

Escuela Superior Politécnica Del Litoral

Facultad Ciencias de la Vida

ANÁLISIS METABOLÓMICO DEL SUERO DE NIÑOS INFECTADOS POR
EL VIRUS DEL DENGUE PARA LA DETECCIÓN DE POTENCIALES
BIOMARCADORES ENDÓGENOS

Previo a la obtención del título de:

**MAGISTER EN BIOCENCIAS APLICADAS CON MENCIÓN EN
BIODESCUBRIMIENTO**

Presentado por:

Ricardo Ernesto Correa Fierro

Guayaquil – Ecuador

Año: 2025

Agradecimientos

Extiendo mi sincero sentir de gratitud a todas las personas e instituciones que contribuyeron al desarrollo de esta investigación. De manera especial a la Doctora Fernanda Bertuccez, quien concibió y diseñó el estudio, liderando con profunda pasión esta investigación. Por su ética y calidad humana ha sido y será siempre un modelo para seguir.

A la Doctora Noroska Salazar, por su gestión, experticia y apoyo que han sido cruciales en el desarrollo de este trabajo. A la Universidad Regional Amazónica IKIAM y los miembros del Laboratorio de Productos Naturales y Biomoleculas Discovery Group.

A la Escuela Superior Politécnica del Litoral, en especial al Laboratorio para Investigaciones Biomédicas, semillero de científicos liderado por el Doctor Washington Cárdenas. Este estudio no sería posible sin su trabajo y liderazgo. De igual manera, al Doctor Saurabh Mehta y más científicos de Cornell University.

A las Doctoras Mary Regato y Mildred Zambrano, así como todo el equipo del INSPI y Hospital de niños Dr. Roberto Gilbert.

Finalmente, extiendo mi gratitud a mis padres, mis hermanos y más familiares por su apoyo incondicional y motivación en este proceso.

Declaración Expresa

Yo, Ricardo Ernesto Correa Fierro acuerdo y reconozco que:

La titularidad de los derechos patrimoniales de autor (derechos de autor) del proyecto de graduación corresponderá al autor o autores, sin perjuicio de lo cual la ESPOL recibe en este acto una licencia gratuita de plazo indefinido para el uso no comercial y comercial de la obra con facultad de sublicenciar, incluyendo la autorización para su divulgación, así como para la creación y uso de obras derivadas. En el caso de usos comerciales se respetará el porcentaje de participación en beneficios que corresponda a favor del autor o autores.

La titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, secreto industrial, software o información no divulgada que corresponda o pueda corresponder respecto de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada por mí/nosotros durante el desarrollo del proyecto de graduación, pertenecerán de forma total, exclusiva e indivisible a la ESPOL, sin perjuicio del porcentaje que me/nos corresponda de los beneficios económicos que la ESPOL reciba por la explotación de mi/nuestra innovación, de ser el caso.

En los casos donde la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) de la ESPOL comunique al/los autor/es que existe una innovación potencialmente patentable sobre los resultados del proyecto de graduación, no se realizará publicación o divulgación alguna, sin la autorización expresa y previa de la ESPOL.

Guayaquil, 18 de marzo del 2025.

Ricardo Ernesto Correa Fierro
Autor

Evaluadores

María Isabelita Jimenez F. Ph.D.
Presidente del Tribunal

Fernanda Bertuccez C. Ph. D.
Tutora del proyecto

Noroska Salazar M. Ph. D.
Co-Tutora del proyecto

Fabian León T. Ph. D.
Docente Evaluador

Vivian Neira M. Ph. D.
Docente Evaluador

Resumen

El dengue es una enfermedad viral de gran preocupación, caracterizada por una presentación clínica heterogénea que dificulta el diagnóstico temprano y desarrollo de tratamientos específicos. La metabolómica ha aportado información clave sobre el perfil de los metabolitos, especialmente los lípidos, y su potencial para el diagnóstico de la enfermedad. En este estudio se analizó el suero de niños y adolescentes con dengue (n=25) y controles (n=15) mediante espectrometría de masas en dos plataformas: cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS) y desorción-ionización laser asistida por matriz (MALDI-MS). Los datos fueron analizados por estadística multivariada, mediante análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), que reveló una tendencia de separación entre grupos e identificó un panel de lípidos con potencial como biomarcadores. Mediante análisis de característica operativa del receptor (Curva ROC), ciertos metabolitos alcanzaron hasta un 80% de sensibilidad individualmente, aumentando hasta 96% cuando se modelaron en conjunto. Estos hallazgos ofrecen nuevas perspectivas sobre los mecanismos fisiopatológicos del dengue en población pediátrica y refuerzan su potencial como herramienta diagnóstica.

Palabras clave: metabolómica, biomarcador, dengue, lipidómica.

Abstract

Dengue fever (DF) is a major viral disease of global concern, characterized by heterogeneous clinical manifestations that hinder early diagnosis and the development of specific treatments. Exploratory metabolomics has provided key insights into metabolomic profiles, particularly lipids, and their potential in dengue diagnostics. In this study we analyzed serum samples from children and adolescents with dengue (n=25) and controls (n=15) using mass spectrometry on two platforms: liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS) and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS). The data was analyzed by multivariate statistics, using partial least squares discriminant analysis (PLS-DA), that revealed a separation trend between groups and identified a panel of lipids with potential as biomarkers. By performing the receiver operating characteristic (ROC) curve analysis, we identified metabolites that achieved up to 80% sensitivity individually, increasing to 96% when modeled together. These findings provide new insights into the pathophysiological mechanisms of dengue in pediatric populations and highlight the potential of lipids as diagnostic tools.

Keywords: metabolomics, biomarker discovery, dengue, lipidomics.

Índice

| | |
|--|------|
| Resumen..... | v |
| Abstract..... | vi |
| Abreviaturas..... | xiii |
| Capítulo 1..... | 1 |
| 1. Introducción..... | 1 |
| 1.1. Objetivos..... | 8 |
| 1.1.1. Objetivo general..... | 8 |
| 1.1.2. Objetivos específicos..... | 8 |
| 1.2. Marco Teórico..... | 9 |
| 1.2.1. Fiebre del dengue: etiología, enfermedad y situación actual..... | 10 |
| 1.2.2. Diagnóstico actual y perspectivas..... | 13 |
| 1.2.3. Alteraciones metabólicas por dengue..... | 16 |
| 1.2.4. Metabolómica..... | 20 |
| 1.2.5. Metabolómica no dirigida..... | 22 |
| 1.2.6. Diseño de estudios metabolómicos..... | 23 |
| 1.2.7. Matrices biológicas en estudios metabolómicos..... | 25 |
| 1.2.8. Tratamiento de muestras..... | 28 |
| 1.2.10. Cromatografía líquida acoplada a MS..... | 33 |
| 1.2.11. Desorción/ionización láser asistida por matriz acoplada a MS..... | 34 |
| 1.2.12. Obtención de perfiles metabolómicos..... | 36 |
| 1.2.13. Análisis estadístico e identificación de metabolitos..... | 38 |
| Capítulo 2..... | 43 |
| 2. Metodología..... | 43 |
| 2.1. Participantes y colección de muestras..... | 43 |
| 2.2. Diagnóstico molecular..... | 45 |
| 2.3. Extracción de metabolitos..... | 46 |
| 2.4. Metabolómica exploratoria mediante UPLC-MS..... | 47 |
| 2.5. Metabolómica exploratoria mediante MALDI-TOF-MS..... | 51 |
| 2.6. Análisis estadístico..... | 52 |

| | | |
|------------------|---|----|
| 2.7. | Identificación de compuestos | 53 |
| 2.8. | Análisis de potenciales biomarcadores..... | 54 |
| Capítulo 3..... | | 55 |
| 3. | Resultados y Análisis..... | 55 |
| 3.1. | Perfil de metabolitos | 55 |
| 3.1.1. | Perfil de metabolitos mediante LC-MS | 55 |
| 3.1.2. | Perfil de metabolitos mediante MALDI-TOF-MS..... | 58 |
| 3.2. | Selección de potenciales biomarcadores metabólicos..... | 59 |
| 3.2.1. | Metabolitos identificados por LC-MS | 59 |
| 3.2.2. | Metabolitos diferenciales identificados por MALDI-MS | 62 |
| 3.1.2. | Panel de metabolitos seleccionado mediante MALDI-TOF-MS | 70 |
| Capítulo 4..... | | 72 |
| 4.1. | Discusión | 72 |
| 4.2. | Conclusión | 80 |
| Referencias..... | | 81 |
| Anexos | | 89 |

Índice de tablas

Tabla 1. *Aportes de la metabolómica al estudio del dengue identificados durante la revisión del estado del arte.*

Tabla 2. *Características del diseño experimental de estudios metabolómicos en dengue identificados en la revisión del estado del arte.*

Tabla 3. *Condiciones del gradiente de elución aplicado para el análisis por LC-MS en el estudio metabolómico del suero de niños con dengue.*

Tabla 4. *Parámetros para construcción del cromatograma de iones obtenido mediante LC-MS en el estudio metabolómico del suero de niños con dengue.*

Tabla 5. *Resumen demográfico de los participantes incluidos en el estudio metabolómico del dengue en niños.*

Tabla 6. *Panel de los 15 compuestos diferenciales seleccionados según la prueba de permutación del PLS-DA con validación cruzada, obtenidos por LC-MS.*

Tabla 7. *Panel de 15 metabolitos de mayor abundancia entre los grupos dengue y control, seleccionados por el PLS-DA, a partir del análisis por MALDI-MS.*

Tabla 8. *Atribución putativa de metabolitos diferencialmente incrementados en el grupo dengue, obtenido vía metabolómica exploratoria por LC-MS del suero de niños infectados comparado con control*

Tabla 9. *Atribución putativa de metabolitos diferencialmente incrementados en el grupo control, obtenido vía metabolómica exploratoria por LC-MS del suero de niños infectados comparado con control.*

Tabla 10. *Atribución putativa de metabolitos diferencialmente incrementados en el grupo dengue, obtenido vía metabolómica exploratoria por MALDI-MS del suero de niños infectados comparado con control.*

Índice de figuras

Figura 1. *Diagrama del proceso de selección de artículos científicos para revisión de la literatura relacionada al estudio del dengue mediante metabolómica.*

Figura 2. *Tendencias de publicaciones de estudios metabolómicos del dengue reportados en la base de datos PubMed (hasta mayo 2023).*

Figura 3. *Vista general del flujo de trabajo para el presente estudio del dengue en niños mediante metabolómica exploratoria.*

Figura 4. *Diagrama de dispersión utilizando los dos componentes principales del PCA obtenido mediante LC-MS del suero de niños con dengue y controles, incluyendo controles de calidad para ambos grupos QCD (dengue) y QCC (control).*

Figura 5. *Gráficos de resultados por PLS-DA de metabolómica del suero de niños infectados con dengue versus control, por LC-MS.*

Figura 6. *Modelo de regresión generado mediante análisis multivariado supervisado PLS-DA de metabolómica exploratoria por MALDI-MS del suero de niños infectados con dengue y control.*

Figura 7. *Curvas ROC univariadas de metabolitos de mayor abundancia en el suero de niños con dengue, identificados por LC-MS.*

Figura 8. *Curvas ROC univariadas de metabolitos con menor abundancia relativa en el suero de niños con dengue comparado con control, identificados por LC-MS.*

Figura 9. *Análisis univariado de Curva ROC de metabolitos incrementados en el suero de niños con dengue comparado con control.*

Figura 10. *Curva ROC del conjunto de metabolitos identificados como potenciales biomarcadores por el PLS-DA de la metabolómica del suero de niños con dengue comparado con control, mediante LC-MS.*

Figura 11. *Análisis de curva ROC del conjunto de metabolitos identificados por el PLS-DA de la metabolómica del suero de niños con dengue comparado con control, mediante MALDI-MS.*

Abreviaturas

| | |
|-----------|--|
| AA | ácido araquínódico |
| CNF | fracción de verdaderos negativos |
| CPF | fracción de verdaderos positivos |
| Cer | ceramida |
| DEN1 | serotipo I del virus del dengue |
| DEN2 | serotipo II del virus del dengue |
| DEN3 | serotipo III del virus del dengue |
| DEN4 | serotipo IV del virus del dengue |
| DF | fiebre del dengue |
| DG | di gliceroles |
| DHA | ácido docosaheptaenoico |
| DWS | dengue con signos de alerta |
| DWWS | dengue sin signos de alerta |
| EIC | cromatograma de iones obtenido |
| ESI | ionización por electropulverización |
| EtOH | etanol |
| FA | ácidos grasos |
| FFA | ácidos grasos libres |
| GC-MS | cromatografía de gases-espectrometría de masas |
| GC-TOF-MS | cromatografía de gases-espectrometría de masas-tiempo de vuelo |
| GL | glicerolípidos |
| GlcA | ácido glucurónico |
| GP | glicerofosfolípidos |
| HMDB | base de datos de metabolómica humana |
| HPLC | cromatografía líquida de alta resolución |
| LC-MS | cromatografía líquida- espectrometría de masas |
| MALDI | desorción láser asistida por matriz de ionización |
| MeOH | metanol |
| MG | mono gliceroles |
| MSI | iniciativa para estándares en metabolómica |
| NAE | N-acilo etanolaminas |
| NMDR | repositorio nacional de datos metabolómicos |
| NMR | resonancia magnética nuclear |
| PE | fosfatidiletanolamina |
| PC | fosfatidilcolina |
| PCA | análisis de componentes principales |
| PCR | reacción en cadena de la polimerasa |
| PLS | mínimos cuadrados parciales |
| PUFA | ácidos grasos poli insaturados |
| PS | fosfatidilserina |

| | |
|-----------|--|
| QC | control de calidad |
| QCC | control de calidad del grupo control |
| QCD | control de calidad del grupo dengue |
| ROC | curva característica operativa del receptor |
| ROS | especies reactivas de oxígeno |
| RPLC | cromatografía líquida de fase inversa |
| RT-PCR | transcripción inversa - reacción en cadena de la polimerasa |
| SD | dengue severo |
| SM | esfingomielina |
| SP | esfingolípidos |
| ST | esterolípidos |
| ST | esteroles |
| TCA | ácido tri-carboxílico |
| TDF o FDR | tasa de descubrimiento falso |
| TG | tri gliceroles |
| UHPLC | cromatografía líquida de ultra eficacia |
| UHPLC-MS | cromatografía líquida de ultra alta resolución-espectrometría de masas |
| VIP | Importancia de las variables para la proyección |

Capítulo 1

1. Introducción

La fiebre del dengue (DF) se posiciona como una de las infecciones de etiología viral, de mayor preocupación para la salud pública después del COVID-19 (Kok et al., 2023). Esta enfermedad es provocada por el virus del dengue (DENV) que pertenece a la familia *Flaviviridae*. Existen cuatro serotipos del dengue y su genoma consiste en una cadena de ARN de sentido positivo de aproximadamente 11,000 nucleótidos (Romagnolo & Carvalho, 2021). El ciclo de replicación del virus se completa cuando un ser humano es picado por mosquitos del género *Aedes* infectados con el virus, vector principal para la transmisión de esta enfermedad (Chotiwan et al., 2018; Melo et al., 2018).

La creciente densidad poblacional humana, que se establece en áreas endémicas del dengue, configura un escenario considerable de morbilidad para un estimado de dos mil quinientos a tres mil novecientos millones de personas a nivel mundial (Ajlan et al., 2019; Romagnolo & Carvalho, 2021). Se estima que anualmente unas 390 millones de personas son infectadas, de las cuales entre 50 y 100 millones de infectados son sintomáticos (Ajlan et al., 2019; Rathnakumar et al., 2023; Romagnolo & Carvalho, 2021). Esto representa un riesgo alarmante de infección, que proyectado para el 2080, se estima que podría afectar al 60% de la población mundial (Ajlan et al., 2019; Messina et al., 2019).

A pesar de que la infección por dengue suele pasar desapercibida en casos asintomáticos o cuando se manifiesta como una fiebre autolimitada (Soe et al., 2020), en algunos casos puede progresar hacia manifestaciones clínicas con riesgo de hemorragia, involucramiento de varios órganos y extravasación de plasma (Ajlan et al., 2019). Las complicaciones durante la infección pueden depender de algunos factores, como: el serotipo del virus; una infección previa con dengue; la variabilidad genética; y la virulencia en el momento de la transmisión (Byers et al., 2019; Nunes & Canuto, 2020). Particularmente en niños, el dengue incluye fiebre, petequias o erupciones cutáneas, dolor abdominal, dolor de cabeza y hepatomegalia, donde comúnmente se presenta edema en extremidades, vómito, dolor retro-ocular y convulsiones (Dhooria et al., 2008; Ray et al., 1999).

