



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **EVALUACIÓN DEL PERFIL METABOLÓMICO Y SU RELACIÓN CON EL ESPECTRO CLÍNICO DE SUJETOS POSITIVOS PARA SARS- CoV-2 EN UNA POBLACIÓN BOGOTANA**

**Laura Alejandra Gómez Muñoz**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Química  
Bogotá, Colombia

2022



# **EVALUACIÓN DEL PERFIL METABOLÓMICO Y SU RELACIÓN CON EL ESPECTRO CLÍNICO DE SUJETOS POSITIVOS PARA SARS- CoV-2 EN UNA POBLACIÓN BOGOTANA**

**Laura Alejandra Gómez Muñoz**

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título  
de:

**Magister en Ciencias Bioquímica**

Director (a):

Doctor en Ciencias-Biomédicas, Adrián Gabriel Sandoval Hernández

Codirector (a):

Doctora en Ciencias-Químicas, Monica Patricia Cala Molina

Línea de Investigación:

Muerte celular

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2022



*A todos los que trabajan en sí mismos.*

*"Nadie puede construir un mundo mejor sin mejorar a las personas. Cada uno debe trabajar para su propia mejora"*

*Marie Curie*

# Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



---

Laura Alejandra Gómez Muñoz

Cédula de Ciudadanía: 1.013.648.404 de Bogotá D.C

Fecha DD/MM/AAAA

Fecha 20/12/2022

## Agradecimientos

En primer lugar, quiero expresar mi gratitud al profesor Adrián Gabriel Sandoval Hernández, por su persistencia, paciencia y motivación. Más que el director del proyecto, él ha sido un apoyo y un respaldo en medio de las dificultades de la pandemia, contribuyendo en la finalización de mi maestría. Igualmente, a la profesora Monica Patricia Cala Molina, quien me ha dado las herramientas para el desarrollo del trabajo, me ha transmitido sus conocimientos y me ha acompañado en el proceso. De igual manera a los estudiantes, profesores y trabajadores de cada grupo de investigación, Juan, Manuel, Daniela, Esneyder, al profesor Humberto Arboleda, al profesor Luis Ernesto Contreras, Mary Andrea Santamaria Torres, Dr. Mario Arturo Isaza Ruget y Sandra Gaitán, quienes aportaron al trabajo, cada uno desde su campo.

A mi familia. Quiero agradecer a mi mamá, por estar ahí mientras yo estudié y trabajé estos años, despertándose temprano conmigo y cuidándome durante todo el tiempo, así mismo, a mi papá y a mis hermanas por su todo su apoyo, especialmente a mi hermana Lilia Nataly, quien elaboró las ilustraciones del trabajo.

A la Universidad Nacional de Colombia, la facultad de Ciencias y la División de Investigación de la sede Bogotá, por abrirme las puertas para fortalecer mi carrera científica y personal, incluyendo a cada uno de los profesores que contribuyeron en mi formación. Así mismo, a la Universidad de los Andes y a Colsanitas, por su participación en la recolección y procesamiento de las muestras para el cumplimiento de los objetivos.



## Resumen

### **Evaluación del perfil metabolómico y su relación con el espectro clínico de sujetos positivos para SARS-COV-2 en una población bogotana**

**Introducción:** Recientemente la enfermedad por el coronavirus SARS-CoV-2, denominada COVID-19, se convirtió en pandemia causando más de 6,38 millones de muertes en el mundo, y en Colombia más de 6,3 millones de casos con más de 142 mil fallecidos, con una tasa de letalidad del 2,5 %. La enfermedad se caracterizó por presentar una prognosis heterogénea con una baja predictibilidad y elevada mortalidad.

**Objetivo:** Evaluar la relación entre el espectro clínico de la COVID 19 y los cambios en el metaboloma del plasma sanguíneo de sujetos positivos para SARS-CoV-2 en una población bogotana.

**Metodología:** Se recolectaron 100 muestras de plasma sanguíneo en colaboración con la Clínica Colsanitas y Unisanitas, agrupados según sus características clínicas en grupos leve, moderado y severo, más un grupo control. El análisis metabolómico y lipidómico multiplataforma no dirigido se realizó por GC/MS y LC/MS en MetCore, de la Universidad de los Andes, los análisis estadísticos se realizaron usando MetaboAnalyst 5.0 y el paquete deducir del software R.

**Resultados y análisis:** Se encontraron 148 metabolitos alterados entre los grupos experimentales, incluyendo carbohidratos como la ribosa, alosa y manitol, lípidos como las fosfocolinas, lisofosfocolinas, lisofosfatidilcolinas y aminoácidos como lisina, ácido glutámico y aminobutanoico, asociados con falla multiorgánica y procesos inflamatorios.

**Conclusiones:** Los metabolitos encontrados en este estudio correlacionan con los reportados para otras poblaciones como europeas y asiáticas. Se identificaron incrementados en casos severos el ácido glutámico, el ácido 2-hidroxi-3-metilbutírico, y disminuida la ribosa que podría considerarse factores pronósticos de estado crítico para COVID-19.

**Palabras clave:** COVID-19, SARS-CoV-2, Metabolómica, Lipidómica, factores pronósticos.

## Abstract

### **Evaluation of the metabolomic profile and its relationship with the clinical spectrum of positive subjects for SARS-COV-2 in a Bogota population**

**Introduction:** Recently, the SARS-CoV-2 coronavirus disease called COVID-19 became a pandemic, causing 6.38 million deaths worldwide. In Colombia, there have been 6.3 million cases and 142,000 deaths, with a rate lethality of 2.5%. The disease was characterized by presenting a heterogeneous prognosis with low predictability and high mortality.

**Objective:** To record metabolomic changes in a group of SARS-CoV-2 positive patients at clinical onset as potential markers of severe COVID-19 disease progression.

**Methodology:** 100 blood plasma samples were collected in collaboration with Colsanitas hospital and Unisanitas, grouped according to their clinical characteristics into mild, moderate, and severe groups, plus a control group. Non-targeted cross-platform metabolomic and lipidomic analysis was performed by GC/MS and LC/MS at MetCore, Andes university, and statistical analyzes were performed using MetaboAnalyst 5.0 and the R software deducer package.

**Results and analysis:** 148 altered metabolites were found between the experimental groups, including carbohydrates such as ribose, allose and mannitol, lipids such as phosphocholines, lysophosphocholines, lysophosphaditylcholines and amino acids such as lysine, glutamic and aminobutanoic acid, associated with multiple organ failure and inflammatory processes.

**Conclusion:** The metabolites found in this study correlate with those reported for other populations, such as Europeans and Asians. Increased glutamic acid, 2-hydroxy-3-methylbutyric acid, and decreased ribose were identified in severe cases, which could be considered critical prognostic factors for COVID-19.

**Keywords:** COVID-19, SARS-CoV-2, Metabolomics, Lipidomics, prognostic factors.

# Contenido

	Pág.
<b>1. Marco Teórico.....</b>	<b>5</b>
1.1 Epidemiología de los Coronavirus humanos.....	5
1.2 Estructura viral .....	10
1.2.1 Características genómicas de SARS-CoV-2 .....	15
1.3 Ciclo de vida del Coronavirus.....	19
1.4 Metabolómica y Lipidómica .....	22
1.4.1 Diseño experimental y recolección de las muestras.....	27
1.4.1 Tratamiento de las muestras.....	28
1.4.2 Adquisición de datos.....	29
1.4.3 Tratamiento de datos.....	35
1.4.4 Análisis de los datos .....	37
1.4.5 Identificación de metabolitos.....	37
1.4.6 Interpretación biológica.....	38
<b>2. Estado del arte.....</b>	<b>39</b>
2.1 Metabolómica en COVID 19.....	39
<b>3. Pregunta de investigación y objetivos .....</b>	<b>45</b>
3.1 Pregunta de investigación .....	45
3.2 Objetivo general .....	45
3.2.1 Objetivos específicos.....	45
<b>4. Metodología .....</b>	<b>47</b>
4.1 Caracterización de los sujetos de estudio .....	47
4.2 Recolección de las muestras.....	48
4.3 Análisis de perfiles metabolómicos de plasma. ....	49
4.3.1 Análisis metabolómico por LC/MS .....	50
4.3.2 Análisis lipidómica no dirigida .....	52
4.3.3 Análisis metabolómico por GC/MS.....	54
4.3.4 Control de calidad de los análisis metabolómicos.....	54
4.3.5 Procesamiento y análisis de datos metabolómicos .....	55
4.3.6 Análisis estadístico .....	55
4.3.7 Identificación de metabolitos.....	56
4.3.8 Análisis de factores pronósticos y mapeo de rutas bioquímicas.....	56
<b>5. Resultados.....</b>	<b>58</b>
5.1 Los parámetros clínicos se modificaron con relación a las complicaciones de la COVID-19.....	58
5.2 Diferencias en el perfil metabolómico entre controles y grupos de severidad ...	61
5.2.1 Análisis de componentes principales pareto con QC .....	61
5.2.2 Análisis discriminante supervisado mediante regresión de mínimos cuadrados parciales.....	62
5.2.3 Análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales ortogonales .....	62
5.3 Alteración del metaboloma plasmático dependiente de la etapa de COVID-19	64

5.4	Cambios asociados con las etapas de severidad de COVID-19.....	65
5.4.1	Metabolitos alterados entre los grupo Leve y Moderado.....	69
5.4.2	Metabolitos alterados entre los grupos Leve y Severo.....	75
5.4.3	Metabolitos alterados entre los grupos Moderado y Severo .....	82
5.5	Exploración de marcadores pronóstico .....	88
5.6	Análisis de vías metabólicas alteradas en pacientes con COVID-19.....	93
<b>6.</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>96</b>
<b>7.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones .....</b>	<b>113</b>
7.1	Conclusiones .....	113
7.2	Recomendaciones .....	114
<b>A.</b>	<b>Anexo: Consentimiento informado.....</b>	<b>115</b>
	<b>Referencias .....</b>	<b>121</b>

## Lista de figuras

Pág.

- Figura 1-1: Síntomas de la COVID-19.** La COVID-19 se detectó inicialmente en Wuhan, capital de la provincia Hubei, en China. Con síntomas leves y moderados como fiebre, tos, fatiga, esputo, disnea, dolor de garganta y de cabeza. Algunos pacientes presentan síntomas gastrointestinales, y otros avanzan a síntomas críticos como insuficiencia respiratoria, shock séptico o falla multiorgánica (27). ..... 5
- Figura 1-2. Casos acumulados de COVID-19 por departamento.** En Colombia, Bogotá fue la ciudad con mayor número de casos reportados al 21 de noviembre del 2022 (1.855.445 casos), seguido por Antioquia (947.848 casos), Valle (564.150 casos), Cundianamarca (327.856 casos) y Santander (293.509 casos) (35). ..... 9
- Figura 1-3. Indicadores de incidencia en Colombia.** Datos de morbilidad, mortalidad, letalidad, hospitalización y número reproductivo basados en el reporte “Corte 01 al 08 de diciembre de 2022” por la OPS, con 6.323.357 y 141.943 defunciones. (36). ..... 11
- Figura 1-4: Estructura del SARS-CoV-2.** Envoltura viral compuesta por las proteínas: S (*Spike*), M (*Membrane*), E (*Envelope*) y la bicapa fosfolipídica. La nucleocápside está formada por la proteína N (*Nucleocapsid*) que cubre al genoma viral ARN monocatenario de sentido positivo (+ssRNA). Su receptor principal es el ACE2 (Angiotensina 2), que es reconocido por la proteína S..... 12
- Figura 1-5: Organización del genoma del SARS-CoV-2.** El genoma de SARS-CoV-2 codifica para 16 nsp, generadas de la autoescisión de las poliproteínas precursoras Pp1a y Pp1ab. Las proteínas estructurales están codificadas por sus respectivos genes, intercaladas con proteínas accesorias que incluyen ORF3a, ORF7a, ORF8 y ORF9b... 15
- Figura 1-6. Inserción en el sitio de escisión proteolítica S1/S2 de la proteína S.** La proteína S presenta el motivo S1 de color azul y S2 en marrón, la flecha indica el sitio de escisión proteolítica S1/S2 que se muestra en rojo. La ampliación del sitio S1/S2 con residuos R y S conservados (naranja) y la inserción única de cuatro residuos de aminoácidos PRRA para el SARS-CoV-2 (azul), que favorecen la selección de la célula hospedera y la infectividad del virus. Las P denotan la posición de ese aminoácido desde el sitio de escisión S1/S2, con P1–P5 refiriéndose a los aminoácidos antes del sitio de escisión y P1' refiriéndose a los aminoácidos después del sitio de escisión..... 20
- Figura 1-7: Ciclo de vida del SARS-CoV-2. A)** Unión de la subunidad S1 de la proteína S al receptor ACE2, expresado en pulmones, arterias, corazón, riñones e intestino. Seguido de la escisión de S2 en S'2 por TMPRSS2, promoviendo la unión de las membranas. **B)** Se da lugar al ingreso y liberación del ARN genómico. **C)** Posteriormente, se traducen los marcos de lectura abiertos, ORF1a y ORF1b que codifican para las poliproteínas pp1a y pp1ab que a su vez se procesan para obtener las nsps. **D)** Se forma el complejo de replicación y transcripción viral, generando ARN a partir de una plantilla negativa. **E)** Se sintetiza ARN subgenómico que codifica las proteínas estructurales. **F)** Las

nuevas proteínas estructurales y accesorias recién sintetizadas se insertan en el RE y transitan a través del ERGIC. **G)** El ARN genómico y la proteína N se combinan con las proteínas S, E y M. **H)** Se forma un virión. **I)** Finalmente, los viriones son secretados por la célula por exocitosis para repetir el ciclo de infección (23).....22

**Figura 1-8: Ciencias ómicas.** El avance en la tecnología y especialmente, en la metabolómica no dirigida, ha permitido comprender a mayor profundidad los procesos patológicos e identificar biomarcadores pronósticos, alteración en vías bioquímicas y objetivos farmacológicos. Los metabolitos, compuestos de las reacciones químicas en las rutas celulares que constituyen el metabolismo, son la base molecular de la vida, estos se clasifican en primarios y secundarios y están asociados al estilo de vida de cada persona. ....24

**Figura 1-9: Clasificación de los lípidos.** Los lípidos son biomoléculas solubles en solventes no polares, se dividen en ácidos grasos, esteroides, vitaminas lipídicas y terpenos. Los ácidos grasos a su vez están compuestos por eicosanoides, triacilgliceroles, ceras, esfingolípidos y glicerofosfolípidos. ....25

**Figura 1-10: Flujo de trabajo en metabolómica.** Los pasos necesarios en la Metabolómica no dirigida se componen por un diseño experimental, preparación de la muestra, adquisición, procesamiento y análisis de los datos, seguido de la identificación de metabolitos y la interpretación biológica (88). ....26

**Figura 1-11. Flujo de trabajo de procesamiento de datos.** Se realiza una revisión de cromatogramas, seguido por deconvolución, alineamiento, integración de iones objetivo y finalmente una filtración de datos.....36

**Figura 4-12: Grupos de estudio.** Se establecieron 4 grupos de estudio divididos según severidad de la enfermedad en grupo control (azul claro), leve (azul oscuro), moderado (amarillo) y severo (Fucsia). Se puede observar características clínicas para cada cohorte y resultado de RT-PCR.....48

**Figura 4-13. Condiciones del análisis de metabolómica no dirigida empleando LC/MS-QTOF (+).** A. Se observan los datos de tiempo en minutos y fase B en porcentaje para el gradiente de fases utilizado. B. Grafica de porcentaje de Fase B comparado con el Tiempo en minutos (Datos de A.). C. Condiciones del espectrómetro de masas para la fuente y MS TOF.....51

**Figura 4-14.** Condiciones del análisis de lipidómica no dirigida empleando LC/MS-QTOF en polaridad positiva. A. Se observan los datos de tiempo en minutos y fase B en porcentaje para el gradiente de fases utilizado. B. Grafica de porcentaje de Fase B comparado con el tiempo (Datos de A.). C. Condiciones del espectrómetro de masas para la fuente y MS TOF .....53

**Figura 5-15. PCA para las tres plataformas.** Se puede evidenciar una agrupación de los controles en cada una de las plataformas. Metabolómica por LC/MS: Variabilidad explicada acumulada ( $R^2_{(cum)}$ ): 0.845 y capacidad de predicción acumulada ( $Q^2_{(cum)}$ ): 0.655, Lipidómica por LC/MS:  $R^2_{(cum)}$ : 0.882 y  $Q^2_{(cum)}$ : 0.685, Metabolómica por GC/MS:  $R^2_{(cum)}$ : 0.536 y  $Q^2_{(cum)}$ : 0.216. En gris los sujetos de estudio y en negro el QC. ....61

**Figura 5-16. PLS-DA de las tres plataformas.** Se observan las tendencias de los grupos de estudio en las tres plataformas. Metabolómica por LC/MS:  $R^2_{(cum)}$ : 0.550 y  $Q^2_{(cum)}$ : 0.191,

CV-ANOVA= p: 1.89401e-03, Lipidómica por LC/MS:  $R^2_{(cum)}$ : 0.365,  $R^2Y_{(cum)}$ : 0.235,  $Q^2_{(cum)}$ : 0.0906 y CV-ANOVA= p: 0.047069, Metabolómica por GC/MS:  $R^2_{(cum)}$ : 0.260,  $R^2Y_{(cum)}$ : 0.538,  $Q^2_{(cum)}$ : 0.250 y CV-ANOVA= p: 3.21327e-05. El grupo leve (en azul), el grupo moderado (en amarillo) y el grupo de pacientes severos (en fucsia). ..... 62

**Figura 5-17. OPLS-DA de las tres plataformas.** Se puede observar las comparaciones entre grupos en cada una de las plataformas analíticas. En **Metabolómica por LC/MS**: OPLS-DA para moderado versus severo con  $R^2_{(cum)}$ : 0.717,  $Q^2_{(cum)}$ : 0.686, y CV-ANOVA= p: 2.3838e-07, OPLS-DA para leve versus moderado,  $R^2_{(cum)}$ : 0.800,  $Q^2_{(cum)}$ : 0.727, y CV-ANOVA= p: 9.13826e-07, y OPLS-DA para leve versus severo,  $R^2_{(cum)}$ : 0.779,  $Q^2_{(cum)}$ : 0.754, y CV-ANOVA= p: 1.69203e-08. Para **Lipidómica por LC/MS**, OPLS-DA para moderado versus severo con  $R^2_{(cum)}$ : 0.431  $R^2Y_{(cum)}$ : 0.624  $Q^2_{(cum)}$ : 0.327 y CV-ANOVA= p: 0.00136463, OPLS-DA para leve versus moderado  $R^2_{(cum)}$ : 0.427  $R^2Y_{(cum)}$ : 0.401  $Q^2_{(cum)}$ : 0.195, CV-ANOVA= p: : 0.0161596, y OPLS-DA para leve versus severo,  $R^2_{(cum)}$ : 0.628  $R^2Y_{(cum)}$ : 0.697  $Q^2_{(cum)}$ : 0.396, CV-ANOVA= p: 6.61098e-4. Finalmente, para **Metabolómica mediante GC/MS**, OPLS-DA para moderado versus severo con  $R^2_{(cum)}$ : 0.235  $R^2Y_{(cum)}$ : 0.750  $Q^2_{(cum)}$ : 0.198 y CV-ANOVA= p: 0.0586634, OPLS-DA para leve versus moderado  $R^2_{(cum)}$ : 0.376  $R^2Y_{(cum)}$ : 0.888  $Q^2_{(cum)}$ : 0.537 y CV-ANOVA= p: 3.45134e-06, y OPLS-DA para leve versus severo,  $R^2_{(cum)}$ : 0.269  $R^2Y_{(cum)}$ : 0.849  $Q^2_{(cum)}$ : 0.472 y CV-ANOVA= p: 3.2325e-06. El grupo leve (en azul), el grupo moderado (en amarillo) y el grupo de pacientes severos (en fucsia). ..... 62

**Figura 5-18: Metabolitos alterados en el espectro clínico COVID-19+ de esta cohorte.** Porcentaje de metabolitos alterados entre Leve y Severo (Vede), Porcentaje de metabolitos alterados entre Leves y Moderados (Amarillo), Porcentaje de metabolitos alterados entre Moderados y Severos (Fucsia). La línea punteada naranja discrimina los Lípidos. .... 65

**Figura 5-19. Metabolitos alterados por grupo de estudio en Lipidómica.** En azul los controles, en verde pacientes con cuadro leve de COVID-19, amarillo con cuadro moderado y finalmente en fucsia el grupo severo. Se encontró un total de 73 metabolitos alterados, para cada uno se determinó el valor promedio por grupo de estudio, observando en tono azul los valores que tienden a disminuir y en rojo que tienden a aumentar..... 66

**Figura 5-20. Metabolitos alterados por grupo de estudio en LC/MS.** En azul los controles, en verde pacientes con cuadro leve de COVID-19, amarillo con cuadro moderado y finalmente en fucsia el grupo severo. Para cada metabolito se determinaron los valores promedio por grupo de estudio, observando en tono azul los valores que tienden a disminuir y en rojo que tienden a aumentar. .... 67

**Figura 5-21. Metabolitos alterados por grupo de estudio en GC/MS.** Mapa de calor del agrupamiento jerárquico de los 76 metabolitos cuantificados por GC/MS/MS en controles sanos y en pacientes con COVID-19 (leve, moderado, severo). Se muestran las abundancias promedio para cada metabolito. En azul los controles, en verde pacientes con cuadro leve de COVID-19, amarillo con cuadro moderado y finalmente en fucsia el grupo severo. Para cada metabolito se determinaron los valores promedio por grupo de estudio, observando en tono azul los valores que tienden a disminuir y en rojo que tienden a aumentar. .... 68

**Figura 5-22. Curvas ROC.** Discriminación de los metabolitos alterados entre los grupos leve (verde) moderado (amarillo), y severo (fucsia) mediante curvas ROC y gráficos de cajas, en cada curva ROC se puede ver su respectivo AUC, sensibilidad y especificidad. **Leve versus moderado: A)** LPC(16:0), **B)** PC(38:6), **C)** indolina, **D)** colina, **E)** PA(30:0), **F)** hidrox-24-(dimetilfosforil)-25,26,27-trinorcoleal, **G)** ribosa, **H)** acetoacetato, **I)** n-acetil-manosamina. **Leve versus severo: J)** ribosa, **K)** SM 39:1;O2, **L)** PC(38:4), **M)** Indolina, **N)** Ser-Ser-OH, **O)** PA(30:0), **P)** hidrox-24-(dimetilfosforil)-25,26,27-trinorcoleal, **Q)** ácido aminobutanoico, **R)** acetoacetato. **Moderado versus severo: S)** PC(38:6), **T)** PC(38:4), **U)** PC(38:6), **V)** Ser-Ser-OH, **W)** ácido 2-hidrox-3-metilbutírico, **X)** ácido glutámico. .... 88

**Figura 5-23: Rutas bioquímicas alteradas.** El color del nodo se basa en su valor p y el radio del nodo se determina en función de los valores de impacto causados por el SARS-CoV-2 en la ruta, por lo tanto, los valores p menores con valor de impacto más altos reflejan las vías alteradas por relevancia. .... 93

**Figura 6-24. Identificación de marcadores pronósticos de severidad.** Se realizó metabolómica y lipidómica no dirigida en 4 grupos de estudio, uno control, y tres de pacientes con COVID-19, confirmado mediante RT-PCR, divididos en leve, moderado y severo, según el cuadro clínico. En la gráfica se puede observar los detalles de la toma de la muestra, así como los metabolitos relevantes para cada comparación entre grupos. 111

## Lista de tablas

Pág.

<b>Tabla 1-1. Clasificación de las variantes del SARS-CoV-2.</b> Se puede observar la denominación dada por la OMS a las variantes preocupantes y variantes de interés a enero del 2022, junto a su linaje pango, clado, documentación y fecha de designación.....	7
<b>Tabla 1-2: Proteínas no estructurales (nsps).</b> Se han reportado 16 proteínas no estructurales del virus, las cuales hacen parte del complejo de replicación viral y cumplen diversas funciones.....	13
<b>Tabla 1-3: Tipos de HPLC.</b> La cromatografía líquida de alta eficacia permite separar los componentes de una mezcla según los tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica. ....	31
<b>Tabla 1-4: Diferencias entre RMN y MS.</b> (163) Diferencias entre RMN y MS según características como su sensibilidad, calidad y costo. ....	34
<b>Tabla 5-5: Diferencias estadísticas de edad, sexo, laboratorios clínicos y comorbilidades entre los grupos de estudio.</b> SD es Desviación estándar y NA significa que No Aplica. Se estudiaron un total de 100 pacientes, de los cuales 10 fueron controles, 30 leves, 30 moderados y 30 severos. Bilirrubina (P = 0,0159), Recuento de leucocitos (P = 0,0159), Neutrófilos (P = 0,0159), Linfocitos (P = 0,0159), Monocitos (P = 0,0159), Deshidrogenasa láctica (P = 0,0159) y Procalcitonina (P = 0,0159). ....	59
<b>Tabla 5-6. Metabolitos de la comparación Leve y Moderado con un Fold Change mayor a 1,5 o Menor a 0,5.</b> 4 compuestos estaban al alza, y 18 regulados a la baja, para cada compuesto se puede ver: Formula molecular; tiempo de retención (RTmin); ion objetivo o masa; CV, coeficiente de variación de los metabolitos en las muestras de QC; GM: metabolómica global; GC: cromatografía de gases; LC: cromatografía líquida; GL: lipidómica global, RP: fase inversa,, QTOF-MS: espectrómetro de masas de tiempo de vuelo de cuadrupolo; Fold Change, cambio porcentual en la abundancia de la comparación especificada calculado como (caso-control)/control) * 100; VIP, importancia variable en la proyección; valor p * correspondiente a los valores de p calculados por la corrección post hoc de la tasa de descubrimiento falso de Benjamini-Hochberg (FDR < 0,05). ....	69
<b>Tabla 5-7. Metabolitos determinandos por GC/MS en el grupo Leve y Moderado.</b> 1. ribosa, 2. alosa, 3. acetil-manosamina, 4. glicina, 5. heptanol, 6. ácido hexanoico, 7. ácido heptanoico, 8. hidroxiiisovalerato, 9. ácido azelaico, 10. ácido palmítico, 11. ácido oleico, 12. ácido esteárico, 13. ácido linoleico, 14. ácido glicólico, 15. ácido hidroxisobutírico. 16. acetoacetato, 17. ácido pirúvico, 18. ácido láctico, 19. ácido 2-ceto-3-metilvalerico, 20. ácido cetoisocaproico, 21. ácido fosfórico, 22. ácido maleico, 23. ácido cítrico, 24. trietanolamina, 25. mioinositol. Fold Change, cambio porcentual en la abundancia de la comparación especificada calculado como (caso-control)/control) * 100; tiempo de retención (RTmin); VIP, importancia variable en la proyección; valor p * correspondiente a los valores de p calculados por la corrección post hoc de la tasa de descubrimiento falso	

de Benjamini-Hochberg (FDR <0,05). coeficiente de variación de los metabolitos en las muestras de QC, formula molecular y nivel de identificación (ID)..... 70

**Tabla 5-8. Metabolitos alterados entre los grupos Leve y Moderado determinados por LC/MS.** 1. ácido dodecenodioico, 2. ácido hidroxitetradecanodioico, 3-4. LPC(16:0), 5. LPC(16:1), 6. LPC(18:0), 7- 8. LPC(18:1), 9-10. LPC(18:2), 11. LPC(20:3), 12. LPC(22:6), 13. LPC(O-16:0), 14. PC(34:1), 15. PC(34:3), 16. PC(36:3), 17. PC(36:4), 18. PC(36:5), 19. PC(38:6), 20. PC(40:7), 21. PC(O-18:0), 22. PE(34:2), 23. PA(30:0), 24. ácido indolacrílico, 25. indolina, 26. triptofanol, 27. colina, 28. fosfocolina, 29. NeuAcHexCer (42:2;O2), 30. GalNAc-Gal-GlcNAc-(Gal-GlcNAc)Gal-GlcNAc-Gal-Glc-Cer(d18:1/18:0), 31. SM (32:1;O2). Fold Change, cambio porcentual en la abundancia de la comparación especificada calculado como (caso-control)/control) \* 100; tiempo de retención (RTmin); VIP, importancia variable en la proyección; valor p \* correspondiente a los valores de p calculados por la corrección post hoc de la tasa de descubrimiento falso de Benjamini-Hochberg (FDR < 0,05). coeficiente de variación de los metabolitos en las muestras de QC, formula molecular y nivel de identificación. .... 71

**Tabla 5-9. Metabolitos determinados por Lipidómica en comparación del grupo Leve y Moderado.** Se determinaron 19 metabolitos entre Acilos grasos y Glicerolípidos. 1. Metilbuten-ol, 2. DG(32:1), 3. DG(32:2), 4. TG(46:1), 5. TG(46:2), 6-7. TG(48:1), 8. TG(48:2), 9. TG(48:3), 10. TG(49:2), 11. TG(50:3), 12. TG(50:4), 13. TG(50:5), 14. TG(54:1), 15. TG(56:4), 16. TG(56:6), 17. TG(57:3), 18. TG(58:7), 19. TG(58:8). Fold Change, cambio porcentual en la abundancia de la comparación especificada calculado como (caso-control)/control) \* 100; tiempo de retención (RTmin); VIP, importancia variable en la proyección; valor p \* correspondiente a los valores de p calculados por la corrección post hoc de la tasa de descubrimiento falso de Benjamini-Hochberg (FDR < 0,05). coeficiente de variación de los metabolitos en las muestras de QC, formula molecular y nivel de identificación. .... 72

**Tabla 5-10. Glicerofosfolípidos determinados por Lipidómica en comparación del grupo Leve vs Moderado.** Metabolitos de Glicerofosfolípidos. 1. LPA(20:4), 2. LPC(16:0), 3. LPC(16:0), 4. LPC(16:1), 5. LPC(17:0), 6. LPC(18:0), 7. LPC(18:0), 8. LPC(18:1), 9. LPC(18:2), 10. LPC(18:2), 11. LPC(18:3), 12. LPC(20:3), 13. LPC(20:4), 14. LPC(20:4), 15. PC(35:4), 16. PC(36:1), 17. PC(36:2), 18. PC(36:3), 19. PC(36:3), 20. PC(36:4), 21. PC(38:2), 22. PC(38:3), 23. PC(38:3), 24. PC(38:4), 25. PC(38:4), 26. PC(38:5), 27. PC(38:5), 28. PC(38:6), 29. PC(38:6), 30. PC(40:4), 31. PC(40:5), 32. PC(40:6), 33. PC(40:7), 34. PC(42:9), 35. PC(O-34:1), 36. PC(O-34:3), 37. PC(O-36:5). Fold Change, cambio porcentual en la abundancia de la comparación especificada calculado como (caso-control)/control) \* 100; tiempo de retención (RTmin); VIP, importancia variable en la proyección; valor p \* correspondiente a los valores de p calculados por la corrección post hoc de la tasa de descubrimiento falso de Benjamini-Hochberg (FDR < 0,05). coeficiente de variación de los metabolitos en las muestras de QC, formula molecular y nivel de identificación. .... 73

**Tabla 5-11. Metabolitos alterados entre los grupos Leve y Moderado determinados por Lipidómica.** Tasas de cambio (Fold Change) de metabolitos compuestos por esfingolípidos y lípidos esteroides. 1. Cer 41:1;O2, 2. Cer 42:1;O2, 3. Hex2Cer 32:0;O2, 4.

HexCer 38:0;O3, 5. NeuAcHexCer 34:1;O2, 6. SM 32:1;O2, 7. SM 38:1;O2, 8. SM 39:1;O2, 9. SM 40:1;O2, 10-11. SM 40:2;O2, 12. SM 41:1;O2, 13. SM 41:2;O2, 14. SM 42:1;O2, 15. SM 44:1;O2, 16. CE(20:5), 17. Glc-Colesterol. Fold Change, cambio porcentual en la abundancia de la comparación especificada calculado como (caso-control)/control) \* 100; tiempo de retención (RTmin); VIP, importancia variable en la proyección; valor p \* correspondiente a los valores de p calculados por la corrección post hoc de la tasa de descubrimiento falso de Benjamini-Hochberg (FDR < 0,05). coeficiente de variación de los metabolitos en las muestras de QC, formula molecular y nivel de identificación..... 74

**Tabla 5-12. Metabolitos de la comparación Leve y Severo con un Fold Change mayor a 1,5 o Menor a 0,5.** 11 compuestos estaban al alza, y 13 regulados a la baja, para cada compuesto se puede ver: Formula molecular; tiempo de retención (RTmin); ion objetivo o masa; CV, coeficiente de variación de los metabolitos en las muestras de QC; GM: metabolómica global; GC: cromatografía de gases; LC: cromatografía líquida; GL: lipidómica global, RP: fase inversa, QTOF-MS: espectrómetro de masas de tiempo de vuelo de cuadrupolo; Fold Change, cambio porcentual en la abundancia de la comparación especificada calculado como (caso-control)/control) \* 100; VIP, importancia variable en la proyección; valor p \* correspondiente a los valores de p calculados por la corrección post hoc de la tasa de descubrimiento falso de Benjamini-Hochberg (FDR < 0,05). ..... 75

**Tabla 5-13. Metabolitos determinandos por GC/MS en el grupo Leve y Severo.** Para cada metabolito se cálculo el Fold Change, p-value, p-FDR, p-Bon y VIP. 1. ribosa. 2. alosa. 3. manitol. 4. ácido aminobutanoico, 5. ácido glutámico, 6. leucina, 7. metionina, 8. tirosina, 9. heptanol, 10. ácido hexanoico, 11. hidroxisovalerato, 12. ácido heptanoico, 13. ácido 2-hidroxi-3-metilbutírico, 14. ácido azelaico, 15. ácido palmitoleico, 16. ácido palmítico, 17. ácido heptadecanoico, 18. ácido linoleico, 19. ácido esteárico, 20. Ácido oleico, 21. ácido glicólico, 22. acetoacetato, 23. ácido hidroxisobutírico, 24. ácido fosfórico, 25. ácido maleico, 26. ácido cítrico, 27. trietanolamina, 28. 1,2,4-butanotriol. 29. mioinositol. Fold Change, cambio porcentual en la abundancia de la comparación especificada calculado como (caso-control)/control) \* 100; tiempo de retención (RTmin); VIP, importancia variable en la proyección; valor p \* correspondiente a los valores de p calculados por la corrección post hoc de la tasa de descubrimiento falso de Benjamini-Hochberg (FDR < 0,05). coeficiente de variación de los metabolitos en las muestras de QC, formula molecular y nivel de identificación. .... 76

**Tabla 5-14. Metabolitos alterados entre los grupos Leve y Severo determinados por LC/MS.** Fold Change de metabolitos que se encontraron alterados, compuestos por Acilos grasos, Glicerofosfolípidos, Indoles, Esfingolípidos y Esteroles. 1. ácido dodecenodioico, 2. ácido hidroxitetradecanodioico, 3. LPC(16:0), 4-5. LPC(18:2), 6. LPC(20:3), 7. PC(34:1), 8. PC(36:3), 9. PC(36:4), 10. PC(36:5), 11-12. PC(38:5), 13. PC(38:6), 14. PC(40:7), 15. PC(O-18:0), 16. PE(34:2), 17. PA(30:0), 18. ácido indolacrílico, 19. 9-O-acetyl GTb1(d18:1/18:0), 20. GalNAc-Gal-GlcNAc-(Gal-GlcNAc)Gal-GlcNAc-Gal-Glc-Cer(d18:1/18:0), 21. SM (32:1;O2). Fold Change, cambio porcentual en la abundancia de la comparación especificada calculado como (caso-control)/control) \* 100; tiempo de retención (RTmin); VIP, importancia variable en la proyección; valor p \* correspondiente a los valores de p calculados por la corrección post hoc de la tasa de descubrimiento falso

de Benjamini-Hochberg (FDR < 0,05). coeficiente de variación de los metabolitos en las muestras de QC, formula molecular y nivel de identificación..... 78

**Tabla 5-15. Metabolitos determinados por Lipidómica en comparación del grupo Leve y Severo.** Metabolitos de Acilos grasos y Glicerolípidos. 1. Metil-buten-ol, 2. DG(32:1), 3. DG(32:2), 4. TG(46:1), 5. TG(46:2), 6. TG(48:1), 7. TG(48:1), 8. TG(48:2), 9. TG(48:3), 10. TG(49:2), 11. TG(50:3), 12. TG(50:4), 13. TG(50:5), 14. TG(54:1), 15. TG(56:4), 16. TG(56:6), 17. TG(57:3), 18. TG(58:7), 19. TG(58:8). Fold Change, cambio porcentual en la abundancia de la comparación especificada calculado como (caso-control)/control) \* 100; tiempo de retención (RTmin); VIP, importancia variable en la proyección; valor p \* correspondiente a los valores de p calculados por la corrección post hoc de la tasa de descubrimiento falso de Benjamini-Hochberg (FDR < 0,05). coeficiente de variación de los metabolitos en las muestras de QC, formula molecular y nivel de identificación. .... 79

**Tabla 5-16. Glicerofosfolípidos determinados por Lipidómica en comparación del grupo Leve vs Severo.** Metabolitos de Glicerofosfolípidos. 1. LPA(20:4), 2. LPC(16:0), 3. LPC(16:0), 4. LPC(16:1), 5. LPC(17:0), 6. LPC(18:0), 7. LPC(18:0), 8. LPC(18:1), 9. LPC(18:2), 10. LPC(18:2), 11. LPC(18:3), 12. LPC(20:3), 13. LPC(20:4), 14. LPC(20:4), 15. PC(35:4), 16. PC(36:1), 17. PC(36:2), 18. PC(36:3), 19. PC(36:3), 20. PC(36:4), 21. PC(38:2), 22. PC(38:3), 23. PC(38:3), 24. PC(38:4), 25. PC(38:4), 26. PC(38:5), 27. PC(38:5), 28. PC(38:6), 29. PC(38:6), 30. PC(40:4), 31. PC(40:5), 32. PC(40:6), 33. PC(40:7), 34. PC(42:9), .35. PC(O-34:1), 36.PC(O-34:3), 37. PC(O-36:5). Fold Change, cambio porcentual en la abundancia de la comparación especificada calculado como (caso-control)/control) \* 100; tiempo de retención (RTmin); VIP, importancia variable en la proyección; valor p \* correspondiente a los valores de p calculados por la corrección post hoc de la tasa de descubrimiento falso de Benjamini-Hochberg (FDR < 0,05). coeficiente de variación de los metabolitos en las muestras de QC, formula molecular y nivel de identificación. .... 80

**Tabla 5-17. Esfingolípidos y esteroides alterados entre los grupos Leve y Severo determinados por Lipidómica.** Se encontraron Esfingolípidos y esteroides a la baja. 1. Cer 41:1;O2, 2. Cer 42:1;O2, 3. Hex2Cer 32:0;O2, 4. HexCer 38:0;O3, 5. NeuAcHexCer 34:1;O2, 6. SM 32:1;O2, 7. SM 38:1;O2, 8. SM 39:1;O2, 9. SM 40:1;O2, 10. SM 40:2;O2, 11. SM 40:2;O2, 12. SM 41:1;O2, 13. SM 41:2;O2, 14. SM 42:1;O2, 15. SM 44:1;O2, 16. CE(20:5), 17. Glc-Colesterol. Fold Change, cambio porcentual en la abundancia de la comparación especificada calculado como (caso-control)/control) \* 100; tiempo de retención (RTmin); VIP, importancia variable en la proyección; valor p \* correspondiente a los valores de p calculados por la corrección post hoc de la tasa de descubrimiento falso de Benjamini-Hochberg (FDR < 0,05). coeficiente de variación de los metabolitos en las muestras de QC, formula molecular y nivel de identificación..... 81

**Tabla 5-18. Metabolitos de la comparación Moderado versus Severo con un Fold Change mayor a 1.5 o Menor a 0.5.** 7 compuestos estaban al alza, y 3 regulados a la baja, para cada compuesto se puede ver: Formula molecular; tiempo de retención (RTmin); ion objetivo o masa; CV, coeficiente de variación de los metabolitos en las muestras de QC; GM: metabolómica global; GC: cromatografía de gases; LC: cromatografía líquida; GL:

lipidómica global, RP: fase inversa,, QTOF-MS: espectrómetro de masas de tiempo de vuelo de cuadrupolo; Fold Change, cambio porcentual en la abundancia de la comparación especificada calculado como (caso-control)/control) \* 100; VIP, importancia variable en la proyección; valor p \* correspondiente a los valores de p calculados por la corrección post hoc de la tasa de descubrimiento falso de Benjamini-Hochberg (FDR < 0,05). ..... 82

**Tabla 5-19 . Metabolitos alterados entre los grupos Moderado y Severo determinados por GC/MS.** Para cada metabolito se cálculo el Fold Change, p-value, p-FDR, p-Bon y VIP. 1. ribosa. 2. alosa. 3. manitol. 4. acetil-manosamina. 5. ácido aminobutanoico. 6. prolina. 7. glicina. 8. ácido aminomalónico. 9. ácido glutámico. 10. tirosina. 11. ácido 2-hidroxi-3-metilbutírico. 12. monopalmitina. 13. ácido glicólico. 14. ácido hidroxisobutírico. Fold Change, cambio porcentual en la abundancia de la comparación especificada calculado como (caso-control)/control) \* 100; tiempo de retención (RTmin); VIP, importancia variable en la proyección; valor p \* correspondiente a los valores de p calculados por la corrección post hoc de la tasa de descubrimiento falso de Benjamini-Hochberg (FDR < 0,05). coeficiente de variación de los metabolitos en las muestras de QC, formula molecular y nivel de identificación. .... 83

**Tabla 5-20. Metabolitos alterados entre los grupos Moderado y Severo determinados por LC/MS.** Se presentan las tasas de cambio (Fold Change) de metabolitos que presentaron cambios en sus niveles de concentración de manera estadísticamente significativa. Se observan glicerofosfolípidos, péptidos, esfingolípidos y esteroides. 1. LPC(16:0). 2. LPC(18:1). 3-4. LPC(18:2). 5. PC(34:3). 6-7. PC(38:5). 8. PC(40:7). 9. Ser-Ser-OH. 10. NeuAcHexCer (42:2;O2), 11. 9. 9-O-acetyl GTb1(d18:1/18:0), 12. GalNAc-Gal-GlcNAc-(Gal-GlcNAc)Gal-GlcNAc-Gal-Glc-Cer(d18:1/18:0), 13. ácido quenodesoxiglicocólico. Fold Change, cambio porcentual en la abundancia de la comparación especificada calculado como (caso-control)/control) \* 100; tiempo de retención (RTmin); VIP, importancia variable en la proyección; valor p \* correspondiente a los valores de p calculados por la corrección post hoc de la tasa de descubrimiento falso de Benjamini-Hochberg (FDR < 0,05). coeficiente de variación de los metabolitos en las muestras de QC, formula molecular y nivel de identificación. .... 84

**Tabla 5-21. Metabolitos alterados entre los grupos Moderado y Severo, determinados por Lipidómica.** Se presentan las tasas de cambio (Fold Change) de metabolitos que presentaron cambios en sus niveles de concentración de manera estadísticamente significativa. Se observan compuestos por acilos grasos y glicerolípidos. 1. Metil-buten-ol, 2. DG(32:1), 3. DG(32:2), 4. TG(46:1), 5. TG(46:2), 6-7. TG(48:1), 8. TG(48:2), 9. TG(48:3), 10. TG(49:2), 11. TG(50:3), 12. TG(50:4), 13. TG(50:5), 14. TG(54:1), 15. TG(56:4), 16. TG(56:6), 17. TG(57:3), 18. TG(58:7), 19. TG(58:8). Fold Change, cambio porcentual en la abundancia de la comparación especificada calculado como (caso-control)/control) \* 100; tiempo de retención (RTmin); VIP, importancia variable en la proyección; valor p \* correspondiente a los valores de p calculados por la corrección post hoc de la tasa de descubrimiento falso de Benjamini-Hochberg (FDR < 0,05). coeficiente de variación de los metabolitos en las muestras de QC, formula molecular y nivel de identificación. .... 85

**Tabla 5-22. Metabolitos alterados entre los grupos Moderado y Severo determinados por Lipidómica.** Se presentan las tasas de cambio (Fold Change) de glicerofosfolípidos

que presentaron cambios en sus niveles de concentración de manera estadísticamente significativa. 1. LPA(20:4), 2-3. LPC(16:0), 4. LPC(16:1), 5. LPC(17:0), 6-7. LPC(18:0), 8. LPC(18:1), 9-10. LPC(18:2), 11. LPC(18:3), 12. LPC(20:3), 13-14. LPC(20:4), 15. PC(35:4), 16. PC(36:1), 17. PC(36:2), 18-19. PC(36:3), 20. PC(36:4), 21. PC(38:2), 22-23. PC(38:3), 24-25. PC(38:4), 26-27. PC(38:5), 28-29. PC(38:6), 30. PC(40:4), 31. PC(40:5), 32. PC(40:6), 33. PC(40:7), 34. PC(40:9), 35. PC(O-34:1), 36. PC(O-34:3), 37. PC(O-36:5). Fold Change, cambio porcentual en la abundancia de la comparación especificada calculado como (caso-control)/control) \* 100; tiempo de retención (RTmin); VIP, importancia variable en la proyección; valor p \* correspondiente a los valores de p calculados por la corrección post hoc de la tasa de descubrimiento falso de Benjamini-Hochberg (FDR < 0,05). coeficiente de variación de los metabolitos en las muestras de QC, formula molecular y nivel de identificación..... 86

**Tabla 5-23. Metabolitos alterados entre los grupos Moderado y Severo determinados por Lipidómica.** Fold Change de metabolitos compuestos por esfingolípidos y Lípidos esteroides. 1. Cer 41:1;O2, 2. Cer 42:1;O2, 3. Hex2Cer 32:0;O2, 4. HexCer 38:0;O3, 5. NeuAcHexCer 34:1;O2, 6. SM 32:1;O2, 7. SM 38:1;O2, 8. SM 39:1;O2, 9. SM 40:1;O2, 10-11. SM 40:2;O2, 12. SM 41:1;O2, 13. SM 41:2;O2, 14. SM 42:1;O2, 15. SM 44:1;O2, 16. CE(20:5), 17. Glc-Colesterol. Fold Change, cambio porcentual en la abundancia de la comparación especificada calculado como (caso-control)/control) \* 100; tiempo de retención (RTmin); VIP, importancia variable en la proyección; valor p \* correspondiente a los valores de p calculados por la corrección post hoc de la tasa de descubrimiento falso de Benjamini-Hochberg (FDR < 0,05). coeficiente de variación de los metabolitos en las muestras de QC, formula molecular y nivel de identificación..... 87

## Lista de Símbolos y abreviaturas

### Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
<i>N</i>	Número de datos		
<i>m/z</i>	Relación masa y carga		
1:1	Relación en volumen	Volumen	Una parte de cada uno.

### Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gamma
$\Delta$	Delta
$\epsilon$	Épsilon
$\zeta$	Dseta
$\eta$	Eta
$\omicron$	Ómicron

### Abreviaturas

Abreviatura	Término
+ssRNA	ARN monocatenario de sentido positivo
ACE2	Enzima convertidora de angiotensina 2
ADN	Ácido desoxirribonucleico
APN	Aminopeptidasa N humana
ARN	Ácido ribonucleico
ARNg	ARN genómico
ARNi	ARN interferente
AT2	Células alveolares tipo II
BSTFA	N,O-bis(trimetil)silil trifluoroacetamida
CD	Dominio conector
CE	Electroforesis capilar
CH	Hélice central
COVID-19	Enfermedad por Coronavirus-2019
CT	Dominio citoplasmático
CTD	C-terminal
DG	Diacilglicerol
DMS	Esférulas abiertas de doble membrana
DMV	Vesículas de doble membrana perinuclear

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
DPP4	Dipeptidil peptidasa 4
dsRNA	ARN de doble cadena
ELISA	Enzimoimmunoanálisis de adsorción
ERGIC	Compartimento intermedio del retículo endoplásmico-Golgi
ESI	Ionización por electrospray
FA	Ácidos grasos
FC	Fold Change
FP	Péptido de fusión
FR	Frecuencia respiratoria
GC	Cromatografía de gases
GL	Glicerolípidos
GP	Glicerofosfolípidos
GSH	Glutation
HILIC	Cromatografía de interacción hidrofílica
HKU1	Coronavirus humano HKU1
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficacia)
HR1	Repetición de heptada 1
HR2	Repetición de heptada 2
ICTV	Comité Internacional de Taxonomía de Virus
ID	Identificación
IFN-I	Interferón de tipo I
LC	Cromatografía líquida
LKR	Región enlazadora central
LLPS	Separación de fase líquido-líquido
LMSD	LIPID MAPS
LPA	Ácido lisofosfatídico
LPC	Lisofosfatidilcolina
m <sup>1</sup> Ψ	N <sup>1</sup> – metilpseudouridina
MALDI	Desorción / ionización láser asistida por matriz
MAVS	Señalización antiviral
MBDSTFA	N-terc-butildimetilsilil-Nmetiltrifluoroacetamida
MERS	Síndrome respiratorio de Oriente Medio
MHV	virus de la hepatitis murina
MS	Espectrometría de masas
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
MSTFA	N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida
MTBE	Éter metil tert-butílico
nAChR	receptores nicotínicos de acetilcolina
Nsps	Proteínas no estructurales del CoV

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
NTD	N-terminal
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPLS-DA	Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales ortogonales
ORF	Marco abierto de lectura, del inglés <i>open reading frame</i>
PC	Fosfatidilcolina
PK	Policétidos
PR	Lípidos de prenol
QC	Controles de calidad
$R^2_{(cum)}$	Variabilidad explicada acumulada
RBD	Dominio de unión al receptor
RdRp	Dominio de la ARN polimerasa dependiente de ARN
RE	Retículo endoplásmico
RMN	Resonancia magnética nuclear
RNP	Ribonucleocápside helicoidal
RO	Orgánulos de replicación viral
ROS	Especies reactivas del oxígeno
RTC	Complejo de replicación y transcripción viral
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
S1P	Esfingosina-1-fosfato
SARS-CoV-2	Síndrome respiratorio Agudo Severo Coronavirus – 2
sgRNA	ARN subgenómico.
siRNA	ARN pequeño de interferencia o ARN de silenciamiento
SL	Sacarolípidos
SNC	Sistema Nervioso Central
SP	Esfingolípidos
SpO <sub>2</sub>	Saturación de oxígeno
SRAS	Síndrome Respiratorio Agudo Severo
ST	Esteroles
TG	Triglicéridos
TM	Dominio transmembrana
TMCS	Trimetilclorosilano
TMPRSS2	Célula hospedadora de serina transmembrana tipo II
TMS	Tres-metilsililato
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
va-siRNA	siRNA activados por virus
VLP	Partículas similares a virus
VOC	<i>Variant of concern</i>
VOI	<i>Variant of interest</i>
$Q^2_{(cum)}$	Capacidad de predicción acumulada



# Introducción

En diciembre del 2019, se reportaron los primeros casos de neumonía viral atípica en la ciudad de Wuhan, provincia de Hubei, China, identificándolo en enero del 2020 como el Síndrome Respiratorio Agudo Severo Coronavirus - 2 (SARS-CoV-2), el cual posteriormente causó la pandemia denominada enfermedad por Coronavirus-2019 (COVID-19) (1), afectando los sistemas de salud, la economía mundial y las dinámicas sociales. De acuerdo con *Worldometer* (2), plataforma de estimaciones estadísticas basadas en algoritmos en tiempo real, al 18 de junio de 2020 la enfermedad COVID-19 ya había afectado a 213 países y territorios de todo el mundo, incluyendo a Colombia, con un total de 3.591.731 casos activos reportados a nivel mundial, de los cuales el 98 % fueron casos no severos y el 2 % (54.561) casos severos, además, a la fecha se habían cerrado 4.530.266 casos, de los cuales se recuperaron el 91 % y fallecieron el 9 % que corresponde a 456.286 personas. En Colombia, de acuerdo con la información del gobierno nacional, al 27 de enero del 2022, se presentaron 5.247.653 casos sintomáticos, 608.181 casos asintomáticos (determinados por consulta mediante RT-PCR) y 133.834 casos fallecidos, observándose una tasa de letalidad del 2.5 % (3).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) (4), los coronavirus han sido descritos extensamente como una familia de virus que causan enfermedades en animales, humanos y no humanos, varios coronavirus producen infecciones respiratorias que varían desde el resfriado común hasta el Síndrome Respiratorio de Oriente Medio (MERS) y el Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS). La OMS también señala, que aproximadamente el 80 % de los pacientes se recuperan sin necesidad de tratamiento hospitalario, y 1 de cada 5 personas presenta un cuadro crítico o severo, experimentando dificultad respiratoria.

Respecto a la terapéutica, en la actualidad se ha considerado tanto terapia farmacológica como inmunomoduladora. Los tratamientos farmacológicos experimentales usados contra el SARS-CoV-2, incluyen: Anticuerpos neutralizantes, con el objetivo de reconocer e

## Introducción

---

interactuar con el receptor ACE2 en el dominio de unión al receptor presente en la proteína S del virus, y así bloquear la interacción virus-hospedero; (5) Inhibidores de la replicación viral, dado que el SARS-CoV-2 depende de una enzima codificada en su genoma para replicar su propio material genético, denominada ARN polimerasa dependiente de ARN, fármacos como Remdesivir, Ribavirin y Favipiravir, originalmente diseñados para combatir el virus ébola, han permitido el manejo de la COVID-19 (6); Inhibidores de la endocitosis viral, los posibles mecanismos de entrada del virus en la célula del hospedero pueden llevarse a cabo mediante la fusión directa de membranas o a través de un proceso de endocitosis, por lo que se utilizó hidroxi-cloroquina, fármaco que inhibe la endocitosis y que originalmente se utilizó para el tratamiento de la malaria (7); Por último, inhibidores de proteasas virales, que reducen el metabolismo de la poliproteína con medicamentos como el Lopinavir y el Duranavir, sin embargo, estos fármacos no fueron tan eficaces a nivel clínico. Siendo interrumpidos como tratamiento por la OMS en julio del 2020 (8).

