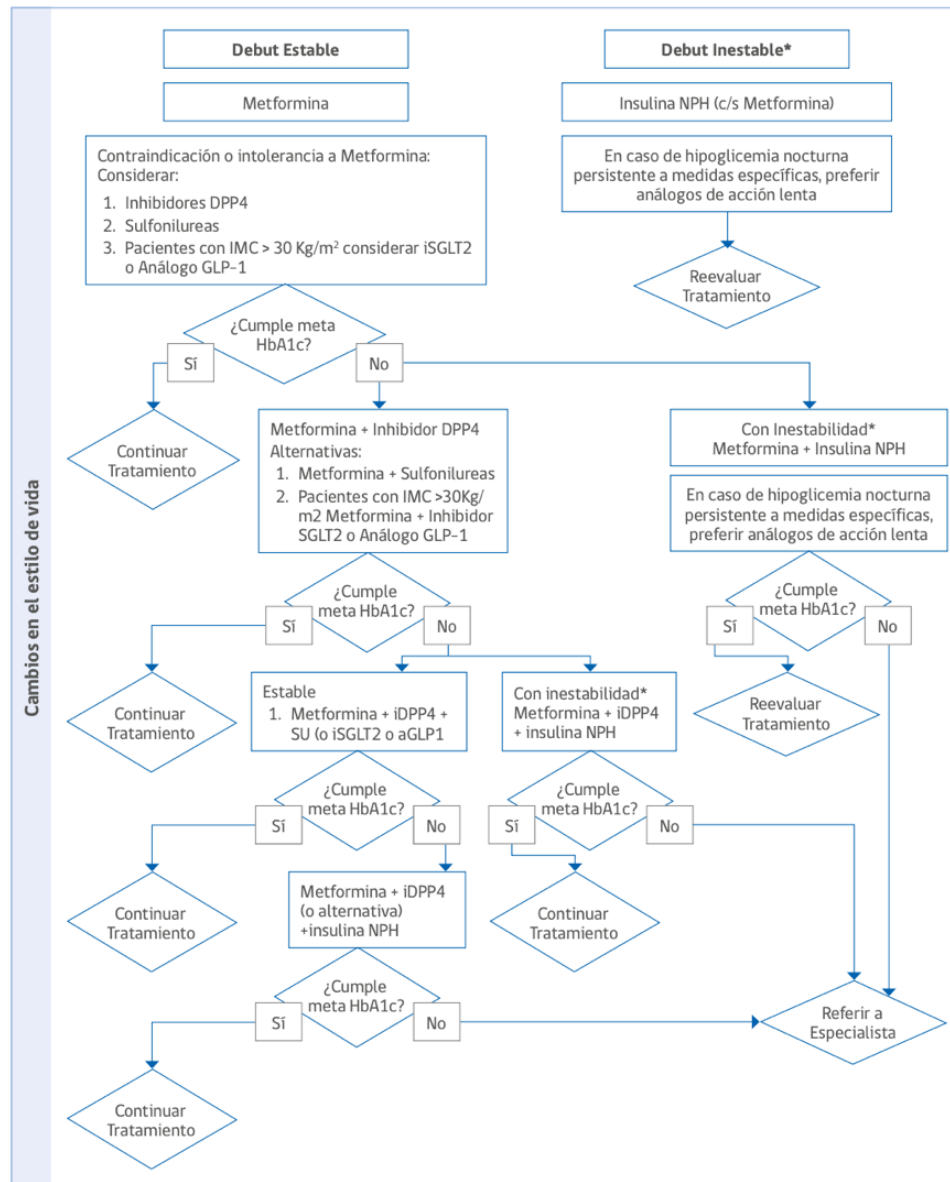


Figura 1-3 Algoritmo tratamiento DMT2 para Debut estable e inestable (Debut Inestable/Inestabilidad: Sintomático (poliuria, polidipsia, baja de peso) y Glicemia >300 mg/dL o HbA1c >9%). Adaptado de guía MINSAL tratamiento farmacología de la DMT2 (2016)

Medir los niveles de hemoglobina glucosilada (HbA1c) es fundamental para el seguimiento y realizar ajustes terapéuticos en el paciente DMT2 (Gancedo Martínez et al., 2006). La HbA1c refleja los niveles promedio de glucosa en

sangre de 2 a 3 meses, proporcionando una evaluación a largo plazo del control glucémico. Esta medida es crucial ya que la hiperglucemia crónica está estrechamente relacionada con el desarrollo de complicaciones microvasculares y macrovasculares en pacientes diabéticos (Germán Campuzano-Maya, 2010) (figura 1-4). Los niveles elevados de HbA1c se asocian con un mayor riesgo de retinopatía, neuropatía, nefropatía, enfermedad cardiovascular y accidente cerebrovascular. Por lo tanto, mantener los niveles de HbA1c en los rangos objetivo, es fundamental para reducir el riesgo de estas complicaciones. La monitorización regular de la HbA1c permite evaluar la efectividad del tratamiento y realizar ajustes terapéuticos oportunos para lograr y mantener un adecuado control glucémico, mejorando así el pronóstico y la calidad de vida de los pacientes con diabetes (Pellegrini, 2021).

HbA1c	Glicemia Promedio	Riesgo de complicaciones
< 4.9	< 96 mg/dL	Muy Bajo
5.0 – 5.6	97 -110 mg/dL	Bajo
5.7 – 6.4	111-140 mg/dL	Moderado
6.4 – 7.8	141- 170 mg/dL	Alto
7.9 - 10	170 -240 mg/dL	Aumentado
> 10	> 241 mg/dL	Crítico

Figura 1-4 Tabla adaptada de los niveles de hemoglobina glicosilada, la glicemia

promedio dentro de un rango de 3 meses y las complicaciones de mantener este nivel en el tiempo. Adaptada de Understanding A1c de ADA (2010) y Recomendaciones sobre el uso de departamento laboratorio biomédico nacional y de referencia hemoglobina glicada A1c (HbA1c) en el diagnóstico de diabetes mellitus (2021).

1.2. Metabolismo

1.2.1 Generalidades

Los seres humanos, dependen del metabolismo celular para mantener la homeostasis y crecimiento. El metabolismo, es un conjunto de reacciones bioquímicas, que convierten los nutrientes en energía y componentes celulares. Para ello, organismos multicelulares como los mamíferos consumen nutrientes, que sirven como sustratos metabólicos. El equilibrio en la ingesta es crucial, ya que el exceso o la deficiencia de ciertos nutrientes pueden afectar el metabolismo. Una dieta balanceada y variada es fundamental para garantizar que el cuerpo obtenga los nutrientes necesarios en las cantidades adecuadas, asegurando así un funcionamiento metabólico óptimo y la salud general (Ward & Thompson, 2012).

La Diabetes Mellitus ejerce un profundo impacto metabólico en tres tejidos clave: el muscular, el adiposo y el hepático. Estos sistemas, interconectados, trabajan en conjunto para mantener la homeostasis. Sin embargo, la desregulación de la diabetes interrumpe este equilibrio, llevando a deficiencias multisistémicas. De especial interés es el metabolismo hepático, donde se desencadenan procesos

cruciales para el control glucémico. El hígado desempeña un papel central en la regulación de los niveles de glucosa en sangre. Por lo tanto, comprender los cambios metabólicos hepáticos en la diabetes es fundamental para abordar sus complicaciones sistémicas (Daryabor et al., 2020). Para estudios relacionados con función hepática, se utiliza la línea celular HepG2, esta línea célula proviene de un hepatoma humano que se utiliza habitualmente en estudios sobre metabolismo y hepatotoxicidad. Las células HepG2 son células no tumorigénicas con altas tasas de proliferación y una morfología de tipo epitelial que desempeñan muchas funciones hepáticas diferenciadas.

1.2.2 Vía de señalización de Insulina

La vía de señalización de la insulina implica la activación de su receptor de membrana, desencadenando una serie de eventos intracelulares. Una vez que la insulina se une a su receptor, este activa una tirosina quinasa intrínseca, que fosforila residuos de tirosina en el propio receptor y en proteínas de sustrato del receptor (IRS).

Los sustratos de insulina IRS 1 e IRS 2 son proteínas adaptadoras que se fosforilan en residuos de tirosina tras la activación del receptor de insulina (Dong et al., 2006). Estas proteínas fosforiladas sirven como anclaje para reclutar y activar otras proteínas de señalización intracelular, como la fosfatidilinositol 3-

cinasa (PI3K) (Miyake et al., 2002) y la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) (Lawan et al., 2015) .

La activación de PI3K por los IRS promueve la fosforilación de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) a fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3), lo que conduce a la activación de la proteína quinasa B (PKB o Akt). Akt juega un papel crucial en la regulación de la captación de glucosa, la síntesis de glucógeno y la supervivencia celular. Akt también promueve la translocación del transportador de glucosa GLUT4 a la membrana celular, facilitando la entrada de glucosa en la célula.

Además, la insulina regula la expresión y actividad de otros transportadores de glucosa, como GLUT1 y GLUT2. GLUT1 está presente en diversas células y su expresión puede aumentar en respuesta a la insulina en algunos tejidos. GLUT2, por otro lado, se encuentra en el hígado y en las células beta pancreáticas, y su expresión no está regulada por la insulina, aunque su actividad puede verse afectada por cambios en los niveles de insulina y glucosa.

En resumen, insulina es un potente regulador del metabolismo celular con efectos en diferentes órganos, incluyendo el hígado.

1.2.3 Metabolismo Hepático y diabetes

La Diabetes Mellitus se caracteriza por asociarse con una serie de anormalidades hepáticas incluso hígado graso. El hígado, participa en la mantención de la homeostasis de la glucosa. Los sistemas principales que contribuyen a la

homeostasis de la glucosa incluyen la glucogénesis, síntesis de glucógeno (glucogenesis), glicólisis y gluconeogénesis (Jiang et al., 2020). A continuación, cada uno de estos procesos serán explicados.

1.2.4 Glicólisis

Las células hepáticas captan glucosa a través de transportadores de glucosa, siendo el transportador principal GLUT2. GLUT2 tiene una afinidad baja por glucosa y es responsable de la captación de glucosa hepática cuando los niveles de glucosa en la sangre son altos. La captación de glucosa se regula en respuesta a la concentración de glucosa en la sangre y a la acción de la insulina (Herzig & Shaw, 2018)

Posterior a la entrada de glucosa a la célula, se inicia una cascada de eventos, que conducen a la utilización de glucosa vía glicólisis y al almacenamiento de ésta a través de la glucogenogénesis. La glicólisis es una vía central del metabolismo de la glucosa, que lleva a la síntesis de energía a la forma de ATP. La glicólisis tiene varias etapas, cuyo avance depende de la actividad de enzimas reguladoras. Tales como, Hexoquinasa, enzima que regula la entrada de glucosa a la vía glucolítica al catalizar la fosforilación de la glucosa (Roberts & Miyamoto, 2015). Fosfofructoquinasa-1, esta enzima es considerada el punto de control principal de la glicólisis, cataliza la conversión de fructosa-6-fosfato a fructosa-1,6-bisfosfato. Es activada por altas concentraciones de fructosa-2,6-bisfosfato y

AMP, y es inhibida por altas concentraciones de ATP y citrato (Webb et al., 2015). Piruvatoquinasa, que cataliza la conversión del fosfoenolpiruvato en piruvato, generando ATP. Esta enzima es regulada por la concentración de ATP y alanina. Estas enzimas claves están sujetas a regulación hormonal, alostérica y también pueden ser controladas por modificaciones como la fosforilación o desfosforilación. Estos mecanismos de regulación permiten ajustar la velocidad de la glicólisis de acuerdo con las necesidades energéticas y metabólicas de la célula. Estas tres enzimas son reguladas en forma positiva por insulina y por glucosa. Por el contrario, el estrés oxidativo y la inflamación actúan como reguladores negativos de la actividad de la fosfofructoquinasa y piruvato quinasa, lo que reduce la velocidad de la glicólisis y afecta la producción de ATP (Li et al., 2015) .

Además de lo mencionado, insulina estimula la glicólisis al promover la síntesis y activación de la proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK) en el hígado. La activación de AMPK suprime la gluconeogénesis (proceso de producción de glucosa en el hígado) y favorece la glicólisis. Así mismo, la insulina también regula la expresión de enzimas glicolíticas y factores de transcripción, como el factor inducible por hipoxia 1 alfa (HIF-1 α), que promueve la expresión de enzimas glicolíticas en condiciones de hipoxia.

En este sentido, es importante investigar cómo la glicólisis hepática y su regulación por la insulina se ven afectadas en condiciones patológicas, como la

DMT2. Comprender cómo se alteran estos procesos en DMT2 puede ayudar a identificar nuevos objetivos terapéuticos y estrategias de tratamiento.

Se ha sugerido que las vesículas extracelulares, al transportar proteínas, lípidos y material genético, tienen la capacidad de transmitir información y moléculas bioactivas entre las células. En el contexto de la glicólisis hepática y la captación de glucosa, se ha postulado que las vesículas extracelulares podrían transportar enzimas glicolíticas, transportadores de glucosa y moléculas regulatorias relacionadas con la insulina que tendrían la capacidad de modular el metabolismo glucídico.

1.2.5 Gluconeogénesis

La gluconeogénesis es un proceso metabólico esencial que ocurre predominantemente en el hígado, aunque también puede ocurrir en menor medida en los riñones. Se encarga de sintetizar glucosa a partir de precursores no glucídicos, como lactato, aminoácidos y glicerol, asegurando así la disponibilidad de glucosa para los tejidos durante períodos de ayuno prolongado o alta demanda energética. Este proceso se desencadena en situaciones en las que los niveles de glucosa en sangre disminuyen, como durante el ayuno, el ejercicio prolongado o en condiciones de hipoglucemia (Hatting et al., 2018) .

Las enzimas clave en la gluconeogénesis incluyen el piruvato carboxilasa, que convierte el piruvato en oxaloacetato; el fosfoenolpiruvato carboxiquinasa

(PCK1), que cataliza la conversión del oxaloacetato a fosfoenolpiruvato; y la glucosa-6-fosfatasa (G6PC), que participa en la última etapa de la síntesis de glucosa al catalizar la conversión de glucosa-6-fosfato a glucosa libre. Otros intermediarios y enzimas, como la fructosa-1,6-bisfosfatasa, también son fundamentales en el control de esta vía metabólica (Hatting et al., 2018).

La regulación de la gluconeogénesis es compleja y está influenciada por diversos factores, entre ellos, las concentraciones de sustratos, hormonas y factores de transcripción. La insulina, una hormona clave en el metabolismo de la glucosa, tiene un efecto inhibitor sobre la gluconeogénesis, actuando para disminuir la síntesis de glucosa en el hígado y promover su almacenamiento en forma de glucógeno. La insulina puede regular la gluconeogénesis hepática mediante la transcripción de genes implicados en el control gluconeogénico, incluidos *PCK1* y *G6PC* (Barthel & Schmoll, 2003)

Sin embargo, en DMT2, se observa una resistencia a la acción de la insulina, lo que conduce a una mayor gluconeogénesis y contribuye a la hiperglucemia crónica característica de esta enfermedad metabólica. En pacientes con DMT2, se ha identificado la gluconeogénesis como la principal fuente de producción de glucosa (Magnusson et al., 1992)

1.2.6 Glucogenogénesis y Glucogenólisis

Cuando los niveles de glucosa en el organismo aumentan, se desencadena una respuesta fisiológica que lleva a la acumulación de glucógeno (Adeva-Andany et al., 2016). Durante la alimentación, esta acumulación en el hígado proporciona una reserva de glucosa utilizada en períodos de ayuno (Han et al., 2016). La glucosa no utilizada de inmediato se convierte y almacena como glucógeno mediante la glucogenogénesis hepática, y estas reservas se movilizan a través de la glucogenólisis cuando se requieren (Lang & Hussain, 2014).

La glucogenogénesis se produce en varias etapas, comenzando con la conversión de glucosa-6-fosfato a glucosa-1-fosfato mediante la enzima glucosa-6-fosfatasa. Luego, la glucosa-1-fosfato se convierte en UDP-glucosa mediante la enzima glucógeno sintasa (GYS), siendo esta enzima clave en este proceso. Por otro lado, la glucogenólisis implica la acción de la enzima glucógeno fosforilasa (PYGM), que cataliza la liberación de glucosa-1-fosfato del glucógeno. A su vez, la glucosa-1-fosfato se convierte en glucosa-6-fosfato gracias a la acción de la fosfoglucomutasa, permitiendo que la glucosa ingrese en la vía glucolítica. En este mismo sentido, insulina activa la glucógeno sintetasa (GYS) que participa en la síntesis de glucógeno e inactiva la glucógeno fosforilasa

(PYGM) que es la enzima que induce su degradación (Jiang et al., 2020 2020) (figura 1-4).

1.2.7 Regulación del Metabolismo

El hígado desempeña un papel central en el metabolismo de la glucosa, regulando cuidadosamente sus niveles en la sangre para mantener la homeostasis metabólica. Esta regulación es vital para asegurar un suministro constante de energía a los tejidos del organismo, mientras se evita la hiperglucemia o la hipoglucemia. Esta regulación implica una compleja interacción hormonal entre el glucagón y la insulina. Durante el ayuno, el glucagón liberado por las células α pancreáticas induce la producción de glucosa a partir de precursores no glucídicos a través de la gluconeogénesis, y libera glucosa almacenada en forma de glucógeno mediante la glucogenólisis para satisfacer las demandas energéticas del cuerpo (Rines et al., 2016). Por el contrario, después de comer, las células β pancreáticas secretan insulina para inhibir estos procesos, estimulando la captación de glucosa por parte del hígado, promoviendo su almacenamiento como glucógeno a través de la glucogenogénesis. La regulación precisa del metabolismo de la glucosa en el hígado es esencial para mantener la homeostasis metabólica en el organismo. Esta regulación involucra una compleja interacción entre diferentes señales

hormonales y vías metabólicas para ajustar la producción y liberación de glucosa según las necesidades energéticas del cuerpo.

Recientemente se ha demostrado que la disfunción metabólica se asocia con cambios en las concentraciones plasmáticas de vesículas extracelulares, así como con alteraciones en su carga. Estas vesículas se han propuesto como un nuevo modo de comunicación intercelular y que participan en la regulación metabólica sistémica (Akbar et al., 2019)

La comprensión de la interacción entre las vesículas extracelulares y la regulación del metabolismo hepático de la glucosa abre nuevas perspectivas en el campo de la fisiología metabólica. Investigaciones futuras dirigidas a elucidar el papel específico de las VE en la comunicación entre diferentes tejidos metabólicos podrían proporcionar nuevas estrategias terapéuticas para abordar trastornos metabólicos como la diabetes tipo 2.

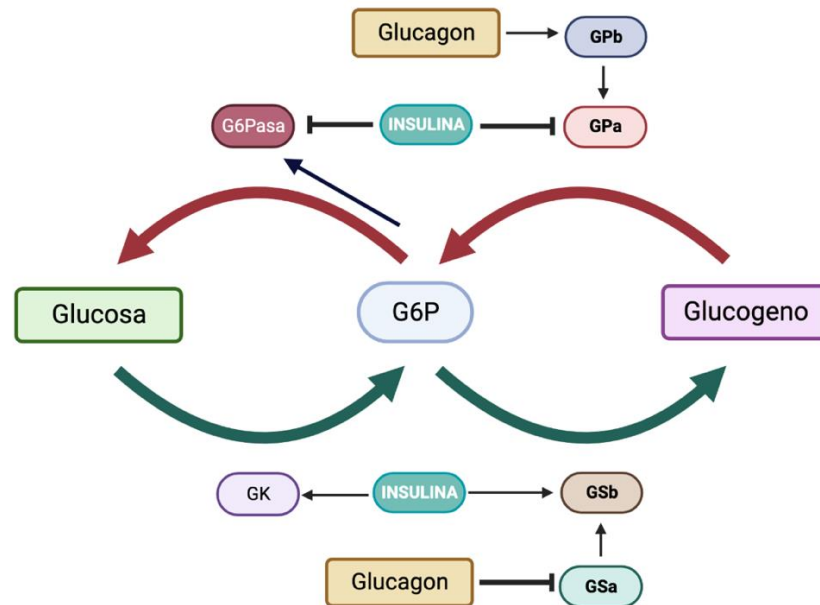


Figura 1-5 Metabolización de la glucosa en el hígado para convertirse a glucógeno en donde la glucosa 6 fosfato (G6P), GK es glucoquinasa, GPa es la forma activa de la glucosa fosforilasa (GP) y GPb es la forma inactiva. A la inversa, GSb es la forma activa de la glucosa sintasa (GS) y GSa es su forma inactiva. Adaptado de Molecular Medicine Reports (2020).

1.3. Vesículas extracelulares

1.3.1 Generalidades

El metabolismo se regula mediante un intrincado sistema que cuenta con diversos mecanismos para prevenir desequilibrios. Uno de estos mecanismos es la comunicación celular, que se produce a través de múltiples vías, como las hormonas, citoquinas y las vesículas extracelulares (VE) (Sarker et al., 2014). Las VE son definidas como una población heterogénea de vesículas de membrana derivadas de células, con la capacidad de mediar la comunicación celular. Fueron descritas por primera vez en el año 1967 por Wolf como “*polvo peleado*” obtenidas desde plasma sanguíneo. Se pensaba que las VE eran un sistema de excreción de desecho celular. A fines de los años 80, se describieron las estructuras de las VE. Durante los años 90, una gran cantidad de investigadores comenzaron a cuantificar VE, encontrando que el número se veía alterado en ciertas patologías. Investigaciones de Johnstone señalaban ciertas funciones biológicas, como actividad enzimática, asociadas con estas vesículas. Investigaciones más recientes han demostrado que las VE pueden desencadenar cambios en estados patológicos y tienen la capacidad de influir en la función de las células receptoras, lo que destaca su relevancia como medio de comunicación celular. (Couch et al., 2021).

3.2 Clasificación de las VE

Actualmente, las VE son definidas como estructuras de bicapa lipídica que miden desde 50 nm a varios micrómetros, las cuales son secretadas de una multitud de células diferentes incluidos trofoblastos, eritrocitos, células endoteliales, etc. Con base en su biogénesis y propiedades físicas, las VE a menudo se clasifican como VE pequeños (incluidos los exosomas) o VE grandes (incluidos ectosomas o microvesículas, migrasomas, cuerpos apoptóticos) y oncosomas grandes, como se describe en la figura 5 (Salomon et al., 2022).

Actualmente, el término "Exosoma" se ha utilizado para referirse a los VE de ~30 a 150 nm de diámetro que se forman a través de la gemación de la membrana interna de los cuerpos multivesiculares (MVB). El contenido de dichos VE puede estar regulado por complejos de clasificación endosomal, mecanismo que puede contribuir aún más a la heterogeneidad de las vesículas (figura 1-6).

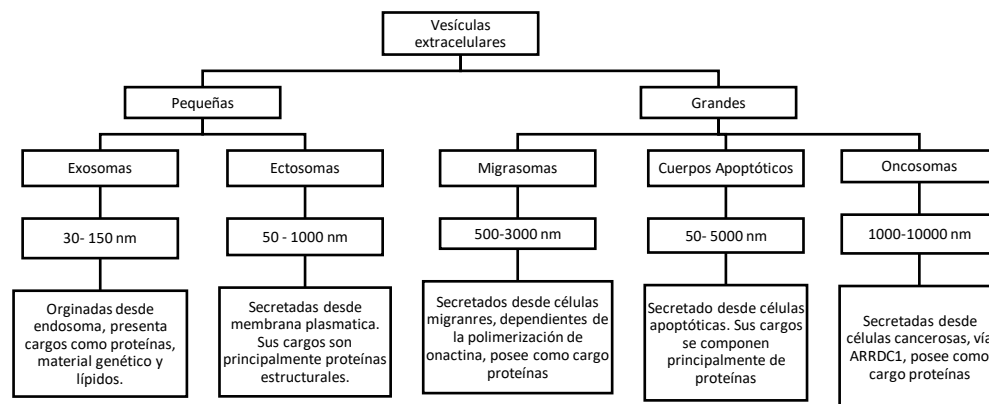


Figura 1-6 Esquema de Clasificación vesículas extracelulares según su tamaño. Fuente: Elaboración propia.

1.3.1 Biogénesis

Las VE pequeñas o exosomas, se forman desde los cuerpos multivesiculares, estos se originan desde la invaginación de la membrana plasmática de la célula (figura 1-6). En este mecanismo se destaca la presencia de los complejos de clasificación endosómica necesarios para el transporte (ESCRT), el cual consiste en un complejo de 4 proteínas (ESCRT-0, -I, -II, -III) en conjunto con proteínas accesorias (Alix, VPS4 y VTA-1) (Hessvik & Llorente, 2018). La formación de estas vesículas implica la formación inicial del endosoma temprano, el cual se transformará en un cuerpo multivesicular donde se incorporarán proteínas y material genético, seguido de su compartimentalización. La activación de receptores como RABS y sinatotagmina-7, median su secreción al espacio extracelular. Si estos receptores no son activados, los cuerpos multivesiculares son llevados al lisosoma para ser desintegrados (Raposo et Al, 2013)

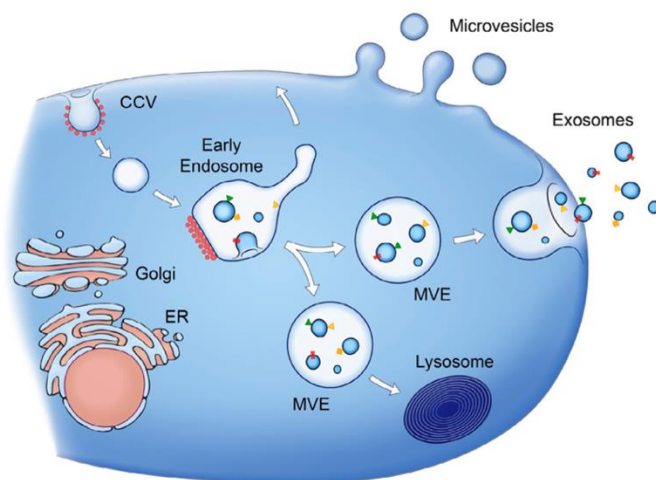


Figura 1-7 Biogénesis formación y secreción de exosomas. Adaptado de Journal of Pharmacy and Healthcare Management (2015)

1.3.3 Caracterización de vesículas extracelulares

La sociedad internacional de vesículas extracelulares señala que para su caracterización se deben abordar tres aspectos principales: la morfología mediante microscopía electrónica, el tamaño mediante técnicas como DLS o NTA, y la identificación de marcadores proteicos utilizando Western Blot o citometría de flujo (Zhang et al., 2020).

Los marcadores proteicos evaluados incluyen dos tipos: las proteínas transmembranales o ancladas a GPI, como CD63, CD9, CD81 y CD53, y las proteínas citosólicas, como ALIX, TSG101 y VPS4 (Zhang et al., 2020).

1.3. 2 Composición

Las vesículas extracelulares se componen de una bicapa lipídica, compuesta principalmente por colesterol, ceramidas, esfingomielina y fosfatidilserina. En su capa externa presenta transportadores de membrana, integrinas y complejos de presentación antigénica (Raposo & Stoorvogel, 2013).

Las VE se caracterizan por contener componentes activos que permiten la transmisión de mensajes de una célula a otra, siendo capaces de empaquetar dentro de ellas biomoléculas como ADN, ARN, proteínas, lípidos etc., permitiendo así que estas sean menos susceptibles a la degradación y transportándolas a las células blanco (Castaño et Al, 2018) (Salomon et Al, 2022) (figura 1-7).

Se ha propuesto que el contenido de las VE es dependiente del estado fisiopatológicos de las células que las secretan (van Niel et al., 2018). El entorno

biológico de las células liberadoras de VE también contribuye modificar la carga de VE. En efecto se ha demostrado que el contenido de las VE se ve afectado por cambios ambientales como los niveles de oxígeno, glucosa y el estado inflamatorio entre otros (Salomon et al., 2022).

Así, la información que las VE transportan desde sus células de origen hasta las receptoras vecinas o ubicadas distalmente media la comunicación intercelular y modula la función de la célula diana.