El diagnóstico pediátrico, en la fase inicial de la infección, se dificulta debido a la similitud en la manifestación de diferentes condiciones comunes de la niñez (Silva et al., 2024). A pesar de que no existe vacuna o un tratamiento específico y efectivo para el dengue, es crucial la detección temprana de los casos para prevenir la progresión a manifestaciones severas, principalmente durante brotes estacionales en que los sistemas de salud pueden saturarse (Romagnolo & Carvalho, 2021; Silva et al., 2024; Whitehorn et al., 2015).

Los métodos actuales de diagnóstico del dengue incluyen métodos directos (aislamiento viral, detección de ARN, detección de antígenos) y métodos indirectos (serología IgM e IgG, y otros). La elección de un método de diagnóstico “ideal”, depende del propósito para el que se destine dicha prueba, ya sea para manejo de casos

clínicos, vigilancia e investigación durante brotes o para la evaluación de intervenciones terapéuticas (Peeling et al., 2010). Se ha documentado ampliamente las fortalezas y limitaciones de las técnicas actuales de diagnóstico (Byers et al., 2019; Kok et al., 2023; Peeling et al., 2010). Entre las limitaciones principales están: una baja sensibilidad en pruebas de antígenos, baja especificidad en pruebas de anticuerpos por reactividad cruzada con otros flavivirus y la incapacidad pronóstica o de diferenciación entre fases de la infección en pruebas moleculares (Patel et al., 2019).

De igual manera, varios autores resaltan la importancia de implementar estrategias técnicas enfocadas a la reducción del tiempo y complejidad en la obtención de resultados (Charrel, 2016), así como el desarrollo de pruebas de diagnóstico específicos, como el uso de biomarcadores, que permitan la intervención oportuna en pacientes para reducir la morbilidad y mortalidad (Peeling et al., 2010).

Los biomarcadores permiten abordar la comprensión del metabolismo alterado durante la enfermedad, al guardar correspondencia con las reacciones bioquímicas asociadas a un cierto fenotipo y que usualmente sería imposible de identificar mediante otras técnicas ómicas (Ivanisevic & Thomas, 2018). El descubrimiento de biomarcadores ha experimentado un importante desarrollo gracias a los avances de las técnicas metabolómicas, que permiten el análisis preciso y sensible de un amplio rango de moléculas endógenas (Byers et al., 2019). Estos estudios ofrecen aplicaciones prometedoras, posicionando a la metabolómica como una herramienta poderosa en estudios de infección y enfermedad, complementando la investigación genómica y proteómica (Yousefi et al., 2022).

Varios patógenos virales aprovechan mecanismos celulares similares durante la infección para su multiplicación, aun así, algunas alteraciones metabólicas presentan requerimientos específicos según la naturaleza del patógeno (Fontaine et al., 2015). Aquellas alteraciones sutiles pueden ofrecer una oportunidad para la identificación de marcadores específicos de la infección por dengue, mediante el establecimiento de perfiles metabólicos (Yousefi et al., 2022).

Los metabolitos constituyen pequeñas moléculas involucradas en diferentes procesos bioquímicos en la maquinaria celular y son el producto final entre la interacción entre el genoma y exposoma, por lo que se considera al metaboloma como la medida más directa del fenotipo a nivel molecular (Ivanisevic & Thomas, 2018). Al relacionar el fenotipo con la abundancia relativa de estas moléculas, podemos ampliar el conocimiento de la respuesta metabólica del hospedero durante la enfermedad (Birungi et al., 2010). Y en el caso del dengue, pueden proporcionar conocimientos esenciales sobre las alteraciones metabólicas del huésped como respuesta a la infección, mejorando así la comprensión de la patogénesis del dengue y sus impactos fisiológicos. (Melo et al., 2018; Shahfiza et al., 2017).

El estudio metabolómico en individuos infectados con dengue es un enfoque relativamente novedoso para el perfil de biomarcadores, que ha permitido la identificación de un volumen y variedad considerable de metabolitos alterados (Romagnolo & Carvalho, 2021). La mayoría de las investigaciones publicadas son de tipo inductivo, de estudios catalogados como metabolómica no dirigida, y un menor número de estudios dirigidos que buscan cuantificar compuestos específicos,

usualmente para probar una hipótesis generada en ensayos previos (Nunes & Canuto, 2020; Romagnolo & Carvalho, 2021). La metabolómica no dirigida es la denominación convencional para estudios que tienen como objetivo identificar una amplia gama de metabolitos, confiando en el análisis estadístico para dilucidar generalmente la relación entre la expresión del metabolismo y el fenotipo (Nunes & Canuto, 2020).

En el presente trabajo se documentó varios estudios que han amplificado la comprensión de la interacción entre el virus y el huésped durante la infección con dengue. Se describen alteraciones en varias rutas metabólicas asociadas al glicólisis, el ciclo del ácido tricarboxílico (ciclo TCA), β -oxidación de lípidos, metabolismo de aminoácidos y otras (Cui et al., 2013, 2017; Soe et al., 2020).

La obtención de perfiles metabolómicos para estos estudios requiere de herramientas analíticas poderosas, que otorgan una alta precisión, sensibilidad y especificidad para la detección del mayor número de metabolitos. La espectrometría de masas (MS) es una plataforma analítica que se ha convertido en la principal herramienta de la metabolómica exploratoria para la caracterización del metaboloma de matrices complejas (Gonzalez-Dominguez et al., 2017). En el estudio del dengue, la MS parece ser el enfoque más confiable para futuros estudios ya que ha permitido la identificación de la mayor cantidad y diversidad de metabolitos diferenciales en el suero humano, siendo esta la matriz biológica más comúnmente estudiada (Romagnolo & Carvalho, 2021). Varios grupos han recomendado el uso de más de una técnica analítica debido a la diversidad en la naturaleza fisicoquímica y concentraciones de los metabolitos presentes en un organismo, ampliando la cobertura del metaboloma en la exploración

de posibles biomarcadores (Gonzalez-Dominguez et al., 2017; Nunes & Canuto, 2020; Romagnolo & Carvalho, 2021).

Diversos flujos de trabajo aprovechan las ventajas de técnicas de separación acopladas a MS, como la cromatografía líquida (LC) y variadas técnicas de ionización que serán descritas más adelante. Bajo la premisa de combinar plataformas analíticas ortogonales en la metabolómica no dirigida, hemos implementado el estudio paralelo del suero humano mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (UPLC), y la desorción-ionización láser asistida por matriz (MALDI), acoplados a MS.

MALDI es una técnica de ionización acoplada a MS que se considera como una herramienta indispensable para estudios en lipidómica (Engel et al., 2022). En proteómica, ha resultado una herramienta prometedora para el monitoreo y vigilancia de enfermedades transmitidas por vectores, mediante el perfil de péptidos y proteínas de bajo peso molecular que permiten identificar especies de vectores, así como sus características de vida (M. M. Costa et al., 2024). El uso de MALDI-TOF-MS en nuestro estudio servirá como una prueba de concepto de su aplicabilidad en la exploración de metabolitos endógenos en el suero humano, ya que podría ofrecer ventajas por el menor tiempo de análisis y costos de operación.

En el presente estudio, realizamos un análisis de metabolómica no dirigida, en la cual se usó la cromatografía líquida de ultra alta eficiencia acoplada a la espectrometría de masas (UHPLC-MS) y la desorción-ionización láser asistida por matriz (MALDI),

acopladas a espectrometría de masas (MS) para identificar posibles biomarcadores en el suero de niños y adolescentes menores a 18 años.

Mediante estadística multivariada determinamos un panel de metabolitos con abundancias diferencialmente alteradas en el suero de niños y adolescente con dengue comparado con el grupo control. El poder discriminante de estos metabolitos les confiere la potencialidad de servir como biomarcadores de la enfermedad en este grupo etario. Para evaluar su sensibilidad y especificidad, realizamos el análisis de características operativas del receptor (ROC), una métrica ampliamente validada para la teoría de decisión con aplicaciones clínicas. El área bajo la curva ROC nos permitió evaluar la capacidad como biomarcadores de los metabolitos individualmente y como un conjunto. El desarrollo de estos análisis nos permitió identificar alteraciones metabólicas endógenas asociadas con la enfermedad gracias a la anotación putativa de las moléculas, lo que permite profundizar la comprensión de los mecanismos fisiopatológicos del dengue y ofrece una perspectiva prometedora para mejorar el diagnóstico de la enfermedad en niños.

1.1.Objetivos

1.1.1. Objetivo general

Identificar el perfil metabólico del suero de individuos con dengue menores de 18 años en comparación con controles mediante espectrometría de masas.

1.1.2. Objetivos específicos

Evaluar el potencial biomarcador de los metabolitos identificados en los grupos de estudio mediante el análisis de la curva ROC.

Analizar las vías metabólicas alteradas por la infección por dengue para la comprensión de sus mecanismos fisiopatológicos.

1.2.Marco Teórico

En el presente capítulo se presenta los resultados de una búsqueda sistemática enfocada en resumir los avances de la metabolómica para identificar biomarcadores de la infección con el virus del dengue. El objetivo de esta búsqueda fue la compilación de resultados de artículos de investigaciones originales sobre las alteraciones metabolómicas en humanos durante la infección por dengue.

La búsqueda se condujo siguiendo la metodología PRISMA en la base de datos científica PubMed en mayo del 2024, utilizando la búsqueda avanzada para cumplir con algunos criterios de inclusión previamente definidos:

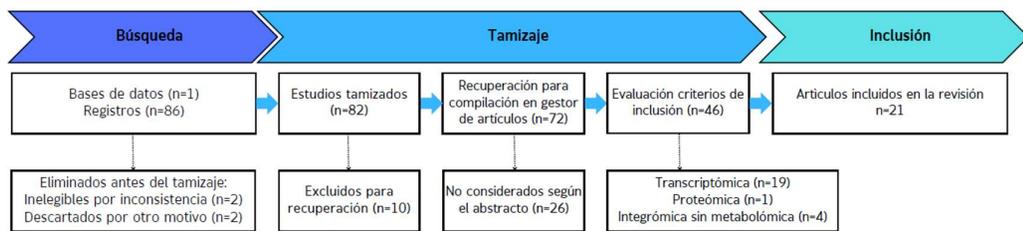
- a) Para incluir el agente etiológico y la infección en humanos se usó los términos: Dengue OR Dengue virus OR Dengue Fever OR Dengue Shock Syndrome OR Dengue Hemorrhagic Fever OR DSS OR DWS OR DWWS.
- b) Para abordar el enfoque metabolómico se usó los términos: Metabolome OR Metabolomics OR Metabolomic OR Targeted metabolomics OR Untargeted metabolomics OR Metabolic profiling
- c) Para identificar los hallazgos de la metabolómica se usó los siguientes términos: Biomarker OR Pathway OR Diagnose OR Diagnostics OR Therapeutic OR Pathology OR physiopathology OR metabolic profiling).

La búsqueda resultó en 86 registros, de los cuales se descartó publicaciones sin relevancia previos al 2010. El tamizaje de los artículos permitió descartar artículos cuyo título no coincidía con nuestra búsqueda, resultado en 72 artículos que fueron cargados

a un gestor de artículos. Según los criterios de exclusión, se descartó 15 estudios que se enfocaban en el estudio del metabolismo de mosquitos del género *Aedes* pero sin relevancia para el estudio del dengue según la lectura del abstracto. Adicionalmente, otros 10 registros correspondían a artículos de revisión o la aplicación de otros enfoques ómicos diferentes al nuestro n=26.

Según el método de búsqueda, se realizó la lectura comprensiva de 21 artículos, cuyos hallazgos serán presentados a lo largo del presente marco teórico junto con información recuperada manualmente de artículos de revisión y más fuentes básicas necesarias para la estructura del estado del arte.

Figura 1. Diagrama del proceso de selección de artículos científicos para revisión de la literatura relacionada al estudio del dengue mediante metabolómica. La búsqueda se realizó siguiendo el modelo PRISMA para revisiones sistemáticas.



1.2.1. Fiebre del dengue: etiología, enfermedad y situación actual

La infección por el virus del dengue es una de las enfermedades transmitidas por mosquitos más comunes y pueden llegar a causar entre 100 y 400 millones de casos anualmente, principalmente en las regiones tropicales y subtropicales (Kok et al.,

2023). Cada año mueren unas 10000 personas por la infección con este Flavivirus que se ha expandido durante los últimos 60 años a más de 125 países (Messina et al., 2019). El escenario global de cambio climático asociado a mayores temperaturas, así como la creciente urbanización genera un panorama que favorece la reemergencia del dengue; Primero, con condiciones climáticas asociadas a altas incidencias de infección por una mayor sobrevivencia, tasas de reproducción y de picaduras del vector. Y segundo, por el incremento del área de distribución del mosquito por urbanización no planificada y escasas estrategias de mitigación, favoreciendo las condiciones de vida en regiones históricamente sin registros de dengue (Messina et al., 2019).

La infección por dengue puede causar un amplio rango de síntomas, se presenta mayoritariamente como una enfermedad febril autolimitada con pocas manifestaciones clínicas (Cui et al., 2013; Cui, Pang, et al., 2018). La enfermedad involucra tres fases: febril, crítica y de recuperación con un período de incubación en el cuerpo humano que dura entre cuatro a siete días (Kok et al., 2023; Rathnakumar et al., 2023). Las fases se estiman según el número de días posterior al inicio de la fiebre: la fase temprana, febril o fase I (0-5 días). Fase crítica, defervescencia o fase II (5-8 días). Y convalecencia, recuperación o fase III (10-28 días) (Cui, Pang, et al., 2018; Rathnakumar et al., 2023). En algunos casos, la enfermedad puede progresar hacia complicaciones clínicas denominadas dengue severo (SDF) que incluyen sangrado, involucramiento de órganos y extravasación del plasma, que pueden conducir a distrés respiratorio, shock y la muerte (Ajlan et al., 2019).

Junto con dengue, otras enfermedades causadas por arbovirus como Zika, Chikunguña y Fiebre Amarilla tienen en común que la transmisión hacia los vertebrados requiere la picadura de mosquitos del género *Aedes*. Así también, según la Organización Mundial de la Salud, los síntomas provocados por dichas enfermedades se superponen, por lo que se dificulta el diagnóstico y tratamiento (Nunes & Canuto, 2020). Se reporta que al menos una tercera parte de las muertes por dengue se debe a un diagnóstico equivocado, lo cual eleva la necesidad de mejorar la especificidad de las pruebas (Patel et al., 2019).

Para abordar la naturaleza heterogénea de la enfermedad, la OMS implementó en 2009 cambios en la clasificación del dengue para la predicción de la severidad y nivel de atención requerido que se sigue a nivel mundial (Rathnakumar et al., 2023). Esto ha favorecido el triaje y la derivación a centros de salud principalmente durante brotes reemergentes. Aun así, mediante estudios retrospectivos, se concluye que la identificación de casos severos es limitada según esta clasificación y estudios similares podrán mejorar mediante la consideración de parámetros clave para discriminar el riesgo de complicaciones (Ajlan et al., 2019).

Los grupos etarios más vulnerables como adolescentes y niños así como adultos mayores, se encuentran en mayor riesgo de presentar complicaciones, con mayor probabilidad de hospitalización y muerte (Guzmán et al., 2002). En varios artículos se ha manifestado la necesidad de implementar estrategias técnicas enfocadas a la reducción del tiempo y complejidad en la obtención de resultados (Charrel, 2016), así como el desarrollo de pruebas de diagnóstico específicos, como el uso de

biomarcadores, que permitan la intervención oportuna en pacientes para reducir la morbilidad y mortalidad (Peeling et al., 2010).

1.2.2. Diagnóstico actual y perspectivas

Las manifestaciones heterogéneas del dengue impiden el establecimiento de un tratamiento terapéutico específico, sin embargo, se destaca que un diagnóstico temprano es crucial para el manejo clínico y la reducción del riesgo de mortalidad en pacientes con dengue severo (Kok et al., 2023; Nunes & Canuto, 2020; Patel et al., 2019). Las características de un método de diagnóstico efectivo dependen del contexto en que se pretende utilizar dichas pruebas (Peeling et al., 2010).