La limitación en los fármacos llevó a una rápida producción de vacunas con diferentes estrategias que incluyeron: plásmidos de ADN, vectores virales de ADN de adenovirus que expresan la proteína S, el uso del ARN (ARNm codificante para la proteína S encapsulado en nanopartículas lipídicas), modificadas de dominios proteicos, de partículas similares a virus e incluso, células artificiales presentadoras de antígenos (9–11). El desarrollo de las vacunas contra el SARS-CoV-2 llegó en pocos meses a la fase III de estudios clínicos (12), para el 26 de noviembre del 2021, ya se habían aprobado varias vacunas, incluyendo: BNT162b2 de Pfizer-BioNTech, Oxford/AstraZeneca, Ad26.CoV2.S de Janssen, Moderna (ARNm-1273), Sinopharm, CoronaVac de Sinovac y BBV152 (Covaxin) de Bharat Biotech (13), las cuales son consideradas fundamentales en el control de la enfermedad. En octubre del 2021, el subcomité de la COVID-19 del Comité Consultivo Mundial sobre Seguridad de las Vacunas, que ofrece asesoramiento a la OMS, concluyó que las vacunas basadas en ARNm redujeron significativamente los ingresos hospitalarios y las muertes por COVID-19, frente a los otros tipos de vacunas (14), no obstante, debido al poco tiempo para su validación, no ofrecen una seguridad científica sobre futuros riesgos y dependen de un umbral de inmunidad colectiva (12,15).

## Introducción

---

Una de las características de la enfermedad COVID-19 es la baja predictibilidad sobre el curso de la enfermedad, tanto sobre aquellos sujetos que serán asintomáticos, así como en el curso y la prognosis de las personas que ingresan a la Unidad de Cuidado Intensivo (UCI). Se evidencia en la clínica una prognosis heterogénea, incluyendo una falla ventilatoria severa hipocápnica de tipo refractaria, y el desarrollo de una tormenta inmunológica con liberación de mediadores inflamatorios con un componente de choque mixto, asimismo, daño neurológico principalmente en los centros de regulación respiratoria en el Sistema Nervioso Central (SNC) (16). Además, una miocarditis fulminante, que surge rápidamente y progresa de forma súbita, lo que puede conducir a insuficiencia cardíaca grave o insuficiencia circulatoria que se presenta como hipotensión de inicio rápido y choque cardiogénico, con tasas de mortalidad entre el 50 y 70 % (17–19). Por lo tanto, se hizo importante determinar indicadores biológicos para predecir la gravedad de la enfermedad y así reducir la mortalidad de los pacientes críticos con COVID-19.

Esto ha llevado al estudio de los coronavirus mediante el uso de ciencias ómicas, las cuales constituyen herramientas de gran relevancia para investigación en diversas patologías, generando nuevo conocimiento acerca de los mecanismos moleculares y bioquímicos subyacentes a estas y señalando a la vez, potenciales dianas terapéuticas. Una de estas ómicas es la metabolómica, que permite diferenciar los estadios de la enfermedad encontrando patrones que relacionan la gravedad con cambios bioquímicos en metabolitos, como los lípidos, entre otros, que se han asociado a la patogenia de la COVID-19. El metabolismo es esencial en la función celular y en su fenotipo (20), y a pesar de que la metabolómica no es aún una ciencia muy estudiada, ha avanzado bastante en la última década (21).

Por tanto, nace la necesidad de impulsar la investigación colombiana mediante la implementación de una herramienta bioquímica confiable y avanzada, en contextos de COVID-19 y sus eventuales rebotes y/o nuevas enfermedades a futuro, por lo que el presente proyecto tuvo como objetivo realizar la caracterización de cambios en el metaboloma asociados a la severidad de la enfermedad en sujetos positivos para SARS-

## Introducción

---

CoV-2, proporcionando información valiosa para el estudio de la COVID-19 y posibles tratamientos (22).

# 1. Marco Teórico

## 1.1 Epidemiología de los Coronavirus humanos

Los coronavirus son virus de ARN monocatenario de sentido positivo, pertenecen a la familia *Coronaviridae* del orden de *Nidovirales*, subfamilia *Orthocoronavirinae*, de la que se conocen cuatro géneros:  $\alpha$ -coronavirus,  $\beta$ -coronavirus,  $\gamma$ -coronavirus,  $\delta$ -coronavirus. Los  $\alpha$ -coronavirus y  $\beta$ -coronavirus se caracterizan por tener envoltura y causar enfermedades zoonóticas que pueden infectar a humanos, son clase IV en la clasificación de Baltimore y causan enfermedades como el síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) y el síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV), entre otros (23).

Las infecciones por Coronavirus se han incrementado a través de la historia, convirtiéndose en un importante problema de salud pública. El SARS-CoV causó un brote con alrededor de 8.098 casos con una tasa de mortalidad del 9 % en Hong Kong, que se extendió causando una epidemia en China entre el 2002 y el 2003 (24). El MERS-CoV se dio lugar en Medio oriente en el 2012 con una tasa de mortalidad del 50%. El más reciente, el SARS-CoV-2, que se notificó a finales del 2019 como neumonía de etiología desconocida en la provincia de Hubei-Wuhan (China), anunciando públicamente su identificación en enero del 2020, provocó un brote de neumonía viral altamente transmisible, con síntomas similares al SARS-CoV y al MERS-CoV, como fiebre, tos seca, malestar, fatiga, disnea e infiltración pulmonar bilateral (25), y diferenciándose de estos mismos al inducir insuficiencia orgánica en algunos pacientes, que conduce eventualmente a la muerte (Ver **Figura 1-1**) (26).

**Figura 1-1: Síntomas de la COVID-19.** La COVID-19 se detectó inicialmente en Wuhan, capital de la provincia Hubei, en China. Con síntomas leves y moderados como fiebre, tos, fatiga, esputo, disnea, dolor de garganta y de cabeza. Algunos pacientes presentan

síntomas gastrointestinales, y otros avanzan a síntomas críticos como insuficiencia respiratoria, shock séptico o falla multiorgánica (27).



Nombre de la fuente: Imagen tomada de Maps4News.com y modificada con información de Khaled Habas et al, por Nataly Gómez (27).

El SARS-CoV-2, denominado así por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) y otros virólogos, debido a su similitud filogenética con el SARS-CoV, se extendió desde China en primera instancia a otros países como Singapur, Japón, República de Corea, Malasia, Vietnam, Australia, Estados Unidos de América y Alemania (28), causando la COVID-19, nombrada así por la Organización Mundial de la Salud (OMS) el 11 de febrero de 2020 (29), siendo declarada como pandemia un mes después por el Director General de la OMS (30). Esto, en gran parte gracias a su capacidad de transmisión, la cual es a través de la inhalación de gotitas y la interacción con superficies contaminadas (31).

La COVID-19 se ha dividido en cinco grupos según características clínicas: Casos asintomáticos, leves, moderados, graves y críticos, identificados con resultado positivo de la detección de ácido nucleico del SARS-CoV-2 mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) (29). Su heterogeneidad clínica, más su periodo de incubación de entre 2 a 14 días con variación entre los grupos de edad y entre los individuos con comorbilidades, hacen que sea más complicado su rastreo en la población (26).

Se han compartido a nivel mundial más de 2.895.410 secuencias genómicas en las bases de datos de acceso público, donde se han determinado la aparición de mutaciones específicas que generan nuevas variantes del SARS-CoV-2, por lo que el 25 de febrero de 2021, la OMS propuso definiciones operativas para las variantes de interés del SARS-CoV-2 (VOI, del inglés, *variant of interest*) y variantes de preocupación (VOC del inglés, *variant of concern*) (30). Las VOI afectan la transmisibilidad y la gravedad de la enfermedad, y su capacidad para escapar a la acción del sistema inmunitario, ser detectado por medios diagnósticos o ser atacado por medicamentos; con prevalencia creciente que indican un nuevo riesgo para la salud pública mundial. Mientras que las VOC están relacionadas con aumento de la transmisibilidad y/o de la virulencia de la COVID-19 y disminución de la eficacia de las medidas sociales y de salud pública o de los medios de diagnóstico, las vacunas y los tratamientos disponibles (32). A enero del 2022, había cinco variantes preocupantes del SARS-CoV-2 a nivel mundial, VOC; Alpha, Beta, Gamma, Delta y Omicron y VOI; Epsilon, Zeta, Eta, Iota, Theta, Kappa, Lambda y Mu, que surgieron bajo la presión de la selección natural (Ver **Tabla 1-1**) (33).

**Tabla 1-1. Clasificación de las variantes del SARS-CoV-2.** Se puede observar la denominación dada por la OMS a las variantes preocupantes y variantes de interés a enero del 2022, junto a su linaje pango, clado, documentación y fecha de designación.

VARIANTES DEL SARS-COV-2					
DENOMINACIÓN DE LA OMS	LINAJE PANGO	CLADO/LINAJE GISAID	CLADO NEXTSTRAIN	PRIMERAS MUESTRAS DOCUMENTADAS	FECHA DE DESIGNACIÓN
Variantes preocupantes (VOC)					
Omicron y Subvariantes	B.1.1.529	GRA	21K, 21L, 21M, 22A, 22B, 22C, 22D	Varios países noviembre 2021	VUM: 24-nov-2021 VOC: 26-nov-2021
Alfa	B.1.1.7	GRY	20I (V1)	Reino Unido, septiembre de 2020	VOC: 18/12/2020

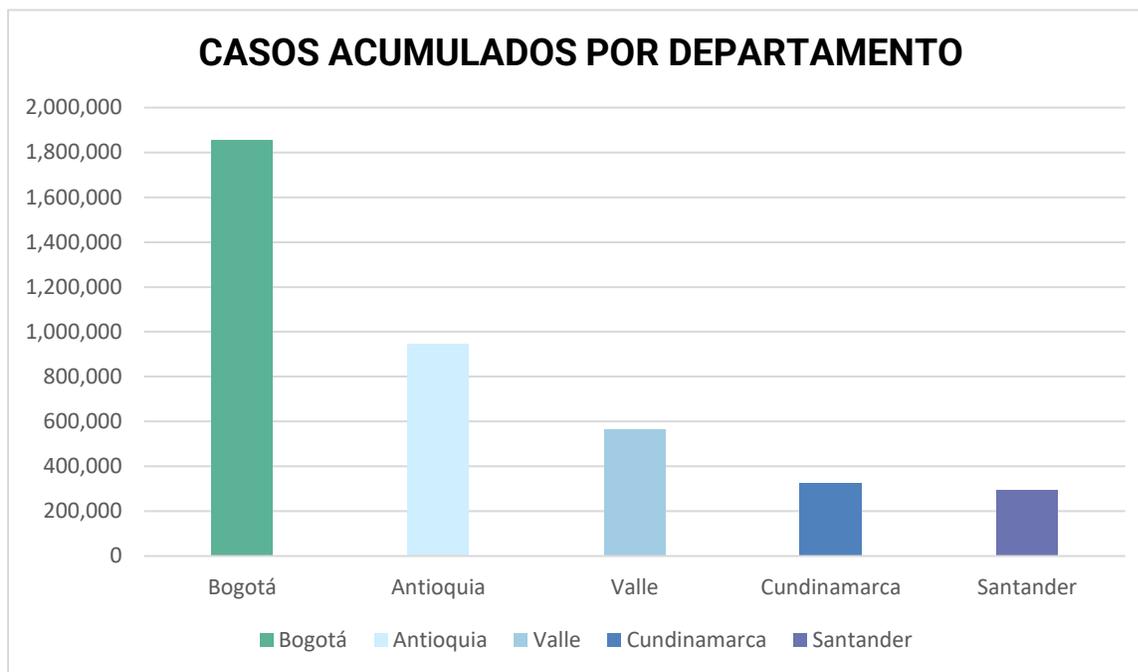
					Anteriormente preocupante: 9/3/2022
Beta	B.1.351	GH/501Y.V2	20H (V2)	Sudáfrica, mayo de 2020	VOC: 18/12/2020 Anteriormente preocupante: 9/3/2022
Gamma	P.1	GR/501Y.V3	20I (V1)	Brasil, noviembre de 2020	VOC: 11/1/2021 Anteriormente preocupante: 9/3/2022
Delta	B.1.617.2	G/478K.V1	21A, 21I, 21J	India, octubre de 2020	VOI: 4-abr-2021 VOC: 11-mayo-2021 Anteriormente preocupante: 7-jun-2022
Variantes de interés (VOI)					
Épsilon	B.1.427 B.1.429	GH/452R.V1 /td>	21C<	Estados Unidos de América, marzo de 2020/td>	VOI: 5/3/2021 Anteriormente de interés: 6/7/2021
Dseta	P.2	GR/484K.V2	20B/S.484K	Brasil, abril de 2020 OI: 17/3/2021	Anteriormente de interés: 6/7/2021
Eta	B.1.525	G/484K.V3	21D	Varios países, diciembre de 2020	Anteriormente de interés: 20/9/2021

				VOI: 17/3/2021	
Zeta	P.3	GR/1092K.V1	21E	Filipinas, enero de 2021 VOI: 24/3/2021	Anteriormente de interés: 6/7/2021
Iota	B.1.526	GH/253G.V1	21F	Estados Unidos de América, noviembre de 2020 VOI: 24/3/2021	Anteriormente de interés: 20/9/2021
Kappa	B.1.617.1	G/452R.V3	21B	India, octubre de 2020 VOI: 4-April-2021	Anteriormente de interés: 20/9/2021
Lambda	C.37	GR/452Q.V1	21G	Perú, diciembre 2020	14 junio 2021
Mu	B.1.621	GH	21H	Colombia, enero 2021	30 agosto 2021

Nombre de la fuente: OMS – 2021 (32).

Para octubre del 2022 se habían reportado 626.337.158 casos confirmados de COVID-19 a nivel global, con 6.566.610 defunciones. De los cuales 29 % de los casos (179.698.207) y 44 % (2.853.745) de las defunciones fueron en América. En Colombia, el primer caso reportado fue el 06 de marzo de 2020, iniciando una cuarentena el 25 de marzo del mismo año (34), y a partir de ahí al cuatro de noviembre del 2022 se registraron alrededor de 6.310.332 casos, que correspondieron aproximadamente al 4 % en América, y 141.850 fallecidos, la ciudad más afectada fue Bogotá (35), como se puede ver en la **Figura 1-2**.

**Figura 1-2. Casos acumulados de COVID-19 por departamento.** En Colombia, Bogotá fue la ciudad con mayor número de casos reportados al 21 de noviembre del 2022 (1.855.445 casos), seguido por Antioquia (947.848 casos), Valle (564.150 casos), Cundinamarca (327.856 casos) y Santander (293.509 casos) (35).



Nombre de la fuente: Instituto Nacional de salud – 2022 (35)

El último informe emitido por la Organización Panamericana de la Salud del 08 de Diciembre del 2022, revela que hubo 5.336 casos nuevos del 01 al 08 de diciembre, con un incremento nacional del 0,084% y 32 muertes nuevas del 3 al 10 de noviembre, con un aumento nacional del 0,002%, ver la **Figura 1-3** (36).

## 1.2 Estructura viral

El genoma viral del SARS-CoV-2 es ARN monocatenario sentido positivo no segmentado con 13 a 16 marcos de lectura abierta (ORF del inglés *open reading frame*), de los cuales se conocen 12 funcionales. Tiene un tamaño aproximado de 29,9 Kb con un 38 % de contenido GC, asemejándose en un 89 % a otros CoV (24). Su estructura es 5' con cola poli-A en 3'. El gen de la replicasa codifica para proteínas estructurales y accesorias o no estructurales del CoV (nsps) (37), a partir de sgRNA (38).

**Figura 1-3. Indicadores de incidencia en Colombia.** Datos de morbilidad, mortalidad, letalidad, hospitalización y número reproductivo basados en el reporte “Corte 01 al 08 de diciembre de 2022” por la OPS, con 6.323.357 y 141.943 defunciones. (36).

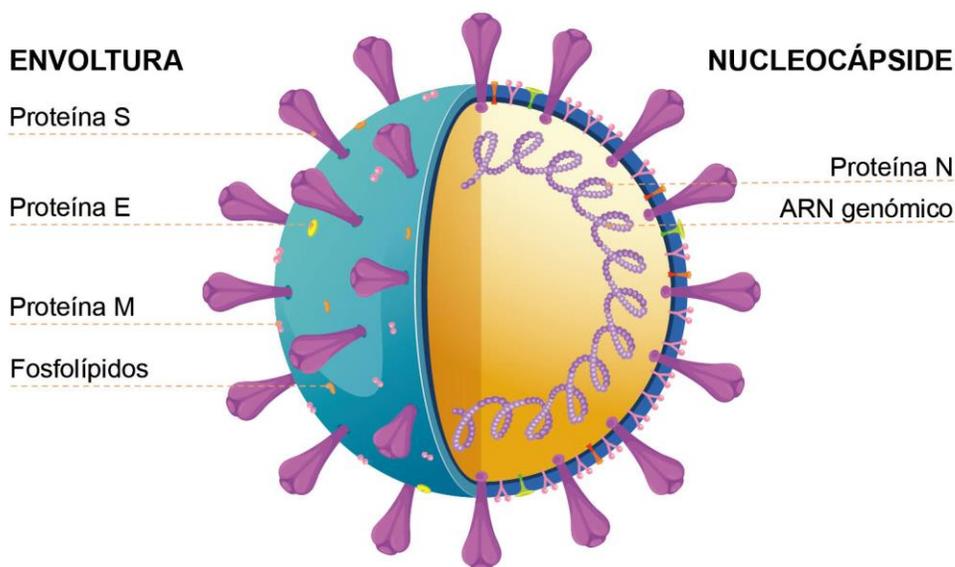
	<b>1 Morbilidad x cada 100 ml habitantes</b>	30 oct/20	30 dic/20	30 mar/21	27 oct/22	8 dic/22
		2.016,7	2.597	4.760	12.526,1	12.553,2
	<b>2 Mortalidad general x millón habitantes</b>	30 oct/20	30 dic/20	30 mar/21	27 oct/22	8 dic/22
		610,5	726,3	1.255,7	2.815,8	2.817,9
	<b>3 Letalidad</b>	30 oct/20	30 dic/20	30 mar/21	27 oct/22	8 dic/22
		3	2,8	2,6	2,2	2,2
	<b>4 % Hospitalización / casos activos</b>	14 abr/22	14 may/22	14 jun/22	27 oct/22	8 dic/22
		13%	2%	3%	28%	10%
	<b>5 % Hospitalización UCI / casos activos</b>	14 abr/22	14 may/22	14 jun/22	27 oct/22	8 dic/22
		2%	0,2%	0,3%	2,6%	2,2%
	<b>6 Proporción de positividad</b>	30 oct/20	30 dic/20	30 mar/21	27 oct/22	8 dic/22
		25,3	25,7	16,9	22,5	22,5
	<b>7 Número reproductivo Rt</b>	10 oct/20	10 dic/20	16 mar/21	16 oct/22	1 dic/22
		0,8	0,9	1,0	0,76	1,08

Nombre de la fuente: Situación COVID-19 Colombia: Corte 01 al 08 de diciembre de 2022. Organización Panamericana de salud (36).

Los viriones de coronavirus son tienen forma aproximadamente esférica con un diámetro promedio de alrededor de  $108 \pm 8$  nm (39), compuestos por cuatro proteínas principales: proteína S (superficie), de 150 kDa, que utiliza una secuencia de señal N-terminal (NTD) para tener acceso al RE, mediando la unión al receptor del hospedero y consta de dos subunidades: S1, un dominio de unión al receptor (RBD) y S2 dominio de fusión. La proteína M (membrana), es la más abundante, de 25 a 30 kDa, tiene 3 ectodominios transmembrana, 1 ectodominio glicosilado NTD y 1 ectodominio C-terminal (CTD) de 6 a 8 nm, da la forma curvada a la membrana y se une a la nucleocápside. La proteína E (envoltura), de 8 a 12 kDa, es la menos abundante, posee un ectodominio NTD y un

endodominio CTD, es una proteína transmembrana que tiene actividad de canal iónico y facilita el ensamblaje y liberación del virus. Finalmente, la proteína N (nucleocápside), se compone por dos dominios, un NTD y un CTD que se unen al ARN, está altamente fosforilada y se cree que desencadena un cambio estructural que mejora la afinidad por el ARN viral (40). Una quinta proteína, la hemaglutinina-esterasa (HE) en los  $\beta$ -coronavirus, se une al ácido siálico en las glicoproteínas de superficie e hidroliza grupos acetilo (41), que podría mejorar la entrada a las células mediada por S y la propagación del virus en la mucosa (37,42). Las proteínas que conforman el virión del SARS-CoV-2 se encuentran representadas en la **Figura 1-4**.

**Figura 1-4: Estructura del SARS-CoV-2.** Envoltura viral compuesta por las proteínas: S (*Spike*), M (*Membrane*), E (*Envelope*) y la bicapa fosfolipídica. La nucleocápside está formada por la proteína N (*Nucleocapsid*) que cubre al genoma viral ARN monocatenario de sentido positivo (+ssRNA). Su receptor principal es el ACE2 (Angiotensina 2), que es reconocido por la proteína S.



Nombre de la fuente: Imagen tomada de Benavides y colaboradores (43).

Las nsps desempeñan diferentes funciones durante la replicación y el ensamblaje viral, las cuales se pueden observar en detalle en la **Tabla 1-2**. Los principales procesos en que están involucradas son: patogénesis, inmunomodulación, transactivación genética y respuesta antiviral (24).

**Tabla 1-2: Proteínas no estructurales (nsps).** Se han reportado 16 proteínas no estructurales del virus, las cuales hacen parte del complejo de replicación viral y cumplen diversas funciones.

<b>PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES DE SARS-CoV-2</b>		
<b>nsp</b>	<b>Tipo de proteína</b>	<b>Función</b>
<b>nsp1</b>	Producto N-terminal de la replicasa.	Promueve degradación del ARNm celular, bloquea la traducción de la proteína líder de la célula hospedera. Bloquea la respuesta inmune innata.
<b>nsp2</b>	Producto de la replicasa para corrección viral.	Se une a prohibitinas (PHB y PHB2) promueve la supervivencia de la célula hospedera.
<b>nsp3</b>	Proteasa similar a la papaína (PLpro).	Proteasa que permite escindir la poliproteína en las diferentes proteínas.  Inhibe respuesta inmune innata.  Promueve la expresión de citocinas (ADRP).  Interactúa con la proteína estructural N mediante los dominios Ub11 y Ac.
<b>nsp4</b>	Proteína de andamio transmembrana	Proteína estructural de los DMV.  Ancla el complejo de transcripción - replicación viral a la membrana del RE.
<b>nsp5</b>	Proteinasa de tipo 3C y proteinasa principal (Mpro).	Escinde la poliproteína viral durante la replicación viral.
<b>nsp6</b>	Proteína transmembrana	Proteína de andamiaje.  Inducción de autofagosomas del RE.
<b>nsp7</b>	ARN polimerasa dependiente de ARN.	Forma un complejo hexadecamérico con nsp8, puede actuar como abrazadera de procesividad para la ARN polimerasa en la replicación.

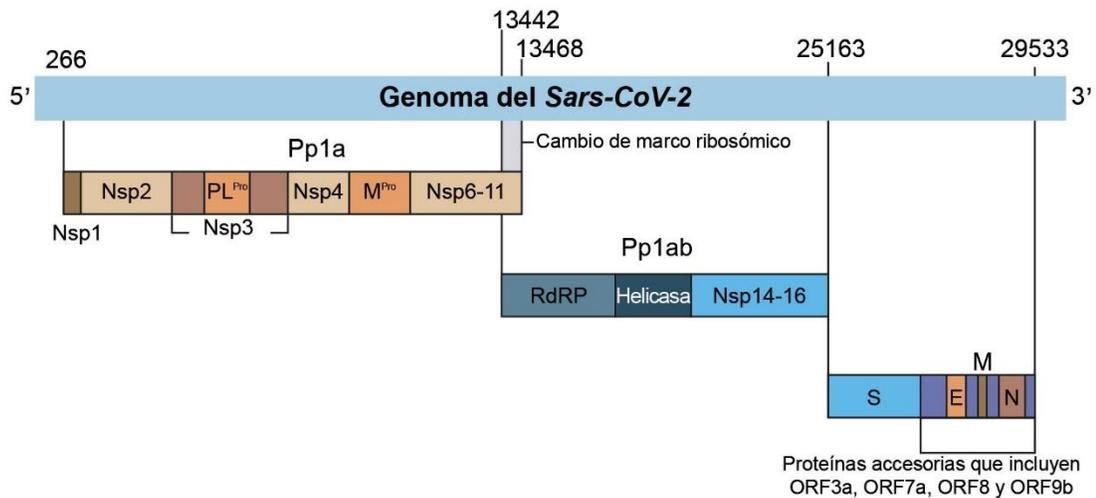
<b>nsp8</b>	Polimerasa de ARN multimérica; replicasa	Forma un complejo hexadecamerico con nsp7, puede actuar como abrazadera de procesividad para la ARN polimerasa; puede actuar como primasa.
<b>nsp9</b>	Proteína de unión al ARN	Se une a ARN monocatenario actuando en la replicación.
<b>nsp10</b>	Proteína similar al factor de crecimiento contiene dos motivos que se unen al zinc	Cofactor transcripcional de nsp16 (actividad 2'-O-metiltransferasa) y nsp14 (actividad nsp14 3'-5' exoribonucleasa), forma un heterodímero con ambos, esencial en la metilación de la tapa de ARNm viral.
<b>nsp11</b>	Desconocido	Desconocido. Compuesto por 13 aminoácidos (sadaqsflngfav) e idéntico al primer segmento de Nsp12.
<b>nsp12</b>	ARN polimerasa dependiente de ARN (Pol / RdRp)	Responsable de la replicación y transcripción del genoma del ARN viral.
<b>nsp13</b>	Dominio de unión al zinc, dominio NTPasa / helicasa, ARN 5'-trifosfatasa	Se une como helicasa al ATP. El dominio de unión al zinc participa en la replicación y la transcripción.
<b>nsp14</b>	N7 MTasa y ExoN	N7-guanina metiltransferasa (N7 MTase) agrega un límite 5' a los ARN virales. Exoribonucleasa 3'-5' (ExoN 3' a 5') importante para la corrección del genoma viral.
<b>nsp15</b>	EndoARNasa; nsp15-A1 y nsp15B-NendoU	Endoribonucleasa dependiente de Mn (2+).
<b>nsp16</b>	2'-O-ribosa metiltransferasa	Metiltransferasa que media la metilación de la capa 2'-O-ribosa del ARNm en la estructura de la capa 5' de los ARNm virales, protegiendo el ARN viral del reconocimiento de MDA5.

Fuente: Principales funciones de las nsps conocidas de CoV (24,37).

### 1.2.1 Características genómicas de SARS-CoV-2

El genoma del SARS-CoV-2 comparte aproximadamente un 80 % de identidad con el SARS-CoV, y un 50 % con el MERS-CoV, (44) sin embargo, el SARS-CoV-2 difiere de otros coronavirus en algunos aspectos claves de su patogénesis. El ARN genómico (ARNg) del SARS-CoV-2 comprende 14 marcos de lectura abiertos (ORF), estos codifican para diferentes proteínas importantes en la replicación viral. Los ORF principales son ORF1a y ORF1b, que se superponen con un cambio de marco ribosómico (-1), comprenden dos tercios del genoma y se traducen en las poliproteínas: pp1a y pp1ab, respectivamente (45), ver **Figura 1-5**, el SARS-CoV-2 produce 6 proteínas accesorias extra, codificadas por los genes ORF3a, ORF6, ORF7a y ORF8, ORF10, y por algunas mutaciones asociadas a la selección natural (46,47).

**Figura 1-5: Organización del genoma del SARS-CoV-2.** El genoma de SARS-CoV-2 codifica para 16 nsp, generadas de la autoescisión de las poliproteínas precursoras Pp1a y Pp1ab. Las proteínas estructurales están codificadas por sus respectivos genes, intercaladas con proteínas accesorias que incluyen ORF3a, ORF7a, ORF8 y ORF9b.



Nombre de la fuente: Imagen tomada y modificada de Nathan J. Hardenbrook (39).

## ▪ **Glicoproteína S**

La glicoproteína S se sitúa en la envoltura externa del virión, es una proteína de membrana tipo I con 66 glicanos, que se compone por dos subunidades: S1 y S2. Actúa como proteína de fusión de membranas, que permite la unión del virus con la célula tras someterse a un reordenamiento estructural. Sus picos están cubiertos por polisacáridos que exacerban la respuesta inmune del hospedero (48)(49).

La proteína S1 media la unión a la célula hospedera mediante el dominio RBD que le permite interactuar con el receptor ACE2. Su secuencia genómica comparte menos del 75 % con el SARS-CoV. Entre las diferencias principales se encuentran el sitio de escisión S1/S2 por TMPRSS2, esta presenta la mutación D614G, asociada a la carga viral, la cual se propagó rápidamente en EEUU y Europa (50). La mutación mejora la infectividad y modula los reordenamientos estructurales para la fusión de membranas (51), y está presente en varias variantes (44,49,52).

Tres inserciones cortas en NTD, donde han surgido mutaciones y deleciones en las nuevas variantes (33)(49), cambios en residuos claves del sitio de unión al receptor (53), Leu455, Phe486, Gln493, Ser494, Asn501 y Tyr505, además, utiliza una furina en la preactivación del ingreso a la célula hospedera, reduciendo la dependencia a proteasas diana como TMPRSS2 o cathepsina L (24).

Estas diferencias explican parcialmente las discrepancias en la sintomatología y el tropismo de la infección frente a otros coronavirus (54), por ejemplo, la furina se expresa en células epiteliales bronquiales humanas, conjuntamente infecta URT en tejidos nasofaríngeos y/u orofaríngeos (55), posiblemente debido a que el receptor de ACE2 se expresa en tejidos nasales y orales, principalmente en lengua, de igual manera en células alveolares tipo II (AT2) de pulmón, células epiteliales estratificadas y superiores del esófago, enterocitos absorbentes del íleon y colon, colangiocitos, células miocárdicas, células del túbulo proximal renal y células uroteliales de la vejiga (56,57). Además, se han identificado polimorfismos en ACE2 que pueden generar mayor o menor susceptibilidad al virus (58).

A diferencia de S1, la S2, presenta un mayor porcentaje de similitud con otros CoV (59), contiene un péptido de fusión (FP), repetición de heptada 1 y 2 (HR1 – HR2), hélice central (CH), dominio conector (CD), dominio transmembrana (TM) y un dominio citoplasmático (CT) (33); S2 se encarga de la fusión viral con la célula hospedera. FP, permite la fusión de membranas al interrumpir y conectar las bicapas lipídicas de la membrana de la célula, durante la fusión S2, pasa por tres estados conformacionales principales; un estado nativo previo a la fusión, seguido de un estado intermedio anterior a la horquilla y un estado de horquilla posterior a la fusión. HR1 y HR2 conforman las seis hélices (6-HB) (48) con funciones en la entrada y fusión de S2, HR1, de *SARS-CoV-2*, tiene una similitud del 96 % con la de *SARS-CoV*, con ocho residuos diferentes en la región central de fusión, a diferencia de HR2, que es 100 % similar entre los dos. Estos cambios en los aminoácidos de HR1 generan diferentes interacciones, principalmente de puentes salinos, entre estos, lo que conlleva a una mayor infectividad (52).

Debido a su papel en el reconocimiento y la invasión del hospedero (60) la proteína S se ha convertido en una diana terapéutica importante para el diseño de fármacos y vacunas. Un ejemplo es la vacuna Pfizer/BioNTech, que consiste en nanopartículas de lípidos portadoras de ARNm modificado con nucleósidos de metil-pseudouridina (m<sup>1</sup>Ψ), que codifica para la proteína S modificada, la cual genera una respuesta inmunológica mediada por linfocitos B y T (61). Otro ejemplo es la vacuna Moderna (62–64), o vacunas que favorecen la unión covalente de nanopartículas al RBD (65).

### ▪ **Proteína de nucleocápside (N)**

La proteína de nucleocápside se ha identificado en gran abundancia durante las infecciones por *SARS-CoV-2* (45), consta de un brazo - NT, la región enlazadora central (LKR) y la cola - CT, dos dominios estructurales: el NTD, un dominio de unión al ARN, y CTD, un dominio de dimerización. Sus funciones principales son empaquetar el ARN viral en la ribonucleocápside helicoidal (RNP), en forma de cuentas de cadena (66), y localizarse en el complejo de replicación y transcripción viral (RTC) para facilitar la síntesis y traducción del ARN viral gracias al cambio de plantilla de ARN y al reclutamiento de factores necesarios (67).

La proteína de la nucleocápside se somete a la separación de fase líquido-líquido (LLPS), permitiendo la condensación de proteínas y ácidos nucleicos que funcionan de base para la replicación viral y promueven el ensamblaje de viriones maduros, también, mitiga, e incluso afecta la formación de los gránulos de estrés de la respuesta inmune innata, inhibiendo la autofosforilación de la proteína quinasa R (PKR, del inglés *protein kinase R*) o secuestrando a la proteína 1 de unión a la proteína activadora de Ras GTPasa (G3BP1) (68).

Además, la proteína N puede secuestrar el ARN de doble cadena (dsRNA, *double-stranded RNA*) suprimiendo la actividad del ARN de interferencia (RNAi, *RNA Interference*) de las células del hospedera (39). El ARNi funciona como defensa inmunológica al generar ARN pequeño de interferencia (siRNA, del inglés *small interfering RNA*) para bloquear la transcripción de las partículas virales. Por lo que al suprimir al ARNi, puede evadir la respuesta inmune e incluso ponerla a su favor al modificar el siRNA endógeno del hospedera y convirtiéndolo en siRNA activados por virus (va-siRNA) que hacen a las células tolerantes al SARS-CoV-2 (69).

### ▪ **Proteínas de membrana (M) y envoltura (E)**

Las proteínas M, E y S, poseen secuencias señal para movilizarse al RE. La proteína E es la más conservada entre los CoV, se involucra en la patogénesis, el ensamblaje y la liberación del virus (66). La proteína E posee dos dominios, un dominio transmembrana hidrofóbico y una cola citoplasmática, con cuatro variaciones frente al SARS-CoV. Dentro de sus funciones esta la oligomerización para formar viroporinas encargadas de la liberación, así como del plegamiento de proteínas en el RE (70). Así mismo, de la regulación del equilibrio iónico junto con el microambiente, ya que al igual que ORF3a y ORF8a, puede auto ensamblarse en oligómeros y generar canales iónicos (71).

La proteína más abundante es M, una glicoproteína transmembrana de aproximadamente 222 aminoácidos (45) consta de 3 dominios: ectodominio NTD, endodominio CTD y tres hélices transmembrana (72). Las funciones de la proteína M son en gran parte desconocidas (73), se sabe que interactúa, en dos conformaciones distintas, consigo misma y con la proteína N y el ARN viral para el ensamblaje de viriones (74), de igual

manera que en el SARS-CoV con el que comparte un 90 % de similitud (75). Además, interactúa con el adaptador mitocondrial de señalización antiviral (MAVS) impidiendo la formación del complejo MAVS-TRAF3-TBK1 y a su vez al Interferón de tipo I (IFN-I) evadiendo al sistema inmune (76). Por otro lado, puede inducir respuesta inmune humoral gracias a epítopos antigénicos en las hélices transmembrana, y es homóloga a la proteína de transporte de azúcar procariótica SemiSWEET que se cree influye en la glicosilación de la proteína S, y le permitiría una rápida replicación y evasión del sistema inmune (77).

### 1.3 Ciclo de vida del Coronavirus

El virus ingresa por el tracto respiratorio superior e invade preferentemente las células caliciformes productoras de moco y las células ciliadas (78). En primer lugar, se une a la célula hospedera mediante la interacción de los sitios del dominio de unión al receptor (RBD) en la región S1 de la proteína S y a su receptor específico, estos pueden variar según el tipo de virus, en el SARS-CoV se encuentra RBD en el CTD mientras que en MHV en NTD (37). Los receptores más relevantes al momento son la aminopeptidasa N humana (APN; HCoV-229E) la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2; HCoV-NL63, SARS-CoV y SARS-CoV-2) y la dipeptidil peptidasa 4 (DPP4; MERS-CoV) (23,79). Además, se ha propuesto que el SARS-CoV-2 podría unirse a los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) (66).

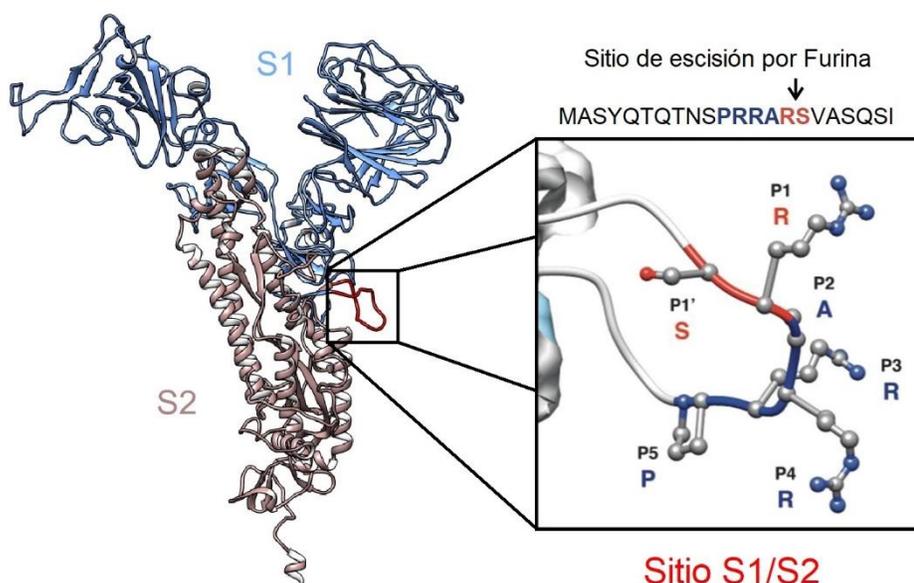
El virus ingresa al citosol de la célula por un mecanismo que implica la escisión proteolítica dependiente de la proteína S, en el sitio S1/S2 y S'2 de S2, mediado por proteasas como furina, la proteasa de célula hospedadora de serina transmembrana tipo II (TMPRSS2) y la catepsina L, que promueven la absorción y fusión en la membrana celular. La escisión de S1 por furina, ocurre en un sitio de escisión PRRA (P, prolina; R, arginina; A, alanina), similar al MERS-CoV, y conservada antecesores cercanos, se ha asociado al tropismo viral por células del sistema respiratorio superior, mejorando su transmisibilidad y patogénesis (80). Esta escisión es esencial para escindir posteriormente S'2, que asegura el ingreso a las células respiratorias (81), ver **Figura1-6**.

Seguido, ocurre la escisión en S2 en el sitio S'2, mediante TMPRSS2 por la vía denominada “temprana” o por la Catepsina L en la vía “tardía”, lo que provoca la separación

de RBD de S y luego expone las cadenas laterales hidrofóbicas del péptido de fusión que se inserta en la membrana desencadenando la fusión de las membranas (82), y conllevando a la liberación del ARN por la proteína E (37,42) y regulando la lisis viral (83).

La replicación viral es de tipo IV según la clasificación de Baltimore, el ARNm<sup>+</sup> viral traduce proteínas reguladoras que participan en la replicación viral, sintetizando posteriormente el ARNm<sup>-</sup> a partir del molde de ARNm<sup>+</sup> por la polimerasa y el complejo de replicación, y traducir a partir de este las proteínas estructurales. Finalmente ocurrirá el ensamblaje de las proteínas estructurales junto con el ARNm<sup>+</sup> para obtener nuevos viriones.

**Figura 1-6. Inserción en el sitio de escisión proteolítica S1/S2 de la proteína S.** La proteína S presenta el motivo S1 de color azul y S2 en marrón, la flecha indica el sitio de escisión proteolítica S1/S2 que se muestra en rojo. La ampliación del sitio S1/S2 con residuos R y S conservados (naranja) y la inserción única de cuatro residuos de aminoácidos PRRA para el SARS-CoV-2 (azul), que favorecen la selección de la célula hospedera y la infectividad del virus. Las P denotan la posición de ese aminoácido desde el sitio de escisión S1/S2, con P1–P5 refiriéndose a los aminoácidos antes del sitio de escisión y P1' refiriéndose a los aminoácidos después del sitio de escisión.



Nombre de la fuente: Imagen tomada y modificada a partir de Mihkel Örd, et al (82) y Tiffany Tang, et al (81).

El SARS-CoV-2 luego de la liberación del genoma, +ssRNA sirve como mRNA funcional y se traducen los marcos de lectura abiertos ORF1a y ORF1b del gen de la replicasa (*rep1a* y *rep1b*), los cuales expresan dos poliproteínas co-terminales pp1a y pp1b, utilizando la secuencia 5'-UUUAAAC-3' que provoca un desplazamiento de -1 en el marco de lectura ribosómico. Estas proteínas se procesan cotraduccionalmente y postraduccionalmente en las proteínas no estructurales individuales (nsps) para formar el RTC, pp1a codifica para nsps 1 al 11, nsps 11 se convierte en nsps 12 durante el desplazamiento y se le denomina dominio de la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) que favorece la recombinación homóloga y no homóloga, y pp1b codifica para nsps 1 al 16.

En conjunto con la expresión de las nsps, principalmente nsp3, nsp4 y nsp6, se inicia la biogénesis de orgánulos de replicación viral (RO), los cuales secuestran factores, metabolitos, lípidos y proteínas necesarias para la síntesis de ARN y la replicación. Los RO se clasifican según categoría morfológica en dos formaciones principales: esféricas y tubulares (vesiculares). Las formaciones esféricas son invaginaciones de membrana dentro de orgánulos como el RE, mitocondrias y endolisosomas; y las formaciones tubulares son protuberancias de la membrana que consisten en orgánulos tubulares, de estos los más conocidos son las vesículas de doble membrana perinuclear (DMV), que ocurren tras el apareamiento de membranas con el RE (84).

Posterior al ensamblaje del complejo replicasa-transcriptasa se da la síntesis del ARN subgenómico (ARNm sg). Los DMV favorecen el acercamiento entre membranas, por lo que se cree que conduce a una mezcla entre los lípidos de las bicapas seguida de la fusión de la membrana (85). Estos DMV, en conjunto con las pequeñas esférulas abiertas de doble membrana (DMS) protegen al material genético viral durante la replicación y transcripción del ARNm sg (23), que traducen las proteínas estructurales S,E,M. Estas se insertan en el RE y posteriormente, por vía secretora, al compartimento intermedio del retículo endoplásmico-Golgi (ERGIC), donde los genomas virales encapsulados por N brotan con nuevos viriones maduros. En los procesos de ensamblaje viral y gemación participa de nuevo la proteína E, localizándose en el RE y las membranas del cuerpo de Golgi, y la proteína N desempeña un papel crucial en la formación de los nuevos viriones protegiendo el material genético (83).

La proteína M dirige interacciones proteína-proteína durante el ensamblaje, y en el ERGIC junto a la proteína E promueve la formación de partículas similares a virus (VLP), N mejora esta formación, S incorpora viriones durante la interacción con M y finalmente M y N finalizan el ensamblaje que se transporta a la superficie en vesículas y se libera por exocitosis. El ciclo completo se puede ver en la **Figura 1-7** (37).

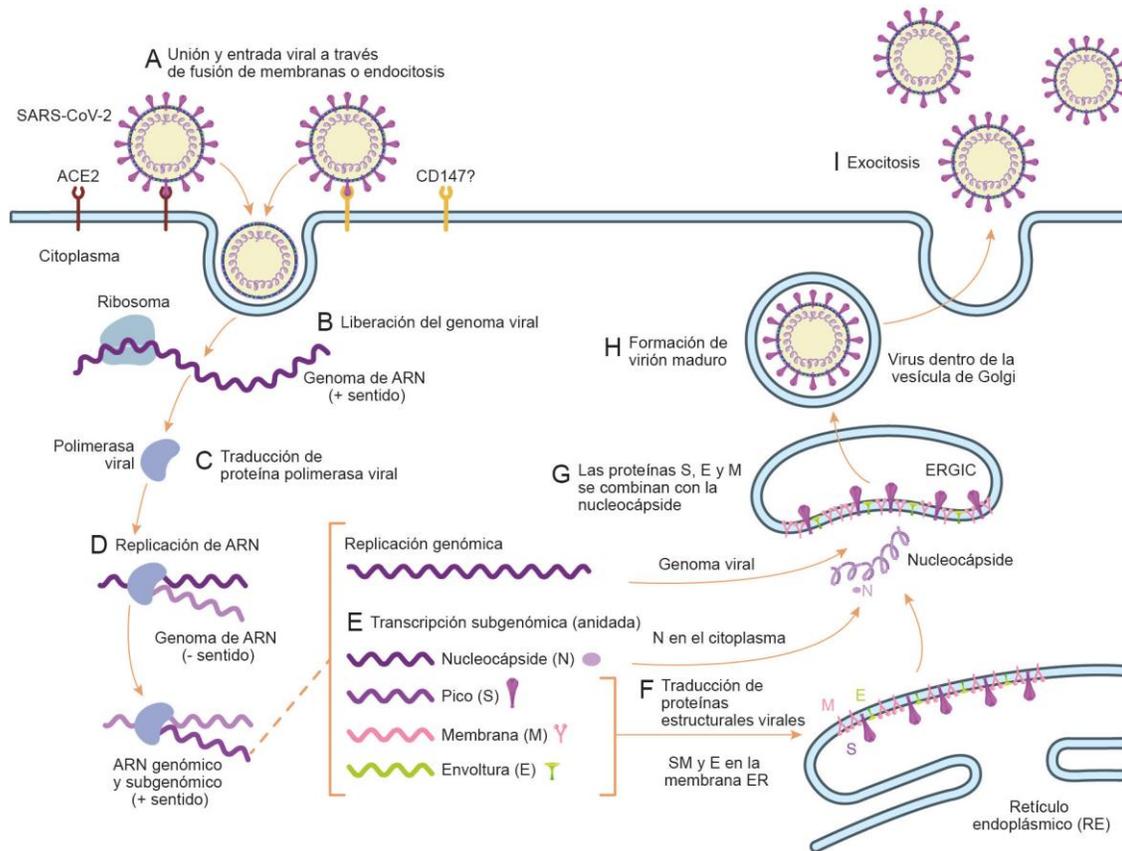
## 1.4 Metabolómica y Lipidómica

Las tecnologías emergentes en el campo de la biología, como la secuenciación de ADN y ARN, la proteómica, la metabolómica y la lipidómica (**Figura 1-8**), pueden medir los niveles de miles de especies moleculares en un corto tiempo y en un solo experimento, permitiendo una mayor comprensión de los sistemas complejos en las células, tejidos u organismos (86).

El metabolismo está relacionado con la energía celular y todos los procesos vitales que esta requiere para su desarrollo, crecimiento, mantenimiento y muerte. Murray y colaboradores, definen las rutas metabólicas como *“La serie de reacciones responsables de la síntesis de un compuesto complejo a partir de uno o más compuestos simples o de la degradación de una sustancia hasta su producto final”* (87), esto hace referencia a dos procesos en el metabolismo: el anabolismo y el catabolismo correspondientemente, mediante estas, un sustrato se transforma en un producto, donde los metabolitos son productos intermedios en estas rutas catalizadas por enzimas. Las biomoléculas principales en la célula son las proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos (88).

**Figura 1-7: Ciclo de vida del SARS-CoV-2.** **A)** Unión de la subunidad S1 de la proteína S al receptor ACE2, expresado en pulmones, arterias, corazón, riñones e intestino. Seguido de la escisión de S2 en S'2 por TMPRSS2, promoviendo la unión de las membranas. **B)** Se da lugar al ingreso y liberación del ARN genómico. **C)** Posteriormente, se traducen los marcos de lectura abiertos, ORF1a y ORF1b que codifican para las poliproteínas pp1a y pp1ab que a su vez se procesan para obtener las nsps. **D)** Se forma el complejo de replicación y transcripción viral, generando ARN a partir de una plantilla negativa. **E)** Se sintetiza ARN subgenómico que codifica las proteínas estructurales. **F)** Las nuevas proteínas estructurales y accesorias recién sintetizadas se insertan en el RE y

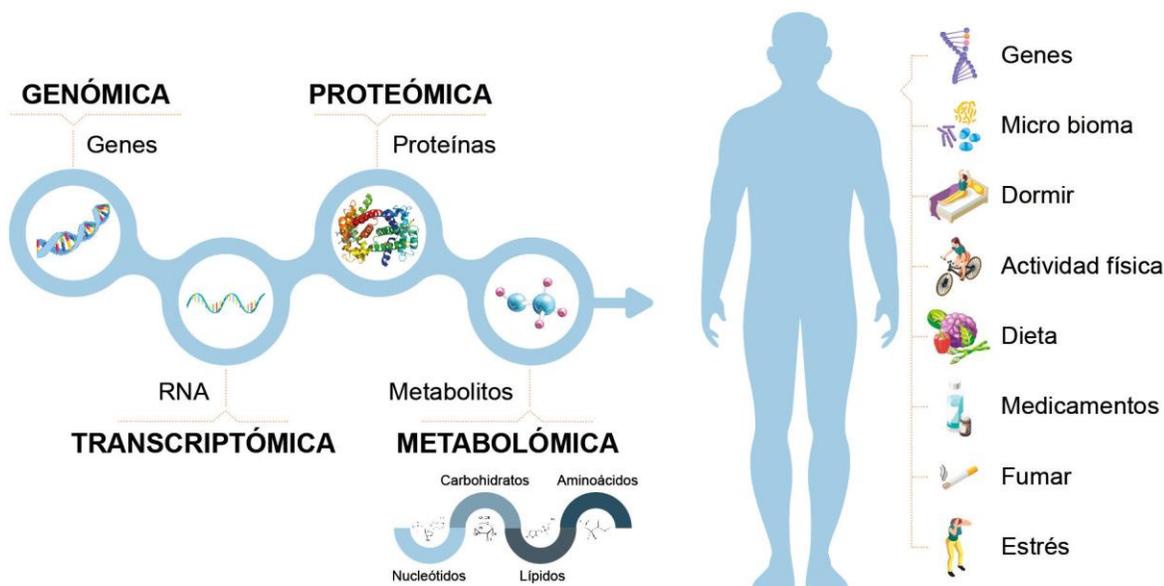
transitan a través del ERGIC. **G)** El ARN genómico y la proteína N se combinan con las proteínas S, E y M. **H)** Se forma un virión. **I)** Finalmente, los viriones son secretados por la célula por exocitosis para repetir el ciclo de infección (23).



Nombre de la fuente: Imagen tomada y modificada de Lebeau y colaboradores (89).

Aunque se había trabajado por años, el término “Metabolómica” se acuñó hasta 1998 por Stephen Oliver, en un artículo de genómica en levaduras (90,91), la cual consiste en el estudio del metaboloma, permitiendo la identificación de biomarcadores y factores pronósticos de diferentes enfermedades (92). Los metabolitos varían dependiendo tanto de factores genéticos como ambientales, son consecuencia o la causa de la modulación de procesos biológicos y fenotípicos al interactuar activamente con todos los demás niveles ‘ómicos’ (93), y están asociados a las funciones celulares esenciales como producción y almacenamiento de energía, transducción de señales, apoptosis, modificaciones postraduccionales e interacción con proteínas plasmáticas, como es el caso de los ácidos grasos y las hormonas (94).

**Figura 1-8: Ciencias ómicas.** El avance en la tecnología y especialmente, en la metabolómica no dirigida, ha permitido comprender a mayor profundidad los procesos patológicos e identificar biomarcadores pronósticos, alteración en vías bioquímicas y objetivos farmacológicos. Los metabolitos, compuestos de las reacciones químicas en las rutas celulares que constituyen el metabolismo, son la base molecular de la vida, estos se clasifican en primarios y secundarios y están asociados al estilo de vida de cada persona.



Nombre de la fuente: Ilustración adaptada del grupo MetCore de la Universidad de los Andes (95).

La metabolómica ha avanzado ampliamente en los últimos 10 años, implementándose tanto en investigación como en el diagnóstico clínico (96), teniendo ventaja sobre algunos métodos, como el enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA) (97), ya que hace posible identificar simultáneamente miles de proteínas, incluyendo las que presentan modificaciones postraduccionales. Los estudios en metabolómica se dividen en estudios dirigidos y no dirigidos, los primeros cuantifican metabolitos conocidos, caracterizados y anotados bioquímicamente, como es el caso de los laboratorios clínicos, y los segundos, permiten analizar un número ilimitado de metabolitos conocidos y desconocidos (94).

En la metabolómica dirigida se usan estándares para realizar análisis cuantitativos o semicuantitativos, valiéndose de la cinética, productos y rutas bioquímicas de enzimas metabólicas (98). Por otro lado, la metabolómica no dirigida, utilizada en el presente

proyecto, permite descubrir metabolitos inherentes a un estado fisiológico (20), las plataformas utilizadas en estos análisis se dividen en los métodos de separación, como son la cromatografía líquida (LC), cromatografía de gases (GC), electroforesis capilar (CE) y métodos de detección como la espectrometría de masas (MS) y la resonancia magnética nuclear (RMN) (20), entre otras.