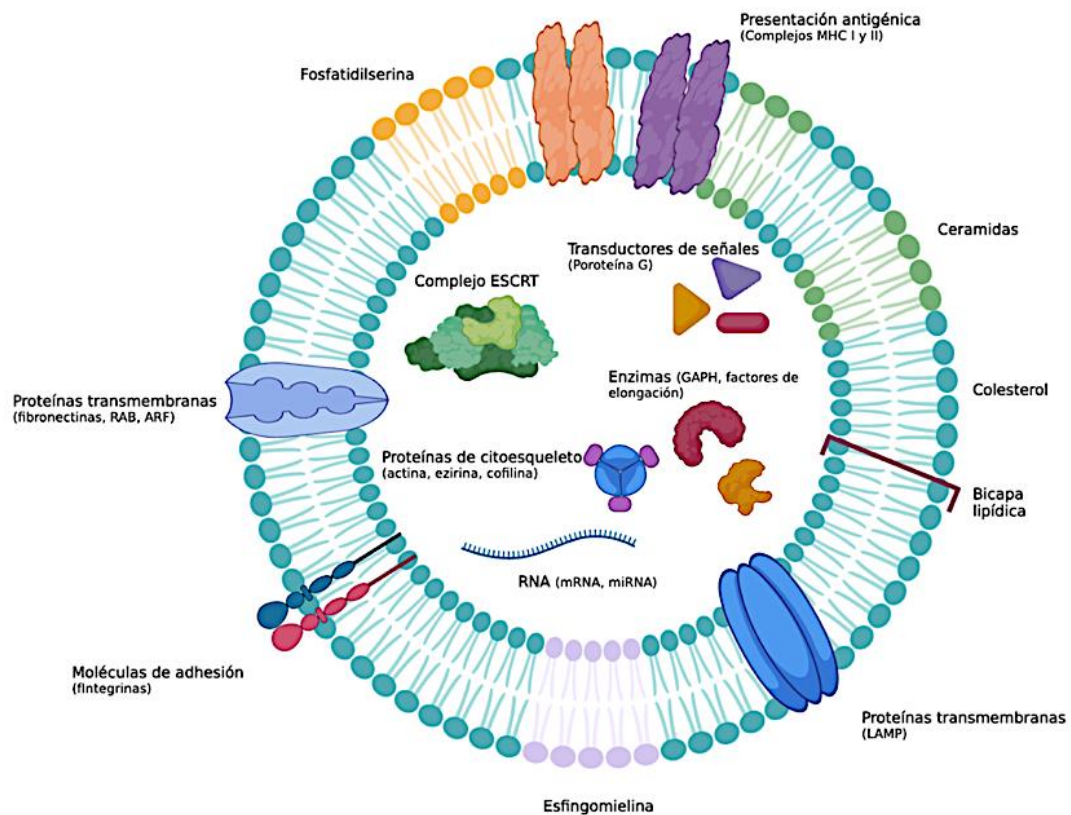


Figura 1-8 Composición de la vesícula extra celular, adaptado de revista Alergia (2013).

1.3.4 Vesículas extracelulares y Diabetes Mellitus

El contenido de las vesículas extracelulares depende del estado fisiopatológico de la célula que las secreta. Cuando las vesículas extracelulares las secretan células sanas, pueden inducir respuestas biológicas mediante la comunicación celular que contribuyen a mantener la homeóstasis del individuo. Sin embargo, si las vesículas extracelulares son secretadas por células alteradas o en un estado patológico, pueden inducir respuestas anómalas en las células receptoras, contribuyendo al desarrollo de la patología (figura 1-9).

No está del todo claro como las VE participan en las funciones fisiológicas de los órganos endocrinos como el páncreas y el hígado en condiciones saludables; sin embargo, se está revelando una participación activa de las VE en diabetes.

La resistencia a la insulina es la causa principal de la DMT2, y los datos existentes señalan que las VE participan en la comunicación cruzada entre adipocitos, hepatocitos, células musculares y/o células inmunitarias. Eventos que regulan el desarrollo de la insulino resistencia (Noren Hooten & Evans, 2020 2020).

Por ejemplo, los exosomas que contienen la proteína "Sonic Hedgehog" o SHH pueden modular funciones inmunitarias y activar un ambiente proinflamatorio en los macrófagos, lo que a su vez puede inducir resistencia a la insulina. Si este comportamiento persiste durante un tiempo prolongado, puede contribuir a la aparición de la diabetes mellitus tipo 2 (Chang & Wang, 2019). Por otro lado, se ha demostrado que los exosomas de pacientes con DMT2, presentan una firma

diferencial en la expresión de miRNA y pueden afectar la acción de insulina en el músculo esquelético (Katayama et al., 2019).

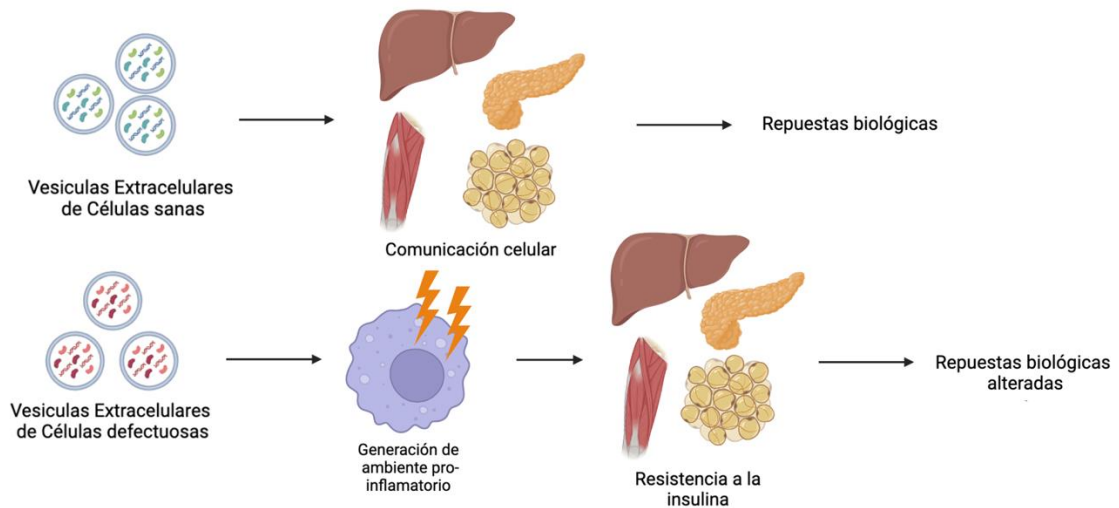


Figura 1-9 Esquema resumen del impacto del contenido de las vesículas extracelulares según su origen. Fuente: Elaboración propia.

Así mismo, Lakhter y su equipo médico descubrieron el año 2018 que los ratones diabéticos secretan un mayor número de VE comparado con ratones normo glicémicos (Lakhter et al., 2018). En este mismo estudio, se demostró que los ratones diabéticos presentaron una mayor expresión del miRNA 21-5p (figura 1-9). Otro estudio realizado en animales demostró el efecto indirecto de las VE del tejido adiposo obeso sobre la resistencia a la insulina a través de la activación de macrófagos (Kranendonk et al., 2014).

La heterogeneidad observada en las VE obtenidas desde ratones diabéticos y normo glucémicos sugieren que estas diferencias pueden regular vías distintas del metabolismo, pero no se sabe con claridad cuáles son los blancos que podrían regular estas VE en forma diferencial.

Un metaanálisis, muestra que los pacientes diabéticos tienen una mayor concentración de VE circulantes comparados con sujetos normoglicémicos (Li et al., 2016). Además, se ha demostrado que la concentración de VE circulantes se asocia al valor del índice HOMA-IR (modelo homeostático de la resistencia a la insulina) (Freeman et al., 2018).

Otros hallazgos sugieren que las VE liberadas por células β pancreáticas, pueden afectar la función de las células hepáticas y musculares, alterando así la regulación de la glucosa y contribuyendo al desarrollo de resistencia a la insulina, un fenómeno central en la diabetes tipo 2 (Noren Hooten & Evans, 2020 2020).

La resistencia a la insulina y la obesidad están vinculadas a una baja inflamación corporal. Se ha observado que las VE liberadas del tejido adiposo de pacientes con DMT2 tienen la capacidad de inducir la diferenciación de los macrófagos hacia el fenotipo M1, lo que resulta en un deterioro directo de la acción de la insulina en miotubos y hepatocitos (Deng et al., 2009).

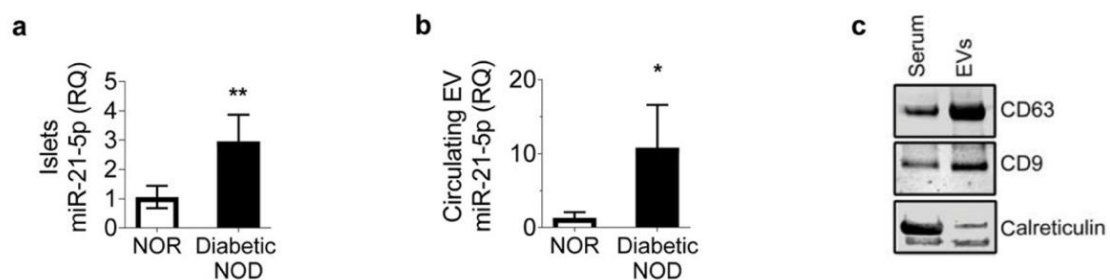


Figura 1-10 a y b) Elevación de mi-RNA por aumento de VE en Ratones NOD (Diabéticos) (c) Presencia de marcadores CD63 y CD9 en VE. Fuente: Elaboración propia.

Estudios recientes han demostrado que una dieta alta en grasas (HFD) conduce a cambios significativos en la composición lipídica de las VE liberadas por células epiteliales intestinales. Estos estudios revelaron un aumento en los niveles de fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilcolina (PC) en las VE derivados de ratones alimentados con HFD, sugiriendo una conexión entre la dieta y la composición lipídica de las VE. En VE de pacientes con diabetes tipo 2, se han encontrado cambios en la composición lipídica también, lo que sugiere una posible asociación entre la dieta alta en grasas, la composición lipídica alterada de las VE y la condición diabética (Figura 1-11).

Además, se llevaron a cabo pruebas de tolerancia a la glucosa (GTT) y tolerancia a la insulina (Solis-Herrera et al.) en ratones C57BL/6 que recibieron una transferencia adoptiva de VE fecales CD63+/A33+ de ratón, obtenidos de animales alimentados con una dieta HFD (Figura 1-12). Los resultados de estas pruebas mostraron efectos significativos en los niveles de glucosa en sangre, lo que sugiere que las VE, moduladas por la dieta, pueden influir en el metabolismo de la glucosa y la sensibilidad a la insulina.

En resumen, las VE están emergiendo como actores importantes en la patogénesis y progresión de la diabetes tipo 2. Su capacidad para transportar moléculas bioactivas y su influencia en la comunicación intercelular los convierte en objetivos prometedores para futuras investigaciones y desarrollo de terapias. El estudio de las VE en el contexto de la diabetes tipo 2 podría ayudar a comprender mejor los mecanismos subyacentes de la enfermedad y abrir nuevas

vías terapéuticas. Para delinear la contribución de las VE en DMT2, es necesario identificar el origen complejo y las diversas funciones de estos VE en los tejidos que contribuyen el control de la homeostasis de la glucosa, como lo es el hígado .

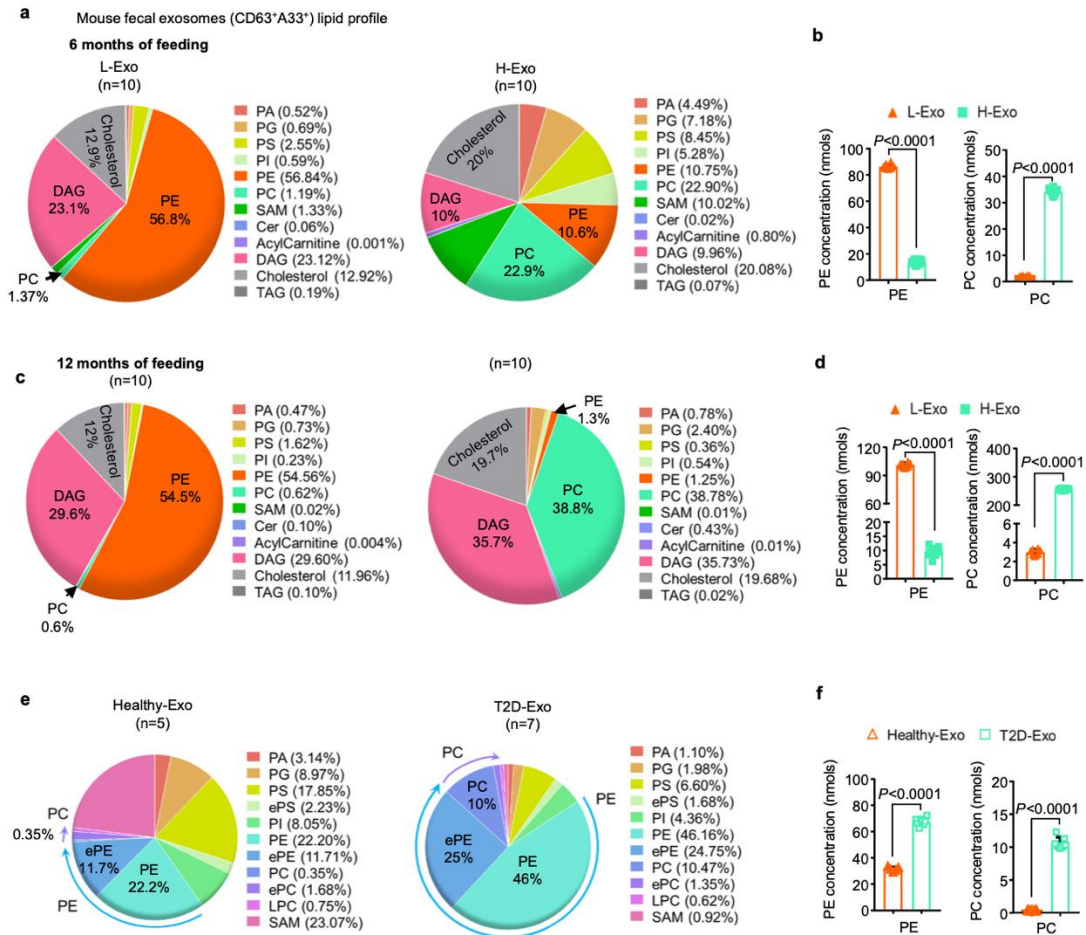


Figura 1-11 La dieta rica en grasas (HFD) altera la composición lipídica de los exosomas liberados por las células epiteliales intestinales. H-exo, son exosomas provenientes de ratones con dieta alta en grasa y L-exo exosomas ratones con dieta baja en grasa

(a, b) Se extrajeron lípidos de exosomas fecales (CD63+A33+) liberados por las células epiteliales intestinales de ratones alimentados con una dieta normal o con una dieta rica en grasas durante 6 meses. (a) Gráficos circulares que representan el porcentaje de cada lípido, determinado mediante espectrometría de masa. (b,d) Concentración de PE y PC (nmol) en el panel derecho. Triángulo relleno-L-Exo y rectángulo relleno-H-Exo. (c) Medido en espectrómetro de masa, lípidos exosomales recogidos de heces de ratones, heces tras 12 meses de sus

respectivas dietas. Gráficos circulares que representan el porcentaje de cada lípido. Gráficos circulares (e) que representan el porcentaje de subtipos de lípidos derivados de los exosomas fecales (CD63 A33) de pacientes sanos (Healthy-Exo, n = 5) o pacientes con diabetes de tipo 2 (T2D-Exo, n = 7). (f) Concentración de PE y PC (nmoles) determinada por MS mostrado en (f). Triángulo hueco-Healthy-Exo y rectángulo hueco-T2D-Exo. Los datos se representan como media $\pm$ D.S. Prueba t de Student (dos colas). Los datos de origen se proporcionan como archivo de datos de origen. Adaptado de Nature Communications (2021)

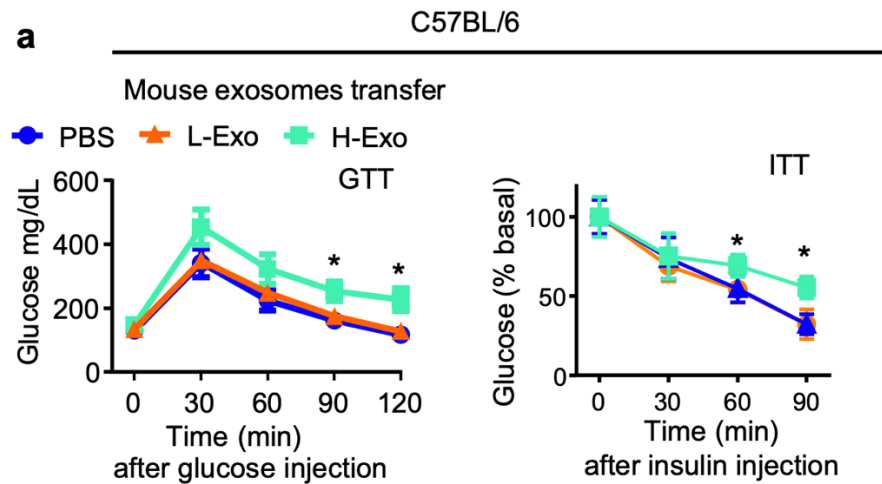


Figura 1-12 Los exosomas CD63 A33 derivados de ratones HFD inducen resistencia a la insulina en ratones alimentados con una HFD. a Pruebas de tolerancia a la glucosa (GTT) y a la insulina (Solis-Herrera et al.) en ratones C57BL/6 (n = 10) tras recibir transferencia adoptiva de exosomas fecales CD63+A33+ de ratón durante 14 días mientras los ratones eran alimentados con HFD. Círculo relleno-PBS, triángulo relleno-L-Exo y rectángulo relleno-H-Exo. Adaptado de Nature Communications (2021)

1.4 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La creciente incidencia global de la Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2) representa un desafío para la salud pública debido a sus complicaciones y la carga en los sistemas de atención médica. Se desconoce como la interacción entre la disfunción hepática que afecta la regulación glucídica y los niveles elevados de HbA1c generan una descompensación metabólica que empeora los síntomas de la enfermedad. En este contexto, las vesículas extracelulares (VE) podrían tener un papel relevante en la regulación del metabolismo glucídico, pero se necesita una comprensión más profunda de su influencia en la función hepática en el contexto de la DMT2 y su correlación con los niveles de HbA1c.

1.5 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto de las vesículas extracelulares de pacientes con diferentes niveles de HbA1c en el metabolismo de la glucosa en células hepáticas (HepG2)?

1.6 HIPÓTESIS

Las vesículas extracelulares (VE) derivadas de pacientes con niveles elevados de HbA1c inducen una disfunción metabólica en células hepáticas HepG2. Esta disfunción se caracteriza por una reducción de mRNA de proteínas claves del metabolismo de la glucosa y una disminución de la captación de glucosa y

acumulación de glucógeno en comparación con las VE de pacientes con niveles inferiores de HbA1c.

1.7 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de las vesículas extracelulares de pacientes con diferentes niveles de HbA1c en el metabolismo de la glucosa en células hepáticas HepG2.

1.8 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar las vesículas extracelulares (VE) de pacientes con niveles crecientes de HbA1c.
2. Evaluar el efecto de las vesículas extracelulares (VE) de pacientes con niveles crecientes de HbA1c en la viabilidad celular, en células HEPG2.
3. Determinar el efecto de las VE de pacientes con niveles crecientes de HbA1c en la expresión de enzimas clave de la glicólisis, gluconeogenesis, glucogenogenesis y glucogenolisis en células HepG2.
4. Evaluar los efectos de las vesículas extracelulares (VE) en la disfunción metabólica de las células HepG2 a través de un análisis estadístico completo de los datos clínicos y experimentales.

2. METODOLOGÍA

En este estudio, se llevó a cabo la obtención de vesículas extracelulares a partir de muestras de sangre periférica de individuos con distintos niveles de glucosa en sangre: normo-glicémicos, prediabéticos y diabéticos que firmaron previamente consentimiento informado aprobado por comité de ética. Estas vesículas fueron agrupadas en diferentes rangos de HbA1c y se cuantificaron utilizando la técnica ELISA. Además, se procedió a su caracterización mediante análisis de dispersión dinámica de luz (DLS) y citometría de flujo, lo que permitió determinar sus propiedades físicas y composición.

Posteriormente, se evaluó el impacto de las vesículas extracelulares pequeñas provenientes de pacientes con diferentes niveles de HbA1c sobre el metabolismo glucídico en células hepáticas HepG2. La viabilidad celular se analizó utilizando el método de Sulforodamida B, mientras que la expresión de ARNm de enzimas claves de la glicólisis, gluconeogenesis, glucogenogenesis y glucogenólisis se determinó mediante la técnica de RT-qPCR. Asimismo, se examinó el efecto de las vesículas extracelulares pequeñas en la captación de glucosa y acumulación de glicogeno (figura 2-1).

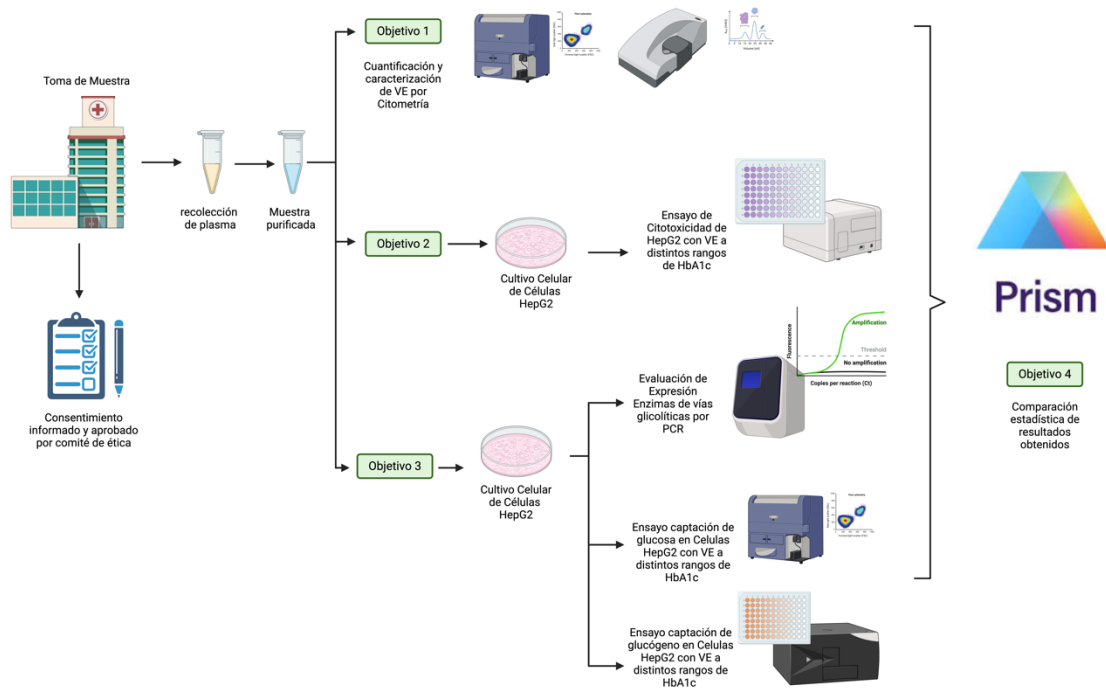


Figura 2-1 Esquema de Metodología resumida . Fuente: Elaboración propia.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo de esta tesis, sus protocolos y normas de bioseguridad fueron analizados y aprobados por el comité de ética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción con fecha 23 de junio del año 2023 y por el comité ético científico del servicio de salud Concepción con fecha 21 de noviembre de 2023.

1. Objetivo 1: Caracterizar las vesículas extracelulares (VE) de pacientes con niveles crecientes de HbA1c. Para la ejecución de este objetivo se realizaron tres etapas:

- Obtener muestras de plasma de pacientes con niveles crecientes de HbA1c.
- Aislar los VE a través de cromatografía por exclusión por tamaño
- Caracterizar los VE mediante técnicas de citometría de flujo, DLS, Niveles de glicosilación y cuantificación por ELISA.

a. Recolección de muestras

Los datos de los pacientes se mantendrán en anonimato durante el desarrollo de la investigación. Se trabajará bajo los estatutos de la declaración de Helsinki.

b. Determinación de tamaño muestral para lograr confiabilidad estadística.

Se hizo un estudio estadístico, para obtener una población ideal, seleccionando la cantidad de rangos y números de muestras por rango para realizar este estudio de forma representativa. El tamaño muestral ideal para tener validez estadística es de 120 pacientes. Los cuales se clasificarán en seis rangos dependiente de los valores de hemoglobina glicosilada.

$$n = \frac{Z^2 * N * p * q}{e^2 (N-1) + (Z^2 * p * q)} \quad (3.1)$$

En donde:

Z = Nivel de confianza

N= Población total

p = Porcentaje de la población con el atributo deseado

e = Error máximo estimado

q = Porcentaje de población que no tiene el atributo deseado (1-p)

n = Tamaño muestral

Según la última encuesta de salud, se estima que aproximadamente el 12,3% de la población chilena padece diabetes. Utilizando un nivel de confianza del 95% y un margen de error máximo de 0,05, al sustituir estos datos, obtenemos un tamaño de muestra (n) de 120.

$$n = \frac{1.96^2 * 428 * 0.123 * 0.877}{0.05^2 (428 - 1) + (1.96^2 * 0.123 * 0.877)}$$

$$n = 119.69 \approx 120$$

Según el análisis estadístico, basado en la prevalencia de la patología, tenía que lograr reclutar al menos 20 pacientes en cada rango de hemoglobina glicosilada descrito en la tabla 3-1

Tabla 3-1.Muestras ordenadas según rangos de Hemoglobina Glicosilada (HbA1C)

Número Rango	Rango HbA1C (%)	Número de pacientes esperado
1	<4.9	20
2	5.0-5.6	20
3	5.7-6.4	20
4	6.4-7.8	20
5	7.9-10	20
6	>10	20
TOTAL		120

c. Protocolo de obtención de la muestra

Los pacientes fueron reclutados, en el momento en el que asistieron al CESFAM de la comuna de Hualqui a realizarse exámenes de sangre través de contacto directo. La toma de muestra se realizará por parte de los profesionales enfermeros/as del CESFAM, utilizando la infraestructura destinada para este fin y siguiendo los protocolos de toma de muestra del CESFAM Hualqui Elaborado por el Bioquímico Luis Briceño, código AAPL 1.2.1, versión N°3 con vigencia de noviembre del año 2019 a marzo del año 2024.

En el CESFAM, se les invitará a los pacientes a formar parte del estudio y solo participarán quienes accedan a firmar el consentimiento informado y completen el formulario. Los datos de aquellas personas que cumplan con los criterios, así como las respuestas del formulario presentada en el Anexo 1, serán registrados

por el Bioquímico Luis Briceño del CESFAM Hualqui en colaboración con la estudiante tesista Francisca Valenzuela.

Después de firmar el consentimiento y, tras usar la muestra de sangre para los exámenes solicitados por el médico. Utilizaremos los 2-3 ml de remanente de la muestra habitual de sangre para nuestro estudio, sin necesidad de una punción adicional. Esto garantizará que no haya procedimientos invasivos adicionales para los participantes y que se cumpla con los estándares de atención médica habituales. La muestra residual (2-3 mL de sangre) será anonimizada y se les asignará un número serial interno, para mantener la confidencialidad de los datos de los pacientes. Para los efectos de este trabajo de investigación, sólo se utilizará tubos de sangre al vacío con anticoagulante etilendiaminotetracético (EDTA).

Para efectos de eliminación de residuos biológicos de forma segura, cada enfermero/a encargado de la toma de muestras realizará la eliminación según protocolo del CESFAM. Por otro lado, el procesamiento de las muestras en la Universidad de Concepción y sus desechos biológicos, serán clasificados y eliminados de acuerdo al manual elaborado por la Facultad de Ciencias Biológicas y MATPEL.

d. Criterios de Inclusión y Exclusión

Para este estudio, se considerarán individuos que asistan al CESFAM de la comuna de Hualqui, en la región del Biobío, Chile, durante el período de mes 1 a

3 desde la aprobación del estudio por el CEC. Se incluirán pacientes de ambos sexos, mayores de 18 años, seleccionados de manera aleatoria, con capacidad para proporcionar el consentimiento informado para la participación en el estudio. Se reclutarán pacientes normoglicémicos y con hiperglicemia en diferentes rangos de hemoglobina glicosilada, como se detalla en la Tabla 3-1 y figura 3-1. En el grupo de pacientes diabéticos, podrán ingresar al estudio, pacientes con patologías como hipertensión arterial y pacientes con tratamiento farmacológico para el control glicémico y de la hipertensión arterial. Los pacientes serán reclutados durante los meses 1 a 3, posterior a la aprobación del protocolo por parte del Comité ético Científico del servicio de Salud Concepción.

e. Aislamiento de Vesículas extracelulares

Las VEs fueron aisladas desde plasma siguiendo el protocolo descrito por Contreras y colaboradores (Contreras et al., 2023). Se recolectaron 10 mL de sangre venosa en vacutainers que contenían EDTA. Después, las muestras de sangre se centrifugaron a 10000g durante 20 minutos para rescatar el plasma. De este plasma, se centrifugaron 500 μ L a 2000 x g durante 30 minutos. Se rescató el sobrenadante y se centrifugó nuevamente a 12000 x g durante 45 minutos para eliminar las células enteras y los desechos. El sobrenadante resultante se filtró a través de un filtro estéril de 0,22 μ m (Steritop™, Millipore, Billerica, MA, EE. UU.). Posteriormente, el sobrenadante filtrado se depositó en la columna de exclusión por tamaño Sephadex G200/40. Se recolectaron las

fracciones 9-12 en un solo tubo, las cuales estaban enriquecidas con EVs, obteniendo un volumen final de 800 µL.

f. Criterios de Exclusión

Para este estudio, se establecieron criterios de exclusión para garantizar la validez de los resultados obtenidos. Se excluyó a aquellos pacientes que tenían menos de 18 años, no asistan al CESFAM de la comuna de Hualqui en los meses de reclutamiento de los pacientes. Pacientes que tuvieran enfermedades como hepatopatías, hígado graso o historial de alcoholismo. Además, aquellos pacientes que estuvieran recibiendo tratamiento con glucocorticoides o citoestáticos. También se les excluyó del estudio pacientes con problemas de salud que dificulten la comprensión del consentimiento informado y pacientes con otras condiciones no descritas en los criterios de inclusión, además se les excluyó de este estudio mujeres embarazadas.

g. Criterios de Eliminación

Fueron eliminados del estudio aquellos pacientes que por distintos motivos no puedan completar el formulario de reclutamiento de pacientes y levantamiento de información y aquellos que no cumplieran con los criterios de inclusión.

h. Método de selección de los pacientes

Para el reclutamiento de los pacientes, inicialmente se realizó un muestro aleatorio por conglomerado de pacientes que asisten al CESFAM de la Comuna de Hualqui mayores de 18 años. Obtenidos los documentos de consentimiento informado y formulario de reclutamiento. Se clasificó la información para posteriormente, realizar un muestreo no probabilístico por cuotas, ya que se considera 20 pacientes por cada rango de hemoglobina glicosilada definido para este estudio.

i. Protocolo de anonimización de las muestras:

1. Se recopiló inicialmente datos médicos y de identificación de los pacientes, incluyendo nombres, fechas de nacimiento, números de identificación y resultados de pruebas médicas como perfiles glicémicos, lipídicos, diagnósticos de enfermedades y uso de medicamentos.
2. Se asignaron códigos o identificadores únicos a cada paciente en lugar de utilizar su información personal directamente. Estos identificadores no estaban relacionados con la identidad real del paciente y se generaron en orden de reclutamiento de los pacientes.
3. Los datos originales con información de identificación se almacenaron segura y separada de los datos anónimos para asegurar que no se pudiera vincular con las identidades reales de los pacientes.
4. Se eliminó toda la información de identificación, como nombres, números de identificación y direcciones, de las muestras y los registros de datos de

manera irreversible para garantizar que no se pudiera recuperar la información de identificación.