Se puede clasificar de manera general, en métodos directos e indirectos de diagnóstico. Los métodos directos procuran la detección temprana y definitiva durante la fase aguda, identificando o no el serotipo. Este método no es realizado rutinariamente en laboratorios, son pocos los kits comerciales disponibles y validados (Peeling et al., 2010). Entre estos métodos encontramos:

1. Aislamiento y detección del virus
2. Amplificación y detección del ARN
3. Detección de antígenos (NS1, ELISA)
4. Inmunohistoquímica

Los métodos indirectos son más comúnmente utilizados debido a la facilidad de uso comparado con técnicas de biología molecular y cultivo celular. Estos métodos serológicos dependen de la producción de inmunoglobulinas (Ig) como marcadores de

serodiagnóstico, muchos de los cuales aún requieren validación (Charrel, 2016; Peeling et al., 2010). Algunas de estas pruebas son:

1. Ensayos basados en IgM
2. Ensayos basados en IgG
3. Pruebas de fijación del complemento (FC)
4. Pruebas de inhibición de hemaglutinación (HI)
5. Ensayos de neutralización

Entre las pruebas actuales de diagnóstico se presentan ciertas limitaciones, como una baja sensibilidad en detección de antígenos, baja especificidad en pruebas de anticuerpos por reactividad cruzada con otros flavivirus y la incapacidad pronóstica o de diferenciación entre fases de la infección en pruebas moleculares (Patel et al., 2019). Adicionalmente, varios autores han presentado las limitaciones actuales y perspectivas para métodos de diagnóstico ideales (Byers et al., 2019; Peeling et al., 2010), así como la necesidad de implementar estrategias técnicas enfocadas a la reducción en el tiempo y complejidad en la obtención de resultados en infecciones por arbovirus (Charrel, 2016).

La ventana de tiempo óptima para el diagnóstico del dengue se estima entre los primeros días de sintomatología febril hasta los 10 días post-infección (Peeling et al., 2010), lo que es más viable mediante métodos directos. Sin embargo, los métodos indirectos presentan algunas ventajas como su aplicabilidad en entornos de recursos

limitados cuando la interpretación de sus resultados es adecuada (Byers et al., 2019; Charrel, 2016).

La metabolómica exploratoria se postula como una técnica ortogonal y no redundante con respecto a lo que proporcionan la PCR y la serología, debido a que las alteraciones metabólicas ocurren más rápidamente que los cambios serológicos y son detectables incluso después del periodo en que el ARN viral puede ser identificado por PCR. Además, permitirían evaluar la eficacia de intervenciones terapéuticas al monitorear detalladamente las variaciones moleculares y su retorno a la homeostasis (Byers et al., 2019).

La implementación práctica de biomarcadores mediante espectrometría de masas suele enfrentar una adaptación lenta, sin embargo, podrían resultar particularmente prácticos en laboratorios hospitalarios o universitarios equipados con estas tecnologías. La exploración y evaluación de biomarcadores del dengue podría cuantificar cambios rápidos la abundancia de metabolitos para monitorear la progresión de la enfermedad (Byers et al., 2019; Kok et al., 2023).

Actualmente no se ha implementado este método como un diagnóstico estandarizado de infecciones, pero existe el ejemplo de laboratorios clínicos que realizan tamizajes neonatales basados en espectrometría de masas, siendo una prueba del potencial que estos enfoques tienen por su alta resolución, especificidad y sensibilidad al monitorear uno o más biomarcadores (Byers et al., 2019; Nunes & Canuto, 2020).

1.2.3. Alteraciones metabólicas por dengue

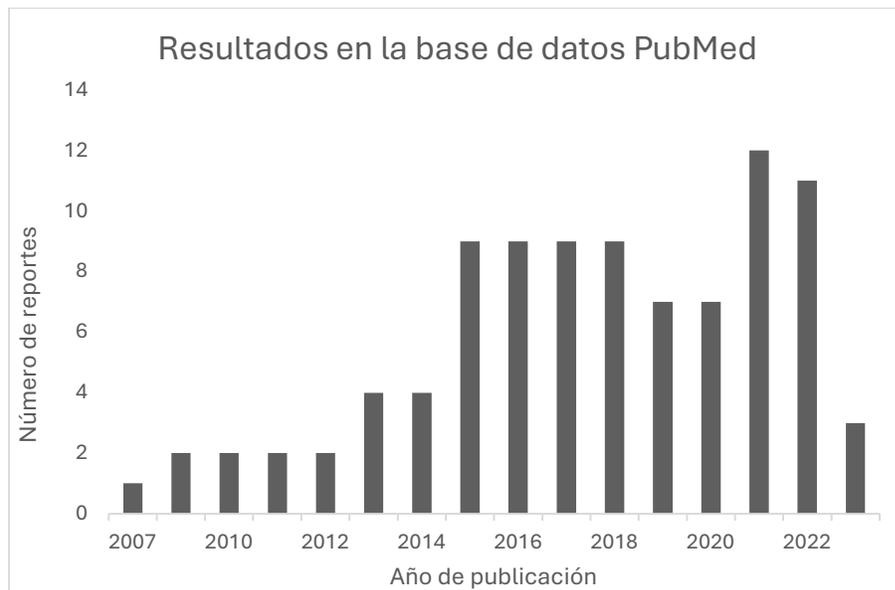
La naturaleza dinámica y heterogénea de las manifestaciones del dengue ha despertado un particular interés en identificar los mediadores de la respuesta metabólica del ser humano frente a este y otros arbovirus (Cui et al., 2013). Las infecciones virales dependen de los mecanismos moleculares del hospedero mediante la generación de complejos de replicación viral que demandan energía (Melo, Delafiori 2018). La mayoría de las infecciones desencadenan reacciones inmunes con requerimientos fundamentales, como respuestas pro-inflamatorias que reflejan los mecanismos adaptativos del humano frente a la replicación viral (Cui et al., 2013; Fontaine et al., 2015).

En el estudio de la fisiopatología, resulta interesante la identificación de casos en los que la respuesta inmune no se ve contrarrestada por un proceso anti-inflamatorio que proteja al hospedero de excesivos daños patológicos por una prologada o acentuada inflamación (Cui et al., 2013). Los diferentes abordajes ómicos han ayudado a conducir a un conocimiento holístico de los procesos biológicos que intervienen en la interacción del patógeno y hospedero, mediante la identificación de rutas metabólicas (Cui et al., 2013; Rathnakumar et al., 2023).

Se identificó que en las últimas décadas se han intensificado los esfuerzos desde la metabolómica y otros campos para comprender las alteraciones en la fisiopatología de la infección con dengue y la identificación de biomarcadores diagnósticos y pronósticos (Fig.2). A continuación, se presenta el estado del arte de estudios de

metabolómica que conducen al descubrimiento de marcadores y elucidación de las rutas metabólicas involucradas en la interacción con el virus.

Figura 2. *Tendencias de publicaciones de estudios metabolómicos del dengue reportados en la base de datos PubMed (hasta mayo 2023)*



Entre los primeros estudios identificados, se describen alteraciones en rutas metabólicas de aminoácidos utilizando un modelo de líneas celulares EA. Hy926 infectadas con dengue. Aquí es importante destacar que se observó diferencias asociadas al serotipo de dengue con que se infectó a las células, configurando patrones distintivos en el perfil metabólico atribuidos a cambios en los niveles de metabolitos como aminoácidos, ácidos dicarboxílicos, ácidos grasos y ácidos orgánicos relacionados al ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) (Birungi et al., 2010). Más adelante, en un estudio realizado por Cui y colaboradores (2013) del suero de pacientes con DF, se

encontró que fenilalanina era un metabolito que se encontraba incrementado en comparación a los controles, misma característica que se detectó en el estudio de células endoteliales antes mencionado. Sin embargo, también se presentan incongruencias, por ejemplo, en los niveles de triptófano con resultados diferentes para los dos estudios (Cui et al., 2013; Romagnolo & Carvalho, 2021).

También se identificó alteraciones en la ruta de los aminoácidos al estudiar la orina de pacientes infectados comparado con controles sanos mediante resonancia magnética nuclear y más alteraciones relacionadas al metabolismo energético mitocondrial, como intermediarios del ciclo del TCA y oxidación de ácidos grasos (Shahfiza et al., 2017). Es esencial seleccionar metabolitos que puedan diferenciar con precisión la infección por dengue de otras condiciones. A medida que surgen nuevos estudios metabolómicos en condiciones clínicas humanas, el análisis comparativo de las vías alteradas permite a los investigadores centrarse en los metabolitos específicos del fenómeno de interés.

La tirosina y la fenilalanina, ambas relacionadas con la producción de acetoacetato, fueron identificadas como metabolitos desregulados en cultivos celulares infectados con DENV1 y DENV3, respectivamente (Birungi et al., 2010), pero estas vías también parecen estar afectadas por factores como la edad, el VIH, la artritis y la fiebre (Shrinet et al., 2016), lo que limita su potencial utilidad como biomarcadores para el dengue.

En otro estudio se observó que algunos aminoácidos esenciales para la biosíntesis de proteínas como L-isoleucina, L-fenilalanina y 2-amino-metil-1-butanol presentaron menor prevalencia en pacientes con dengue, especialmente en pacientes con SD (Soe

et al., 2020). Estos metabolitos, representaron una minoría comparado con el número de metabolitos alterados, siendo las rutas metabólicas de lípidos las que mayor porcentaje de variación tuvieron al comparar grupos de participantes sanos, e infectados con diferentes grados de severidad. En aquellos pacientes con SD y DWWS se encontró que una notable alteración de metabolitos relacionados a los fosfolípidos, moléculas cruciales para la funcionalidad de la bicapa lipídica de las células (Soe et al., 2020).

Gracias a la alta sensibilidad de instrumentos basados basados en MS y MRN, la lista de metabolitos alterados es extensa reflejando principalmente la respuesta celular a la infección y la manipulación de los recursos energéticos durante la replicación viral (Chotiwan et al., 2018). Es conocido que las infecciones virales utilizan los mecanismos moleculares del hospedero a su favor, generando complejos de replicación viral que suponen una alta demanda energética. Estos procesos interrumpen la homeostasis celular y generan cambios en el metabolismo (Cui et al., 2013; Melo et al., 2018).

Existen resultados congruentes de diferentes grupos donde se identificaron modificaciones lipídicas por la infección con dengue *in vitro* y se corroboraron *in vivo*. Se plantea la hipótesis de que la activación de la glucólisis y la movilización de lípidos para el almacenamiento de ácidos grasos mediante la actividad de lipasas desempeñan un papel en los procesos de alta demanda energética durante la génesis de viriones (Manchester & Anand, 2017; Melo et al., 2018)

La variada naturaleza de los compuestos identificados en estos estudios se ha intentado sintetizar en varios artículos de revisión que seguramente podrán ofrecer un panorama más completo al lector. La revisión de los diferentes tipos de estudios metabolómicos con dengue refleja que no existe un consenso en los protocolos del tratamiento de muestras ni protocolos instrumentales, ampliando el panorama en el rango de compuestos identificados en diferentes matrices biológicas.

1.2.4. Metabolómica

La metabolómica implica el análisis de mezclas complejas que contienen moléculas de bajo peso molecular, conocidas colectivamente como metabolitos, que son sintetizadas a través de los procesos catabólicos y anabólicos de los organismos vivos (Byers et al., 2019). Los cambios metabólicos se pueden estudiar al relacionar el fenotipo con la detección e identificación de estas moléculas, que sirven como biomarcadores (Birungi et al., 2010).

Esto nos coloca en una etapa fundacional, donde el descubrimiento de biomarcadores sigue siendo una vía abierta para la exploración. La metabolómica ha provisto información valiosa para identificar cambios en los procesos metabólicos dentro de un sistema biológico después de un evento de estrés, como una enfermedad mediante el análisis diferencial en la regulación de metabolitos (Shrinet et al., 2016).

Simultáneamente, un creciente conjunto de enfoques y técnicas complementarias están en desarrollo, potenciando el alcance de los hallazgos para diversas enfermedades (Byers et al., 2019). En base a los análisis quimio-métricos, el tratamiento de muestras

y los diseños de estudio revisados, muchos de los estudios previos han constituido herramientas generadoras de hipótesis. En contraste, un subconjunto más pequeño de estudios adopta un enfoque dirigido o complementario, que es más deductivo y está impulsado por hipótesis basadas en biomarcadores diferenciales identificados en estudios previos (Nunes & Canuto, 2020).

Se identificó que la aplicación de la metabolómica a individuos infectados con DENV sigue siendo un enfoque relativamente novedoso para el perfil de metabolitos. La mayoría de los estudios (76%) son estudios inductivos, comúnmente denominados metabolómica no dirigida o exploratoria, enfocados en el descubrimiento de conocimiento. La metabolómica no dirigida es la denominación convencional para estudios que buscan identificar una amplia variedad de metabolitos, basándose en análisis estadísticos para dilucidar las variaciones en los conjuntos de datos en comparación con las características fenotípicas.

Simultáneamente, se está desarrollando un conjunto más amplio de enfoques y técnicas complementarias más robustas. El análisis instrumental, el tratamiento de muestras y los diseños de estudio sirven predominantemente como un enfoque generador de hipótesis. En contraste, un subconjunto más pequeño de estudios (24%) adopta un enfoque dirigido complementario, que es más deductivo y basado en hipótesis fundamentadas en biomarcadores diferenciales identificados en estudios previos. Esto a menudo implica la introducción de técnicas complementarias, ya sea de tratamiento de muestras, extracción de metabolitos, diferentes métodos de ionización, columnas cromatográficas o plataformas de separación distintas (Dunn et al., 2011).

1.2.5. Metabolómica no dirigida

La metabolómica no dirigida representa una poderosa herramienta para capturar el perfil metabólico de una muestra de interés y la investigación de biotransformaciones endógenas o exógenas (Snyder et al., 2013). El enfoque llamado no direccionado busca cuantificar la mayor cantidad de metabolitos como sea posible en un sistema biológico, con objetivos de descubrimiento y generación de hipótesis que suelen ser confirmadas por enfoques direccionados (Romagnolo & Carvalho, 2021).

La implementación de la metabolómica no dirigida ha conducido al descubrimiento de biomarcadores y una mejor comprensión de las enfermedades con aplicaciones en medicina de precisión (Cui, Lu, et al., 2018). La combinación de la metabolómica exploratoria, como una potente tecnología de fenotipado, al combinarse con enfoques clínicos y biológicos ortogonales, pueden acelerar significativamente el entendimiento de los mecanismos que subyacen a enfermedades complejas, en donde intervienen también un conjunto de factores genéticos y ambientales (Ivanisevic & Thomas, 2018).

Varias plataformas analíticas se han utilizado en la obtención del perfil metabolómico, en diferentes contextos. La adquisición y subsecuente identificación precisa de un gran rango de metabolitos ha sido abordada mediante la implementación de numerosas técnicas analíticas que constantemente presentan avances con respecto a su sensibilidad, especificidad y precisión, las cuales serán detalladas más adelante (Gonzalez-Dominguez et al., 2017). Aún así, el rendimiento de estas plataformas tiene limitaciones en el descubrimiento de cierta clase de metabolitos, propias de las propiedades fisicoquímicas que estas técnicas pueden explorar. Es por esto que se

resalta la importancia de la combinación de más de una técnica para una caracterización más amplia del metaboloma (Byers et al., 2019; Gonzalez-Dominguez et al., 2017).

Al aplicar metabolómica no dirigida en busca de una mejor comprensión de un proceso fisiopatológico, la generación de un volumen abundante de datos es una ventaja que también incluye algunos retos, considerando la capacidad computacional que se requiere para interpretar los resultados (Ivanisevic & Thomas, 2018). El gran volumen de datos generado en estos estudios puede reducirse priorizando metabolitos potencialmente relevantes (Cui, Lu, et al., 2018). Diferentes aspectos como el pre- y post- procesamiento, y curación de bases de datos podrían ayudar a solventar esta limitante. Así también el análisis estadístico e interpretación biológica, mediante diversas técnicas de estadística multivariantes favorece la selección de subconjuntos de metabolitos candidatos a biomarcadores o perfiles metabólicos de relevancia biológica (Cui, Lu, et al., 2018).

1.2.6. Diseño de estudios metabolómicos

Actualmente no existe un consenso en el número de muestras o participantes ideal, aunque algunos autores si reportan el uso de recursos para cálculo del número de muestras representativo en sus estudios (Shahfiza et al., 2017). Estas discrepancias entre estudios generan una alta variabilidad en los resultados y por consiguiente en la escalabilidad del uso de los biomarcadores a aplicaciones prácticas.