La Lipidómica, es el estudio y caracterización de los lípidos, mediante esta se puede obtener la composición y abundancia del lipidoma (99), basándose en principios de química analítica y herramientas tecnológicas, como la espectrometría de masas (100). Los lípidos, son compuestos orgánicos insolubles en agua, cumplen funciones de: almacenamiento energético, estructural (fosfolípidos - esteroides), cofactores enzimáticos, transportadores electrónicos, absorción de luz, anclas hidrofóbicas para proteínas, agentes emulsionantes, hormonas, entre otros. Debido a que sus funciones son diversas en los procesos biológicos, su desequilibrio se asocia a diferentes patologías, siendo posible relacionar los lípidos y las vías metabólicas con el inicio y la progresión de una enfermedad (101).

Los lípidos con función de almacenamiento son alrededor del 80 %, y los lípidos estructurales entre el 5-10 %. En la **Figura 1-9** se muestra algunas clases de lípidos (102), de las que se han determinado ocho principales: ácidos grasos (FA), glicerolípidos (GL), glicerofosfolípidos (GP), esfingolípidos (SP), esteroides (ST), lípidos de prenol (PR), sacarolípidos (SL) y policétidos (PK) (103,104). Estas categorías se subdividen en clases de lípidos, lo que crea un reto en el campo de la lipidómica, ya que no hay una base de datos que los contenga a todos, sin embargo, la más completa es LIPID MAPS (LMSD) (105).

**Figura 1-9: Clasificación de los lípidos.** Los lípidos son biomoléculas solubles en solventes no polares, se dividen en ácidos grasos, esteroides, vitaminas lipídicas y



muestra, adquisición, procesamiento y análisis de los datos, seguido de la identificación de metabolitos y la interpretación biológica (95).



### 1.4.1 Diseño experimental y recolección de las muestras

El diseño experimental es la parte más importante de un estudio metabolómico, en primer lugar, se debe abordar la pregunta que se desea responder, recolectar y almacenar las muestras. De igual manera, se debe tener en cuenta el tipo de método analítico que se utilizará, el recipiente en que se recolectará la muestra (si es necesario un aditivo), la identificación de la muestra (108), las réplicas analíticas que se realizarán, blancos, controles negativos y positivos para inferir variaciones analíticas y biológicas, y los controles de calidad (QC), que permiten evaluar la calidad de los datos y el poder estadístico (106,109).

Una vez está claro el diseño del estudio es importante tener las herramientas necesarias para la conservación de las muestras a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , asegurando el mínimo tiempo entre la toma de muestra y su almacenamiento. Las muestras pueden ser biofluidos, tejidos y/o extractos celulares (110), su elección debe estar basada en la hipótesis de estudio, al igual que el tamaño de la muestra y la aleatorización (111), esta última nos permite minimizar la influencia de variables no controladas y posibles errores (112). Los biofluidos más comunes son suero, plasma y orina, que se someten a tratamientos para asegurar la recuperación de la mayoría de analitos, los tratamientos varían dependiendo del tipo de muestra y de la plataforma analítica a usar (113). Este tipo de fluidos son usados generalmente para la identificación de biomarcadores, en cambio, los tejidos y células suelen emplearse para explorar mecanismos asociados a procesos fisiopatológicos (114).

### 1.4.1 Tratamiento de las muestras

Cuando se trabaja con RMN, es posible realizar la medición directa de las muestras, tanto de líquidos como sólidos; sin embargo, en plataformas como GC/MS y LC/MS se requiere un tratamiento previo al análisis (115), el cual depende de la matriz que se esté estudiando, la más sencilla es la orina debido a su estado líquido, y las más complejas son los tejidos (108,116). Las muestras deben descongelarse en hielo, homogeneizarse y posteriormente eliminar compuestos de alto peso molecular (117). Los tratamientos más comunes son la extracción de metabolitos y la precipitación de proteínas con solventes (113), usando metanol enfriado, etanol, isopropanol, cloroformo o acetonitrilo, solos, combinados o con agua, en una proporción al menos de 1:3 muestra/solvente (117).

En sangre, suero o plasma se suele agregar cloroformo/metanol deuterado en una relación 1:1 y posteriormente se realiza centrifugación para obtener dos fases: acuosa (MeOH) y lipídica (CHCl<sub>3</sub>) para el análisis mediante las plataformas RMN o LC/MS, o también no deuterados para LC/MS, GC/MS o CE/MS. En la primera fase, acuosa, se obtienen ácidos orgánicos hidrosolubles, azúcares, ácidos biliares, entre otros, y en la segunda fase, lípidos y vitaminas como A, D, E y K. En el caso de muestras como orina, se pueden centrifugar a 12.000 gravedades por 4 °C durante 10 minutos y mediante la adición de metanol a -20 °C se consigue la eliminación de las proteínas más grandes (108). *Jiye y colaboradores*, determinaron que el uso de 900 µL de metanol y agua (8:1 v/v) es ideal para la extracción de compuestos de bajo peso molecular para GC/MS (118), lo que la hace eficaz, sensible y reproducible (119).

Otro tipo de tratamiento en las muestras es la ionización, debido a que la MS determina la masa de iones (120), además, para mejorar el rendimiento se utiliza la derivatización, que consiste en la modificación de la estructura química de los analitos que en algunos casos mejora tanto la estabilidad y la selectividad en LC, HPLC (121,122) y GC, en esta última se usa para promover la volatilidad (123)(124). Los procesos de derivatización más comunes son la oximación y la sililación. En la primera, se emplea generalmente clorhidrato de O-metoxiamina en piridina, y se busca proteger los grupos funcionales cetónicos del tautomerismo y la descarboxilación del cetoenol e inhibir la formación de anillos de azúcares reductores. En la segunda, la sililación, se emplea N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA), N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) o N-

terc-butildimetilsilil-Nmetiltrifluoroacetamida (MBDSTFA), con o sin un catalizador como trimetilclorosilano (TMCS) al 1 % (118), para aumentar la volatilidad del compuesto reemplazando el hidrógeno activo con un grupo alquilsililo, generalmente tres-metilsililato (TMS) (117), y aumenta la volatilidad de los metabolitos (125).

En LC/MS es necesario una desproteínización de la muestra, para el análisis de los compuestos hidrófilos se puede añadir metanol frío en un volumen de 3:1 de plasma o suero, y en el caso de los compuestos hidrófobos, una mezcla de metanol y éter metil tert-butílico (MTBE) (126), y posteriormente se precipitan por centrifugación.

## 1.4.2 Adquisición de datos

El procesamiento de las muestras se puede realizar por una o varias plataformas analíticas, como se mencionó previamente, permiten la separación, caracterización y detección de los metabolitos. Las técnicas más utilizadas son RMN y MS, esta última puede estar acoplada a LC, GC, CE y/o movilidad de iones para el proceso de separación, o pueden estar basadas sin separación mediante infusión directa, ionización por desorción láser asistida por matriz, imágenes o análisis directo en tiempo real (DART).

La MS, se ha convertido en una de las plataformas más importantes en el estudio de las ciencias, ampliando su área de aplicación en investigación biológica, estudios clínicos, descubrimiento de fármacos, ciencia forense y las ciencias ambientales (127,128). Hoy en día permite el estudio de lipidómica (104), proteómica (129,130), metabolómica e incluso imágenes de tejidos (131,132). La MS permite medir la relación masa – carga ( $m/z$ ) y la abundancia de iones en las muestras de estudio, determinando pesos moleculares, estructura y propiedades químicas de cada una. Utiliza técnicas de ionización suave como el electrospray (ESI) (133), la desorción / ionización láser asistida por matriz (MALDI) (134,135), la Ionización química a presión atmosférica (APCI) o la fotoionización a presión atmosférica (APPI). ESI fue desarrollada por John Bennett Fenn, esta permite la identificación de analitos con polaridad media como xenobióticos y péptidos, siendo además empleada de manera habitual en Lipidómica (136).

El espectrómetro de masas se compone por una fuente de ionización, un analizador de masas, y un sistema de detección de iones. En el primero, las moléculas se mueven entre

campos eléctricos y magnéticos como iones en fase gaseosa y se cargan positiva o negativamente. Posteriormente, los iones se separan en el analizador, donde el espectrómetro mide las señales del ion, hay 4 tipos de analizadores: Cuadrupolo simple (SQ), Triple cuadrupolo (QQQ), Tiempo de vuelo (TOF) y Tiempo de iones (IT). Finalmente, los iones son detectados.

### ▪ Método basado en separación

La cromatografía permite la separación e identificación de componentes en una mezcla, mediante una fase móvil (líquida o gaseosa) que fluye a través de una fase estacionaria, que puede ser en columna o plana. Las plataformas más utilizadas son la GC/MS y LC/MS (137). La GC/MS permite la identificación de moléculas pequeñas, menores de 650 Da, al tener una alta sensibilidad y reproducibilidad (138). Sin embargo, la muestra debe ser volátil y térmicamente estable, por lo que los metabolitos que no cumplen estas condiciones deben pasar primero por una derivatización química en sus grupos funcionales polares. En el caso de las muestras de plasma, estas se extraen con etanol, acetonitrilo o metanol, y el sobrenadante se derivatiza (139). Posteriormente, son inyectados en la columna, donde los componentes fluyen en la fase móvil, la fase móvil es un gas inerte que no interactúa con los analitos de la muestra (140) (141).

En la Cromatografía líquida, la fase móvil es un líquido que no requiere que sea volátil como en la GC, la técnica más utilizada es la Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, por sus siglas en inglés *High Performance Liquid Chromatography*), la fase móvil pasa a través de la fase estacionaria dentro de en columna mediante bombeo, los compuestos (analitos) son retenidos de forma diferencial según la interacción física o química con la fase estacionaria. Se han diseñado varios tipos de HPLC, como son de reparto, de adsorción, iónica y de exclusión por tamaños, explicados en la **Tabla 1-3** (142). Además, según la polaridad de la fase, pueden ser de tipo reverso: donde la fase estacionaria es no polar y la móvil es polar, o de tipo normal, con recubrimiento polar.

**Tabla 1-3: Tipos de HPLC.** La cromatografía líquida de alta eficacia permite separar los componentes de una mezcla según los tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.

TIPOS DE HPLC	INTERACCIÓN QUÍMICA	DESCRIPCIÓN
Reparto	Líquido – Líquido	La fase estacionaria se retiene mediante adsorción física al soporte.
	Fases enlazadas químicamente	La fase estacionaria se retiene químicamente mediante sílice.
Adsorción	Líquido – Sólido	Competencia por los analitos neutrales entre la fase móvil y la fase estacionaria.
Iónica	Iones	Mediante resinas de intercambio iónico.
Exclusión por tamaños	Partículas poliméricas o de sílice que permiten difundir el soluto del disolvente.	Filtración en gel con disolventes acuosos – Hidrofílico.
		Gel permeable, con disolventes no polares – Hidrofóbico.

Nombre de la fuente: Cromatografía de líquidos de alta resolución - Gomis Yagües, Vicente. 2008 (142)

La cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC, *Hydrophilic interaction chromatography*), es un método de HPLC que permite la separación de compuestos polares. Su nombre fue propuesto en 1990 por Alpert, sin embargo, las publicaciones se han hecho mayores desde 2003 (143). Utiliza perlas hidrofílicas en la fase estacionaria, como sílice, amino o ciano, y se eluye con un gradiente de solvente orgánico polar miscible en agua, como el acetonitrilo, en la fase móvil (21,143), reteniendo por mayor tiempo los compuestos hidrofílicos a los hidrofóbicos (144). Se emplea para la identificación de fármacos polares, metabolitos y compuestos de importancia biológica (127,145).

La cromatografía líquida de fase reversa (RPLC por sus siglas en inglés *Reverse Phase Liquid Chromatography*) proporciona una amplia selectividad, realizando la elución en gradiente con contenidos altamente acuosos y orgánicos, sin embargo, no retiene

fácilmente compuestos polares e iónicos. Y la cromatografía de fluidos supercríticos (SFC, *Supercritical Fluid Chromatography*), que es una combinación entre la GC y la HPLC, ideal tanto para compuestos polares como no polares, y más amigable con el medio ambiente, utiliza fluidos supercríticos, por lo general CO<sub>2</sub> (31,1 °C y 7,38 MPa), como fase móvil (146).

Otras técnicas son la electroforesis capilar (CE, *Capillary electrophoresis*) y la espectrometría de masas con movilidad de iones (IM-MS, *Ion Mobility Spectrometry*). En la primera, los iones viajan a través de un flujo electroforético en un calibre de sílice con un diámetro angosto ( 10-200 µm) (147), y en la segunda, en fase gaseosa separa los iones mediante un tubo de deriva en un campo eléctrico, en función de tamaño, forma, carga y masa (148).

### ▪ **Método sin separación**

La espectrometría de masas por infusión directa (DI-MS, *Direct infusion Mass Spectrometry*), permite la inyección de la muestra mediante ionización continua, sin separación cromatográfica previa, por lo que se obtienen resultados en menor tiempo, y es muy útil en lipidómica, cuantificación de proteínas, y metabolómica dirigida (149)(150), sin embargo, cuenta con desventajas como la supresión de iones y la dificultad para separar compuestos isoméricos

Otra técnica de ionización suave es la Espectrometría de masas de ionización/desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF, *Matrix-assisted laser desorption/ionization*), utiliza muy poca cantidad de muestra que se ubica sobre una placa de metal, se evapora con solvente y se somete a pulsos de láser, cargando la muestra con H<sup>+</sup>. Permite el análisis de macromoléculas con poca fragmentación, es de alto rendimiento y bajo costo de reactivos (151).

Imágenes de espectrometría de masas (MSI, *Mass spectrometry imaging*), es una técnica para estudios no dirigidos que permite detectar metabolitos *in situ*, se usa generalmente con muestras de tejidos. En este proceso, se recorre la muestra para obtener la distribución de las moléculas, generando un espectro de masas que posteriormente se analiza en un software que permite seleccionar de manera individual la relación e intensidad de

masa/carga para cada metabolito, que se interpreta en píxeles para finalmente reconstruir una imagen (128,132).

Finalmente, el análisis directo en tiempo real (DART, *Direct analysis in real time*), con el que se puede estudiar sólidos, líquidos y gases a presión atmosférica, sin preparación previa de las muestras. Las moléculas se excitan electrónicamente o por vibración a partir de gases como helio, argón o nitrógeno (152). Siendo una técnica rápida y sensible ampliamente usada en ambiental y medicina forense (153).

### ▪ **Resonancia Magnética Nuclear (RMN)**

La RMN es una técnica ampliamente utilizada en la metabolómica, adecuada para estudiar tejidos, muestras sólidas y semisólidas, sin embargo, tiene baja sensibilidad en comparación con la MS (154), las diferencias se pueden observar en la **Tabla 1-4**. Entre las ventajas de esta técnica, destaca su reproducibilidad, por lo que los procesos se pueden estandarizar fácilmente, además, los isómeros generan diferentes espectros que permiten un mejor estudio de las estructuras químicas (155), puede detectar metabolitos a través de uno o más tipos de núcleos atómicos y no es necesario un tratamiento previo de la muestra (156).

Esta técnica, permite el estudio de núcleos atómicos con un número impar de protones o neutrones magnéticamente activos a partir del espín. La muestra se ubica en un campo magnético, en el que los núcleos con espín positivo se orientan en dirección hacia el campo, con un estado de mínima energía (estado de espín  $\alpha$ ), mientras que los núcleos con espín negativo se orientan en dirección opuesta a la del campo magnético (estado de espín  $\beta$ ). En el campo, los núcleos en estado de espín  $\alpha$  cambian momentáneamente a  $\beta$  y regresan a su posición emitiendo una diferencia de energía, la cual es detectada, registrada y graficada por el espectrómetro de RMN en un espectro (157). Además, la técnica permite la cuantificación de los metabolitos mediante un estándar interno único (156).

El flujo de trabajo consiste en la preparación de muestras, seguido de la adquisición y el procesamiento espectral, deconvolución y finalmente la Interpretación de datos, bien sea para diseño de modelos computacionales o estudio de biomarcadores, siendo este último

el paso más complejo, debido a la escases de librerías para RMN (158). Con los datos obtenidos del espectro se realiza una interpolación para excluir regiones no relacionadas con el estudio, posteriormente, se detectan los puntos aislados mediante análisis estadísticos y corrección de la línea de base.

La RMN hace más sencillo el procesamiento de las muestras, no requiere el uso de cromatografía, proporciona, además de los estudios de biomarcadores, perfiles de subclases de lipoproteínas, cuantificación de ácidos grasos circulantes, aminoácidos, metabolitos relacionados con la gluconeogénesis, entre otras. Estas propiedades la han llevado a ser valiosa en los estudios de enfermedades, epidemiológicos, fármacos y biología vegetal (123,159–163).

**Tabla 1-4: Diferencias entre RMN y MS.** (164) Diferencias entre RMN y MS según características como su sensibilidad, calidad y costo.

	Resonancia magnética nuclear (RMN)	Espectrometría de masas (MS)
Sensibilidad	Bajo	Alto
Reproducibilidad	Muy alto	Promedio
Selectividad	Análisis no selectivo.	Análisis electivo y no selectivo.
Número de metabolitos detectables	30 - 100	300 – 1000 (Dependiendo del tipo de cromatografía)
Preparación de la muestra	Mínima	Compleja

Extracción de tejido	No necesario	Requiere extracción
Tiempo de análisis de la muestra	Rápido	Extenso
Costo del instrumento	Costoso	Económico
Robustez de instrumento	Alta	Baja
Costo de muestra	Bajo costo	Alto costo
Cantidad de la muestra	Alta	Baja
Recuperación de la muestra	No destructivo	Destructivo

Nombre de la fuente: EMBL-EBI. Comparison of NMR and MS | Metabolomics.

### 1.4.3 Tratamiento de datos

El procesamiento de datos permite obtener la información biológica relevante, estos datos se organizan en una matriz anotada de las características obtenidas (Picos de señal del cromatograma) junto a abundancias relativas para cada muestra. El flujo general de procesamiento de los datos se puede observar en la **Figura 1-11**. Sin embargo, el análisis de los datos implica una reducción de los mismos durante la selección de los metabolitos más significativos, dejando por fuera una gran cantidad de información que se hace compleja de analizar de manera manual (165).

El preprocesamiento de los datos se compone de: análisis de las características, selección de picos, filtración del ruido sistemático o aleatorio, y el alineamiento de los datos. Además,

se realiza una deconvolución, mediante un algoritmo matemático que determina el peso molecular real de  $m/z$ . Cada uno de los picos cromatográficos posee un tiempo de retención (RT), un área bajo la curva (AUC, *Area Under the Curve*), y espectros de masa, estos permiten determinar la identidad de cada metabolito. Entre los tipos de software más utilizados se encuentran: XCMS, MZmine2, MetaboAnalyst y MS-DIAL (*Mass Spectrometry-Data Independent Analysis*), este último permite la deconvolución de los datos. Luego, estos metabolitos se identifican en bases de datos o librerías espectrales, las más conocidas son *Human Metabolome Database* (HMDB), METLIN, *LipidMaps*, *LipidBlast*, *Massbank*, *GMD*, *National Institute of Standards and Technology* (NIST), GNSP, etc (166). Algunos softwares, como FingerID, MAGMa y MEtFrag, permiten realizar una búsqueda simultánea en diferentes bases de datos.

En el post-procesamiento de los datos, que encierra la imputación, normalización, centrado, escalado, transformación y finalmente el filtrado de datos (Por presencia, importancia y variabilidad) (167), se obtienen finalmente los metabolitos biológicamente relevantes para el estudio. La imputación permite reemplazar datos faltantes, que están por debajo del límite de detección, con sustitutos. La normalización, reduce la variación sistemática del proceso, filtrando la variación biológica. El centrado lleva los datos a fluctuar alrededor de cero y no sobre su media, que luego se ajusta mediante la escala en diferencias de concentración. La transformación ajusta los valores en una distribución normal, convirtiéndolos en datos no lineales de tipo logarítmico o de potencia, que favorecen la corrección de la heteroscedasticidad. La filtración según la significancia se lleva a cabo mediante análisis estadísticos univariantes (UVA) y multivariantes (MVA). Según el diseño experimental, se pueden incluir controles que permiten un mejor filtrado, que genera datos más reproducibles y sólidos, estos controles se forman mediante la combinación de las muestras de estudio en partes iguales.

**Figura 1-11. Flujo de trabajo de procesamiento de datos.** Se realiza una revisión de cromatogramas, seguido por deconvolución, alineamiento, integración de iones objetivo y finalmente una filtración de datos.



### 1.4.4 Análisis de los datos

Para definir diferencias significativas entre conjuntos de metabolomas del estudio, se emplea métodos de análisis univariado o multivariado (MVA). El análisis univariado consiste en estudiar cada variable por separado, las técnicas más utilizadas en análisis univariados son: distribución de frecuencias, y análisis de medidas de tendencia central de la variable (168,169). En cambio, el análisis multivariado permite el estudio de todas las variables al tiempo, un ejemplo son el análisis de componentes principales (PCA) y el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA). Los modelos de PCA y PLS-DA grafican cada espectro en un gráfico de puntos, permitiendo ver la distribución, agrupamiento y variabilidad entre los metabolitos (123,170,171). Otra herramienta utilizada junto a PCA, son los diagramas de árbol, que permiten ver de mejor manera la similitud o diferencia entre grandes grupos de estudio (172).

### 1.4.5 Identificación de metabolitos

La identificación de metabolitos permite poner los datos en un contexto biológico, por lo que se han descrito cuatro niveles de confianza para la correcta identificación de metabolitos (173):

1. Compuestos identificados
2. Compuestos supuestamente anotados, sin estándares de referencia químicos, que se determinaron basándose en propiedades fisicoquímicas y/o similitud espectral con librerías.
3. Clases de compuestos putativamente caracterizados, basados en características de una clase química concreta.
4. Compuestos desconocidos, no se identifican o clasifican, pero se pueden diferenciar y cuantificar en función de los datos espectrales.

En el caso de datos obtenidos por LC/MS, la identificación implica tres pasos generales: anotación putativa, análisis MS/MS y confirmación del estándar, que en el caso de los compuestos desconocidos debe coincidir, al igual que los fragmentos obtenidos y la correlación con las intensidades (106,174). Este proceso se realiza apoyándose en bases de datos como METLIN o KEEG, entre otros.

### 1.4.6 Interpretación biológica

La interpretación biológica es la integración de lo obtenido con la información biológica, para un análisis funcional (169), lo que permite reconocer en que procesos bioquímicos participa cada uno de los metabolitos y su papel en las consecuencias fenotípicas y fisiológicas. Se conocen dos tipos de software que permiten trabajar en la interpretación de los datos, los primeros permiten mapeos y visualizaciones de los metabolitos en representaciones gráficas de las vías bioquímicas, y el segundo realiza análisis de enriquecimiento, que consiste en análisis estadísticos de anotaciones de metabolitos (170).

Una forma de realizar la interpretación de los datos es mediante el uso de la Biología de sistemas, que se ha descrito en los últimos años (171). Como ejemplo de estas herramientas tenemos a *Metabolome Searcher* (172), que contribuye en la búsqueda de los metabolitos directamente en bases de datos, *MetaMapp*, que permite la visualización en gráficos de red en *Cytoscape*, y resalta las alteraciones metabólicas que pueden estar asociadas con los metabolitos de estudio (173), y *MetaboAnalyst*, que cuenta con herramientas en línea para el análisis e interpretación de los datos (175).

## 2.Estado del arte

### 2.1 Metabolómica en COVID 19

El estudio de las biomoléculas como ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y metabolitos, proporciona información sobre el panorama molecular de diversas enfermedades, facilitando la comprensión de los factores asociados a sus complicaciones clínicas. Al momento, se han realizado diversos estudios asociados a COVID-19, demostrando la importancia de la metabolómica y lipidómica no solo como aportes al conocimiento, sino con miras a la predicción del curso de la enfermedad es decir en la búsqueda de factores pronósticos que permitirían prevención y tratamiento.

*Thomas* y colaboradores en junio del 2020, realizaron metabolómica dirigida mediante UHPLC/MS en sueros en pacientes estratificados por sus niveles circulantes de interleucina-6 (IL-6). La muestra comprendió de 49 sujetos, 16 controles y 33 pacientes COVID-19 positivos (5 con niveles bajos, 10 con niveles medios y 18 con niveles altos de IL-6) Encontrando valores disminuidos de acilcarnitinas de cadena corta y media, aumento en todos los NEFA (excepto el ácido nonanoico) y metabolismo alterado del triptófano en la vía quinurenina, importante en el proceso de inflamación e inmunidad, asociado a los niveles de IL-6. Concluyendo que el metabolismo de los aminoácidos y los ácidos grasos podrían ser marcadores de la gravedad clínica y posibles dianas terapéuticas. (176)

Por otro lado, *Shen* y colaboradores julio del 2020, estudiaron perfiles metabolómicos y proteómicos de 53 controles y 65 pacientes con COVID-19, 37 de ellos en estado no grave y 28 graves. Usaron un método basado en el entrenamiento de un modelo de aprendizaje

automático que posteriormente se validó con ensayos de proteómica y metabólica dirigidos. Reportaron la regulación negativa de más de 100 lípidos, principalmente esfingolípidos, glicerofosfolípidos y ácidos grasos, elevación de productos de degradación de la glucosa, glucuronato y bilirrubina, lo que se relacionó con un posible daño hepático asociado a la disminución de la función de desintoxicación, y correlacionado a la linfopenia, PCR y AST elevadas, y trombocitopenia. (177)

*Wu* y colaboradores en julio del 2020, utilizaron muestras seriadas durante el curso de la enfermedad en un total de 34 pacientes, 9 con un resultado fatal, 11 con síntomas severos y 14 con síntomas leves (126), identificaron y cuantificaron 431 metabolitos y 698 lípidos, evidenciando alteraciones dramáticas en el plasma de pacientes con COVID-19, incluyendo la regulación negativa de carbamoil fosfato del ciclo de la urea, el ácido málico del ciclo del TCA y el glicerol 3-fosfato. También observaron cambios significativos en la producción de monofosfato de guanosina (GMP) mediada por GMP sintasa y las enzimas inmunomoduladoras CD39 y CD73, que se asoció a la progresión de la enfermedad por la disfunción inmunológica y las alteraciones en el metabolismo. (178).

*Song* y colaboradores en agosto del 2020 (179), realizaron una combinación de MS/MS dirigida y no dirigida para lipidoma y el metaboloma plasmático a 76 sujetos, de los cuales 26 fueron controles y 50 pacientes COVID-19 (18 leves, 19 moderado y 13 graves), observando aumento en esfingolípidos como SM d18: 1/18:1 y GM3 d18:1/25:0, en los lisofosfolípidos, incluido el ácido lisofosfatídico 18:1 y la lisofosfatidilcolina 18:1 y reducción en los lípidos neutros, incluyendo el TAG 48 de cadena media: 1 (18:0), TAG de cadena larga 60:3 (18:1) y DAG 34:1 (16:1/18:0). Además, usando exosomas aislados de la misma cohorte, mostraron que los exosomas de los pacientes COVID-19 presentan niveles elevados de GM3 asociado a la gravedad y correlacionado negativamente el recuento de células T y T-CD4+.

*Blasco* y colaboradores, en diciembre del 2020, realizaron un estudio utilizando un abordaje metabólico en 55 pacientes SARS-CoV-2 positivos (180) y 45 controles con muestras de plasma, tomadas el día del diagnóstico y a los días 7 y 15 de evolución de la enfermedad. Reportaron un rol importante de la microbiota intestinal en la regulación de la vía triptófano-nicotinamida asociada a procesos inflamatorios relacionados con la vía del

triptófano-quinurenina y la activación de la vía mTOR. Estos hallazgos complementan la investigación de Shen y colaboradores, (177) y Thomas y colaboradores, (176) quienes reportaron previamente la activación de la vía quinurenina en pacientes COVID-19, sugiriendo que el NAD sintetizado a partir del triptófano modula la actividad de los macrófagos, como la liberación de IL-6 y TNF $\alpha$ .

Además, encontraron un aumento significativo en los niveles plasmáticos de citosina en pacientes COVID-19, que sugiere que el virus usa en menor proporción esta base en la síntesis de nucleótidos y por lo tanto la citosina es liberada por lisis celular. Así mismo, hallaron una relación entre el metabolismo de arginina y prolina (incluyendo productos finales: poliamina y espermidina) y la evolución clínica de la enfermedad, lo que se relacionó con protección frente al estrés oxidativo e inducción de la autofagia. (180)

*Bruzzone* y colaboradores, en octubre del 2020 (181), estudiaron las alteraciones en lípidos y el metabolismo por RMN. Utilizaron una cohorte de 263 pacientes sintomáticos positivos para SARS-CoV-2 y 280 controles de pacientes recolectados antes de la pandemia por COVID-19. Observaron un reordenamiento de las lipoproteínas asociado a la enfermedad tanto del tamaño como la composición asociado a un mayor riesgo aterosclerótico, aumento de cuerpos cetónicos, incluyendo el ácido acetoacético, ácido 3-hidroxiibutírico, acetona, y ácido 2-hidroxiibutírico, acumulación sérica de triglicéridos (TG), TG-VLDL (VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad), TG-IDL (IDL, lipoproteínas de densidad intermedia), TG-LDL (LDL, lipoproteínas de baja densidad) y TG-HDL (HDL, lipoproteínas de alta densidad), y disminución de colesterol total (TC), TC-LDL y TC-HDL. Teniendo como consecuencia la disminución de la capacidad hepática para oxidar acetil-CoA derivada de la oxidación de ácidos grasos, determinando por tanto la relación entre la enfermedad y el daño hepático asociado a estrés oxidativo y dislipidemia, previamente señalado por otros autores.

Las concentraciones reducidas de colesterol total en HDL y LDL se establecieron por *Hu* y colaboradores en noviembre del 2020 (182), quienes publicaron un estudio retrospectivo realizado con datos clínicos de 114 pacientes y 80 controles sanos, así como el monitoreo de un paciente grave desde la etapa inicial de la infección hasta el período de recuperación (80 días) con el perfil de lípidos séricos, el ácido nucleico COVID-19 y la tomografía computarizada de tórax, en el cual el colesterol HDL se correlacionó negativamente con la

proteína C reactiva (PCR) y positivamente con los linfocitos, durante el periodo de la enfermedad.

Barberis y colaboradores en noviembre del 2020 (183) realizaron un análisis lipídico y metabólico no dirigido, con muestras de plasma de 161 sujetos, de los cuales 103 fueron SARS-CoV2 positivos (19 críticos y 84 no críticos), y 32 fueron SARS-CoV-2 negativos con síntomas similares (neumonía y/o insuficiencia respiratoria, 20 no críticos y 12 críticos) y 26 controles saludables. En este, correlacionaron los valores de triglicéridos y ácidos grasos libres, especialmente ácido araquidónico y ácido oleico, con la gravedad de la enfermedad, al igual que activación de la gluconeogénesis, el metabolismo de las porfirina, las alteración en lípidos y la alteración de la biosíntesis de fenilalanina, tirosina y triptófano, el metabolismo de fenilalanina, degradación de aminoacil-tRNA, metabolismo del ácido araquidónico y ciclo del ácido tricarboxílico (TCA). Adicionalmente, establecieron como biomarcadores potenciales algunos lípidos circulantes, como fosfatidilcolina 14:0\_22:6, fosfatidilcolina 16:1\_22:6 y fosfatidiletanolamina 18:1\_20:4, que se encontraban disminuidos, y como posible diana terapéutica la fosfolipasa A2 (PLA2) como un potencial factor clave en la patogénesis de COVID-19.

*Schwarz* y colaboradore, en enero del 2021 (184), asociaron la desregulación de los lípidos inmunorreguladores (LM), incluyendo los PUFA y varios proinflamatorios, con la gravedad de la enfermedad en pacientes con COVID moderado y grave del Hospital de Yale-New Haven, Connecticut, Estados Unidos. Estudiaron el suero de 19 pacientes saludables, 18 pacientes COVID-19 moderados (Hospitalizados que no requirieron ingresar a UCI) y 20 pacientes severos que entraron a UCI. Encontrando que los pacientes moderados presentan niveles elevados de LM con actividad ciclooxigenasa (COX), EPA de ALOX12, y resolvina E3 (RvE3). En pacientes severos reportaron el aumento en PUFA libres, un desequilibrio de LM relacionados con la progresión de la enfermedad y mayor actividad de las enzimas ALOX5 y citocromo P450.

Overmyer y colaboradores en enero del 2021 (185), mapearon 219 características moleculares relacionadas con el estado y la gravedad de la COVID-19, mediante RNA-seq y espectrometría de masas de alta resolución en 102 pacientes positivos (41 en UCI y 51 no UCI) y 26 controles (10 UCI y 16 no UCI) del Albany Medical Center – NY. Observaron

---

moléculas relacionadas con procesos de dislipidemia, activación de neutrófilos e intervención en el proceso de la coagulación, principalmente del citrato, el plasmenil-PC y la gelsolina plasmática (pGSN) que covarían y se reducen con la gravedad de la enfermedad.

En marzo del 2021, Danlos y colaboradores (186), encontraron al menos 77 metabolitos entre aminoácidos, lípidos, poliaminas, y azúcares, que revelaron cambios asociados al estado de la enfermedad, en casos leves, moderados y graves. El ácido antranílico, producto de la vía de la quinurenina, fue elevado en pacientes críticos en comparación con pacientes moderados y leves, y correlacionaron positivamente con los niveles de IL-10 e IL-18, lo que se asocia con una evolución desfavorable de la enfermedad, por lo que fue propuesto como un biomarcador para el pronóstico de la evolución de COVID-19.



## **3. Pregunta de investigación y objetivos**

### **3.1 Pregunta de investigación**

Los coronavirus se han convertido en agentes infecciosos importantes a través de la historia, algunos de los cuales han emergido en las últimas décadas mostrando alta infectividad y letalidad, siendo el caso reciente del SARS-CoV-2 que causó la pandemia de la COVID-19. Uno de los mayores problemas de la enfermedad, es que ésta se caracteriza por presentar una prognosis heterogénea con una baja predictibilidad y elevada mortalidad. Adicionalmente, la generación de nuevas variantes sugiere que continuarán siendo la causa de enfermedades respiratorias, por lo cual, identificar alteraciones metabólicas relacionadas con la evolución clínica permitiría comprender los mecanismos moleculares y fisiopatológicos que estarían involucrados en el espectro clínico de estas enfermedades y sus futuros brotes. Por lo tanto, se planteó el proyecto de investigación, “ESTUDIO DE FACTORES PRONÓSTICOS DE INGRESO A UNIDAD DE CUIDADO INTENSIVO Y MORTALIDAD A TRAVÉS DE PERFILES METABOLÓMICOS EN SUJETOS POSITIVOS PARA SARS-CoV-2 EN UNA POBLACIÓN BOGOTANA” con el fin de registrar los cambios metabólicos en un grupo de pacientes positivos para SARS-CoV-2 en diferentes estados clínicos, para determinar potenciales marcadores de la evolución de la enfermedad severa de la COVID-19.

### **3.2 Objetivo general**

Evaluar la relación entre el espectro clínico de la COVID 19 y los cambios en el metaboloma del plasma sanguíneo de sujetos positivos para SARS-CoV-2 en una población bogotana.

#### **3.2.1 Objetivos específicos**

- Categorizar los especímenes biológicos de sujetos en diferentes estados de la COVID-19 en una población bogotana.

- Analizar los cambios en el perfil metabólico de sujetos con COVID-19 en diferentes estados de la enfermedad.
- Identificar los metabolitos asociados a los diferentes estados de la COVID-19.

## 4. Metodología

### 4.1 Caracterización de los sujetos de estudio

Se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia en el Biorepositorio Unisanitas, donde se estudiaron 100 individuos mayores de 18 años, de ambos sexos, residentes de la ciudad de Bogotá-Colombia. Se conformaron 4 grupos experimentales de acuerdo con las manifestaciones clínicas reportadas en las bases de datos internacionales (187), como se puede observar en la **Figura 4-12**.

**Grupo control:** muestras de sujetos con resultados negativos para SARS-CoV-2 por RT-PCR, sin síntomas relacionados.

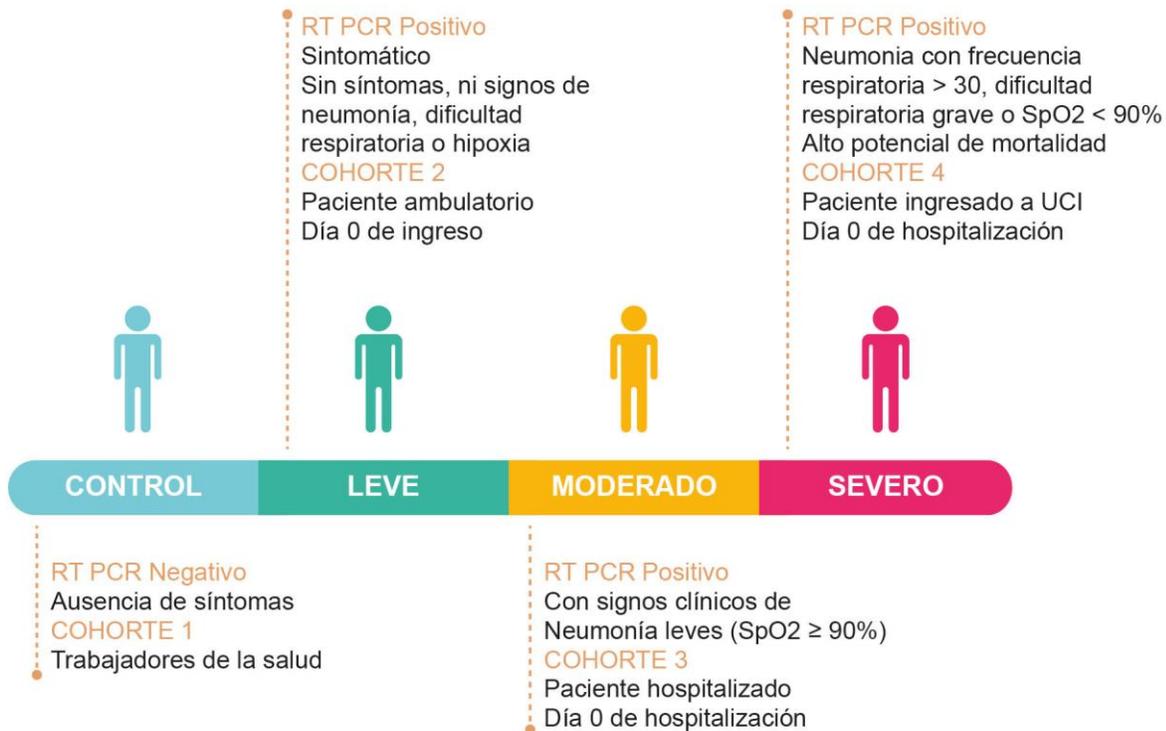
**Grupo leve:** pacientes que ingresaron a urgencias, con prueba RT-PCR positiva y síntomas como: fiebre, tos, anorexia, astenia, adinamia, mialgias, cefaleas, faringitis, dolor de garganta, diarrea, náuseas, vómitos, anosmia, ageusia, pero que no presentaron síntomas y signos de neumonía, dificultad respiratoria o hipoxia.

**Grupo moderado:** pacientes hospitalizados que no requirieron traslado a UCI, confirmados por PCR positiva, sin evidencia de marcadores de dificultad respiratoria aguda severa, Frecuencia respiratoria (FR) menor a 30 y saturación de oxígeno (SpO<sub>2</sub>) mayor a 90 % con flujos de oxígeno menor o igual a 3 min, y signos clínicos de neumonía (fiebre, tos, disnea, taquipnea) pero sin signos de neumonía grave (SpO<sub>2</sub> ≥ 90 %, con aire ambiente).

**Grupo severo:** pacientes inicialmente hospitalizados que posteriormente llegaron a UCI y que requirieron ventilación mecánica invasiva o no invasiva, confirmados por PCR positiva, con signos clínicos de neumonía (fiebre, tos, disnea, taquipnea) más alguno de los siguientes: FR > 30 respiraciones por minuto, dificultad respiratoria grave o SpO<sub>2</sub> < 90% con aire ambiente, el cual podría evolucionar a un síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), septicemia,

choque séptico y otras complicaciones agudas con alto potencial de mortalidad (embolia pulmonar aguda, síndrome coronario agudo, accidente cerebrovascular, entre otros).

**Figura 4-12: Grupos de estudio.** Se establecieron 4 grupos de estudio divididos según severidad de la enfermedad en grupo control (azul claro), leve (azul oscuro), moderado (amarillo) y severo (Fucsia). Se puede observar características clínicas para cada cohorte y resultado de RT-PCR.



## 4.2 Recolección de las muestras

La obtención de las muestras se realizó en base a la resolución 8430 de 1993, en la que se estipulan las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud, y fue avalado por el Comité de Ética en Investigación de la Fundación Universitaria Sanitas en la sesión registrada en el acta No. 040-20, que se rige bajo la normatividad vigente en temas relacionados con investigación en salud, la ley 1581 de 2012 de protección de datos personales y es certificado por el INVIMA en Buenas Prácticas Clínicas según la Resolución No.201728113 de fecha 12 de julio de 2017.

Las muestras se obtuvieron bajo el protocolo establecido para los grupos descritos en el punto anterior teniendo en cuenta los criterios siguientes, donde lo único que varía entre estos es el tiempo de recolección de la muestra:

- **Grupo control:** Personal de la Clínica Universitaria Colombia con prueba de RT-PCR negativa.
- **Leves:** Obtención de muestras de pacientes en el ingreso a la unidad de urgencias
- **Moderados:** Obtención de muestras de pacientes en el día cero de hospitalización
- **Severos:** Obtención de muestras de pacientes en el día cero de hospitalización, y sin ningún indicio de complicación en el momento de la toma de la muestra.

Los pacientes participantes firmaron con el repositorio Unisanitas un consentimiento informado (Anexo 1), donde se recolectaron las variables clínicas y socioeconómicas de cada participante por medio de una entrevista semiestructurada presencial o por medio de la examinación de su historia clínica, y se recolectó un espécimen biológico con el protocolo descrito a continuación:

1. Se entregó la información necesaria al paciente con resultado confirmado de PCR y posterior firma del consentimiento informado.
2. Extracción de sangre periférica (5 mL) en tubo tapa lila con anticoagulante EDTA.
3. Agitación del tubo manualmente mediante inversión 10 veces seguidas.
4. Almacenó del espécimen biológico se a temperatura de refrigeración durante su transporte al Laboratorio especializado de la Clínica Universitaria Colombia.
5. Centrifugación de la muestra entre 1000 y 1300 g por 10 minutos a 4 °C.
6. Separación del plasma almacenamiento en alícuotas de 1000 µL en crio-viales a una temperatura de -80 °C

### 4.3 Análisis de perfiles metabolómicos de plasma.

Los especímenes biológicos recolectados se trasladaron al Centro de Metabolómica-MetCore de la Universidad de los Andes, para la determinación de los perfiles metabólicos, que se realizó mediante un análisis metabolómico y lipidómico multiplataforma no dirigido empleando GC y LC

acoplados a espectrometría de masas de alta resolución (HRMS), bajo los protocolos implementados y estandarizados previamente en MetCore.

### 4.3.1 Análisis metabolómico por LC/MS

En primer lugar, se realizó la extracción de metabolitos, para lo que se tomaron 200  $\mu\text{L}$  de cada una de las muestras y se les adicionó MeOH (a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) en una proporción de 1:3. Posteriormente, se agitaron en vórtex a 3200 rpm durante 3 minutos y se dejaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos, transcurrido este tiempo se centrifugaron a 13000 rpm,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos y se tomaron 100  $\mu\text{L}$  del sobrenadante para análisis por cromatografía líquida.

El análisis de las muestras se realizó por cromatografía líquida acoplado a espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo (RP-LC/MS-QTOF), empleando un sistema de Cromatografía de Líquidos *Agilent Technologies* 1260 acoplado a un analizador de masas de cuadrupolo con tiempo de vuelo Q-TOF 6545 con ionización por *electrospray*. Se inyectaron 2  $\mu\text{L}$  de la muestra en una columna C18 (ZORBAX Eclipse Plus 50 x 2.1 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ ) a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  y una elución en gradiente compuesta de: 0.1 % (v/v) de ácido fórmico en agua Milli-Q (Fase A) y 0.1 % (v/v) de ácido fórmico en acetonitrilo (Fase B) con un flujo constante de 0,6 mL/min. La detección por espectrometría de masas se realizó en modo ESI positivo y negativo en full scan de 100 a 1100 m/z. Durante todo el análisis, para la corrección de masas se emplearon dos masas de referencia: m/z 121.0509 ( $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4$ ) y m/z 922.0098 ( $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_6\text{N}_3\text{P}_3\text{F}_{24}$ ) en positivo. Más detalles de las condiciones del análisis se muestran en la **Figura 4-13**.

**Figura 4-13. Condiciones del análisis de metabolómica no dirigida empleando LC/MS-QTOF (+).** A. Se observan los datos de tiempo en minutos y fase B en porcentaje para el gradiente de fases utilizado. B. Grafica de porcentaje de Fase B comparado con el Tiempo en minutos (Datos de A.). C. Condiciones del espectrómetro de masas para la fuente y MS TOF.

**A.**

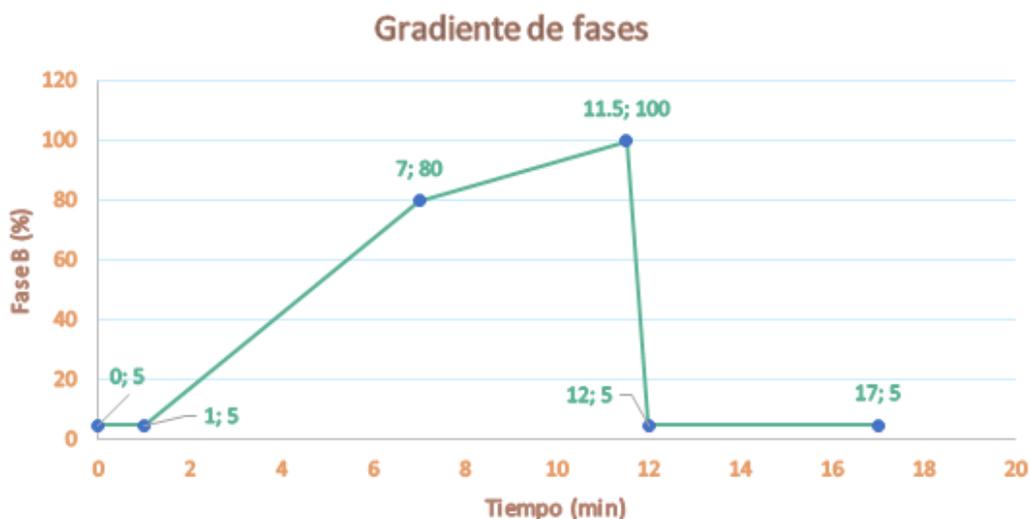
**CONDICIONES DEL ANÁLISIS DE METABOLÓMICA NO DIRIGIDA EMPLEANDO LC/MS-QTOF (+)**

Gradiente de fases usado en el análisis de RP-LC/MS-QTOF	
Tiempo (min)	Fase B (%)
0	5
1	5
7	80
11.5	100
12	5
17	5

**C.**

Condiciones Espectrómetro de Masas	
Fuente – Dual AJS ESI	
Vcap (V)	3000
Drying Gas (L/min)	12
Gas Temp (°C)	250
Nebulizer (psi)	52
Sheat Gas Temp (°C)	370
Sheat Gas Flow (L/min)	11
MS TOF	
Fragmentor (V)	175
Skimmer (V)	65
OCT RF Vpp (V)	750

**B.**



### 4.3.2 Análisis lipidómica no dirigida

La detección de lípidos se realizó mediante LC/MS, para lo que se tomaron 100  $\mu$ L de plasma y se adicionaron 350  $\mu$ L de MeOH (a -20 °C) seguido de 350  $\mu$ L de MTBE, y se agitaron en vórtex a 3200 rpm durante 5 minutos, posteriormente se centrifugaron a 13000 rpm, 20 °C por 10 minutos. Finalmente, 100  $\mu$ L del sobrenadante se transfirieron a un eppendorf para análisis por cromatografía líquida acoplado a espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo GL-LC/MS-QTOF.

Las muestras se analizaron empleando un sistema de Cromatografía de Líquidos *Agilent Technologies* 1260 acoplado a un analizador de masas de cuadrupolo con tiempo de vuelo Q-TOF 6545 con ionización por electrospray. Se inyectaron 5  $\mu$ L de la muestra en una columna C18 (100x 3.0 mm, 2.7  $\mu$ m) a 50 °C y una elución en gradiente compuesta de: 10 mM acetato de amonio H<sub>2</sub>O:MeOH (90:10) (Fase A) y 10 mM acetato de amonio ACN:MeOH:IPA (20:30:50) (Fase B) con un flujo constante de 0,6 mL/min. La detección por espectrometría de masas se realizó en modo ESI positivo en full scan de 100 a 1800 m/z. Durante todo el análisis, para la corrección de masas se emplearon dos masas de referencia: m/z 121.0509 (C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>N<sub>4</sub>), m/z 922.0098 (C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>O<sub>6</sub>N<sub>3</sub>P<sub>3</sub>F<sub>24</sub>). Más detalles de las condiciones del análisis se muestran en la **Figura 4-14**.

**Figura 4-14.** Condiciones del análisis de lipidómica no dirigida empleando LC/MS-QTOF en polaridad positiva. A. Se observan los datos de tiempo en minutos y fase B en porcentaje para el gradiente de fases utilizado. B. Grafica de porcentaje de Fase B comparado con el tiempo (Datos de A.). C. Condiciones del espectrómetro de masas para la fuente y MS TOF

**A.**

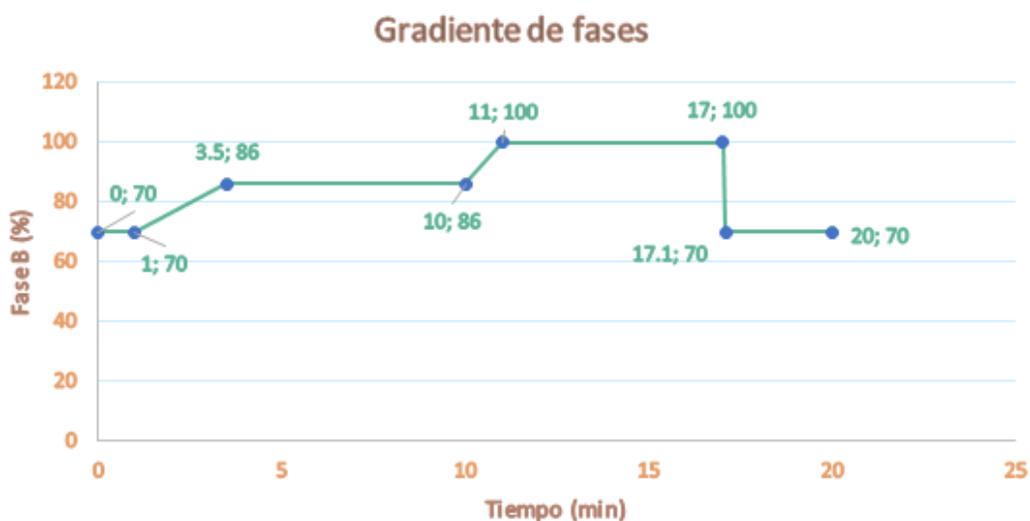
**CONDICIONES DEL ANÁLISIS DE LIPIDÓMICA NO DIRIGIDA EMPLEANDO LC/MS-QTOF (+ -)**

Gradiente de fases usado en el análisis de GL-LC/MS-QTOF	
Tiempo (min)	Fase B (%)
0	70
1	70
3.5	86
10	86
11	100
17	100
17.1	70
20	70

**C.**

Condiciones Espectrómetro de Masas	
Fuente – Dual AJS ESI	
Vcap (V)	3500
Drying Gas (L/min)	12
Gas Temp (°C)	290
Nebulizer (psi)	50
Sheat Gas Temp (°C)	350
Sheat Gas Flow (L/min)	12
MS TOF	
Fragmentor (V)	175
Skimmer (V)	65
OCT RF Vpp (V)	750

**B.**



### 4.3.3 Análisis metabólico por GC/MS

Para el análisis metabólico mediante GC, se tomaron 50  $\mu$ L de los extractos metabólicos obtenidos para LC/MS, y se llevaron a sequedad en *speedvac* durante 3 horas a 35 °C. Posteriormente, se adicionaron 10  $\mu$ L de O-metoxiamina en piridina (15 mg/mL) y se agitaron en vórtex a 3200 rpm durante 5 minutos. Luego, se realizaron tres ciclos de ultrasonido x 10 segundos y vórtex x 1 minuto y se incubaron en oscuridad por 16 horas. Transcurrido este tiempo, se adicionaron 10  $\mu$ L de BSTFA con 1% de TMCS y se incubaron a 70 °C durante 1 hora. Finalmente, las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente por 30 minutos, se agregaron 200  $\mu$ L de metil estearato en heptano como estándar interno (10 mg/L) y se agitaron en vórtex durante 10 minutos a 3200 rpm.

El análisis de las muestras se realizó por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo (GC/MS-QTOF). Para la adquisición de los datos se utilizó un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 7890B* acoplado a un detector selectivo de masas con tiempo de vuelo *Agilent Technologies GC/Q-TOF 7250*, equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (250 °C, relación de split 30) y un inyector automático *Agilent Technologies 7693A*. La fuente de ionización electrónica (EI) fue operada a 70 eV. Se empleó una columna *Agilent Technologies J&W HP-5MS* (30 m, 0.25 mm, 0.25  $\mu$ m), el gas de arrastre fue helio a flujo constante de 0.7 mL/min. La temperatura del horno se programó desde 60°C (1 min) @10°C/min hasta 325 °C (10 min). La temperatura de la línea de transferencia al detector, del filamento de la fuente y del cuadrupolo se mantuvieron a 280 °C, 230 °C y 150 °C, respectivamente. La detección por espectrometría de masas se realizó entre 50 a 600 m/z a una velocidad de 5 espectros/min.