5. Las muestras biológicas, como la sangre, se conservaron y etiquetaron únicamente con los códigos o identificadores únicos, almacenándose de manera segura para su posterior análisis.
6. Durante el análisis, los investigadores utilizaron los códigos o identificadores únicos en lugar de información de identificación personal para llevar a cabo investigaciones, estudios y análisis, manteniendo así los resultados anónimos y sin posibilidad de vinculación con pacientes específicos.
7. Todos los datos, tanto los originales como los anonimizados, se almacenaron y protegieron de acuerdo con las leyes y regulaciones de privacidad de datos vigentes.
8. Se cumplió con todas las leyes y regulaciones aplicables, incluyendo aquellas relacionadas con la privacidad de datos y la investigación médica. En algunos casos, las autoridades tuvieron acceso a los datos de identificación si se requería legalmente.
9. Al informar los resultados de la investigación, estos se presentaron de manera agregada y sin incluir información que pudiera identificar a individuos específicos.

i. Protocolo de traslado de las muestras desde el CESFAM Hualqui.

El protocolo para el retiro y traslado seguro de muestras de sangre desde el Centro de Salud Familiar (CESFAM) Hualqui al laboratorio de la Universidad de

Concepción se realizó con el objetivo de asegurar la integridad y trazabilidad de las muestras destinadas al estudio.

Para llevar a cabo este proceso, el encargado designado, en este caso la Bioquímica y guía de tesis, Dra. Valeska Ormazábal, fue la encargada de coordinar y ejecutar el retiro de las muestras.

En el CESFAM Hualqui, se verificó la disponibilidad de las muestras que cumplían con los criterios de inclusión del estudio. Cada muestra fue etiquetada con un identificador único y luego colocada en envases herméticos resistentes a filtraciones que contenían elementos refrigerantes para asegurar su conservación durante el transporte.

La encargada del retiro llevó consigo una copia impresa de la autorización del comité de ética, así como los detalles del estudio. Durante el traslado, se mantuvieron las muestras aisladas y protegidas para evitar cualquier daño o alteración. La encargada del traslado registró la hora de salida del CESFAM y la hora de llegada al laboratorio de la Universidad de Concepción.

Este registro se actualizó en caso de demoras o problemas en el proceso. Al llegar al laboratorio, el encargado entregó las muestras al equipo de laboratorio

encargado del estudio, registrando la hora de entrega y asegurándose de que las condiciones de las muestras sean apropiadas.

j.Reclutamiento de pacientes y separación por grupos

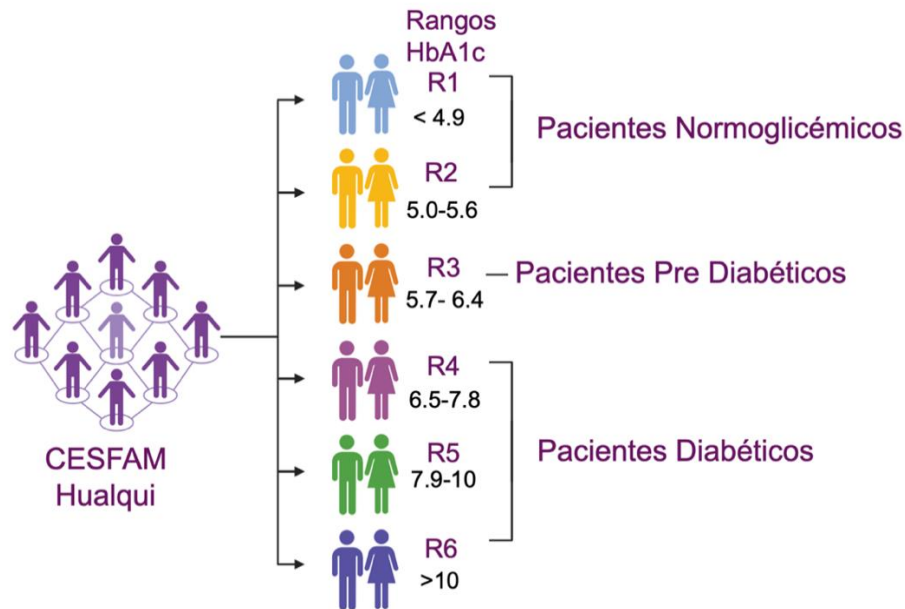


Figura 3-1 Esquema Resumen de la separación de los grupos de estudio según rangos de Hemoglobina glicosilada y Diagnostico del paciente (Diabético, Pre diabético y normoglicémico) Fuente: Elaboración propia.

Se lograron reclutar 96 pacientes del Centro de Salud Familiar (CESFAM) de la comuna Hualqui, Región del Bío-Bío Chile. Estos Cumplieron con los requisitos de criterios de inclusión y exclusión. Todos firmaron el consentimiento solicitado por esta investigación siguiendo los protocolos de buena conducta del Servicio de Salud de Concepción. La separación de los diferentes rangos se hizo según los niveles de Hemoglobina glicosilada para generar 6 pools de muestras de cada rango de HbA1c.

Tabla 3-2 Número de pacientes reclutados en cada Grupo y el porcentaje de cada subdivisión.

Número	Rango HbA1C	n	Estado	Total	Porcentaje
1	<4.9	19	Normo glicemia	30	32%
2	5.0-5.6	11			
3	5.7-6.4	18	Pre diabetes	18	18%
4	6.4-7.8	14	Diabetes	48	50%
5	7.9-10	16			
6	>10	18			
TOTAL		96			

k. Almacenamiento de las muestras en el laboratorio

Una vez en el laboratorio, las muestras fueron centrifugadas a 1000g, por un periodo de 15 minutos. El plasma obtenido fue separado del resto de los elementos figurados, y posteriormente almacenado a -80°C. Los tubos de almacenamiento se rotularon usando el mismo número asignado al tubo de la muestra de sangre. El equipo de laboratorio es responsable de garantizar el adecuado almacenamiento y registro de las muestras hasta su análisis.

l. Cuantificación

Antes de la cuantificación, se llevó a cabo un tratamiento de pre-enriquecimiento de muestras en rotavapor durante 12 horas. Después, se cuantificó proteínas de las vesículas obtenidas.

La cuantificación de proteínas totales se realizó utilizando el kit Protein Assay SEC de BIO-RAD, mientras que la cuantificación de vesículas extracelulares se llevó a cabo con el kit Exo ELISA-ULTRA-CD63-1 de SBI. Ambas técnicas emplean métodos colorimétricos para la determinación de las concentraciones correspondientes.

Cuantificación de proteínas:

Se empleó el método de Bradford para la determinación de proteínas totales. Para ello, se elaboró una curva de calibración utilizando BSA como estándar en concentraciones conocidas. A continuación, se agregaron 5 µL de muestra en cada pocillo de una placa de microtitulación. Posteriormente, se añadieron 25 µL de reactivo A' y 200 µL de reactivo B. Tras incubar la placa, se midió la absorbancia en un lector de microplacas Synergy 2 (BioTek Instruments) a una longitud de onda de 750 nm.

Para el análisis cuantitativo, se empleó una curva de calibración mediante la cual se realizó el despeje de la ecuación (3.2) para calcular, a través de la absorbancia, las concentraciones correspondientes para cada grupo de estudio.

$$y = mx + c \quad (3.2)$$

En donde

m= pendiente

x= Concentración deseada

C = Intersección en eje Y

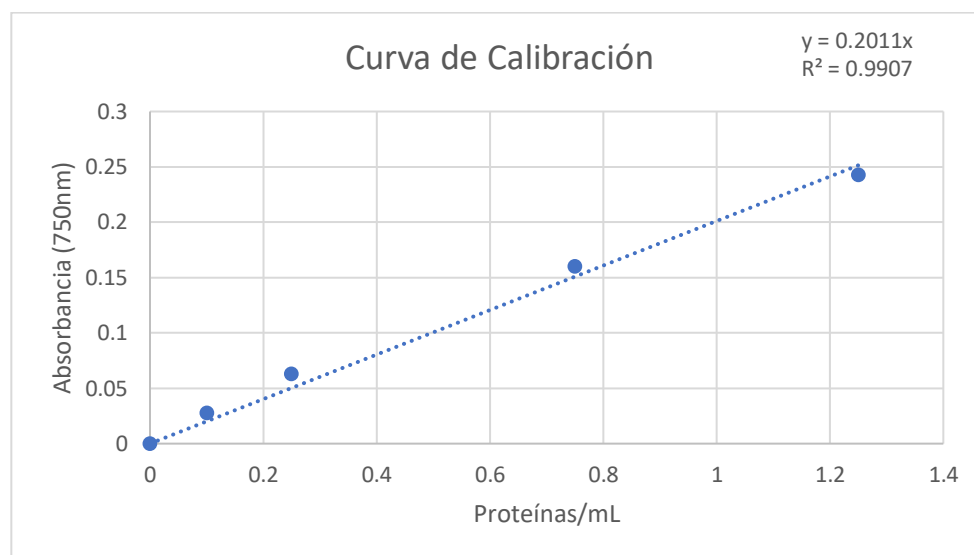


Figura 3-2 Curva de calibración para la cuantificación de proteínas totales. Fuente: Elaboración propia.

En este procedimiento se tendrán dos condiciones para cada rango de VE con RIPA, este es un detergente que permite romper la vesícula extracelular, junto con el sonicado de las muestras, con esto se podrá medir la cantidad de proteínas dentro de la vesícula, esto es de vital importancia ya que la cuantificación sin ripa es cercana a cero.

Cuantificación de Vesículas:

El Kit Exo-ELISA fue empleado para cuantificar las vesículas extracelulares mediante ELISA sándwich. En este método, se utilizó una placa sensibilizada con el anticuerpo CD63, que facilitó la adhesión de las vesículas a la superficie de la

placa, aumentando así la especificidad en la cuantificación. Esto se debe a que las vesículas extracelulares poseen el reconocimiento para CD63 y se unen al anticuerpo. A diferencia de la cuantificación de las proteínas totales, este enfoque permitió determinar con eficacia la presencia de vesículas extracelulares, lo cual resulta crucial para asegurar la pureza de la muestra.

La intensidad del color desarrollado en la placa se correlacionó directamente con la cantidad de vesículas presentes. Cuantas más vesículas había, mayor era la intensidad del color y, por consiguiente, mayor era la absorbancia medida a una longitud de onda de 450 nm. Después de la adición de las vesículas extracelulares y los reactivos, se añadió un anticuerpo secundario, se incubó y se realizaron las lecturas de absorbancia en un lector de microplacas Synergy 2 (BioTek Instruments) a 450 nm. De esta manera, se obtuvo una medida cuantitativa de las vesículas extracelulares presentes en la muestra.

Para el análisis cuantitativo, se utilizó una curva de calibración, mediante la cual se realizó el despeje de la ecuación (3.3) para calcular, a través de la absorbancia, las concentraciones correspondientes para cada grupo de estudio.

$$y = mx + c \quad (3.3)$$

En donde

m= pendiente

x= Concentración deseada

C = Interseccion en eje Y

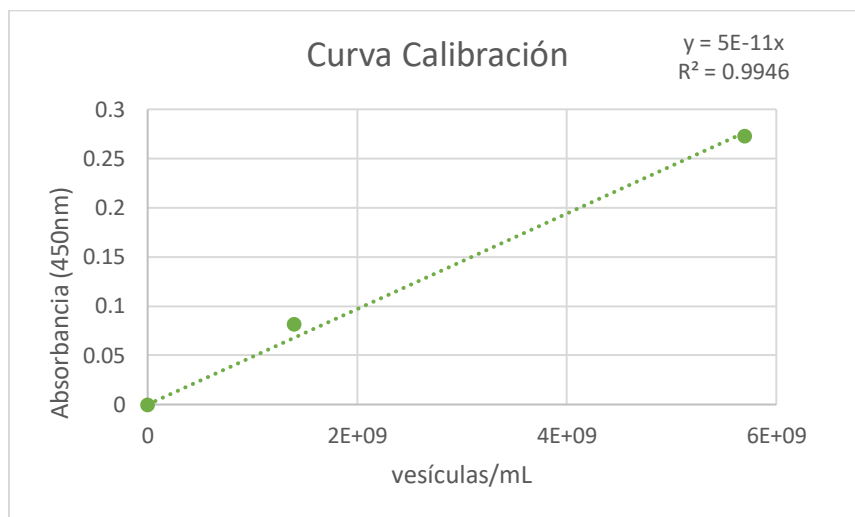


Figura 3-3 Curva de calibración para la cuantificación de Vesículas Extracelulares. Fuente: Elaboración propia.

f. Caracterización

a) DLS

Para determinar el tamaño de las vesículas extracelulares, se empleó el equipo Zeta-sizer, reconocido por su capacidad de medir el tamaño de partículas mediante la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS). Esta técnica se fundamenta en la medición del movimiento browniano de las moléculas, donde las partículas más grandes presentan un coeficiente de difusión más lento. Para ello, las muestras de EVs se diluyeron 1/10 en buffer PBS y se analizaron en el equipo mencionado. En la figura 14 se ilustra el fundamento científico de la técnica DLS.

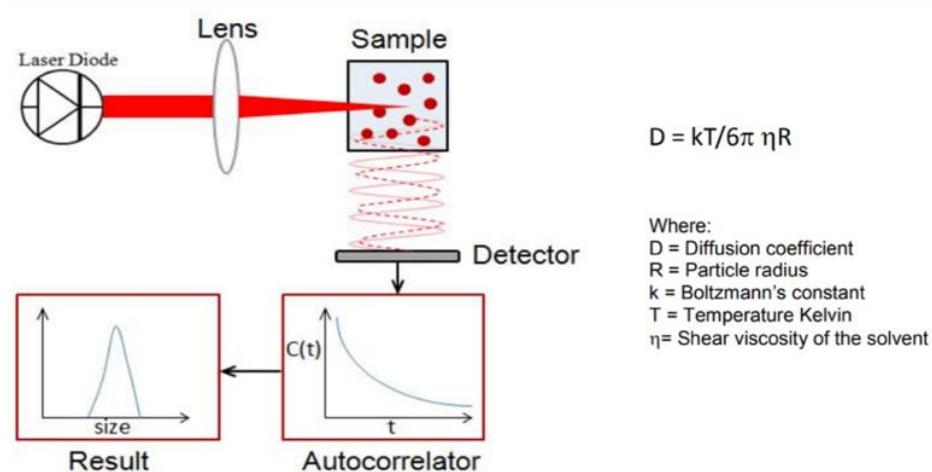


Figura 3-4 Funcionamiento DLS. Fuente: Elaboración propia.

b) Fluorescencia para medir niveles de Glicosilación

Para observar la fluorescencia de las VE se utilizará el equipo Q-bit que permite ver la fluorescencia de partículas de forma directa como también cuantificar proteínas ADN entre otras. Para ello se empleará una dilución de VE en 200 μL y una concentración de 2×10^{10} de vesículas extracelulares. Las vesículas se colocaron en un tubo especial para la medición que se realizará a 470 nm

c) Citometría de flujo

En el análisis de citometría de flujo, se emplearon diversos marcadores de membrana para medir y cuantificar las partículas en las muestras. Esta técnica se basa en el reconocimiento de marcadores específicos y la capacidad de contar las partículas que los portan. Para este estudio, se siguió el protocolo de

aislamiento de exosomas humanos CD63 de INVITROGEN y se utilizó el equipo BD LSRFortessa™ X-20 para llevar a cabo la citometría de flujo.

En cada muestra, se añadieron 20 µL de beads magnéticas y se realizaron lavados repetidos con una solución stock compuesta por PBS 1x y BSA al 0,1%. Después, las muestras se incubaron durante 22 horas. Al día siguiente, se realizaron dos lavados adicionales con la solución stock y se añadieron los anticuerpos específicos para CD81 y CD90. Estos anticuerpos permiten determinar la presencia o ausencia de vesículas extracelulares que expresen estos marcadores. Finalmente, las muestras se sometieron a citometría de flujo utilizando el equipo BD LSRFortessa™ X-20 y se analizaron los resultados obtenidos.

De esta manera, se pudo evaluar la presencia de vesículas extracelulares con los marcadores CD81 y CD90 en las muestras mediante citometría de flujo, lo que proporcionó información sobre la composición y la cantidad de vesículas presentes.

2. Objetivo 2: Evaluar el efecto de las vesículas extracelulares (VE) de pacientes con niveles crecientes de HbA1c en la viabilidad celular. Este objetivo se realizará en dos etapas

- Cultivar células HepG2 en placas de cultivo y dejarlas adherir.

- Tratar las células HepG2 con diferentes concentraciones de VE obtenidos de pacientes con diferentes niveles de HbA1c. Evaluar la viabilidad celular a través de técnicas la técnica de sulforodamina B.

a. Cultivo de las células HepG2:

Se utilizaron células hepáticas de la línea celular HEPG2 para realizar la evaluación del metabolismo en distintas condiciones de concentración de vesículas extracelulares (VE) provenientes de distintos rangos de HbA1C. Las células se cultivaron en medio RPMI, suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado y 1% de penicilina/estreptomicina, e incubadas a 37°C y 5% de CO₂

b. Ensayo Sulforodamina B

Para realizar el ensayo de Sulforodamina B Se sembraron 20.000 células por pocillo de ambas líneas celulares en una placa de 96 pocillos en atmósfera húmeda con un 5% de CO₂ durante 24 horas. Al día siguiente, las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de VE: 5x10⁴ vesículas/mL, 5x10⁵ vesículas/mL, 5x10⁶ vesículas/mL, 5x10⁷ vesículas/mL, 5x10⁸ vesículas/mL y 5x10⁹ vesículas/mL. Cada concentración se realizó por triplicado. Por último, la placa se dejó incubar nuevamente durante 24 horas a 37°C en atmósfera húmeda con un 5% de CO₂.

Posteriormente se eliminó el medio de cultivo de la placa y se agregaron 100 µL de ácido tricloroacético (TCA) al 10% p/v para fijar las células al pocillo, las cuales se incubaron durante 1 hora a 4°C. Luego de la incubación, la placa se lavó cinco veces con agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 100 µL de Sulforodamina B al 0.057% p/v, preparada en ácido acético al 1% v/v, para teñir las células fijadas, y se dejó actuar durante 30 minutos. Tras finalizar el tiempo, la placa se lavó nuevamente cinco veces con ácido acético al 1% v/v y se dejó secar a temperatura ambiente. Después, se agregaron 200 µL de Tris base 10 mM pH 10.5, dejando la placa en agitación durante 30 minutos. Finalmente, se midió la absorbancia en el lector de microplaca Synergy 2 (BioTek Instruments) a una longitud de onda de 510 nm.

3. Objetivo 3: Determinar el efecto de las VE de pacientes con niveles crecientes de HbA1c en la expresión de enzimas clave de la vía glucolítica en células HepG2. Este objetivo se realizará en 6 etapas:

- Cultivar células HepG2 en placas de cultivo y dejarlas adherir.
- Tratar las células HepG2 con diferentes concentraciones de VE obtenidos de pacientes con diferentes niveles de HbA1c.
- Extraer el ARN total de las células HepG2 tratadas y no tratadas con VE.
- Realizar una transcripción inversa para obtener ADNc. Realizar una PCR en tiempo real (RT-qPCR) para evaluar la expresión de las enzimas clave de la vía glucolítica (Hexoquinasa, piruvato quinasa, fosfogructoquinasa).

- Tratar las células HepG2 con diferentes concentraciones de VE obtenidos de pacientes con diferentes niveles de HbA1c. Incubar las células HepG2 con un medio que contenga glucosa 2NDBG.
- Medir la captación de glucosa en las células HepG2 a través de citometría de flujo
- Tratar las células HepG2 con diferentes concentraciones de VE obtenidos de pacientes con diferentes niveles de HbA1c. Medir captación de Glucógeno a través de un kit colorimétrico

a. RT-qPCR

Las células HepG2 se sembrarán en placas de 12 pocillos a una densidad celular de 500.000 células/pocillo y se cultivaron durante 24 horas utilizando medios de cultivo habituales. Después de alcanzar la confluencia, las células se trataron con 5×10^8 vesículas/mL de vesículas (obtenidas de cada rango de hemoglobina glicosilada) durante 24 horas, en medio libre de suero. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo celular y las células fueron lisadas con 500µL de TRIzol a temperatura ambiente. Los experimentos se realizaron por triplicado.

El ARN total se extrajo de las células utilizando 500 µL del reactivo TRIzol (Invitrogen) y el kit Direct-zol™ RNA MiniPrep (Zymo) siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción de RT-qPCR se llevó a cabo en un solo paso, utilizando el reactivo TaqPart, CG de un paso (ThermoFisher) para sondas

TaqMan y el equipo Applied Biosystem 7500 FAST Real Time PCR System con el siguiente protocolo de amplificación: 50°C durante 15 minutos, 95°C durante 2 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 3 segundos y alineamiento/extensión a 60°C durante 30 segundos. Las sondas TaqMan prediseñadas para GLUT1 (Hs00892681_m1), GLUT 2 (Hs01096908_m1), GLUT4 (Hs00168966_m1), ISR2 (Hs00275843_s1) y INSR (Hs00961557_m1), HK2 (Hs00606086_m1), PFKM (Hs00737347_m1), PKM (Hs00987255_m1), PCK1 (Hs00159918_m1), PYGM (Hs00989942_m1), GYS (Hs00157863_m1) Y G6PC (Hs02802676_m1) se adquirieron de Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific, Inc.). La cuantificación relativa se normalizó a la expresión de RNase P utilizando el método $2^{(-\Delta\Delta Cq)}$. Cada muestra se analizó por triplicado. (Toledo-Oñate, 2023).

b. Captación de Glucosa

La captación de glucosa en células HepG2 se evaluó utilizando un ensayo 2-NBDG. Las células HepG2 se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad celular de $2,5 \times 10^5$ células/pocillo y se cultivaron durante la noche en medios de cultivo estándar. Una vez alcanzada la confluencia, las células se trataron con una concentración de 5×10^8 vesículas/mL obtenidas de diferentes rangos de hemoglobina glicosilada durante 24 horas en medio libre de suero. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo celular y se lavaron las células con

PBS, seguido de una incubación de 30 minutos con PBS a temperatura ambiente (Li et al., 2022).

Para el marcaje con 2-NBDG (Invitrogen), las células se desprendieron de cada pocillo mediante la adición de 0.3 mL de tripsina TripLE 1X y la reacción se detuvo con 0.6 mL de medio completo. Luego, las células se transfirieron a tubos eppendorf y se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos para eliminar el sobrenadante. Posteriormente, las células se resuspendieron en 100 uL de PBS que contenía 2-NBDG a una concentración final de 20 uM y se incubaron a 37°C durante 20 minutos. La reacción se detuvo añadiendo 800 uL de PBS frío, seguido de una centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos. Finalmente, las células se marcaron con L/D y se agregaron 5 uL de Beads de conteo antes de ser leídas en el citómetro BD LSR Fortessa™ X-20 Cell Analyzer.

c. Almacenamiento de Glucógeno

Las células HepG2 se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad celular de 1×10^6 células/pocillo y se cultivaron durante la noche utilizando medios de cultivo habituales. Después de alcanzar la confluencia, las células se trataron con 5×10^8 vesículas/mL de vesículas (obtenidas de cada rango de hemoglobina glicosilada) durante 24 horas, en medio libre de suero. Luego, se midió la captación de glucógeno a través del Kit Abcam Glycogen Assay Kit II (ab169558) siguiendo las instrucciones del fabricante.

$$y = mx + c \quad (3.4)$$

En donde

m= pendiente

x= Concentración deseada

C = Interseccion en eje Y

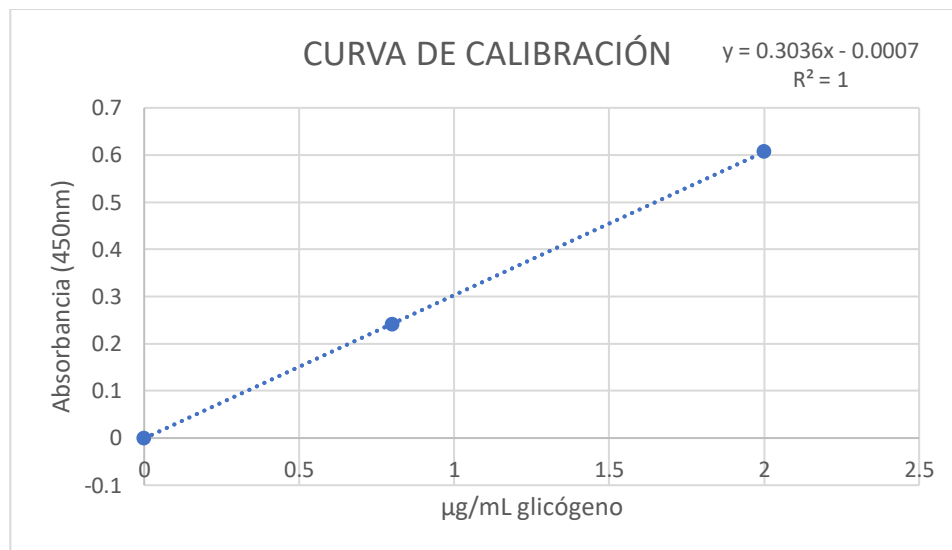


Figura 3-5 Curva de calibración para la cuantificación de Almacenamiento de glicógeno. Fuente: Elaboración propia.

Para interpretar los datos, se generó una curva de calibración para cuantificar la cantidad de glucógeno. Esta curva permitió obtener el valor de "y" de la ecuación (3.4). Posteriormente, este valor se introdujo en la ecuación mencionada en el protocolo (3.5) para calcular la cantidad total de glucógeno. Esta cantidad se dividió por el número de células utilizadas en el experimento para obtener una medida precisa de la concentración de glucógeno

$$\text{Concentración de glicógeno (C)} = \frac{B}{V} \times \text{Factor de dilución} \quad (3.5)$$

En donde:

B = Glicógeno obtenido desde la curva de calibrado (μg)

V = Volumen final utilizado en el pocillo (μL)

Objetivo 4: Evaluar los efectos de las vesículas extracelulares (VE) en la disfunción metabólica de las células HepG2 a través de un análisis estadístico completo de los datos clínicos y experimentales. Este objetivo se realizará en 3 etapas:

- Recopilación de datos clínicos de los pacientes participantes en el estudio, incluyendo niveles de HbA1c y otros parámetros relevantes para la diabetes mellitus.
- Organización de los datos experimentales resultante de los efectos de las VE de distintos rangos de HbA1c sobre células HEPG2.
- Realización de análisis estadístico de los datos clínicos utilizando técnicas como Análisis de Componentes Principales (PCA), dendrogramas y análisis de jerarquía para identificar patrones y relaciones entre variables.

a. Análisis de Componentes principales

Se realizó un análisis integral de datos que combinó información clínica de pacientes. El objetivo primordial de este estudio fue investigar posibles variaciones en estos procesos metabólicos entre las distintas condiciones crecientes de HbA1c, buscando identificar patrones y relaciones significativas que pudieran contribuir a una comprensión más profunda de las alteraciones

metabólicas asociadas con la Diabetes Mellitus Tipo II. Para abordar esta complejidad de datos, se implementó un análisis de componentes principales (PCA), una herramienta estadística avanzada que permitió identificar las principales fuentes de variabilidad en nuestro conjunto de datos. Este enfoque analítico nos brindó una visión integral, facilitando la identificación de patrones subyacentes y destacando las variables clave que podrían haber contribuido a las diferencias observadas entre los grupos diabéticos y no diabéticos.