Entre los factores claves para determinar la robustez de un estudio se incluyen: tamaño de muestras suficiente, reporte del análisis confirmatorio, respaldo de manifestaciones

clínicas, un meticuloso cuidado en todas las etapas del flujo de trabajo y un análisis sin sesgos. Recientemente, se ha intentado abordar la disparidad entre las clasificaciones de la enfermedad reportada históricamente según los autores (Ajlan et al., 2019). El uso de una categorización estandarizada permite mejorar la interrelación entre los resultados encontrados por diferentes estudios metabolómicos, además de mejorar la eficiencia del tratamiento médico principalmente durante epidemias (Ajlan et al., 2019; Byers et al., 2019).

De manera general se realiza una comparación entre individuos infectados con dengue, en sus diferentes fases o grados de severidad y se contrasta con un control típicamente sanos. Aun así, depende del enfoque del grupo de investigación ya que se ha realizado el contraste con individuos enfrentando otra enfermedad, con sintomatologías coincidentes o por algún otro factor de conveniencia (Cui et al., 2017; El-Bacha et al., 2016; Năstase et al., 2023).

Dichos grupos deberán contar con un número suficiente de participantes para compensar la variabilidad individual al identificar metabolitos que puedes discriminar legítimamente el fenotipo estudiado (Byers et al., 2019). Además, para favorecer el descubrimiento de biomarcadores útiles para extrapolación a nivel poblacional es importante la validación de dichos marcadores, ya sea en un subgrupo del estudio, pero preferiblemente en cohortes prospectivas independientes (Cui, Lu, et al., 2018).

En el contexto de valorar los cambios metabólicos a lo largo de la evolución de la enfermedad, los estudios longitudinales proveen una dimensión temporal

longitudinalmente con el curso de una patología o intervención, iluminando la respuesta metabolómica de interés para el estudio al suprimir la interferencia de factores externos (Cui, Lu, et al., 2018). El seguimiento periódico del metaboloma ha provisto importantes avances en el estudio de la dinámica del dengue y explorar metabolitos con potencial pronóstico y diagnóstico (El-Bacha et al., 2016).

1.2.7. Matrices biológicas en estudios metabolómicos.

El estudio metabolómico fue introducido a la investigación del dengue como una forma de mejorar la interpretación de las respuestas metabólicas de mamíferos a la infección. La extracción de metabolitos y el tratamiento de muestras depende directamente de los objetivos del investigador y la elección del método analítico (Byers et al., 2019). Para identificar con precisión y fiabilidad los compuestos presentes en la muestra, es crucial inhibir las reacciones enzimáticas una vez que se toma muestra. Esto se logra mediante una rápida separación y criogenización de las muestras durante todo el proceso hasta la extracción de metabolitos (Dunn et al., 2011).

En 2010 se publicó el primer estudio metabolómico de la respuesta de un modelo celular humano a la infección por dengue empleando células híbridas endoteliales. Este primer modelo, se enfocó en la identificación de biomarcadores presentes en el medio de cultivo de líneas celulares frente a la infección con dengue, estudiando el exometaboloma al cuantificar dichos metabolitos (Birungi et al., 2010).

Recientemente, otro linaje de células clonadas a partir de riñón embrionario humano se ha empleado para identificar alteraciones metabólicas y lipídicas asociadas al retículo

endoplasmático, las cuales juegan un rol importante durante la patogénesis de infecciones como Dengue y coronavirus humano (Yousefi et al., 2022). Otro modelo de células fibroblásticas han sido utilizadas para explorar la intervención de rutas metabólicas asociadas a la glicólisis, donde se encontró que esta ruta es fundamental para satisfacer las necesidades energéticas durante la replicación viral (Fontaine et al., 2015). Los resultados de estudios *in vitro* y otros modelos celulares, al igual que modelos animales ofrecen una interesante alternativa para simplificar algunas variables como edad, género, estilo de vida y comorbilidades propias de ensayos clínicos en humanos además de la posibilidad de manipulación genética en modelos (Cui, Lu, et al., 2018).

De igual manera se han realizado varios estudios con modelos animales, sin embargo, estos modelos no reflejan totalmente la complejidad de la interacción y la respuesta metabólica del humano con el virus. El estudio metabolómico en humano requiere un mayor esfuerzo y dificulta la inclusión de un gran número de individuos, pero es un enfoque potente al momento de discriminar biomarcadores de utilidad clínica. Ante la falta de un modelo animal adecuado, aún existen incógnitas acerca de los procesos de respuesta y homeostasis en el estudio de la patogénesis del dengue (Cui et al., 2013).

Entre los estudios clínicos se encontró que el suero es el fluido más utilizado para el análisis metabolómico en pacientes con dengue (Tabla 1.). La elección entre suero y plasma se sugiere que depende principalmente del equipamiento del centro de salud o investigación y disponibilidad de este tipo de muestra, así como las preferencias del investigador. La separación del suero no requiere una centrífuga refrigerada, además

que la colección se puede realizar en tubos estériles sin anticoagulante. Con menor frecuencia se identificó estudios que realizan metabolómica de la orina de pacientes, que presenta ciertas ventajas en colección de muestras y reclutamiento de pacientes al ser una técnica menos invasiva y económica. Además, a diferencia del suero y plasma, hay menor presencia de enzimas que puedan interferir en la identificación de biomarcadores (Dunn et al., 2011).

Tabla 1. *Aportes de la metabolómica al estudio del dengue identificados durante la revisión del estado del arte.*

| Especie o modelo | Muestra o bio-fluido | Enfoque metabolómico | Autores |
|------------------|----------------------------------|-------------------------|---------------------------|
| Cultivo celular | 293FT Cells | Exploratorio + dirigido | (Yousefi et al., 2022) |
| | EA.hy 926 endothelial cell lines | Exploratorio | (Birungi et al., 2010) |
| | Human Foreskin Fibroblasts | Exploratorio | (Fontaine et al., 2015) |
| Mosquitos | A. aegypti midgut | Exploratorio | (Chotiwan et al., 2018) |
| | A. aegypti hemolymph | Exploratorio | (Shrinet et al., 2018) |
| | Orina | Exploratorio | (Shahfiza et al., 2015) |
| | | Exploratorio | (Shahfiza et al., 2017) |
| Humanos | Suero | Exploratorio | (Cui et al., 2013) |
| | | Exploratorio | (Shrinet et al., 2016) |
| | | Exploratorio | (Voge et al., 2016) |
| | | Exploratorio + dirigido | (Cui et al., 2016) |
| | | Exploratorio + dirigido | (Cui, Fang, et al., 2017) |

| | | | |
|---------|-----------------------------------|-------------------------|---------------------------------|
| | | Exploratorio | (Melo, Delafiori, et al., 2018) |
| | | Exploratorio + dirigido | (Cui et al., 2018) |
| | | Exploratorio + dirigido | (Patel et al., 2019) |
| | | Exploratorio | (Soe et al., 2020) |
| | | Exploratorio | (Rathnakumar et al., 2023) |
| | Plasma | Exploratorio | (El-Bacha et al., 2016) |
| | Suero humanizado | Exploratorio | (Cui, Hou, et al., 2017) |
| Ratones | Tejido hepático de ratones BALB/c | Exploratorio | (Zheng et al., 2023) |
| | Orina de ratones BALB/c | Exploratorio | (Zheng & Wang, 2022) |

Independientemente del tipo de estudio, se resalta la importancia de una correcta categorización de los grupos experimentales además de un tratamiento prolijo en la colección de muestras, almacenamiento y extracción de metabolitos (Dunn et al., 2011). De igual manera es crucial identificar cualquier fuente de sesgos o factores que puedan conducir a una incorrecta interpretación del fenómeno que se estudia, así como un reporte estandarizado de los resultados según consensos como la Iniciativa para Estándares en Metabolómica (MSI por sus siglas en inglés) (Byers et al., 2019).

1.2.8. Tratamiento de muestras

Debido a que estas muestras son matrices biológicas compuestas por metabolitos de variada naturaleza, es deseable la habilidad de poder separar dichos compuestos según su polaridad, peso molecular o más características que permitan mejorar la selectividad

y sensibilidad en la identificación (Byers et al., 2019; Nunes & Canuto, 2020). Previo a la obtención de un espectro de masas, que permita valorar cuantitativa o cualitativamente la presencia de metabolitos relevantes para un estudio metabolómico, se debe preparar las muestras según los objetivos del investigador.

De los estudios que se identificó en la búsqueda, un 29% (n=6) utilizaron la técnica de espectroscopía por resonancia magnética de protón (1H NMR) y un solo registro con espectroscopía de Raman (Patel et al., 2019). Estos, tienen una ventaja por el mínimo tratamiento que requieren las muestras durante el análisis, usualmente consiste en la dilución de esta en un buffer para NMR. Dicho buffer suele contener una sustancia conocida como bloqueante para mantener la fuerza del campo magnético y un buffer salino para mantener las condiciones fisiológicas de pH (Haslauer et al., 2019). Muestras como suero o hemolinfa se suele mezclar directamente con este buffer, y otras muestras menos concentradas como orina suelen ser centrifugadas (Shrinet et al., 2016).

La obtención de metabolitos para las demás plataformas analíticas usualmente requiere un proceso de extracción de tipo líquido/líquido utilizando solventes puros, en algún gradiente de polaridad o afinidad. Además, es deseable una disrupción de las estructuras celulares con excepción de aquellos estudios que se enfocan en el exometaboloma (Birungi et al., 2010; Dunn et al., 2011).

Entre los métodos más comunes de extracción en muestras de suero o plasma en humanos, se realiza inicialmente una precipitación de las proteínas con solventes grado

HPLC. Se usa un volumen de plasma o suero usualmente igual o menor a 50 μL y se homogeniza mediante vórtex o sonicación con al menos 4 veces su volumen del solvente, por ejemplo: metanol frío, metanol diluido, cloroformo, tetrahidrofurano; y es posteriormente centrifugado para sedimentar restos celulares y proteínas. Durante la extracción se suele agregar un estándar interno, una sustancia conocida que sería identificable para facilitar la trazabilidad y sirve como control de calidad del experimento (Cui et al., 2017; Rathnakumar et al., 2023).

Se puede implementar una adición subsecuente del solvente al sobrenadante del paso anterior para mejorar la purificación. Aquí es posible utilizar otro solvente orgánico que favorezca una separación de fases, de ser requerido ya que algunos autores analizan las fases orgánicas y acuosa del extracto por separado (Cui, Lu, et al., 2018; Dunn et al., 2011). Los metabolitos se pueden concentrar mediante centrifugación en un evaporador al vacío, los cuales son reconstituidos según la afinidad de solventes usados en las fases móviles de separación previo a su análisis por MS.

1.2.9. Espectrometría de masas

Existen diferentes métodos para analizar la composición bioquímica según sus características físico-químicas (Romagnolo & Carvalho, 2021), de las cuales identificamos que, en la investigación metabolómica en dengue, la espectrometría de masas (MS) es la más común, seguida de la MNR. Esta técnica analítica separa los iones cargados de los analitos según su relación masa-carga (valores m/z). La espectrometría de masas permite caracterizar con alta sensibilidad y resolución perfiles

lipídicos a pesar del gran número y diversidad estructural de estos compuestos (Khalil et al., 2010).

Los avances en espectrometría de masas han permitido la mejora continua en la confianza de identificación de compuestos. Los analizadores de masas basados en tiempo de vuelo (TOF, por sus siglas en inglés) alcanzan una alta precisión, que combinado con otros desarrollos en la velocidad y sensibilidad en la adquisición de datos, favorecen la obtención de información estructural de múltiples moléculas pequeñas (Cui, Lu, et al., 2018).

La MS realiza la detección de masas al acoplarse a instrumentos de separación como cromatografía líquida, cromatografía de gases o por inyección directa junto con el uso de alguna fuente de ionización de las muestras. En el presente estudio utilizaremos dos métodos de ionización que en términos generales se pueden considerar “fuerte” y “suave” al usar ESI y MALDI-MS, es decir, que no produce mayor fragmentación molecular. Estas generalizaciones podrían resultar burdas debido a la naturaleza multifactorial en el flujo de trabajo con estas plataformas. La complementariedad de estas son herramientas ofrecen una cobertura de metabolitos en gradiente de mayor a menor polaridad con ESI y MALDI, respectivamente. El impacto en la ciencia de las dos técnicas hizo a sus autores merecedores del Premio Nobel de Química en 2002.

Algunos de estos estudios incorporaron una técnica de separación complementaria a las muestras o analizaron diferentes fracciones de los extractos para ampliar el panorama de metabolitos (Tabla 2). Algunos estudios han demostrado que la

combinación de dos técnicas de separación amplía significativamente la cobertura del metaboloma (Cui, Lu, et al., 2018). La cromatografía gaseosa (GC) ha sido utilizada en menor medida, y se reporta como una herramienta prospectiva para metabolómica dirigida.

Tabla 2. Características del diseño experimental de estudios metabolómicos en dengue identificados en la revisión del estado del arte.

| Autores | Grupos analizados | Plataforma principal | Plataforma complementaria |
|----------------------------|---|----------------------|---------------------------|
| (Shahfiza et al., 2015) | 52 Dengue vs. 43 Sanos | | Ninguna |
| (El-Bacha et al., 2016) | 48 Dengue vs. 17 febril Control | | Ninguna |
| (Shrinet et al., 2016) | 40 Dengue vs. 10 Sanos | 1H NMR | Ninguna |
| (Shahfiza et al., 2017) | 96 Dengue vs. 50 Sanos | | Ninguna |
| (Shrinet et al., 2018) | 100 Control vs 100 Dengue vs. 100 co-infectados CHIKV | | Ninguna |
| (Voge et al., 2016) | 127 Dengue vs. 52 Non-Dengue | HILIC-MS/MS | RP-LC-MS |
| (Melo et al., 2018) | 20 Dengue vs. 10 Control | HRMS | Ninguna |
| (Cui et al., 2013) | 44 Dengue vs. 50 Control | | GC-MS |
| (Cui et al., 2018) | 25 Dengue vs. 27 DHF | LC-MS | Ninguna |
| (Rathnakumar et al., 2023) | 13 Dengue vs. 13 Sanos | | Ninguna |
| (Cui et al., 2016) | 116 Dengue vs. 24 Control | LC-MS/MS | Ninguna |
| (Soe et al., 2020) | 30 Dengue vs. 10 Sanos | RP-LCMS | Ninguna |
| (Patel et al., 2019) | 37 Dengue vs. 37 Malaria vs. 54 Sanos | RS | MS |
| (Zheng & Wang, 2022) | Modelo de ratones infectados | UHPLC | Ninguna |
| (Zheng et al., 2023) | | UHPLC | Ninguna |

1.2.10. Cromatografía líquida acoplada a MS

La metabolómica no-dirigida busca la mejor discriminación posible mediante la separación, por lo que se requiere una fase estacionaria cuyas propiedades fisicoquímicas provean esta versatilidad y eficiencia en la resolución de una amplia variedad de compuestos orgánicos (Cui, Lu, et al., 2018). Esta es una de las razones por la cual la cromatografía líquida es el patrón estándar para identificación de biomarcadores en metabolómica exploratoria y es la técnica analítica establecida mediante la cuantificación de la intensidad de los iones (Romagnolo & Carvalho, 2021)

La mayoría de los estudios utilizan cromatografía líquida de fase inversa (RPLC por sus siglas en inglés), la cual inicia con un alto contenido acuoso en la fase móvil y la fase orgánica es incrementada (metanol o acetonitrilo), operando usualmente de 100% acuoso hasta 100% orgánico (Dunn et al., 2011). En nuestra búsqueda se identificó que la cromatografía líquida y sus variantes representaba el 67% de los estudios (Tabla 2).

Los instrumentos de separación convencional mediante cromatografía líquida de alto rendimiento HPLC han provisto perfiles metabólicos valiosos, aún así, están siendo ampliamente desplazados por métodos de ultra alto rendimiento (UHPLC), con una mayor eficiencia cromatográfica y mayor resolución de separación (Gika et al., 2019).

La cobertura del metaboloma se ve favorecido con estos métodos debido a la reducción de superposición de picos cromatográficos y una menor supresión de iones, que en conjunto de una selección adecuada de columnas y condiciones de elución, favorece el análisis de un rango diverso de clases de metabolitos (Gika et al., 2019).