### 4.3.4 Control de calidad de los análisis metabólicos

Para cada plataforma, las muestras de control de calidad (QC) se prepararon mezclando volúmenes iguales de plasma, se procesaron y analizaron siguiendo los procedimientos descritos anteriormente. Para determinar la reproducibilidad de la preparación de las muestras

y la estabilidad de la plataforma analítica utilizada, se realizaron varias corridas de QC hasta equilibrar el sistema analítico. Posteriormente, los QC se analizaron cada ocho muestras inyectadas de forma aleatoria.

### 4.3.5 Procesamiento y análisis de datos metabolómicos

El procesamiento de los datos consiste en una deconvolución, alineamiento de los RT e integración de los datos. Con respecto a los datos de metabolómica no dirigida por GC/MS, se realizó la deconvolución mediante *Agilent MassHunter Unknowns Analysis B.10.0*, el alineamiento de tiempos de retención se hizo utilizando *Agilent Mass Profiler Professional B.15.0*, y la integración de los datos se realizó en *Agilent Mass Hunter Quantitative Analysis B.10.00*. Este algoritmo realiza una deconvolución del cromatograma e integración de las características moleculares presentes en las muestras y en el blanco de solvente de acuerdo con la masa y el tiempo de retención.

Para los datos de LC/MS, los compuestos fueron analizados e inspeccionados manualmente utilizando el software *Agilent Mass Hunter Profinder 10.0*, empleando el algoritmo *Recursive Molecular Extraction*, los parámetros de procesamiento de datos para el análisis fueron 0 -12 minutos con 6000 *counts* para la extracción, y las especies de iones se realizaron en positivo (+H,+Na,-H<sub>2</sub>O), sin emplear filtros de masas o señales.

Finalmente, los datos obtenidos en cada plataforma se inspeccionaron manualmente y se exportarán a Excel para filtrarlos por presencia y reproducibilidad manteniendo los metabolitos presentes en al menos 80 % de las muestras con un QC menor al 20 % (30 % para datos de GC/MS), entre otros parámetros químicos relevantes.

### 4.3.6 Análisis estadístico

Posterior a la obtención de datos metabolómicos, se realizó un análisis estadístico por medio de técnicas bioinformáticas para determinar las diferencias entre los perfiles metabólicos entre los grupos bajo estudio, y seleccionar los metabolitos estadísticamente significativos, mediante análisis estadístico univariado y multivariado no supervisado y supervisado.

### ▪ **Análisis multivariado**

Para maximizar las diferencias entre los grupos bajo estudio y seleccionar los metabolitos con mayor cambio entre cada uno, se utilizó el programa SIMCA-P 16.0. Primero, se hizo PCA, para evaluar la calidad de los datos y verificar la agrupación de las muestras QC, garantizando la estabilidad del sistema analítico, posteriormente, se realizó el análisis supervisado, PLS-DA y OPLS-DA.

### ▪ **Análisis univariado**

Mediante el programa MatLab se determinó el valor  $p$ , mediante pruebas paramétricas o no paramétricas con una corrección *False Discovery Rate* de *Benjamini-Hochberg* y *Bonferroni*. Finalmente, se seleccionaron los metabolitos estadísticamente significativos de acuerdo con los resultados univariados y multivariados, valor  $p < 0.05$ , valor VIP  $> 1.0$  e intervalo de confianza *Jack-knife* (JK).

## **4.3.7 Identificación de metabolitos**

Los metabolitos obtenidos mediante análisis LC/MS se identificaron en función de la masa monoisotópica, la formación de aductos de distribución isotópica y la fórmula molecular. Además, haciendo uso de la herramienta *CEU Mass Mediator* (<http://ceumass.eps.uspceu.es/>), se interrogaron en librerías y bases de datos como: *Human metabolome Database*: (<http://hmdb.ca>), *MassBank* (<https://massbank.eu/MassBank/>), *Lipid MAPS* (<http://lipidmaps.org>), *METLIN* (<http://metlin.scripps.edu>) y *KEGG* (<http://genome.jp/kegg>). Luego, con el objetivo de confirmar la identidad del metabolito, los datos de MS/MS iterativos se anotaron con el software *Agilent Lipid Annotator* y las bibliotecas de MS/MS *in silico*. En el caso de GC-QTOF-MS, se identificaron los metabolitos mediante Fiehn versión 2013.

## **4.3.8 Análisis de factores pronósticos y mapeo de rutas bioquímicas**

---

Los parámetros de registros médicos electrónicos, incluyendo sexo, edad, comorbilidades (diabetes, hipertensión, enfermedades cardiovasculares), laboratorios clínicos (Bilirrubina total, bilirrubina directa, bilirrubina indirecta, cuadro hemático completo, cloro, creatinina en suero, deshidrogenasa láctica, nitrógeno ureico en suero, potasio, procalcitonina, proteína C reactiva, sodio, Alanino y Aspartato Amino Transferasa, dimero D, ferritina), y antecedentes personales y familiares, se utilizaron para realizar análisis estadísticos en el software de lenguaje de programación R, de valor p, test ji cuadrado ( $\chi^2$ ) y test de Shapiro-Wilks.

Además, se realizaron Heatmaps para cada plataforma, donde la abundancia relativa de iones detectados en cada muestra se representa con una intensidad de color, curvas ROC para determinar los valores de corte, la sensibilidad y especificidad de los posibles marcadores y análisis de vías metabólicas alteradas, mediante la herramienta *MetaboAnalyst 5.0*.

## 5. Resultados

### 5.1 Los parámetros clínicos se modificaron con relación a las complicaciones de la COVID-19

Los parámetros clínicos se pueden observar en la **Tabla 5-5**, donde se calcularon los valores p mediante la prueba de ANOVA de las comparaciones entre los grupos y la prueba de ji-cuadrado ( $\chi^2$ ) para sexo, comorbilidades y exámenes de laboratorio. De los 100 individuos estudiados, 48 fueron hombres y 52 mujeres, con una edad media de 54,4 años. Dentro de los antecedentes personales se encontró prevalencia del 14 % para diabetes mellitus tipo 2, 24 % para hipertensión arterial y 11 % para enfermedades cardiovasculares. Por otro lado, dentro de los antecedentes familiares hubo una prevalencia de 11 % para diabetes mellitus tipo 2, 19 % para hipertensión arterial y 4 % para enfermedades cardiovasculares.

A partir de las muestras de sangre obtenidas se evaluó de forma cuantitativa la cantidad de poblaciones celulares en sangre (neutrófilos, linfocitos, monocitos y plaquetas), marcadores de inflamación como procalcitonina, proteína C reactiva y deshidrogenasa láctica, marcadores de función hepática y renal (bilirrubina total, ALT, AST y BUN) y otros biomarcadores de interés como dímero D (coagulación), ferritina (hierro en sangre) y potasio en suero (electrolitos). De las variables analizadas se observaron cambios estadísticamente significativos para bilirrubina total ( $p = 0,0159$ ), recuento de leucocitos ( $p = 0,0174$ ), neutrófilos ( $p = 1e-04$ ), linfocitos ( $p = 0,0252$ ), monocitos ( $p = 0,0176$ ), deshidrogenasa láctica ( $P = 0,0089$ ) y procalcitonina ( $p = 2e-04$ ).

**Tabla 5-5: Diferencias estadísticas de edad, sexo, laboratorios clínicos y comorbilidades entre los grupos de estudio.** SD es Desviación estándar y NA significa que No Aplica. Se estudiaron un total de 100 pacientes, de los cuales 10 fueron controles, 30 leves, 30 moderados y 30 severos. Bilirrubina (P = 0,0159), Recuento de leucocitos (P = 0,0159), Neutrófilos (P = 0,0159), Linfocitos (P = 0,0159), Monocitos (P = 0,0159), Deshidrogenasa láctica (P = 0,0159) y Procalcitonina (P = 0,0159).

<b>Pacientes (n = 100)</b>					
	<b>Control</b>	<b>COVID – 19 (n = 90)</b>			
		<b>Leve</b>	<b>Moderado</b>	<b>Severo</b>	
	(n = 10)	(n = 30)	(n = 30)	(n = 30)	
<b>Edad</b>					<b>Valor p / Shapiro-Wilks</b>
<b>Media</b>	35.2	49.9	60.9	58.9	
<b>SD</b>	10.0	15.0	15.7	14.0	0.06 / 0.0037
<b>IR</b>	14.8	18.8	21.0	21.0	
<b>Sexo</b>					<b>χ<sup>2</sup> / Shapiro-Wilks</b>
<b>Masculino</b>	1	15	17	15	
<b>Femenino</b>	9	15	13	15	0.079 / 0.0079
<b>Laboratorios</b>					<b>Valor p</b>
<b>Bilirrubina total</b>	NA	0.4646 SD 0.2084	0.5207 SD 0.1964	0.6385 SD 0.3458	0.0159
<b>Recuento total de leucocitos</b>	NA	6.72 SD 1.786	8.4106 SD 2.902	9.4461 SD 3.849	0.0174
<b>Neutrófilos</b>	NA	4.8560 SD 2.1967	6.3412 SD 2.9917	8.1154 SD 3.5294	1e-04
<b>Linfocitos</b>	NA	1.3530 SD 0.6063	1.1012 SD 0.3745	0.7171 0.3134	0.0252
<b>Monocitos</b>	NA	0.3780 SD 0.1527	0.7965 SD 0.7732	0.4293 SD 0.239	0,0176
<b>Plaquetas</b>	NA	235.70 SD 111.1616	258.5294 SD 107.2917	253.6071 SD 92.9067	0.6642

<b>Deshidrogenasa Láctica</b>	NA	280.21 SD 94.7472	323.6345 SD 134.4552	390.2303 SD 214.5236	0.0089
<b>Nitrógeno Ureico en Suero</b>	NA	13.052 SD 4.5468	16.130 SD 4.9804	20.7013 SD 12.5917	0.2629
<b>Potasio en suero</b>	NA	4.1562 SD 0.3951	4.1743 SD 0.4266	4.4207 SD 0.6175	0.7001
<b>Procalcitonina</b>	NA	0.2850 SD 0.4836	1.8269 SD 4.3763	1.0261 SD 3.1305	2e-04
<b>Proteína C reactiva</b>	NA	33.8510 SD 38.7898	75.1496 SD 79.3764	124.1163 SD 81.7083	0.4336
<b>Alanino Amino Transferasa</b>	NA	35.6 SD 11.501	44.7827 SD 29.2532	52.625 SD 55.778	0.2957
<b>Aspartato Amino Transferasa</b>	NA	30.65 SD 8.3051	45.2 SD 26.5278	51.6821 SD 53.8687	0.1473
<b>Dímero D</b>	NA	433.6667 SD 290.6765	852.9630 SD 859.0782	1217.0690 SD 1923.4508	0.2444
<b>Ferritina</b>	NA	765.1156 SD 1097.803	1343.7042 SD 1223.2268	1128.5811 SD 975.1902	0.111
<b>Comorbilidades</b>					<b><math>\chi^2</math> / Shapiro-Wilks</b>
<b>Diabetes</b>					
<b>Personal</b>	0	1	7	6	0.056 / 0.218
<b>Familiar</b>	3	1	7	0	0.003 / 0.052
<b>Hipertensión</b>					
<b>Personal</b>	1	2	9	12	0.012 / 0.726
<b>Familiar</b>	5	5	3	6	0.047 / 0.005

**Cardiovascular**

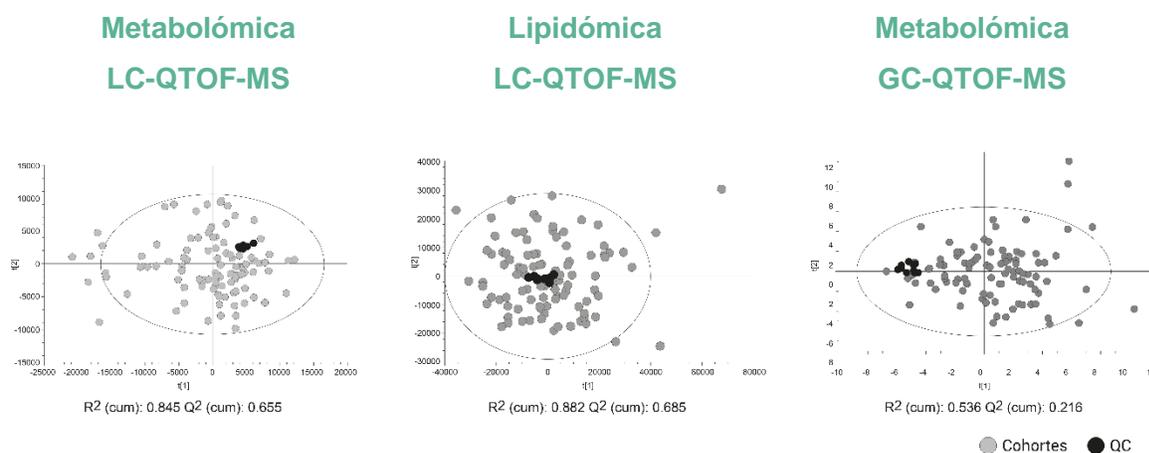
<b>Personal</b>	0	3	2	6	0.228 / 0.069
<b>Familiar</b>	0	2	1	1	0.791 / 0.009

## 5.2 Diferencias en el perfil metabólico entre controles y grupos de severidad

### 5.2.1 Análisis de componentes principales pareto con QC

En primer lugar, se evaluó la calidad de los análisis realizados empleando un análisis no supervisado de los componentes principales (PCA). En la **Figura 5-15** se puede observar el PCA para las tres plataformas de los pacientes pareto el QC, éste muestra la baja variabilidad analítica entre los grupos y asegura la conservación de la variación biológica.

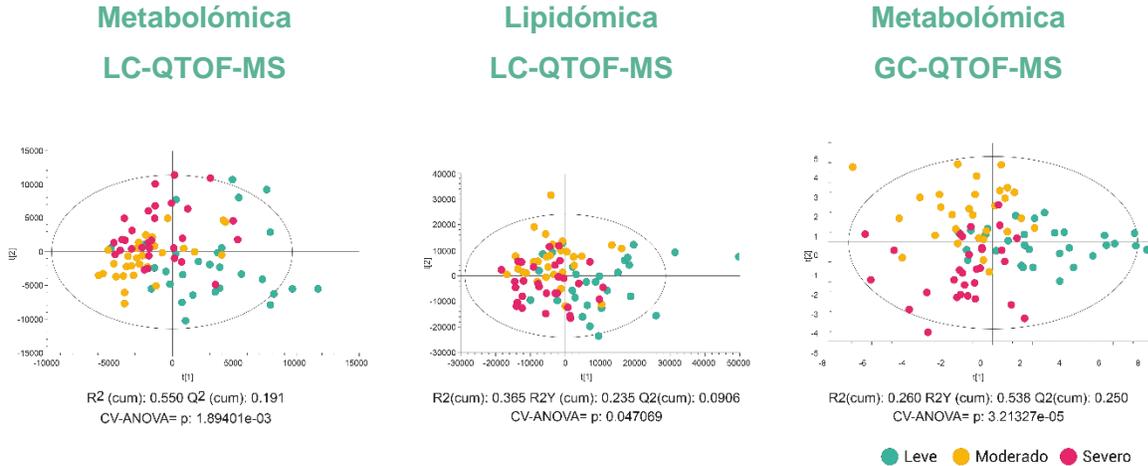
**Figura 5-15. PCA para las tres plataformas.** Se puede evidenciar una agrupación de los controles en cada una de las plataformas. Metabolómica por LC/MS: Variabilidad explicada acumulada ( $R^2_{(cum)}$ ): 0.845 y capacidad de predicción acumulada ( $Q^2_{(cum)}$ ): 0.655, Lipidómica por LC/MS:  $R^2_{(cum)}$ : 0.882 y  $Q^2_{(cum)}$ : 0.685, Metabolómica por GC/MS:  $R^2_{(cum)}$ : 0.536 y  $Q^2_{(cum)}$ : 0.216. En gris los sujetos de estudio y en negro el QC.



## 5.2.2 Análisis discriminante supervisado mediante regresión de mínimos cuadrados parciales

Para diferenciar entre los grupos y maximizar sus diferencias, se realizó un Análisis discriminante supervisado mediante regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), los resultados para las tres plataformas se pueden observar en la **Figura 5-16**.

**Figura 5-16. PLS-DA de las tres plataformas.** Se observan las tendencias de los grupos de estudio en las tres plataformas. Metabolómica por LC/MS:  $R^2_{(cum)}$ : 0.550 y  $Q^2_{(cum)}$ : 0.191, CV-ANOVA= p: 1.89401e-03, Lipidómica por LC/MS:  $R^2_{(cum)}$ : 0.365,  $R^2Y_{(cum)}$ : 0.235,  $Q^2_{(cum)}$ : 0.0906 y CV-ANOVA= p: 0.047069, Metabolómica por GC/MS:  $R^2_{(cum)}$ : 0.260,  $R^2Y_{(cum)}$ : 0.538,  $Q^2_{(cum)}$ : 0.250 y CV-ANOVA= p: 3.21327e-05. El grupo leve (en azul), el grupo moderado (en amarillo) y el grupo de pacientes severos (en fucsia).



## 5.2.3 Análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales ortogonales

Posteriormente, se realizó una comparación entre los grupos (Dos a dos) mediante un Análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLS-DA) con parámetros  $R^2_{(cum)}$  y  $Q^2_{(cum)}$ , y se validó utilizando el enfoque de validación cruzada (CV-ANOVA), que se puede observar en la **Figura 5-17**, el cual evidencia una separación estadística entre las poblaciones de estudio.

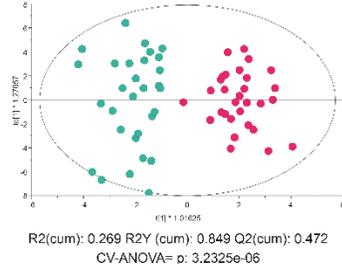
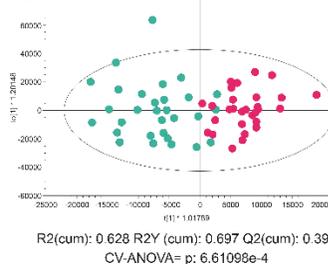
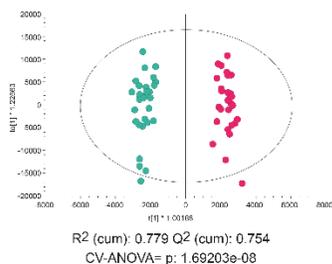
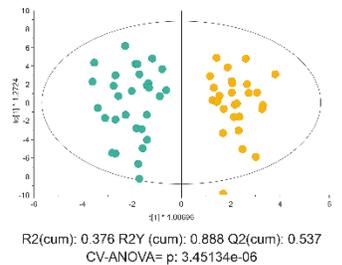
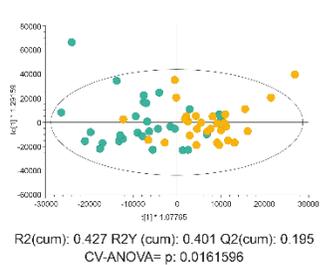
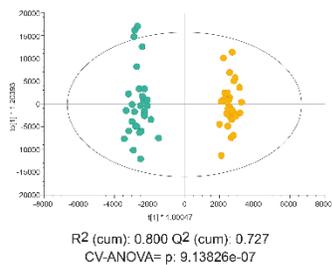
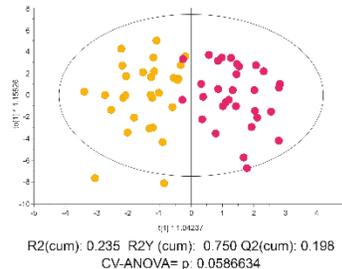
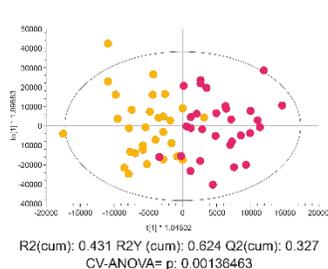
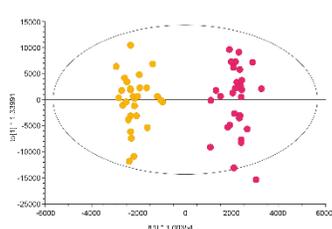
**Figura 5-17. OPLS-DA de las tres plataformas.** Se puede observar las comparaciones entre grupos en cada una de las plataformas analíticas. En **Metabolómica por LC/MS**: OPLS-DA para moderado versus severo con  $R^2_{(cum)}$ : 0.717,  $Q^2_{(cum)}$ : 0.686, y CV-ANOVA= p: 2.3838e-07, OPLS-DA para leve versus moderado,  $R^2_{(cum)}$ : 0.800,  $Q^2_{(cum)}$ : 0.727, y CV-ANOVA= p: 9.13826e-

07, y OPLS-DA para leve versus severo,  $R^2_{(cum)}$ : 0.779,  $Q^2_{(cum)}$ : 0.754, y CV-ANOVA= p: 1.69203e-08. Para **Lipidómica por LC/MS**, OPLS-DA para moderado versus severo con  $R^2_{(cum)}$ : 0.431  $R^2Y_{(cum)}$ : 0.624  $Q^2_{(cum)}$ : 0.327 y CV-ANOVA= p: 0.00136463, OPLS-DA para leve versus moderado  $R^2_{(cum)}$ : 0.427  $R^2Y_{(cum)}$ : 0.401  $Q^2_{(cum)}$ : 0.195, CV-ANOVA= p: : 0.0161596, y OPLS-DA para leve versus severo,  $R^2_{(cum)}$ : 0.628  $R^2Y_{(cum)}$ : 0.697  $Q^2_{(cum)}$ : 0.396, CV-ANOVA= p: 6.61098e-4. Finalmente, para **Metabolómica mediante GC/MS**, OPLS-DA para moderado versus severo con  $R^2_{(cum)}$ : 0.235  $R^2Y_{(cum)}$ : 0.750  $Q^2_{(cum)}$ : 0.198 y CV-ANOVA= p: 0.0586634, OPLS-DA para leve versus moderado  $R^2_{(cum)}$ : 0.376  $R^2Y_{(cum)}$ : 0.888  $Q^2_{(cum)}$ : 0.537 y CV-ANOVA= p: 3.45134e-06, y OPLS-DA para leve versus severo,  $R^2_{(cum)}$ : 0.269  $R^2Y_{(cum)}$ : 0.849  $Q^2_{(cum)}$ : 0.472 y CV-ANOVA= p: 3.2325e-06. El grupo leve (en azul), el grupo moderado (en amarillo) y el grupo de pacientes severos (en fucsia).

**Metabolómica  
LC-QTOF-MS**

**Lipidómica  
LC-QTOF-MS**

**Metabolómica  
GC-QTOF-MS**



● Leve ● Moderado ● Severo

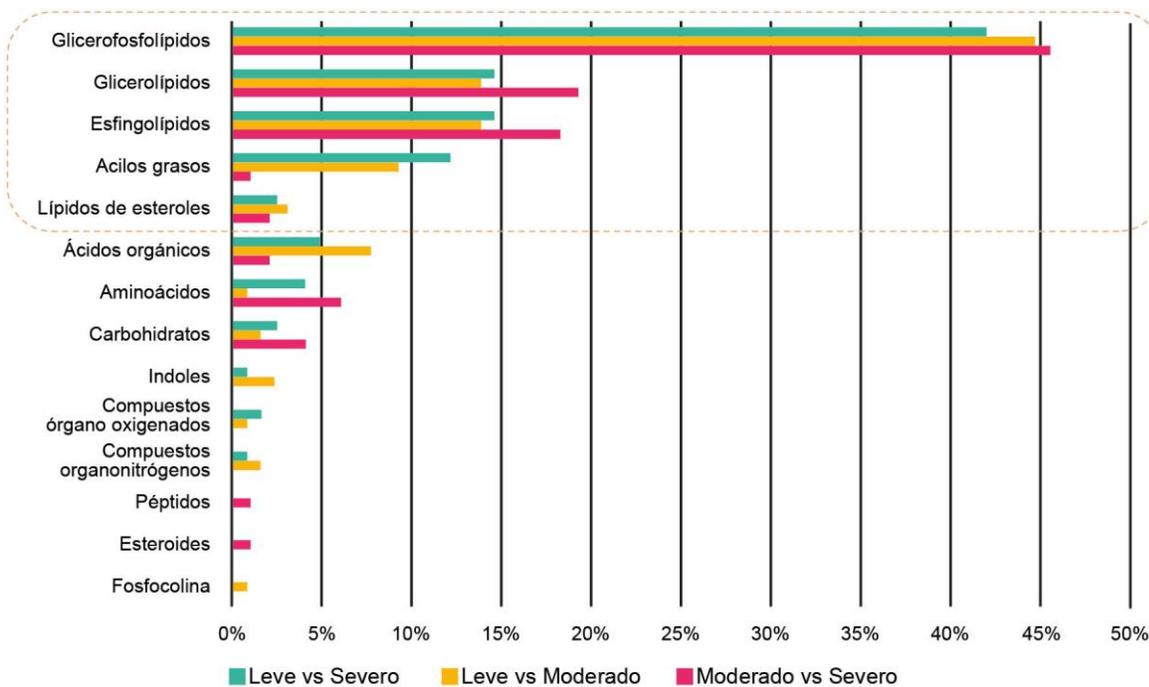
### 5.3 Alteración del metaboloma plasmático dependiente de la etapa de COVID-19

Se encontraron un total de 148 metabolitos alterados que pertenecen a Glicerofosfolípidos, Glicerolípidos, Esfingolípidos y Acilos grasos (**Figura 5-18**). El 40,67 % correspondieron a Glicerofosfolípidos, que son los principales componentes de las membranas biológicas. La alteración del metabolismo de estos se ha reportado anteriormente en la COVID-19, indicando su potencial como factor pronóstico. En la comparación del grupo Moderado versus Severo se encontraron 45 Glicerofosfolípidos alterados, 58 en Leve versus Moderados y 52 en Leve versus Severo. Entre los que se encontraban Ácidos lisofosfatídicos (LPA, *Lysophosphatidic acid*), Lisofosfatidilcolinas (LPC, *Lysophosphatidylcholine*), Fosfatidilcolinas (PC, *Phosphatidylcholine*), Fosfatidiletanolaminas (PE, *Phosphatidylethanolamine*) y Ácidos fosfatídicos (PA, *Phosphatidic acid*).

Los Glicerolípidos y Esfingolípidos en segundo lugar, alterados en un 12,67 %, que junto a los esteroides conforman las tres principales clases de lípidos de membrana. Los Glicerolípidos también desempeñan funciones de almacenamiento de energía y señalización intracelular (188), poseen al menos una cadena hidrófoba unida a un esqueleto de glicerol en un enlace éster o éter, de tipo mono, di o trisustituidos, siendo los triacilgliceroides los más conocidos (189). Se detectaron Glicerolípidos como la Monopalmitina, Diacilgliceroides (DG, *Diacylglycerols*) y Triacilgliceroides (TG, *Triacylglycerols*). En la comparación del grupo Moderado versus Severo se obtuvieron 19 Glicerolípidos y 18 Esfingolípidos alterados, 18 y 18 en Leve versus Moderados y en Leve versus Severo.

Los acilos grasos, que hacen el 10 %, se componen, entre otros, por ácidos grasos, ceras y eicosanoides. Se obtuvo 1 en Moderado versus Severo, 15 en Leve versus severo y 12 en Leve versus Moderado.

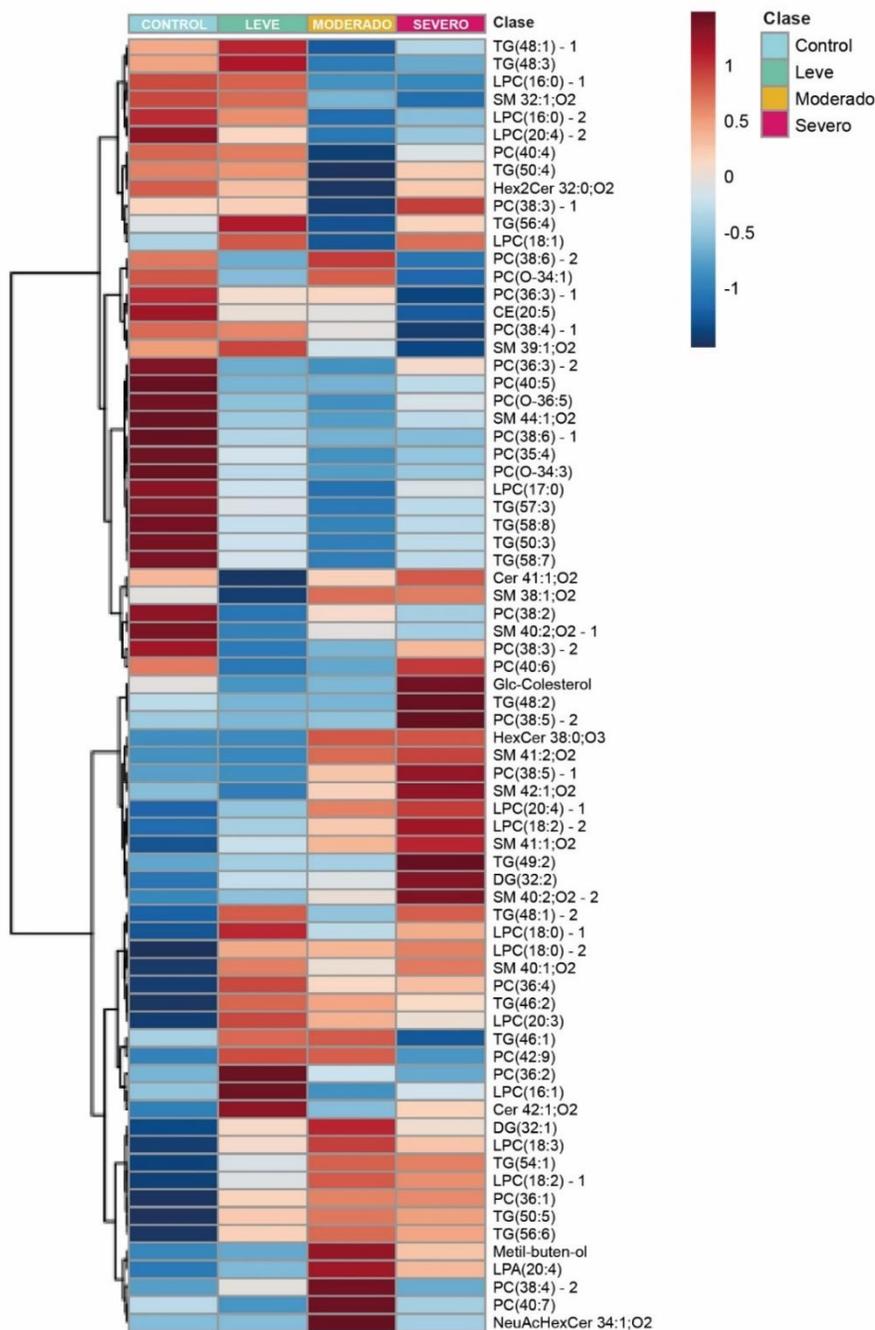
**Figura 5-18: Metabolitos alterados en el espectro clínico COVID-19+ de esta cohorte.** Porcentaje de metabolitos alterados entre Leve y Severo (Vede), Porcentaje de metabolitos alterados entre Leves y Moderados (Amarillo), Porcentaje de metabolitos alterados entre Moderados y Severos (Fucsia). La línea punteada naranja discrimina los Lípidos.



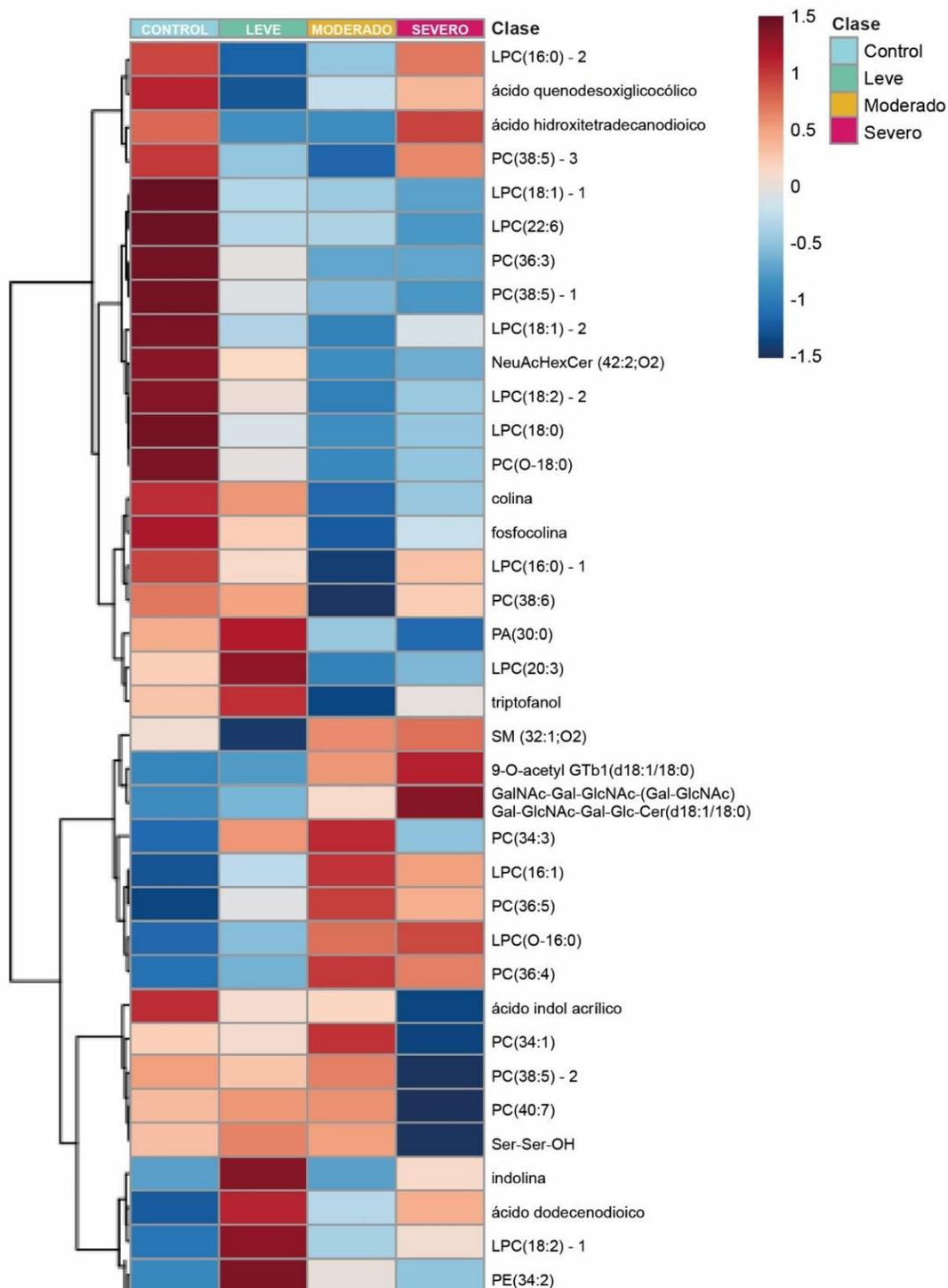
### 5.4 Cambios asociados con las etapas de severidad de COVID-19

Los mapas de calor (*heatmaps*, en inglés), son una representación gráfica que permite visualizar fácilmente, por colores, el comportamiento de un conjunto de datos. Por lo que se realizaron mapas de calor para los resultados obtenidos por cada plataforma analítica utilizada. En la **Figura 5-19**, se puede observar los valores promedio de cada especie de metabolito obtenido mediante Lipidómica en cada uno de los grupos, que revela un cambio en los lípidos de acuerdo con la enfermedad; en la **Figura 5-20**, se observan los valores promedio de las especies de metabolitos obtenidos mediante LC para cada uno de los grupos. Finalmente, en la **Figura 5-21**, se puede observar los valores promedio de cada especie de metabolito obtenido mediante GC en cada uno de los grupos.

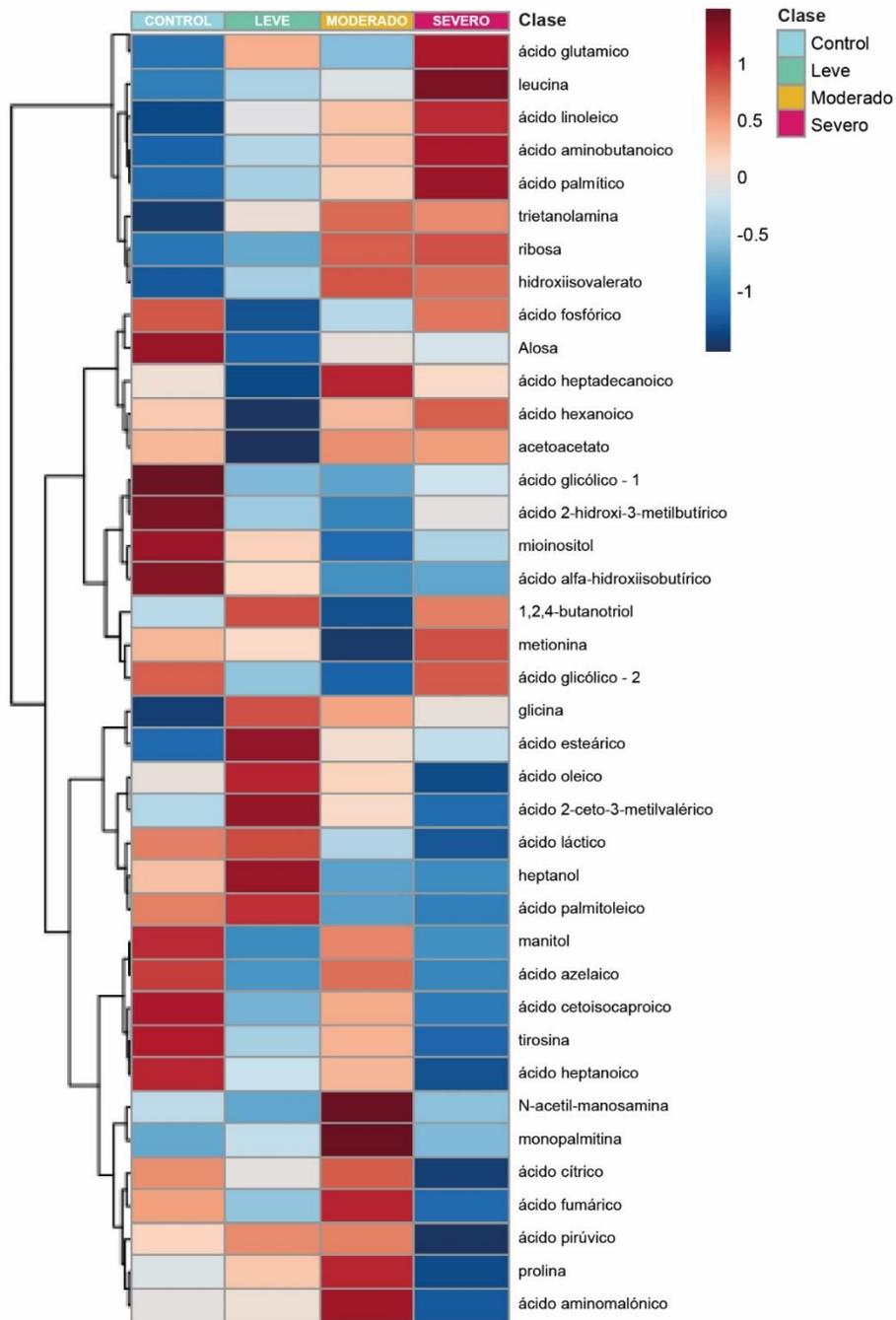
**Figura 5-19. Metabolitos alterados por grupo de estudio en Lipidómica.** En azul los controles, en verde pacientes con cuadro leve de COVID-19, amarillo con cuadro moderado y finalmente en fucsia el grupo severo. Se encontró un total de 73 metabolitos alterados, para cada uno se determinó el valor promedio por grupo de estudio, observando en tono azul los valores que tienden a disminuir y en rojo que tienden a aumentar.



**Figura 5-20. Metabolitos alterados por grupo de estudio en LC/MS.** En azul los controles, en verde pacientes con cuadro leve de COVID-19, amarillo con cuadro moderado y finalmente en fucsia el grupo severo. Para cada metabolito se determinaron los valores promedio por grupo de estudio, observando en tono azul los valores que tienden a disminuir y en rojo que tienden a aumentar.



**Figura 5-21. Metabolitos alterados por grupo de estudio en GC/MS.** Mapa de calor del agrupamiento jerárquico de los 76 metabolitos cuantificados por GC/MS/MS en controles sanos y en pacientes con COVID-19 (leve, moderado, severo). Se muestran las abundancias promedio para cada metabolito. En azul los controles, en verde pacientes con cuadro leve de COVID-19, amarillo con cuadro moderado y finalmente en fucsia el grupo severo. Para cada metabolito se determinaron los valores promedio por grupo de estudio, observando en tono azul los valores que tienden a disminuir y en rojo que tienden a aumentar.



Los metabolitos alterados en las comparaciones Dos a dos se describen a continuación:

### 5.4.1 Metabolitos alterados entre los grupo Leve y Moderado

Se obtuvieron 129 metabolitos alterados, comprendidos por carbohidratos, aminoácidos, acilos grasos, ácidos orgánicos, compuestos organonitrógenos, compuestos organooxigenados, fosfocolina, glicerolípidos, glicerofosfolípidos, esfingolípidos, esteroides e Indoles. En la **Tabla 5-6** se pueden observar los metabolitos con tasas de cambio (Fold Change) mayores a 1,5 o menores a 0,5.

**Tabla 5-6. Metabolitos de la comparación Leve y Moderado con un Fold Change mayor a 1,5 o Menor a 0,5.** 4 compuestos estaban al alza, y 18 regulados a la baja, para cada compuesto se puede ver: Formula molecular; tiempo de retención (RTmin); ion objetivo o masa; CV, coeficiente de variación de los metabolitos en las muestras de QC; GM: metabolómica global; GC: cromatografía de gases; LC: cromatografía líquida; GL: lipidómica global, RP: fase inversa., QTOF-MS: espectrómetro de masas de tiempo de vuelo de cuadrupolo; Fold Change, cambio porcentual en la abundancia de la comparación especificada calculado como (caso-control)/control) \* 100; VIP, importancia variable en la proyección; valor p \* correspondiente a los valores de p calculados por la corrección post hoc de la tasa de descubrimiento falso de Benjamini-Hochberg (FDR < 0,05).

LEVE VERSUS MODERADO								
Compuesto	Formula molecular	RT (min)	Targed ion / Mass	CV for QC(%)	Plataforma analitica	Fold Change	VIP	p valor
ribosa	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> O <sub>8</sub> P	15.06	103.0567	9.03	GM-GC-QTOF-MS	6.87	1.87	6.635E-09
acetil-manosamina	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>6</sub>	18.97	204.0992	24.5	GM-GC-QTOF-MS	1.78	1.39	3.870E-03
ácido fosfórico	H <sub>3</sub> O <sub>4</sub> P	10.09	299.0713	6.33	GM-GC-QTOF-MS	1.61	1.53	2.488E-03
mioinositol	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	19.59	217.1072	6.17	GM-GC-QTOF-MS	1.51	1.45	5.020E-04
ácido azelaico	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	16.37	317.1593	6.88	GM-GC-QTOF-MS	0.09		1.080E-03
ácido dodecenodioico	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	4.20	228.1362	3.05	GM-RP-LC-QTOF-MS	0.02	1.45	1.150E-02*
ácido hidroxitetradecanodioico	C <sub>14</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>	4.90	274.1780	4.90	GM-RP-LC-QTOF-MS	0.03	1.45	1.150E-02*
LPC(16:1)	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> NO <sub>7</sub> P	6.38	493.3168	2.78	GM-RP-LC-QTOF-MS	0.48	1.25	3.160E-02*
LPC(18:0)	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub> NO <sub>7</sub> P	7.29	523.3638	3.62	GM-RP-LC-QTOF-MS	0.43	1.88	2.350E-02
LPC(O-16:0)	C <sub>24</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>6</sub> P	6.98	481.3532	2.03	GM-RP-LC-QTOF-MS	0.39	1.13	3.000E-02
PC(34:1)	C <sub>42</sub> H <sub>83</sub> NO <sub>8</sub> P	10.96	760.5856	15.76	GM-RP-LC-QTOF-MS	0.47	1.31	2.080E-02
PC(36:4)	C <sub>44</sub> H <sub>80</sub> NO <sub>8</sub> P	10.96	781.5622	4.82	GM-RP-LC-QTOF-MS	0.43	2.6	8.140E-03
PE(34:2)	C <sub>39</sub> H <sub>74</sub> NO <sub>8</sub> P	7.75	715.5152	7.74	GM-RP-LC-QTOF-MS	0.06	1.51	2.590E-03*
triptofanol	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> NO	6.68	161.0841	4.68	GM-RP-LC-QTOF-MS	0.50	1.52	3.780E-02*
TG(46:2)	C <sub>49</sub> H <sub>90</sub> O <sub>6</sub>	14.37	774.6737	5.54	GL-RP-LC-QTOF-MS	0.50	1.37	3.130E-02
TG(48:3)	C <sub>51</sub> H <sub>92</sub> O <sub>6</sub>	14.4	800.6894	6.62	GL-RP-LC-QTOF-MS	0.46	2.03	2.106E-02
LPC(16:0)	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	2.34	495.3325	4.96	GL-RP-LC-QTOF-MS	0.49	3.43	1.339E-02
LPC(16:1)	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> NO <sub>7</sub> P	1.86	493.3168	4.18	GL-RP-LC-QTOF-MS	0.48	1.35	3.734E-03
LPC(18:0)	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub> NO <sub>7</sub> P	3.61	523.3638	7.05	GL-RP-LC-QTOF-MS	0.50	1.89	4.902E-02
LPC(18:0)	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub> NO <sub>7</sub> P	3.89	523.3638	2.33	GL-RP-LC-QTOF-MS	0.47	5.29	3.800E-02*
LPC(18:3)	C <sub>26</sub> H <sub>48</sub> NO <sub>7</sub> P	2.34	517.3168	2.07	GL-RP-LC-QTOF-MS	0.48	1.92	1.160E-02
PC(36:4)	C <sub>44</sub> H <sub>80</sub> NO <sub>8</sub> P	7.92	781.5622	2.09	GL-RP-LC-QTOF-MS	0.49	3.65	4.080E-02*

## ▪ Análisis metabolómico por GC/MS Leve versus Moderado

Mediante GC/MS se encontraron 25 metabolitos en la comparación de leve versus moderado. Obteniendo 4 Carbohidratos, entre ellos la ribosa, con la tasa de cambio más alta (Fold Change: 6.87), 8 acilos grasos, de los cuales 3 están regulados a la baja, principalmente el ácido azelaico (Fold Change: 0.09), 2 hidroxiacidos, 1 cetoácido, 7 ácidos orgánicos, todos al alza, 1 compuesto nitrogenado y 2 oxigenados. (Ver **Tabla 5-7**).

**Tabla 5-7. Metabolitos determinados por GC/MS en el grupo Leve y Moderado.** 1. ribosa, 2. alosa, 3. acetil-manosamina, 4. glicina, 5. heptanol, 6. ácido hexanoico, 7. ácido heptanoico, 8. hidroxiiisovalerato, 9. ácido azelaico, 10. ácido palmítico, 11. ácido oleico, 12. ácido esteárico, 13. ácido linoleico, 14. ácido glicólico, 15. ácido hidroxiiisobutírico. 16. acetoacetato, 17. ácido pirúvico, 18. ácido láctico, 19. ácido 2-ceto-3-metilvalérico, 20. ácido cetoisocaproico, 21. ácido fosfórico, 22. ácido maleico, 23. ácido cítrico, 24. trietanolamina, 25. mioinositol. Fold Change, cambio porcentual en la abundancia de la comparación especificada calculado como (caso-control)/control \* 100; tiempo de retención (RTmin); VIP, importancia variable en la proyección; valor p \* correspondiente a los valores de p calculados por la corrección post hoc de la tasa de descubrimiento falso de Benjamini-Hochberg (FDR <0,05). coeficiente de variación de los metabolitos en las muestras de QC, fórmula molecular y nivel de identificación (ID).

	Fold Change	RT (min)	VIP	p-value	CV for QC (%)	Fórmula molecular	Nivel de ID
<b>Carbohidratos y derivados</b>							
ribosa	6.87	15.06	1.9	6.63E-09	9.03	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> O <sub>8</sub> P	2
alosa	1.26	17.60	1.9	2.32E-06	4.27	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	2
acetil-manosamina	1.78	18.97	1.4	3.87E-03	24.5	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>6</sub>	2
<b>Aminoácidos y derivados</b>							
glicina	0.66	10.53	1.2	6.49E-03	26.22	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	2
<b>Acilos grasos</b>							
heptanol	0.89	6.23	1.2	4.29E-02	7.31	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> O	2
ácido hexanoico	0.74	7.02	1.6	1.50E-04	3.63	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	2
ácido heptanoico	0.92	8.44	1	-	3.97	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	2
hidroxiiisovalerato	1.43	9.11	1.4	7.79E-03	4.08	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	2
ácido azelaico	0.09	16.37	-	1.08E-03	6.88	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	2
ácido palmítico	1.12	18.82	1.1	-	4.71	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	2
ácido oleico	1.28	20.40	1.2	-	13.94	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	2
ácido esteárico	1.04	20.60	1	-	4.63	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	2
ácido linoleico	1.08	20.37	1	-	23.85	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	2
<b>Ácidos orgánicos y derivados</b>							
ácido glicólico	0.87	7.1	-	1.06E-02	6.57	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	2
ácido hidroxiiisobutírico	1.44	7.91	1.4	1.62E-02	3.64	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	2
acetoacetato	1.04	7.55	1.5	2.36E-04	3.26	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	2
ácido pirúvico	1.30	6.72	-	4.78E-02	4.28	C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	2
ácido láctico	1.02	6.87	-	1.20E-02	3.93	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	2
ácido 2-ceto-3-metilvalérico	1.07	8.69	1	-	7.78	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	2
ácido cetoisocaproico	1.11	9.00	1.1	-	4.60	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	2
ácido fosfórico	1.61	10.09	1.5	2.48E-03	6.33	H <sub>3</sub> O <sub>4</sub> P	2

ácido maleico	1.22	10.99	1.2	3.19E-02	6.69	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	2
ácido cítrico	1.26	16.79	1.1	-	8.25	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	2
<b>Compuestos organonitrógenos</b>							
trietanolamina	1.29	14.56	-	7.02E-04	28.74	C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub>	2
<b>Compuestos organooxigenados</b>							
mioinositol	1.51	19.59	1.5	5.02E-04	6.17	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	2

## ▪ Análisis metabólico por LC/MS Leve y Moderado

Mediante la plataforma LC/MS se obtuvieron 31 metabolitos con diferencias estadísticamente significativas y regulados a la baja, comprendidos por acilos grasos, glicerofosfolípidos, indoles, compuestos nitrogenados, fosfocolinas, esfingolípidos y esteroides (Tabla 5-8).