Se consideraron las diferencias de $p < 0.05$ como estadísticamente significativas. Se utilizó el programa estadístico PRISM para realizar los análisis e interpretación de resultados. Se compararon los resultados obtenidos con los VE de pacientes con diferentes niveles de HbA1c para determinar si había una relación dosis-respuesta entre los niveles de HbA1c y el número de VE, la expresión de enzimas claves de glicólisis y la captación de glucosa en las células HepG2.

Análisis estadístico

En este proyecto, se consideraron seis grupos de estudio, cada uno compuesto por 20 participantes, clasificados según sus niveles de hemoglobina glicosilada. El análisis estadístico y la generación de gráficos se llevaron a cabo utilizando el software GraphPad Prism 9®. Se examinaron las variables continuas de cada grupo mediante las pruebas de normalidad de D'Agostino-Pearson y Shapiro-Wilk, según la cantidad de muestras. Los datos con distribución normal se expresaron como media $\pm$ desviación estándar (D.E) y se compararon utilizando la prueba t de Student paramétrica. Para los datos sin distribución normal, se presentaron con mediana y Rango Intercuartílico (RIC) y se analizaron con la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.

Para el análisis de variables con dos o más grupos, se aplicaron las pruebas ANOVA y Kruskal-Wallis, según la distribución de los datos. Las variables categóricas se expresaron como porcentaje (%) del total de datos. La reducción de dimensionalidad se llevó a cabo mediante el análisis de componentes principales (PCA) utilizando los parámetros de glucosa en sangre, hemoglobina glicosilada y perfil lipídico. Esto permitió agrupar características afines para una comprensión más sencilla.

La visualización de resultados se realizó con el método UMAP (Uniform Manifold Approximation and Project) para obtener representaciones no lineales

en dimensiones reducidas, preservando las distancias entre puntos y vecinos. La interpretación de resultados se centró en la relación entre estos parámetros y su impacto en el metabolismo glucídico. Se estableció un nivel de confianza del 95% para todas las pruebas estadísticas realizadas en este estudio. Para determinar si los datos presentaban diferencias estadísticamente significativas, se utilizó un valor de $p < 0.05$. Esto significó que si el valor de p calculado en las pruebas estadísticas fue menor que 0.05, se consideró que existía una diferencia significativa entre los grupos comparados

4. RESULTADOS

4.1 Objetivo 1. Caracterizar las vesículas extracelulares (VE) de pacientes con niveles crecientes de HbA1c.

a. Cuantificación de Proteínas Totales y Vesículas Extracelulares

Se caracterizaron las vesículas extracelulares (VE) obtenidas de pacientes con niveles variables de HbA1c. Tras el aislamiento de las VE, la primera etapa de su caracterización implicó la cuantificación de proteínas totales presentes en las mismas. Para ello, las VE se lisaron y luego se cuantificaron. Los resultados obtenidos revelaron disparidades significativas en la concentración de proteínas totales de las VE, sin exhibir un patrón claro de concentración relacionado con los niveles de HbA1c (figura 4-1).

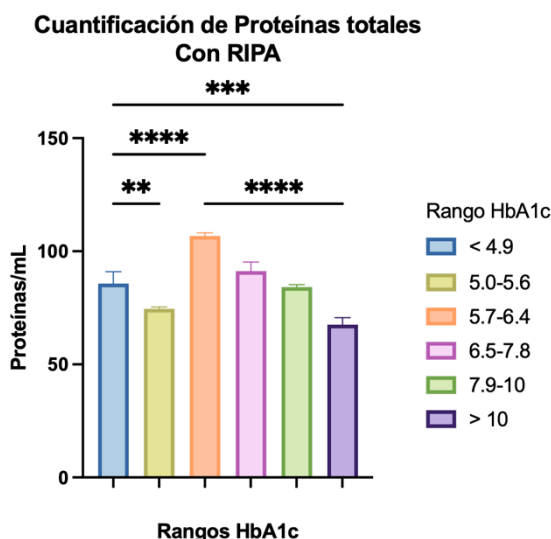


Figura 4-1 Cuantificación de proteínas/mL mediante kit DC Total Protein de Bio-Rad. Representación de datos en gráfico de barras mean with SEM de proteínas con RIPA. Representación de datos en gráfico de barras mean with SEM de proteínas con RIPA. Realizado por triplicado (*) p 0.05 (**) p 0.01, (***) p 0.005 y

(****) $p < 0.0001$. Fuente: Elaboración propia

Número de Vesículas Extracelulares en plasma sanguíneo

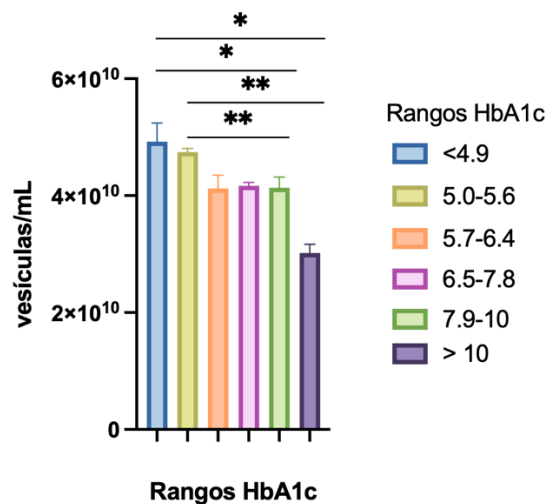


Figura 4-2 Cuantificación de vesículas extracelulares pequeñas/ mL mediante kit ExoElisa-ULTRA CD63 de System Biosciences A) Representación de datos en gráfico de barras mean with SEM. Realizado por triplicado(*) $p < 0.05$ (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.005$ y (****) $p < 0.0001$ Fuente: Elaboración propia.

En una segunda fase del estudio, se procedió a cuantificar el número de vesículas extracelulares (VE) en los seis rangos de HbA1c utilizando la técnica de ELISA con el marcador específico CD63 Figura 4-2 ¿?? La figura debe ir despues. Los resultados revelan una relación inversa entre el número de vesículas extracelulares y los niveles de HbA1c. Se observa una disminución significativa en la cantidad de vesículas a medida que aumenta el rango de HbA1c, con una concentración mayor en los rangos normoglicémicos en comparación con los rangos pre-diabéticos y diabéticos. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) al comparar

los rangos más bajos de HbA1c con los rangos más altos, lo que indica una relación directa entre la concentración de vesículas y los niveles de HbA1c.

b. Caracterización de vesículas extracelulares a través de Citometría de Flujo y Dynamic light Scattering (DLS)

i. Caracterización de marcadores de superficie de las vesículas extracelulares (VE):

Para la caracterización de marcadores de superficie clásicos de las vesículas extracelulares (VE), se empleó citometría de flujo utilizando beads de captura CD63. Se analizó la expresión de los marcadores CD81 y CD9 en los seis rangos de HbA1c. En cuanto al marcador CD81, se observó una presencia del 91,4%, 91,8%, 93,7%, 94,5%, 93,8% y 95,2% en los rangos 1 al 6 de HbA1c, respectivamente. En contraste, la expresión del marcador CD9 no superó el 0,08% en ninguno de los rangos de HbA1c analizados. Se destaca que, al utilizar beads de captura CD63, las vesículas extracelulares presentaron marcadores CD81/CD63+ en todos los rangos de HbA1c (figura 4-3).

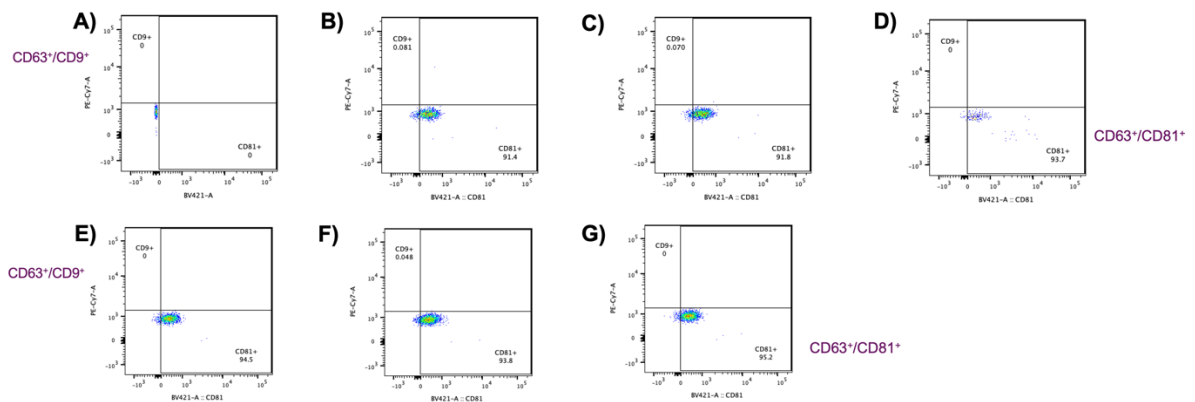


Figura 4-3 Caracterización de marcadores de vesículas extracelulares pequeñas mediante citometría de flujo A) Dot plot control B) Dot plot vesículas extracelulares HbA1c <4.9 C) Dot plot vesículas extracelulares HbA1c 5.0-5.6 D) Dot plot vesículas extracelulares HbA1c 5.7-6.4 E) Dot plot vesículas extracelulares HbA1c 6.5-7.8 F) Dot plot vesículas extracelulares HbA1c 7.9-10 G) Dot plot vesículas extracelulares >10 Fuente: Elaboración propia.

c. Caracterización del Tamaño de las vesículas extracelulares (VE)

El análisis del tamaño de las vesículas extracelulares (VE) mediante DLS indica que el tamaño medio de las vesículas obtenidas de rangos crecientes de HbA1c coincide con el tamaño esperado para VE pequeñas. Sin embargo, para el rango 6, correspondiente al nivel más alto de HbA1c (mayor al 10% de HbA1c), se observa un incremento en el tamaño de las vesículas, así como una mayor dispersión de tamaño. Al graficar los tamaños medios de las vesículas respecto a los rangos de HbA1c, se observa un aumento proporcional del tamaño promedio de las VE conforme aumenta el porcentaje de HbA1c (figura 4-4 y 4-5).

Además, al analizar la glicosilación de las VE mediante la determinación de fluorescencia, los resultados indican un aumento en la glicosilación de las VE

a medida que aumenta el porcentaje de HbA1c hasta el rango 5. Sin embargo, en el rango 6 se observa una reducción en la fluorescencia, alcanzando un nivel similar al observado en el rango más bajo de HbA1c (figura 4-6).

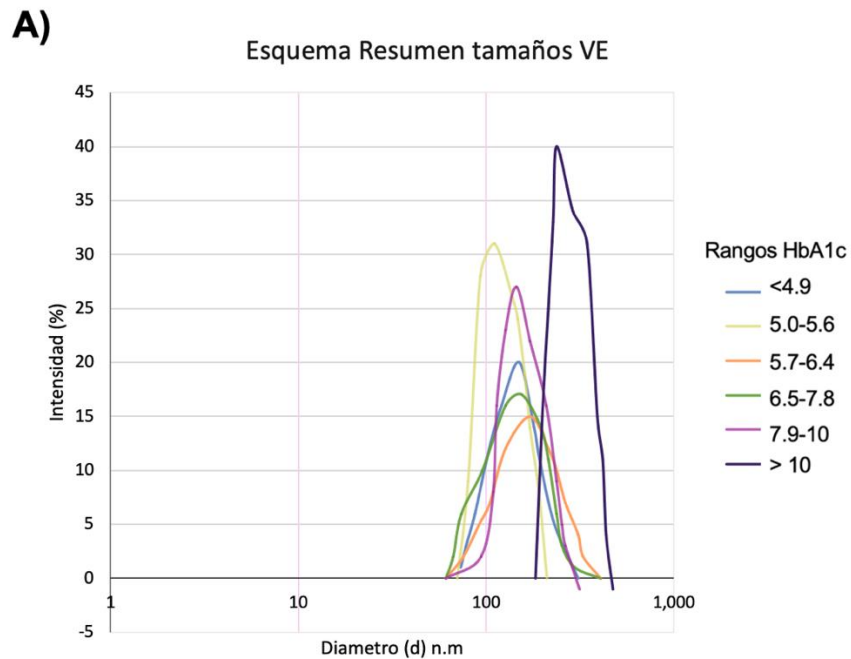


Figura 4-4 Caracterización de tamaño de vesículas extracelulares pequeñas utilizando z-sizer A) Representación de datos en gráfico por Z-Sizer. Fuente: Elaboración propia.

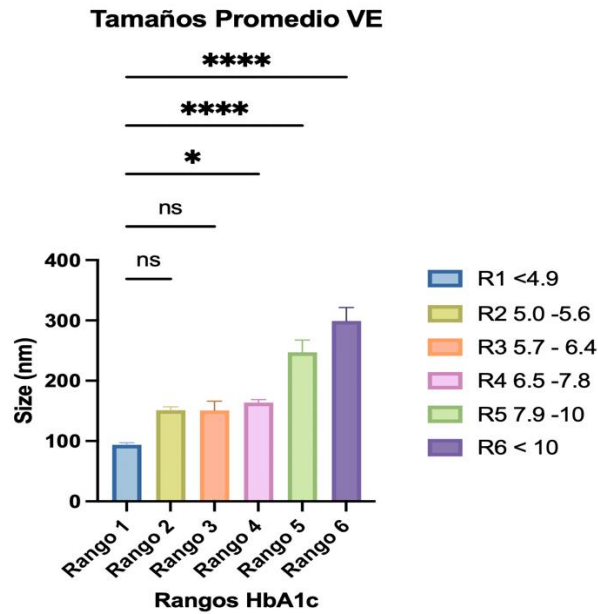


Figura 4-5 Caracterización de vesículas extracelulares pequeñas por tamaño mediante Dynamic Light Scattering utilizando Z-Sizer. Graficado en gráfico de barras. Las barras de error indican SEM. Realizado por triplicado (*) p 0.05 (**) p 0.01, (***) p 0.005 y (****) p < 0.0001. Fuente: Elaboración Propia.

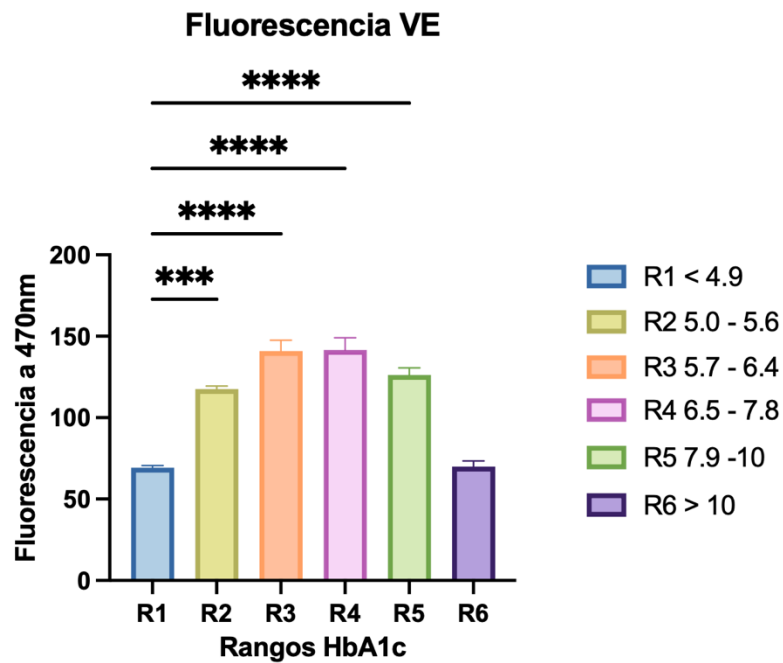


Figura 4-6 Nivel de fluorescencia de las Vesículas extracelulares pequeñas a través de Q-bit a 470 nm. Realizado por triplicado (*) p 0.05 (**) p 0.01, (***) p 0.005 y (****) p < 0.0001. Fuente: Elaboración Propia.

4.2 Evaluar el efecto de las vesículas extracelulares (VE) de pacientes con niveles crecientes de HbA1c en la viabilidad celular.

a. Ensayo de Viabilidad células HEPG2

Se evaluó la viabilidad de las células HEPG2 tratadas con vesículas extracelulares (VE) mediante el ensayo de Sulforodamina B. Las células fueron incubadas con diferentes concentraciones de vesículas extracelulares durante 24 horas en medio sin suero. Como se aprecia en la imagen, a pesar del incremento en la concentración de VE, no se observó una diferencia significativa en la viabilidad celular en ninguno de los rangos. Se registró una supervivencia celular superior al 99% en todos los casos (figura 4-7) no debe llevar titulo la figura, basta con el titulo y descripción a pie de figura.

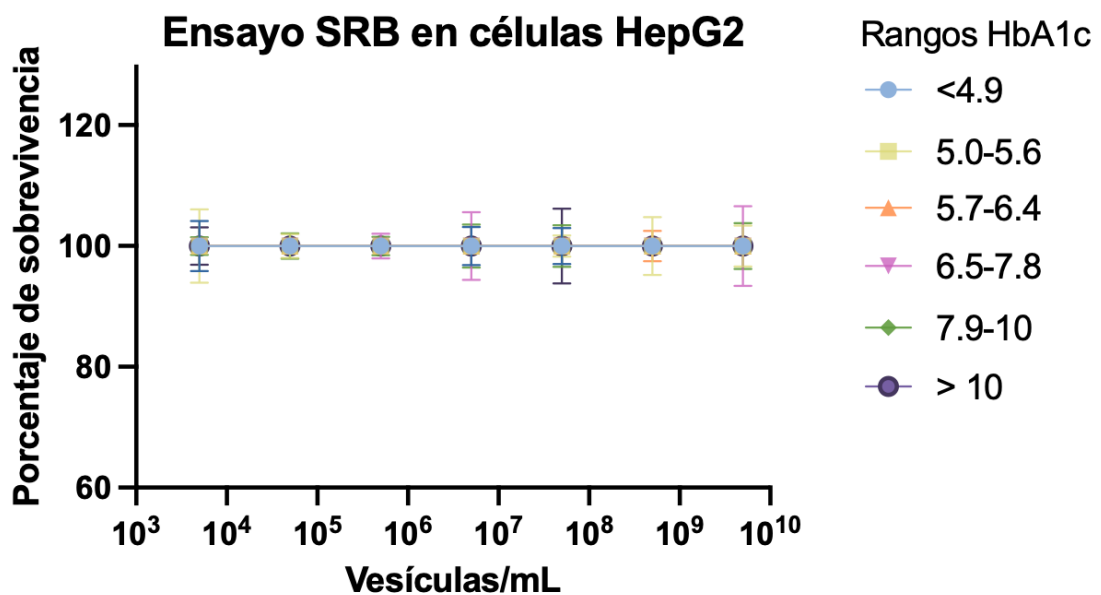


Figura 4-7 Ensayo de viabilidad de celular Sulforodamina B. Porcentaje de Supervivencia de células HEPG2 tratadas con vesículas extracelulares

provenientes de pacientes con diferentes rangos de HbA1C. Gráfico mean + SEM. El experimento fue realizado por triplicado. Elaboración propia.

4.3 Determinar el efecto de las VE de pacientes con niveles crecientes de HbA1c en la expresión de enzimas clave de la vía glucolítica en células HepG2.

a. Expresión de enzimas, transportadores y sustratos de las vías metabólicas relacionadas a la glucosa a través de RT-qPCR

Para analizar el efecto de la expresión génica en las vías relacionadas con la glucosa, las células HEPG-2 se incubaron con 5×10^8 de cada rango de HbA1c. Se evaluó el nivel de expresión de ARNm de proteínas clave involucradas en el metabolismo de la glicólisis, gluconeogénesis y glucogenólisis, incluyendo el transportador de glucosa 1 (GLUT-1), transportador de glucosa 2 (GLUT-2), transportador de glucosa 4 (GLUT-4), Hexoquinasa 2 (HKII), piruvato quinasa M (PKM), fosfofructoquinasa plaquetaria (PKFP), glicógeno sintetasa 1 (GYS1), glicógeno fosforilasa M (PYGM), fosfopiruvato carboxiquinasa (PCK1), glucosa-6-fosfato fosforilasa (G6PC), receptor de insulina (INSR) y sustrato de insulina 2 (IRS2).

a.1 Evaluación de la expresión de mRNA de proteínas claves de la glucogenogenesis y glucogenolisis.

Los resultados indican que no hubo cambios significativos en la expresión de mRNA de GYS1 en los rangos de HbA1c 1, 2, 4 y 5 en comparación con el control (células no tratadas con VE). Sin embargo, se observó una reducción drástica en la expresión de este mensajero en el rango 3 (pre-diabético), mientras

que en el rango 6 se observó un incremento en comparación con el control (figura 4-8 A).

En cuanto a la expresión del mRNA de PYGM, no se observaron cambios cuando las células HEPG2 se expusieron a VE de los rangos de HbA1c 1, 2, 4, 5 y 6. Sin embargo, se observó una drástica disminución de este mRNA en el rango 3 (figura 4-8 B).

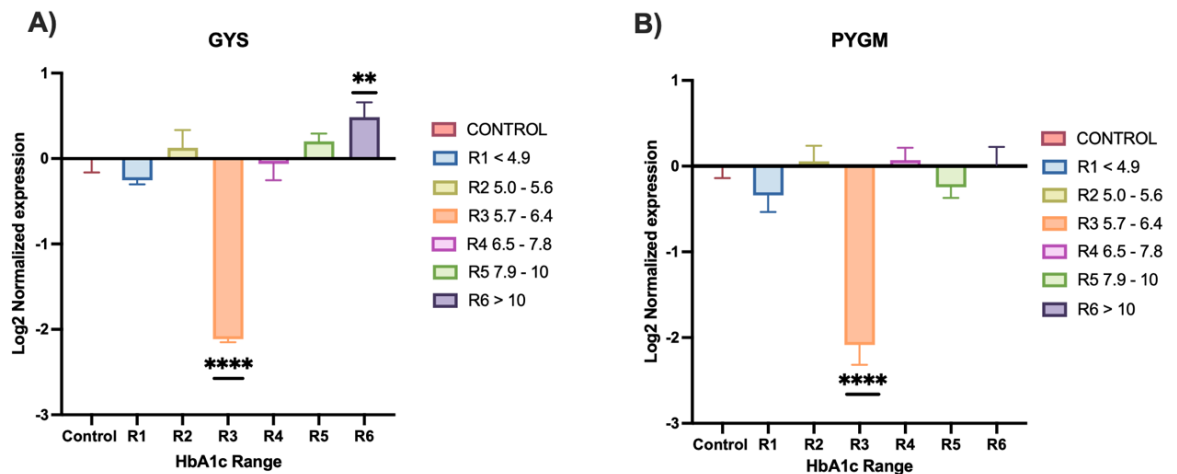


Figura 4-8 Expresión de ARNm de GYS Y PYGM en HEPG-2 tratadas con vesículas extracelulares provenientes de pacientes con diferentes rangos de HbA1C. A) Expresión de ARNm de GYS. B) Expresión de ARNm de PYGM. Gráficos de barras Mean + SEM. Realizado por triplicado (*) p 0.05 (**) p 0.01, (***) p 0.005 y (****) p < 0.0001. Fuente: Elaboración propia.

a.2 Evaluación de la expresión de mRNA de proteínas claves en gluconeogenesis.

Para evaluar el efecto de las vesículas extracelulares (VE) de diferentes rangos de HbA1c en la expresión del mRNA de las proteínas PCK1 y G6PC en células HEPG2, se realizó la cuantificación mediante PCR en tiempo real. Los

resultados muestran una disminución en la expresión de PCK1 en los rangos 1, 4 y 5, con un perfil de disminución similar. Sin embargo, se observa una drástica disminución del mRNA de PCK1 en el rango 3, aproximadamente tres veces menor en comparación con el control (no tratado con VE). En cuanto a la expresión de mRNA de G6PC, se observa un patrón de comportamiento similar al observado para PCK1. (Figura 4-9)

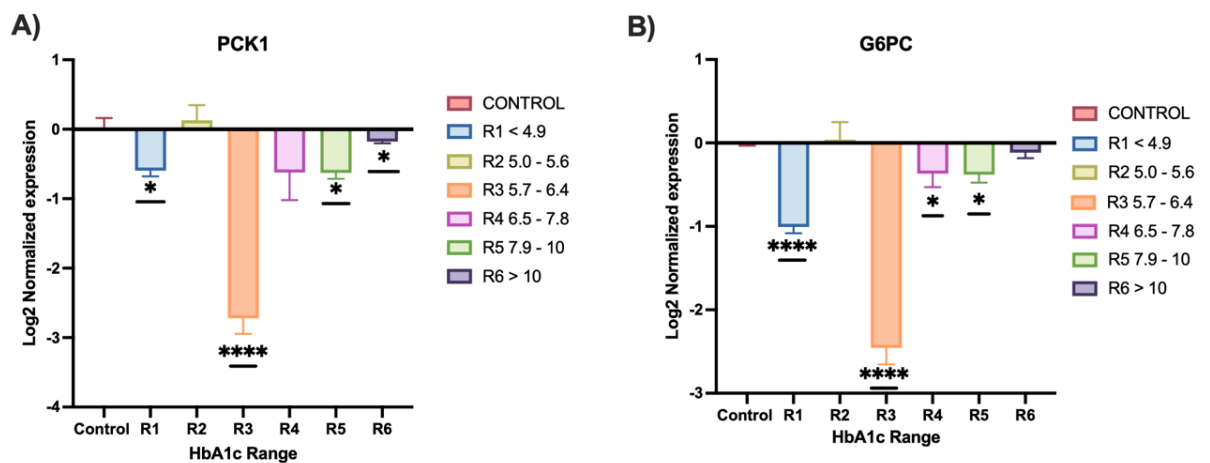


Figura 4-9 Expresión de ARNm de PCK1 Y G6PC en HEPG-2 tratadas con vesículas extracelulares provenientes de pacientes con diferentes rangos de HbA1C. A) Expresión de ARNm de PCK1. B) Expresión de ARNm de G6PC. Gráficos de barras Mean + SEM. Realizado por triplicado (*) p 0.05 (**) p 0.01, (***) p 0.005 y (****) p < 0.0001. Fuente: Elaboración propia.

a.3 Evaluación de la expresión de mRNA de proteínas claves en la captación de glucosa y en la glicolisis.

Para evaluar el efecto de las VE de los 6 rangos de HbA1c en las células HEPG2 expuestas a estas vesículas, se cuantificó la expresión de los mRNA para

GLUT1 el transportador basal de glucosa expresado en todas las células del organismo. GLUT2 el transportador mayormente expresado en tejido y células hepáticas y GLUT4 el transportador que responde a la señalización de insulina. Cuando se midió la expresión del mRNA de los transportadores de glucosa GLUT1, GLUT2 y GLUT4, se encontró que GLUT4 no cambió su nivel de expresión en comparación con el control en los rangos de HbA1c 1, 2, 4, 5 y 6. Sin embargo, se observó una drástica disminución de este mRNA en el rango 3. En cuanto a GLUT2, se observó un incremento en la expresión del mRNA en los rangos de HbA1c 2, 4 y 6, y una reducción en los rangos 3 y 5. Por otro lado, para GLUT1 se observó una reducción en su expresión en comparación con el control en los rangos 1, 3 y 5. Sin cambios significativos, comparados con el control en los rangos 2, 4 y 6 (Figura 4-10).

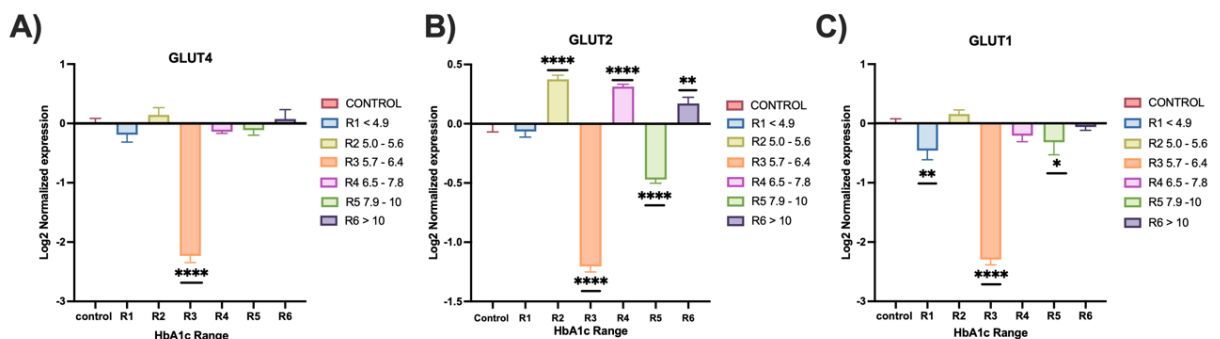


Figura 4-10 Expresión de ARNm de GLUT-4 Y GLUT-2 en HEPG-2 tratadas con vesículas extracelulares provenientes de pacientes con diferentes rangos de HbA1C. A) Expresión de ARNm de GLUT-4. B) Expresión de ARNm de GLUT-2. C) Expresión de ARNm de GLUT-1. Gráficos de barras Mean + SEM. Realizado por triplicado (*) p 0.05 (**) p 0.01, (***) p 0.005 y (****) p < 0.0001. Fuente: Elaboración propia.