1.2.11. Desorción/ionización láser asistida por matriz acoplada a MS

Se ha reportado que el uso de MALDI-TOF-MS es un enfoque innovador para la identificación de mosquitos vectores y los patógenos que estos transmiten, con aplicaciones en la respuesta temprana a epidemias virales (M. M. Costa et al., 2024). Para nuestro conocimiento, esta plataforma de espectrometría de masas no ha sido utilizada en el estudio del perfil metabólico humano durante la infección con dengue. Sin embargo, se han reportado numerosos estudios de exploración de biomarcadores para diferentes tipos de cáncer bajo el enfoque de peptidómica utilizando MALDI-TOF-MS (Ployetch et al., 2022).

MALDI-TOF-MS, involucra la ionización de partículas de muestra mezcladas con una matriz que transmite iones a dicha muestra durante la excitación con un haz de láser. Las partículas resultantes son aceleradas mediante vacío, donde se determina la relación masa/carga en base al tiempo de vuelo hasta el detector (M. M. Costa et al., 2024).

Entre los resultados de nuestra búsqueda, no se identificó estudios que utilicen MALDI-MS para la obtención del perfil de metabolitos en pacientes con dengue. Sin embargo, se discute que la implementación de espectrometría de masas MALDI-TOF, como una herramienta complementaria a otras plataformas analíticas, podría representar una estrategia de diagnóstico rápida, robusta y confiable durante la ocurrencia de brotes virales (J. Costa et al., 2021).

Además del uso de instrumentos con ESI, MALDI es la técnica de ionización más ampliamente utilizada en estudios proteómicos (Engel et al., 2022). Aun así, presenta algunas limitaciones cuando el tipo de muestra que se utiliza es altamente compleja por su cantidad, diversidad y naturaleza de los metabolitos como suero, sangre o plasma (Swiatly et al., 2017). La investigación moderna de lípidos también se ha visto beneficiada de múltiples ventajas que ofrece MALDI-TOF-MS por factores como su rapidez, sensibilidad y tolerancia a impurezas, generando un espectro con mayor fragmentación de los analitos (Engel et al., 2022).

Los instrumentos comercialmente disponibles de MALDI-TOF-MS son costosos, pero se considera que su inversión se retribuye por el bajo costo de análisis por muestra (M. Costa et al., 2024). Además, la amplia aplicación de dichos equipos para la identificación rutinaria de microorganismos en laboratorios permitiría cerrar la brecha en la implementación práctica de este enfoque. A pesar de que MALDI-TOF provee un alto rendimiento, no ha sido ampliamente aprovechada en el diagnóstico de arbovirus a diferencia del diagnóstico de herpesvirus y enfermedades respiratorias y enterohepáticas (J. Costa et al., 2021).

Durante la pandemia por COVID-19, se exploró el potencial de esta herramienta para el diagnóstico en hisopados nasales, encontrando un 94% de precisión en la detección del virus comparado con resultados obtenidos mediante RT-PCR (Nachtigall et al., 2020). Algunas consideraciones para tomar en cuenta es la complejidad del tipo de muestra analizada. En el caso del análisis de muestras de suero humano, era necesario el uso de tratamientos previos de la muestra como ultrafiltración con membrana o

extracción de fase inversa como pretratamiento, para obtener mejor detección de péptidos de bajo peso molecular (Aresta et al., 2008).

Aunque los principios de MALDI-MS no han cambiado, se han logrado avances significativos en su aplicación, incluyendo: 1) Nuevas matrices que favorecen el aumento de la sensibilidad y reproducibilidad; 2) Ampliación del rango de masas analizadas mediante la corrección de interferencias de iones generados por ruido en masas menores a 500 Da.; 3) Mejor comprensión teórica del mecanismo de ionización y por consiguiente en la resolución de picos; 4) Acoplamiento de MALDI-MS con técnicas cromatográficas para mejorar el análisis de mezclas complejas (Engel et al., 2022).

1.2.12. Obtención de perfiles metabolómicos

Una vez que los metabolitos fueron cuantificados, ya sea por el enfoque exploratorio o dirigido, se busca conducir los análisis estadísticos, modelado y análisis bioinformáticos (Romagnolo & Carvalho, 2021). La identificación de compuestos en estudios de metabolómica no dirigida debe enfrentar varias limitaciones, en parte por el rango de la naturaleza química de los metabolitos que pueden corresponder a una enorme variedad de compuestos orgánicos, desde ácidos nucleicos y aminoácidos hasta azúcares y lípidos (Cui, Lu, et al., 2018).

La similitud en los elementos que componen un metabolito puede generar falsos-positivos en la búsqueda de anotaciones en bases de datos, ya que a pesar de tener una diferente estructura las masas mono-isotópicas pueden ser compartidas por varios

metabolitos. Los perfiles de picos no identificados al relacionarlos con picos conocidos ayudan a clasificar compuestos y reducir ambigüedades sin requerir confirmación estructural completa. El software MS-DIAL es clave en metabolómica no dirigida, ya que permite deconvolucionar espectros de masas, identificar compuestos coeluyentes y ampliar el espacio del metaboloma. (Cui, Lu, et al., 2018; Tsugawa et al., 2015).

Los resultados de los espectros de masas se presentan como datos compuestos en una matriz, en los cuales se reporta la intensidad de la señal o área del pico cromatográfico que corresponden a un a un valor m/z y tiempo de retención. Al realizar el preprocesamiento se alinea los tiempos de retención en masas comunes para todas las muestras, corrigiendo de este modo el efecto de desfase propio de un estudio con gran número de inyecciones en cromatografía líquida, asegurando que un pico cromatográfico se ha identificado con los mismos parámetros para todas las muestras.

Usualmente el pre-procesamiento de los datos busca compactar señales analíticas complejas mediante la reducción del ruido, detección y deconvolución de la señal, alineamiento y agrupamiento para generar una matriz de datos de relevancia molecular (Nunes & Canuto, 2020). Además que es favorable comprimir la matriz de datos a un formato tabular con las concentraciones, agrupamiento de espectros o intensidad de picos, por su compatibilidad para el procesamiento de datos (Xia & Wishart, 2016).

Las lecturas registradas en los cromatogramas obtenidos son luego procesadas mediante software abiertos como Metaboanalyst, o comercialmente disponibles como

MetaCore donde se realiza la alineación de picos cromatográficos, reducción de ruido y corrección del tiempo de retención (Romagnolo & Carvalho, 2021).

1.2.13. Análisis estadístico e identificación de metabolitos

El análisis estadístico de los datos metabolómicos permite evaluar las diferencias entre los grupos experimentales, identificar metabolitos y clasificar las muestras según estos marcadores. Al igual que los métodos analíticos aplicados en el pre-procesamiento de los datos, la elección del método estadístico puede depender de la pregunta de investigación, estructura de los datos y objetivos del estudio (Byers et al., 2019).

Es análisis multivariado abarca un amplio rango de técnicas estadísticas que permiten explorar múltiples variables simultáneamente. En metabolómica es común encontrar enfoques supervisados y no supervisados de estadística multivariada aplicados para reducir la dimensionalidad y complejidad para la exploración de biomarcadores. Para el estudio del dengue, se encontró que el método más comúnmente utilizado es el Análisis de Componentes Principales (PCA, por sus siglas en inglés), el Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA, por sus siglas en inglés) y el PLS-DA Ortogonal. Es importante resaltar que en algunos estudios utilizan la combinación de métodos estadísticos para analizar los datos metabolómicos.

El PCA y análisis de agrupamiento asociado a este, representan el enfoque no supervisado de estadística multivariada que más ampliamente se utiliza para entender la variación y tendencias en los datos, simplificando su complejidad y transformándolas en variables ortogonales llamadas componentes principales, que mejoran la

comprensión de la fuente de varianza en el set de datos metabolómicos (Byers et al., 2019).

De forma complementaria, los enfoques supervisados como PLS-DA permiten identificar biomarcadores y predecir o clasificar la pertenencia de las muestras a un grupo estudiado. Esto mediante un modelo de regresión mediante combinación lineal de las variables originales que mejor pueden predecir la pertenencia de una muestra a una variable categórica y (Brown & Davis, 2006; Byers et al., 2019; Szymańska et al., 2012).

Para lograr obtener un modelo eficiente mediante PLS-DA, se aplica un esquema de doble validación cruzada, que permita no solo la optimización o calibración del modelo, pero también la evaluación de la eficiencia final del modelo en la discriminación de los datos. Dicha optimización y evaluación se puede realizar con diferentes técnicas estadísticas de diagnóstico, entre las más utilizadas están: número de misclasificaciones (NMC, por sus siglas en inglés), área debajo de la curva característica operativa del receptor (AUROC, por sus siglas en inglés), Q^2 y Q^2 discriminante (DQ^2) (Szymańska et al., 2012).

Las clasificaciones utilizadas para aplicar estos métodos de reducción de la dimensionalidad dependen del diseño del estudio y típicamente involucran un grupo infectado comparado con un grupo sano. De igual manera, se pueden explorar diferentes fases de la infección, discriminación del serotipo del virus o la comparación longitudinal a lo largo del curso de la enfermedad. Los modelos se complementan

mediante la valoración de los metabolitos con análisis univariados que explican significativamente la variación entre las condiciones experimentales. Entre estos se utilizan diferentes métricas como: ANOVA, análisis *fold change*, valoración de importancia de las variables para la proyección (VIP scores), test-t de Student, valor p, prueba U de Mann-Whitney, entre otros.

Una vez que se define la significancia de uno o más metabolitos para discriminación de los grupos, se procede a la identificación de la naturaleza de estos compuestos. Existen distintos niveles de confianza establecidos para la identificación de un metabolito según la MSI, donde el primer nivel corresponde a los compuestos identificados según dos o más propiedades como: *m/z* precisa, fragmentación MS, tiempo de retención, estándar de referencia. Idealmente, la confirmación de la identidad de un compuesto químico debería realizarse basándose en el análisis de estándares analíticos auténticos, más en la actualidad existen cientos de señales analíticas que no logran identificarse por esta vía por razones como limitaciones de las bases de datos, indisponibilidad de estándares de referencia o insuficiente tecnología para analizarlos (Cui, Lu, et al., 2018; Nunes & Canuto, 2020).

Esto determina de la identificación de metabolitos es uno de los mayores retos en el flujo de trabajo de la metabolómica exploratoria. El desarrollo de herramientas de predicción basados en modelos de fragmentación de las masas ha aportado una solución en la identificación y la consecuente interpretación biológica de los metabolitos alterados gracias al uso de bases de datos como METLIN, Human Metabolome Database (HMDB), LipidMaps, MassBank (Byers et al., 2019; Nunes & Canuto, 2020).

La anotación putativa, en estos casos, no utiliza un estándar de referencia y se basa en la semejanza del espectro de masas con aquellas reportadas en otros estudios o bases de datos, y se encuentra establecida en un segundo nivel de confianza según la MSI (Cui, Lu, et al., 2018).

Según el orden de confianza estos cuatro niveles categorizan en primer lugar a aquellos compuestos confirmados mediante la comparación con estándares de referencia mediante el tiempo de retención, masa exacta (MS/MS e isótopos). El segundo nivel comprende a los compuestos anotados sin estándares de referencia, pero considerando las propiedades fisicoquímicas reportadas en bibliotecas de referencia (similitud de espectros de fragmentación de masas). El tercer nivel realiza la identificación putativa basándose en tiempos de retención y valores de m/z relativos. En cuarto nivel, con menor nivel de confianza están los compuestos desconocidos que no han sido resueltos por el análisis espectral (Cui, Lu, et al., 2018). La identificación mediante anotación ha facultado el descubrimiento de biomarcadores en la investigación de enfermedades y procesos biológicos variados de utilidad epidemiológica.

1.2.14. Evaluación de sensibilidad de los biomarcadores

La evaluación consiste en el análisis de la curva de característica operativa del receptor (ROC) utilizada para valorar el rendimiento de predicción de una variable frente a eventos o clasificaciones dicotómicas. El concepto de la curva ROC, introducido inicialmente en la segunda guerra mundial para caracterizar la capacidad de un operador de radar en identificar aeronaves amigas de las hostiles, permeó a otras

aplicaciones que involucran la teoría de procesos de decisión. La curva ROC clásica se genera mediante la gráfica de la fracción de verdaderos positivos (CPF) en el eje vertical, y 1- fracción de verdaderos negativos (CNF) en el eje horizontal.

El valor área bajo la curva ROC es una medida robusta para evaluar el rendimiento de diferentes modelos de biomarcadores, principalmente validado en el desarrollo y valoración de pruebas de diagnóstico médico (Xia et al., 2013; Xia & Wishart, 2016).

La interpretación de la funcionalidad biológica de los metabolitos alteradas se suele realizar una vez que los compuestos putativos son sometidos a los análisis estadísticos de significancia respectivos y al estudiar su relación con rutas metabólicas (Byers et al., 2019; Nunes & Canuto, 2020). La incursión de la metabolómica en el estudio de la fisiopatología frente a una infección ha permitido la identificación de biomarcadores con aplicaciones en el diagnóstico y evaluación de tratamientos (Byers et al., 2019).

Capítulo 2.

2. Metodología

El presente estudio se condujo en colaboración con el “Hospital de Niños Doctor Roberto Gibert” en la ciudad de Guayaquil, Ecuador. El proyecto fue revisado y aprobado en febrero de 2017 por el comité de ética en investigación del “Hospital Luis Vernaza” con número HLV-DOF-CEI-004. Los protocolos de inclusión de participantes, procedimientos de colección de muestras y tratamiento confidencial de resultados fueron autorizados por dicho comité y se desarrollaron en concordancia con los lineamientos éticos de la declaración de Helsinki de 1964. Se obtuvo consentimiento informado de los representantes legales de menores de edad previo a la colección de muestras. El esquema del estudio se presenta en la figura 3.

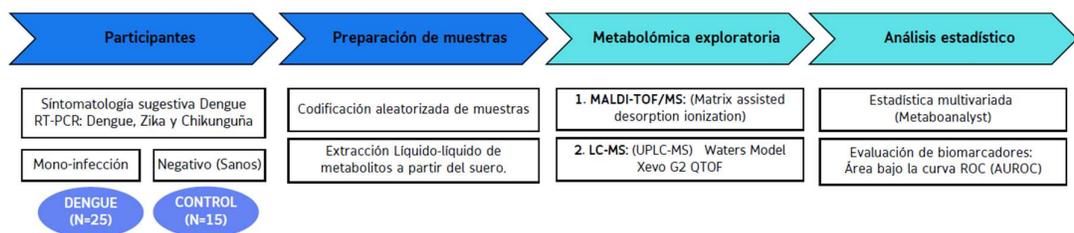
2.1.Participantes y colección de muestras

Se condujo la selección de pacientes menores a 18 años que fueron llevados a emergencias del hospital pediátrico durante los primeros cinco días de manifestaciones clínicas congruentes con sospecha por infección con arbovirus. El criterio mínimo de inclusión en el grupo dengue, por parte del staff médico fue la presencia de alguno de los siguientes signos o síntomas: fiebre, dolor de cabeza, dolor retro-orbital, mialgia, artralgias, náuseas, vómito o erupciones cutáneas. El diagnóstico se confirmó mediante RT-PCR (N=25). Se excluyó pacientes que presentaban signos o síntomas de otitis media, sinusitis, infecciones del tracto urinario o reacciones alérgicas y aquellos en los que se confirmó una infección por otros arbovirus, como zika y chikunguña, mediante

RT-PCR. El grupo control fue compuesto con la participación de niños y adolescentes que asistían a consulta debido a otras condiciones clínicas que demandaban toma de muestra de sangre para respectivo diagnóstico; como consultas de rutina y otras enfermedades no asociadas a arbovirosis. Para este grupo, se determinó resultado negativo para dengue mediante RT-PCR (N=15). Para ambos los grupos, se excluyó la posibilidad de otras arbovirosis, como Zika y Chikunguña mediante RT-PCR. Además, se excluyó la participación de pacientes con historial médico o auto reporte de cáncer o embarazo.

Se colectó muestras de sangre de todos los pacientes luego de la anamnesis del médico tratante. Se aprovechó la toma de muestra para diagnóstico y con el uso de un vacutainer, se separó suficiente sangre para obtener tres fracciones sanguíneas: sangre completa, suero y plasma que fueron distribuidas en alícuotas de 250 μ L para ser almacenadas a -80 °C hasta su análisis.