**Tabla 5-8. Metabolitos alterados entre los grupos Leve y Moderado determinados por LC/MS.** 1. ácido dodecenodioico, 2. ácido hidroxitetradecanodioico, 3-4. LPC(16:0), 5. LPC(16:1), 6. LPC(18:0), 7- 8. LPC(18:1), 9-10. LPC(18:2), 11. LPC(20:3), 12. LPC(22:6), 13. LPC(O-16:0), 14. PC(34:1), 15. PC(34:3), 16. PC(36:3), 17. PC(36:4), 18. PC(36:5), 19. PC(38:6), 20. PC(40:7), 21. PC(O-18:0), 22. PE(34:2), 23. PA(30:0), 24. ácido indolacrílico, 25. indolina, 26. triptofanol, 27. colina, 28. fosfocolina, 29. NeuAcHexCer (42:2;O<sub>2</sub>), 30. GalNAc-Gal-GlcNAc-(Gal-GlcNAc)Gal-GlcNAc-Gal-Glc-Cer(d18:1/18:0), 31. SM (32:1;O<sub>2</sub>). Fold Change, cambio porcentual en la abundancia de la comparación especificada calculado como (caso-control)/control \* 100; tiempo de retención (RTmin); VIP, importancia variable en la proyección; valor p \* correspondiente a los valores de p calculados por la corrección post hoc de la tasa de descubrimiento falso de Benjamini-Hochberg (FDR < 0,05), coeficiente de variación de los metabolitos en las muestras de QC, fórmula molecular y nivel de identificación.

	bFold Change	RT (min)	cVIP	<sup>d</sup> p-value	CV/QC (%)	Fórmula molecular	Nivel de ID
<b>Acilos grasos</b>							
ácido dodecenodioico	0.02	4.20	1.45	1.15E-02 *	3.05	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	3
ácido hidroxitetradecanodioico	0.03	4.90	1.45	1.15E-02 *	4.90	C <sub>14</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>	3
<b>Glicerofosfolípidos</b>							
LPC (16:0)	0.86	6.80	2.60	3.22E-04*	1.61	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC (16:0)	0.53	6.68	3.25	2.43E-02*	3.48	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC (16:1)	0.48	6.38	1.25	3.16E-02*	2.78	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC (18:0)	0.43	7.29	1.88	2.30E-02	3.62	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC (18:1)	0.63	6.98	3.09	3.62E-02*	1.33	C <sub>26</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC (18:1)	0.62	6.87	1.10	2.37E-02	4.00	C <sub>26</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC (18:2)	0.54	6.51	1.81	2.90E-04*	3.38	C <sub>26</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC (18:2)	0.66	6.61	3.89	2.90E-04*	1.75	C <sub>26</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC (20: 3)	0.54	6.85	1.53	3.10E-02	2.85	C <sub>28</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC (22: 6)	0.67	6.63	1.32	3.64E-02*	3.47	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	3
LPC (O-16: 0)	0.39	6.98	1.13	3.00E-02	2.03	C <sub>24</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>6</sub> P	3
PC(34:1)	0.47	10.96	1.31	2.08E-02	15.76	C <sub>42</sub> H <sub>83</sub> NO <sub>8</sub> P	3
PC(34:3)	0.65	10.84	2.06	2.92E-02	4.78	C <sub>42</sub> H <sub>78</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(36:3)	0.65	11.98	3.50	4.81E-02	7.28	C <sub>44</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(36:4)	0.43	10.96	2.60	8.14E-03	4.82	C <sub>44</sub> H <sub>80</sub> NO <sub>8</sub> P	2

PC(36:5)	0.73	11.91	1.39	2.12E-02	12.38	C <sub>44</sub> H <sub>80</sub> NO <sub>7</sub> P	3
PC(38:6)	0.63	10.69	1.26	2.36E-02*	12.41	C <sub>46</sub> H <sub>80</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(40:7)	0.97	11.16	-	-	5.21	C <sub>48</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(O-18:0)	0.56	7.41	4.82	1.15E-02*	1.24	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub> NO <sub>7</sub> P	2
PE(34:2)	0.06	7.75	1.51	2.59E-03*	7.74	C <sub>39</sub> H <sub>74</sub> NO <sub>8</sub> P	5
PA(30:0)	0.81	11.26	-	3.48E-04	5.50	C <sub>33</sub> H <sub>65</sub> O <sub>8</sub> P	3
<b>Indoles</b>							
ácido indolacrílico	0.82	0.72	1.01	4.20E-02*	4.05	C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	3
indolina	0.00	3.33	2.03	1.78E-07*	3.56	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> N	3
triptofanol	0.50	6.68	1.52	3.78E-02*	4.68	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> NO	3
<b>Compuestos organonitrógenos</b>							
colina	0.70	6.80	1.03	8.14E-03*	4.66	C <sub>5</sub> H <sub>14</sub> NO	3
<b>Fosfocolina</b>							
fosfocolina	0.63	6.80	1.67	1.15E-02*	1.71	C <sub>5</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>4</sub> P	2
<b>Esfingolípidos</b>							
NeuAcHexCer (42:2;O2)	0.67	11.26	1.13	8.14E-03*	9.60	C <sub>59</sub> H <sub>108</sub> N <sub>2</sub> O <sub>16</sub>	5
9-O-acetyl GTb1(d18:1/18:0)	0.81	5.41	-	4.80E-02	4.41	C <sub>97</sub> H <sub>167</sub> N <sub>5</sub> O <sub>48</sub>	5
SM (32:1;O2)	0.82	9.27	1.30	1.14E-02	1.43	C <sub>37</sub> H <sub>75</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	2

### ■ Comparación entre Leve y Moderado mediante Lipidómica.

En lipidómica, se encontraron alterados acilos grasos, 18 glicerolípidos (Tabla 5-9), 37 glicerofosfolípidos (Tabla 5-10), 15 esfingolípidos y 2 esteroides (Tabla 5-11). En su mayoría regulados a la baja, a excepción de algunos TG y PC, con la tasa de cambio más alta en 1.41 de PC(38:6).

**Tabla 5-9. Metabolitos determinados por Lipidómica en comparación del grupo Leve y Moderado.** Se determinaron 19 metabolitos entre Acilos grasos y Glicerolípidos. 1. Metil-buten-ol, 2. DG(32:1), 3. DG(32:2), 4. TG(46:1), 5. TG(46:2), 6-7. TG(48:1), 8. TG(48:2), 9. TG(48:3), 10. TG(49:2), 11. TG(50:3), 12. TG(50:4), 13. TG(50:5), 14. TG(54:1), 15. TG(56:4), 16. TG(56:6), 17. TG(57:3), 18. TG(58:7), 19. TG(58:8). Fold Change, cambio porcentual en la abundancia de la comparación especificada calculado como (caso-control)/control \* 100; tiempo de retención (RTmin); VIP, importancia variable en la proyección; valor p \* correspondiente a los valores de p calculados por la corrección post hoc de la tasa de descubrimiento falso de Benjamini-Hochberg (FDR < 0,05). coeficiente de variación de los metabolitos en las muestras de QC, formula molecular y nivel de identificación.

	bFold Change	RT (min)	cVIP	<sup>d</sup> p-value	CV for QC (%)	Fórmula molecular	Nivel de ID
<b>Acilos grasos</b>							
Metil-buten-ol	0.63	3.88	1.27	2.73E-03 *	8.40	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O	3
<b>Glicerolípidos</b>							
DG(32:1)	0.65	14.77	1.26	3.25E-02	3.01	C <sub>35</sub> H <sub>66</sub> O <sub>5</sub>	3
DG(32:2)	0.66	14.77	-	3.09E-02	6.81	C <sub>35</sub> H <sub>64</sub> O <sub>5</sub>	5

TG(46:1)	0.62	14.74	-	-	4.21	C <sub>49</sub> H <sub>92</sub> O <sub>6</sub>	3
TG(46:2)	0.50	14.37	1.37	3.13E-02	5.54	C <sub>49</sub> H <sub>90</sub> O <sub>6</sub>	3
TG(48:1)	0.73	14.43	1.61	4.45E-02	7.02	C <sub>51</sub> H <sub>96</sub> O <sub>6</sub>	5
TG(48:1)	0.69	15.19	-	-	5.00	C <sub>51</sub> H <sub>96</sub> O <sub>6</sub>	3
TG(48:2)	0.59	14.76	-	2.66E-02	5.13	C <sub>51</sub> H <sub>94</sub> O <sub>6</sub>	3
TG(48:3)	0.46	14.40	2.03	2.11E-02	6.62	C <sub>51</sub> H <sub>92</sub> O <sub>6</sub>	3
TG(49:2)	0.70	14.99	-	-	7.49	C <sub>53</sub> H <sub>96</sub> O <sub>6</sub>	4
TG(50:3)	0.80	14.76	-	1.73E-02	6.00	C <sub>53</sub> H <sub>96</sub> O <sub>6</sub>	3
TG(50:4)	0.67	14.43	1.67	1.19E-02	7.13	C <sub>53</sub> H <sub>94</sub> O <sub>6</sub>	3
TG(50:5)	0.59	14.14	1.03	3.88E-02	8.84	C <sub>53</sub> H <sub>92</sub> O <sub>6</sub>	3
TG(54:1)	1.18	15.05	1.62	3.03E-02	8.35	C <sub>57</sub> H <sub>100</sub> O <sub>6</sub>	3
TG(56:4)	1.16	15.85	-	-	2.33	C <sub>59</sub> H <sub>106</sub> O <sub>6</sub>	4
TG(56:6)	1.29	15.07	1.97	4.29E-02 *	4.69	C <sub>59</sub> H <sub>102</sub> O <sub>6</sub>	3
TG(57:3)	1.39	14.84	1.32	6.15E-03	7.36	C <sub>60</sub> H <sub>110</sub> O <sub>6</sub>	5
TG(58:7)	1.36	15.02	1.17	1.21E-02	3.96	C <sub>61</sub> H <sub>104</sub> O <sub>6</sub>	4
TG(58:8)	1.37	14.83	1.26	9.78E-03	8.61	C <sub>61</sub> H <sub>102</sub> O <sub>6</sub>	4

**Tabla 5-10. Glicerofosfolípidos determinados por Lipidómica en comparación del grupo Leve vs Moderado.** Metabolitos de Glicerofosfolípidos. 1. LPA(20:4), 2. LPC(16:0), 3. LPC(16:0), 4. LPC(16:1), 5. LPC(17:0), 6. LPC(18:0), 7. LPC(18:0), 8. LPC(18:1), 9. LPC(18:2), 10. LPC(18:2), 11. LPC(18:3), 12. LPC(20:3), 13. LPC(20:4), 14. LPC(20:4), 15. PC(35:4), 16. PC(36:1), 17. PC(36:2), 18. PC(36:3), 19. PC(36:3), 20. PC(36:4), 21. PC(38:2), 22. PC(38:3), 23. PC(38:3), 24. PC(38:4), 25. PC(38:4), 26. PC(38:5), 27. PC(38:5), 28. PC(38:6), 29. PC(38:6), 30. PC(40:4), 31. PC(40:5), 32. PC(40:6), 33. PC(40:7), 34. PC(42:9), 35. PC(O-34:1), 36. PC(O-34:3), 37. PC(O-36:5). Fold Change, cambio porcentual en la abundancia de la comparación especificada calculado como (caso-control)/control \* 100; tiempo de retención (RTmin); VIP, importancia variable en la proyección; valor p \* correspondiente a los valores de p calculados por la corrección post hoc de la tasa de descubrimiento falso de Benjamini-Hochberg (FDR < 0,05). coeficiente de variación de los metabolitos en las muestras de QC, formula molecular y nivel de identificación.

	bFold Change	RT (min)	cVIP	<sup>d</sup> p-value	CV for QC (%)	Fórmula molecular	Nivel de ID
<b>Glicerofosfolípidos</b>							
LPA(20:4)	0.59	2.63	1.60	1.51E-02 *	8.38	C <sub>23</sub> H <sub>39</sub> O <sub>7</sub> P	3
LPC(16:0)	0.49	2.34	3.43	1.34E-02	4.96	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC(16:0)	0.60	2.62	7.60	1.51E-02 *	6.00	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC(16:1)	0.48	1.86	1.35	3.73E-03	4.18	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC(17:0)	0.53	3.26	1.08	4.68E-02	4.99	C <sub>25</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC(18:0)	0.50	3.61	1.89	4.90E-02	7.05	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC(18:0)	0.47	3.89	5.29	3.80E-02 *	2.33	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC(18:1)	0.55	2.87	3.95	8.93E-03	6.37	C <sub>26</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC(18:2)	0.61	1.94	1.09	2.97E-03 *	12.95	C <sub>26</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC(18:2)	0.53	2.12	4.11	4.26E-03*	4.70	C <sub>26</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC(18:3)	0.48	2.34	1.92	1.16E-02	2.07	C <sub>26</sub> H <sub>48</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC(20:3)	0.61	2.48	1.34	3.50E-02	2.32	C <sub>28</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC(20:4)	0.67	2.06	1.04	4.16E-02	7.78	C <sub>28</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	3
LPC(20:4)	0.56	2.48	1.06	2.73E-02	6.71	C <sub>28</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	2

PC(35:4)	1.39	11.13	-	4.86E-02*	8.30	C <sub>43</sub> H <sub>78</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(36:1)	0.87	11.03	1.60	-	2.00	C <sub>44</sub> H <sub>86</sub> NO <sub>8</sub> P	5
PC(36:2)	0.91	11.04	4.34	-	4.07	C <sub>44</sub> H <sub>84</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(36:3)	0.97	9.40	3.61	-	6.83	C <sub>44</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(36:3)	0.84	9.11	2.86	-	8.39	C <sub>44</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(36:4)	0.49	7.92	3.65	4.08E-02 *	2.09	C <sub>44</sub> H <sub>80</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(38:2)	0.87	12.59	1.65	-	14.50	C <sub>46</sub> H <sub>88</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(38:3)	0.82	11.85	4.40	-	13.91	C <sub>46</sub> H <sub>86</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(38:3)	0.97	12.57	-	-	8.11	C <sub>46</sub> H <sub>86</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(38:4)	0.93	9.67	1.66	-	2.30	C <sub>46</sub> H <sub>84</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(38:4)	1.07	10.71	-	-	4.04	C <sub>46</sub> H <sub>84</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(38:5)	0.76	9.40	1.95	4.08E-02 *	9.17	C <sub>46</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>8</sub> P	4
PC(38:5)	1.00	8.83	-	-	1.98	C <sub>46</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(38:6)	0.63	7.72	1.80	4.00E-02 *	2.69	C <sub>46</sub> H <sub>80</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(38:6)	1.41	9.13	-	6.19E-03 *	16.27	C <sub>46</sub> H <sub>80</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(40:4)	0.84	12.34	-	-	3.19	C <sub>48</sub> H <sub>88</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(40:5)	0.99	10.18	-	-	3.90	C <sub>48</sub> H <sub>86</sub> NO <sub>8</sub> P	5
PC(40:6)	1.03	10.18	-	-	8.06	C <sub>48</sub> H <sub>84</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(40:7)	0.95	8.49	-	-	6.52	C <sub>48</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(42:9)	1.03	10.16	-	-	9.94	C <sub>50</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(O-34:1)	1.11	11.96	-	-	5.88	C <sub>42</sub> H <sub>84</sub> NO <sub>7</sub> P	2
PC(O-34:3)	0.72	9.81	1.32	4.00E-02 *	4.49	C <sub>42</sub> H <sub>80</sub> NO <sub>7</sub> P	2
PC(O-36:5)	0.80	9.52	1.43	1.58E-02	2.47	C <sub>44</sub> H <sub>80</sub> NO <sub>7</sub> P	2

**Tabla 5-11. Metabolitos alterados entre los grupos Leve y Moderado determinados por Lipidómica.** Tasas de cambio (Fold Change) de metabolitos compuestos por esfingolípidos y lípidos esteroides. 1. Cer 41:1;O<sub>2</sub>, 2. Cer 42:1;O<sub>2</sub>, 3. Hex2Cer 32:0;O<sub>2</sub>, 4. HexCer 38:0;O<sub>3</sub>, 5. NeuAcHexCer 34:1;O<sub>2</sub>, 6. SM 32:1;O<sub>2</sub>, 7. SM 38:1;O<sub>2</sub>, 8. SM 39:1;O<sub>2</sub>, 9. SM 40:1;O<sub>2</sub>, 10-11. SM 40:2;O<sub>2</sub>, 12. SM 41:1;O<sub>2</sub>, 13. SM 41:2;O<sub>2</sub>, 14. SM 42:1;O<sub>2</sub>, 15. SM 44:1;O<sub>2</sub>, 16. CE(20:5), 17. Glc-Colesterol. Fold Change, cambio porcentual en la abundancia de la comparación especificada calculado como (caso-control)/control \* 100; tiempo de retención (RTmin); VIP, importancia variable en la proyección; valor p \* correspondiente a los valores de p calculados por la corrección post hoc de la tasa de descubrimiento falso de Benjamini-Hochberg (FDR < 0,05). coeficiente de variación de los metabolitos en las muestras de QC, formula molecular y nivel de identificación.

	bFold Change	RT (min)	cVIP	<sup>d</sup> p-value	CV for QC (%)	Fórmula molecular	Nivel de ID
<b>Esfingolípidos</b>							
Cer 41:1;O <sub>2</sub>	0.77	13.42	-	0.01	10.99	C <sub>41</sub> H <sub>81</sub> NO <sub>3</sub>	4
Cer 42:1;O <sub>2</sub>	0.75	13.58	1.22	0.00	8.96	C <sub>42</sub> H <sub>83</sub> NO <sub>3</sub>	2
Hex2Cer 32:0;O <sub>2</sub>	0.98	10.18	-	-	2.39	C <sub>44</sub> H <sub>85</sub> NO <sub>13</sub>	5
HexCer 38:0;O <sub>3</sub>	0.80	12.70	-	0.01	5.87	C <sub>44</sub> H <sub>87</sub> NO <sub>9</sub>	4
NeuAcHexCer 34:1;O <sub>2</sub>	0.37	2.60	3.49	0.02	4.27	C <sub>51</sub> H <sub>94</sub> N <sub>2</sub> O <sub>16</sub>	3
SM 32:1;O <sub>2</sub>	0.82	6.80	1.17	0.01	3.06	C <sub>37</sub> H <sub>75</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	2
SM 38:1;O <sub>2</sub>	0.83	12.34	1.66	4.72E-02 *	2.26	C <sub>43</sub> H <sub>87</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	2
SM 39:1;O <sub>2</sub>	0.77	12.70	1.12	0.01	15.92	C <sub>44</sub> H <sub>89</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	2

SM 40:1;O2	0.83	12.91	2.82	3.80E-02 *	5.98	C <sub>45</sub> H <sub>91</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	2
SM 40:2;O2	0.83	12.91	1.88	4.08E-02 *	4.78	C <sub>45</sub> H <sub>90</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	2
SM 40:2;O2	0.85	12.51	2.31	0.01	11.19	C <sub>45</sub> H <sub>89</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	2
SM 41:1;O2	0.71	13.10	2.49	7.90E-03 *	7.48	C <sub>46</sub> H <sub>93</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	2
SM 41:2;O2	0.83	12.77	1.79	0.00	7.28	C <sub>46</sub> H <sub>91</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	2
SM 42:1;O2	0.74	13.28	2.64	2.09E-02 *	5.36	C <sub>47</sub> H <sub>95</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	2
SM 44:1;O2	0.54	14.44	2.60	0.03	5.88	C <sub>49</sub> H <sub>100</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	3
<b>Lípidos de esteroides</b>							
CE(20:5)	0.82	15.98	-	0.02	2.76	C <sub>47</sub> H <sub>74</sub> O <sub>2</sub>	2
Glc-Colesterol	0.61	14.36	-	0.04	8.66	C <sub>51</sub> H <sub>90</sub> O <sub>7</sub>	5

### 5.4.2 Metabolitos alterados entre los grupos Leve y Severo

En la comparación entre Leve y Severo, se obtuvieron 123 metabolitos alterados, entre ellos: carbohidratos, aminoácidos, acilos grasos, ácidos orgánicos, compuestos organonitrógenos, compuestos organooxigenados, glicerolípidos, glicerofosfolípidos, esfingolípidos, esteroides e Indoles. En la **Tabla 5-12**, se encuentran los metabolitos con tasas de cambio (Fold Change) mayores a 1,5 y menores a 0,5 que fueron estadísticamente significativos.

**Tabla 5-12. Metabolitos de la comparación Leve y Severo con un Fold Change mayor a 1,5 o Menor a 0,5.** 11 compuestos estaban al alza, y 13 regulados a la baja, para cada compuesto se puede ver: Formula molecular; tiempo de retención (RTmin); ion objetivo o masa; CV, coeficiente de variación de los metabolitos en las muestras de QC; GM: metabolómica global; GC: cromatografía de gases; LC: cromatografía líquida; GL: lipidómica global, RP: fase inversa, QTOF-MS: espectrómetro de masas de tiempo de vuelo de cuadrupolo; Fold Change, cambio porcentual en la abundancia de la comparación especificada calculado como (caso-control)/control) \* 100; VIP, importancia variable en la proyección; valor p \* correspondiente a

los valores de p calculados por la corrección post hoc de la tasa de descubrimiento falso de Benjamini-Hochberg (FDR < 0,05).

LEVE VERSUS SEVERO								
Compuesto	Formula molecular	RT (min)	Targed ion / Mass	CV for QC(%)	Plataforma analitica	Fold Change	VIP	p valor
ribosa	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> O <sub>8</sub> P	15.06	103.0567	9.03	GM-GC-QTOF-MS	3.27	1.48	2.568E-04
alosa	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	17.60	319.1569	4.27	GM-GC-QTOF-MS	1.98	1.64	4.288E-05
ácido aminobutanoico	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	6.38	58.065	16.18	GM-GC-QTOF-MS	1.56	1.50	1.793E-04
ácido glutámico	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>	13.38	84.0443	-	GM-GC-QTOF-MS	2.84	1.60	1.104E-03
ácido 2-hidroxi-3-metilbutírico	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	8.48	145.1042	5.56	GM-GC-QTOF-MS	2.10	1.77	1.420E-05
ácido hidroxiiisobutírico	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	7.91	131.0882	3.64	GM-GC-QTOF-MS	1.88	1.87	6.672E-06
hidroxiiisovalerato	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	9.11	131.0889	4.08	GM-GC-QTOF-MS	1.73	1.47	4.236E-04
ácido fosfórico	H <sub>3</sub> O <sub>4</sub> P	10.09	299.0713	6.33	GM-GC-QTOF-MS	1.65	1.57	2.439E-04
mioinositol	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	19.59	217.1072	6.17	GM-GC-QTOF-MS	1.62	-	2.529E-02
PC(35:4)	C <sub>43</sub> H <sub>78</sub> NO <sub>8</sub> P	11.13	767.5465	8.3	GL-RP-LC-QTOF-MS	1.58	1.20	5.960E-03*
ácido azelaico	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	16.37	317.1593	6.88	GM-GC-QTOF-MS	0.14	-	1.213E-02
manitol	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	18.04	319.1576	8.36	GM-GC-QTOF-MS	0.01	1.38	4.625E-03
ácido dodecenodioico	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	4.2	228.1362	3.05	GM-RP-LC-QTOF-MS	0.08	1.45	1.800E-02*
ácido hidroxitetradecanodioico	C <sub>14</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>	4.9	274.178	4.90	GM-RP-LC-QTOF-MS	0.08	1.44	1.940E-02*
PC(36:3)	C <sub>44</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>8</sub> P	11.98	783.5778	7.28	GM-RP-LC-QTOF-MS	0.49	4.81	3.840E-03*
PC(36:4)	C <sub>44</sub> H <sub>80</sub> NO <sub>8</sub> P	10.96	781.5622	4.82	GM-RP-LC-QTOF-MS	0.50	2.52	1.920E-02*
PE(34:2)	C <sub>39</sub> H <sub>74</sub> NO <sub>8</sub> P	7.75	715.5152	7.74	GM-RP-LC-QTOF-MS	0.12	1.48	9.230E-03*
9-O-acetyl GTb1(d18:1/18:0)	C <sub>97</sub> H <sub>167</sub> N <sub>5</sub> O <sub>48</sub>	5.41	2170.0781	4.41	GM-RP-LC-QTOF-MS	0.49	1.08	1.220E-05*
Hex(5)-HexNAc(4)-Cer 36:1;O2	C <sub>98</sub> H <sub>173</sub> N <sub>5</sub> O <sub>48</sub>	5.41	2188.125	7.16	GM-RP-LC-QTOF-MS	0.48	1.04	1.100E-05*
TG(46:1)	C <sub>49</sub> H <sub>92</sub> O <sub>6</sub>	14.74	776.6894	4.21	GL-RP-LC-QTOF-MS	0.50	1.59	2.212E-02
TG(46:2)	C <sub>49</sub> H <sub>90</sub> O <sub>6</sub>	14.37	774.6737	5.54	GL-RP-LC-QTOF-MS	0.41	1.44	1.180E-02
TG(48:3)	C <sub>51</sub> H <sub>92</sub> O <sub>6</sub>	14.4	800.6894	6.62	GL-RP-LC-QTOF-MS	0.43	2.07	1.400E-02
Glc-Colesterol	C <sub>51</sub> H <sub>90</sub> O <sub>7</sub>	14.36	814.6687	8.66	GL-RP-LC-QTOF-MS	0.50	1.03	8.511E-03

### Metabolitos alterados entre los grupos Leve y Severo determinados por GC/MS

Mediante GC/MS se encontraron 29 analitos que presentaron cambios estadísticamente significativos, la mayoría al alza, a excepción del manitol (Fold Change: 0.01), heptanol (Fold Change: 0.91), ácido hexanoico (Fold Change: 0.76), ácido heptanoico (Fold Change: 0.90), ácido azelaico (Fold Change: 0.14), y el ácido cítrico (Fold Change: 0.98) (Ver **Tabla 5-13**).

**Tabla 5-13. Metabolitos determinados por GC/MS en el grupo Leve y Severo.** Para cada metabolito se calculó el Fold Change, p-value, p-FDR, p-Bon y VIP. 1. ribosa. 2. alosa. 3. manitol. 4. ácido aminobutanoico, 5. ácido glutámico, 6. leucina, 7. metionina, 8. tirosina, 9. heptanol, 10. ácido hexanoico, 11. hidroxiiisovalerato, 12. ácido heptanoico, 13. ácido 2-hidroxi-3-metilbutírico, 14. ácido azelaico, 15. ácido palmítico, 16. ácido palmítico, 17. ácido heptadecanoico, 18. ácido linoleico, 19. ácido esteárico, 20. Ácido oleico, 21. ácido glicólico, 22. acetoacetato, 23. ácido hidroxiiisobutírico, 24. ácido fosfórico, 25. ácido maleico, 26. ácido cítrico, 27. trietanolamina, 28. 1,2,4-butanotriol. 29. mioinositol. Fold Change, cambio porcentual en la abundancia de la comparación especificada calculado como (caso-control)/control \* 100;

tiempo de retención (RTmin); VIP, importancia variable en la proyección; valor p \* correspondiente a los valores de p calculados por la corrección post hoc de la tasa de descubrimiento falso de Benjamini-Hochberg (FDR < 0,05). coeficiente de variación de los metabolitos en las muestras de QC, formula molecular y nivel de identificación.

	bFold Change	RT (min)	cVIP	<sup>a</sup> p-value	CV for QC (%)	Fórmula molecular	Nivel de ID
<b>Carbohidratos y derivados</b>							
ribosa	3.27	15.06	1.5	2.56E-04	9.03	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> O <sub>8</sub> P	2
alosa	1.98	17.6	1.6	4.29E-05	4.27	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	2
manitol	0.01	18.04	1.4	4.62E-03	8.36	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	2
<b>Aminoácidos y derivados</b>							
ácido aminobutanoico	1.56	6.38	1.50	1.79E-04	16.18	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	2
ácido glutámico	2.84	13.38	1.60	1.10E-03	-	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>	2
leucina	1.22	10.02	-	3.55E-02	2.9	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	2
metionina	1.31	11.86	-	1.62E-02	13.13	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> S	2
tirosina	1.26	17.39	1.10	-	6.12	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	2
<b>Acilos grasos</b>							
heptanol	0.91	6.23	1.1	-	7.31	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> O	2
ácido hexanoico	0.76	7.02	1.4	1.22E-03	3.63	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	2
hidroxiisovalerato	1.73	9.11	1.5	4.23E-04	4.08	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	2
ácido heptanoico	0.90	8.44	1.1	-	3.97	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	2
ácido 2-hidroxi-3-metilbutírico	2.10	8.48	1.8	1.42E-05	5.56	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	2
ácido azelaico	0.14	16.37	-	1.21E-02	6.88	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	2
ácido palmitoleico	1.24	18.64	1	-	7.25	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	2
ácido palmítico	1.14	18.82	1.20	-	4.71	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	2
ácido heptadecanoico	1.02	19.74	1.1	-	26.43	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	2
ácido linoleico	1.19	20.37	1.1	-	23.85	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	2
ácido esteárico	1.05	20.6	1.2	-	4.63	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	2
ácido oleico	1.40	20.4	1.3	-	13.94	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	2
<b>Ácidos orgánicos y derivados</b>							
ácido glicólico	1.07	7.31	-	4.97E-02	5.22	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	2
acetoacetato	1.04	7.55	1.5	4.26E-04	3.26	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	2
ácido hidroxisobutírico	1.88	7.91	1.9	6.70E-06	3.64	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	2
ácido fosfórico	1.65	10.09	1.6	2.43E-04	6.33	H <sub>3</sub> O <sub>4</sub> P	2
ácido maleico	1.16	10.99	1.3	2.82E-02	6.69	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	2
ácido cítrico	0.98	16.79	1	-	8.25	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	2
<b>Compuestos organonitrógenos</b>							
trietanolamina	1.38	14.56	-	4.13E-03	28.74	C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub>	2
<b>Compuestos organooxigenados</b>							
1,2,4-Butanotriol	1.38	11.95	1.3	1.19E-02	7.35	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	2
mioinositol	1.62	19.59	-	2.52E-02	6.17	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	2

- **Metabolitos alterados entre los grupos Leve y Severo determinados por LC/MS**

Mediante la plataforma LC/MS se obtuvieron 21 metabolitos con diferencias estadísticamente significativas y regulados a la baja, comprendidos por ácidos grasos, glicerofosfolípidos, indoles, esfingolípidos y esteroides (**Tabla 5-14**).

**Tabla 5-14. Metabolitos alterados entre los grupos Leve y Severo determinados por LC/MS.** Fold Change de metabolitos que se encontraron alterados, compuestos por Ácidos grasos, Glicerofosfolípidos, Indoles, Esfingolípidos y Esteroides. 1. ácido dodecenodioico, 2. ácido hidroxitetradecanodioico, 3. LPC(16:0), 4-5. LPC(18:2), 6. LPC(20:3), 7. PC(34:1), 8. PC(36:3), 9. PC(36:4), 10. PC(36:5), 11-12. PC(38:5), 13. PC(38:6), 14. PC(40:7), 15. PC(O-18:0), 16. PE(34:2), 17. PA(30:0), 18. ácido indolacrílico, 19. 9-O-acetyl GTb1(d18:1/18:0), 20. GalNAc-Gal-GlcNAc-(Gal-GlcNAc)Gal-GlcNAc-Gal-Glc-Cer(d18:1/18:0), 21. SM (32:1;O2). Fold Change, cambio porcentual en la abundancia de la comparación especificada calculado como (caso-control)/control \* 100; tiempo de retención (RTmin); VIP, importancia variable en la proyección; valor p \* correspondiente a los valores de p calculados por la corrección post hoc de la tasa de descubrimiento falso de Benjamini-Hochberg (FDR < 0,05). coeficiente de variación de los metabolitos en las muestras de QC, fórmula molecular y nivel de identificación.

	<b>bFold Change</b>	<b>RT (min)</b>	<b>cVIP</b>	<b><sup>d</sup>p-value</b>	<b>CV for QC (%)</b>	<b>Fórmula molecular</b>	<b>Nivel de ID</b>
<b>Ácidos grasos</b>							
ácido dodecenodioico	0.08	4.20	1.45	1.80E-02*	3.05	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	3
ácido hidroxitetradecanodioico	0.08	4.90	1.44	1.94E-02*	4.90	C <sub>14</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>	3
<b>Glicerofosfolípidos</b>							
LPC (16:0)	0.93	6.80	1.60	1.16E-02	1.61	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC (18:2)	0.71	6.51	1.34	3.66E-02	3.38	C <sub>26</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC (18:2)	0.81	6.61	2.71	1.04E-02	1.75	C <sub>26</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC (20:3)	0.56	6.85	1.53	3.28E-02	2.85	C <sub>28</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>7</sub> P	2
PC(34:1)	0.56	10.96	1.21	1.02E-02	15.76	C <sub>42</sub> H <sub>83</sub> NO <sub>8</sub> P	3
PC(36:3)	0.49	11.98	4.81	3.84E-03*	7.28	C <sub>44</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(36:4)	0.50	10.96	2.52	1.92E-02*	4.82	C <sub>44</sub> H <sub>80</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(36:5)	0.72	11.91	1.40	1.92E-02*	12.38	C <sub>44</sub> H <sub>80</sub> NO <sub>7</sub> P	3
PC(38:5)	0.70	11.16	1.02	1.01E-02	14.70	C <sub>46</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>8</sub> P	3
PC(38:5)	0.59	11.93	1.72	3.77E-03*	4.16	C <sub>46</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>8</sub> P	3
PC(38:6)	0.77	10.69	-	4.17E-02	12.41	C <sub>46</sub> H <sub>80</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(40:7)	0.71	11.16	1.13	5.26E-03*	5.21	C <sub>48</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(O-18:0)	0.72	7.41	3.83	4.82E-02	1.24	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub> NO <sub>7</sub> P	2
PE (34:2)	0.12	7.75	1.48	9.23E-03*	7.74	C <sub>39</sub> H <sub>74</sub> NO <sub>8</sub> P	5
PA(30:0)	0.78	11.26	1.09	4.78E-05*	5.50	C <sub>33</sub> H <sub>65</sub> O <sub>8</sub> P	3
<b>Indoles</b>							
ácido indolacrílico	0.74	0.72	1.36	5.25E-03*	4.05	C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	3
<b>Esfingolípidos</b>							
9-O-acetyl GTb1(d18:1/18:0)	0.49	5.41	1.08	1.22E-05*	4.41	C <sub>97</sub> H <sub>167</sub> N <sub>5</sub> O <sub>48</sub>	5
d18:1/18:0	0.48	5.41	1.04	1.10E-05*	7.16	C <sub>98</sub> H <sub>173</sub> N <sub>5</sub> O <sub>48</sub>	5
SM (32:1;O2)	0.74	9.27	1.72	9.75E-03*	1.43	C <sub>37</sub> H <sub>75</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	2

## ▪ Lipidómica en la comparación de Leve y Severo

Se encontraron 73 metabolitos alterados, en lipidómica, correspondientes a: acilos grasos, glicerolípidos, glicerofosfolípidos, esfingolípidos y esteroides. En la **Tabla 5-15** se pueden observar los metabolitos correspondientes a acilos grasos y glicerolípidos. La mayoría de TG se encontraron a la baja, a excepción de 5 metabolitos.

**Tabla 5-15. Metabolitos determinados por Lipidómica en comparación del grupo Leve y Severo.** Metabolitos de Acilos grasos y Glicerolípidos. 1. Metil-buten-ol, 2. DG(32:1), 3. DG(32:2), 4. TG(46:1), 5. TG(46:2), 6. TG(48:1), 7. TG(48:1), 8. TG(48:2), 9. TG(48:3), 10. TG(49:2), 11. TG(50:3), 12. TG(50:4), 13. TG(50:5), 14. TG(54:1), 15. TG(56:4), 16. TG(56:6), 17. TG(57:3), 18. TG(58:7), 19. TG(58:8). Fold Change, cambio porcentual en la abundancia de la comparación especificada calculado como (caso-control)/control \* 100; tiempo de retención (RTmin); VIP, importancia variable en la proyección; valor p \* correspondiente a los valores de p calculados por la corrección post hoc de la tasa de descubrimiento falso de Benjamini-Hochberg (FDR < 0,05). coeficiente de variación de los metabolitos en las muestras de QC, formula molecular y nivel de identificación.

	bFold Change	RT (min)	cVIP	<sup>d</sup> p-value	CV for QC (%)	Fórmula molecular	Nivel de ID
<b>Acilos grasos</b>							
Metil-buten-ol	0.79	3.88	-	0.01	8.40	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O	3
<b>Glicerolípidos</b>							
DG(32:1)	0.67	14.77	1.21	0.04	3.01	C <sub>35</sub> H <sub>66</sub> O <sub>5</sub>	3
DG(32:2)	0.60	14.77	1.11	0.01	6.81	C <sub>35</sub> H <sub>64</sub> O <sub>5</sub>	5
TG(46:1)	0.51	14.74	1.59	0.02	4.21	C <sub>49</sub> H <sub>92</sub> O <sub>6</sub>	3
TG(46:2)	0.41	14.37	1.44	0.01	5.54	C <sub>49</sub> H <sub>90</sub> O <sub>6</sub>	3
TG(48:1)	0.73	14.43	1.57	0.04	7.02	C <sub>51</sub> H <sub>96</sub> O <sub>6</sub>	5
TG(48:1)	0.63	15.19	2.45	0.02	5.00	C <sub>51</sub> H <sub>96</sub> O <sub>6</sub>	3
TG(48:2)	0.53	14.76	2.97	0.01	5.13	C <sub>51</sub> H <sub>94</sub> O <sub>6</sub>	3
TG(48:3)	0.43	14.40	2.07	0.01	6.62	C <sub>51</sub> H <sub>92</sub> O <sub>6</sub>	3
TG(49:2)	0.63	14.99	1.15	0.04	7.49	C <sub>53</sub> H <sub>96</sub> O <sub>6</sub>	4
TG(50:3)	0.83	14.76	1.62	0.05	6.00	C <sub>53</sub> H <sub>96</sub> O <sub>6</sub>	3
TG(50:4)	0.67	14.43	1.72	0.01	7.13	C <sub>53</sub> H <sub>94</sub> O <sub>6</sub>	3
TG(50:5)	0.56	14.14	-	0.03	8.84	C <sub>53</sub> H <sub>92</sub> O <sub>6</sub>	3
TG(54:1)	1.21	15.05	-	0.01	8.35	C <sub>57</sub> H <sub>100</sub> O <sub>6</sub>	3
TG(56:4)	0.95	15.85	-	-	2.33	C <sub>59</sub> H <sub>106</sub> O <sub>6</sub>	4
TG(56:6)	1.19	15.07	1.31	0.03	4.69	C <sub>59</sub> H <sub>102</sub> O <sub>6</sub>	3
TG(57:3)	1.13	14.84	-	-	7.36	C <sub>60</sub> H <sub>110</sub> O <sub>6</sub>	5
TG(58:7)	1.15	15.02	-	-	3.96	C <sub>61</sub> H <sub>104</sub> O <sub>6</sub>	4
TG(58:8)	1.20	14.83	-	-	8.61	C <sub>61</sub> H <sub>102</sub> O <sub>6</sub>	4

Se encontraron 37 glicerofosfolípidos, que se pueden observar en la **Tabla 5-16**, en su mayoría regulados a la baja, a excepción de PC(35:4), con una tasa de cambio (Fold Change) de 1.58.

**Tabla 5-16. Glicerofosfolípidos determinados por Lipidómica en comparación del grupo Leve vs Severo.** Metabolitos de Glicerofosfolípidos. 1. LPA(20:4), 2. LPC(16:0), 3. LPC(16:0), 4. LPC(16:1), 5. LPC(17:0), 6. LPC(18:0), 7. LPC(18:0), 8. LPC(18:1), 9. LPC(18:2), 10. LPC(18:2), 11. LPC(18:3), 12. LPC(20:3), 13. LPC(20:4), 14. LPC(20:4), 15. PC(35:4), 16. PC(36:1), 17. PC(36:2), 18. PC(36:3), 19. PC(36:3), 20. PC(36:4), 21. PC(38:2), 22. PC(38:3), 23. PC(38:3), 24. PC(38:4), 25. PC(38:4), 26. PC(38:5), 27. PC(38:5), 28. PC(38:6), 29. PC(38:6), 30. PC(40:4), 31. PC(40:5), 32. PC(40:6), 33. PC(40:7), 34. PC(42:9), 35. PC(O-34:1), 36. PC(O-34:3), 37. PC(O-36:5). Fold Change, cambio porcentual en la abundancia de la comparación especificada calculado como (caso-control)/control \* 100; tiempo de retención (RTmin); VIP, importancia variable en la proyección; valor p \* correspondiente a los valores de p calculados por la corrección post hoc de la tasa de descubrimiento falso de Benjamini-Hochberg (FDR < 0,05). coeficiente de variación de los metabolitos en las muestras de QC, formula molecular y nivel de identificación.

Glicerofosfolípidos	bFold Change	RT (min)	cVIP	<sup>d</sup> p-value	CV for QC (%)	Fórmula molecular	Nivel de ID
LPA(20:4)	0.84	2.63	-	-	8.38	C <sub>23</sub> H <sub>39</sub> O <sub>7</sub> P	3
LPC(16:0)	0.84	2.34	2.01	-	4.96	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC(16:0)	0.85	2.62	3.97	-	6.00	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC(16:1)	0.76	1.86	-	-	4.18	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC(17:0)	0.85	3.26	-	-	4.99	C <sub>25</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC(18:0)	0.68	3.61	1.16	-	7.05	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC(18:0)	0.67	3.89	3.28	-	2.33	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC(18:1)	0.80	2.87	2.25	-	6.37	C <sub>26</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC(18:2)	0.79	1.94	-	0.03	12.95	C <sub>26</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC(18:2)	0.76	2.12	2.20	-	4.70	C <sub>26</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC(18:3)	0.79	2.34	1.11	-	2.07	C <sub>26</sub> H <sub>48</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC(20:3)	0.67	2.48	-	0.05	2.32	C <sub>28</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC(20:4)	0.90	2.06	-	-	7.78	C <sub>28</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	3
LPC(20:4)	0.62	2.48	-	0.03	6.71	C <sub>28</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	2
PC(35:4)	1.58	11.13	1.20	5.96E-03 *	8.30	C <sub>43</sub> H <sub>78</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(36:1)	0.80	11.03	2.44	0.01	2.00	C <sub>44</sub> H <sub>86</sub> NO <sub>8</sub> P	5
PC(36:2)	0.84	11.04	6.22	0.03	4.07	C <sub>44</sub> H <sub>84</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(36:3)	0.77	9.40	5.55	2.86E-02 *	6.83	C <sub>44</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(36:3)	0.73	9.11	3.91	3.71E-02 *	8.39	C <sub>44</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(36:4)	0.54	7.92	3.59	4.20E-02 *	2.09	C <sub>44</sub> H <sub>80</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(38:2)	0.70	12.59	1.66	0.02	14.50	C <sub>46</sub> H <sub>88</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(38:3)	0.53	11.85	6.43	2.38E-03 *	13.91	C <sub>46</sub> H <sub>86</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(38:3)	0.75	12.57	1.25	4.17E-02 *	8.11	C <sub>46</sub> H <sub>86</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(38:4)	0.68	9.67	2.45	2.43E-03*	2.30	C <sub>46</sub> H <sub>84</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(38:4)	0.88	10.71	-	0.04	4.04	C <sub>46</sub> H <sub>84</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(38:5)	0.61	9.40	3.69	1.04E-04 *	9.17	C <sub>46</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>8</sub> P	4
PC(38:5)	0.83	8.83	1.94	4.20E-02 *	1.98	C <sub>46</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(38:6)	0.65	7.72	1.79	3.01E-02 *	2.69	C <sub>46</sub> H <sub>80</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(38:6)	0.84	9.13	1.15	0.05	16.27	C <sub>46</sub> H <sub>80</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(40:4)	0.71	12.34	1.29	3.91E-02 *	3.19	C <sub>48</sub> H <sub>88</sub> NO <sub>8</sub> P	2

PC(40:5)	0.77	10.18	1.17	0.00	3.90	C <sub>48</sub> H <sub>86</sub> NO <sub>8</sub> P	5
PC(40:6)	0.78	10.18	3.07	0.01	8.06	C <sub>48</sub> H <sub>84</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(40:7)	0.76	8.49	1.10	2.15E-02 *	6.52	C <sub>48</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(42:9)	0.79	10.16	1.19	3.44E-02 *	9.94	C <sub>50</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(O-34:1)	0.89	11.96	-	-	5.88	C <sub>42</sub> H <sub>84</sub> NO <sub>7</sub> P	2
PC(O-34:3)	0.76	9.81	1.21	0.01	4.49	C <sub>42</sub> H <sub>80</sub> NO <sub>7</sub> P	2
PC(O-36:5)	0.89	9.52	-	-	2.47	C <sub>44</sub> H <sub>80</sub> NO <sub>7</sub> P	2

En la **Tabla 5-17**, se pueden observar los esfingolípidos y esteroides, que están en su totalidad regulados a la baja.

**Tabla 5-17. Esfingolípidos y esteroides alterados entre los grupos Leve y Severo determinados por Lipidómica.** Se encontraron Esfingolípidos y esteroides a la baja. 1. Cer 41:1;O<sub>2</sub>, 2. Cer 42:1;O<sub>2</sub>, 3. Hex2Cer 32:0;O<sub>2</sub>, 4. HexCer 38:0;O<sub>3</sub>, 5. NeuAcHexCer 34:1;O<sub>2</sub>, 6. SM 32:1;O<sub>2</sub>, 7. SM 38:1;O<sub>2</sub>, 8. SM 39:1;O<sub>2</sub>, 9. SM 40:1;O<sub>2</sub>, 10. SM 40:2;O<sub>2</sub>, 11. SM 40:2;O<sub>2</sub>, 12. SM 41:1;O<sub>2</sub>, 13. SM 41:2;O<sub>2</sub>, 14. SM 42:1;O<sub>2</sub>, 15. SM 44:1;O<sub>2</sub>, 16. CE(20:5), 17. Glc-Colesterol. Fold Change, cambio porcentual en la abundancia de la comparación especificada calculado como (caso-control)/control \* 100; tiempo de retención (RTmin); VIP, importancia variable en la proyección; valor p \* correspondiente a los valores de p calculados por la corrección post hoc de la tasa de descubrimiento falso de Benjamini-Hochberg (FDR < 0,05). coeficiente de variación de los metabolitos en las muestras de QC, formula molecular y nivel de identificación.

	bFold Change	RT (min)	cVIP	<sup>d</sup> p-value	CV for QC (%)	Fórmula molecular	Nivel de ID
<b>Esfingolípidos</b>							
Cer 41:1;O <sub>2</sub>	0.74	13.42	1.19	3.04E-02 *	10.99	C <sub>41</sub> H <sub>81</sub> NO <sub>3</sub>	4
Cer 42:1;O <sub>2</sub>	0.76	13.58	1.93	4.75E-02 *	8.96	C <sub>42</sub> H <sub>83</sub> NO <sub>3</sub>	2
Hex2Cer 32:0;O <sub>2</sub>	0.77	10.18	1.21	5.96E-03 *	2.39	C <sub>44</sub> H <sub>85</sub> NO <sub>13</sub>	5
HexCer 38:0;O <sub>3</sub>	0.67	12.70	1.19	4.68E-04 *	5.87	C <sub>44</sub> H <sub>87</sub> NO <sub>9</sub>	4
NeuAcHexCer 34:1;O <sub>2</sub>	0.83	2.60	2.10	-	4.27	C <sub>51</sub> H <sub>94</sub> N <sub>2</sub> O <sub>16</sub>	3
SM 32:1;O <sub>2</sub>	0.75	6.80	1.83	1.56E-02 *	3.06	C <sub>37</sub> H <sub>75</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	2
SM 38:1;O <sub>2</sub>	0.75	12.34	2.81	1.37E-03 *	2.26	C <sub>43</sub> H <sub>87</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	2
SM 39:1;O <sub>2</sub>	0.61	12.70	2.34	4.68E-04 *	15.92	C <sub>44</sub> H <sub>89</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	2
SM 40:1;O <sub>2</sub>	0.76	12.91	4.30	7.05E-04 *	5.98	C <sub>45</sub> H <sub>91</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	2
SM 40:2;O <sub>2</sub>	0.75	12.91	2.96	8.30E-04 *	4.78	C <sub>45</sub> H <sub>90</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	2
SM 40:2;O <sub>2</sub>	0.79	12.51	3.11	5.73E-03 *	11.19	C <sub>45</sub> H <sub>89</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	2
SM 41:1;O <sub>2</sub>	0.59	13.10	4.19	1.04E-04 *	7.48	C <sub>46</sub> H <sub>93</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	2
SM 41:2;O <sub>2</sub>	0.71	12.77	3.20	4.80E-04 *	7.28	C <sub>46</sub> H <sub>91</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	2
SM 42:1;O <sub>2</sub>	0.62	13.28	4.57	1.04E-04 *	5.36	C <sub>47</sub> H <sub>95</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	2
SM 44:1;O <sub>2</sub>	0.53	14.44	2.57	0.03	5.88	C <sub>49</sub> H <sub>100</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	3
<b>Lípidos de esteroides</b>							
CE(20:5)	0.79	15.98	1.10	3.49E-02 *	2.76	C <sub>47</sub> H <sub>74</sub> O <sub>2</sub>	2
Glc-Colesterol	0.51	14.36	1.03	0.01	8.66	C <sub>51</sub> H <sub>90</sub> O <sub>7</sub>	5

### 5.4.3 Metabolitos alterados entre los grupos Moderado y Severo

Entre los grupos Moderado y Severo se encontraron 100 metabolitos alterados, entre carbohidratos, aminoácidos, acilos grasos, ácidos orgánicos, péptidos, glicerolípidos, glicerofosfolípidos, esfingolípidos, esteroides y esteroides. En la **Tabla 5-18** se pueden observar los metabolitos con una tasa de cambio (Fold Change) mayor a 1,5 o menor a 0,5.

Respecto a los glicerofosfolípidos, se observaron cambios en 45 metabolitos, de los cuales 24 estaban regulados al alza, en su mayoría LPA y LPC, y 21 a la baja, principalmente PC. La mayoría de esfingolípidos se encontraron a la baja en las comparaciones 2 a 2, a excepción de NeuAcHexCer 42:2;O2 (190), que se encontró al alza (Fold change: 1,37, p valor: 0,00883), al igual que NeuAcHexCer 34:1;O2 y Cer 42:1;O2. Dentro de este conjunto de metabolitos, 7 presentaron una tasa de cambio (Fold Change) mayor a 1,5 y 3 menor a 0,5, siendo el más alto el NeuAcHexCer 34:1;O2 (Fold change: 2,27) y manitol el más bajo (Fold change: 0,01).

**Tabla 5-18. Metabolitos de la comparación Moderado versus Severo con un Fold Change mayor a 1.5 o Menor a 0.5.** 7 compuestos estaban al alza, y 3 regulados a la baja, para cada compuesto se puede ver: Formula molecular; tiempo de retención (RTmin); ion objetivo o masa; CV, coeficiente de variación de los metabolitos en las muestras de QC; GM: metabolómica global; GC: cromatografía de gases; LC: cromatografía líquida; GL: lipidómica global, RP: fase inversa,, QTOF-MS: espectrómetro de masas de tiempo de vuelo de cuadrupolo; Fold Change, cambio porcentual en la abundancia de la comparación especificada calculado como (caso-control)/control) \* 100; VIP, importancia variable en la proyección; valor p \* correspondiente a los valores de p calculados por la corrección post hoc de la tasa de descubrimiento falso de Benjamini-Hochberg (FDR < 0,05).

MODERADO VERSUS SEVERO								
Compuesto	Formula molecular	RT (min)	Targed ion / Mass	CV for QC(%)	Plataforma analítica	Fold Change	VIP	p valor
ácido glutámico	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>	13.38	84.0443	-	GM-GC-QTOF-MS	1.87	1.30	3.170E-05
ácido 2-hidroxi-3-metilbutírico	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	8.48	145.1042	5.56	GM-GC-QTOF-MS	1.90	2.54	1.306E-05
LPC(16:0)	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	2.34	495.3325	4.96	GL-RP-LC-QTOF-MS	1.73	-	-
LPC(16:1)	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> NO <sub>7</sub> P	1.86	493.3168	4.18	GL-RP-LC-QTOF-MS	1.60	-	4.208E-02
LPC(17:0)	C <sub>25</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>7</sub> P	3.26	509.3481	4.99	GL-RP-LC-QTOF-MS	1.59	-	-
LPC(18:3)	C <sub>26</sub> H <sub>48</sub> NO <sub>7</sub> P	2.34	517.3168	2.07	GL-RP-LC-QTOF-MS	1.65	-	-
NeuAcHexCer 34:1;O2	C <sub>51</sub> H <sub>94</sub> N <sub>2</sub> O <sub>16</sub>	2.6	990.6603	4.27	GL-RP-LC-QTOF-MS	2.27	-	-
ribosa	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> O <sub>8</sub> P	15.06	103.0567	9.03	GM-GC-QTOF-MS	0.48	-	3.038E-05
manitol	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	18.04	319.1576	8.36	GM-GC-QTOF-MS	0.01	2.04	1.245E-08
ácido quenodesoxiglicocólico	C <sub>26</sub> H <sub>43</sub> NO <sub>5</sub>	5.63	449.3141	4.35	GM-RP-LC-QTOF-MS	0.29	1.03	1.250E-02*

## ▪ Metabolitos alterados entre los grupos Moderado y Severo determinados por GC/MS

Durante el análisis de GC/MS, se obtuvieron 14 analitos estadísticamente significativos en la comparación entre el grupo Moderado y Severo, entre ellos carbohidratos, aminoácidos, acilos grasos, glicerolípidos y ácidos orgánicos (**Tabla 5-19**). Los carbohidratos, glicerolípidos y el aminoácido prolina se encontraron a la baja, y los demás al alza. La tasa de cambio más alta correspondió al ácido 2-hidroxi-3-metilbutírico

**Tabla 5-19 . Metabolitos alterados entre los grupos Moderado y Severo determinados por GC/MS.** Para cada metabolito se calculó el Fold Change, p-value, p-FDR, p-Bon y VIP. 1. ribosa. 2. alosa. 3. manitol. 4. acetil-manosamina. 5. ácido aminobutanoico. 6. prolina. 7. glicina. 8. ácido aminomalónico. 9. ácido glutámico. 10. tirosina. 11. ácido 2-hidroxi-3-metilbutírico. 12. monopalmitina. 13. ácido glicólico. 14. ácido hidroxibutírico. Fold Change, cambio porcentual en la abundancia de la comparación especificada calculado como (caso-control)/control \* 100; tiempo de retención (RTmin); VIP, importancia variable en la proyección; valor p \* correspondiente a los valores de p calculados por la corrección post hoc de la tasa de descubrimiento falso de Benjamini-Hochberg (FDR < 0,05). coeficiente de variación de los metabolitos en las muestras de QC, fórmula molecular y nivel de identificación.

	Fold Change	RT (min)	VIP	p-value	CV for QC (%)	Fórmula molecular	Nivel de ID
<b>Carbohidratos y derivados</b>							
ribosa	0.48	15.06	-	3.04E-05	9.03	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> O <sub>8</sub> P	2
alosa	0.90	17.6	1.1	-	3.84	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	2
manitol	0.01	18.04	2	1.24E-08	8.36	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	2
acetil-manosamina	0.72	18.97	-	1.49E-02	24.5	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>6</sub>	2
<b>Aminoácidos y derivados</b>							
ácido aminobutanoico	1.29	6.38	1.5	1.37E-02	16.18	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	2
prolina	0.84	8.60	1	-	-	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	2
glicina	1.34	10.53	1.3	2.63E-02	26.22	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	2
ácido aminomalónico	1.41	12.71	1.7	1.62E-02	24.93	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>4</sub>	2
ácido glutámico	1.87	13.38	1.30	3.17E-05	-	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>	2
tirosina	1.06	17.39	1.1	-	6.12	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	2
<b>Acilos grasos</b>							
ácido 2-hidroxi-3-metilbutírico	1.90	8.48	2.5	1.31E-05	5.56	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	2
<b>Glicerolípidos</b>							
monopalmitina	0.90	23.49	1.1	-	13.30	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	2
<b>Ácidos orgánicos y derivados</b>							
ácido glicólico	1.21	7.1	2.2	4.04E-04	6.57	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	2
ácido hidroxibutírico	1.30	7.91	1.7	1.55E-02	3.64	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	2

▪ **Metabolitos alterados entre los grupos Moderado y Severo determinados por LC/MS**

Se encontraron 13 metabolitos alterados, correspondientes a glicerofosfolipidos, péptidos, esfingolípidos y esteroides. En la **Tabla 5-20** se puede observar la tasa de cambio al alza para los LPC y el PC(34:3), y regulado a la baja para otras especies de PC.