Posteriormente, se evaluó la expresión de mRNA de tres enzimas regulatorias de la glicólisis en células HEPG2 expuestas a vesículas extracelulares (VE) de rangos crecientes de HbA1c del 1 al 6.

Para las enzimas HKII, PKF y PKM, se observaron diferentes patrones de expresión en respuesta a los diferentes rangos de HbA1c. La expresión de HKII mostró niveles estables en comparación con el control en los rangos 1, 4 y 6, pero hubo un aumento en los rangos 2 y 5. Sin embargo, se observó una disminución drástica de la expresión en el rango 3. En el caso de PKF, no se observaron cambios significativos con respecto al control en los rangos 1, 2, 5 y 6, pero se registró una disminución en los rangos 3, con una drástica disminución en el rango 3. Por último, para PKM, no se observaron cambios en los niveles de expresión en los rangos de HbA1c 1, 2, 4, 5 y 6, pero se observó una disminución drástica en el mRNA en el rango 3 en comparación con el control (figura 4-11).

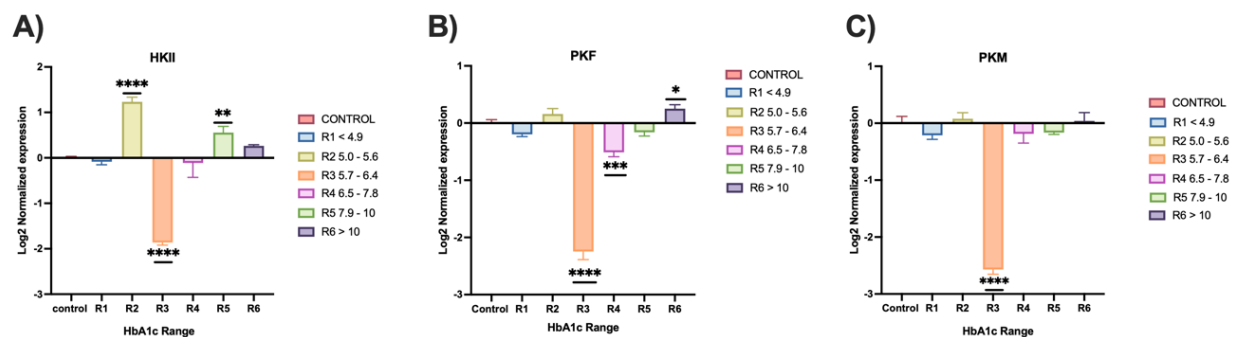


Figura 4-11 Expresión de ARNm de PKF Y PKM en HEPG-2 tratadas con vesículas extracelulares provenientes de pacientes con diferentes rangos de HbA1C. A) Expresión de ARNm de HKII. B) Expresión de ARNm de PKF. C) Expresión de ARNm de PKM. Gráficos de barras Mean + SEM. Realizado por triplicado (*) p 0.05 (**) p 0.01, (***) p 0.005 y (****) p < 0.0001 Fuente: Elaboración propia.

a.4 Evaluación de la expresión de mRNA del receptor de insulina y del sustrato del receptor de insulina.

Para evaluar el efecto de las VE de los 6 rangos de HbA1c en las células HEPG2 en la expresión de mRNA del receptor de insulina y el sustrato para receptor de insulina a través de RT-qPCR. En el caso de INSR no existen cambios con respecto al control para el rango 4 y 6 mientras que existe un aumento en la expresión para el Rango 2. Por otro lado, existe una disminución en la expresión para los rangos 1, 3 y 5, viéndose una diferencia más drástica en el rango 3 (Figura 4-12 A). En el caso de IRS 2 se observa una disminución de la expresión para los rangos 1 y 4 mientras que un aumento de la expresión de los rangos 2, 3, 5 y 6, en el caso del rango 5 el aumento es mucho mayor al resto de los rangos (Figura 4-12 B).

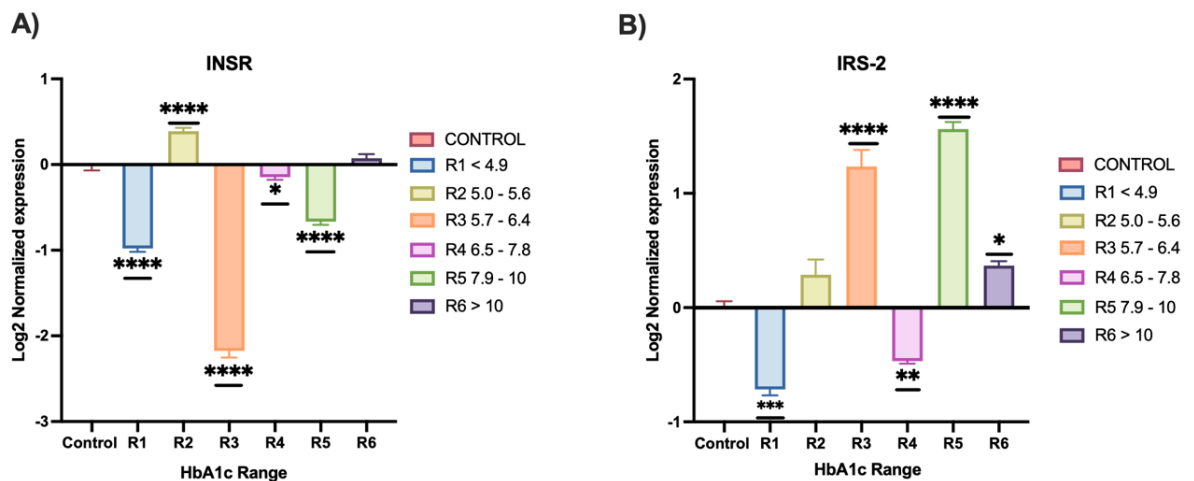


Figura 4-12 Expresión de ARNm de INSR Y IRS-2 en HEPG-2 tratadas con vesículas extracelulares provenientes de pacientes con diferentes rangos de HbA1C. A) Expresión de ARNm de INSR. B) Expresión de ARNm de IRS-2. Gráficos de barras Mean + SEM. Experimento Realizado por triplicado (*) p 0.05 (**) p 0.01, (***) p 0.005 y (****) p < 0.0001. Fuente: Elaboración propia.

b. Captación de glucosa 2-NBDG a través de Citometría de Flujo.

Para analizar los efectos de las vesículas extracelulares en captación de glucosa 2-NBDG, las células HEPG2 se incubaron con una concentración de 5×10^8 vesículas/mL de cada una de las condiciones por 24 horas sin suero. Luego se evaluó el porcentaje de captación de glucosa 2-NBDG a través de citometría de flujo. Los resultados de Captación de glucosa 2-NBDG (figura 4-13) muestran cambios significativos al comparar el control versus el rango 3 en donde se observa una reducción del 40% en el porcentaje de captación de glucosa 2-NBDG, tendencia que se mantiene en los rangos 4,5 y 6.

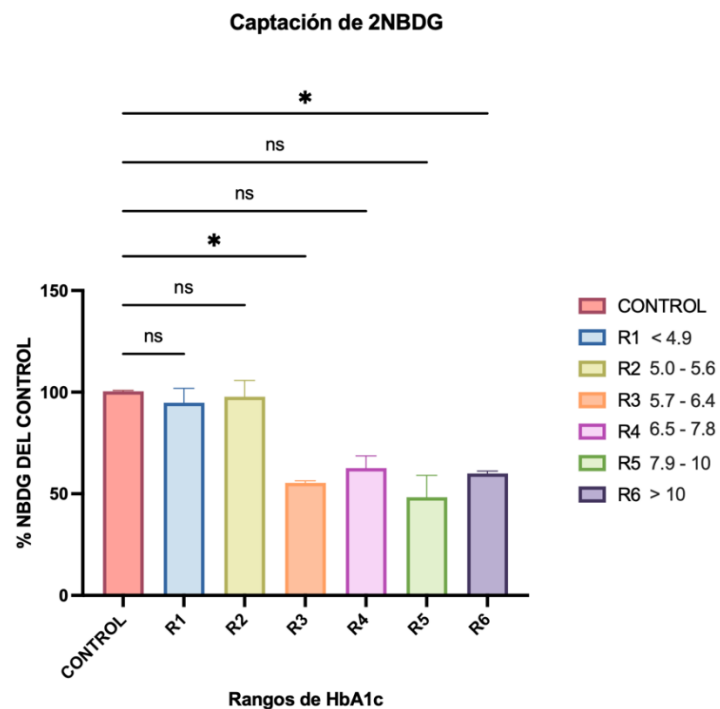


Figura 4-13 Captación de glucosa 2NBDG a través de citometría de flujo. A) Porcentaje de captación de glucosa 2NBDG en células HEPG2 tratadas con vesículas extracelulares provenientes de pacientes con diferentes rangos de HbA1C. Realizado en triplicado (*) p 0.05 (**) p 0.01, (***) p 0.005 y (****) p < 0.0001. Fuente: Elaboración propia

c. Almacenamiento de Glicógeno

Para investigar los efectos de las vesículas extracelulares en el almacenamiento de glicógeno, se llevaron a cabo experimentos utilizando células HEPG2. Estas células fueron incubadas con una concentración de 5×10^8 vesículas/mL correspondientes a cada uno de los diferentes rangos de HbA1c durante 24 horas en un medio sin suero. Posteriormente, se utilizó una técnica colorimétrica para medir el almacenamiento de glicógeno en las células.

Los resultados obtenidos de la medición del almacenamiento de glicógeno, como se muestra en la figura 4-14 revelan que en los rangos 1 y 2, asociados con niveles normales de HbA1c, no se observaron cambios significativos en el almacenamiento de glucógeno en comparación con el grupo control, que consistía en células no tratadas con vesículas extracelulares (VE). Sin embargo, en el rango 3, caracterizado por un estado prediabético, se observó una disminución en el almacenamiento de glucógeno, fenómeno que también se observó en los rangos 4 y 6. Sin embargo, en el rango 6, el nivel de almacenamiento de glucógeno fue similar al observado en el grupo control.

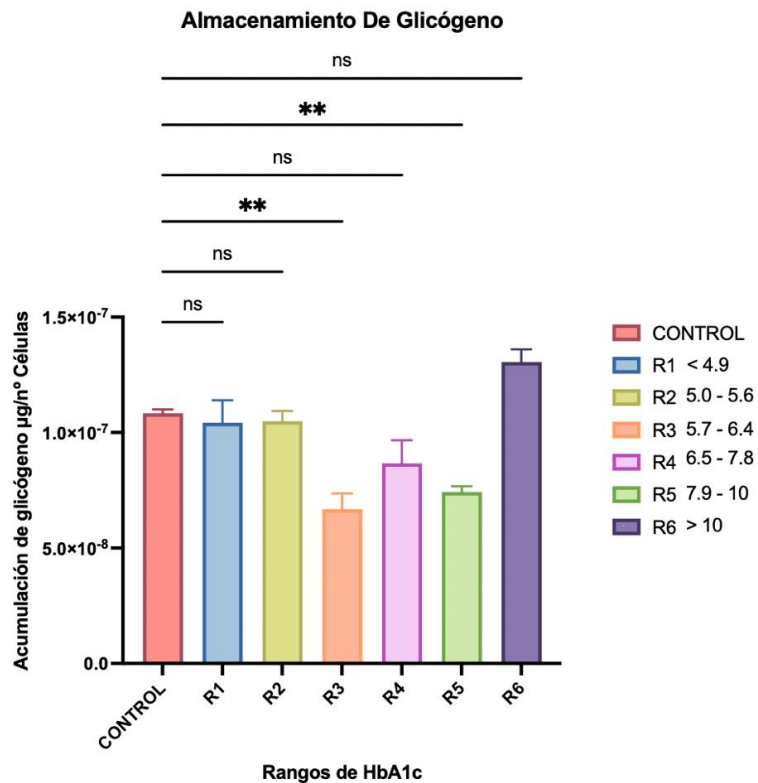


Figura 4-14 Almacenamiento de Glicógeno en células. Acumulación de glicógeno en μg por número de células HEPG2 tratadas con vesículas extracelulares provenientes de pacientes con diferentes rangos de HbA1C. Realizado por triplicado (*) p 0.05 (**) p 0.01, (***) p 0.005 y (****) p < 0.0001. Fuente: Elaboración Propia

4.4 Evaluar los efectos de las vesículas extracelulares (VE) en la disfunción metabólica de las células HepG2 a través de un análisis estadístico completo de los datos clínicos y experimentales.

a. Análisis de datos clínicos

Según los datos clínicos recopilados de los pacientes reclutados, se procedió a caracterizar cada grupo de estudio. Los datos recopilados se organizaron en una tabla que incluyó parámetros clínicos relacionados con el control de la glucosa, como la glicemia y la hemoglobina glicosilada (HbA1c), así como parámetros del perfil lipídico, como el colesterol total, el colesterol LDL, el colesterol HDL, el colesterol VLDL y los triglicéridos (TG), para cada conjunto de datos de pacientes obtenido (Tabla 4-1).

En el caso de los pacientes con niveles de triglicéridos superiores a 400, dado que no es posible calcular el colesterol LDL de acuerdo con el protocolo establecido, se realizó un ajuste necesario para mantener la homogeneidad de los datos y permitir un análisis más preciso mediante el estudio de Análisis de Componentes Principales (PCA).

Los resultados que se muestran en la tabla están ordenados de forma resumida mostrando un promedio de los resultados obtenidos junto con la desviación estándar de cada uno de ellos, junto además del P-value, sacado del método ANOVA de cada uno de los parámetros estudiados.

Los datos se analizaron mediante un Análisis de Componentes Principales (PCA), un método estadístico utilizado para reducir la dimensionalidad de los datos que se trabaja, para simplificar el número de variables o predictores de la base de datos proporcionada por cada grupo.

Tabla 4-1 Resumen de los resultados obtenidos por rango de cada uno de los parámetros clínicos relacionados a glicemia y perfil lipídico

	Rango 1	Rango 2	Rango 3	Rango 4	Rango 5	Rango 6	p-value
Hb1Ac (%)	4.6 ± 0.25	5.4 ± 0.17	6.0 ± 0.22	7.0 ± 0.25	8.8 ± 0.63	12.1 ± 1.32	< 0.0001
Glicemia (mg/dL)	103 ± 10	110 ± 25	124 ± 17	144 ± 42	189 ± 44	289 ± 107	< 0.0001
Colesterol Total (mg/dL)	181 ± 43	169 ± 46	183 ± 55	175 ± 45	186 ± 38	193 ± 51	0.779
Colesterol LDL (mg/dL)	99 ± 32	92 ± 35	104 ± 39	95 ± 35	118 ± 68	114 ± 63	0.595
Colesterol HDL (mg/dL)	45 ± 12	50 ± 6	46 ± 9	49 ± 17	49 ± 12	47 ± 11	0.848
Colesterol VLDL (mg/dL)	32 ± 19	27 ± 12	35 ± 21	32 ± 22	44 ± 27	43 ± 25	0.240
Triglicéridos (mg/dL)	162 ± 95	134 ± 61	169 ± 109	161 ± 111	217 ± 138	212 ± 125	0.251

El análisis de componentes principales (PCA) se representa gráficamente en la figura 4-15, donde se muestran los datos agrupados en las dos primeras dimensiones y su nivel de relevancia. Cada rango de HbA1c se asigna a un color específico: el rango 1 (<4.9) se representa en celeste, el rango 2 (5.0-5.6) en amarillo, el rango 3 (5.7-6.4) en naranja, el rango 4 (6.5-7.8) en rosado, el rango 5 (7.9-10) en verde y el rango 6 (>10) en violeta.

Cada grupo de datos se visualiza mediante un símbolo que representa la posición de los datos individuales y una elipse que indica la varianza o dispersión del grupo. Además, el símbolo de mayor tamaño denota el valor central de los datos

dentro del grupo. Aunque no existe una separación total entre los grupos, se pueden identificar tres grupos principales: normoglicémicos (rangos 1 y 2), pre-diabéticos (rango 3) y diabéticos (rangos 4, 5 y 6). Los grupos muestran una varianza similar entre sí, excepto el grupo 6, que presenta una mayor varianza en los datos.

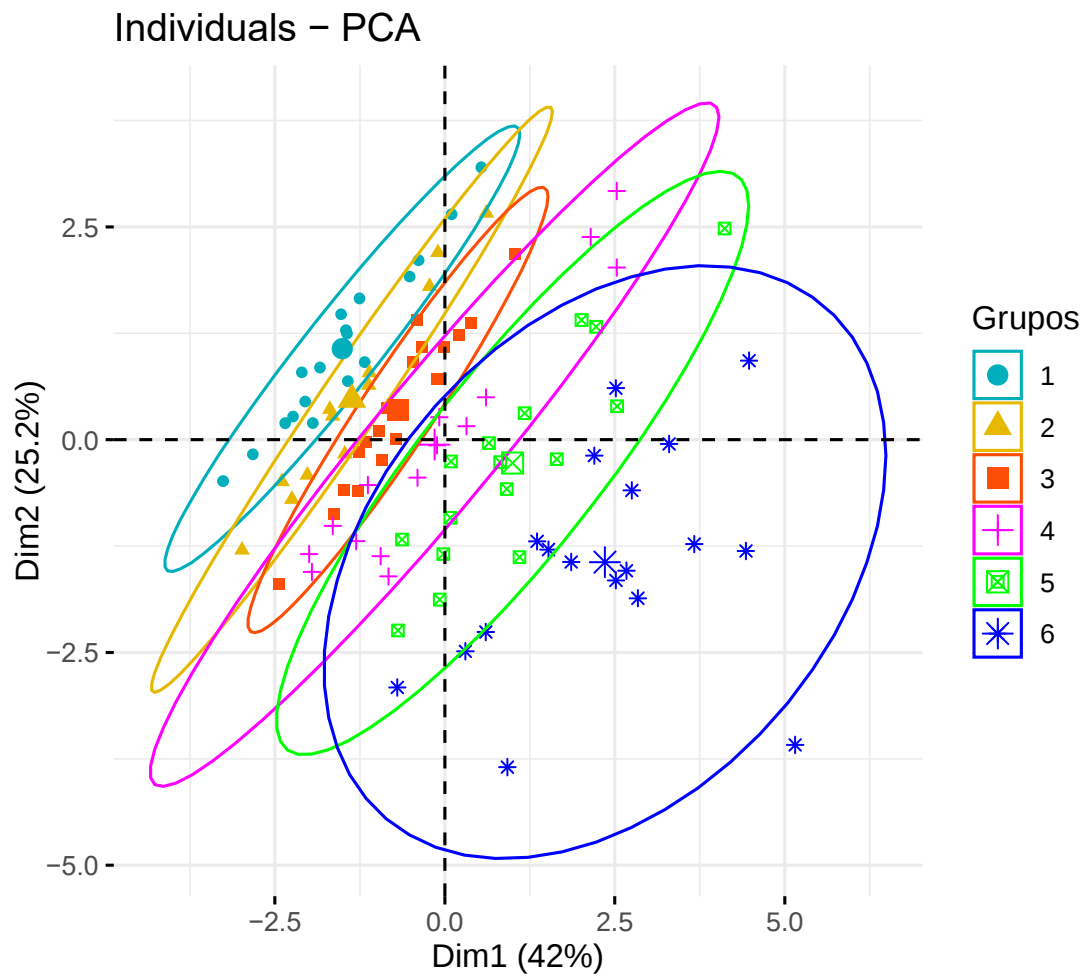


Figura 4-15 Score plot de valores individuales obtenidos de cada rango. Gráfica de elaboración propia

La figura 4-16 presenta un gráfico que ilustra el comportamiento y la relevancia de las variables estudiadas en las dos primeras dimensiones. La distribución del color en el gráfico se basa en el resultado de Cos^2 obtenido para cada variable. Cuanto mayor sea el valor de Cos^2 , mayor será la relevancia de la variable dentro del plano. Las variables que se encuentran más cerca del borde del círculo representado se consideran mejor representadas en el conjunto de los componentes.

Las variables que aparecen juntas en una misma dirección se denominan variables complementarias, ya que están relacionadas entre sí. Aquellas variables que se encuentran más cerca del centro del gráfico no son tan bien representadas por estos componentes dimensionales. Por ejemplo, el índice de riesgo (IR) tiene una mayor representación a través de otra dimensión del análisis de componentes principales.

Por otro lado, las variables mejor representadas por estos componentes son HbA1c y glicemia. Estas variables son complementarias, ya que están cerca una de la otra y tienen la misma dirección en el gráfico. Además, muestran una

influencia positiva en la Dimensión 1 (DIM1) y una influencia negativa en la Dimensión 2 (DIM2).

Esto quiere decir que, HbA1c y glicemia varían de manera similar en los datos analizados. En otras palabras, cuando los valores de HbA1c aumentan, también tiende a aumentar la glicemia, y viceversa. Además, al tener una influencia positiva en DIM1, contribuyen en gran medida a explicar la variabilidad observada en el conjunto de datos.

Por otro lado, al tener una influencia negativa en la Dimensión 2 (DIM2), indica que la relación entre HbA1c y glicemia es inversa en relación con otras variables del conjunto de datos cuando se considera esta dimensión. Esto significa que cuando HbA1c y glicemia aumentan, otras variables relacionadas pueden tender a disminuir, y viceversa.

Las variables relacionadas con el perfil lipídico (colesterol total, colesterol LDL, colesterol VLDL, triglicéridos) están representadas en igual medida en el gráfico. Tienen valores de Cos^2 entre 0.4 y 0.6, lo que indica una buena representación en los componentes. Esto significa que, aunque contribuyen a la explicación de

la variabilidad en los datos, su relación con las dimensiones DIM1 y DIM2 no es tan pronunciada como la de HbA1c y glicemia.

Estas variables también son complementarias entre sí y muestran una influencia positiva en ambas dimensiones. Esto indica que estas variables están asociadas de manera similar en los datos y pueden contribuir conjuntamente a explicar la variabilidad observada en el conjunto de datos. Es decir, cuando los niveles de colesterol total (Contreras et al.), colesterol LDL (LDL), colesterol VLDL (VLDL) y triglicéridos (TG) aumentan, otras variables también pueden aumentar, y viceversa.

En resumen, estos resultados sugieren una asociación entre HbA1c, glucemia y perfil lipídico, lo que podría indicar interrelación entre el control glucémico y los niveles de lípidos en sangre en la población estudiada.

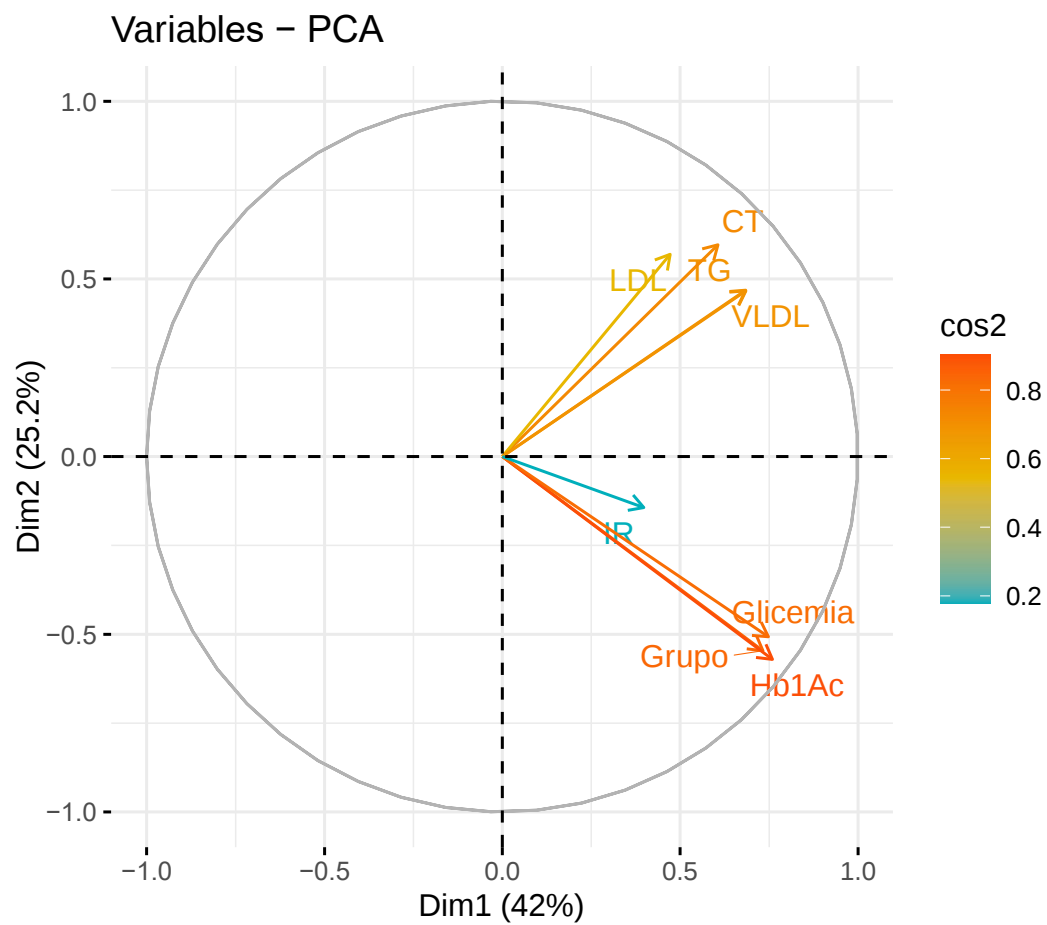


Figura 4-16 Gráfico de loadings de las variables en los planos 1-2 . Elaboración propia

Los dendrogramas, representados en la Figura 4-17 ordenan los resultados según las características individuales sin incluir la variable de grupo. Cada observación individual se representa como una "Hoja". A medida que se asciende

en la estructura del dendrograma, las hojas se fusionan a través de nodos que representan las observaciones con similitudes entre sí. Los nodos se fusionan con otros nodos cuando comparten similitudes, lo que conduce a una separación final por grupos. La altura de las uniones de los nodos indica la distancia entre los datos individuales y cómo se relacionan entre los diferentes grupos creados a partir del nodo.

Esta reorganización de los datos se realiza de manera no dirigida, lo que permite ordenar los datos en comparación con el estudio original. En este caso, el dendrograma clasifica los datos individuales de los parámetros de los pacientes en tres grupos principales, identificados por colores azul, amarillo y gris. Esta separación no está relacionada con los grupos de rangos utilizados para los ensayos funcionales, sino que genera una nueva forma de agrupación considerando únicamente los parámetros clínicos.

A pesar de esto, en el grupo de datos en azul se encuentran principalmente pacientes pertenecientes a los rangos normoglicémicos y pre-diabéticos (Rangos 1 a 3), mientras que los pacientes en el grupo de datos en gris se encuentran principalmente en los rangos diabéticos (Rangos 4 a 6). Esto sugiere una asociación entre las características clínicas de los pacientes y su agrupación en el dendrograma, lo que podría tener implicaciones importantes para la comprensión de la variabilidad en la respuesta a las variables clínicas evaluadas,

lo que podría indicar patrones o subgrupos clínicos dentro de la población estudiada.

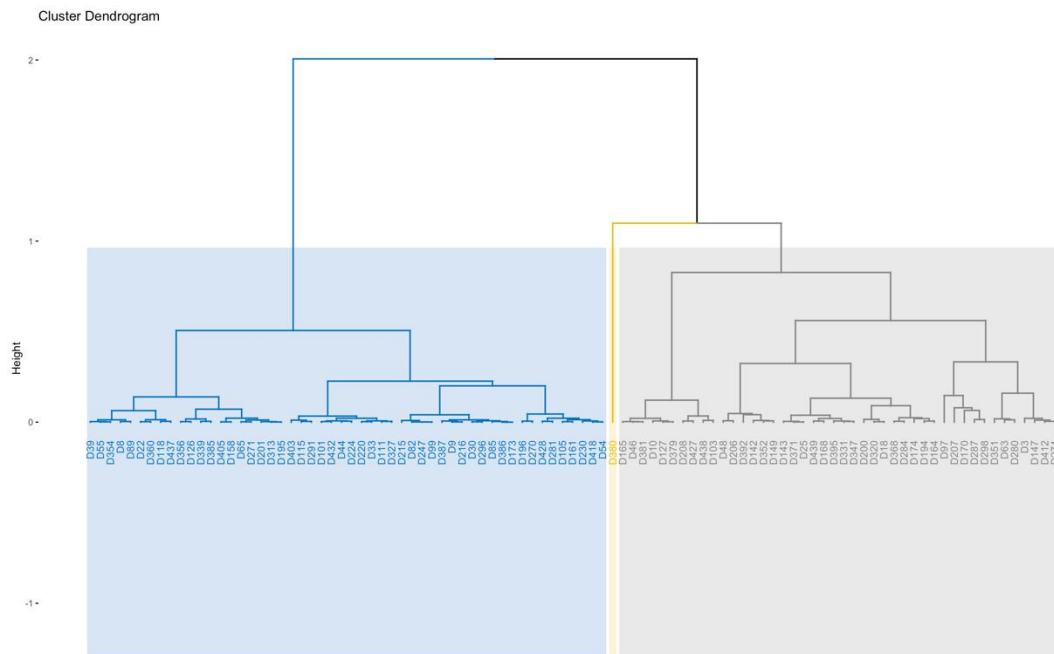


Figura 4-17 Dendrograma ordenado en clúster de la información individual de los pacientes. Gráfica de elaboración propia.

b. Análisis estadísticos de datos de Ensayos Funcionales

Para tener una mejor comprensión de los ensayos funcionales realizados en células HEPG2, se realizó un análisis de componentes principales en base a la información obtenida, se realizó una caracterización para cada uno de los grupos de estudio.