Figura 3. Vista general del flujo de trabajo para el presente estudio del dengue en niños mediante metabolómica exploratoria.



2.2. Diagnóstico molecular

Se sometió las tres fracciones sanguíneas de cada participante a extracción de ARN mediante la adición de 750 μ L de TRI Reagent (Sigma-Aldrich Inc. MO, USA) que fue homogenizado por vórtex con los 250 μ L de cada muestra e incubado por 10 minutos para favorecer la lisis celular. Se agregó 0.2 mL de cloroformo y homogenizado mediante inversión por 20 segundos. Luego, se realiza la separación de fases orgánica y acuosa mediante centrifugación a 14000 \times g durante 15 minutos a 4 °C. Se recupera el ARN suspendido en la capa superior y se transfiere a un nuevo tubo que contiene 4 μ L de glicógeno y 50 μ L de una solución 3M de acetato de sodio para facilitar la visualización del pellet. Este contiene el ARN que es precipitado mediante lavados con 0.5 mL de isopropanol frío y dos lavados consecutivos con 1 mL de etanol al 75%. El alcohol es descartado y se seca totalmente el pellet para resuspender en 25 μ L de agua UltraPure™ (Thermo Fisher Scientific Inc. MA, USA) y refrigerado hasta realizar la amplificación molecular.

Se realizó la amplificación de ácidos nucleicos mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) utilizando el kit SuperScript III Platinum One Step RT-PCR Kit (Invitrogen; CA). Se confirmó la presencia de DENV para el grupo infectado utilizando un protocolo semi-anidado con dos rondas de PCR con oligonucleótidos dirigidos para amplificar la región que codifica la formación de la cápside (ancC) y la glicoproteína precursora de membrana (prM) del gen POLY, con 511 pares de bases de nucleótidos aproximadamente. La segunda ronda de amplificación se condujo con el kit Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen; CA)

utilizando el mismo cebador oligonucleótido iniciador y una mezcla de cuatro cebadores “contra-sentido” buscando amplificar uno de los cuatro serotipos de dengue (DEN1, DEN2, DEN3 y DEN4). Los iniciadores disponibles en la literatura (Lanciotti RS et al., 1992) fueron probados *in-silico* con secuencias publicadas disponibles y comprobadas en laboratorio con material de referencia para estandarización del diagnóstico.

De forma paralela se sometió a todas las muestras al diagnóstico mediante RT-PCR para estudiar la presencia del virus de zika y chikunguña, por su similitud en la manifestación de síntomas. Los cebadores y protocolos de amplificación son presentados como material suplementario. Se descartó la infección por Zika mediante amplificación y detección de ARN usando como diana la región que codifica para la proteína no-estructural 5 (NS5) (Lanciotti et al., 2008). Así mismo, se analizó la presencia del virus de chikunguña con oligonucleótidos específicos para genes de proteína no estructural 1 (nsP1) y la glicoproteína E1 (Hasebe et al., 2002). Esto permitió comprobar, mediante la prueba patrón de oro (gold-standard), la mono-infección por DENV en el grupo infectado y el diagnóstico negativo para el grupo sano.

2.3.Extracción de metabolitos

Para la obtención de los metabolitos se aplicó un método de extracción líquido-líquido. Se preparó previamente el reactivo de extracción que consiste en una mezcla de cloroformo, metanol y agua en una proporción (1:3:1) utilizando un frasco estéril de vidrio. Se utilizó cloroformo ($\geq 99.9\%$) de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA), metanol grado HPLC para LC-MS de Merck KGaA (Darmstadt, Germany) y agua

destilada UltraPure™ libre de DNA-asas y RNA-asas de Thermo Fisher Scientific Inc (Waltham, MA, USA).

Se realizó la extracción de metabolitos utilizando 25 µL de suero según el protocolo del servicio de metabolómica de Glasgow Polyomics (https://www.polyomics.gla.ac.uk/ms_metabolomics.html#gpProtocols). A cada muestra se agregó 1 mL del reactivo de extracción, seguido de homogenización mediante vórtex durante 30 segundos. Enseguida, los extractos fueron centrifugados a 13000 ×g por 3 minutos. Se mantuvo idénticas condiciones de extracción en todas las muestras y una temperatura de 4 °C. De cada extracto se recuperó 200 µL del sobrenadante para el análisis por LC-MS y 150 µL para analizar mediante MALDI-TOF/MS en dos nuevos tubos estériles. Aquí se recuperó también 5 µL de cada extracto para formar una mezcla de extractos (pool) para cada grupo. Estos pools servirán como control de calidad (QC) para el grupo dengue (QCD) y control (QCC). Los metabolitos fueron concentrados mediante la evaporación del solvente en un concentrador al vacío (miVac Duo Concentrator, GeneVac, UK) y luego reconstituidos para su análisis.

2.4. Metabolómica exploratoria mediante UPLC-MS

Los extractos previamente secados en el evaporador al vacío fueron reconstituidos en 50 µL de una solución de agua ultrapura con ácido fórmico al 0.1% (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) y dispensados en insertos de vidrio estériles para colocar en los viales para su análisis por LC-MS. El análisis de los metabolitos se realizó utilizando el cromatógrafo líquido de ultra-eficiencia clase-I de (UPLC) acoplado al

espectrómetro de masas Xevo® G2QTOF de Waters (Waters Corporation, MA, USA). Se realizó la cromatografía líquida con un flujo de 0.5 mL/min, utilizando una columna C18 ACQUITY UPLC BEH (Waters Corporation, MA, USA) con 1.7 µm de tamaño de partícula y dimensiones de 100 mm × 2.1 mm de diámetro interno. Las fases móviles para la cromatografía fueron solución de agua con ácido fórmico al 0.1% (fase A) y acetonitrilo con ácido fórmico al 0.1% (fase B). Se inyectó un volumen de 10 µL con un gradiente de elución que se describe a continuación: inicialmente se usa 80% A y 20% B durante 1 minuto, seguido de una transición lineal de 50% A y 50% B por 1 minuto. Luego, se ajusta el gradiente a 35% A y 65% B por 2 minutos. Después, 20% A y 80% B por 3 minutos. Se modifica el gradiente a 3% A y 97% B por 10 minutos. Finalmente se reanuda por 3 minutos las condiciones iniciales 80% A y 20% B para luego condicionar y lavar la columna durante 1 minuto (Tabla 3). El orden de análisis de cada muestra se asignó aleatoriamente a lo largo del bloque de inyecciones y se realizó por triplicado.

Tabla 3. *Condiciones del gradiente de elución aplicado para el análisis por LC-MS en el estudio metabolómico del suero de niños con dengue.*

| Tipo de ionización | Velocidad del flujo | Tiempo (min) | %A | %B |
|--------------------|---------------------|--------------|----|----|
| ESI + | 0.5 mL/min | Inicial | 80 | 20 |
| | | 0-1 | 80 | 20 |
| | | 1-2 | 50 | 50 |
| | | 2-4 | 35 | 65 |
| | | 4-7 | 20 | 80 |
| | | 7-17 | 3 | 97 |
| | | 17-20 | 80 | 20 |
| | | 20-21 | 80 | 20 |

Para la espectrometría de masas, se utilizó la fuente de ionización por electrospray (ESI) en modo positivo, y los datos se adquirieron en modo de escaneo completo. El voltaje del capilar se estableció en 0.5 kV, con una tasa de flujo de gas de cono de 30 L/h y una tasa de flujo de gas de desolvación de 900 L/h. La temperatura de la fuente se mantuvo a 120 °C, mientras que la temperatura de desolvación se fijó en 450 °C. Tanto el cono de muestreo como la compensación de la fuente se ajustaron a 40 y 80 V, respectivamente. Se utilizó una velocidad de escaneo de 1 s, cubriendo un rango de m/z entre 100 a 1200 Da.

Se realizó la infusión periódica de una solución de Leucina-encefalina con una concentración de 200 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ hacia el espectrómetro de masas, como referencia no estandarizada. Además, para asegurar la calidad de los datos se analizó los controles de calidad a lo largo del experimento, inyectando durante 16 ocasiones el QCD y QCC, para graficar el desfase en el tiempo de retención como referencia para el análisis de los cromatogramas. Se evaluó la calidad mediante un Análisis de Componentes Principales (PCA) preliminar, que incluyó los pools QCC y QCD, mostrando la agrupación esperada de las muestras, anidadas en sus grupos de clase, identificados en el análisis de clúster por estadística multivariada no-supervisada.

Los datos crudos de LC-MS (*.raw) se convirtieron al formato *.mzML utilizando ProteoWizard (Chambers et al., 2012). Luego, los archivos *.mzML se procesaron en MS-DIAL ver. 4.9.221218 (Tsugawa et al., 2015), considerando detección de picos,

alineamiento, relleno de huecos y filtrado de blancos (con una relación máxima de intensidad de muestra/intensidad promedio de blanco > 7), de acuerdo con los parámetros recomendados para la construcción del cromatograma de iones obtenidos (EIC, Tabla 4).

Tabla 4. *Parámetros para construcción del cromatograma de iones obtenido mediante LC-MS en el estudio metabolómico del suero de niños con dengue.*

| | | | |
|---------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------|
| Raw Data Method | Mass detection | MS Level | 1 |
| Noise level | 5.0E1 | Data type | Centroid |
| Feature detection | ADAP Chromatogram Builder | | |
| Min group size in # of scans | 4 | | |
| Group intensity threshold | 1.2E3 | | |
| Min highest intensity | 6.0E3 | | |
| Scan to scan accuracy | 0.0050 <i>m/z</i> | | |
| Local minimum feature resolver | | Dimension | Retention time |
| Chromatographic threshold | 95% | | |
| Minimum absolute height | 7.0E3 | Min # of data points | 4 |
| Min ratio of peak top/edge | 1.70 | | |
| Peak smoothing method | Loess smoothing | RT tolerance | 0.03min |
| Isotope filter | 13C isotope grouper | | |
| Representative isotope | Most intense | <i>m/z</i> tolerance | 0.002 <i>m/z</i> |
| Alignment method | Join aligner | RT tolerance | 0.1min |
| Weight for RT | 1 | | |
| Weight for <i>m/z</i> | 3 | <i>m/z</i> tolerance | 0.005 <i>m/z</i> |
| Gap filling method | Peak finder (multithreaded) | | |
| Intensity tolerance | 50% | RT tolerance | 0.1min |
| Min data points | 2 | <i>m/z</i> tolerance | 0.002 <i>m/z</i> |

Antes del análisis estadístico, preprocesamos los datos exportados de MS-DIAL para obtener datos de alta calidad. El preprocesamiento de datos se implementó en R 4.2.2

utilizando el paquete “notame” (<https://github.com/antonvsdata/notame>). El preprocesamiento incluyó la corrección de desfase mediante “smoothed cubic spline”, considerando la media/mediana de los QCs entre lotes y la imputación de datos mediante el algoritmo “random forest”. El método detallado está disponible en el repositorio de GitHub (https://github.com/IKIAM-NPLab/Dengue_metabolomics). La matriz de datos de m/z y tiempo de retención vs. intensidad fue exportada en formato *.txt para el análisis estadístico. Estos datos están disponibles en el sitio web del National Metabolomics Data Repository (NMDR) del Common Fund de los NIH, en Metabolomics Workbench, <https://www.metabolomicsworkbench.org>, donde se les ha asignado el ID de proyecto 5181.

2.5. Metabolómica exploratoria mediante MALDI-TOF-MS

Se estudió los metabolitos del suero humano utilizando el instrumento MALDI-TOF-MS Shimadzu Axima™ Confidence (Shimadzu-Biotech, Manchester, UK). Se aleatorizó el orden de análisis y se reconstituyó los metabolitos previamente concentrados agregando 5 μL de cloroformo ($\geq 99.9\%$) de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA), homogenizando por pipeteo y depositando 1 μL en tres pocillos de la placa de análisis para el triplicado técnico. Una vez seco el pocillo con la muestra, se cubre agregando 1 μL de una solución 0.5 M de sustancia matriz para MALDI-MS. La matriz corresponde al ácido 2,5- dihidroxi benzoico (REF 85707 de Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA) con una pureza 99.0% (HPLC) diluido en vehículo de metanol puro y ácido fórmico al 0.1%.

Se realizó la calibración mediante la lectura del estándar TOF-MIX™ (LaserBio Labs, Francia), obteniendo una desviación en un rango menor a 500 mDa de las masas monoisotópicas esperadas.. Se realizó la lectura automatizada de las muestras en el rango de masas de 300 a 1000 Da. Se optimizó la excitación de las muestras usando el 88% del máximo poder del láser (20 kV) en modo reflectron, fijando la tasa de repetición en 50 Hz, con 10 disparos acumulados por perfil y un total de 100 perfiles por cada muestra (0.1 Joule acumulado por pocillo).

La adquisición de espectros de masas se condujo de manera automatizada en el software Shimadzu Biotech Launchpad (version 2.9). Se exportó los listados de las señales obtenidas en formato masa/intensidad reportada en mV a un archivo de texto ASCII. Los espectros de masas fueron compilados en una matriz en formato de texto previo al análisis estadístico.

La matriz de datos fue filtrada por ceros, para eliminar variables sin señal de intensidad en más del 50% de muestras para los dos grupos. Se aplicó normalización por escalado de Pareto en la matriz de datos, centrando la media de cada variable dividido por la raíz cuadrada de su desviación estándar para realizar el análisis estadístico multivariado en Metaboanalyst (Anexo 1).

2.6. Análisis estadístico

Luego del pre-procesamiento de los datos, se realizó el análisis estadístico multivariado en el software Metaboanalyst 6.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/>) comprobando la integridad de los valores de intensidades y la presencia de triplicados técnicos.

Inicialmente, se realiza una normalización mediante el ajuste de cada variable según su dispersión (Anexo 2). El factor de normalización es estimado por el software basado en la media y dividido por la desviación estándar de cada variable. Se condujo estadística multivariada mediante el análisis discriminante de cuadrados mínimos parciales (PLS-DA), una clasificación supervisada que generan un modelo de regresión mediante la combinación lineal de las variables originales. La clasificación es comprobada mediante el análisis gráfico de agrupamiento y evaluado mediante la prueba de validación cruzada, estableciendo un índice de predicción Q^2 basado en la habilidad de predicción del modelo generado por PLS-DA. En este estudio usaremos el índice Q^2 para determinar el número óptimo de componentes a ser considerados para la clasificación, ya que es más simple y menos propenso al sobreajuste. Adicionalmente, se determinó los metabolitos de importancia mediante el valor estimado (VIP) de la importancia de cada variable en la proyección generada por el modelo de regresión según PLS-DA, así como la concentración relativa de dicha variable en los grupos infectado y control. Se generó los diagramas de correspondencia a los grupos, así como la abundancia relativa de un panel de 15 metabolitos con mayor valor VIP del componente con mejor índice Q^2 de predicción sugerido mediante la técnica de reducción de dimensionalidad PLS-DA.

2.7. Identificación de compuestos

A partir del panel de 15 posibles biomarcadores con mayor importancia en la proyección (valores VIP superiores a 1.9), se realizó la atribución de los compuestos usando como referencia la base de datos LipidMaps (<https://www.lipidmaps.org/>). Se

realizó la búsqueda de los valores de los metabolitos obtenidos en modo positivo, permitiendo una tolerancia de ± 0.05 m/z de los resultados disponibles. Se incluyó las posibles coincidencias correspondientes a las siguientes clases principales disponibles en la base de datos: ácidos grasos (FA), glicerolípidos (GL), glicerofosfolípidos (GP), esfingolípidos (SP) y esterol-lípidos (ST).

2.8. Análisis de potenciales biomarcadores

Se evaluó la sensibilidad y especificidad de los metabolitos propuestos por PLS-DA para determinar su potencial como biomarcadores. Se aplicó el análisis clásico univariado de la curva ROC para cada metabolito, calculando el área bajo la curva (AUC) y su intervalo de confianza CI 95%. Además, se evaluó a los metabolitos como un conjunto aplicando el modelo de biomarcadores con la evaluación multivariada basada en la curva ROC del grupo de compuestos. Para este modelo se incluyó la herramienta de evaluación para probabilidad de predicción de pertenencia de las muestras a cada grupo mediante 100 validaciones cruzadas.

Capítulo 3.