**Tabla 5-20. Metabolitos alterados entre los grupos Moderado y Severo determinados por LC/MS.** Se presentan las tasas de cambio (Fold Change) de metabolitos que presentaron cambios en sus niveles de concentración de manera estadísticamente significativa. Se observan glicerofosfolipidos, péptidos, esfingolípidos y esteroides. 1. LPC(16:0). 2. LPC(18:1). 3-4. LPC(18:2). 5. PC(34:3). 6-7. PC(38:5). 8. PC(40:7). 9. Ser-Ser-OH. 10. NeuAcHexCer (42:2;O2), 11. 9-O-acetyl GTb1(d18:1/18:0), 12. GalNAc-Gal-GlcNAc-(Gal-GlcNAc)Gal-GlcNAc-Gal-Glc-Cer(d18:1/18:0), 13. ácido quenodesoxiglicocólico. Fold Change, cambio porcentual en la abundancia de la comparación especificada calculado como (caso-control)/control \* 100; tiempo de retención (RTmin); VIP, importancia variable en la proyección; valor p \* correspondiente a los valores de p calculados por la corrección post hoc de la tasa de descubrimiento falso de Benjamini-Hochberg (FDR < 0,05). coeficiente de variación de los metabolitos en las muestras de QC, formula molecular y nivel de identificación.

	Fold Change	RT (min)	VIP	p-value	CV for QC (%)	Fórmula molecular	Nivel de ID
<b>Glicerofosfolípidos</b>							
LPC (16:0)	1.08	6.80	1.94	2.00E-02	1.61	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC (18:1)	1.36	6.98	2.64	3.01E-02	1.33	C <sub>26</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC (18:2)	1.32	6.51	1.10	3.26E-02	3.38	C <sub>26</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC (18:2)	1.23	6.61	2.69	2.91E-02	1.75	C <sub>26</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	2
PC(34:3)	1.31	10.84	-	4.43E-02	4.78	C <sub>42</sub> H <sub>78</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(38:5)	0.69	11.93	1.58	7.87E-03*	4.16	C <sub>46</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>8</sub> P	3
PC(38:5)	0.83	11.35	2.40	2.00E-02	3.58	C <sub>46</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(40:7)	0.74	11.16	1.18	2.05E-02*	5.21	C <sub>48</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>8</sub> P	2
<b>Péptidos</b>							
Ser-Ser-OH	0.82	0.28	2.43	6.40E-04*	2.31	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	3
<b>Esfingolípidos</b>							
NeuAcHexCer (42:2;O2)	1.37	11.26	-	8.83E-03	9.60	C <sub>59</sub> H <sub>108</sub> N <sub>2</sub> O <sub>16</sub>	5
9-O-acetyl GTb1(d18:1/18:0)	0.60	5.41	-	5.18E-04*	4.41	C <sub>97</sub> H <sub>167</sub> N <sub>5</sub> O <sub>48</sub>	5
d18:1/18:0	0.59	5.41	-	4.51E-04*	7.16	C <sub>98</sub> H <sub>173</sub> N <sub>5</sub> O <sub>48</sub>	5
<b>Esteroides</b>							

ácido quenodesoxiciglicocólico	0.29	5.63	1.03	1.25E-02*	4.35	C <sub>26</sub> H <sub>43</sub> NO <sub>5</sub>	3
-----------------------------------	------	------	------	-----------	------	---	---

▪ **Metabolitos alterados entre los grupos Moderado y Severo determinados por lipidómica**

Se encontraron 73 metabolitos alterados, entre ellos ácidos grasos, glicerolípidos, glicerofosfolípidos, esfingolípidos y lípidos esteroides. En la **Tabla 5-21** se observan los metabolitos correspondientes a ácidos grasos y glicerolípidos. Los TG están regulados a la baja, a excepción de TG(50:3) y TG(54:1).

**Tabla 5-21. Metabolitos alterados entre los grupos Moderado y Severo, determinados por Lipidómica.** Se presentan las tasas de cambio (Fold Change) de metabolitos que presentaron cambios en sus niveles de concentración de manera estadísticamente significativa. Se observan compuestos por ácidos grasos y glicerolípidos. 1. Metil-buten-ol, 2. DG(32:1), 3. DG(32:2), 4. TG(46:1), 5. TG(46:2), 6-7. TG(48:1), 8. TG(48:2), 9. TG(48:3), 10. TG(49:2), 11. TG(50:3), 12. TG(50:4), 13. TG(50:5), 14. TG(54:1), 15. TG(56:4), 16. TG(56:6), 17. TG(57:3), 18. TG(58:7), 19. TG(58:8). Fold Change, cambio porcentual en la abundancia de la comparación especificada calculado como (caso-control)/control \* 100; tiempo de retención (RTmin); VIP, importancia variable en la proyección; valor p \* correspondiente a los valores de p calculados por la corrección post hoc de la tasa de descubrimiento falso de Benjamini-Hochberg (FDR < 0,05). coeficiente de variación de los metabolitos en las muestras de QC, fórmula molecular y nivel de identificación.

	bFold Change	RT (min)	cVIP	<sup>d</sup> p-value	CV for QC (%)	Fórmula molecular	Nivel de ID
<b>Ácidos grasos</b>							
Metil-buten-ol	1.25	3.88	-	0.03	8.40	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O	3
<b>Glicerolípidos</b>							
DG(32:1)	1.03	14.77	-	-	3.01	C <sub>35</sub> H <sub>66</sub> O <sub>5</sub>	3
DG(32:2)	0.90	14.77	-	-	6.81	C <sub>35</sub> H <sub>64</sub> O <sub>5</sub>	5
TG(46:1)	0.82	14.74	-	-	4.21	C <sub>49</sub> H <sub>92</sub> O <sub>6</sub>	3
TG(46:2)	0.83	14.37	-	-	5.54	C <sub>49</sub> H <sub>90</sub> O <sub>6</sub>	3
TG(48:1)	1.00	14.43	-	-	7.02	C <sub>51</sub> H <sub>96</sub> O <sub>6</sub>	5
TG(48:1)	0.91	15.19	1.56	-	5.00	C <sub>51</sub> H <sub>96</sub> O <sub>6</sub>	3
TG(48:2)	0.90	14.76	1.65	-	5.13	C <sub>51</sub> H <sub>94</sub> O <sub>6</sub>	3
TG(48:3)	0.93	14.40	-	-	6.62	C <sub>51</sub> H <sub>92</sub> O <sub>6</sub>	3
TG(49:2)	0.90	14.99	-	-	7.49	C <sub>53</sub> H <sub>96</sub> O <sub>6</sub>	4
TG(50:3)	1.04	14.76	1.18	-	6.00	C <sub>53</sub> H <sub>96</sub> O <sub>6</sub>	3
TG(50:4)	0.99	14.43	-	-	7.13	C <sub>53</sub> H <sub>94</sub> O <sub>6</sub>	3
TG(50:5)	0.95	14.14	-	-	8.84	C <sub>53</sub> H <sub>92</sub> O <sub>6</sub>	3
TG(54:1)	1.03	15.05	-	-	8.35	C <sub>57</sub> H <sub>100</sub> O <sub>6</sub>	3

TG(56:4)	0.82	15.85	1.05	0.05	2.33	C <sub>59</sub> H <sub>106</sub> O <sub>6</sub>	4
TG(56:6)	0.93	15.07	1.21	-	4.69	C <sub>59</sub> H <sub>102</sub> O <sub>6</sub>	3
TG(57:3)	0.81	14.84	1.09	-	7.36	C <sub>60</sub> H <sub>110</sub> O <sub>6</sub>	5
TG(58:7)	0.85	15.02	-	-	3.96	C <sub>61</sub> H <sub>104</sub> O <sub>6</sub>	4
TG(58:8)	0.88	14.83	-	-	8.61	C <sub>61</sub> H <sub>102</sub> O <sub>6</sub>	4

En la **Tabla 5-22** están los glicerofosfolípidos alterados. Se encontró un LPA, 13 LPC y 5 PC regulados al alza, y 18 PC restantes a la baja.

**Tabla 5-22. Metabolitos alterados entre los grupos Moderado y Severo determinados por Lipidómica.** Se presentan las tasas de cambio (Fold Change) de glicerofosfolípidos que presentaron cambios en sus niveles de concentración de manera estadísticamente significativa. 1. LPA(20:4), 2-3. LPC(16:0), 4. LPC(16:1), 5. LPC(17:0), 6-7. LPC(18:0), 8. LPC(18:1), 9-10. LPC(18:2), 11. LPC(18:3), 12. LPC(20:3), 13-14. LPC(20:4), 15. PC(35:4), 16. PC(36:1), 17. PC(36:2), 18-19. PC(36:3), 20. PC(36:4), 21. PC(38:2), 22-23. PC(38:3), 24-25. PC(38:4), 26-27. PC(38:5), 28-29. PC(38:6), 30. PC(40:4), 31. PC(40:5), 32. PC(40:6), 33. PC(40:7), 34. PC(40:9), 35. PC(O-34:1), 36. PC(O-34:3), 37. PC(O-36:5). Fold Change, cambio porcentual en la abundancia de la comparación especificada calculado como (caso-control)/control \* 100; tiempo de retención (RTmin); VIP, importancia variable en la proyección; valor p \* correspondiente a los valores de p calculados por la corrección post hoc de la tasa de descubrimiento falso de Benjamini-Hochberg (FDR < 0,05). coeficiente de variación de los metabolitos en las muestras de QC, formula molecular y nivel de identificación.

	bFold Change	RT (min)	cVIP	<sup>d</sup> p-value	CV for QC (%)	Fórmula molecular	Nivel de ID
<b>Glicerofosfolípidos</b>							
LPA(20:4)	1.42	2.63	-	0.02	8.38	C <sub>23</sub> H <sub>39</sub> O <sub>7</sub> P	3
LPC(16:0)	1.73	2.34	-	-	4.96	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC(16:0)	1.41	2.62	-	0.02	6.00	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC(16:1)	1.60	1.86	-	0.04	4.18	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC(17:0)	1.59	3.26	-	-	4.99	C <sub>25</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC(18:0)	1.36	3.61	-	-	7.05	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC(18:0)	1.42	3.89	-	-	2.33	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC(18:1)	1.47	2.87	-	-	6.37	C <sub>26</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC(18:2)	1.29	1.94	-	0.04	12.95	C <sub>26</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC(18:2)	1.44	2.12	-	0.04	4.70	C <sub>26</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC(18:3)	1.65	2.34	-	-	2.07	C <sub>26</sub> H <sub>48</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC(20:3)	1.10	2.48	-	-	2.32	C <sub>28</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>7</sub> P	2
LPC(20:4)	1.34	2.06	-	-	7.78	C <sub>28</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	3
LPC(20:4)	1.10	2.48	-	-	6.71	C <sub>28</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	2
PC(35:4)	1.13	11.13	-	-	8.30	C <sub>43</sub> H <sub>78</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(36:1)	0.92	11.03	1.12	-	2.00	C <sub>44</sub> H <sub>86</sub> NO <sub>8</sub> P	5
PC(36:2)	0.92	11.04	3.60	-	4.07	C <sub>44</sub> H <sub>84</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(36:3)	0.79	9.40	7.21	0.01	6.83	C <sub>44</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(36:3)	0.88	9.11	-	-	8.39	C <sub>44</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>8</sub> P	2

PC(36:4)	1.10	7.92	-	-	2.09	C <sub>44</sub> H <sub>80</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(38:2)	0.80	12.59	1.66	-	14.50	C <sub>46</sub> H <sub>88</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(38:3)	0.64	11.85	6.70	0.00	13.91	C <sub>46</sub> H <sub>86</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(38:3)	0.78	12.57	1.37	0.01	8.11	C <sub>46</sub> H <sub>86</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(38:4)	0.73	9.67	2.53	0.00	2.30	C <sub>46</sub> H <sub>84</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(38:4)	0.82	10.71	8.01	0.00	4.04	C <sub>46</sub> H <sub>84</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(38:5)	0.80	9.40	2.62	0.02	9.17	C <sub>46</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>8</sub> P	4
PC(38:5)	0.83	8.83	2.58	0.02	1.98	C <sub>46</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(38:6)	1.04	7.72	-	-	2.69	C <sub>46</sub> H <sub>80</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(38:6)	0.59	9.13	2.78	1.85E-05 *	16.27	C <sub>46</sub> H <sub>80</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(40:4)	0.84	12.34	1.16	0.05	3.19	C <sub>48</sub> H <sub>88</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(40:5)	0.78	10.18	1.28	0.00	3.90	C <sub>48</sub> H <sub>86</sub> NO <sub>8</sub> P	5
PC(40:6)	0.76	10.18	3.63	0.01	8.06	C <sub>48</sub> H <sub>84</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(40:7)	0.80	8.49	1.03	0.03	6.52	C <sub>48</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(42:9)	0.77	10.16	1.44	0.01	9.94	C <sub>50</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>8</sub> P	2
PC(O-34:1)	0.81	11.96	1.48	0.01	5.88	C <sub>42</sub> H <sub>84</sub> NO <sub>7</sub> P	2
PC(O-34:3)	1.06	9.81	-	-	4.49	C <sub>42</sub> H <sub>80</sub> NO <sub>7</sub> P	2
PC(O-36:5)	1.11	9.52	-	-	2.47	C <sub>44</sub> H <sub>80</sub> NO <sub>7</sub> P	2

En su mayoría, los esfingolípidos se encontraron regulados a la baja, a excepción de Cer 42:1;O<sub>2</sub> y NeuAcHexCer 34:1;O<sub>2</sub>, este último con la mayor tasa de cambio (FC: 2,27), en la **Tabla 5-23** se observan los esfingolípidos y esteroides hallados.

**Tabla 5-23. Metabolitos alterados entre los grupos Moderado y Severo determinados por Lipidómica.** Fold Change de metabolitos compuestos por esfingolípidos y Lípidos esteroides. 1. Cer 41:1;O<sub>2</sub>, 2. Cer 42:1;O<sub>2</sub>, 3. Hex2Cer 32:0;O<sub>2</sub>, 4. HexCer 38:0;O<sub>3</sub>, 5. NeuAcHexCer 34:1;O<sub>2</sub>, 6. SM 32:1;O<sub>2</sub>, 7. SM 38:1;O<sub>2</sub>, 8. SM 39:1;O<sub>2</sub>, 9. SM 40:1;O<sub>2</sub>, 10-11. SM 40:2;O<sub>2</sub>, 12. SM 41:1;O<sub>2</sub>, 13. SM 41:2;O<sub>2</sub>, 14. SM 42:1;O<sub>2</sub>, 15. SM 44:1;O<sub>2</sub>, 16. CE(20:5), 17. Glc-Colesterol. Fold Change, cambio porcentual en la abundancia de la comparación especificada calculado como (caso-control)/control \* 100; tiempo de retención (RTmin); VIP, importancia variable en la proyección; valor p \* correspondiente a los valores de p calculados por la corrección post hoc de la tasa de descubrimiento falso de Benjamini-Hochberg (FDR < 0,05). coeficiente de variación de los metabolitos en las muestras de QC, formula molecular y nivel de identificación.

	bFold Change	RT (min)	cVIP	<sup>d</sup> p-value	CV for QC (%)	Fórmula molecular	Nivel de ID
<b>Esfingolípidos</b>							
Cer 41:1;O <sub>2</sub>	0.96	13.42	-	-	10.99	C <sub>41</sub> H <sub>81</sub> NO <sub>3</sub>	4
Cer 42:1;O <sub>2</sub>	1.01	13.58	-	-	8.96	C <sub>42</sub> H <sub>83</sub> NO <sub>3</sub>	2
Hex2Cer 32:0;O <sub>2</sub>	0.79	10.18	1.29	0.00	2.39	C <sub>44</sub> H <sub>85</sub> NO <sub>13</sub>	5
HexCer 38:0;O <sub>3</sub>	0.83	12.70	-	0.01	5.87	C <sub>44</sub> H <sub>87</sub> NO <sub>9</sub>	4
NeuAcHexCer 34:1;O <sub>2</sub>	2.27	2.60	-	-	4.27	C <sub>51</sub> H <sub>94</sub> N <sub>2</sub> O <sub>16</sub>	3
SM 32:1;O <sub>2</sub>	0.91	6.80	-	-	3.06	C <sub>37</sub> H <sub>75</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	2

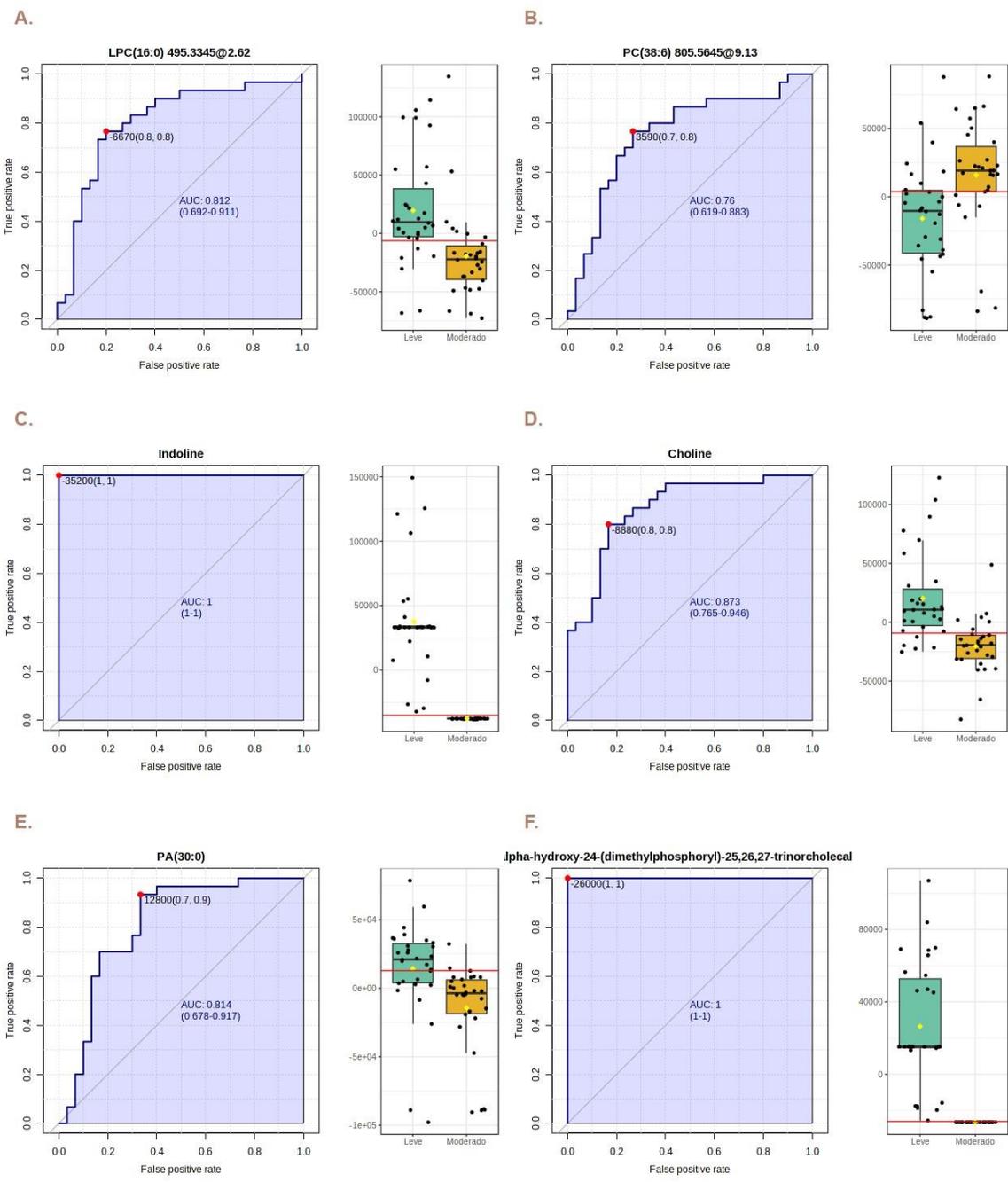
SM 38:1;O2	0.90	12.34	1.41	-	2.26	C <sub>43</sub> H <sub>87</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	2
SM 39:1;O2	0.79	12.70	1.22	0.01	15.92	C <sub>44</sub> H <sub>89</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	2
SM 40:1;O2	0.91	12.91	2.12	-	5.98	C <sub>45</sub> H <sub>91</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	2
SM 40:2;O2	0.91	12.91	1.46	-	4.78	C <sub>45</sub> H <sub>90</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	2
SM 40:2;O2	0.93	12.51	-	-	11.19	C <sub>45</sub> H <sub>89</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	2
SM 41:1;O2	0.83	13.10	1.71	0.03	7.48	C <sub>46</sub> H <sub>93</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	2
SM 41:2;O2	0.86	12.77	1.70	0.02	7.28	C <sub>46</sub> H <sub>91</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	2
SM 42:1;O2	0.83	13.28	2.36	0.05	5.36	C <sub>47</sub> H <sub>95</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	2
SM 44:1;O2	0.98	14.44	-	-	5.88	C <sub>49</sub> H <sub>100</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	3
<b>Lípidos de esteroides</b>							
CE(20:5)	0.97	15.98	-	-	2.76	C <sub>47</sub> H <sub>74</sub> O <sub>2</sub>	2
Glc-Colesterol	0.83	14.36	-	-	8.66	C <sub>51</sub> H <sub>90</sub> O <sub>7</sub>	5

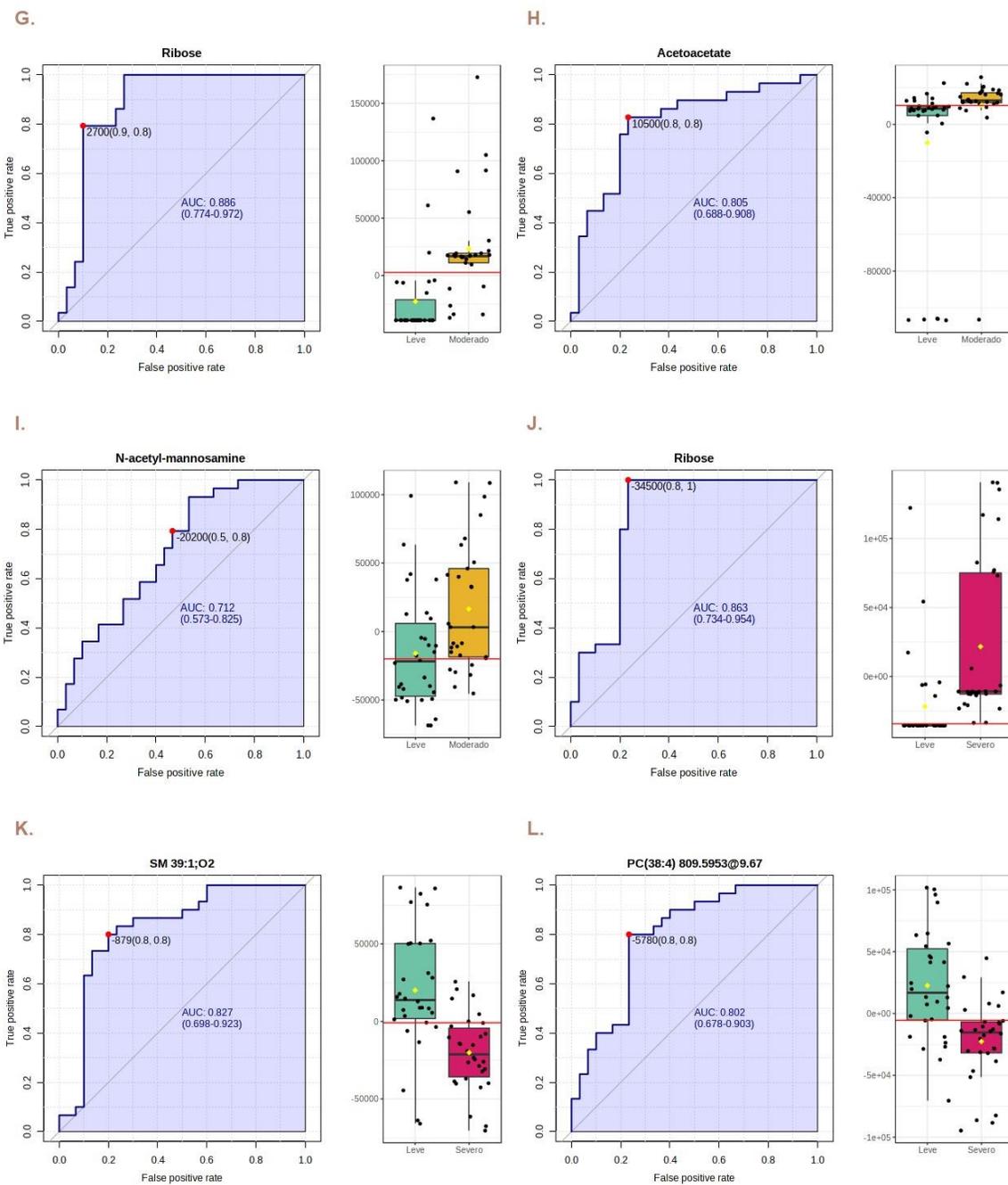
## 5.5 Exploración de marcadores pronóstico

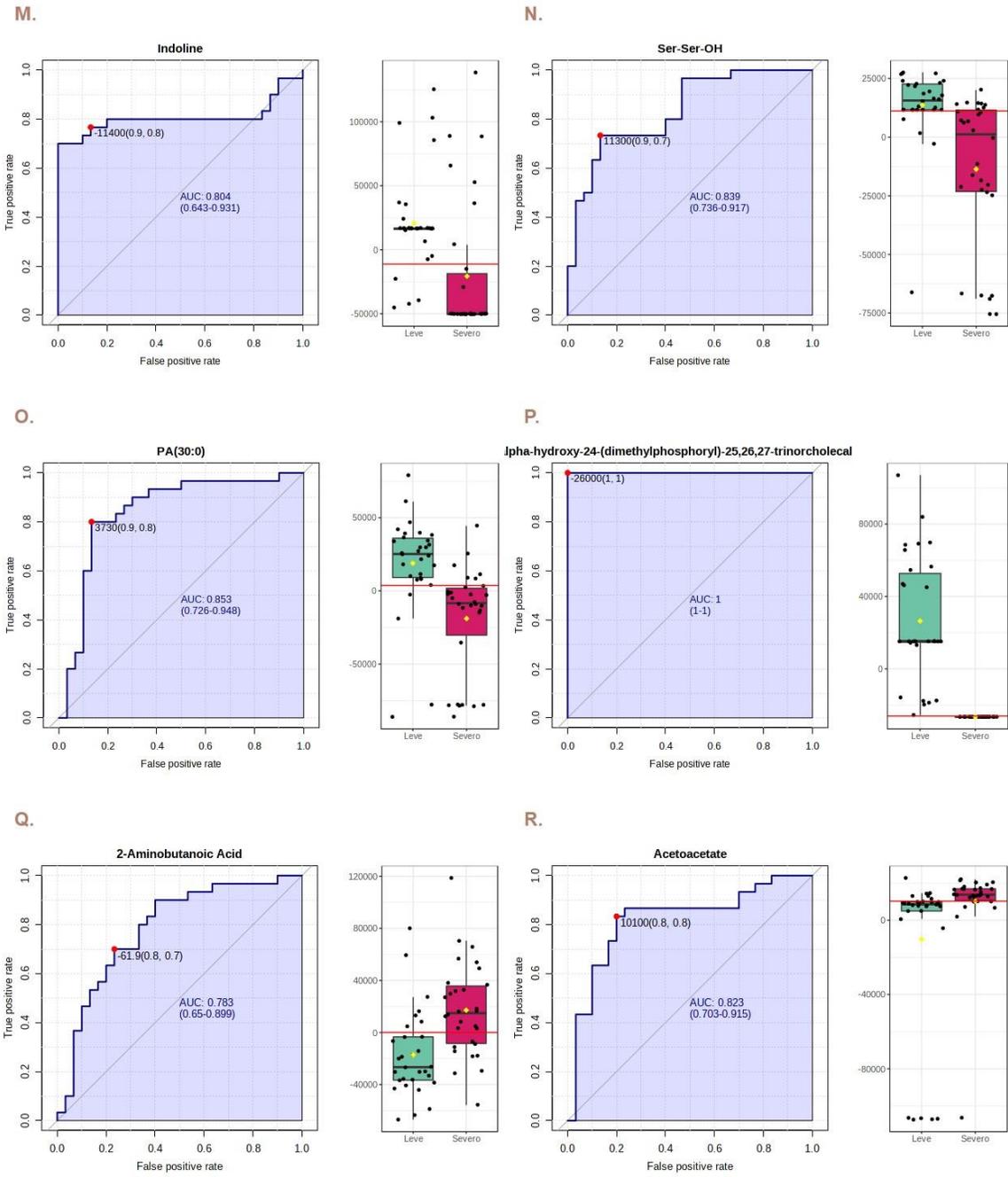
Se realizaron curvas ROC para las comparaciones 2 a 2 de los grupos de estudio, para evaluar posibles marcadores de ingreso a UCI de los pacientes hospitalizados. En la **Figura 5-22** se observan las curvas ROC con un área bajo la curva (AUC) cercano o mayor a 0,8 y una gráfica de cajas para cada metabolito que muestran si el cambio fue al alza o a la baja.

**Figura 5-22. Curvas ROC.** Discriminación de los metabolitos alterados entre los grupos leve (verde) moderado (amarillo), y severo (fucsia) mediante curvas ROC y gráficos de cajas, en cada curva ROC se puede ver su respectivo AUC, sensibilidad y especificidad. **Leve versus moderado:** **A)** LPC(16:0), **B)** PC(38:6), **C)** indolina, **D)** colina, **E)** PA(30:0), **F)** hidroxí-24-(dimetilfosforil)-25,26,27-trinorcolecal, **G)** ribosa, **H)** acetoacetato, **I)** n-acetil-manosamina. **Leve versus severo:** **J)** ribosa, **K)** SM 39:1;O<sub>2</sub>, **L)** PC(38:4), **M)** Indolina, **N)** Ser-Ser-OH, **O)** PA(30:0), **P)** hidroxí-24-(dimetilfosforil)-25,26,27-trinorcolecal, **Q)** ácido aminobutanoico, **R)**

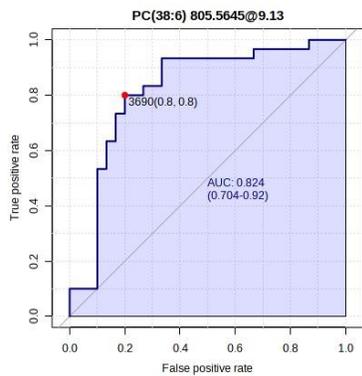
acetoacetato. **Moderado versus severo: S) PC(38:6), T) PC(38:4), U) PC(38:6), V) Ser-Ser-OH, W) ácido 2-hidroxi-3-metilbutírico, X) ácido glutámico.**



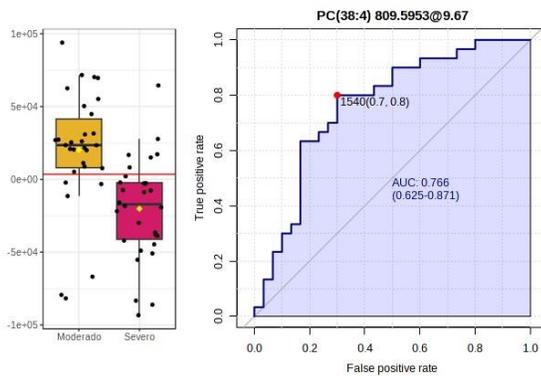




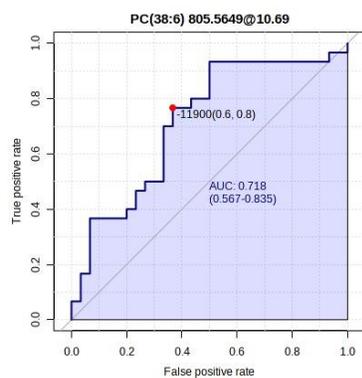
S.



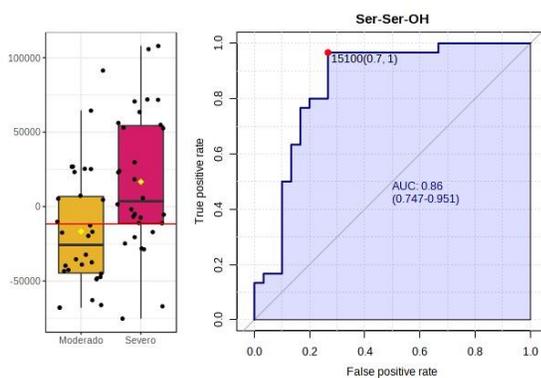
T.



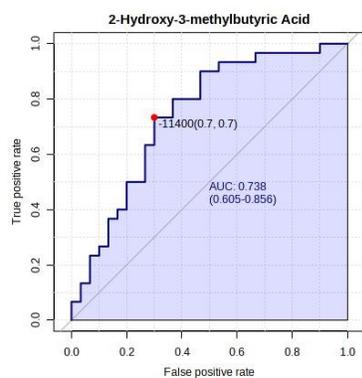
U.



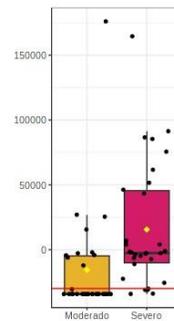
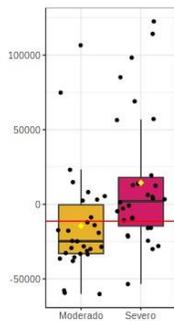
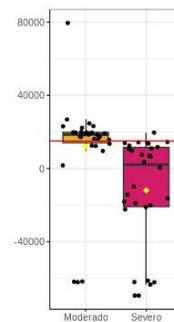
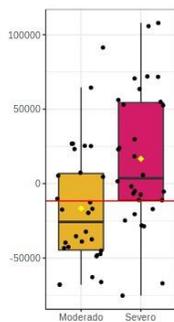
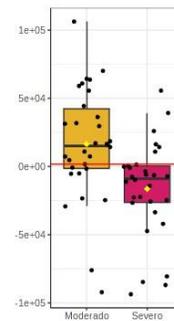
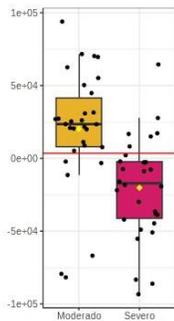
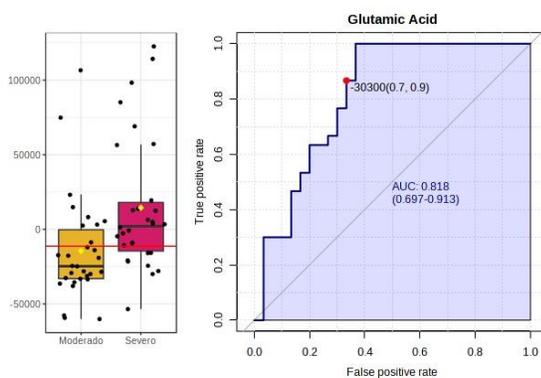
V.



W.



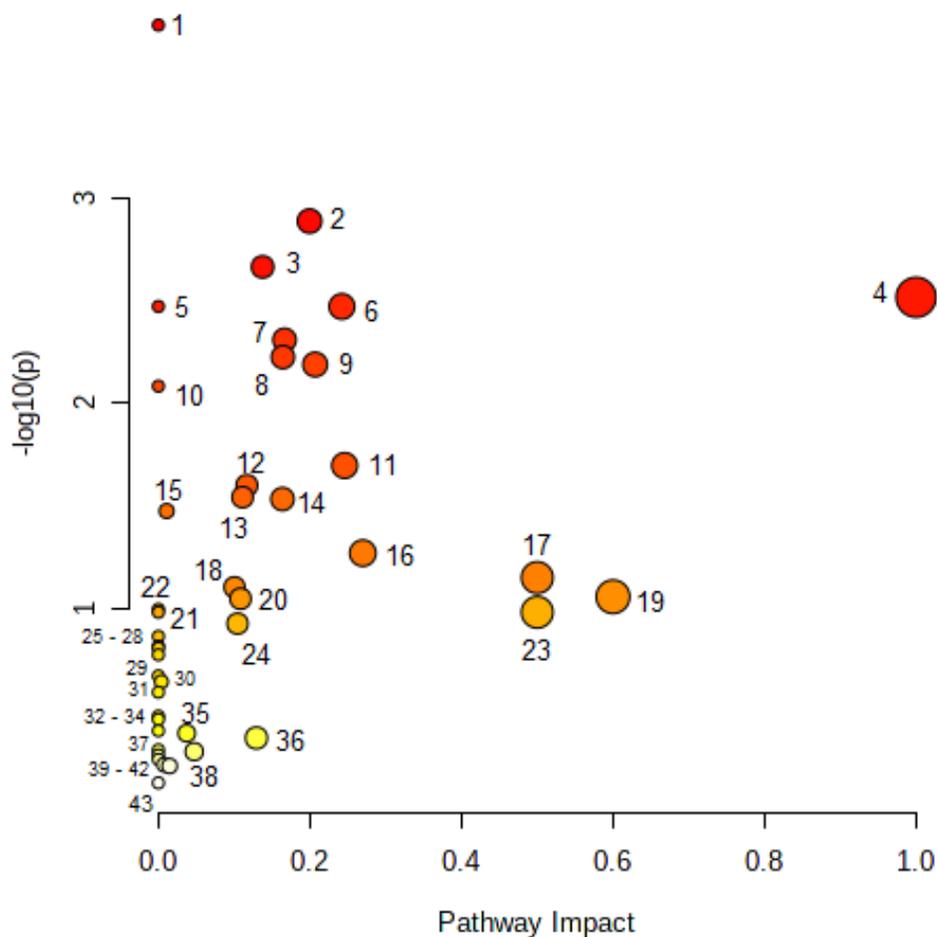
X.



## 5.6 Análisis de vías metabólicas alteradas en pacientes con COVID-19

Mediante la herramienta MetaboAnalyst 5.0 se realizó un análisis de rutas con ID Human Metabolome Database (HMDB) (**Figura 5-23**). Se encontraron principalmente alterados, en orden del mayor a menor, la biosíntesis de aminoacil-ARNt, el metabolismo de alanina, aspartato y glutamato, del glioxilato y dicarboxilato, del ácido linoleico, la biosíntesis de ácidos grasos insaturados, el metabolismo de los glicerofosfolípidos y el ciclo de Krebs (TCA), entre otros.

**Figura 5-23: Rutas bioquímicas alteradas.** El color del nodo se basa en su valor p y el radio del nodo se determina en función de los valores de impacto causados por el SARS-CoV-2 en la ruta, por lo tanto, los valores p menores con valor de impacto más altos reflejan las vías alteradas por relevancia.



<b>RUTAS BIOQUÍMICAS ALTERADAS EN SARS-CoV-2</b>		
<b>N°</b>	<b>Ruta metabólica</b>	<b>P</b>
1	Biosíntesis de aminoacil-tRNA	1.44E-01
2	Metabolismo de alanina, aspartato y glutamato	0.0012965
3	Metabolismo de glioxilatos y dicarboxilatos	0.002166
4	Metabolismo del ácido linoleico	0.0030443
5	Biosíntesis de ácidos grasos insaturados	0.0033752
6	Metabolismo de los glicerofosfolípidos	0.0033752
7	Ciclo de citrato (ciclo TCA)	0.0049029
8	Metabolismo de la tirosina	0.0059505
9	Metabolismo del piruvato	0.0064645
10	Biosíntesis de valina, leucina e isoleucina	0.0082418
11	Metabolismo de la glicina, la serina y la treonina	0.02005
12	Biosíntesis de arginina	0.02505
13	Metabolismo del butanoato	0.028584
14	Metabolismo de la arginina y la prolina	0.029189
15	Degradación de valina, leucina e isoleucina	0.033372
16	Metabolismo de los esfingolípidos	0.053488
17	Biosíntesis de fenilalanina, tirosina y triptófano	0.07039
18	Glucólisis / Gluconeogénesis	0.078339
19	Síntesis y degradación de cuerpos cetónicos	0.087226
20	Metabolismo del glutatión	0.089135
21	Metabolismo de la porfirina y la clorofila	0.10035
22	Metabolismo del nitrógeno	0.10377
23	Metabolismo de D-Glutamina y D-glutamato	0.10377
24	Metabolismo de la cisteína y la metionina	0.11788
25	Metabolismo de ascorbato y aldarato	0.13599
26	Biosíntesis de ubiquinona y otros terpenoides-quinonas	0.15168
27	Degradación de ácidos grasos	0.15499
28	Metabolismo de la fenilalanina	0.16709
29	Metabolismo del ácido alfa-linolénico	0.21173
30	Biosíntesis de ancla de glicosilfosfatidilinositol (GPI)	0.22609
31	Metabolismo de la histidina	0.25406
32	Vía pentosa fosfato	0.33224
33	Metabolismo del propanoato	0.34447
34	Metabolismo de la galactosa	0.39129
35	Sistema de señalización de fosfatidilinositol	0.40248
36	Metabolismo del fosfato de inositol	0.42427
37	Metabolismo del ácido araquidónico	0.48514

---

<b>38</b>	Metabolismo de aminoazúcares y nucleótidos de azúcares	0.49466
<b>39</b>	Elongación de ácidos grasos	0.5132
<b>40</b>	Biosíntesis de esteroides	0.53978
<b>41</b>	Biosíntesis primaria de ácidos biliares	0.57305
<b>42</b>	Biosíntesis de ácidos grasos	0.581
<b>43</b>	Metabolismo de las purinas	0.7019

## 6. Discusión

Una de las características de la COVID-19 es la baja predictibilidad sobre su curso, lo cual ha dificultado su manejo clínico, esta situación ha derivado en la implementación de estrategias que permitan identificar biomarcadores de la evolución de la enfermedad. Por lo tanto, este estudio abordó la caracterización del metaboloma del plasma sanguíneo en una población bogotana de sujetos positivos para SARS-CoV-2, mayores de 18 años, y su relación con el espectro clínico de la enfermedad. Los análisis experimentales y computacionales desarrollados permitieron identificar potenciales biomarcadores metabólicos relacionados con los grupos leve, moderado y severo de COVID-19.

Se realizó un análisis estadístico de los laboratorios clínicos de los pacientes, evidenciando un aumento significativo de la bilirrubina con respecto a la severidad de la enfermedad ( $P = 0,01$ ), este se ha relacionado ampliamente con lesiones en hígado y vías biliares en pacientes críticos que ingresan a UCI (191,192). Sin embargo, los mecanismos de daño hepático no se comprenden totalmente, las hipótesis principales proponen que es por ingreso del virus a las células hepáticas o a las células de las vías biliares mediante el receptor ACE2, por hipoxia, por fármacos o por inflamación (193–196).

Así mismo, reportamos para la población una correlación de la severidad de la COVID-19 con neutrofilia ( $P = 1e-04$ ), los neutrófilos son leucocitos conocidos como productores de citoquinas proinflamatorias, que en estudios previos fueron asociados a un cuadro de inflamación crónica, complicaciones y mal pronóstico de la COVID-19 (197)(198).

Igualmente, monocitosis, que aumentó de pacientes leves a moderados, con ligera disminución en los severos ( $P = 0,01$ ) y la deshidrogenasa láctica ( $P = 0,008$ ), una enzima intracelular de gran relevancia en la glucólisis anaerobia y la síntesis de ADN, que es utilizada como marcador inespecífico de daño orgánico, se encontró particularmente incrementada en el grupo severo, concordante con las complicaciones de los casos severos y el posible desenlace mortal de la COVID-19.

Respecto a los marcadores de inflamación, como la proteína C reactiva ( $P = 0,43$ ), el Dímero D ( $P = 0,24$ ), la Ferritina ( $P = 0,1$ ) y la Procalcitonina ( $P = 2e-04$ ), se encontraron aumentados conforme el grado de severidad, aunque algunos de estos tuvieron un valor p mayor que el nivel de significancia 0.05, se han relacionado previamente como marcadores de severidad de la enfermedad (199)(200), por lo que un valor no significativo podría relacionarse con un número bajo de pruebas de laboratorio para estos analitos particulares en los sujetos de estudio.

Recientemente, ha tomado importancia el papel del metabolismo y su relación con el sistema inmune, durante los últimos años se han hecho grandes hallazgos de lo que ahora se conoce como el inmunometabolismo, en este se estudian las alteraciones en la función de las células inmunitarias y la relación con los cambios en las vías bioquímicas (201). Por lo que aún existe un gran desconocimiento del papel del estrés oxidativo, la señalización inflamatoria, el sistema endocrino, e incluso, en la interacción entre las diferentes vías metabólicas y de señalización celular. El papel del inmunometabolismo ha tomado mayor interés durante la pandemia del COVID-19, en donde algunas comorbilidades asociadas al síndrome metabólico y los procesos inflamatorios se han relacionado a las complicaciones y la mortalidad de la enfermedad (202).

Por lo tanto, cabe recalcar que los antecedentes clínicos de los pacientes en los grupos de este estudio también muestran una estrecha relación entre las patologías crónicas no transmisibles y la gravedad del cuadro desarrollado. Se observó en la población de estudio antecedentes de: diabetes, hipertensión y enfermedad cardiovascular, siendo

estás ya ampliamente descritas en la literatura como factores de riesgo para un desenlace grave o severo de la COVID-19, donde se han evidenciado diferencias con los casos que no presentan dichas comorbilidades. En este estudio el 40 % de los sujetos del grupo severo presentan hipertensión, 20 % diabetes y 20 % enfermedad cardiovascular.

Respecto a las alteraciones metabólicas asociadas al desenlace severo de la COVID-19, en este trabajo de investigación se realizó un abordaje amplio, que incluyó el uso de LC/MS, GC/MS y Lipidómica, con el objetivo de detectar cambios metabólicos asociados a la severidad enfermedad. Por lo que a los pacientes hospitalizados se les tomó una muestra sanguínea el primer día de ingreso, desconociendo el desenlace de la COVID-19. Posteriormente, se tuvieron en cuenta tanto los pacientes que avanzaron a un estado severo e ingresaron a UCI, como los que no lo requirieron. Esto permitió realizar la búsqueda de potenciales marcadores de un desenlace severo en pacientes hospitalizados.

El análisis de componentes principales, realizado para cada plataforma, mostró que los grupos de estudio se separaron tanto entre cohortes como respecto a los controles, lo que indica que el perfil del metaboloma sérico difiere de acuerdo con el desenlace de la COVID-19. Durante el curso de la investigación, se encontraron diferentes grupos de metabolitos alterados, incluyendo glicerofosfolípidos, glicerolípidos, esfingolípidos, ácidos grasos, esteroides, ácidos orgánicos, aminoácidos, carbohidratos, indoles, péptidos, esteroides, fosfocolinas compuestos organonitrogenados y organooxigenados, esto es evidencia de que estamos frente a una patología sistémica que genera afección multiorgánica.

El metabolismo lipídico fue el que mostró un mayor número de metabolitos con variaciones en sus niveles, lo que sugiere que es el metabolismo más alterado. Previamente, otros investigadores han sugerido que el SARS-CoV-2 podría estar reconfigurando el metabolismo de los lípidos e induciendo una remodelación en la

composición lipídica de las membranas celulares (203). Los glicerofosfolípidos, son los principales componentes de las membranas biológicas, de estos se encontraron 45 metabolitos, cuyos niveles varían significativamente en los casos severos, de los cuales 24 estaban al alza, en su mayoría LPA y LPC, y 21 regulados a la baja, principalmente PC.

Referente a las LPC, estas se sintetizan por la acción de la superfamilia de enzimas PLA2, que hidrolizan el ácido graso de la posición sn-2 de la PC de membrana (204), liberando ácido araquidónico al citosol, el cual se asocia a la exacerbación de la enfermedad (203). El ácido araquidónico, deriva en la producción de hormonas eicosanoides, incluyendo, prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, lipoxinas y factores activadores de plaquetas (205), también promueve la exocitosis en macrófagos, desgranulación de mastocitos y eosinófilos, y la producción de citocinas y quimiocinas de macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, monocitos y células endoteliales. Este proceso inflamatorio conlleva a la producción de Especies reactivas del oxígeno (ROS) y al daño oxidativo (206).

Las fosfolipasas se agrupan en 4 categorías, siendo las más estudiadas PLA2 secretora (sPLA2) y PLA2 asociada a lipoproteínas (Lp-PLA2), cada una actúa de manera independiente en el metabolismo de lípidos y se han relacionado con diferentes patologías. Tras secretar LPC, este se hidroliza a LPA y a colina por autotaxina (ATX), una lisofosfolipasa D plasmática (lisoPLD) (204). El aumento de LPC y LPA se ha evidenciado en los pacientes COVID-19 severos, asociado al incremento en la hidrólisis de PC, que a su vez se encuentra disminuido en el plasma sanguíneo. Relacionamos el aumento de LPC y la acción de PLA2 con el proceso inflamatorio en el paciente crítico, esto se ha sugerido previamente en otras patologías, incluyendo el dolor articular crónico y el dolor neuropático (207)(208).

En cuanto a los esfingolípidos, algunas de estas moléculas desempeñan funciones estructurales y biológicas, incluyendo funciones en la regulación de la inflamación, la activación de células inmunitarias, el reconocimiento de agentes exógenos, la

transducción de señales, la motilidad, el crecimiento, la senescencia celular, la diferenciación y el destino celular, ya que están implicadas en la regulación de la vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis. Entre ellas, las ceramidas y la esfingosina-1-fosfato (S1P), han sido las más estudiadas, la primera se ha relacionado con inducción de apoptosis, y la segunda con supervivencia y diferenciación celular (209). Otros estudios describen sus funciones en la respuesta alérgica de los mastocitos y otras células alveolares como los macrófagos y las células epiteliales (210). Además, los esfingolípidos, asociados al colesterol y proteínas de membrana (211), forman balsas lipídicas, las cuales tienen funciones en la homeostasis de la apoptosis (209).

La alteración en el metabolismo de los esfingolípidos se ha evidenciado en diversas enfermedades, incluyendo: infecciones pulmonares y enfermedades respiratorias, como asma (212,213); enfermedades cardiovasculares (214) como miocardiopatía lipotóxica (215), almacenamiento de tejido adiposo, principalmente debido al aumento de ceramidas, como C16:0, inflamación, obesidad, diabetes, neurodegeneración, enfermedades de la piel, pérdida del cabello, afectación en el desarrollo de huesos y cartílagos (216), infecciones virales (217), y cáncer (218), mediante la supervivencia de células tumorales, infiltración y resistencia a quimioterapia. En COVID-19 se ha relacionado con tropismo, replicación y patogenicidad viral (210).

Los intermediarios en la biosíntesis y degradación de los esfingolípidos, que están implicados en varias vías de señalización, y los lípidos esteroides, que se convierten en hormonas, participan en la regulación del tráfico de membranas (219), mediando la unión ligando – receptor en la entrada del virus (220). Por su parte, se describió que el receptor ACE2, desempeña un papel importante en la regulación de lípidos, el estrés en el retículo endoplásmico y la función mitocondrial (221). Algunas alteraciones, principalmente en ceramidas, influyen en la unión del ACE2 al SARS-CoV-2, en un mecanismo dependiente de formación de balsas lipídicas (222), estas se ubican en: membrana plasmática, RE, complejo de Golgi, y en membranas de endosomas y fagosomas, lo que facilitaría el ingreso del virus a las células hospedera (223).

Así mismo, es bien sabido que las balsas lipídicas requieren de colesterol, el aumento de este se ha asociado con la susceptibilidad a adquirir infecciones virales, incluyendo la infección por el virus de la hepatitis murina (MHV) y SARS-CoV-2 (224). Sin embargo, los esteroides son una familia de moléculas con funciones muy amplias, algunos de ellos con funciones como anticancerígenos, antiinflamatorios, inmunomoduladores y antivirales (225,226). En este estudio se identificó al Glc-colesterol, al igual que otros esteroides como CE(20:5), con niveles reducidos en los pacientes frente a controles. Esta reducción de esteroides puede tener varios orígenes, por una parte podría ser la consecuencia del deterioro progresivo de las membranas celulares (227), por regulación a la baja de las enzimas implicadas en su biosíntesis como la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG CoA reductasa) (228), o a su regulación por medio de la proteína de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBP) en el RE, esto asociado a un mecanismo de protección celular en el cual se detiene la síntesis de esteroides cuando hay niveles críticos de colesterol (229).

Otro tipo de lípidos alterados fueron los triacilglicerol (TG) y diacilglicerol (DG), que están estrechamente relacionados con la dependencia del ciclo viral al metabolismo de los glicerolípidos. La síntesis de TG se considera fundamental para la producción de viriones y la formación de gotas de lípidos (LD) (203). Las LD, además de participar en la replicación, están asociadas a producción de ATP a través de la  $\beta$ -oxidación (230), y a la modulación de la producción de mediadores inflamatorios (231). En la generación de LD, participan ácidos grasos como el palmitato, que se convierte a DG y luego en TG por diacilglicerol o-aciltransferasa 1 (DGAT1) y 2 (DGAT2) (232). Además, las proteínas virales como: nsp1, nsp5, orf6 y orf9c, participan en la síntesis de TG, lo que naturalmente provocaría la formación de LD (203).

Los ácidos grasos tienen cadenas hidrocarbonadas compuestas por 4 a 28 carbonos monocarboxílicos (233), ellos varían según su grado de insaturación y ramificaciones, siendo su concentración celular muy baja (102). Los de cadena corta tienen menos de 6 carbonos, los medianos cuentan con 6 a 12 carbonos y los de cadena larga con 12

carbonos o más (234). Se ha reportado, que durante la infección viral los ácidos grasos suelen aumentar debido a su necesidad funcional en la replicación viral, siendo contribuyentes de membranas de vesículas replicativas. Sin embargo, también se ha descrito que los monoacilgliceroles (monopalmitina, monomiristina y monolaurina), presentan propiedades antivirales y previenen infecciones intestinales por coronavirus (235), encontrándose a la baja en pacientes moderados y severos.