Los datos obtenidos se organizaron en una tabla que es la que se muestra a continuación (tabla 4-2) en donde se incluyen ensayos como la Captación de 2NBDG (2NBDG), el almacenamiento de Glicógeno (GC), la cuantificación de vesículas extracelulares (CV), los niveles de expresión de ARNm de proteínas clave del metabolismo glucídico, tales como el transportador de glucosa 1 (GLUT-1), transportador de glucosa 2 (GLUT-2), transportador de glucosa 4 (GLUT-4) Hexoquinasa 2 (HKII), piruvato quinasa M (PKM), fosfofructoquinasa plaquetaria (PKFP), Glicógeno sintetasa 1 (GYS), Glicógeno Fosforilasa M (PYGM), Fosfopiruvato carboquinasa (PCK1), Glucosa-6-Fosfato Fosforilasa (G6PC), Receptor de Insulina (INSR) e Sustrato de insulina 2 (IRS2).

Tabla 4-2 Resumen de los resultados obtenidos por rango de cada uno de los ensayos funcionales.

	Rango 1	Rango 2	Rango 3	Rango 4	Rango 5	Rango 6	P-value
2NBDG (%)	95.13 ± 12.4	97.76 ± 8.04	55.39 ± 0.1	62.63 ± 10.5	48.26 ± 10.8	59.95 ± 1.2	< 0.0001
GC (µg/Nºcel)	1.04.E-07	1.05.E-07	6.68.E-08	8.67.E-08	7.43.E-08	1.31.E-07	< 0.0001
CV (Ves/mL)	4.92.E+10	4.74.E+10	4.12.E+10	4.17.E+10	4.13.E+10	3.37.E+10	0.00687
GYS (log2)	-0.15 ± 0.17	0.29 ± 0.091	-1.87 ± 0.19	-0.41 ± 0.16	0.19 ± 0.13	-0.01 ± 0.16	< 0.0001
PYGM (log2)	-0.34 ± 0.19	0.06 ± 0.18	-2.09 ± 0.23	0.07 ± 0.14	-0.25 ± 0.09	0.02 ± 0.2	< 0.0001
GLUT1 (log2)	-0.46 ± 0.15	0.16 ± 0.07	-2.30 ± 0.08	-0.48 ± 0.37	-0.56 ± 0.21	-0.12 ± 0.08	< 0.0001
GLUT2 (log2)	-0.07 ± 0.05	0.37 ± 0.034	-1.20 ± 0.05	0.31 ± 0.02	-0.47± 0.031	0.17 ± 0.05	< 0.0001
GLUT4 (log2)	0.07 ± 0.14	0.41 ± 0.09	-2.02 ± 0.06	0.16 ± 0.07	0.04 ± 0.234	0.30 ± 0.19	< 0.0001
HKII (log2)	0.31 ± 0.256	1.58 ± 0.066	-1.61± 0.11	0.25 ± 0.19	0.64 ± 0.27	0.53 ±0.084	< 0.0001

PKF (log2)	-0.35 ± 0.06	0.16 ± 0.166	-2.28 ± 0.14	-0.44 ± 0.07	-0.22 ± 0.09	0.25 ± 0.04	< 0.0001
PKM (log2)	-0.04 ± 0.03	0.35 ± 0.07	-2.34 ± 0.06	0.20 ± 0.14	-0.03 ± 0.18	0.13 ± 0.09	< 0.0001
PCK1 (log2)	-0.65 ± 0.35	0.16 ± 0.11	-2.52 ± 0.27	-0.44 ± 0.22	-0.37 ± 0.08	-0.53 ± 0.15	< 0.0001
G6PC (log2)	0.99 ± 0.356	0.26 ± 0.047	-2.40 ± 0.34	-0.60 ± 0.31	-0.29 ± 0.07	-0.18 ± 0.19	< 0.0001
INSR (log2)	-1.00 ± 0.08	0.28 ± 0.02	-2.22 ± 0.04	-0.30 ± 0.04	-0.77 ± 0.06	-0.02 ± 0.05	< 0.0001
IRS2 (log2)	-0.57 ± 0.14	0.39 ± 0.12	1.32 ± 0.11	-0.43 ± 0.05	1.50 ± 0.23	0.56 ± 0.04	< 0.0001

Los resultados que se muestran en la tabla están ordenados de forma resumida mostrando un promedio de los resultados obtenidos junto con la desviación estándar de cada uno de ellos, junto además del P-value, sacado del método ANOVA de cada uno de los parámetros estudiados

El análisis de componentes principales (PCA) se representa gráficamente en la figura 4-18, donde se muestran los datos agrupados en las dos primeras dimensiones y su nivel de relevancia. Cada rango de HbA1c se asigna a un color específico: el rango 1 (<4.9) se representa en celeste, el rango 2 (5.0-5.6) en amarillo, el rango 3 (5.7-6.4) en naranja, el rango 4 (6.5-7.8) en rosado, el rango 5 (7.9-10) en verde y el rango 6 (>10) en violeta. Cada grupo tiene un símbolo que en el conjunto representa la posición de los datos individuales y una elipse que representa la varianza o dispersión del grupo de datos.

El análisis de componentes principales (PCA) reveló la distribución de los diferentes rangos de HbA1c en un plano bidimensional. Los resultados sugieren

una asociación entre los perfiles metabólicos (como la captación de glucosa, almacenamiento de glicógeno, niveles de expresión de ARNm de proteínas relacionadas con el metabolismo glucídico, etc.) y los niveles de HbA1c. Cada rango ocupa una posición única en el espacio de dos dimensiones, lo que indica una separación significativa entre los grupos. Además, se puede observar que los rangos 1 y 2, se encuentran hacia la izquierda del PCA, lo que podría indicar perfiles metabólicos asociados con niveles normales o saludables de HbA1c.

Los rangos 5 y 6: Están hacia la derecha, lo que puede reflejar alteraciones metabólicas más pronunciadas, comunes en individuos con HbA1c alto.

El rango 4, aparece en el centro respecto a la primera dimensión, pero tiene valores altos en la segunda, lo que podría indicar un perfil metabólico intermedio o mixto. Finalmente, el rango 3, está más disperso, lo que sugiere que estos individuos, que están en el rango prediabético, pueden tener una variabilidad metabólica significativa.

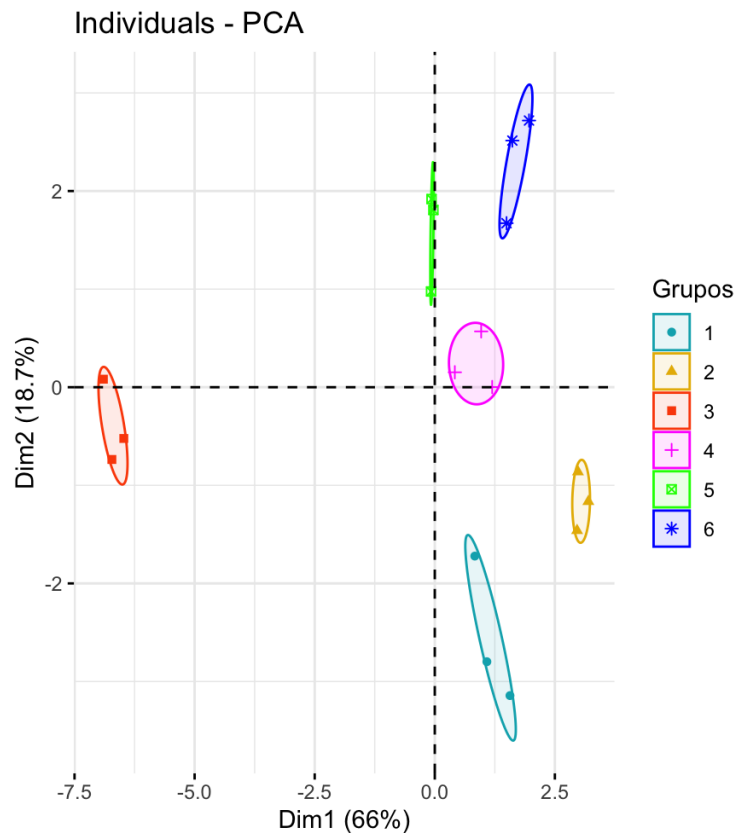


Figura 4-18 Score plot de valores individuales obtenidos de cada rango. Gráfica de elaboración propia.

En la figura 4-19 se muestra la gráfica de loadings, ofrece una vista de las contribuciones de las variables individuales a las dos componentes principales. Nos muestra cómo se relacionan los parámetros metabólicos entre sí y con los componentes principales.

Con base en la información proporcionada, el análisis de los resultados del PCA revela varias relaciones entre las variables estudiadas. La Dimensión 1 (Dim1) y

Dimensión 2 (Dim2) representan las dos componentes principales del análisis de componentes principales (PCA). Dim1 explica el 67.8% de la varianza total, mientras que Dim2 explica el 17.6%, lo que significa que juntas capturan el 85.4% de la variabilidad total en los datos. Las variables que están más alineadas con Dim1, como GLUT4, GYS1, PYGM, INSR, PKF, PKM y CAG, muestran la mayor variación a lo largo de esta dimensión. Por otro lado, las variables GLUT1, PCK1, GLUT2, HKII y G6PC variables también están correlacionadas entre sí, pero de manera inversa a las anteriores. Esto sugiere que estas variables pueden tener una fuerte influencia en las diferencias observadas entre los individuos en la primera dimensión principal. La variable IRS2 está alineada predominantemente con Dim2, lo que sugiere que esta variable es importante para explicar la variabilidad en la segunda componente principal.

Los resultados indican que la relación entre variables relacionadas con el transporte de glucosa y enzimas del metabolismo glucídico como HKII y PKM, muestran una fuerte correlación positiva entre sí y están alineadas en la misma dirección en el biplot. Esto indica que estas variables están relacionadas y contribuyen en gran medida a la variabilidad observada en los datos. En cuanto a la captación de 2NBDG y cantidad de vesículas, estas se oponen a algunas

variables de transporte de glucosa y enzimáticas, lo que sugiere una relación inversa en su influencia sobre los componentes del PCA.

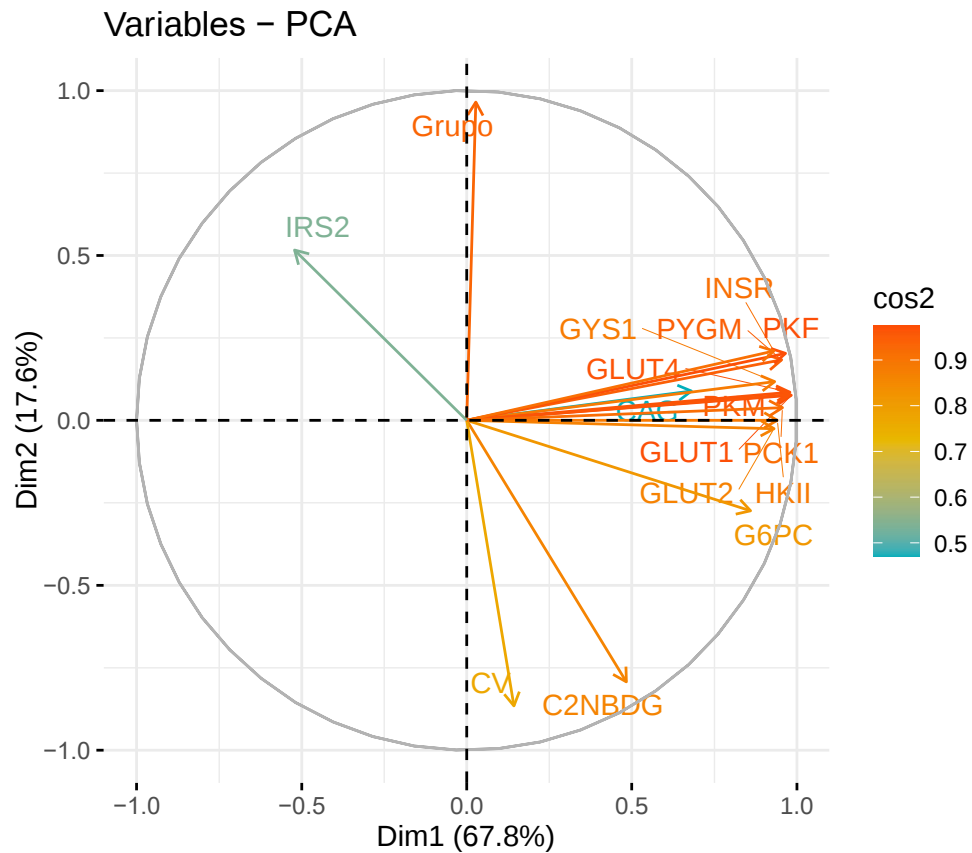


Figura 4-19 Gráfico de loadings de las variables en los planos 1-2 . Elaboración propia

El dendrograma de clustering jerárquico (figura 4-20 sobre las componentes principales muestra cómo los individuos pueden agruparse según sus perfiles metabólicos. Los colores y la estructura del árbol proporcionan información sobre la agrupación de pacientes y la similitud entre estos grupos. Los pacientes se

agrupan en clusters que pueden reflejar niveles similares de HbA1c o respuestas metabólicas similares. Estos clusters representan conjuntos de individuos que comparten características metabólicas comunes, lo que sugiere la existencia de subgrupos dentro de la población estudiada.

La altura en el dendrograma indica la distancia entre los clusters, lo que refleja la similitud o diferencia entre los perfiles metabólicos de los pacientes. Algunos pacientes o grupos de pacientes están más separados que otros en el dendrograma, lo que sugiere diferencias más marcadas en sus perfiles metabólicos. Esta distancia puede interpretarse como una medida de la variabilidad en las respuestas metabólicas dentro de la población. El dendrograma revela que los grupos correspondientes a los rangos 6 y 4 están cercanos entre sí en la parte inferior del dendrograma. A medida que ascendemos en la altura del dendrograma, se incorpora el grupo correspondiente al rango 5, sugiriendo una relación cercana entre estos tres rangos en términos de sus perfiles metabólicos. Por otro lado, los rangos 1 y 2 están relacionados entre sí en la parte más baja del dendrograma, y al aumentar la altura, se asocian con los rangos 6, 4 y 5.

Sin embargo, el rango 3 está notablemente separado de los otros grupos y solo se une en la porción más alta del dendrograma. Esta separación indica que el perfil metabólico del rango 3 es significativamente diferente al de los otros grupos,

lo que sugiere la existencia de diferencias metabólicas distintivas en este subgrupo en comparación con los demás

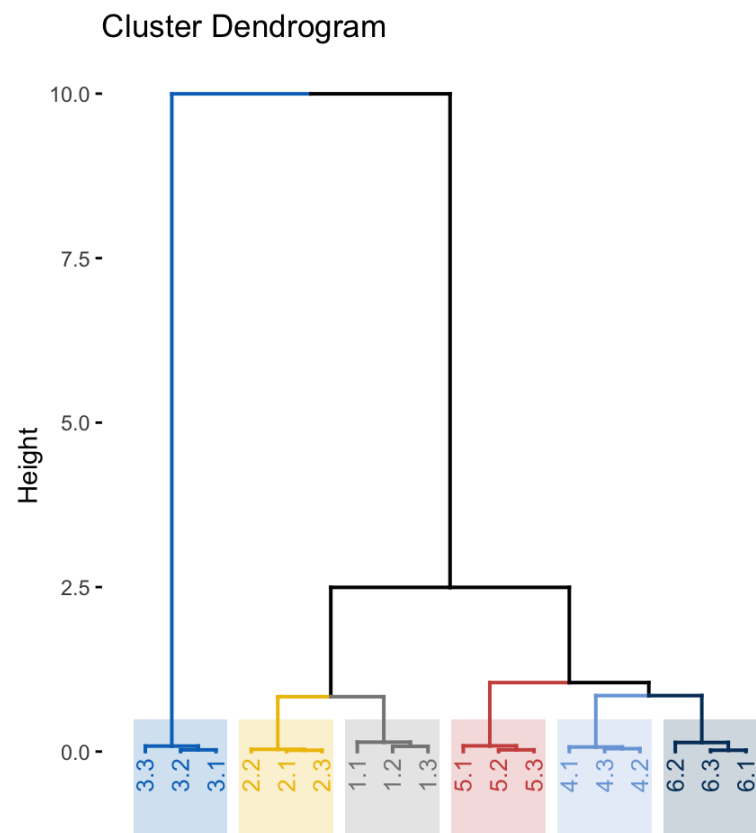


Figura 4-20 Dendrograma ordenado en cluster de la información individual de los pacientes. Gráfica de elaboración propia.

5. DISCUSIÓN

Caracterización de las Vesículas extracelulares obtenidas de rangos crecientes de HbA1c.

La caracterización de las vesículas extracelulares (VE) obtenidas de pacientes con niveles variables de HbA1c reveló diferencias significativas en múltiples parámetros analizados. Inicialmente, se cuantificaron las proteínas totales presentes en las VE, lo cual se logró mediante la lisis de estas seguida de una cuantificación proteica. Si bien, se esperaba observar cambios en la cantidad de proteínas presentes en rangos normoglicémicos versus diabéticos y prediabéticos, los resultados mostraron disparidades significativas en la concentración de proteínas de las VE, aunque no se evidenció un patrón claro de concentración relacionado con los niveles de HbA1c. Este hallazgo sugiere una complejidad en la regulación de las proteínas en las VE en respuesta a los cambios en los niveles de glucosa en sangre. Estos resultados son consistentes a los hallazgos realizados en vesículas proveniente de ratones diabéticos y normoglicémicos en donde se señala que existen diferencias en la cuantificación de proteínas entre estos dos grupos (Abolbaghaei et al., 2023).

En una segunda fase del estudio, se procedió a cuantificar el número de VE en los diferentes rangos de HbA1c utilizando ELISA con el marcador específico CD63. Los resultados revelaron una relación inversa entre el número de VE y los niveles de HbA1c, observándose una disminución significativa en la cantidad de vesículas a medida que aumentaba el rango de HbA1c. Este hallazgo contradice

las expectativas basadas en la literatura, que sugiere un aumento en el número de VE en estados diabetogénicos (van Niel et al., 2018)

Una posible explicación para esta disminución de VE en pacientes con niveles superiores de HbA1c podría estar relacionada con alteraciones en la biogénesis y liberación de VE en hiperglicemia crónica (Liu et al., 2022).

La relación entre los niveles de HbA1c y la cantidad de VE aún no está comprendida y puede ser objeto de debate. Algunos estudios han reportado resultados contradictorios, con aumentos en la cantidad de VE en pacientes diabéticos en comparación con controles sanos (Freeman et al., 2018) . Otros estudios han reportado que una carga oral de glucosa reduce los niveles de VE en pacientes obesos normoglicémicos y en pacientes prediabéticos (Eichner, N. Et Al. 2019 (Eichner et al., 2019)). Estas discrepancias podrían deberse a diferencias en las poblaciones de estudio, en las técnicas de cuantificación utilizadas y en los contextos fisiopatológicos específicos de cada estudio.

La mayoría de las publicaciones utilizan para la cuantificación de VE el NTA, una técnica, más acertada que mejora la reproducibilidad de resultados según la guía de la asociación internacional de vesículas extracelulares, a diferencia de la utilización de ELISA mediado por un marcador, que depende directamente de la expresión de dicho marcador para conocer la cantidad de vesículas presentes en las diferentes condiciones, si existiese un grupo de vesículas que no es CD63+, no estaría cuantificado por el kit, que aunque es altamente preciso es de baja

cobertura. La gran desventaja del NTA es el costo del equipo y la falta de equipos con esta tecnología en Chile, que hace más difícil la utilización de esta técnica y es por esto por lo que en este caso se decidió utilizar ELISA, que era una forma de cuantificación que estaba disponible para utilizar de forma inmediata (Kurian et al., 2021).

En relación con la caracterización de las vesículas extracelulares (VE), es esencial subrayar que las VE derivadas de los rangos de HbA1c 1 al 5 exhibieron un tamaño coherente con los valores reportados en la literatura científica para VE pequeñas o exosomas (Johnson et al., 2020). En contraste, se identificó un aumento en el tamaño de las VE en el rango 6, con un rango mayor que sugiere la presencia de vesículas excepcionalmente grandes (<200 nm). Este fenómeno podría ser indicativo de la glicación de proteínas o la fusión de vesículas, dos procesos influyentes en la fisiopatología diabética. Según el estudio realizado por Burger, D. et al. (Burger et al.), se ha demostrado que la glucosa elevada aumenta el tamaño de las partículas liberadas por las células (Burger et al., 2017). Este hallazgo es consistente con la observación de un aumento en el tamaño de las VE en respuesta a niveles elevados de HbA1c, como se documenta en nuestro estudio. Por lo que se puede sugerir que los niveles elevados de hemoglobina glicosilada, característicos de la diabetes

descontrolada, podrían desencadenar modificaciones en la composición y morfología de las VE.

Para examinar nuestra hipótesis sobre el efecto de la glicosilación de las VE Al respecto, se ha demostrado que es posible evaluar la glicosilación de proteínas en base a su la capacidad inherente de fluorescencia, tal como ha sido previamente documentado por Lau, S et al. (Lau et al.). Nuestros resultados indican que conforme aumentan los niveles de HbA1c, se evidencia un incremento en la glicación de las VE, manifestado por un aumento en la fluorescencia. A niveles más elevados de HbA1c (rango 6), los resultados muestran una disminución en la fluorescencia, lo que sugiere que la fusión de las VE pueda enmascarar la determinación de la glicosilación. Esta hipótesis se correlaciona con el aumento del tamaño promedio de las VE a medida que aumentan los niveles de HbA1c.

El tamaño de las VE puede estar influenciado por la glicosilación y por la fusión de vesículas pequeñas. En este contexto, los hallazgos de este estudio sugieren que la fusión de VE podría ser un factor contribuyente significativo al incremento en el tamaño observado. Por tanto, sería muy interesante evaluar la morfología de las VE mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), para corroborar esta hipótesis y obtener una comprensión detallada de los procesos subyacentes que conducen a las alteraciones en el tamaño y composición de las VE en respuesta a cambios en los niveles de HbA1c.

En el contexto de la investigación sobre vesículas extracelulares (VE), se emplean diversos marcadores clásicos como CD63, CD9, CD81 y TSG101 para su caracterización. Estos marcadores son fundamentales para identificar y estudiar las VE en diferentes tipos de muestras biológicas. En este estudio se pudo determinar la presencia de los marcadores CD81 y CD63 en los grupos investigados. CD63 fue evaluado de forma implícita, siendo utilizado como agente de captura de las VE mediante beads magnéticas en el proceso de citometría de flujo. Esta metodología permitió la identificación de vesículas extracelulares con doble marcación. Por otro lado, se observó un marcado positivo de CD81 en altos porcentajes en todas las poblaciones estudiadas, lo cual coincide con investigaciones previas realizadas por Shtam, T. et al. (2020), quienes reportaron una presencia notable de la población CD81+ de VE en diversas condiciones. La ausencia de poblaciones CD9+ en nuestro estudio no descarta la naturaleza de las vesículas estudiadas como VE, dado que esto puede atribuirse a varios factores. Estos incluyen la notable heterogeneidad de las VE, como se ha mencionado en estudios previos (van de Wakker et al., 2023), así como la sensibilidad técnica y la especificidad de unión de los marcadores CD9 a sus receptores. A partir de los ensayos realizados en este estudio, podemos concluir que las vesículas analizadas son, en su mayoría, VE pequeñas o exosomas.

Análisis Funcionales: Efecto de las VE de rangos crecientes de HbA1c en el metabolismo glucídico en células HEPG2.

La evaluación del efecto de la progresión de la diabetes en la función hepática cobra vital importancia al considerar el papel central del hígado en el metabolismo glucídico. Este órgano desempeña un papel crucial en la regulación de la glucosa en sangre mediante procesos como la glicólisis, glucogenogénesis, glucogenólisis y gluconeogénesis. La disfunción metabólica asociada con la diabetes, caracterizada por la resistencia a la insulina y la hiperglucemia, puede tener un impacto significativo en la función hepática. Esta alteración metabólica puede conducir a la acumulación de lípidos en el hígado, dando lugar al desarrollo del hígado graso no alcohólico (NAFLD). Por lo tanto, comprender cómo la diabetes afecta el metabolismo hepático es esencial no solo para abordar la progresión de la diabetes, sino también para prevenir y tratar las complicaciones hepáticas asociadas, como el NAFLD. Bajo ese contexto evaluamos el efecto de las VE sobre el metabolismo glucídico en células HEPG2. Uno de los primeros pasos fue evaluar como las VE de los 6 rangos de HbA1c afectan la viabilidad de estas células.

Los resultados obtenidos revelan que las vesículas extracelulares (VE) no inducen citotoxicidad ni provocan muerte celular en el modelo HEPG2, lo que sugiere su potencial aplicación en estudios funcionales. La literatura existente respalda la elección de una concentración de 5×10^8 , como lo indican investigaciones previas (ElBadre, H. et al., 2023). Dado que esta concentración no compromete la viabilidad celular, se establece como la más adecuada para

ser empleada en los ensayos funcionales subsiguientes que requieran la participación de VE. Esta selección cuidadosa de la concentración de VE no solo garantiza la integridad del modelo celular, sino que también asegura la validez y fiabilidad de los resultados obtenidos en los experimentos posteriores.

Los resultados obtenidos de la evaluación del efecto de las vesículas extracelulares (VE) de distintos rangos de HbA1c en las células HEPG2 revelan una respuesta compleja y específica de cada marcador y enzima involucrada en el metabolismo de la glucosa y la señalización de la insulina.

En primer lugar, se observó que la expresión del mRNA de los transportadores de glucosa GLUT1, GLUT2 y GLUT4 mostró diferentes patrones en respuesta a los distintos rangos de HbA1c. Notablemente, se detectó una drástica disminución en la expresión de GLUT4 en el rango 3, mientras que la expresión de GLUT2 mostró un incremento en los rangos 2, 4 y 6, pero una reducción en los rangos 3 y 5. En cuanto a GLUT1, se evidenció una reducción en su expresión en los rangos 1, 3 y 5, mientras que no hubo cambios significativos en los rangos 2, 4 y 6. Estos resultados están en consonancia en parte con lo discutido en la literatura, donde se ha observado una tendencia a la disminución en la expresión de GLUT4 en la diabetes tipo 2 (DMT2), mientras que GLUT1 y GLUT2 tienden a aumentar (Chadt & Al-Hasani, 2020 2020). Además, es importante considerar el posible impacto de los medicamentos consumidos por los pacientes. En este estudio, la condición más cercana a la patología pura está en el rango

prediabético, asociado con un tratamiento mínimo o nulo. Por otro lado, en los rangos diabéticos, existe un tratamiento farmacológico subyacente que podría influir en la calidad de los resultados. A pesar de estas consideraciones, los hallazgos sugieren una clara desregulación en la expresión de transportadores cruciales para el metabolismo glucídico, lo que podría tener implicaciones significativas en el rendimiento metabólico celular.