3. Resultados y Análisis

Se realizó la metabolómica no direccionada del suero de 40 niños y adolescentes menores a 18 años (media=6.76, desv.est.=5.89). Se obtuvo el perfil de metabolitos en el grupo de niños con sintomatología febril y diagnóstico molecular de infección por dengue comparado con un grupo control de niños (con diagnóstico negativo para dengue y otros arbovirus). La obtención de los perfiles metabolómicos se logró mediante LC-MS y MALDI-TOF/MS para ampliar la cobertura del metaboloma.

Tabla 5. *Resumen demográfico de los participantes incluidos en el estudio metabolómico del dengue en niños*

| Grupo | No. Participantes | Masculino | Femenino |
|---------|-------------------|-----------|----------|
| CONTROL | 15 | 6 | 9 |
| DENV | 25 | 12 | 13 |

3.1. Perfil de metabolitos

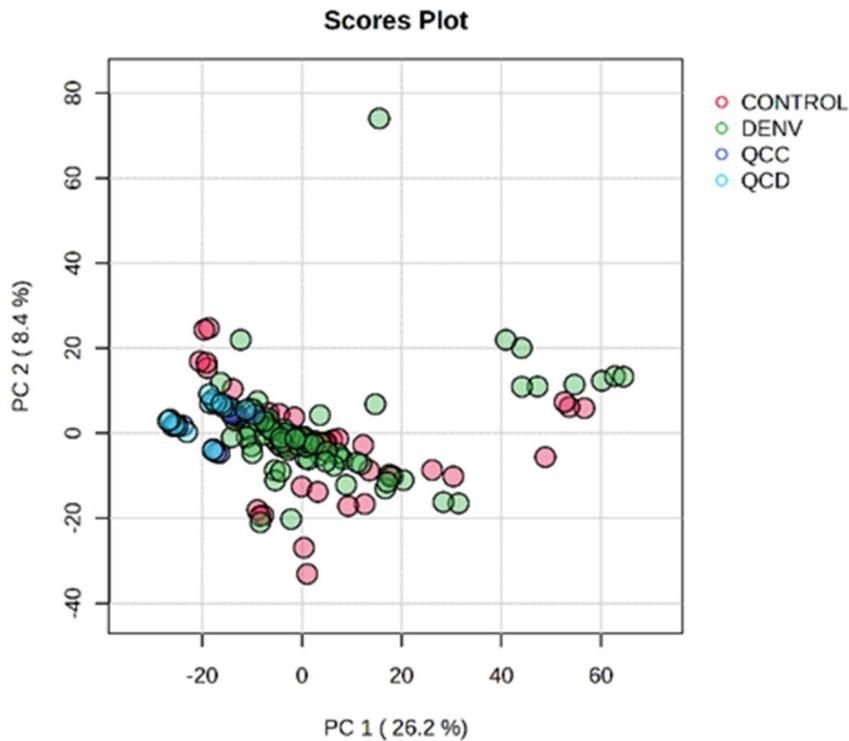
El estudio del perfil de metabolitos fue realizado mediante análisis de los espectros de masas de cada muestra, considerando sus respectivos grupos. Los datos obtenidos de los espectros de masas fueron analizados en la plataforma Metaboanalyst 6.0.

3.1.1. Perfil de metabolitos mediante LC-MS

Los datos de las muestras de los grupos dengue y control fueron inicialmente analizadas juntamente con las muestras de 16 controles de calidad (QCD y QCC) en un análisis

preliminar mediante PCA, con el objetivo de garantizar la confiabilidad de los datos. Como resultado, las muestras QC se agruparon en sus respectivos grupos con una dispersión mínima, reforzando que la instrumentación y el proceso de inyección han sido consistentes (Fig.4).

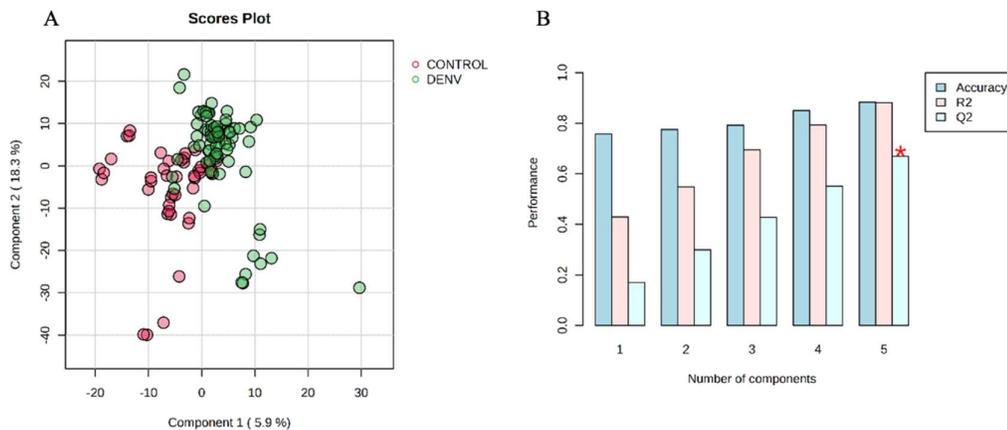
Figura 4. Diagrama de dispersión utilizando los dos componentes principales del PCA obtenido mediante UPLC-MS del suero de niños con dengue y controles, incluyendo controles de calidad para ambos grupos QCD (dengue) y QCC (control).



Se realizó el análisis de PLS-DA con los datos de las muestras exceptuado los QC's, para clasificar las muestras en función de sus características metabolómicas. Como resultado del PLS-DA se identificó una tendencia de separación entre el grupo dengue

y el grupo control, presentado en el gráfico bi-dimensional entre el componente 1 y componente 2 (Fig. 5A). Se determinó mediante validación cruzada que el modelo que considera el componente principal 5 otorga un mayor índice de habilidad de predicción $Q^2=0.68345$, comparado a los demás componentes (Fig. 5B). Además, en el componente 5 también se observa un alto valor del coeficiente de determinación ($R^2=0.88095$), lo que indica que el modelo de regresión presenta buen ajuste de los datos.

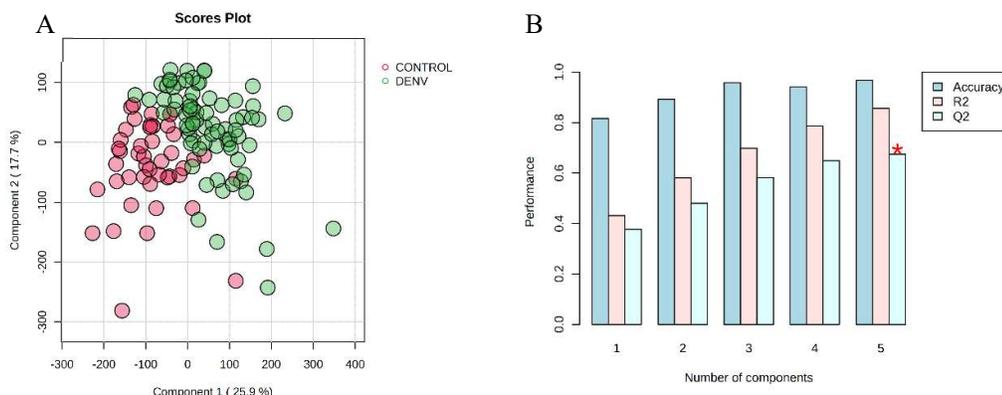
Figura 5. Gráficos de resultados por PLS-DA de metabolómica del suero de niños infectados con dengue versus control, por LC-MS. A) Diagrama de dispersión generado en el gráfico bi-dimensional (componente 1 vs. Componente 2) del PLS-DA exhibiendo una tendencia de separación entre los grupos. B) La validación cruzada del modelo muestra el máximo valor de predicción Q^2 para el quinto componente principal del PLS-DA.



3.1.2. Perfil de metabolitos mediante MALDI-TOF-MS

Para los datos generados en el análisis de MALDI-TOF/MS se empleó el análisis estadístico multivariado mediante PLS-DA, similar al procedimiento realizado con los datos obtenidos por LC-MS. A diferencia, se eligió normalización por PARETO por su capacidad de reducir el efecto de variaciones externas sin eliminar completamente la importancia de las señales que puedan tener una relevancia biológica. Como resultado, se identificó una tendencia de separación del grupo dengue comparado al grupo control al identificar los agrupamientos en el gráfico bi-dimensional (Fig.6A). Se determinó mediante validación cruzada que el modelo que considera el quinto componente principal otorga un mayor índice de habilidad de predicción $Q^2=0.69109$ y de coeficiente de determinación $R^2=0.85579$ (Fig. 6)

Figura 6. Modelo de regresión generado mediante análisis multivariado supervisado PLS-DA de metabolómica exploratoria por MALDI-MS del suero de niños infectados con dengue y control. A) Diagrama de dispersión generado en el gráfico bi-dimensional (Componente 1 vs. Componente 2) del PLS-DA exhibiendo una tendencia de separación entre los grupos. B) La validación cruzada del modelo muestra el máximo valor de predicción Q^2 utilizando el quinto componente del PLS-DA.



3.2. Selección de potenciales biomarcadores metabólicos

Para ambos los datos resultantes de los análisis de LC-MS y MALDI-TOF/MS se realizó un análisis de curva ROC para evaluar la capacidad de los modelos generados por el PLS-DA para distinguir entre los grupos de estudio. Además, el análisis de curva ROC permitió identificar la capacidad predictiva de los metabolitos individualmente y en grupo.

3.2.1. Metabolitos identificados por LC-MS

Del modelo de predicción generado por el componente 5 del PLS-DA, se estableció un panel con los 15 metabolitos con mayor valoración por su importancia para la proyección (VIP) del modelo del PLS-DA. Los metabolitos identificados en el VIP presentan score a partir de 1.93, indicando buena contribución de estos para la tendencia de separación entre los grupos (Tabla 6).

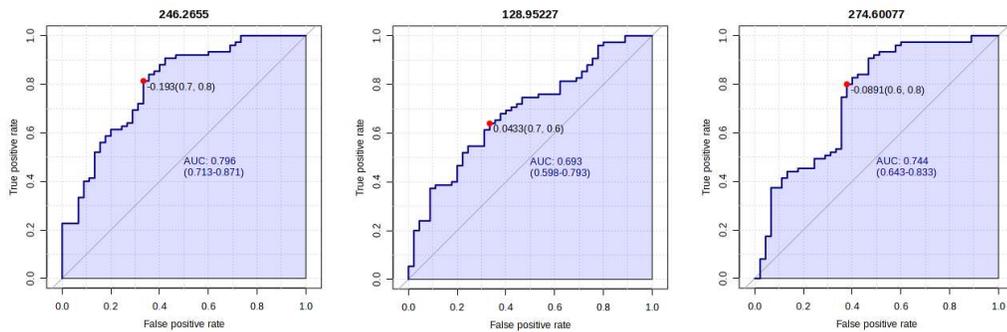
Tabla 6. Panel de los 15 metabolitos de mayor abundancia diferencial entre los grupos control y dengue seleccionados por el PLS-DA, a partir del análisis por LC-MS.

| Masa | VIP (Comp. 5) | CONTROL | DENGUE |
|-----------|---------------|---------|--------|
| 246.2655 | 2.9859 | ↓ | ↑ |
| 349.26489 | 2.6202 | ↑ | ↓ |
| 305.22946 | 2.5919 | ↑ | ↓ |
| 512.55011 | 2.52 | ↑ | ↓ |
| 758.70825 | 2.5141 | ↑ | ↓ |
| 305.17508 | 2.4633 | ↑ | ↓ |
| 393.43518 | 2.2934 | ↑ | ↓ |
| 349.20367 | 2.2406 | ↑ | ↓ |
| 128.95227 | 2.1255 | ↓ | ↑ |

| | | | |
|-----------|--------|---|---|
| 780.08936 | 2.0927 | ↑ | ↓ |
| 274.60077 | 2.0751 | ↓ | ↑ |
| 139.98825 | 2.0441 | ↑ | ↓ |
| 437.47452 | 2.0028 | ↑ | ↓ |
| 484.47333 | 1.9987 | ↑ | ↓ |
| 246.54501 | 1.9541 | ↑ | ↓ |

El análisis de la curva ROC clásica (univariado) se condujo para evaluar el poder diagnóstico de cada metabolito. Se generó la curva ROC clásica para los 15 metabolitos identificados en el VIP, para el grupo dengue (Fig. 7) y para el grupo control (Fig. 8).

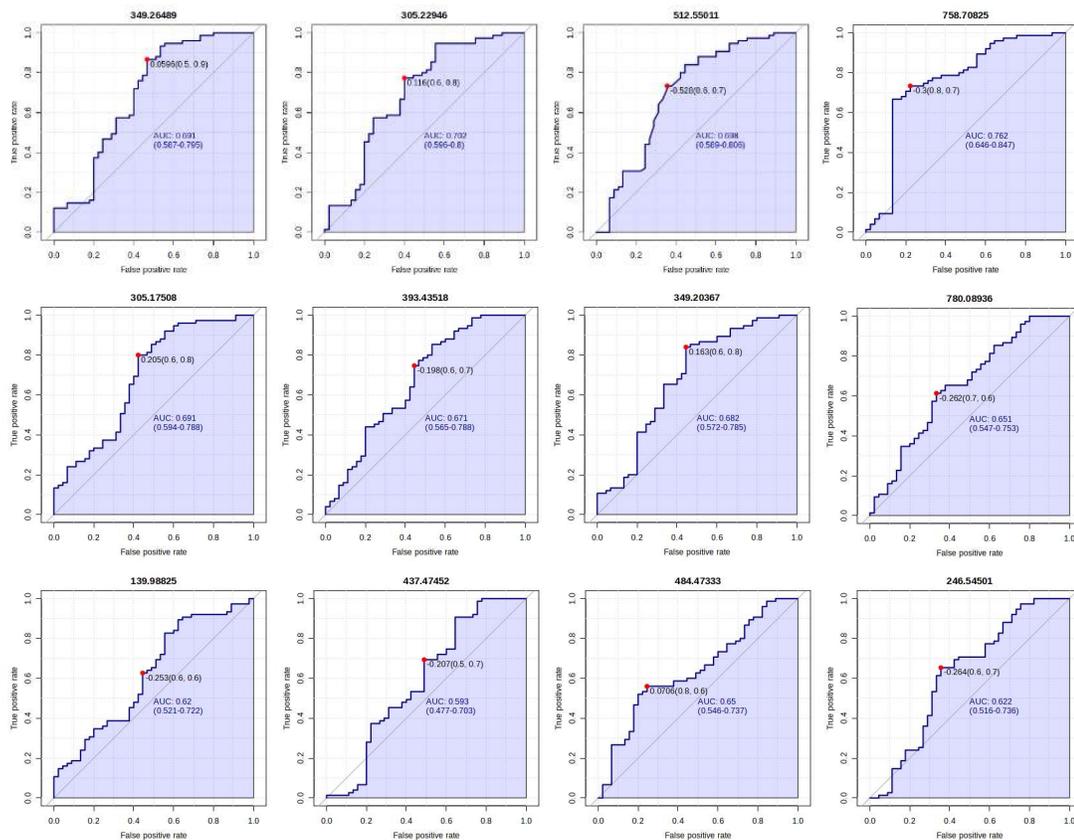
Figura 7. Curvas ROC univariadas de metabolitos de mayor abundancia en el suero de niños con dengue, identificados por LC-MS.



De los 15 metabolitos identificados por el VIP, 3 presentan mayor abundancia en el grupo dengue, mientras 12 metabolitos presentan mayor abundancia en el grupo control (Figura 8). Se presenta el AUC junto al intervalo de confianza en las curvas ROC, que tiene la fracción de verdaderos positivos (CPF) en el eje vertical, y 1- fracción de verdaderos negativos (CNF) en el eje horizontal. Los metabolitos que estaban diferencialmente incrementados en el grupo dengue con respecto al control fueron

246.2655, 128.95227 y 274.60077. El área bajo la curva de los candidatos biomarcadores mostró que el metabolito con masa 246.2655 m/z presentó la más alta sensibilidad (AUC= 0.798, 95% CI: 0.718-0.866). En contraste el metabolito con menor sensibilidad corresponde a la masa 437.47452 m/z (AUC=0.590, 95% CI: 0.48-0.703).

Figura 8. *Curvas ROC univariadas de metabolitos con menor abundancia relativa en el suero de niños con dengue comparado con control, identificados por LC-MS.*



3.2.2. Metabolitos diferenciales identificados por MALDI-MS

Del modelo generado por el quinto componente principal del PLS-DA, se estableció mediante ranking, un panel con los 15 metabolitos con mayor valoración por su importancia para la proyección $VIP > 7.24$. Se determinó una mayor abundancia relativa de los metabolitos (incrementados ↑) presentes en el suero de niños infectados con dengue comparado con el control (tabla 7).