Los ácidos grasos, en los casos leves respecto a los moderados, se encontraron regulados a la baja el Metil-buten-ol, el ácido dodecenodioico, el ácido hidroxitetradecanodioico, el heptanol, el ácido heptanoico y el ácido azelaico, y regulados al alza el Beta-hidroxiisovalerato, el ácido palmítico, el ácido linoleico, el ácido esteárico y el ácido oleico. Así mismo, se hallaron a la baja en los casos leves, respecto a los severos, pero incluyendo el ácido hexanoico, a la baja, y al ácido 2-hidroxi-3-metilbutírico, el ácido palmitoleico, el ácido heptadecanoico, regulados al alza. Finalmente, en los casos moderados frente a los severos, se encontró al alza el Metil-buten-ol y el ácido 2-hidroxi-3-metilbutírico.

Los ácidos grasos saturados también cumplen funciones en las vías de la inflamación, como el ácido palmítico, que además, influye en la resistencia a la insulina (236). El ácido palmítico y el ácido esteárico, son los más consumidos en la dieta occidental, y estos se asocian con el incremento del colesterol (237,238). Se ha descrito en COVID-19, que el ácido palmítico modula la producción de citocinas, como IL1 $\beta$ , IL6 e IFNB1; quimiocinas, como CCL2, CCL5 y CXCL8; reguladores de traducción, como EEF1A; factores de transcripción, como FOS y NFkB; moléculas implicadas en la apoptosis, como BAX.; y la expresión de ACE2 (239). Adicionalmente, la palmitoilación de la proteína S del SARS-CoV-2 es esencial en la infectividad viral (240).

En contraste, derivados del ácido palmítico como el ácido palmitoleico, generado por biosíntesis en tejido adiposo e hígado por acción de la esteroil-CoA desaturasa-1, tiene funciones antiinflamatorias. Este se incorpora en fosfolípidos, triacilgliceroles y ésteres

de colesterol, aumentando la lipólisis, el consumo de oxígeno, la oxidación de ácidos grasos y el contenido de ATP en adipocitos, reduciendo la expresión de proteínas superficiales de adhesión, e induciendo la expresión de genes proinflamatorios en células endoteliales estimuladas por TNF $\alpha$ . Sin embargo, la mayoría de estos hallazgos se han realizado in vitro o en ratones, por lo que no es claro su mecanismo en humanos (241,242).

El  $\beta$ -hidroxiisovalerato, se ha asociado a estados de hipoxia, que son más recurrentes con la severidad de la enfermedad. El ácido oléico, se ha vinculado a cuadros clínicos severos debido a que incrementa la actividad de PLA2 (183). Así mismo, el ácido esteárico favorece la inflamación por mecanismos dependientes de la activación del factor nuclear Kappa  $\beta$  (NF-K $\beta$ ), un factor de transcripción que regula la expresión de factores proinflamatorios como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ , que median a su vez la activación del inflammasoma y la muerte celular, realizando un feedback positivo sobre NF-K $\beta$  (243,244). El prenol, Metil-buten-ol, se encontró disminuido en casos moderados respecto a leves, sin embargo, aumentó en los casos severos respecto a los moderados, este se sintetiza a partir de los precursores de carbono isopentenil difosfato y dimetilalil difosfato, que se producen principalmente a través de la vía del ácido mevalónico (245), intermediario en la biosíntesis de colesterol. Sin embargo, se carece de información previa en SARS-CoV-2, por lo que podría considerarse como un potencial marcador de mal pronóstico para COVID-19.

Por su parte, el 2-hidroxi-3 metil butírico, fue el metabolito con la mayor tasa de cambio (FC:1.9), en el grupo severo respecto a moderados. Este ha sido reportado previamente como un posible predictor de severidad (246,247). Si bien se desconoce con precisión el rol de este, se ha relacionado con estados de acidosis láctica y cetoacidosis en humanos (248) (249), trastornos que afectan principalmente pacientes con Síndrome de Dificultad Respiratoria Aguda (SDRA), donde se observa el aumento del metabolismo anaeróbico y por tanto de la LDH (250).

Por lo anterior, se han considerado a los ácidos grasos como moléculas importantes en las infecciones virales, tanto en roles que evitan la acción de ciertos virus, como hace el ácido linolénico al dificultar la unión viral a las células hospederas en el SARS-CoV-2 (251), o desde su papel en la exacerbación de la respuesta inflamatoria por medio de las vías canónicas ya mencionadas.

También se encontraron ácidos orgánicos con alteraciones entre grupos, estos se obtienen de fuentes animales o vegetales y son sintetizados a partir de comunidades microbianas o de manera industrial. Son moléculas que en su estructura cuentan con uno o más grupos de ácido carboxílicos unidos covalentemente con grupos como amidas, ésteres y péptidos. Participan en la degradación de aminoácidos, grasas y carbohidratos (252,253). Los ácidos orgánicos se encontraron al alza en los tres grupos respecto a la severidad, a excepción del ácido cítrico, que está regulado a la baja en el grupo severo en comparación con el grupo leve ( $FC = 0.98$ ). Dentro de los ácidos orgánicos al alza se encontró el ácido pirúvico, láctico y glicólico, entre otros. El ácido fosfórico presentó la mayor variación entre el grupo moderado respecto al leve ( $FC = 1.61$ ), y en severo respecto a leve ( $FC = 1.65$ ), este fue reportado anteriormente por Shi y colaboradores, aunque sus implicaciones metabólicas aún se desconocen, podría ser un factor predictivo de las complicaciones de la enfermedad (247).

Respecto a los aminoácidos, múltiples estudios han expuesto la relevancia del cambio del perfil de aminoácidos en pacientes con COVID-19 (254,255), y su relación con respecto a la severidad de la enfermedad. En este estudio, se detectaron alteraciones en varios aminoácidos, los cuales se encontraron al alza en el grupo severo en comparación con el grupo leve, así como en el grupo severo en comparación con el grupo moderado, a excepción de la prolina, regulada a la baja. El aminoácido con el mayor cambio al alza fue el ácido glutámico, un aminoácido proteinogénico no esencial, sintetizado a partir de la alanina, en la vía aspartato, alfa-cetoglutarato y oxalacetato mediante la acción de transaminasas.

El ácido glutámico es necesario para la síntesis de glutatión (GSH), cisteína y glicina. El GSH, es reconocido como el antioxidante endógeno más importante, se encarga de la eliminación de ROS, protegiendo a las células del estrés oxidativo. Se ha sugerido que durante el COVID-19 el estrés oxidativo genera disminución de oxígeno, aumento de la glucólisis, respuesta exacerbada de la inflamación y aumento de la replicación viral (256), que a su vez está relacionado con el aumento de neutrófilos y citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-8, CXCL10 y TNF- $\alpha$  (257), llevando a mayor producción de ROS y consecuentemente a un estallido oxidativo (258). Aunque no es claro el significado del ácido glutámico durante el COVID-19, se sabe que se incrementa en patologías neoplásicas y psiquiátricas (259), causando una alteración en la homeostasis oxido-reductora (256) y un estado hipercatabólico, con compromiso multiorgánico (260).

Por otra parte, aunque la glucosa es la principal fuente de energía en nuestro organismo, bajo ciertas condiciones patológicas como cáncer, o infecciones virales, ocurre el efecto Warburg, donde el ATP se produce por glicólisis anaeróbica. La glutamina, recarga el ciclo de TCA a través del  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ KG), esta reacción en la que se proporciona un intermediario en el ciclo se denomina anaplerosis. Se cree que la replicación del SARS-CoV-2 en monocitos infectados genera el efecto Warburg y controla la glucólisis para mantener la demanda de ácidos grasos, recargando el ciclo TCA y la lanzadera de malato-aspartato mediante glutaminólisis, que también es fuente de carbono y nitrógeno, manteniendo la replicación y ensamblaje viral (260).

Adicionalmente, se evidenciaron cambios en los niveles plasmáticos del ácido aminobutanoico, un aminoácido no proteínogénico que puede encontrarse en el riñón, hígado, biofluidos y excreciones. Se localiza en el citoplasma a nivel intracelular y es considerado un producto del metabolismo de la metionina, treonina, serina, glicina, y del alfa-cetobutirato (261–264). En el contexto fisiopatológico, se ha detectado en Alzheimer (265), esquizofrenia (266), cáncer colorrectal (267,268), depresión (269,270) y sepsis, en esta última se ha propuesto como un marcador de transición al estado crítico del paciente (271). Recientemente, fue reportado en COVID-19 al alza

comparado con controles sanos (255), resultado que es concordante con lo encontrado en este estudio.

Respecto a los carbohidratos, es bien conocido que son consumidos en la dieta y oxidados para obtener la energía para los procesos metabólicos de las células y los organismos, además, almacenan energía, son un componente estructural y funcionan como marcadores celulares (272). Teniendo en cuenta la amplia variedad de procesos biológicos en lo que participan, es relevante comprender su implicación en la unión e infección viral. Entre los carbohidratos alterados, se encontraron la ribosa y la alosa al alza en casos moderados en comparación con los casos leves: ribosa (FC = 6.87) alosa (FC = 1.26) y en casos severos en comparación con los casos leves: ribosa (FC = 3.27), alosa (FC = 1.98). La relevancia de este hallazgo radica en la importancia de la ribosa en diversos procesos biológicos, en primera medida la ribosa es uno de los productos principales de la vía de las pentosa fosfato, es esencial para la biosíntesis de nucleótidos (273), y está asociada al ADP en la unión al macrodominio Mac1 de la nsp3, el cual cataliza a ADP-ribosa (274,275), por lo que podría estar relacionada con la infección activa del virus y su capacidad de evadir la respuesta inmunitaria innata.

Los otros productos de la vía de las pentosas fosfato, son ribulosa 5-fosfato y xilulosa 5 fosfato, además, esta vía es la principal fuente de NADPH + H<sup>+</sup>, asociada a la biosíntesis de metabolitos como ácidos grasos, a la vía del mevalonato, y a la vía del glutatión. La ruta completa se divide en dos etapas, la primera etapa es oxidante, se producen dos moléculas de NADPH cuando se convierte la glucosa 6-fosfato en ribulosa 5-fosfato y CO<sub>2</sub>, en la segunda etapa, la ribulosa 5-fosfato se convierte en xilulosa 5-fosfato por acción de una epimerasa, y en ribulosa 5-fosfato por una isomerasa. Finalmente, se da la formación de compuestos intermedios de la glicólisis como la fructosa 6-fosfato y el gliceraldehído 3-fosfato. La ribosa 5-fosfato es esencial en la síntesis del ARN y el ADN, y algunos estudios han demostrado que modificaciones en 2' y 3'-ribosa de análogos de nucleótidos inhiben la replicación viral del SARS-CoV-2 (276) Por su parte, la Alosa, se ha reportado alterada en células tumorales, asociado

como supresor del ciclo celular (277), neuroprotector y antiinflamatorio (278). En COVID-19, únicamente se ha reportado disminuida en materia fecal de pacientes (279), por lo que se sugiere como posible marcador de infección en la enfermedad.

Otro tipo de metabolitos alterados fueron los indoles, se obtuvieron en leve versus moderado y en leve versus severo regulados a la baja. El indol es un heterocíclico, consiste en dos anillos unidos, uno de seis bencenos y el otro de cinco pirroles, producto de la degradación del aminoácido triptófano, la información relacionada es limitada, a la fecha se ha reportado que el compuesto 2-((1H-indol-3-il)tio)-N-fenil-acetamida actúa como inhibidor de RdRp del SARS-CoV-2 (280). En otros modelos, se ha descrito que el ácido indolacrílico inhibe el crecimiento del micelio de *Neurospora crassay*, aparentemente por la represión en la triptófano sintetasa, lo que priva a las células de triptófano, reduciendo la tasa de crecimiento (281). También se han descrito funciones antiinflamatorias en enfermedades como la enfermedad inflamatoria intestinal, causada por una disminución de la capacidad bacteriana en la metabolización del triptófano (282).

Los indoles, se han estudiado principalmente por sus propiedades anticancerígenas, actuando mediante la regulación de la vía de la apoptosis y la formación de necrosis. Entre estos están algunos compuestos policíclicos derivados del triptofanol, regulado a la baja en moderados comparados con leves (FC = 0.50), que activan a la proteína supresora p53 y atacan a las células de adenocarcinoma gástrico humano (283) y moléculas sintetizadas, como 3-espiro-indolina-2-onas, clasificadas como anticancerígenas, que además muestran propiedades anti-SARS-CoV-2 (284), mediante mecanismos similares.

Los compuestos nitrogenados, también alterados, se han asociado a la mortalidad en COVID-19 (285). Se encontró la colina a la baja en los pacientes leve en comparación con moderados, Trietanolamina al alza en leve comparado con moderado y leve comparado con severo, y Fosfocolina a la baja en leve comparado con moderado. La colina, se puede obtener a través de la dieta mediante suplementos

dietéticos/alimenticios, y se puede sintetizar de forma endógena en el hígado como fosfatidilcolina. Pertenece a la familia de las vitaminas B y contribuye en la formación de genes, procesos metabólicos y transporte de lípidos. El suplemento de colina prenatal es esencial en el desarrollo cerebral del feto, y disminuye el efecto negativo de infecciones respiratorias virales, incluida la COVID-19 (286).

Como se mencionó anteriormente, el proceso inflamatorio conlleva a la producción de ROS y, por tanto, al daño oxidativo. Esto se ha relacionado en enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, y con manifestaciones neurológicas de la COVID-19, entre las que se ha descrito la “niebla cerebral”, disfunción neuronal y alteración en el metabolismo mitocondrial por déficit de oxígeno (206).

La “niebla cerebral” se presenta con síntomas como mareo, dolor de cabeza, alteración de la conciencia, enfermedad cerebrovascular aguda, convulsiones de ataxia y disfunción del sistema nervioso periférico, manifestándose con olvidos, confusión, dificultad para concentrarse y comunicarse (287). Estos síntomas pueden persistir después de la fase de recuperación de la enfermedad, y son importantes en el estudio del long COVID (206), que afecta al menos a un tercio de los pacientes que ingresaron a hospitalización por COVID-19, lo que podría convertirse en un problema de salud pública mundial a largo plazo (287).

La colina también se ha relacionado con efectos antiinflamatorios y antioxidantes. Estudios comprueban el uso de citicolina (CTN) como neuroprotector, esta se administra por vía oral o parental, y una vez en el intestino se hidroliza a colina y citidina mediante procesos de desfosforilación e hidrólisis. CTN promueve la actividad de la glutatión reductasa aumentando la síntesis de glutatión y favorece la integridad de la membrana mitocondrial inhibiendo la actividad de PLA2, estimula la síntesis de acetilcolina (ACh) cerebral y reduce la peroxidación de lípidos, entre otros (288). Además, el SARS-CoV-2 puede inhibir a sirtuina 1 (SIRT1 o Silent Mating Type Information Regulation Proteins 1), una proteína que protege la plasticidad neuronal,

reduce el estrés oxidativo y mejora la función cognitiva, y CTN ha demostrado regular a SIRT1 contrarrestando los efectos negativos (206).

En cuanto a los esteroides, en la comparación del grupo moderado versus severo, se documentó un metabolito relevante por su posible rol protector: el ácido quenodesoxicólico, una molécula perteneciente a las sales biliares primarias, con funciones reguladoras en el metabolismo de la glucosa y la homeostasis de los ácidos biliares y lipoproteínas, por medio de la vía del receptor X farnesoide (FXR), que favorece la vía de señalización de la insulina y el ingreso de glucosa a los adipocitos (289). Adicionalmente, este metabolito, se relaciona con la formación de sales biliares secundarias: ácido desoxicólico, ácido litocólico y ácido ursodeoxicólico, siendo este último un inmunomodulador en la fisiopatología del SARS-CoV-2, que contrarresta la tormenta de citoquinas y reduce el reclutamiento de monocitos y células natural killer. A pesar de ser esto importante en la comprensión de la enfermedad, su mecanismo no está del todo esclarecido (290).

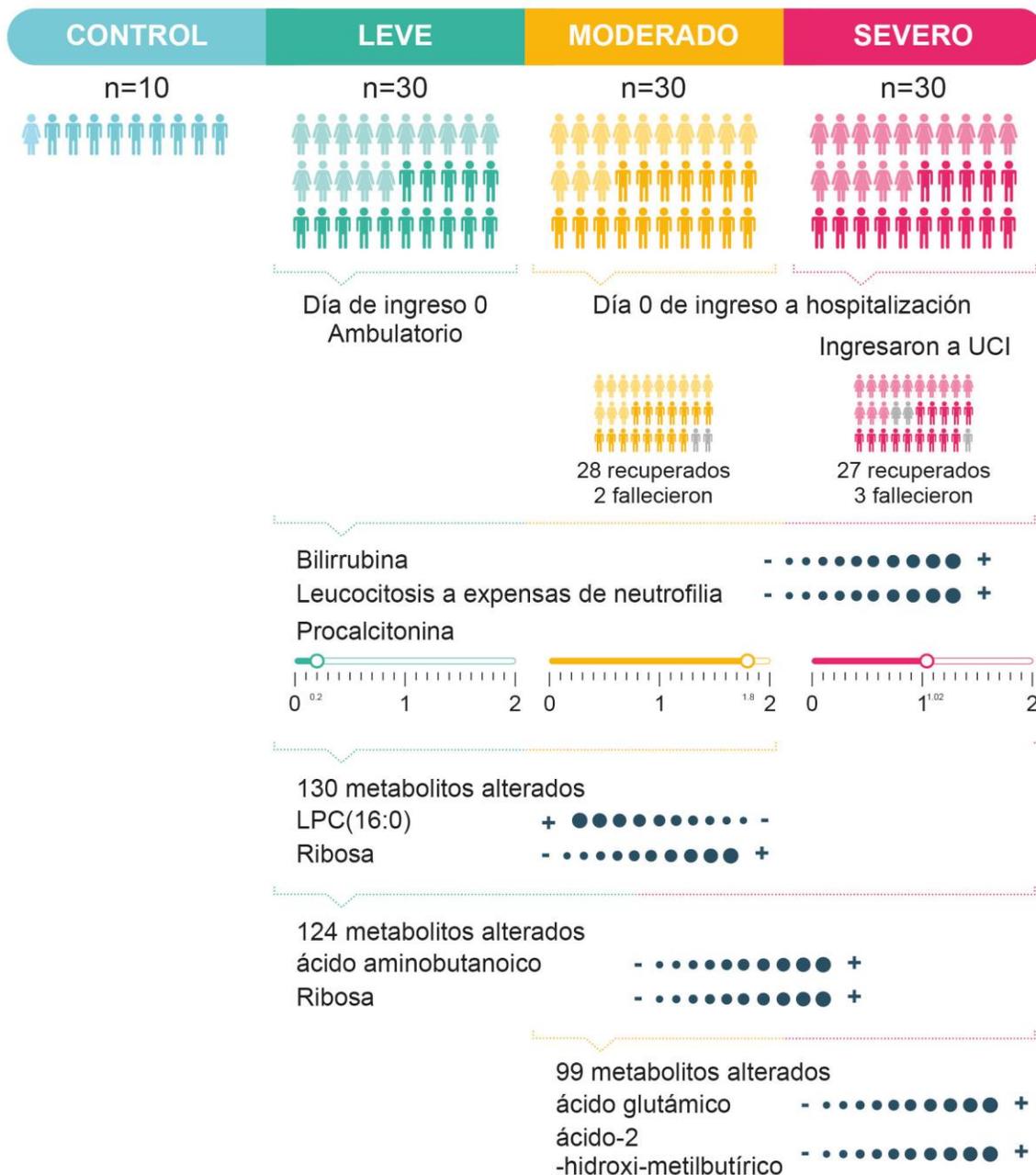
Finalmente, considerando lo mencionado anteriormente, respecto a las comorbilidades que incluyeron diabetes, hipertensión y enfermedades cardiovasculares, a pesar de que no se realizó un análisis estadístico que definiera el nivel de relación entre estas y los metabolitos alterados acá encontrados, debido a un número bajo de pacientes de estudio, se evidenció una asociación cualitativa entre las comorbilidades a los casos moderados y severos, lo cual ya ha sido reportado extensamente. Así mismo, reportamos 148 metabolitos alterados entre los diferentes grupos experimentales, que se encontraron distribuidos entre lípidos (ácidos grasos, glicerolípidos, glicerofosfolípidos, esfinglípidos, y esteroides), carbohidratos (ribosa, alosa, acetilmanosamina, manitol) en su mayoría al alza en los pacientes leves y moderados, sin embargo, regulados a la baja en los pacientes severos, también se reportaron aminoácidos (glicina, ácido glutámico, ácido aminobutanoico, ácido aminomalónico, leucina, metionina, tirosina y prolina) regulados en su mayoría al alza en pacientes moderados y severos, entre otros metabolitos.

La gran variedad de metabolitos alterados encontrados en este trabajo son una posible consecuencia de la falla multiorgánica de la enfermedad, así mismo, varios de estos metabolitos se encuentran asociados a procesos inflamatorios, que adicionalmente se han asociado extensamente al desenlace severo de la COVID-19 y la elevada mortalidad. En cuanto a la búsqueda de metabolitos con poder predictivo, lo que constituye uno de los objetivos de este trabajo, se consideraron aquellos metabolitos que en los análisis estadísticos presentaron un valor mayor significancia estadística, con tasas de cambio superior a 1.5 o menor a 0.5, y un AUC cercano a 1.0.

En este sentido, hemos determinado que en el progreso de la enfermedad de leve a moderado se asocia con la reducción de la lisofosfaditilcolina (LPC) (16:0). En una comparación del grupo severo respecto al leve se observó incremento de la ribosa, al igual que en el grupo moderado, sin embargo, la ribosa disminuyó en los pacientes severos en comparación con el grupo moderado. Respecto a este metabolito, al estar asociado a tantos procesos metabólicos se ve alterado por diversas causas, será necesario profundizar en su rol en la COVID-19 para confirmar su potencial como marcador de mal pronóstico. El ácido aminobutanoico por su parte, se encontró al alza, podría estar asociado al estrés oxidativo e inflamación, característico el estado crítico del paciente COVID-19.

Finalmente, en la comparación entre el grupo moderado y severo, en donde la enfermedad pasa a un estado crítico y la mortalidad se incrementa en este grupo de pacientes entre el 20 y el 32 % dependiendo la población, encontramos asociado el incremento del ácido glutámico asociado a un estado hipercatabólico y compromiso multiorgánico. Por otro lado el papel del ácido 2-hidroxi-3-metilbutírico, que también fue encontrado al alza por Shi y colaboradores (247), no está totalmente descrito. Estos resultados adicionalmente demuestran que hay cambios en el metaboloma que anteceden el estado crítico del paciente y por lo tanto son marcadores del desenlace severo y son susceptibles de ser usado como marcadores.

**Figura 6-24. Identificación de marcadores pronósticos de severidad.** Se realizó metabolómica y lipidómica no dirigida en 4 grupos de estudio, uno control, y tres de pacientes con COVID-19, confirmado mediante RT-PCR, divididos en leve, moderado y severo, según el cuadro clínico. En la gráfica se puede observar los detalles de la toma de la muestra, así como los metabolitos relevantes para cada comparación entre grupos.





# 7. Conclusiones y recomendaciones

## 7.1 Conclusiones

Este es el primer proyecto que identifica cambios en el metaboloma en plasma sanguíneo de pacientes COVID-19, con diferentes estados de la enfermedad en una población Bogotana. Cabe destacar, que entender el papel de la hiperinflamación sistémica en COVID-19 es algo vital para el manejo y seguimiento de los pacientes, en este estudio se encontraron diferentes vías alteradas que conllevan a la exacerbación de la respuesta inflamatoria y, por tanto, a la complicación de la enfermedad. Además, las vías principalmente afectadas están relacionadas con las enfermedades de base como obesidad, diabetes y enfermedades cardiovasculares.

Hasta donde se sabe la ribosa no juega un papel específico en el metabolismo de virus o en la enfermedad, queda abierta la posibilidad de que en futuras investigaciones se revele un papel más importante de este metabolito en la COVID-19. Además, se encontró por primera vez en población bogotana el ácido glutámico incrementado en pacientes hospitalizados que tuvieron posteriores complicaciones avanzando a un estado crítico, sugiriéndolo como un potencial marcador de mal pronóstico. Los metabolitos alterados en la comparación de los grupos moderado y severo representan los cambios asociados a la complicación de la enfermedad, ya que la muestra fue tomada en hospitalización para todos los pacientes, sin conocer el curso de la enfermedad de cada uno. Los resultados de este estudio podrían sentar las bases de un plan a largo plazo para futuros brotes o enfermedades causadas por los coronavirus.

Asociamos el ácido 2-hidroxi-3-metilbutírico como factor pronóstico de severidad, que está relacionado con un estado hipercatabólico y compromiso multiorgánico, a pesar de que no se ha determinado su papel en la enfermedad, este fue reportado previamente.

## 7.2 Recomendaciones

Aunque este estudio buscó brindar una visión del metabolismo en la patogénesis, el diagnóstico y el tratamiento de COVID-19, se presentaron algunas limitaciones que deben abordarse en estudios futuros. Primero, la severidad de la enfermedad se ha asociado con la edad del paciente, en este estudio se tuvieron en cuenta pacientes mayores de 18 años, pero no hubo un filtro riguroso. En segundo lugar, estudiamos principalmente alteraciones metabólicas reflejadas en el plasma sanguíneo, sin embargo, al ser una enfermedad que causa falla multiorgánica, quedan aún vacíos en el papel de la metabolómica en órganos como el hígado y pulmones. Finalmente, los metabolitos asociados como factores pronósticos requieren de estudios más profundos para su determinación de manera rutinaria en la clínica.

# A. Anexo: Consentimiento informado

## FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

### **ESTUDIO DE FACTORES PRONÓSTICOS DE INGRESO A UNIDAD DE CUIDADO INTENSIVO Y MORTALIDAD A TRAVÉS PERFILES METABOLÓMICOS EN SUJETOS SEROPOSITIVOS PARA SARS-CoV-2 EN UNA POBLACIÓN BOGOTANA**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) denominó COVID-19 al responsable del Síndrome Respiratorio Agudo Severo originado en la capital de la provincia de Hubei, China. Se logró identificar al virus SARS-CoV-2, hasta entonces desconocido, como el agente causal. Luego de su aparición y desde el mes de diciembre de 2019, se ha presentado un crecimiento exponencial de los casos y se ha descrito la sintomatología de la enfermedad, que comprende fiebre, tos seca, fatiga, mialgia y disnea. En los estadios severos, los síntomas evolucionan a dificultad respiratoria aguda que puede llegar a ser letal. En lo transcurrido del 2020, el COVID-19 se ha extendido a diferentes regiones del mundo por lo que se considera una pandemia. En la actualidad, no existe un medicamento seguro y específico ni vacuna para su prevención.

Considerando estos antecedentes y teniendo en cuenta la importancia de identificar factores modificables y no modificables que puedan contribuir a la evolución clínica de individuos colombianos enfermos de COVID-19, el proyecto propone un estudio en dichos pacientes analizando, mediante métodos moleculares, los perfiles metabólicos en muestras biológicas de sangre periférica, y su asociación con el pronóstico y parámetros clínicos de personas infectadas por el SARS-CoV-2 (agente causal de la COVID-19).

La metodología consiste en tomar una muestra de sangre periférica por venopunción la cual conlleva para el participante mayor de edad un **RIESGO MÍNIMO** de acuerdo con la **Resolución No. 8430 de 1993 del Ministerio de Salud y Protección Social, Art.11, numeral b:**

*“Investigación con riesgo mínimo: Son estudios prospectivos que emplean el registro de datos a través de procedimientos comunes consistentes en: exámenes físicos o psicológicos de diagnóstico o tratamientos rutinarios, entre los que se consideran: pesar al sujeto, electrocardiogramas, pruebas de agudeza auditiva, termografías, colección de excretas y secreciones externas, obtención de placenta durante el parto, recolección de líquido amniótico al romperse las membranas, obtención de saliva, dientes decíales y dientes permanentes extraídos por indicación terapéutica, placa dental y cálculos removidos por procedimientos profilácticos no invasores, corte de pelo y uñas sin causar desfiguración, extracción de sangre por punción venosa en adultos en buen estado de salud, con frecuencia máxima de dos veces a la semana y volumen máximo de 450 ml en dos meses excepto durante el embarazo, ejercicio moderado en voluntarios sanos, (...)”*

Es importante saber que extraer sangre de algunas personas puede ser más difícil que de otras, en este sentido los riesgos de la extracción de sangre incluyen aparición de un dolor leve e hinchazón alrededor del sitio de la venopunción. Otros riesgos asociados con la extracción de sangre son leves, pero pueden ser: sangrado excesivo, sensación de mareo, generación de hematoma (acumulación de sangre debajo de la piel) infección (un riesgo leve cada vez que se presenta ruptura de la piel). Frente a esto se tomarán todas las medidas para prevenir la infección. Pero se prevé que lo único que puede llegar a sentir es un dolor leve.

Los futuros resultados aportarán al establecimiento de políticas de Salud Pública y al descubrimiento de nuevos factores pronósticos que contribuyan al entendimiento de la patogénesis, de la susceptibilidad y al grado de severidad clínica ocasionado por el SARS-CoV-2 en los pacientes colombianos.

Esta participación es completamente voluntaria, el participante no recibirá ninguna remuneración y no debe realizar ningún aporte económico. El participante debe tener conocimiento de los objetivos de esta investigación y que habrá un manejo ético y correcto por parte de los investigadores del Instituto de Genética de la Universidad Nacional, Centro de Metabólica de la Universidad de los Andes y el Biorepositorio Unisanitas; estos contarán con la información personal y datos metabólicos en estudio los cuales estarán consignados en la historia clínica y en las bases de datos debidamente custodiadas. Al igual en cualquier momento, de acuerdo con las circunstancias y el estado de la investigación, usted tiene la posibilidad de obtener información sobre los resultados de los estudios realizados a la muestra. Por último, el participante tiene la libertad para retirar este consentimiento y no seguir participando en la investigación, sin ningún efecto negativo para su integridad física ni moral y no afectará el tratamiento médico que esté recibiendo.

Yo \_\_\_\_\_ con C.C. No \_\_\_\_\_  
acepto voluntariamente la participación en el proyecto de investigación **“ESTUDIO DE FACTORES PRONÓSTICOS DE INGRESO A UNIDAD DE CUIDADO INTENSIVO Y MORTALIDAD A TRAVÉS PERFILES METABOLÓMICOS EN SUJETOS SEROPositivos PARA SARS-CoV-2 EN**

**UNA POBLACIÓN BOGOTANA**", que se adelanta en el Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia en asociación con el Biorepositorio Unisanitas y el Centro de Metabolómica de la Universidad de los Andes, el cual tiene como objetivo general estudiar la relación entre los perfiles metabolómicos con la evolución clínica, pronóstico y desarrollo de la COVID-19 en personas colombianas positivas para SARS-CoV-2.

Autorizo que de ser necesario se publique con fines científicos los datos de la historia clínica y de los análisis metabolómicos realizados, bajo las normas nacionales (**Resolución No. 8430 de 1993 del Ministerio de Salud y Protección Social especialmente los artículos 5, 7, 8 y 11, y la Ley Estatutaria de 1581 de 2012 de protección de datos personales**) e internacionales (**Normas de Buenas Prácticas de Investigación Clínica - GCP, la Declaración de Helsinki y Fortaleza – Brasil 2013**) que regulan estas actividades. Además, reconozco que no se dará a conocer ningún tipo de identificación personal, se mantendrá la privacidad y que los datos obtenidos sólo podrán ser utilizados con fines investigativos.

Acepto que se me han resuelto todas las dudas y he entendido las explicaciones que me han dado los investigadores, teniendo derecho a recibir información actualizada durante el estudio. En caso de causar algún daño como consecuencia del estudio, el paciente dispondrá de tratamiento e indemnización correspondiente.

Confirmando que he leído, me han explicado el formato de consentimiento informado versión 01, en la fecha / / , para el presente estudio, que tengo 18 años o más y entiendo que los investigadores, el Comité de Ética e Investigaciones y las autoridades regulatorias serán las únicas personas que podrán observar mis registros de salud.

**Participante,**

Firma: \_\_\_\_\_  
 Nombre: \_\_\_\_\_  
 C.C.: \_\_\_\_\_  
 Dirección: \_\_\_\_\_  
 Teléfono: \_\_\_\_\_  
 Fecha y hora: / / - \_\_\_\_\_

**Investigador principal,**

Firma: \_\_\_\_\_  
 Nombre: \_\_\_\_\_  
 C.C.: \_\_\_\_\_  
 Dirección: \_\_\_\_\_  
 Teléfono: \_\_\_\_\_  
 Fecha y hora: / / - \_\_\_\_\_

**Testigo 1,**

Firma: \_\_\_\_\_  
Nombre: \_\_\_\_\_  
C.C.: \_\_\_\_\_  
Parentesco: \_\_\_\_\_  
Dirección: \_\_\_\_\_  
Teléfono: \_\_\_\_\_  
Fecha y hora:    /    /    - \_\_\_\_\_

**Testigo 2**

Firma: \_\_\_\_\_  
Nombre: \_\_\_\_\_  
C.C.: \_\_\_\_\_  
Parentesco: \_\_\_\_\_  
Dirección: \_\_\_\_\_  
Teléfono: \_\_\_\_\_  
Fecha y hora:    /    /    - \_\_\_\_\_





## Referencias

1. Alsharif W, Qurashi A. Effectiveness of COVID-19 diagnosis and management tools: A review. Radiogr (London, Engl 1995). 2021 May 1;27(2):682. Available from: [/pmc/articles/PMC7505601/](#)
2. COVID Live Update: Cases and Deaths from the Coronavirus - Worldometer. Available from: [https://www.worldometers.info/coronavirus/?utm\\_campaign=homeAdvegas1?](https://www.worldometers.info/coronavirus/?utm_campaign=homeAdvegas1?)
3. El Coronavirus en Colombia. Available from: <https://coronaviruscolombia.gov.co/Covid19/index.html>
4. OMS O mundial de la salud. Nuevo coronavirus 2019. Available from: [https://www.who.int/es/emergencias/diseases/novel-coronavirus-2019?gclid=EAIaIQobChMI\\_8Tlx6iE9AIViYKGCh0H1ADqEAAYASAAEgLfD PD\\_BwE](https://www.who.int/es/emergencias/diseases/novel-coronavirus-2019?gclid=EAIaIQobChMI_8Tlx6iE9AIViYKGCh0H1ADqEAAYASAAEgLfD PD_BwE)
5. Jiang S, Hillyer C, Du L. Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2 and Other Human Coronaviruses. Trends Immunol 2020 May 1;41(5):355. Available from: [/pmc/articles/PMC7129017/](#)
6. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. Lancet (London, England). 2020 Feb 15;395(10223):497. Available from: [/pmc/articles/PMC7159299/](#)
7. Hu TY, Frieman M, Wolfram J. Insights from nanomedicine into chloroquine efficacy against COVID-19. Nat Nanotechnol. 2020 Apr 1;15(4):1. Available from: [/pmc/articles/PMC7094976/](#)
8. OMS. La OMS interrumpe los grupos de tratamiento de la COVID-19 con

- hidroxicloroquina y con la combinación lopinavir/ritonavir. Available from: <https://www.who.int/es/news/item/04-07-2020-who-discontinues-hydroxychloroquine-and-lopinavir-ritonavir-treatment-arms-for-covid-19>
9. Xia S, Zhang Y, Wang Y, Wang H, Yang Y, Gao GF, et al. Safety and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine, BBIBP-CorV: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 trial. *Lancet Infect Dis.* 2021 Jan 1;21(1):39. Available from: </pmc/articles/PMC7561304/>
  10. Thanh Le T, Andreadakis Z, Kumar A, Gómez Román R, Tollefsen S, Saville M, et al. The COVID-19 vaccine development landscape. *Nat Rev Drug Discov.* 2020 May 1;19(5):305–6.
  11. Ura T, Yamashita A, Mizuki N, Okuda K, Shimada M. New vaccine production platforms used in developing SARS-CoV-2 vaccine candidates. *Vaccine.* 2021 Jan 8;39(2):197. Available from: </pmc/articles/PMC7685034/>
  12. Chakraborty S, Mallajosyula V, Tato CM, Tan GS, Wang TT. SARS-CoV-2 vaccines in advanced clinical trials: Where do we stand? *Adv Drug Deliv Rev.* 2021 May 1;172:314. Available from: </pmc/articles/PMC7816567/>
  13. OMS. Enfermedad por el coronavirus (COVID-19): Vacunas. Available from: [https://www.who.int/es/emergencias/diseases/novel-coronavirus-2019/question-and-answers-hub/q-a-detail/coronavirus-disease-\(covid-19\)-vaccines?adgroupsurvey=%7Badgroupsurvey%7D&gclid=Cj0KCQiAi9mPBhCJARIsAHchl1xgy5gL27gOo\\_IHIJ7Je7rmbUnhm8OQcOJwqZrFxb2yXkrV](https://www.who.int/es/emergencias/diseases/novel-coronavirus-2019/question-and-answers-hub/q-a-detail/coronavirus-disease-(covid-19)-vaccines?adgroupsurvey=%7Badgroupsurvey%7D&gclid=Cj0KCQiAi9mPBhCJARIsAHchl1xgy5gL27gOo_IHIJ7Je7rmbUnhm8OQcOJwqZrFxb2yXkrV)
  14. OMS. Lo que debe saber sobre la vacuna de Pfizer-BioNTech (BNT162b2) contra la COVID-19. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/feature-stories/detail/who-can-take-the-pfizer-biontech-covid-19--vaccine-what-you-need-to-know>
  15. Awadasseid A, Wu Y, Tanaka Y, Zhang W. Current advances in the development of SARS-CoV-2 vaccines. *Int J Biol Sci.* 2021;17(1):8. Available from: </pmc/articles/PMC7757035/>
  16. Baig AM. Computing the Effects of SARS-CoV-2 on RespirationRegulatory Mechanisms in COVID-19. *ACS Chem Neurosci.* 2020 Aug 19;11(16):2416.

- Available from: [/pmc/articles/PMC7422910/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/322910/)
17. Irabien-Ortiz Á, Carreras-Mora J, Sionis A, Pàmies J, Montiel J, Tauron M. Fulminant myocarditis due to COVID-19. *Rev Española Cardiol (English Ed)*. 2020 Jun 1;73(6):503–4. Available from: <http://www.revespcardiol.org/en-fulminant-myocarditis-due-covid-19-articulo-S1885585720301651>
  18. Garot J, Amour J, Pezel T, Dermoch F, Messadaa K, Felten M-L, et al. SARS-CoV-2 Fulminant Myocarditis. *JACC Case Reports*. 2020 Jul;2(9):1342. Available from: [/pmc/articles/PMC7274592/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3274592/)
  19. Gauchotte G, Venard V, Segondy M, Cadoz C, Esposito-Fava A, Barraud D, et al. SARS-Cov-2 fulminant myocarditis: an autopsy and histopathological case study. *Int J Legal Med*. 2021 Mar 1;135(2):1. Available from: [/pmc/articles/PMC7779100/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3779100/)
  20. Schrimpe-Rutledge AC, Codreanu SG, Sherrod SD, McLean JA. Untargeted metabolomics strategies – Challenges and Emerging Directions. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2016 Dec 1;27(12):1897. Available from: [/pmc/articles/PMC5110944/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3110944/)
  21. Jang C, Chen L, Rabinowitz JD. Metabolomics and isotope tracing. *Cell*. 2018 May 3;173(4):822. Available from: [/pmc/articles/PMC6034115/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3034115/)
  22. Sreepadmanabh M, Sahu AK, Chande A. COVID-19: Advances in diagnostic tools, treatment strategies, and vaccine development. *J Biosci*. 2020 Dec 1;45(1). Available from: [/pmc/articles/PMC7683586/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37683586/)
  23. V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol* 2020 193. 2020 Oct 28;19(3):155–70. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41579-020-00468-6>
  24. Naqvi AAT, Fatima K, Mohammad T, Fatima U, Singh IK, Singh A, et al. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2020 Oct 1;1866(10):165878. Available from: [/pmc/articles/PMC7293463/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3293463/)
  25. B Hu, H Guo, P Zhou, ZL Shi. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-

- 
19. Nat Rev Microbiol. 2021 Mar 1;19(3):141–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33024307/>
  26. Chung JY, Thone MN, Kwon YJ. COVID-19 vaccines: The status and perspectives in delivery points of view. *Adv Drug Deliv Rev.* 2021 Mar 1;170:1. Available from: [/pmc/articles/PMC7759095/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33024307/)
  27. Habas K, Nganwuchu C, Shahzad F, Gopalan R, Haque M, Rahman S, et al. Resolution of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Emerg Infect Dis.* 2020;18(12):1201–11. Available from: <https://doi.org/10.1080/1478721020201797487>
  28. Ahn D-G, Shin H-J, Kim M-H, Lee S, Kim H-S, Myoung J, et al. Current Status of Epidemiology, Diagnosis, Therapeutics, and Vaccines for Novel Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *J Microbiol Biotechnol.* 2020 Mar 28;30(3):313–24. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14787210.2020.1797487>
  29. Gao Z, Xu Y, Sun C, Wang X, Guo Y, Qiu S, et al. A systematic review of asymptomatic infections with COVID-19. *J Microbiol Immunol Infect.* 2021 Feb 1;54(1):12. Available from: [/pmc/articles/PMC7227597/](https://www.jmb.or.kr/journal/view.html?doi=10.4014/jmb.2003.03011)
  30. Organization PAH. Epidemiological Update: Coronavirus disease (COVID-19). *Pan Am Heal Organ.* 2021 Aug 21; Available from: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/54717>
  31. Atzrodt CL, Maknojia I, McCarthy RDP, Oldfield TM, Po J, Ta KTL, et al. A Guide to COVID-19: a global pandemic caused by the novel coronavirus SARS-CoV-2. *FEBS J.* 2020 Sep 1;287(17):3633–50. Available from: [/pmc/articles/PMC7283703/?report=abstract](https://www.febs.org/doi/abs/10.1111/febs.46111)
  32. OMS. Seguimiento de las variantes del SARS-CoV-2. 2021. Available from: <https://www.who.int/es/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/tracking-SARS-CoV-2-variants>
  33. Yan W, Zheng Y, Zeng X, He B, Cheng W. Structural biology of SARS-CoV-2: open the door for novel therapies. *Signal Transduct Target Ther* 2022 71.

- 2022 Jan 27;7(1):1–28. Available from:  
<https://www.nature.com/articles/s41392-022-00884-5>
34. Instituto Nacional de salud de C. Noticias coronavirus-casos. 2021. Available from: <https://www.ins.gov.co/Noticias/Paginas/coronavirus-casos.aspx>
  35. Instituto Nacional de salud de C. COVID-19 en Colombia, Reporte diario. 2022. Available from:  
<https://www.ins.gov.co/Noticias/paginas/coronavirus.aspx>
  36. Organización Panamericana de la Salud (OPS). REPORTE: Situación COVID-19 Colombia. 2022.
  37. Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. *Coronaviruses*. 2015 Feb 26;1282:1. Available from:  
</pmc/articles/PMC4369385/>
  38. Wang F, Kream RM, Stefano GB. An Evidence Based Perspective on mRNA-SARS-CoV-2 Vaccine Development. *Med Sci Monit*. 2020;26:e924700-1. Available from: </pmc/articles/PMC7218962/>
  39. Hardenbrook NJ, Zhang P. A structural view of the SARS-CoV-2 virus and its assembly. *Curr Opin Virol*. 2022 Feb 1;52:123–34.
  40. Ke Z, Oton J, Qu K, Cortese M, Zila V, McKeane L, et al. Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions. *Nat* 2020 5887838. 2020 Aug 17;588(7838):498–502. Available from:  
<https://www.nature.com/articles/s41586-020-2665-2>
  41. Alfonso Accinelli R, Zhang Xu CM, Ju Wang J-D, Yachachin-Chávez JM, Cáceres-Pizarro JA, Tafur-Bances KB, et al. COVID-19: LA PANDEMIA POR EL NUEVO VIRUS SARS-CoV-2. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2020 Apr 20;37(2):302–11. Available from:  
<https://www.scielosp.org/pdf/rpmesp/2020.v37n2/302-311/es>
  42. Kirtipal N, Bharadwaj S, Kang SG. From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. *Infect Genet Evol*. 2020 Nov 1;85:104502. Available from:  
</pmc/articles/PMC7425554/>

43. Benavides-Rosero MF, Benavides-Rosero MF. COVID-19 y la pandemia global causada por un nuevo coronavirus. *Univ y Salud*. 2020 Dec 10;22(3):299–314. Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0124-71072020000400299&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0124-71072020000400299&lng=en&nrm=iso&tlng=es)
44. Harrison AG, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends Immunol*. 2020 Dec 1;41(12):1100. Available from: </pmc/articles/PMC7556779/>
45. Arya R, Kumari S, Pandey B, Mistry H, Bihani SC, Das A, et al. Structural insights into SARS-CoV-2 proteins. *J Mol Biol*. 2021 Jan 22;433(2):166725. Available from: </pmc/articles/PMC7685130/>
46. Giovanetti M, Benedetti F, Campisi G, Ciccozzi A, Fabris S, Ceccarelli G, et al. Evolution patterns of SARS-CoV-2: Snapshot on its genome variants. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021 Jan 29;538:88. Available from: </pmc/articles/PMC7836704/>
47. Flower TG, Buffalo CZ, Hooy RM, Allaire M, Ren X, Hurley JH. Structure of SARS-cov-2 ORF8, a rapidly evolving immune evasion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021 Jan 12;118(2). Available from: </pmc/articles/PMC7812859/>
48. Huang Y, Yang C, Xu X feng, Xu W, Liu S wen. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antivirus drug development for COVID-19. *Acta Pharmacol Sin* 2020 419. 2020 Aug 3;41(9):1141–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41401-020-0485-4>
49. Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2021 231. 2021 Oct 5;23(1):3–20. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41580-021-00418-x>
50. Groves DC, Rowland-Jones SL, Angyal A. The D614G mutations in the SARS-CoV-2 spike protein: Implications for viral infectivity, disease severity and vaccine design. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021 Jan 29;538:104.