Por otro lado, al analizar la expresión de las enzimas reguladoras de la glicólisis HKII, PKF y PKM, se identificaron patrones de expresión divergentes en respuesta a los diferentes rangos de HbA1c. Por ejemplo, la expresión de HKII mostró niveles estables en los rangos 1, 4 y 6, pero aumentó en los rangos 2 y 5, mientras que se observó una disminución drástica en el rango 3. Similarmente, para PKF, no se detectaron cambios significativos en los rangos 1, 2, 5 y 6, pero se registró una marcada en el rango 3. En el caso de PKM, no se observaron cambios en los niveles de expresión en los rangos 1, 2, 4, 5 y 6, pero se identificó una disminución drástica en el rango 3 en comparación con el control. En el caso de la hexoquinasa II (HKII), se espera que su expresión aumente con el incremento de glucosa, como se observa levemente en los rangos 4, 5 y 6 (diabéticos) en comparación con el control (Rabbani et al., 2022 P., 2022). Respecto al piruvato quinasa (PKF), se esperaría un aumento en su expresión en etapas tempranas de aumento de glucosa, como se observa en cierta medida en el rango 2, pero conforme disminuye la disponibilidad de insulina, la expresión

de esta enzima tiende a disminuir, como se evidencia en los rangos 3, 4 y 5 (Rabbani & Thornalley, 2023 2024). En el rango 6, se registra un ligero aumento de esta vía, posiblemente como una respuesta compensatoria cuando el tejido ya se encuentra en una etapa de desregulación avanzada debido al progreso de la patología

En cuanto a la expresión del receptor de insulina (INSR) y el sustrato para receptor de insulina (IRS 2), se observaron cambios significativos en su expresión en respuesta a los distintos rangos de HbA1c. Mientras que la expresión de INSR no mostró cambios en los rangos 4 y 6, pero aumentó en el rango 2 y disminuyó en los rangos 1, 3 y 5, con una reducción más pronunciada en el rango 3; la expresión de IRS 2 disminuyó en los rangos 1 y 4, pero aumentó en los rangos 2, 3, 5 y 6, siendo especialmente elevada en el rango 5. El patrón de comportamiento de INSR se alinea con lo anticipado en la literatura para la diabetes tipo 2 (DMT2) y condiciones de resistencia a la insulina (IR) (Payankaulam et al., 2019). Por otro lado, en cuanto al sustrato del receptor de insulina 2 (IRS2), su comportamiento muestra una tendencia opuesta al INSR en los rangos 3 y 5, lo que podría interpretarse como una medida compensatoria para activar el receptor de insulina. Investigaciones previas sugieren que la disminución de IRS2 perpetúa patrones diabetogénicos, lo que indica que se espera que su expresión esté reducida en DMT2 (Withers et al., 1998). Este fenómeno ha sido confirmado en pacientes diabéticos con una expresión

hepática disminuida de IRS2, aunque esta relación se destaca más en pacientes con hígado graso y diabetes (Krause et al., 2020).

Además, los resultados de la captación de glucosa 2-NBDG revelaron una reducción significativa en el porcentaje de captación en el rango 3, tendencia que se mantuvo en los rangos 4, 5 y 6, indicando una disminución en la capacidad de captación de glucosa en células expuestas a VE de estos rangos de HbA1c.

Por último, la medición del almacenamiento de glicógeno mostró una disminución en los rangos 3, 4 y 6, mientras que en el rango 6, el nivel de almacenamiento fue similar al del grupo control. Esto sugiere que la exposición a VE de estos rangos de HbA1c afecta negativamente el almacenamiento de glicógeno en las células HEPG2, especialmente en aquellos rangos asociados con estados prediabéticos o diabéticos. La literatura indica que los niveles de glicógeno tienden a disminuir en presencia de diabetes tipo 2 (DMT2), aunque el mecanismo exacto no está completamente comprendido (Galicia-Garcia et al., 2020). Se sabe que la insulina es crucial en la síntesis de glicógeno hepático, y la sobreexpresión de GYS podría ser compensatoria y una respuesta al uso de medicamentos como la insulina, administrada en diabetes más avanzada.

Los mayores cambios se observan en el rango 3, el análisis de estos datos revela una respuesta distintiva de las células hepáticas HEPG2 a las vesículas

extracelulares asociadas con la prediabetes. Se observa una reducción en la expresión de GLUT2, sugiriendo una disminución en la captación de glucosa, y un aumento en la expresión de IRS2, indicando un intento de compensación frente a la resistencia a la insulina. Además, se registra una disminución en la expresión de PKM, lo que sugiere una reducción en la capacidad de metabolización de glucosa (figura 5-1). Estos hallazgos subrayan la adaptación compleja de las células hepáticas en la prediabetes para mantener la homeostasis glucémica. Este entendimiento podría guiar el desarrollo de terapias dirigidas a prevenir la progresión a diabetes tipo 2 y sus complicaciones hepáticas.

Respecto al rango 6, caracterizado por niveles de HbA1c mayores al 10%, se observa una respuesta metabólica disfuncional en las células hepáticas HEPG2, a pesar del tratamiento con antidiabéticos e insulina. Aunque ocurren cambios metabólicos que apuntan a mejorar el uso y almacenamiento de glucosa, persiste la hiperglucemia, lo que sugiere una ineficacia en la regulación glucémica a nivel hepático en este estado avanzado de la diabetes tipo 2 (figura 5-2).

En conjunto, estos resultados indican una respuesta heterogénea de las células HEPG2 a las VE de diferentes rangos de HbA1c, lo que sugiere una compleja interacción entre el estado glucémico y la función celular, destacando la importancia de evaluar detalladamente los efectos de las VE en el contexto de la progresión de la diabetes y sus implicaciones en el metabolismo hepático.

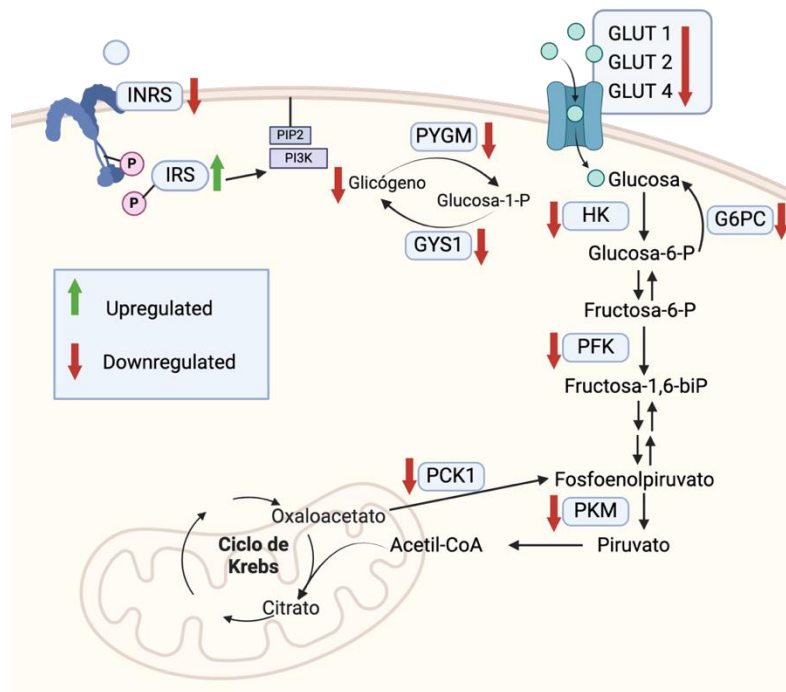


Figura 5-1 Esquema resumen de la expresión de las vías relacionadas a la glucosa y almacenamiento de glicógeno del Rango 3. Fuente: Elaboración Propia

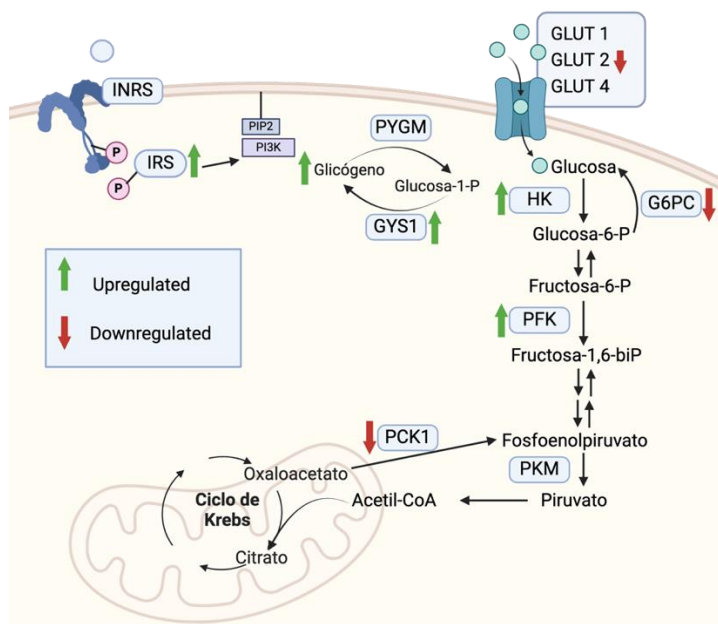


Figura 5-2 Esquema resumen de la expresión de las vías relacionadas a la glucosa y almacenamiento de glicógeno del Rango 6. Fuente: Elaboración Propia

Análisis estadísticos de los datos clínicos y ensayos funcionales.

Con respecto a los datos clínicos, se observaron diferencias significativas principalmente en la HbA1c y la glicemia ($p\text{-valor} < 0.0001$), los cuales son parámetros críticos en el diagnóstico y seguimiento de la DMT2, justificando su relevancia en el análisis estadístico de correlación, como el ANOVA. Otros parámetros clínicos, aunque relacionados con la enfermedad, no son específicos de la diabetes y sus fluctuaciones pueden atribuirse a otras condiciones subyacentes. Es importante destacar que la HbA1c y la glicemia tienden al aumento y están correlacionadas. En relación al colesterol total, LDL, VLDL y triglicéridos, la mayoría de los parámetros clínicos no mostraron significancia estadística y no tienden al aumento, excepto el colesterol VLDL, que mostró una leve tendencia creciente con los niveles de HbA1c y glicemia.

Al aplicar el Análisis de Componentes Principales (PCA) a los datos, se observa que el 42% de la variabilidad está representada por la primera dimensión, y casi el 70% por las dos primeras dimensiones. Se identifica una tendencia positiva en la DIM 1 y una tendencia negativa en la DIM 2 a medida que se avanza en los rangos. Esta variación en la varianza de los rangos se corresponde con la progresión de la enfermedad, ya que los pacientes con DMT2 muestran mayores niveles de HbA1c y alteraciones en el perfil lipídico. Esto se condice además con lo observado en estudios como el de De, D. Et Al (De et al.) en donde los parámetros clínicos de pacientes diabéticos y normoglicémicos que más sobresaltan es la hemoglobina glicosilada y perfil lipídico tiene un menor impacto, en la dimensión contraria.

En cuanto a la distribución de los grupos, aunque no haya separación completa, se distinguen tres grupos dentro de los seis rangos establecidos. Estos grupos se definen por los rangos de HbA1c: normoglicémicos (rangos 1 y 2), pre-diabéticos (rango 3), y diabéticos (rangos 4, 5 y 6).

En el caso de la gráfica que explica los datos con la varianza, se destaca que las variables de glicemia, grupo y HbA1c tienen un alto coseno cuadrado ($\cos^2$), lo que indica una fuerte influencia en la varianza de los datos y una buena representación en las dimensiones correspondientes. Las variables del perfil lipídico, aunque tienen un $\cos^2$ menor, también están bien representadas por

las primeras dos dimensiones. Por otro lado, la variable IR tiene una baja representatividad en las dimensiones del PCA. Este comportamiento se condice con lo visto en literatura, en donde el perfil lipídico se mantiene en la mismo cuadrante dimensional a excepción de HDL y HbA1c se mantiene un cuadrante distinto ("Standards of Care in Diabetes-2023 Abridged for Primary Care Providers," 2022).

Para la jerarquización de las muestras individuales de pacientes, se observa la separación en dos grupos principales: uno gris y otro azul. Los pacientes de los primeros tres rangos tienden a agruparse en el grupo azul, mientras que los pacientes de los últimos tres rangos se agrupan en el grupo gris. Las similitudes en los parámetros clínicos entre los nodos cercanos indican una coherencia en la agrupación de los datos según los rangos de HbA1c. En resumen, al considerar únicamente los parámetros clínicos, se podrían identificar diferencias significativas entre estos grupos.

Los datos de los ensayos funcionales presentan una alta significancia estadística, con un valor de $p < 0.0001$ en su mayoría, lo que indica una fuerte relación entre estas variables y los grupos de estudio. Al aplicar el Análisis de Componentes Principales (PCA) a estos datos, se encuentra que el 66% de la variabilidad está representada por la primera dimensión y casi el 90% por las dos primeras

dimensiones, lo cual permite una representación efectiva de la estructura de los datos en un plano bidimensional.

Cuando se distribuyen los valores individuales en un plano bidimensional, se encuentra que los grupos están fuertemente separados unos de otros, destacando la influencia del grupo 3 (Rango 3, HbA1c 5.7-6.4), que exhibe una relación más compleja con otras variables, explicada principalmente por la segunda dimensión del PCA. Por otro lado, los grupos 1 y 2 tienen una mayor influencia en la dirección definida por la primera dimensión, lo que indica que estas variables tienen un peso significativo en la variabilidad total de los datos.

En cuanto al comportamiento de las variables individuales, la mayoría presenta un alto valor de coseno cuadrado (COS^2), lo que indica una buena representación en las componentes principales del PCA. Las vías relacionadas con la glucosa muestran una alta relevancia, mientras que otros ensayos funcionales como la captación de 2NBDG o el almacenamiento de glicógeno (CAG) también son relevantes, aunque en menor medida. Es importante destacar que la falta de réplicas puede haber afectado la prolijidad de los resultados obtenidos.

El dendrograma de la figura 4-20 revela un orden jerárquico de las muestras individuales de los ensayos funcionales, con una agrupación coherente según los

rangos de hemoglobina glicosilada. Esto sugiere que los ensayos funcionales tienen una alta relevancia en la agrupación de los datos y refuerza la importancia de los parámetros de hemoglobina glicosilada y glicemia en la separación de grupos.

6. CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES

En este estudio, se evidenció que las vesículas extracelulares (VE) muestran variaciones según los niveles de hemoglobina glicosilada (HbA1c), lo que sugiere una asociación entre la composición de estas vesículas y el estado glucémico del individuo. Además, se observó que las VE provenientes de rangos elevados de HbA1c presentan una morfología distinta en comparación con las provenientes de rangos normoglicémicos, lo que podría ser discernible mediante técnicas como la microscopía electrónica de transmisión.

Asimismo, se identificó que las VE ejercen un impacto metabólico en el tejido hepático, lo que sugiere que un entorno hiperglicémico puede modificar el contenido de estas vesículas, generando alteraciones en los tejidos receptores. La expresión de genes relacionados con la glicólisis y la gluconeogénesis se ve notablemente afectada por las VE más asociadas con la diabetes, lo que podría explicarse por los efectos en el perfil hepático y el metabolismo lipídico. Este fenómeno podría contribuir al aumento de la glicemia, exacerbando los síntomas de la diabetes, dado que existen múltiples factores involucrados en la glicemia crónica, como se discute en el octeto ominoso.

Además, se destaca la importancia de investigar el perfil hepático de los pacientes y realizar experimentos funcionales, como la captación de colesterol, para comprender mejor cómo las VE afectan el metabolismo lipídico. La

utilización de medicamentos antidiabéticos puede generar limitaciones en el estudio como los del Rango 6 (HbA1c >10).

En cuanto al análisis de datos, se observó que las agrupaciones obtenidas mediante análisis de componentes principales (PCA) difieren entre los conjuntos de datos presentados, aunque ambos están correlacionados con los niveles de glicemia y HbA1c. Se propone la realización de ensayos futuros utilizando datos individuales de pacientes para analizar ensayos funcionales y resultados clínicos en un solo PCA, lo que podría brindar una visión más completa del comportamiento metabólico en diferentes niveles de HbA1c.

En conclusión, el efecto de las VE parece depender asociarse al del rango de HbA1c al que pertenecen y podría tener implicaciones metabólicas en los tejidos diana, lo que subraya la importancia de comprender su papel en la fisiopatología de la diabetes mellitus.

7. GLOSARIO

DMT2 Diabetes Mellitus Tipo 2

DMG Diabetes Mellitus Gestacional

HbA1c Hemoglobina Glicosilada

R1 Rango 1 HbA1c < 4.9

R2 Rango 2 HbA1c 5.0-5.6

R3 Rango 3 HbA1c 5.7-6.4

R4 Rango 4 HbA1c 6.5-7.8

R5 Rango 5 HbA1c 7.9-10

R6 Rango 5 HbA1c > 10

VE Vesículas Extracelulares Pequeñas

DLS Dynamic light Scattering

SRB Sulforodamina B

TCA Acido Tricloro Acético

ADN Acido desoxirribonucleico

ARN Acido ribonucleico

MVB Cuerpo multivesicular

TEM Microscopía electrónica de transmisión

NTA Nanoparticle Tracking Analysis

GYS Glucógeno sintasa

PYGM Glucógeno Fosforilasa

GLUT1 Transportador de Glucosa 1

GLUT2 Transportador de Glucosa 2

GLUT4 Transportador de Glucosa 4

HKII Hexoquinasa 2

PKF Fosfatofructoquinasa

PKM Piruvato quinasa

PCK1 Fosfofenolpiruvatocarboxiquinasa

G6PC Glucosa-6-fosfatasa

INSR Receptor de Insulina

IRS2 Sustrato de Insulina 2

PCA Análisis de Componentes Principales

8. REFERENCIAS

- Abolbaghaei, A., Turner, M., Thibodeau, J.-F., Holterman, C. E., Kennedy, C. R. J., & Burger, D. (2023). The Proteome of Circulating Large Extracellular Vesicles in Diabetes and Hypertension. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), 4930. <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/5/4930>
- Adeva-Andany, M. M., Perez-Felpete, N., Fernandez-Fernandez, C., Donapetry-Garcia, C., & Pazos-Garcia, C. (2016). Liver glucose metabolism in humans. *Biosci Rep*, 36(6). <https://doi.org/10.1042/BSR20160385>
- Akbar, N., Azzimato, V., Choudhury, R. P., & Aouadi, M. (2019). Extracellular vesicles in metabolic disease. *Diabetologia*, 62(12), 2179-2187. <https://doi.org/10.1007/s00125-019-05014-5>
- Barthel, A., & Schmoll, D. (2003). Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 285(4), E685-692. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00253.2003>
- Burger, D., Turner, M., Xiao, F., Munkonda, M. N., Akbari, S., & Burns, K. D. (2017). High glucose increases the formation and pro-oxidative activity of endothelial microparticles. *Diabetologia*, 60(9), 1791-1800. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4331-2>
- Chadt, A., & Al-Hasani, H. (2020). Glucose transporters in adipose tissue, liver, and skeletal muscle in metabolic health and disease. *Pflugers Arch*, 472(9), 1273-1298. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02417-x>
- Chan, M. (2016). Informe Mundial de la Salud. *Organización Mundial de la Salud*.
- Chang, W., & Wang, J. (2019). Exosomes and Their Noncoding RNA Cargo Are Emerging as New Modulators for Diabetes Mellitus. *Cells*, 8(8). <https://doi.org/10.3390/cells8080853>
- Cipriani-Thorne, E., & Quintanilla, A. (2010). Diabetes mellitus tipo 2 y resistencia a la insulina. *Revista Medica Herediana*, 21, 160-171. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2010000300008&nrm=iso
- Contreras, H., Alarcón-Zapata, P., Nova-Lamperti, E., Ormazabal, V., Varas-Godoy, M., Salomon, C., & Zuniga, F. A. (2023). Comparative study of size exclusion chromatography for isolation of small extracellular vesicle from cell-conditioned media, plasma, urine, and saliva [Original Research]. *Frontiers in Nanotechnology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fnano.2023.1146772>
- Couch, Y., Buzas, E. I., Di Vizio, D., Gho, Y. S., Harrison, P., Hill, A. F., Lotvall, J., Raposo, G., Stahl, P. D., Thery, C., Witwer, K. W., & Carter, D. R. F. (2021). A brief history of nearly EV-erything - The rise and rise of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*, 10(14), e12144. <https://doi.org/10.1002/jev2.12144>
- Daryabor, G., Atashzar, M. R., Kabelitz, D., Meri, S., & Kalantar, K. (2020). The Effects of Type 2 Diabetes Mellitus on Organ Metabolism and the Immune

- System. *Front Immunol*, 11, 1582. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01582>
- De, D., Nayak, T., Chowdhury, S., & Dhal, P. K. (2022). Insights of Host Physiological Parameters and Gut Microbiome of Indian Type 2 Diabetic Patients Visualized via Metagenomics and Machine Learning Approaches. *Front Microbiol*, 13, 914124. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.914124>
- DeFronzo, R. A. (2018). Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. In E. Bonora & R. A. DeFronzo (Eds.), *Diabetes Epidemiology, Genetics, Pathogenesis, Diagnosis, Prevention, and Treatment* (pp. 181-253). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45015-5_8
- Deng, Z. B., Poliakov, A., Hardy, R. W., Clements, R., Liu, C., Liu, Y., Wang, J., Xiang, X., Zhang, S., Zhuang, X., Shah, S. V., Sun, D., Michalek, S., Grizzle, W. E., Garvey, T., Mobley, J., & Zhang, H. G. (2009). Adipose tissue exosome-like vesicles mediate activation of macrophage-induced insulin resistance. *Diabetes*, 58(11), 2498-2505. <https://doi.org/10.2337/db09-0216>
- Dong, X., Park, S., Lin, X., Copps, K., Yi, X., & White, M. F. (2006). Irs1 and Irs2 signaling is essential for hepatic glucose homeostasis and systemic growth. *J Clin Invest*, 116(1), 101-114. <https://doi.org/10.1172/jci25735>
- Eichner, N. Z. M., Gilbertson, N. M., Musante, L., La Salvia, S., Weltman, A., Erdbrügger, U., & Malin, S. K. (2019). An Oral Glucose Load Decreases Postprandial Extracellular Vesicles in Obese Adults with and without Prediabetes. *Nutrients*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/nu11030580>
- Espinoza, M. A., Abbott, T., Passi, A., & Balmaceda, C. (2022). Health and economic effects on patients with type 2 diabetes mellitus in the long run: predictions for the Chilean population. *Diabetol Metab Syndr*, 14(1), 155. <https://doi.org/10.1186/s13098-022-00928-4>
- Federartion, I. D. (2021). *Diabetes Atlas 2021*. IDF. Retrieved 04/03/2023 from <https://diabetesatlas.org/>
- Freeman, D. W., Noren Hooten, N., Eitan, E., Green, J., Mode, N. A., Bodogai, M., Zhang, Y., Lehrmann, E., Zonderman, A. B., Biragyn, A., Egan, J., Becker, K. G., Mattson, M. P., Ejioogu, N., & Evans, M. K. (2018). Altered Extracellular Vesicle Concentration, Cargo, and Function in Diabetes. *Diabetes*, 67(11), 2377-2388. <https://doi.org/10.2337/db17-1308>
- Galicía-García, U., Benito-Vicente, A., Jebari, S., Larrea-Sebal, A., Siddiqi, H., Uribe, K. B., Ostolaza, H., & Martín, C. (2020). Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci*, 21(17). <https://doi.org/10.3390/ijms21176275>
- Gancedo Martínez, J., Carrera Izquierdo, E., Alconchel Gracia, S., & García, A. I. D. (2006). Seguimiento de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 en un centro de salud [10.1016/S1138-3593(06)73271-3]. *Medicina de Familia. SEMERGEN*, 32(6), 265-272. [https://doi.org/10.1016/S1138-3593\(06\)73271-3](https://doi.org/10.1016/S1138-3593(06)73271-3)

- Germán Campuzano-Maya, G. L.-S. (2010). La HbA1c en el diagnóstico y en el manejo de la diabetes. *La clínica y el laboratorio*, 16(5-6).
- Han, H. S., Kang, G., Kim, J. S., Choi, B. H., & Koo, S. H. (2016). Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. *Exp Mol Med*, 48(3), e218. <https://doi.org/10.1038/emm.2015.122>
- Hatting, M., Tavares, C. D. J., Sharabi, K., Rines, A. K., & Puigserver, P. (2018). Insulin regulation of gluconeogenesis. *Ann N Y Acad Sci*, 1411(1), 21-35. <https://doi.org/10.1111/nyas.13435>
- Herzig, S., & Shaw, R. J. (2018). AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19(2), 121-135. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.95>
- Hessvik, N. P., & Llorente, A. (2018). Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell Mol Life Sci*, 75(2), 193-208. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2595-9>
- Jiang, S., Young, J. L., Wang, K., Qian, Y., & Cai, L. (2020). Diabetic-induced alterations in hepatic glucose and lipid metabolism: The role of type 1 and type 2 diabetes mellitus (Review). *Mol Med Rep*, 22(2), 603-611. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11175>
- Johnson, S. M., Banyard, A., Smith, C., Mironov, A., & McCabe, M. G. (2020). Large Extracellular Vesicles Can be Characterised by Multiplex Labelling Using Imaging Flow Cytometry. *Int J Mol Sci*, 21(22). <https://doi.org/10.3390/ijms21228723>
- Katayama, M., Wiklander, O. P. B., Fritz, T., Caidahl, K., El-Andaloussi, S., Zierath, J. R., & Krook, A. (2019). Circulating Exosomal miR-20b-5p Is Elevated in Type 2 Diabetes and Could Impair Insulin Action in Human Skeletal Muscle. *Diabetes*, 68(3), 515-526. <https://doi.org/10.2337/db18-0470>
- Kranendonk, M. E., de Kleijn, D. P., Kalkhoven, E., Kanhai, D. A., Uiterwaal, C. S., van der Graaf, Y., Pasterkamp, G., & Visseren, F. L. (2014). Extracellular vesicle markers in relation to obesity and metabolic complications in patients with manifest cardiovascular disease. *Cardiovasc Diabetol*, 13, 37. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-13-37>
- Krause, C., Geißler, C., Tackenberg, H., El Gammal, A. T., Wolter, S., Spranger, J., Mann, O., Lehnert, H., & Kirchner, H. (2020). Multi-layered epigenetic regulation of IRS2 expression in the liver of obese individuals with type 2 diabetes. *Diabetologia*, 63(10), 2182-2193. <https://doi.org/10.1007/s00125-020-05212-6>
- Kurian, T. K., Banik, S., Gopal, D., Chakrabarti, S., & Mazumder, N. (2021). Elucidating Methods for Isolation and Quantification of Exosomes: A Review. *Mol Biotechnol*, 63(4), 249-266. <https://doi.org/10.1007/s12033-021-00300-3>
- Lakhter, A. J., Pratt, R. E., Moore, R. E., Doucette, K. K., Maier, B. F., DiMeglio, L. A., & Sims, E. K. (2018). Beta cell extracellular vesicle miR-21-5p cargo is increased in response to inflammatory cytokines and serves as a

- biomarker of type 1 diabetes. *Diabetologia*, 61(5), 1124-1134. <https://doi.org/10.1007/s00125-018-4559-5>
- Lang, T. F., & Hussain, K. (2014). Pediatric hypoglycemia. *Adv Clin Chem*, 63, 211-245. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800094-6.00006-6>
- Lau, S. Y., Kang, M., Hisey, C. L., & Chamley, L. W. (2023). Studying exogenous extracellular vesicle biodistribution by in vivo fluorescence microscopy. *Dis Model Mech*, 16(8). <https://doi.org/10.1242/dmm.050074>
- Lawan, A., Zhang, L., Gatzke, F., Min, K., Jurczak, M. J., Al-Mutairi, M., Richter, P., Camporez, J. P., Couvillon, A., Pesta, D., Roth Flach, R. J., Shulman, G. I., & Bennett, A. M. (2015). Hepatic mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 selectively regulates glucose metabolism and energy homeostasis. *Mol Cell Biol*, 35(1), 26-40. <https://doi.org/10.1128/mcb.00503-14>
- Leiva, A.-M., Martínez, M.-A., Petermann, F., Garrido-Méndez, A., Poblete-Valderrama, F., Díaz-Martínez, X., & Celis-Morales, C. (2018). Factores asociados al desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 en Chile. *Nutrición Hospitalaria*, 35, 400-407. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112018000200400&nrm=iso
- Li, H., Rafie, R., Xu, Z., & Siddiqui, R. A. (2022). Phytochemical profile and anti-oxidation activity changes during ginger (*Zingiber officinale*) harvest: Baby ginger attenuates lipid accumulation and ameliorates glucose uptake in HepG2 cells. *Food Sci Nutr*, 10(1), 133-144. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2654>
- Li, S., Wei, J., Zhang, C., Li, X., Meng, W., Mo, X., Zhang, Q., Liu, Q., Ren, K., Du, R., Tian, H., & Li, J. (2016). Cell-Derived Microparticles in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Cell Physiol Biochem*, 39(6), 2439-2450. <https://doi.org/10.1159/000452512>
- Li, X. B., Gu, J. D., & Zhou, Q. H. (2015). Review of aerobic glycolysis and its key enzymes - new targets for lung cancer therapy. *Thorac Cancer*, 6(1), 17-24. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.12148>
- Liu, J., Zhang, Y., Tian, Y., Huang, W., Tong, N., & Fu, X. (2022). Integrative biology of extracellular vesicles in diabetes mellitus and diabetic complications. *Theranostics*, 12(3), 1342-1372. <https://doi.org/10.7150/thno.65778>
- Magnusson, I., Rothman, D. L., Katz, L. D., Shulman, R. G., & Shulman, G. I. (1992). Increased rate of gluconeogenesis in type II diabetes mellitus. A ¹³C nuclear magnetic resonance study. *J Clin Invest*, 90(4), 1323-1327. <https://doi.org/10.1172/jci115997>
- Maiz., C. G. A. H. M. G. D. L. R. A. N. S. I. M. C. E. F. E. C. P. M. A. A. (2010). GUÍA CLÍNICA DIABETES MELLITUS TIPO 2. . MINISTERIO DE SALUD. <https://www.minsal.cl/portal/url/item/72213ed52c3e23d1e04001011f011398.pdf>