- Available from: [/pmc/articles/PMC7643658/](#)
51. Zhang J, Cai Y, Xiao T, Lu J, Peng H, Sterling SM, et al. Structural impact on SARS-CoV-2 spike protein by D614G substitution. *Science*. 2021 Apr 30;372(6541):525. Available from: [/pmc/articles/PMC8139424/](#)
  52. Wang MY, Zhao R, Gao LJ, Gao XF, Wang DP, Cao JM. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 Nov 25;10. Available from: [/pmc/articles/PMC7723891/](#)
  53. Zhou P, Yang X Lou, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020 Mar 12;579(7798):270. Available from: [/pmc/articles/PMC7095418/](#)
  54. Scialo F, Daniele A, Amato F, Pastore L, Matera MG, Cazzola M, et al. ACE2: The Major Cell Entry Receptor for SARS-CoV-2. *Lung*. 2020 Dec 1;198(6):867. Available from: [/pmc/articles/PMC7653219/](#)
  55. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Müller MA, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*. 2020 May 28;581(7809):465–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32235945/>
  56. Ziegler CGK, Allon SJ, Nyquist SK, Mbano IM, Miao VN, Tzouanas CN, et al. SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Is an Interferon-Stimulated Gene in Human Airway Epithelial Cells and Is Detected in Specific Cell Subsets across Tissues. *Cell*. 2020 May 28;181(5):1016. Available from: [/pmc/articles/PMC7252096/](#)
  57. Xu H, Zhong L, Deng J, Peng J, Dan H, Zeng X, et al. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *Int J Oral Sci*. 2020 Dec 1;12(1). Available from: [/pmc/articles/PMC7039956/](#)
  58. Suryamohan K, Diwanji D, Stawiski EW, Gupta R, Miersch S, Liu J, et al. Human ACE2 receptor polymorphisms and altered susceptibility to SARS-CoV-2. *Commun Biol* 2021 41. 2021 Apr 12;4(1):1–11. Available from: <https://www.nature.com/articles/s42003-021-02030-3>

59. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet (London, England)*. 2020 Feb 22;395(10224):565. Available from: [/pmc/articles/PMC7159086/](#)
60. Mariano G, Farthing RJ, Lale-Farjat SLM, Bergeron JRC. Structural Characterization of SARS-CoV-2: Where We Are, and Where We Need to Be. *Front Mol Biosci*. 2020 Dec 17;7:344.
61. Li C, Lee A, Grigoryan L, Arunachalam PS, Scott MKD, Trisal M, et al. Mechanisms of innate and adaptive immunity to the Pfizer-BioNTech BNT162b2 vaccine. *Nat Immunol*. 2022 Apr 1;23(4):543. Available from: [/pmc/articles/PMC8989677/](#)
62. Tian JH, Patel N, Haupt R, Zhou H, Weston S, Hammond H, et al. SARS-CoV-2 spike glycoprotein vaccine candidate NVX-CoV2373 immunogenicity in baboons and protection in mice. *Nat Commun*. 2021 Dec 1;12(1). Available from: [/pmc/articles/PMC7809486/](#)
63. Xia X. Domains and Functions of Spike Protein in SARS-Cov-2 in the Context of Vaccine Design. *Viruses*. 2021 Jan 1;13(1). Available from: [/pmc/articles/PMC7829931/](#)
64. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med*. 2020 Dec 31;383(27):2603–15. Available from: [/pmc/articles/PMC7745181/](#)
65. Kang YF, Sun C, Zhuang Z, Yuan RY, Zheng Q, Li JP, et al. Rapid Development of SARS-CoV-2 Spike Protein Receptor-Binding Domain Self-Assembled Nanoparticle Vaccine Candidates. *ACS Nano*. 2021 Feb 23;15(2):2738–52. Available from: [/pmc/articles/PMC7839421/](#)
66. Yadav R, Chaudhary JK, Jain N, Chaudhary PK, Khanra S, Dhamija P, et al. Role of Structural and Non-Structural Proteins and Therapeutic Targets of SARS-CoV-2 for COVID-19. *Cells*. 2021 Apr 1;10(4). Available from: [/pmc/articles/PMC8067447/](#)

67. Lu S, Ye Q, Singh D, Cao Y, Diedrich JK, Yates JR, et al. The SARS-CoV-2 nucleocapsid phosphoprotein forms mutually exclusive condensates with RNA and the membrane-associated M protein. *Nat Commun.* 2021 Dec 1;12(1). Available from: [/pmc/articles/PMC7820290/](#)
68. Wang W, Chen J, Yu X, Lan HY. Signaling mechanisms of SARS-CoV-2 Nucleocapsid protein in viral infection, cell death and inflammation. *Int J Biol Sci.* 2022;18(12):4704. Available from: [/pmc/articles/PMC9305276/](#)
69. Karjee S, Mukherjee SK. RNAi suppressor: The hidden weapon of SARS-CoV. *J Biosci.* 2020 Dec 1;45(1). Available from: [/pmc/articles/PMC7363689/](#)
70. Kadam SB, Sukhramani GS, Bishnoi P, Pable AA, Barvkar VT. SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights. *J Basic Microbiol.* 2021 Mar 1;61(3):180. Available from: [/pmc/articles/PMC8013332/](#)
71. Cao Y, Yang R, Lee I, Zhang W, Sun J, Wang W, et al. Characterization of the SARS-CoV-2 E Protein: Sequence, Structure, Viroporin, and Inhibitors. *Protein Sci.* 2021 Jun 1;30(6):1114. Available from: [/pmc/articles/PMC8138525/](#)
72. Noori R, Sardar M. An outlook on potential protein targets of COVID-19 as a druggable site. *Mol Biol Rep.* 2022 Nov 1;49(11):10729–48. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11033-022-07724-3>
73. Zhang Z, Nomura N, Muramoto Y, Ekimoto T, Uemura T, Liu K, et al. Structure of SARS-CoV-2 membrane protein essential for virus assembly. *Nat Commun* 2022 131. 2022 Aug 5;13(1):1–12. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-022-32019-3>
74. Shen L, Bard JD, Triche TJ, Judkins AR, Biegel JA, Gai X. Emerging variants of concern in SARS-CoV-2 membrane protein: a highly conserved target with potential pathological and therapeutic implications. *Emerg Microbes Infect.* 2021;10(1):885. Available from: [/pmc/articles/PMC8118436/](#)
75. Hu Y, Wen J, Tang L, Zhang H, Zhang X, Li Y, et al. The M Protein of

- SARS-CoV: Basic Structural and Immunological Properties. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2003;1(2):118. Available from: [/pmc/articles/PMC5172243/](#)
76. Sui L, Zhao Y, Wang W, Wu P, Wang Z, Yu Y, et al. SARS-CoV-2 Membrane Protein Inhibits Type I Interferon Production Through Ubiquitin-Mediated Degradation of TBK1. *Front Immunol*. 2021 May 18;12. Available from: [/pmc/articles/PMC8168463/](#)
  77. Thomas S. The Structure of the Membrane Protein of SARS-CoV-2 Resembles the Sugar Transporter SemiSWEET. *Pathog Immun*. 2020;5(1):342. Available from: [/pmc/articles/PMC7608487/](#)
  78. Pizzato M, Baraldi C, Boscato Sopotto G, Finozzi D, Gentile C, Gentile MD, et al. SARS-CoV-2 and the Host Cell: A Tale of Interactions. *Front Virol*. 2022 Jan 12;0:46.
  79. Hamming I, Timens W, Bulthuis MLC, Lely AT, Navis GJ, van Goor H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J Pathol*. 2004 Jun;203(2):631. Available from: [/pmc/articles/PMC7167720/](#)
  80. Volz E, Hill V, McCrone JT, Price A, Jorgensen D, O'Toole Á, et al. Evaluating the Effects of SARS-CoV-2 Spike Mutation D614G on Transmissibility and Pathogenicity. *Cell*. 2021 Jan 7;184(1):64. Available from: [/pmc/articles/PMC7674007/](#)
  81. Tang T, Jaimes JA, Bidon MK, Straus MR, Daniel S, Whittaker GR. Proteolytic Activation of SARS-CoV-2 Spike at the S1/S2 Boundary: Potential Role of Proteases beyond Furin. *ACS Infect Dis*. 2021 Feb 12;7(2):264–72. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acsinfecdis.0c00701>
  82. Örd M, Faustova I, Loog M. The sequence at Spike S1/S2 site enables cleavage by furin and phospho-regulation in SARS-CoV2 but not in SARS-CoV1 or MERS-CoV. *Sci Reports* 2020 101. 2020 Oct 9;10(1):1–10. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-74101-0>

83. Yang H, Rao Z. Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development. *Nat Rev Microbiol* 2021 19(11):685–700. 2021 Sep 17;19(11):685–700. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41579-021-00630-8>
84. Casari I, Manfredi M, Metharom P, Falasca M. Dissecting lipid metabolism alterations in SARS-CoV-2. *Prog Lipid Res.* 2021 Apr 1;82:101092.
85. Klein S, Cortese M, Winter SL, Wachsmuth-Melm M, Neufeldt CJ, Cerikan B, et al. SARS-CoV-2 structure and replication characterized by in situ cryo-electron tomography. *Nat Commun* 2020 11(11):1–10. 2020 Nov 18;11(11):1–10. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-020-19619-7>
86. Ma'ayan A. Complex systems biology. *J R Soc Interface.* 2017 Sep 1;14(134). Available from: [/pmc/articles/PMC5636275/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5636275/)
87. Murray R, Granner D, Mayes P, Rodwell V. *Bioquímica de Harper*. 11a ed. D.F México: Editorial El Manual Moderno, S.A; 1988. 9 p.
88. Macías Alvia A, Astudillo Hurtado JR, Holguín Cedeño DM, Vite Solórzano FA, Scott Álava MM, Vallejo Valdivieso PA, et al. INTRODUCCIÓN AL ESTUDIO DE LA BIOQUÍMICA. Editorial Área de Innovación y Desarrollo SL, editor. ALICANTE; 2018. 1–120 p.
89. Lebeau G, Vagner D, Frumence É, Ah-Pine F, Guillot X, Nobécourt E, et al. Deciphering SARS-CoV-2 Virologic and Immunologic Features. *Int J Mol Sci.* 2020 Aug 2;21(16):1–40. Available from: [/pmc/articles/PMC7460647/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7460647/)
90. Kell DB, Oliver SG. The metabolome 18 years on: a concept comes of age. *Metabolomics.* 2016 Oct 1;12(9). Available from: [/pmc/articles/PMC5009154/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5009154/)
91. Alseekh S, Fernie AR. Metabolomics 20 years on: what have we learned and what hurdles remain? *Plant J.* 2018 Jun 1;94(6):933–42. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/tpj.13950>
92. Bujak R, Struck-Lewicka W, Markuszewski MJ, Kaliszan R. Metabolomics for laboratory diagnostics. *J Pharm Biomed Anal.* 2015 Sep 10;113:108–20.
93. Rinschen MM, Ivanisevic J, Giera M, Siuzdak G. Identification of bioactive metabolites using activity metabolomics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019 Jun

- 1;20(6):353. Available from: [/pmc/articles/PMC6613555/](#)
94. Johnson CH, Ivanisevic J, Siuzdak G. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016 Jul 1;17(7):451. Available from: [/pmc/articles/PMC5729912/](#)
95. MetCore U. Acerca de metabolómica. Available from: <https://metcore.uniandes.edu.co/es/acerca-de-metabolomica>
96. Seger C, Salzman L. After another decade: LC–MS/MS became routine in clinical diagnostics. *Clin Biochem.* 2020 Aug 1;82:2–11.
97. Li J, Zhu HJ. Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)-Based Proteomics of Drug-Metabolizing Enzymes and Transporters. *Mol* 2020, Vol 25, Page 2718. 2020 Jun 11;25(11):2718. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/11/2718/htm>
98. Roberts LD, Souza AL, Gerszten RE, Clish CB. Targeted Metabolomics. *Curr Protoc Mol Biol.* 2012 Apr;CHAPTER(SUPPL.98):Unit30.2. Available from: [/pmc/articles/PMC3334318/](#)
99. Ochoa B. La lipidómica, una nueva herramienta al servicio de la salud. *Gac Med Bilbao.* 2006 Jun 6;103:101–2. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-gaceta-medica-bilbao-316-pdf-S0304485806745346>
100. Yang K, Han X. Lipidomics: Techniques, applications, and outcomes related to biomedical sciences. *Trends Biochem Sci.* 2016 Nov 1;41(11):954. Available from: [/pmc/articles/PMC5085849/](#)
101. Meikle TG, Huynh K, Giles C, Meikle PJ. Clinical lipidomics: realizing the potential of lipid profiling. *J Lipid Res.* 2021;62. Available from: [/pmc/articles/PMC8528718/](#)
102. Horton R, Mora L, Scrimgeour G, Perry M, Rawn D. Principios de Bioquímica. 4a ed. Fuerte R, editor. México: Pearson education; 2008.
103. Li A, Hines KM, Xu L. Lipidomics by HILIC-Ion Mobility-Mass Spectrometry. *Methods Mol Biol.* 2020;2084:119. Available from: [/pmc/articles/PMC7255642/](#)

104. Züllig T, Trötz Müller M, Köfeler HC. Lipidomics from sample preparation to data analysis: a primer. *Anal Bioanal Chem.* 2020 Apr 1;412(10):2191. Available from: [/pmc/articles/PMC7118050/](#)
105. Züllig T, Köfeler HC. High resolution mass spectrometry in lipidomics. *Mass Spectrom Rev.* 2021 May 1;40(3):162. Available from: [/pmc/articles/PMC8049033/](#)
106. Zhou B, Xiao JF, Tuli L, Ressom HW. LC-MS-based metabolomics. *Mol Biosyst.* 2012;8(2):470. Available from: [/pmc/articles/PMC3699692/](#)
107. Li W, Jie Z, Tse F. *Handbook of LC-MS Bioanalysis: Best Practices, Experimental Protocols, and Regulations.* Jhon Wiley. Canada; 2013. 704 p. Available from: [https://books.google.com.co/books?id=yYOuAAAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=LC-MS&hl=es&sa=X&redir\\_esc=y#v=onepage&q=LC-MS&f=false](https://books.google.com.co/books?id=yYOuAAAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=LC-MS&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=LC-MS&f=false)
108. Barnes S, Benton HP, Casazza K, Cooper SJ, Cui X, Du X, et al. Training in metabolomics research. I. Designing the experiment, collecting and extracting samples and generating metabolomics data. *J Mass Spectrom.* 2016 Jul 1;51(7):461. Available from: [/pmc/articles/PMC4964969/](#)
109. Dunn WB, Wilson ID, Nicholls AW, Broadhurst D. The importance of experimental design and QC samples in large-scale and MS-driven untargeted metabolomic studies of humans. *Bioanalysis.* 2012 Sep;4(18):2249–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23046267/>
110. Lee AY, Troisi J, Symes SJK. Experimental design in metabolomics. *Metabolomics Perspect.* 2022 Jan 1;27–61.
111. EMBL-EBI. Designing a metabolomics study. Available from: <https://www.ebi.ac.uk/training/online/courses/metabolomics-introduction/designing-a-metabolomics-study/>
112. Jacyna J, Kordalewska M, Markuszewski MJ. Design of Experiments in metabolomics-related studies: An overview. *J Pharm Biomed Anal.* 2019 Feb 5;164:598–606.
113. Méndez Rodríguez KB, Santoyo Treviño MJ, Saldaña Villanueva K,

- Rodríguez Aguilar M, Flores Ramírez R, Pérez Vázquez FJ. Metabolomics as a new tool for timely diagnosis in noncommunicable diseases. *Rev salud Ambient.* 2019;19(2):109–15.
114. Libiseller G, Dvorzak M, Kleb U, Gander E, Eisenberg T, Madeo F, et al. IPO: a tool for automated optimization of XCMS parameters. *BMC Bioinformatics.* 2015 Apr 16;16(1). Available from: [/pmc/articles/PMC4404568/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25077626/)
115. Andaluz sociedad grupo regional analítica E de química. *BOLETÍN GRASEQA Metabolómica.* García Reyes JF, editor. 2012;56.
116. Naz S, Moreira Dos Santos DC, García A, Barbas C. Analytical protocols based on LC-MS, GC-MS and CE-MS for nontargeted metabolomics of biological tissues. *Bioanalysis.* 2014;6(12):1657–77. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25077626/>
117. Mastrangelo A, Ferrarini A, Rey-Stolle F, García A, Barbas C. From sample treatment to biomarker discovery: A tutorial for untargeted metabolomics based on GC-(EI)-Q-MS. *Anal Chim Acta.* 2015 Nov 5;900:21–35.
118. Jiye A, Trygg J, Gullberg J, Johansson AI, Jonsson P, Antti H, et al. Extraction and GC/MS analysis of the human blood plasma metabolome. *Anal Chem.* 2005 Dec 15;77(24):8086–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16351159/>
119. Garcia A, Barbas C. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)-based metabolomics. *Methods Mol Biol.* 2011;708:191–204. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21207291/>
120. Nishikaze T. Sialic acid derivatization for glycan analysis by mass spectrometry. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2019;95(9):523. Available from: [/pmc/articles/PMC6856002/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32856002/)
121. David V, Moldoveanu SC, Galaon T. Derivatization procedures and their analytical performances for HPLC determination in bioanalysis. *Biomed Chromatogr.* 2021 Jan 1;35(1):e5008. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/bmc.5008>

122. Akula RK, Kwon YU. Bioenzymatic and Chemical Derivatization of Renewable Fatty Acids. *Biomolecules*. 2019 Oct 1;9(10). Available from: [/pmc/articles/PMC6843907/](#)
123. Marshall DD, Powers R. Beyond the Paradigm: Combining Mass Spectrometry and Nuclear Magnetic Resonance for Metabolomics. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*. 2017 May 1;100:1. Available from: [/pmc/articles/PMC5448308/](#)
124. Perez HL, Evans CA. Chemical derivatization in bioanalysis. <http://dx.doi.org/10.4155/bio15182>. 2015 Nov 3;7(19):2435–7. Available from: <https://www.future-science.com/doi/full/10.4155/bio.15.182>
125. Domingues P, García A, Skrzydlewska E. *Advanced Analytical Chemistry for Life Sciences*. Bialystok: Liberlibro.com A.C.; Available from: [https://www.umb.edu.pl/photo/pliki/projekty\\_umb/aac/aacifesci-manual-spanish\\_with-cover.pdf](https://www.umb.edu.pl/photo/pliki/projekty_umb/aac/aacifesci-manual-spanish_with-cover.pdf)
126. Wu D, Shu T, Yang X, Song J-X, Zhang M, Yao C, et al. Plasma metabolomic and lipidomic alterations associated with COVID-19. *Natl Sci Rev*. 2020 Jul 1;7(7):1157–68. Available from: <https://academic.oup.com/nsr/article/7/7/1157/5826189>
127. Zheng F, Lin Y, Boulas P. Development and validation of a novel HILIC method for the quantification of low-levels of cuprizone in cuprizone-containing chow. *Sci Reports* 2021 111. 2021 Sep 9;11(1):1–10. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-97590-z>
128. Unsihuay D, Mesa Sanchez D, Laskin J. Quantitative Mass Spectrometry Imaging of Biological Systems. *Annu Rev Phys Chem*. 2021 Apr 20;72:307. Available from: [/pmc/articles/PMC8161172/](#)
129. Bantscheff M, Schirle M, Sweetman G, Rick J, Kuster B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal Bioanal Chem* 2007 3894. 2007 Aug 1;389(4):1017–31. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-007-1486-6>
130. Han X, Aslanian A, Yates JR. Mass Spectrometry for Proteomics. *Curr Opin Chem Biol*. 2008 Oct ;12(5):483. Available from: [/pmc/articles/PMC2642903/](#)

- 
131. Nauta SP, Poeze M, Heeren RMA, Porta Siegel T. Clinical use of mass spectrometry (imaging) for hard tissue analysis in abnormal fracture healing. *Clin Chem Lab Med*. 2020 Jun 1;58(6):897–913. Available from: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/cclm-2019-0857/html>
  132. Buchberger AR, DeLaney K, Johnson J, Li L. Mass Spectrometry Imaging: A Review of Emerging Advancements and Future Insights. *Anal Chem*. 2018 Jan 2;90(1):240. Available from: </pmc/articles/PMC5959842/>
  133. Indelicato S, Bongiorno D, Ceraulo L. Recent Approaches for Chemical Speciation and Analysis by Electrospray Ionization (ESI) Mass Spectrometry. *Front Chem*. 2020 Jan 20;8:625945. Available from: </pmc/articles/PMC7855954/>
  134. Ryan DJ, Spraggins JM, Caprioli RM. Protein Identification Strategies in MALDI Imaging Mass Spectrometry: A Brief Review. *Curr Opin Chem Biol*. 2019 Feb 1;48:64. Available from: </pmc/articles/PMC6382520/>
  135. Milewska A, Ner-Kluza J, Dabrowska A, Bodzon-Kulakowska A, Pyrc K, Suder P. MASS SPECTROMETRY IN VIROLOGICAL SCIENCES. *Mass Spectrom Rev*. 2020 Sep 1;39(5–6):499–522. Available from: </pmc/articles/PMC7228374/>
  136. Pitt JJ. Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *Clin Biochem Rev*. 2009 Feb;30(1):19. Available from: </pmc/articles/PMC2643089/>
  137. Fang Z, Gonzalez FJ. LC–MS-based metabolomics: an update. *Arch Toxicol*. 2014;88(8):1491. Available from: </pmc/articles/PMC6310611/>
  138. Fiehn O. Metabolomics by Gas Chromatography-Mass Spectrometry: the combination of targeted and untargeted profiling. *Curr Protoc Mol Biol*. 2016 Apr 1;114:30.4.1. Available from: </pmc/articles/PMC4829120/>
  139. KK Pasikanti, PC Ho, EC Chan. Gas chromatography/mass spectrometry in metabolic profiling of biological fluids. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2008 Aug 15;871(2):202–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18479983/>

140. UNLP F de CA y F-. INTRODUCCIÓN A LAS SEPARACIONES ANALÍTICAS. Available from:  
[https://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/35288/mod\\_resource/content/1/2\\_cromatografia\\_2017.pdf](https://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/35288/mod_resource/content/1/2_cromatografia_2017.pdf)
141. JW H. Gas chromatography-mass spectrometry. *Methods Mol Biol.* 2006;324:53–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16761371/>
142. Gomis Yagües V. Tema 4. Cromatografía de líquidos de alta resolución. 2008. Available from: <http://hdl.handle.net/10045/8248>
143. Buszewski B, Noga S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Anal Bioanal Chem.* 2012 Jan;402(1):231. Available from: </pmc/articles/PMC3249561/>
144. Boersema PJ, Mohammed S, Heck AJR. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in proteomics. *Anal Bioanal Chem.* 2008 May 9;391(1):151–9. Available from:  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-008-1865-7>
145. Paczkowska M, Mizera M, Tężyk A, Zalewski P, Dzitko J, Cielecka-Piontek J. Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) for the determination of cetirizine dihydrochloride. *Arab J Chem.* 2019 Dec 1;12(8):4204–11.
146. Ren JL, Zhang AH, Kong L, Wang XJ. Advances in mass spectrometry-based metabolomics for investigation of metabolites. *RSC Adv.* 2018 Jun 19;8(40):22335–50. Available from:  
<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2018/ra/c8ra01574k>
147. Redalyc S de IC. ¿Que es la electroforesis capilar? *Rev Bioquim Y Patol Clin.* 2007;71(2):60–6. Available from:  
<http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=65114270008>
148. SERVICIOS DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN Sai-H. LA ESPECTROMETRÍA DE MOVILIDAD IÓNICA. 2021. Available from:  
<https://saishnp.com/2021/02/08/la-espectrometria-de-movilidad-ionica/>
149. Gutbrod K, Peisker H, Dörmann P. Direct infusion mass spectrometry for complex lipid analysis. *Methods Mol Biol.* 2021;2295:101–15. Available from: [https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-0716-1362-7\\_7](https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-0716-1362-7_7)

150. Looße C, Galozzi S, Debor L, Julsing MK, Bühler B, Schmid A, et al. Direct infusion-SIM as fast and robust method for absolute protein quantification in complex samples. *EuPA Open Proteomics*. 2015 Jun 1;7:20–6.
151. García MO, Oviaño M, Belén G, Sánchez R, De Dios J, Pérez C, et al. Aplicaciones de la espectrometría de masas MALDI-TOF en Microbiología Clínica. In: Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R, editors. *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Seimc.
152. Sekimoto K. Direct analysis in real time. *Ambient Ioniz Mass Spectrom Life Sci Princ Appl*. 2020 Jan 1;33–75.
153. Prokai L, Stevens SM. Direct Analysis in Real Time (DART) of an Organothiophosphate at Ultrahigh Resolution by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry. *Int J Mol Sci*. 2016 Jan 16;17(1). Available from: </pmc/articles/PMC4730357/>
154. Emwas AH, Roy R, McKay RT, Tenori L, Saccenti E, Nagana Gowda GA, et al. NMR Spectroscopy for Metabolomics Research. *Metabolites*. 2019 Jul 1;9(7). Available from: </pmc/articles/PMC6680826/>
155. Moco S. Studying Metabolism by NMR-Based Metabolomics. *Front Mol Biosci*. 2022 Apr 27;9:372.
156. Nagana Gowda GA, Raftery D. NMR Based Metabolomics. *Adv Exp Med Biol*. 2021;1280:19. Available from: </pmc/articles/PMC8816450/>
157. Castell J. TEMA 10. ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR. BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR. España: Universidad de Valencia; 2006.
158. Nalini Kanta S, G T, Madhusmita S, KS M. An overview on NMR spectroscopy based metabolomics. *Int J Pharm Sci Dev Res*. 2020 Jun 3;6(1):016–20.
159. Würtz P, Kangas AJ, Soininen P, Lawlor DA, Davey Smith G, Ala-Korpela M. Quantitative Serum Nuclear Magnetic Resonance Metabolomics in Large-Scale Epidemiology: A Primer on -Omic Technologies. *Am J*

- Epidemiol. 2017 Nov 11;186(9):1084. Available from:  
[/pmc/articles/PMC5860146/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32040584/)
160. Ranjan R, Sinha N. Nuclear magnetic resonance (NMR)-based metabolomics for cancer research. *NMR Biomed.* 2019 Oct 1;32(10):e3916. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/nbm.3916>
161. Ayala-Lopez N. Nuclear Magnetic Resonance Metabolomics-Enabled Biomarker Discovery for All-Cause Mortality. *Clin Chem.* 2020 Feb 1;66(2):400. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32040584/>
162. Leenders J, Frédérich M, De Tullio P. Nuclear magnetic resonance: a key metabolomics platform in the drug discovery process. *Drug Discov Today Technol.* 2015 Jun 1;13:39–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26190682/>
163. Lopez JM, Leyva V, Maruenda H. Pure Shift Nuclear Magnetic Resonance: a New Tool for Plant Metabolomics. *J Vis Exp.* 2021 Jul 31;(173). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34398150/>
164. EMBL-EBI. Comparison of NMR and MS | Metabolomics. Available from: <https://www.ebi.ac.uk/training/online/courses/metabolomics-introduction/designing-a-metabolomics-study/son-of-nmr-and-ms/>
165. Amara A, Frainay C, Jourdan F, Naake T, Neumann S, Novoa-del-Toro EM, et al. Networks and Graphs Discovery in Metabolomics Data Analysis and Interpretation. *Front Mol Biosci.* 2022 Mar 8;9:223.
166. Méndez Rodríguez KB, Santoyo Treviño MJ, Saldaña Villanueva K, Rodríguez Aguilar M, Flores Ramírez R, Pérez Vázquez FJ. Metabolómica como nueva herramienta para el diagnóstico oportuno en enfermedades no transmisibles. *Rev Salud Ambient.* 2019 Dec 15;19(2):109–15. Available from: <https://ojs.diffundit.com/index.php/rasa/article/view/942/947>
167. Van den Berg RA, Hoefsloot HCJ, Westerhuis JA, Smilde AK, van der Werf MJ. Centering, scaling, and transformations: Improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics.* 2006 Jun 8;7(1):1–15. Available from: <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-7-142>

168. Augusto C, Rodas E. TALLER DE TESIS I. INSTITUTO PARA LA CALIDAD DE LA EDUCACIÓN - USMP; 2018. Available from: <https://proyectoseducativoscr.wordpress.com/elaboracion-del-ante-proyecto/capitulo-iii>.
169. CEVALLOS TORRES LJ, VALENCIA MARTINEZ NA, BARROS MORALES RL. Análisis Estadístico Univariado. Grupo compás, editor. Vicerrectorado de Investigación, Gestión del Conocimiento y Posgrado, Universidad de Guayaquil; 2017.
170. Worley B, Powers R. Multivariate Analysis in Metabolomics. *Curr Metabolomics*. 2013 May 7;1(1):92. Available from: </pmc/articles/PMC4465187/>
171. Yamamoto H, Nakayama Y, Tsugawa H. OS-PCA: Orthogonal Smoothed Principal Component Analysis Applied to Metabolome Data. *Metabolites*. 2021 Mar 1;11(3). Available from: </pmc/articles/PMC7999099/>
172. Werth MT, Halouska S, Shortridge MD, Zhang B, Powers R. Analysis of Metabolomic PCA Data using Tree Diagrams. *Anal Biochem*. 2010 Apr 4;399(1):58. Available from: </pmc/articles/PMC2824058/>
173. Sumner LW, Amberg A, Barrett D, Beale MH, Beger R, Daykin CA, et al. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics*. 2007 Sep;3(3):211. Available from: </pmc/articles/PMC3772505/>
174. Theodoridis GA, Gika HG, Want EJ, Wilson ID. Liquid chromatography–mass spectrometry based global metabolite profiling: A review. *Anal Chim Acta*. 2012 Jan 20;711:7–16.
175. MetaboAnalyst [Internet]. Available from: <https://www.metaboanalyst.ca/>
176. Thomas T, Stefanoni D, Reisz JA, Nemkov T, Bertolone L, Francis RO, et al. COVID-19 infection alters kynurenine and fatty acid metabolism, correlating with IL-6 levels and renal status. *JCI Insight*. 2020 Jun 23;5(14). Available from: </pmc/articles/PMC7453907/>

177. Shen B, Yi X, Sun Y, Bi X, Du J, Zhang C, et al. Proteomic and Metabolomic Characterization of COVID-19 Patient Sera. *Cell*. 2020 Jul 9;182(1):59. Available from: [/pmc/articles/PMC7254001/](#)
178. Idle JR, Gonzalez FJ. *Metabolomics*. *Cell Metab*. 2007 Nov 7;6(5):348. Available from: [/pmc/articles/PMC2140247/](#)
179. Song J-W, Lam SM, Fan X, Cao W-J, Wang S-Y, Tian H, et al. Omics-Driven Systems Interrogation of Metabolic Dysregulation in COVID-19 Pathogenesis. *Cell Metab*. 2020 Aug 4;32(2):188. Available from: [/pmc/articles/PMC7311890/](#)
180. Blasco H, Bessy C, Plantier L, Lefevre A, Piver E, Bernard L, et al. The specific metabolome profiling of patients infected by SARS-COV-2 supports the key role of tryptophan-nicotinamide pathway and cytosine metabolism. *Sci Rep*. 2020 Dec 1;10(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33033346/>
181. Bruzzone C, Bizkarguenaga M, Gil-Redondo R, Diercks T, Arana E, García de Vicuña A, et al. SARS-CoV-2 Infection Dysregulates the Metabolomic and Lipidomic Profiles of Serum. *iScience*. 2020 Oct 23;23(10):101645.
182. Hu X, Chen D, Wu L, He G, Ye W. Declined serum high density lipoprotein cholesterol is associated with the severity of COVID-19 infection. *Clin Chim Acta*. 2020 Nov 1;510:105–10.
183. Barberis E, Timo S, Amede E, Vanella V V., Puricelli C, Cappellano G, et al. Large-Scale Plasma Analysis Revealed New Mechanisms and Molecules Associated with the Host Response to SARS-CoV-2. *Int J Mol Sci*. 2020 Nov 2;21(22):1–25. Available from: [/pmc/articles/PMC7696386/](#)
184. Schwarz B, Sharma L, Roberts L, Peng X, Bermejo S, Leighton I, et al. Cutting Edge: Severe SARS-CoV-2 Infection in Humans Is Defined by a Shift in the Serum Lipidome, Resulting in Dysregulation of Eicosanoid Immune Mediators. *J Immunol*. 2021 Jan 15;206(2):329–34. Available from: <https://www.jimmunol.org/content/206/2/329>
185. Overmyer KA, Shishkova E, Miller IJ, Balnis J, Bernstein MN, Peters-Clarke TM, et al. Large-Scale Multi-omic Analysis of COVID-19 Severity. *Cell Syst*.

- 2021 Jan 20;12(1):23-40.e7.
186. Danlos F-X, Grajeda-Iglesias C, Durand S, Sauvat A, Roumier M, Cantin D, et al. Metabolomic analyses of COVID-19 patients unravel stage-dependent and prognostic biomarkers. *Cell Death Dis* 2021 123. 2021 Mar 11;12(3):1–11. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41419-021-03540-y>
  187. World Health Organization. Clinical management of COVID-19: interim guidance, mayo. 2020. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/332196>
  188. Voelker DR. Glycerolipid Structure, Function, and Synthesis in Eukaryotes. *Encycl Biol Chem Second Ed.* 2013 Jan 1;412–8.
  189. Donato P, Dugo P, Mondello L. Separation of lipids. *Liq Chromatogr Appl Second Ed.* 2017 Jan 1;2:201–43.
  190. University C, Institute B, UC SD, University S. LIPID MAPS - LMSP0601AA07. Available from: <https://www.lipidmaps.org/databases/lmsd/LMSP0601AA07?LMID=LMSP0601AA07>
  191. Tian D, Ye Q. Hepatic complications of COVID-19 and its treatment. *J Med Virol.* 2020 Oct 1;92(10):1818. Available from: </pmc/articles/PMC7280725/>
  192. Anirvan P, Bharali P, Gogoi M, Thuluvath PJ, Singh SP, Satapathy SK. Liver injury in COVID-19: The hepatic aspect of the respiratory syndrome — what we know so far. *World J Hepatol.* 2020 Dec 12;12(12):1182. Available from: </pmc/articles/PMC7772728/>
  193. McConnell MJ, Kawaguchi N, Kondo R, Sonzogni A, Licini L, Valle C, et al. Liver injury in COVID-19 and IL-6 trans-signaling-induced endotheliopathy. *J Hepatol.* 2021 Sep 1;75(3):647. Available from: </pmc/articles/PMC8285256/>
  194. Nardo AD, Schneeweiss-Gleichner M, Bakail M, Dixon ED, Lax SF, Trauner M. Pathophysiological mechanisms of liver injury in COVID-19. *Liver Int.* 2021 Jan 1;41(1):20. Available from: </pmc/articles/PMC7753756/>
  195. Serra F, Bonaduce I, De ruvo N, Cautero N, Brugioni L, Gelmini R. Covid-19 and hepatic injury: A systematic review. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.*

- 2021 May 1;45(3):101605. Available from: [/pmc/articles/PMC7832993/](#)
196. Zhang XT, Yu Y, Zhang C, Wang H, Zhao L, Wang H, et al. Mechanism of SARS-CoV-2 Invasion into the Liver and Hepatic Injury in Patients with COVID-19. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2022;14(1). Available from: [/pmc/articles/PMC8747016/](#)
197. McElvaney OJ, McEvoy NL, McElvaney OF, Carroll TP, Murphy MP, Dunlea DM, et al. Characterization of the inflammatory response to severe COVID-19 Illness. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020 Sep 15;202(6):812–21. Available from: [/pmc/articles/PMC7491404/](#)
198. Batabyal R, Freishtat N, Hill E, Rehman M, Freishtat R, Koutroulis I. Metabolic dysfunction and immunometabolism in COVID-19 pathophysiology and therapeutics. *Int J Obes (Lond)*. 2021 Jun 1;45(6):1163. Available from: [/pmc/articles/PMC7961323/](#)
199. Hu R, Han C, Pei S, Yin M, Chen X. Procalcitonin levels in COVID-19 patients. *Int J Antimicrob Agents*. 2020 Aug 1;56(2):106051. Available from: [/pmc/articles/PMC7286278/](#)
200. Nasif WA, Mukhtar MH, Althubiti MA, Alamodi HS, Balkhir OY, Qurban YK, et al. Serum Ferritin and its Importance for SARS-CoV-2-Infected Patients. *Clin Lab*. 2022;68(8):1543–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35975512/>
201. O'Neill LAJ, Kishton RJ, Rathmell J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol*. 2016 Aug 25;16(9):553. Available from: [/pmc/articles/PMC5001910/](#)
202. Makhoul E, Aklinski JL, Miller J, Leonard C, Backer S, Kahar P, et al. A Review of COVID-19 in Relation to Metabolic Syndrome: Obesity, Hypertension, Diabetes, and Dyslipidemia. *Cureus*. 2022 Jul 29;14(7). Available from: [/pmc/articles/PMC9420458/](#)
203. Farley SE, Kyle JE, Leier HC, Bramer LM, Weinstein JB, Bates TA, et al. A global lipid map reveals host dependency factors conserved across SARS-CoV-2 variants. *Nat Commun*. 2022 Dec 1;13(1). Available from: [/pmc/articles/PMC9203258/](#)

204. Sevastou I, Kaffe E, Mouratis MA, Aidinis V. Lysoglycerophospholipids in chronic inflammatory disorders: The PLA2/LPC and ATX/LPA axes. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2013 Jan 1;1831(1):42–60.
205. Cantú SM, Lee HJ, Donoso A, Puyó AM, Peredo HA. EL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO Y SUS DERIVADOS. GENERALIDADES DE LOS PROSTANOIDES EN RELACIÓN CON PROCESOS INFLAMATORIOS. *Cienc Invest*. 2017;67(4):1–8.
206. Turana Y, Nathaniel M, Shen R, Ali S, Aparasu RR. Citolina and COVID-19-Related Cognitive and Other Neurologic Complications. *Brain Sci*. 2022 Jan 1;12(1). Available from: </pmc/articles/PMC8782421/>
207. Ren J, Lin J, Yu L, Yan M. Lysophosphatidylcholine: Potential Target for the Treatment of Chronic Pain. *Int J Mol Sci* 2022, Vol 23, Page 8274. 2022 Jul 27;23(15):8274. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/15/8274/htm>
208. Leslie CC. Thematic Review Series: Phospholipases: Central Role in Lipid Signaling and Disease: Cytosolic phospholipase A2: physiological function and role in disease. *J Lipid Res*. 2015 Aug 1;56(8):1386. Available from: </pmc/articles/PMC4513982/>
209. Iessi E, Marconi M, Manganeli V, Sorice M, Malorni W, Garofalo T, et al. On the role of sphingolipids in cell survival and death. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2020 Jan 1;351:149–95.
210. Prakash H, Upadhyay D, Bandapalli OR, Jain A, Kleuser B. Host sphingolipids: Perspective immune adjuvant for controlling SARS-CoV-2 infection for managing COVID-19 disease. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2021 Feb 1;152:106504. Available from: </pmc/articles/PMC7605809/>
211. Palacios-Rápalo SN, De Jesús-González LA, Cordero-Rivera CD, Farfan-Morales CN, Osuna-Ramos JF, Martínez-Mier G, et al. Cholesterol-Rich Lipid Rafts as Platforms for SARS-CoV-2 Entry. *Front Immunol*. 2021 Dec 16;12. Available from: </pmc/articles/PMC8719300/>

- 
212. Sturgill JL. Sphingolipids and their enigmatic role in asthma. *Adv Biol Regul.* 2018 Dec 1;70:74. Available from: [/pmc/articles/PMC6560640/](#)
213. Reinke SN, Gallart-Ayala H, Gómez C, Checa A, Fauland A, Naz S, et al. Metabolomics analysis identifies different metabotypes of asthma severity. *Eur Respir J.* 2017 Mar 1;49(3):1601740. Available from: [/pmc/articles/PMC5399350/](#)
214. Kovilakath A, Jamil M, Cowart LA. Sphingolipids in the Heart: From Cradle to Grave. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020 Sep 15;11:652. Available from: [/pmc/articles/PMC7522163/](#)
215. Green CD, Maceyka M, Cowart LA, Spiegel S. Sphingolipids in Metabolic Disease: The Good, the Bad, and the Unknown. *Cell Metab.* 2021 Jul 7;33(7):1293. Available from: [/pmc/articles/PMC8269961/](#)
216. Hannun YA, Obeid LM. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018 Mar 1;19(3):175. Available from: [/pmc/articles/PMC5902181/](#)
217. Torretta E, Garziano M, Poliseno M, Capitanio D, Biasin M, Santantonio TA, et al. Severity of covid-19 patients predicted by serum sphingolipids signature. *Int J Mol Sci.* 2021 Oct 1;22(19):22. Available from: [/pmc/articles/PMC8508132/](#)
218. Cumin C, Huang Y-L, Rossdam C, Ruoff F, Posada Céspedes S, Liang C-Y, et al. Glycosphingolipids are mediators of cancer plasticity through independent signaling pathways Graphical abstract. 2022; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111181>
219. Hannich JT, Umebayashi K, Riezman H. Distribution and Functions of Sterols and Sphingolipids. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(5):1–14. Available from: [/pmc/articles/PMC3101845/](#)
220. Alketbi EH, Hamdy R, El-Kabalawy A, Juric V, Pignitter M, A. Mosa K, et al. Lipid-based therapies against SARS-CoV-2 infection. *Rev Med Virol.* 2021 Sep 1;31(5):1–13. Available from: [/pmc/articles/PMC8013851/](#)
221. Cao X, Lu XM, Tuo X, Liu JY, Zhang YC, Song LN, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 regulates endoplasmic reticulum stress and

- mitochondrial function to preserve skeletal muscle lipid metabolism. *Lipids Health Dis.* 2019 Nov 27;18(1):1–8. Available from: <https://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12944-019-1145-x>
222. Törnquist K, Asghar MY, Srinivasan V, Korhonen L, Lindholm D. Sphingolipids as Modulators of SARS-CoV-2 Infection. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Jun 17;9. Available from: </pmc/articles/PMC8245774/>
223. Fecchi K, Anticoli S, Peruzzo D, Iessi E, Gagliardi MC, Matarrese P, et al. Coronavirus Interplay With Lipid Rafts and Autophagy Unveils Promising Therapeutic Targets. *Front Microbiol.* 2020 Aug 11;11:1821.
224. Li GM, Li YG, Yamate M, Li SM, Ikuta K. Lipid rafts play an important role in the early stage of severe acute respiratory syndrome-coronavirus life cycle. *Microbes Infect.* 2007 Jan;9(1):96. Available from: </pmc/articles/PMC7110773/>
225. Shady NH, Youssif KA, Sayed AM, Belbahri L, Oszako T, Hassan HM, et al. Sterols and Triterpenes: Antiviral Potential Supported by In-Silico Analysis. *Plants.* 2021 Jan 1;10(1):1–34. Available from: </pmc/articles/PMC7823815/>
226. Baglivo M, Baronio M, Natalini G, Beccari T, Chiurazzi P, Fulcheri E, et al. Natural small molecules as inhibitors of coronavirus lipid-dependent attachment to host cells: a possible strategy for reducing SARS-COV-2 infectivity? *Acta Bio Medica Atenei Parm.* 2020;91(1):161. Available from: </pmc/articles/PMC7569585/>
227. Anderson RH, Sochacki KA, Vuppula H, Scott BL, Bailey EM, Schultz MM, et al. Sterols lower energetic barriers of membrane bending and fission necessary for efficient clathrin-mediated endocytosis. *Cell Rep.* 2021 Nov 11;37(7):110008. Available from: </pmc/articles/PMC8620193/>
228. Goldstein JL, DeBose-Boyd RA, Brown MS. Protein Sensors for Membrane Sterols. *Cell.* 2006 Jan 13;124(1):35–46. Available from: <http://www.cell.com/article/S0092867405014637/fulltext>
229. Griffiths WJ, Wang Y. Sterols, Oxysterols, and Accessible Cholesterol: Signalling for Homeostasis, in Immunity and During Development. *Front*

- Physiol. 2021 Oct 8;12:1688.
230. Nardacci R, Colavita F, Castilletti C, Lapa D, Matusali G, Meschi S, et al. Evidences for lipid involvement in SARS-CoV-2 cytopathogenesis. *Cell Death Dis* 2021 123. 2021 Mar 12;12(3):1–12. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41419-021-03527-9>
231. Da Silva Gomes Dias S, Soares VC, Ferreira AC, Sacramento CQ, Fintelman-Rodrigues N, Temerozo JR, et al. Lipid droplets fuel SARS-CoV-2 replication and production of inflammatory mediators. *PLoS Pathog*. 2020 Dec 16;16(12). Available from: </pmc/articles/PMC7773323/>
232. Pagliari F, Marafioti MG, Genard G, Candeloro P, Viglietto G, Seco J, et al. ssRNA Virus and Host Lipid Rearrangements: Is There a Role for Lipid Droplets in SARS-CoV-2 Infection? *Front Mol Biosci*. 2020 Oct 8;7. Available from: </pmc/articles/PMC7579428/>
233. Carrero I, Herráez A. Ácidos grasos. Sede web Biomodel. Available from: <https://biomodel.uah.es/model2/lip/acgr.htm>
234. Burdge GC, Calder PC. Introduction to fatty acids and lipids. *World Rev Nutr Diet*. 2015;112:1–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25471798/>
235. Barberis E, Amede E, Khoso S, Castello L, Sainaghi PP, Bellan M, et al. Metabolomics diagnosis of covid-19 from exhaled breath condensate. *Metabolites*. 2021 Dec 1;11(12). Available from: </pmc/articles/PMC8708149/>
236. Amine H, Benomar Y, Taouis M. Palmitic acid promotes resistin-induced insulin resistance and inflammation in SH-SY5Y human neuroblastoma. *Sci Rep*. 2021 Dec 1;11(1):5427. Available from: </pmc/articles/PMC7940652/>
237. Van Rooijen MA, Mensink RP. Palmitic Acid Versus Stearic Acid: Effects of Interesterification and Intakes on Cardiometabolic Risk Markers—A Systematic Review. *Nutrients*. 2020 Mar 1;12(3). Available from: </pmc/articles/PMC7146500/>
238. Meng H, Matthan NR, Wu D, Li L, Rodríguez-Morató J, Cohen R, et al. Comparison of diets enriched in stearic, oleic, and palmitic acids on inflammation, immune response, cardiometabolic risk factors, and fecal bile

- acid concentrations in mildly hypercholesterolemic postmenopausal women-randomized crossover trial. *Am J Clin Nutr.* 2019 Aug 1;110(2):305–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31179489/>
239. Joshi C, Jadeja V, Zhou H. Molecular Mechanisms of Palmitic Acid Augmentation in COVID-19 Pathologies. *Int J Mol Sci.* 2021 Jul 1;22(13). Available from: </pmc/articles/PMC8269364/>
240. Chu J, Xing C, Du Y, Duan T, Liu S, Zhang P, et al. Pharmacological inhibition of fatty acid synthesis blocks SARS-CoV-2 replication. *Nat Metab* 2021 311. 2021 Sep 27;3(11):1466–75. Available from: <https://www.nature.com/articles/s42255-021-00479-4>
241. Bermúdez MA, Pereira L, Fraile C, Valerio L, Balboa MA, Balsinde J. Roles of Palmitoleic Acid and Its Positional Isomers, Hypogeic and Sapienic Acids, in Inflammation, Metabolic Diseases and Cancer. *Cells.* 2022 Jul 1;11(14). Available from: </pmc/articles/PMC9319324/>
242. Tsai YW, Lu CH, Chang RCA, Hsu YP, Ho LT, Shih KC. Palmitoleic acid ameliorates palmitic acid-induced proinflammation in J774A.1 macrophages via TLR4-dependent and TNF- $\alpha$ -independent signalings. *Prostaglandins, Leukot Essent Fat Acids.* 2021 Jun 1;169:102270.
243. Harvey KA, Walker CL, Xu Z, Whitley P, Pavlina TM, Hise M, et al. Oleic acid inhibits stearic acid-induced inhibition of cell growth and pro-inflammatory responses in human aortic endothelial cells. *J Lipid Res.* 2010 Dec;51(12):3470. Available from: </pmc/articles/PMC2975719/>
244. Stubbs BJ, Koutnik AP, Goldberg EL, Upadhyay V, Turnbaugh PJ, Verdin E, et al. Investigating Ketone Bodies as Immunometabolic Countermeasures against Respiratory Viral Infections. *Med (New York, N.y).* 2020 Dec 12;1(1):43. Available from: </pmc/articles/PMC7362813/>
245. Fahy E, Subramaniam S, Alex Brown H, Glass CK, Merrill AH, Murphy RC, et al. A comprehensive classification system for lipids<sup>1</sup>. *J Lipid Res.* 2005 May 1;46(5):839–61. Available from: <http://www.jlr.org/article/S0022227520339687/fulltext>

- 
246. Gomez-Gomez A, Rodríguez-Morató J, Haro N, Marín-Corral J, Masclans JR, Pozo OJ. Untargeted detection of the carbonyl metabolome by chemical derivatization and liquid chromatography-tandem mass spectrometry in precursor ion scan mode: Elucidation of COVID-19 severity biomarkers. *Anal Chim Acta*. 2022 Mar 1;1196. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35151400/>
247. Shi D, Yan R, Lv L, Jiang H, Lu Y, Sheng J, et al. The serum metabolome of COVID-19 patients is distinctive and predictive. *Metabolism*. 2021 May 1;118:154739. Available from: </pmc/articles/PMC7920809/>
248. Landaas S, Jakobs C. The occurrence of 2-hydroxyisovaleric acid in patients with lactic acidosis and ketoacidosis. *Clin Chim Acta*. 1977 Aug 1;78(3):489–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/884872/>
249. Patel U, Deluxe L, Salama C, Jimenez AR, Whiting A, Lubin C, et al. Evaluation of Characteristics and Outcomes for Patients with Diabetic Ketoacidosis (DKA) With and Without COVID-19 in Elmhurst Queens During Similar Three-Month Periods in 2019 and 2020. *Cureus*. 2021 Jul 16;13(7). Available from: </pmc/articles/PMC8364784/>
250. Gupta GS. The Lactate and the Lactate Dehydrogenase in Inflammatory Diseases and Major Risk Factors in COVID-19 Patients. *Inflammation*. 2022 Dec 1;45(6):2091. Available from: </pmc/articles/PMC9117991/>
251. Stromberg S, Baxter BA, Dooley G, LaVergne SM, Gallichotte E, Dutt T, et al. Relationships between plasma fatty acids in adults with mild, moderate, or severe COVID-19 and the development of post-acute sequelae. *Front Nutr*. 2022 Sep 14;9. Available from: </pmc/articles/PMC9515579/>
252. Leonard J V. Recent advances in amino acid and organic acid metabolism. *J Inherit Metab Dis*. 2007 Apr;30(2):134–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17237988/>
253. Papagianni M. Organic Acids. *Compr Biotechnol Second Ed*. 2011 Jan 1;1:109–20.
254. Rees CA, Rostad CA, Mantus G, Anderson EJ, Chahroudi A, Jaggi P, et al. Brief Report: Altered amino acid profile in patients with SARS-CoV-2

- infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021 Jun 6;118(25). Available from: [/pmc/articles/PMC8237604/](#)
255. Atila A, Alay H, Yaman ME, Akman TC, Cadirci E, Bayrak B, et al. The serum amino acid profile in COVID-19. *Amino Acids*. 2021 Oct 1;53(10):1569. Available from: [/pmc/articles/PMC8487804/](#)
256. Páez-Franco JC, Maravillas-Montero JL, Mejía-Domínguez NR, Torres-Ruiz J, Tamez-Torres KM, Pérez-Fragoso A, et al. Metabolomics analysis identifies glutamic acid and cystine imbalances in COVID-19 patients without comorbid conditions. Implications on redox homeostasis and COVID-19 pathophysiology. *PLoS One*. 2022 Sep 1;17(9). Available from: [/pmc/articles/PMC9488784/](#)
257. Kalyanaraman B. Reactive oxygen species, proinflammatory and immunosuppressive mediators induced in COVID-19: overlapping biology with cancer. *RSC Chem Biol*. 2021 Oct 10;2(5):1402. Available from: [/pmc/articles/PMC8496060/](#)
258. Laforge M, Elbim C, Frère C, Hémadi M, Massaad C, Nuss P, et al. Tissue damage from neutrophil-induced oxidative stress in COVID-19. *Nat Rev Immunol*. 2020 Sep 1;20(9):515. Available from: [/pmc/articles/PMC7388427/](#)
259. Kim HY, Lee H, Kim SH, Jin H, Bae J, Choi HK. Discovery of potential biomarkers in human melanoma cells with different metastatic potential by metabolic and lipidomic profiling. *Sci Rep*. 2017 Dec 1;7(1). Available from: [/pmc/articles/PMC5562697/](#)
260. Bharadwaj S, Singh M, Kirtipal N, Kang SG. SARS-CoV-2 and Glutamine: SARS-CoV-2 Triggered Pathogenesis via Metabolic Reprograming of Glutamine in Host Cells. *Front Mol Biosci*. 2021 Jan 11;7:462.
261. Lieber C. Pathogenesis and treatment of alcoholic liver disease: progress over the last 50 years - PubMed. *Rocz Akad Med Bialymst*. 2005;50:7–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16363067/>
262. McMenamy RH, Vang J, Drapanas T. Amino acid and alpha-keto acid concentrations in plasma and blood of the liverless dog. *Am J Physiol*.

- 1965;209(5):1046–52. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5849485/>
263. Yudkoff M, Blazer-Yost B, Cohn R, Segal S. On the clinical significance of the plasma alpha-amino-n-butyric acid:leucine ratio. *Am J Clin Nutr*. 1979;32(2):282–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/420125/>
264. Darling PB, Grunow J, Rafii M, Brookes S, Ball RO, Pencharz PB. Threonine dehydrogenase is a minor degradative pathway of threonine catabolism in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000;278(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10780944/>
265. Fonteh AN, Harrington RJ, Tsai A, Liao P, Harrington MG. Free amino acid and dipeptide changes in the body fluids from Alzheimer's disease subjects. *Amino Acids*. 2007 Feb;32(2):213–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17031479/>
266. Yang J, Chen T, Sun L, Zhao Z, Qi X, Zhou K, et al. Potential metabolite markers of schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2013 Jan;18(1):67. Available from: </pmc/articles/PMC3526727/>
267. Ni Y, Xie G, Jia W. Metabonomics of human colorectal cancer: new approaches for early diagnosis and biomarker discovery. *J Proteome Res*. 2014 Sep 5;13(9):3857–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25105552/>
268. Cheng Y, Xie G, Chen T, Qiu Y, Zou X, Zheng M, et al. Distinct urinary metabolic profile of human colorectal cancer. *J Proteome Res*. 2012 Feb 3;11(2):1354–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22148915/>
269. Woo HI, Chun MR, Yang JS, Lim SW, Kim MJ, Kim SW, et al. Plasma Amino Acid Profiling in Major Depressive Disorder Treated With Selective Serotonin Reuptake Inhibitors. *CNS Neurosci Ther*. 2015 May 1;21(5):417. Available from: </pmc/articles/PMC6495833/>
270. Adachi Y, Toyoshima K, Nishimoto R, Ueno S, Tanaka T, Imaizumi A, et al. Association between plasma  $\alpha$ -aminobutyric acid and depressive symptoms in older community-dwelling adults in Japan. *Geriatr Gerontol Int*. 2019 Mar

- 1;19(3):254–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30561103/>
271. Chiarla C, Giovannini I, Siegel JH. Characterization of alpha-amino-n-butyric acid correlations in sepsis. *Transl Res.* 2011;158(6):328–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22061040/>
272. Lee YK, Chang WC, Prakash E, Peng YJ, Tu Z, Lin CH, et al. Carbohydrate Ligands for COVID-19 Spike Proteins. *Viruses.* 2022 Feb 1;14(2). Available from: </pmc/articles/PMC8880561/>
273. Del-Corso A, Cappiello M, Moschini R, Balestri F, Mura U, Ipata PL. The furanosidic scaffold of d-ribose: a milestone for cell life. *Biochem Soc Trans.* 2019 Dec 20;47(6):1931–40. Available from: </biochemsoctrans/article/47/6/1931/221031/The-furanosidic-scaffold-of-d-ribose-a-milestone>
274. Alhammad YMO, Kashipathy MM, Roy A, Gagné J-P, McDonald P, Gao P, et al. The SARS-CoV-2 Conserved Macrodomain Is a Mono-ADP-Ribosylhydrolase. *J Virol.* 2021 Jan 13;95(3). Available from: </pmc/articles/PMC7925111/>
275. Frick DN, Viridi RS, Vuksanovic N, Dahal N, Silvaggi NR. Molecular Basis for ADP-Ribose Binding to the Mac1 Domain of SARS-CoV-2 nsp3. *Biochemistry.* 2020 Jul 21;59(28):2608–15. Available from: </pmc/articles/PMC7341687/>
276. Li Y, Zhang D, Gao X, Wang X, Zhang L. 2'- and 3'-Ribose Modifications of Nucleotide Analogues Establish the Structural Basis to Inhibit the Viral Replication of SARS-CoV-2. *J Phys Chem Lett.* 2022;4111–8.
277. Noguchi C, Kamitori K, Hossain A, Hoshikawa H, Katagi A, Dong Y, et al. D-Allose Inhibits Cancer Cell Growth by Reducing GLUT1 Expression. *Tohoku J Exp Med.* 2016 Jan 30;238(2):131–41.
278. Gao D, Kawai N, Nakamura T, Lu F, Fei Z, Tamiya T. Anti-inflammatory Effect of D-Allose in Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury in Rats. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 2013;53(6):365–74.
279. Lv L, Jiang H, Chen Y, Gu S, Xia J, Zhang H, et al. The faecal metabolome

- in COVID-19 patients is altered and associated with clinical features and gut microbes. *Anal Chim Acta*. 2021 Apr 1;1152:338267. Available from: [/pmc/articles/PMC7847702/](#)
280. Zhao J, Zhang G, Zhang Y, Yi D, Li Q, Ma L, et al. 2-((1H-indol-3-yl)thio)-N-phenyl-acetamides: SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase inhibitors. *Antiviral Res*. 2021 Dec 1;196:105209. Available from: [/pmc/articles/PMC8600920/](#)
281. Matchett WH. Inhibition of Tryptophan Synthetase by Indoleacrylic Acid. *J Bacteriol*. 1972 Apr;110(1):146. Available from: [/pmc/articles/PMC247391/?report=abstract](#)
282. Wlodarska M, Luo C, Kolde R, d'Hennezel E, Annand JW, Heim CE, et al. Indoleacrylic acid produced by commensal *Peptostreptococcus* species suppresses inflammation. *Cell Host Microbe*. 2017 Jul 7;22(1):25. Available from: [/pmc/articles/PMC5672633/](#)
283. Espadinha M, Barcherini V, Gonçalves LM, Molins E, Antunes AMM, Santos MMM. Tryptophanol-Derived Oxazolopyrrolidone Lactams as Potential Anticancer Agents against Gastric Adenocarcinoma. *Pharmaceuticals*. 2021 Mar 1;14(3):208. Available from: [/pmc/articles/PMC8001353/](#)
284. Fawazy NG, Panda SS, Mostafa A, Kariuki BM, Bekheit MS, Moatasim Y, et al. Development of spiro-3-indolin-2-one containing compounds of antiproliferative and anti-SARS-CoV-2 properties. *Sci Rep*. 2022 Dec 1;12(1):13880. Available from: [/pmc/articles/PMC9380671/](#)
285. Jochum M, Lee MD, Curry K, Zaksas V, Vitalis E, Treangen T, et al. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid metatranscriptomes among patients with COVID-19 disease. *Sci Rep*. 2022 Dec 1;12(1). Available from: [/pmc/articles/PMC9729217/](#)
286. Chowdhury P, Pathak P. Neuroprotective immunity by essential nutrient “Choline” for the prevention of SARS CoV2 infections: An in silico study by molecular dynamics approach. *Chem Phys Lett*. 2020 Dec 12;761:138057. Available from: [/pmc/articles/PMC7532804/](#)
287. Orfei MD, Porcari DE, D’Arcangelo S, Maggi F, Russignaga D, Ricciardi E.

- A New Look on Long-COVID Effects: The Functional Brain Fog Syndrome. *J Clin Med*. 2022 Oct 1;11(19). Available from: [/pmc/articles/PMC9573330/](#)
288. Al-kuraishy HM, Al-Buhadily AK, Al-Gareeb AI, Alorabi M, Hadi Al-Harcana NA, El-Bouseary MM, et al. Citicoline and COVID-19: vis-à-vis conjectured. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2022 39512. 2022 Sep 5;395(12):1463–75. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00210-022-02284-6>
289. Feher J. Pancreatic and Biliary Secretion. *Quant Hum Physiol*. 2012 Jan 1;721–30.
290. Thuy PX, Bao TDD, Moon EY. Ursodeoxycholic acid ameliorates cell migration retarded by the SARS-CoV-2 spike protein in BEAS-2B human bronchial epithelial cells. *Biomed Pharmacother*. 2022 Jun 1;150:113021. Available from: [/pmc/articles/PMC9035373/](#)