- Medina-Pérez, E., Sánchez-Reyes, A, Hernández-Peredo, AR, Martínez-López, MA, Jiménez-Flores, CN, Serrano-Ortiz, I, Maqueda-Pineda, AV, Islas-Cruz, DN, & Cruz-González, M. . (2017). Diabetes gestacional. Diagnóstico y tratamiento en el primer nivel de atención. *Medicina interna de México*, 33(1), 91-98.
- Miyake, K., Ogawa, W., Matsumoto, M., Nakamura, T., Sakaue, H., & Kasuga, M. (2002). Hyperinsulinemia, glucose intolerance, and dyslipidemia induced by acute inhibition of phosphoinositide 3-kinase signaling in the liver. *J Clin Invest*, 110(10), 1483-1491. <https://doi.org/10.1172/jci15880>
- Ndisang, J. F., Vannacci, A., & Rastogi, S. (2017). Insulin Resistance, Type 1 and Type 2 Diabetes, and Related Complications 2017. *J Diabetes Res*, 2017, 1478294. <https://doi.org/10.1155/2017/1478294>
- Noren Hooten, N., & Evans, M. K. (2020). Extracellular vesicles as signaling mediators in type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Cell Physiol*, 318(6), C1189-c1199. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00536.2019>
- Payankaulam, S., Raicu, A. M., & Arnosti, D. N. (2019). Transcriptional Regulation of INSR, the Insulin Receptor Gene. *Genes (Basel)*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/genes10120984>
- Pellegrini, P. (2021). Recomendaciones sobre el uso de departamento laboratorio biomédico nacional y de referencia hemoglobina glicada a1c (hba1c) en el diagnóstico de diabetes mellitus. . *Instituto de Salud Pública de Chile*, 1. <https://www.ispch.cl/wp-content/uploads/2021/01/Recomendaciones-sobre-el-uso-de-HbA1c-en-el-diagn%C3%B3stico-de-Diabetes-Mellitus2020.pdf>.
- Rabbani, N., & Thornalley, P. J. (2023). Hexokinase-linked glycolytic overload and unscheduled glycolysis in hyperglycemia-induced pathogenesis of insulin resistance, beta-cell glucotoxicity, and diabetic vascular complications. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 14, 1268308. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1268308>
- Rabbani, N., Xue, M., & Thornalley, P. J. (2022). Hexokinase-2-Linked Glycolytic Overload and Unscheduled Glycolysis-Driver of Insulin Resistance and Development of Vascular Complications of Diabetes. *Int J Mol Sci*, 23(4). <https://doi.org/10.3390/ijms23042165>
- Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*, 200(4), 373-383. <https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>
- Rines, A. K., Sharabi, K., Tavares, C. D., & Puigserver, P. (2016). Targeting hepatic glucose metabolism in the treatment of type 2 diabetes. *Nat Rev Drug Discov*, 15(11), 786-804. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.151>
- Roberts, D. J., & Miyamoto, S. (2015). Hexokinase II integrates energy metabolism and cellular protection: Acting on mitochondria and TORCing to autophagy. *Cell Death Differ*, 22(2), 364. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.208>

- Salomon, C., Das, S., Erdbrugger, U., Kalluri, R., Kiang Lim, S., Olefsky, J. M., Rice, G. E., Sahoo, S., Andy Tao, W., Vader, P., Wang, Q., & Weaver, A. M. (2022). Extracellular Vesicles and Their Emerging Roles as Cellular Messengers in Endocrinology: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr Rev*, 43(3), 441-468. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnac009>
- Sarker, S., Scholz-Romero, K., Perez, A., Illanes, S. E., Mitchell, M. D., Rice, G. E., & Salomon, C. (2014). Placenta-derived exosomes continuously increase in maternal circulation over the first trimester of pregnancy. *J Transl Med*, 12, 204. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-204>
- Solis-Herrera, C., Triplitt, C., Cersosimo, E., & DeFronzo, R. A. (2021). Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. In K. R. Feingold, B. Anawalt, M. R. Blackman, A. Boyce, G. Chrousos, E. Corpas, W. W. de Herder, K. Dhatariya, K. Dungan, J. Hofland, S. Kalra, G. Kaltsas, N. Kapoor, C. Koch, P. Kopp, M. Korbonits, C. S. Kovacs, W. Kuohung, B. Laferrère, M. Levy, E. A. McGee, R. McLachlan, M. New, J. Purnell, R. Sahay, A. S. Shah, F. Singer, M. A. Sperling, C. A. Stratakis, D. L. Trence, & D. P. Wilson (Eds.), *Endotext*. MDTText.com, Inc.
- Copyright © 2000-2024, MDTText.com, Inc.
- Srur, A. (2016). *EL Desafío de la Diabetes en Chile*. https://redcronicas.minsal.cl/wrdprss_minsal/wp-content/uploads/2014/04/Compendio-de-Diabetes-Chile.pdf
- Standards of Care in Diabetes-2023 Abridged for Primary Care Providers. (2022). *Clin Diabetes*, 41(1), 4-31. <https://doi.org/10.2337/cd23-as01>
- Toledo-Oñate, K. (2023). Dependencia del Metabolismo Celular con la Sensibilidad a Drogas Antineoplásicas en Células de Cáncer de Ovario. .
- van de Wakker, S. I., Meijers, F. M., Sluijter, J. P. G., & Vader, P. (2023). Extracellular Vesicle Heterogeneity and Its Impact for Regenerative Medicine Applications. *Pharmacol Rev*, 75(5), 1043-1061. <https://doi.org/10.1124/pharmrev.123.000841>
- van Niel, G., D'Angelo, G., & Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19(4), 213-228. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>
- Ward, P. S., & Thompson, C. B. (2012). Signaling in control of cell growth and metabolism. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(7), a006783. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006783>
- Webb, B. A., Forouhar, F., Szu, F. E., Seetharaman, J., Tong, L., & Barber, D. L. (2015). Structures of human phosphofructokinase-1 and atomic basis of cancer-associated mutations. *Nature*, 523(7558), 111-114. <https://doi.org/10.1038/nature14405>
- Withers, D. J., Gutierrez, J. S., Towery, H., Burks, D. J., Ren, J. M., Previs, S., Zhang, Y., Bernal, D., Pons, S., Shulman, G. I., Bonner-Weir, S., & White, M. F. (1998). Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature*, 391(6670), 900-904. <https://doi.org/10.1038/36116>

Zhang, Y., Bi, J., Huang, J., Tang, Y., Du, S., & Li, P. (2020). Exosome: A Review of Its Classification, Isolation Techniques, Storage, Diagnostic and Targeted Therapy Applications. *Int J Nanomedicine*, 15, 6917-6934. <https://doi.org/10.2147/IJN.S264498>

1. ANEXO

1. Patrocinio

Proyecto FONDECYT iniciación 11109522 y VRID-UDEC 220.062.043M

2. Ética

Las muestras obtenidas para este estudio son donaciones desde el CESFAM de Hualqui, estas muestras son de pacientes anónimos, por ende, la información personal de los participantes no será compartida por los investigadores involucrados en el estudio. Todos estos procedimientos y protocolos están aprobados por el comité de ética de la facultad de ciencias biológicas de la Universidad de concepción y por el Servicio de Salud De concepción SEC-23-09-2023.

Se utilizará el siguiente formato para el consentimiento informado para el uso de muestra de los pacientes.

3. Ejemplo de Consentimiento informado



Universidad
de Concepción



Versión 2.1, Octubre 2023

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA DONACIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE RESIDUALES

Nombre del Estudio: "Explorando las implicaciones en el metabolismo glucídico de las vesículas extracelulares de pacientes diabéticos en células Hepáticas."

- **Investigador Principal:** Dra. Msc. BQ.Valeska Ormazabal V.
- **Centro de Investigación:** Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.
- **Co-guía:** Msc. BQ. Luis Briceño
- **Patrocinador:** Universidad de Concepción.

INTRODUCCIÓN:

Le saludamos cordialmente y nos complace invitarle a participar en un estudio de investigación científica titulado **"Explorando las implicaciones en el metabolismo glucídico de las vesículas extracelulares de pacientes diabéticos en células hepáticas"**. En este proyecto, deseamos entender cómo pequeñas partículas que están en la sangre y que actúan como mensajeros afectan la forma en que nuestro cuerpo maneja el azúcar. Nos enfocamos en personas con altos niveles de azúcar en la sangre, como los pacientes diabéticos y personas con azúcar en sangre normal. ¿Sabías que estas partículas tienen información especial que ayuda a controlar tus órganos, como el hígado, los músculos y la grasa? Nos preguntamos qué mensajes llevan en personas con diferentes niveles de azúcar en la sangre. Para aprender más, obtendremos estas partículas de la sangre y las estudiaremos en el laboratorio. También veremos cómo pueden afectar la forma en que el cuerpo usa el azúcar. Nuestro objetivo es entender mejor cómo funciona el cuerpo en personas con diabetes comparado con personas con niveles de azúcar normal en la sangre. Si decides participar, estarás ayudando a avanzar en el conocimiento y posiblemente a encontrar mejores formas de tratar la diabetes. ¡Gracias por considerar unirse a este emocionante estudio!

Es por eso que les solicitamos **que donen la sangre que no se utiliza después de sus exámenes de rutina en el CESFAM, aquella que será eliminada una vez realizados todos los exámenes. También necesitamos su permiso para conocer sus niveles de azúcar y grasa en la sangre. No vamos a requerir más muestras ni realizaremos otros procedimientos.**

Nuestra prioridad es brindarle información clara, precisa y suficientemente detallada para que pueda evaluar, juzgar y decidir de manera informada si desea participar en este estudio. Es importante que tome el tiempo necesario para leer detenidamente esta hoja informativa y que

1



Universidad
de Concepción



tenga la libertad de consultar cualquier duda o inquietud que pudiera surgir durante el proceso. No tiene que decir hoy, si participará en la investigación.

Fundamento del estudio: Cada año, más personas son diagnosticadas con diabetes, lo que trae consigo problemas de salud, gastos en tratamientos médicos y frecuentes visitas al médico. Esto se debe a que la diabetes puede llevar a complicaciones como presión arterial alta, problemas al corazón, hígado graso, problemas en los pies y daño a los riñones. Lograr entender cómo la diabetes afecta a otros órganos es importante para prevenir daños mayores y encontrar soluciones a estos problemas de salud. En la sangre de todas las personas, existen pequeñas partículas que envían mensajes sobre la salud general, las enfermedades y el avance de ciertos problemas de salud. Creemos que si entendemos los mensajes de estas partículas en personas con diferentes niveles de azúcar en la sangre, podremos entender cómo la diabetes daña diversos órganos. Por lo tanto, deseamos investigar, en el laboratorio, estas partículas en la sangre y analizar cómo afectan al hígado, y si están relacionadas con los niveles de azúcar y grasa en la sangre de quienes participan en el estudio. Este estudio ayudará a mejorar nuestro conocimiento de cómo la diabetes afecta al cuerpo y puede aportar en el futuro al desarrollo de nuevos tratamientos para esta enfermedad que causa tanto daño al paciente y a su familia.

El estudio se llevará a cabo en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción, Chile, en colaboración con el departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología de la Facultad de Farmacia. Contamos con el patrocinio de la Universidad de Concepción para llevar a cabo esta investigación.

Razón por la que se invita a la persona participar. Invitamos a todos los adultos mayores de 18 años que se hagan exámenes en el CESFAM Hualqui. Necesitamos voluntarios con diferentes niveles de azúcar en la sangre, desde normal hasta alto. Su ayuda es muy importante para entender mejor como los niveles de azúcar en sangre van dañando a otros órganos en los pacientes con diabetes. Sus datos y muestras de sangre son clave para tener resultados importantes y dar información útil para futuras investigaciones y tratamientos.

Quienes pueden participar: Mayores de 18 años, con o sin diabetes.

Quienes no pueden participar: Adultos de 18 años, que tengan alguna enfermedad del hígado, que sean alcohólicos, o que estén utilizando medicamentos como corticoides o citoestáticos, embarazadas y madres que estén amamantando a sus hijos o hijas.

Tipo de Intervención: Se solicita donar la sangre que sobra después de la realización de los exámenes solicitados por el médico. Además, acceso a su ficha de medicamentos y a los resultados de los exámenes de laboratorio realizados en el CESFAM: perfil glicémico (niveles de azúcar: glucosa y Hemoglobina glicosilada) y perfil lipídico (niveles de grasa: colesterol total, LDL, HDL y triglicéridos).



Participación y retiro voluntario. Es importante destacar que su participación en este estudio es totalmente opcional. Si decide no participar, no sufrirá ningún castigo ni perderá ningún beneficio al que tenga derecho. También es libre de abandonar el estudio en cualquier momento sin que esto tenga efectos negativos para usted. Si decide no participar, puede comunicarse con uno de los investigadores del proyecto, por teléfono, correo, mensaje de texto, es decir puede utilizar la vía que sea más cómoda para usted.

Diseño experimental. Realizaremos un estudio en el que recolectaremos la sangre que se elimina después de realizarse exámenes médicos a los pacientes mayores de 18 años que acuden al CESFAM. Recolectaremos muestras de personas con niveles normales de azúcar a niveles altos de azúcar en su sangre.

Descripción del estudio: En este estudio usaremos un poco de la sangre que sobra (como 2 cucharaditas de té) después de sus exámenes médicos en el CESFAM Hualqui. No necesitará dar más sangre ni hacer nada más. Usaremos la información sobre el nivel de azúcar y de grasa en su sangre para ver cómo se relaciona con las partículas en su sangre. No le daremos ningún medicamento ni ningún tratamiento y tampoco realizaremos ningún procedimiento médico o intervención alguna.

Selección de los pacientes. Hemos invitado a participar a este estudio a todo adulto mayor de 18 años, que se controle en el CESFAM Hualqui y que se le haya pedido exámenes de sangre.

Número de Participantes: Se reclutarán un total de 120 pacientes adultos mayores de 18 años que se controlan en el CESFAM Hualqui y a quienes se les haya solicitado exámenes de sangre. Los participantes se dividirán en dos grupos: uno compuesto por pacientes diabéticos y otro por pacientes con niveles normales de azúcar. Se reclutarán a todos los pacientes que quieran participar y que cumplan con el criterio de edad mencionado.

Asignación Aleatoria: En este estudio, no haremos sorteos al azar para elegir a los pacientes, les pediremos a todos los pacientes mayores de 18 años que participen en el estudio. Posteriormente, nos enfocaremos en analizar las muestras de sangre y clasificar los datos en base a los niveles de azúcar en sangre y los niveles de grasa.

Recolección de muestras: La sangre que le solicitamos donar es la que queda después de que usted haya terminado sus exámenes habituales en el CESFAM, es decir es la que sobra. Generalmente, esta sangre se desecha. No le pediremos donar una muestra de sangre extra.

Análisis de muestras: Una vez obtenidas las muestras de sangre, las vamos a analizar para ver las partículas pequeñas que están en ellas. Luego, veremos si hay alguna relación entre estas partículas pequeñas y los niveles de azúcar y grasa que están presentes en las muestras.



Universidad
de Concepción



Descripción del procedimiento: Durante su visita al CESFAM, el personal de enfermería del CESFAM, tomará la muestra de sangre necesaria para los exámenes que su médico le haya solicitado. Después de que se realicen todos los exámenes habituales, hay un poco de sangre que generalmente se elimina, y es esa sangre (la sangre que sobra) es la que nos gustaría utilizar para nuestro estudio. Luego, esta sangre sobrante se retirará del CESFAM y se llevará a la Universidad de Concepción, donde la analizaremos en busca de pequeñas partículas llamadas vesículas extracelulares. Además, utilizaremos los resultados de sus exámenes de azúcar y grasa en sangre para ver si están relacionados con estas pequeñas partículas

Duración del estudio: Este estudio se realizará durante 12 meses, pero solo le pediremos participar en una ocasión y estaremos reclutando pacientes por un período no mayor a 3 meses. No le pediremos que venga a donar sangre adicional al CESFAM. Usaremos la sangre que sobra y que queda después de sus exámenes médicos regulares. Si, después de nuestros análisis aún nos queda alguna muestra, la guardaremos para futuras investigaciones relacionadas con la diabetes.

Costos para los participantes: No Tendrá ningún costo para usted como participante.

Beneficios para los Participantes del Estudio y/o para la Sociedad: Si bien este estudio no ofrece beneficios directos para usted, su participación ayudará mucho a la investigación sobre diabetes y cómo funciona el azúcar en el cuerpo. Esto podría tener un impacto positivo en la salud de todos en el futuro

Riesgos para el participante: No hay riesgos para usted en este estudio. No tomaremos más sangre ni haremos ningún procedimiento médico extra. Usaremos solo la sangre que sobra después de sus exámenes habituales. La molestia que podría sentir será producto de la punción venosa, que deberá someterse para realizar los exámenes solicitados por su médico. Su seguridad es importante para nosotros.

Responsabilidades del participante: Donar la muestra de sangre que sobra y compartir información médica, como sus niveles de grasa o el uso de remedios y que enfermedades tiene, para entender cómo las partículas que están en la sangre puedes cambiar según los niveles de azúcar.

Termino anticipado del estudio: Si algo no va bien, el investigador puede detener su participación, por ejemplo, si no cumple los requisitos o si cambian las metas del estudio. Esto no le afectará sus controles médicos en el CESFAM

Confidencialidad. Vamos a mantener su información en secreto en todo momento. Los resultados se mostrarán sin revelar su nombre. Usaremos códigos en lugar de nombres para sus datos. Solo el equipo de investigación sabrá quién es usted. Solo compartiremos su nombre si la ley lo requiere

4

o si alguna institución lo necesita para verificar que estamos haciendo todo de manera ética y correcta.

Los resultados del estudio podrían aparecer en revistas científicas y presentarse en conferencias académicas, pero su nombre siempre se mantendrá en secreto. Es posible que los datos obtenidos se puedan utilizar en futuras investigaciones relacionadas con el mismo tema de estudio.

Comunicación de resultados: Durante la realización del estudio, se informarán a los participantes todos los hallazgos nuevos e importantes que puedan afectar su voluntad de seguir participando o que tengan importancia para su salud. Además, los participantes podrán solicitar información de los resultados o información general del proyecto.

Compensación y seguros: No se ofrecerá compensación económica a los participantes por su colaboración en el estudio, ya que no que no se amerita dado el mínimo o nulo riesgo para el paciente.

Patologías GES: Si tiene alguna patología GES, no se preocupe. Nuestra investigación no implicará ningún tratamiento médico ni intervención. No vamos a alterar sus tratamiento, como tampoco intervenir en los remedios que este usando. Solo necesitamos la misma muestra de sangre que usted entrega cada vez que se realiza exámenes. Nosotros queremos utilizar la sangre que sobra, aquella que generalmente se desecha. Por lo que, no interferirá en ningún procedimiento médico que esté recibiendo actualmente. Participar es voluntario y no afectará su atención médica habitual

Contacto e información adicional. El investigador y el personal del estudio estarán disponibles para responder cualquier pregunta o inquietud que los participantes puedan tener acerca del estudio o los procedimientos involucrados. Si está de acuerdo en participar en este estudio, le solicitamos que firme este documento como muestra de su consentimiento informado. Si tiene alguna pregunta o inquietud, por favor, no dude en comunicarse con Valeska Ormazabal correo electrónico vormazabal@udec.cl , fono 412204160.

Con el fin de proteger la integridad de los derechos y bienestar de los participantes, este estudio será sometido a la revisión y aprobación por el Comité Ético Científico del Servicio de Salud Concepción, ubicado en San Martín 1436, Concepción, al teléfono 41 - 2722745.

“ESTE DOCUMENTO SE FIRMARÁ POR DUPLICADO QUEDANDO UNA COPIA CON EL INVESTIGADOR Y OTRA EN MANOS DE LA PACIENTE, LA QUE DEBE CONSERVAR MIENTRES SE LLEVE A CABO EL ESTUDIO”.



Universidad
de Concepción



HOJA DE FIRMAS DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

TITULO DEL ESTUDIO: "Explorando las implicaciones en el metabolismo glucídico de las vesículas extracelulares de pacientes diabéticos en células Hepáticas."

ANTES QUE EL PARTICIPANTE FIRME CONFIRMAR QUE:

- Sus preguntas han sido respondidas a su entera satisfacción y considera que comprende toda la información proporcionada acerca del estudio.
- Acepta que su información médica de la ficha clínica sea recopilada, utilizada y divulgada conforme a lo descrito en esta información escrita para el sujeto y formulario de consentimiento informado.
- Ha decidido voluntariamente participar en el estudio de investigación.
- Puede retirarse en cualquier momento sin sanción alguna
- Sabe que recibirá una copia firmada y fechada de este documento.
- Sabe que al firmar este documento, no renuncia a ninguno de sus derechos legales.

Nombre del participante en letra imprenta	Firma del participante	Fecha de la firma
---	------------------------	-------------------

RELACIÓN CON PARTICIPANTE

Yo, el que suscribe, investigador/sub-investigador, confirmo que he entregado verbalmente la información necesaria acerca del estudio, que he contestado toda duda adicional y que no ejercí presión alguna para que el participante ingrese al estudio.

Declaro que procedí en completo acuerdo con los principios éticos descritos en las Directrices de GCP (Buenas Prácticas Clínicas) y otras leyes nacionales e internacionales vigentes.

Se le proporcionará al paciente una copia de esta información escrita para el participante y formulario de consentimiento firmado.

Nombre de la persona que solicita el consentimiento
Fecha de la firma informado en letra imprenta
informado

Firma de la persona que solicita
el consentimiento

Nombre del director de la institución (o delegado
Fecha de la firma de la institución, si corresponde)
si corresponde

Firma del Director o Delegado
de la institución,

4. Carta Comité de Ética Facultad Ciencias Biológicas



Decanato Facultad de Ciencias Biológicas
Fono (56-41) 220 4508
www.cienciasbiologicasudec.cl

Concepción, 23 de junio de 2023

INFORME COMITÉ DE BIOÉTICA Y BIOSEGURIDAD

Comité de Bioética y Bioseguridad Dirección de Investigación Facultad de Ciencias Biológicas Universidad de Concepción ❖ Dra. Carola Muñoz M. ❖ Dr. José Martínez O. ❖ Dr. Fabián Segovia M. ❖ Dr. Iván Chavarría G.	PROYECTO	En postulación
	TÍTULO	"Explorando las implicaciones en el metabolismo glucídico de las vesículas extracelulares de pacientes diabéticos en células Hepáticas"
	INVESTIGADOR PRINCIPAL	- Dra. Valeska Ormazábal Valladares

A solicitud de la Dra. Valeska Ormazabal Valladares, se recibe documento (adjunto) con precisiones a la metodología incluida en la postulación al proyecto antes mencionado (en postulación) y que contará con el financiamiento del laboratorio de la Dra. Ormazábal, solicitando que este Comité emita una carta de aprobación.

Estas precisiones, así como la metodología del Proyecto, han sido analizadas de acuerdo con el "Manual de Normas de Bioseguridad y Riesgos Asociados" editado por CONICYT en 2018. En particular:

1. Dado que no existe un modelo alternativo para realizar el estudio, el Investigador necesita emplear Muestras de Sangre Humana, apropiadas para realizar la investigación.
2. La aprobación de estos estudios está supeditada al Servicio de Salud Concepción.
3. La Srta. Francisca Valenzuela M., recibirá muestras de sangre del CESFAM de Hualqui, para lo que cuenta con una carta de colaboración del mencionado CESFAM.
4. En consecuencia, los protocolos existentes son adecuados.
5. El estudio propuesto permitirá realizar avances en los conocimientos en beneficio humano.
6. El personal involucrado es idóneo en el manejo y uso de las muestras humanas.
7. Los estudios serán desarrollados en el LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR de nuestra Facultad, donde se encuentran disponibles tanto las facilidades como el equipamiento necesario para realizar los estudios incluidos en el Proyecto.



**Universidad
de Concepción**



Decanato Facultad de Ciencias Biológicas
Fono (56-41) 220 4508
www.cienciasbiologicasudec.cl

8. Cabe mencionar que nuestra Facultad cuenta con los servicios de la Unidad de Seguridad MATPEL (www2.udec.cl/matpel), quienes colectan y procesan en forma rutinaria los residuos biológicos y químicos generados por nuestros investigadores, de acuerdo con las indicaciones del "Manual de Bioseguridad" de CONICYT.

En consecuencia, el comité de Bioética y Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción valida los estudios señalados.

Sin otro particular, les saluda muy atentamente,



Dra. Carola Muñoz Montesino
Presidenta
Comité de Bioética y Bioseguridad
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

5. Carta Comité de Ética Servicio de Salud Concepción



ACTA DE EVALUACIÓN COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO

COMITÉ CONSTITUIDO EN CONFORMIDAD A LA R. EX N°2444 / 14.08.2012
RE ACREDITADO POR LA SEREMI SALUD DEL BIOBIO EN CONFORMIDAD A LA R. EX. N° 2963/ 06.10.20

Concepción, 4 de diciembre 2023

Dra. Valeska Ormazabal
Investigadora Responsable
Presente.

Ref: Explorando las implicaciones en el metabolismo glucídico de las vesículas extracelulares de pacientes diabéticos en Células Hepáticas
Código CEC-SSC: 23-07-29

Estimada investigadora

Junto con saludarle, nos permitimos informar a usted que el Comité Ético Científico del Servicio de Salud Concepción, en reunión de fecha 21 noviembre 2023, tomó conocimiento y evaluó respuesta a observaciones planteadas por el comité en reunión de fecha 24 de octubre 2023

Miembros del Comité Ético Científico que participaron en la sesión del 21 noviembre 2023

Q: 07 / 08

Nombre y apellidos	Profesión/Institución	Cargo CEC
Claudio Bustos	Psicólogo	Integrante permanente / externo
Felipe León M.	Abogado / SSC	Integrante permanente / Abogado / Vice presidente
Nelson Pérez T	Médico Psiquiatra / HGGB	Integrante permanente / Presidente
Catalina Márquez Z.	Químico Farmacéutico / HGGB	Integrante permanente
Eliana Eriz S.	Médico/Centro de Sangre Concepción	Integrante permanente
Francisco Guede R.	Kinesiólogo / UNAB	Integrante permanente / externo
Ricardo Saldías	Ingeniero comercial /HGG	Integrante permanente / Secretario

Excusas: María Cristina Fellay

Este informe se refiere a la revisión que el comité hizo de los siguientes documentos recepcionados:

- Carta conductora
- Tabla respuestas a observaciones
- Protocolo de estudio: Explorando las implicaciones en el metabolismo glucídico de las vesículas extracelulares de pacientes diabéticos en Células Hepáticas. Versión 3, noviembre 2023
 - Anexo 1: Formulario de Reclutamiento de Participantes
 - Anexo 2: Residuos biológicos_ Clasificación y manejo de residuos biológicos



ACTA DE EVALUACIÓN COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO

COMITÉ CONSTITUIDO EN CONFORMIDAD A LA R. EX N°2444 / 14.08.2012
RE ACREDITADO POR LA SEREMI SALUD DEL BIOBIO EN CONFORMIDAD A LA R. EX. N° 2963/ 06.10.20

CONCLUSION: Con fecha 21 noviembre 2023, el Comité aprueba el estudio y procede a timbrar los siguientes documentos:

- Protocolo de estudio: Explorando las implicaciones en el metabolismo glucídico de las vesículas extracelulares de pacientes diabéticos en Células Hepáticas. Versión 3, noviembre 2023
 - Anexo 1: Formulario de Reclutamiento de Participantes
 - Anexo 2: Residuos biológicos_ Clasificación y manejo de residuos biológicos
- Consentimiento Informado para la donación de muestras de sangre residuales. Versión 2.1, octubre 2023
- Hojas de registro de la información

Además, este Comité solicita que:

1. El investigador utilice el formulario de consentimiento informado con el timbre y fecha de aprobación del comité en los pacientes que serán enrolados en su institución.
2. El Investigador responsable debe cumplir con el adecuado manejo de la información, asegurando la no utilización de datos que pueda identificar a los participantes.
3. Las enmiendas, reportes de eventos adversos y desvíos de protocolo se entreguen al comité en conjunto con una opinión personal del investigador, sobre la relevancia de ellos en el proyecto.
4. Informar a lo menos una vez al año de su estado de desarrollo, como también de cualquier publicación o presentación a congresos que de él se generen
5. La validez de esta aprobación es por un año.
6. Una vez finalizado el proyecto, el comité deberá ser informado de los resultados del estudio.
7. Conservar toda la documentación en su poder por lo menos hasta quince años cerrado el estudio
8. En toda futura correspondencia hacer referencia al número de código asignado
9. Cumplir con la normativa y protocolos de seguridad del establecimiento y/o centro de investigación.
10. Para iniciar el estudio debe tener la autorización del Director del centro

Atentamente,


Ing. Ricardo Saldías Cerda
Secretario CEC-SSC

CC: CEC-SSC



Powerd by
Firma electrónica avanzada
NELSON IGOR PEREZ
TERAN
2023.12.11 15:50:42 -0300

Dr. Nelson Perez Terán
Presidente CEC-SSC

6. Residuos biológicos

Para el descarte de residuos biológicos se seguirán las indicaciones recomendadas por MATPEL. Empresa encargada del manejo de residuos de la Universidad de Concepción.



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 <u>NO</u> 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 <u>NO</u> 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