Tabla 7. Panel de 15 metabolitos de mayor abundancia entre los grupos dengue y control, seleccionados por el PLS-DA, a partir del análisis por MALDI-MS.

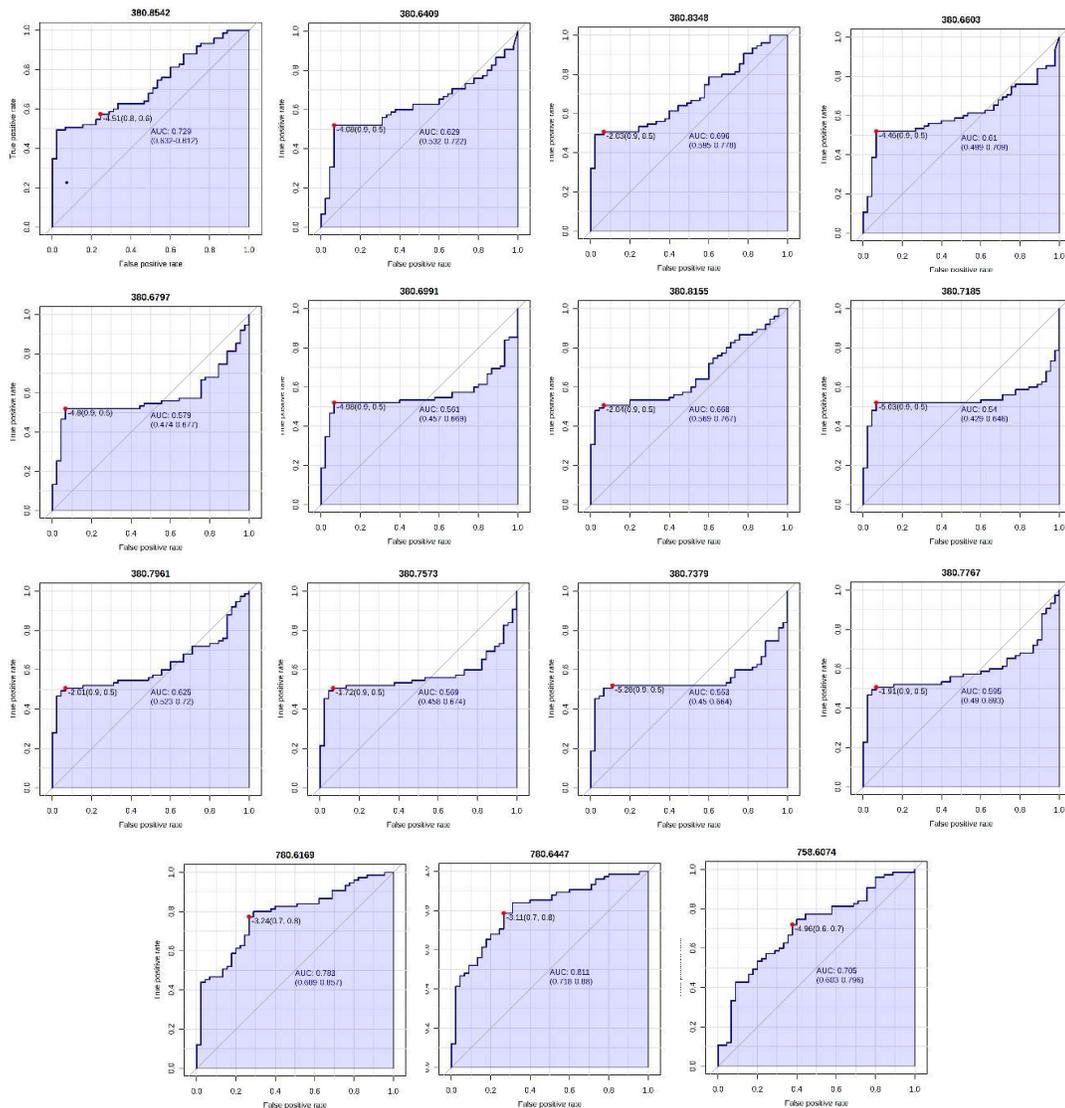
| Masa | VIP | CONTROL | DENGUE |
|----------|--------|---------|--------|
| 380.7185 | 9.0305 | ↓ | ↑ |
| 380.7379 | 9.0103 | ↓ | ↑ |
| 380.6991 | 8.8921 | ↓ | ↑ |
| 380.7573 | 8.8677 | ↓ | ↑ |
| 380.7767 | 8.6833 | ↓ | ↑ |
| 380.6797 | 8.5348 | ↓ | ↑ |
| 380.7961 | 8.4321 | ↓ | ↑ |
| 380.8155 | 8.1332 | ↓ | ↑ |
| 380.6603 | 7.9918 | ↓ | ↑ |
| 380.8348 | 7.7977 | ↓ | ↑ |
| 380.8542 | 7.484 | ↓ | ↑ |
| 380.6409 | 7.3272 | ↓ | ↑ |
| 780.6447 | 7.3216 | ↓ | ↑ |
| 758.6074 | 7.2432 | ↓ | ↑ |
| 780.6169 | 7.2392 | ↓ | ↑ |

La evaluación del desempeño de la curva ROC, indica que el metabolito con mayor sensibilidad corresponde al valor 780.6447 m/z con un $AUC=0.809$. Por otro lado, el metabolito con menor sensibilidad del panel, de acuerdo con el área bajo la curva ROC

presentó un valor de 0.53985 representado por dos valores posiblemente isotópicos 380.7185 y 380.7379 *m/z*.

Se presenta los resultados del cálculo de área bajo la curva ROC para este panel junto con el intervalo de confianza del análisis univariado (Fig.9).

Figura 9. *Análisis univariado de Curva ROC de metabolitos incrementados en el suero de niños con dengue comparado con control.*



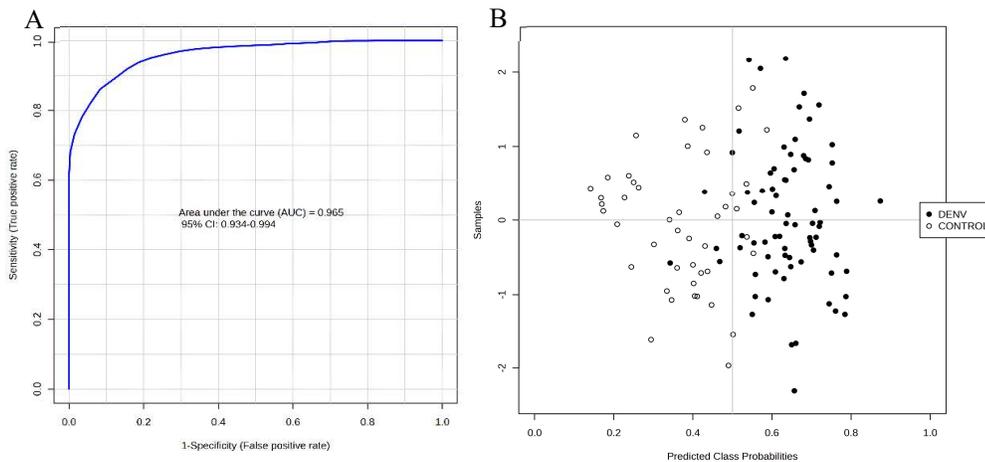
3.3. Análisis exploratorio ROC multivariado

Se exploró la sensibilidad de los paneles de metabolitos mediante el análisis multivariado de la curva ROC. Las curvas ROC fueron generadas para casi uno de los análisis realizados (LC-MS y MALDI-MS) utilizando los metabolitos identificados como potenciales biomarcadores por el análisis de PLS-DA.

3.3.1. Análisis ROC multivariado del panel de metabolitos obtenidos por LC-MS

Se evaluó el desempeño de la curva ROC multivariada del panel de metabolitos, mediante la selección de los 15 metabolitos identificados en el VIP. Este panel presentó un área AUROC de 0.965 (95% CI: 0.934-0.994) (Fig.10(A)). Los modelos de biomarcadores fueron analizados en el módulo de evaluación (Tester) en Metaboanalyst con 100 validaciones cruzadas (CV) y un intervalo de confianza del 95%. La matriz de confusión permitió valorar una sensibilidad del 93.3% algoritmo y una especificidad del 82.2%, determinados mediante la relación de los verdaderos positivos y los verdaderos negativos clasificados en la matriz de confusión generada según la validación cruzada (Fig.10(B)).

Figura 10. Curva ROC del conjunto de metabolitos identificados como potenciales biomarcadores por el PLS-DA de la metabolómica del suero de niños con dengue comparado con control, mediante LC-MS (A). Área de la curva (AUC=0.965) con el modelo generado por el panel de metabolitos. B) Predicción correcta de clasificación de casos en 70 de 75 muestras (sensibilidad superior a 93.3%).

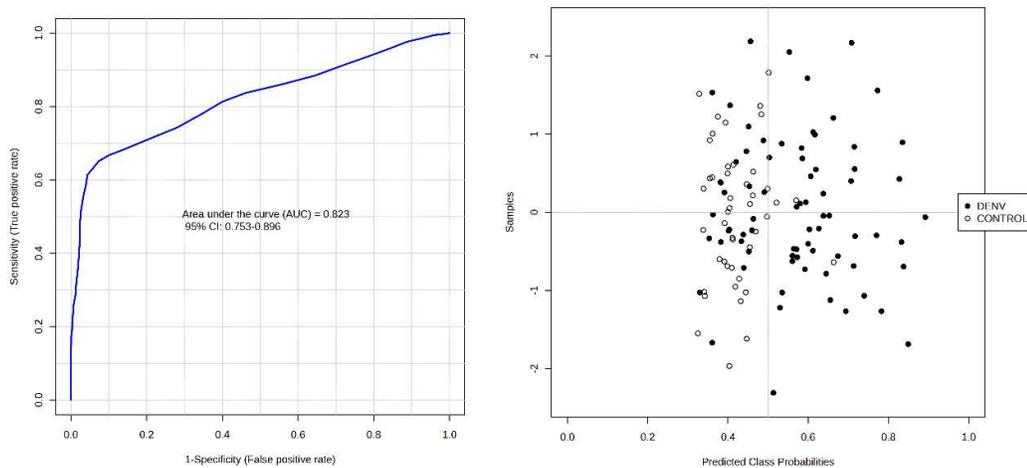


3.3.2. Análisis ROC multivariado del panel de metabolitos obtenidos por MALDI-MS

Se evaluó el desempeño de la curva ROC multivariada del panel de metabolitos, mediante la selección de los 15 iones precursores con mejores valores VIP del modelo del PLS-DA. Los modelos de biomarcadores fueron analizados en el módulo de evaluación (Tester) en Metaboanalyst con 100 validaciones cruzadas (CV) y un intervalo de confianza del 95%. Este panel presentó un área AUROC de 0.823 (95% CI: 0.753-0.896) (Fig.11). La matriz de contingencia o confusión, producto de la clasificación (Fig.11 (B)), permitió valorar una sensibilidad del 66.7% del algoritmo y una especificidad del 91.1%, determinados mediante la relación de los verdaderos

positivos y los verdaderos negativos clasificados en la matriz de confusión generada según la validación cruzada.

Figura 11. *Análisis de curva ROC del conjunto de metabolitos identificados por el PLS-DA de la metabolómica del suero de niños con dengue comparado con control, mediante MALDI-MS (A). Área de la curva (AUC=0.823) con el modelo generado por el panel de metabolitos. B) Resultado de 100 validaciones cruzadas del modelo presentó una sensibilidad de 66.7% y especificidad de 91.1%.*



3.4. Identificación putativa de metabolitos

La atribución putativa de los metabolitos se realizó mediante la búsqueda en la base de datos LipidMaps. Se comparó los valores m/z seleccionados con los modelos de PLS-DA generados por LC-MS y MALDI-MS, en los meses de agosto 2023 y diciembre de 2024, respectivamente. Adicionalmente, se exploraron las bases de datos HMDB y LipidSpecies de Metabolomics Workbench. Aquellos resultados no correspondían a

metabolitos endógenos, por lo tanto no fueron incluidos en los resultados principales (Ver anexo 1).

3.4.1. Metabolitos identificados a partir del análisis por LC-MS

Se realizó la identificación de los metabolitos al contrastar la lista de valores m/z de los iones precursores con la base de datos de metabolómica LipidMaps, ampliando la búsqueda entre todas las clases de lípidos y una tolerancia de $\pm 0.05 m/z$. Del panel de 15 metabolitos se logró clasificar 10 de ellos mediante anotación putativa. Los metabolitos fueron identificados entre los aductos positivos ($[M+H]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+2H]^{2+}$, $[M+H-H_2O]^+$, $[M+Li]^+$, $[M+2Na]^{2+}$). Se logró la identificación putativa de dos metabolitos endógenos que los tres que se encontró diferencialmente incrementado en el suero de niños con dengue comparado con control y correspondían a los valores $246.2655 m/z$ (posiblemente ácido graso, FA 14:0) y $274.60077 m/z$ (posiblemente glicerofosfolípido de tipo fosfatasa/fosfotransferasa LPT 16:4) (Tabla 8).

Tabla 8. *Atribución putativa de metabolitos (según LipidMaps) diferencialmente abundantes en el grupo dengue, obtenido vía metabolómica exploratoria por LC-MS del suero de niños infectados comparado con control.*

| Masa | Delta | Clase | Nombre | Fórmula | Aducto |
|---------------|--------|--------------------|-------------|---|----------------|
| 246.2655 | 0.0228 | Ácido graso | FA 14:0 | C ₁₄ H ₂₈ O ₂ | $[M+NH_4]^+$ |
| 128.9522 7 | - | Sin atribución | - | - | - |
| 274.6007 7 | 0.0027 | Glicerofosfolípido | LPT 16:4 | C ₂₃ H ₃₈ NO ₁₀ PN a ₂ | $[M+2Na]^{2+}$ |

En contraste, de aquellos metabolitos incrementados en el grupo control se logró la identificación putativa de nueve posibles marcadores endógenos de los doce metabolitos del panel con mayor abundancia para el grupo control, detallados en la tabla 9. Los metabolitos corresponden a las siguientes clases:

Esfingolípidos, con los valores m/z : 349.26489 (posiblemente esfingomielina, SM 34:4;O2), 512.55011 (posiblemente ceramida, Cer 32:0;O2), 484.47333 (posiblemente ceramida, Cer 30:0;O2). Gliceroles mono-, di- y tri- sustituidos, con los valores m/z : 305.22946 (posiblemente diglicéridos (DG 36:8 DG O-36:9;O) o triglicérido, TG O-36:8), 758.70825 (posiblemente triglicéridos, TG 100:10/ TG 100:11;O), 437.47452 (posiblemente monoglicerol, MG O-26:1). Ácidos grasos, con los valores m/z : 512.55011 (posiblemente FA 32:1;O; o de tipo N-acilo etanolaminas, NAE 30:0;O), 305.17508 (posiblemente FA 18:5;O3), 484.47333 (posiblemente FA 30:1;O; o de tipo N-acilo etanolaminas, NAE 28:0;O). Y finalmente esteroides, con los valores m/z : 305.17508 (posiblemente ST 18:3;O4, ST 18:2;O5 o un conjugado de ácido glucurónico ST 30:7;O2;GlcA), 349.20367 (posiblemente ST 18:0;O;S)

Tabla 9. *Atribución putativa de metabolitos (según LipidMaps) diferencialmente abundantes en el grupo control, obtenido vía metabolómica exploratoria por LC-MS del suero de niños infectados comparado con control.*

| Masa | Delta | Clase | Nombre | Fórmula | Aducto |
|------|-------|-------|--------|---------|--------|
| | a | | | | |

| | | | | | |
|---------------|------------|----------------------------|------------------------|-----------------|----------------|
| 349.264 89 | 0.00 27 | Esfingolípido | SM 34:4;O2 | C39H73N2 O6P | [M+2H]2+ |
| | | Di(acilo alquilo)glicero | DG 36:8 | C39H60O5 | [M+2H]2+ |
| 305.229 46 | 0.00 02 | Di(acilo alquilo)glicero | DG O-36:9;O | C39H60O5 | [M+2H]2+ |
| | | Tri(acilo alquilo)glicero | TG O-36:8 | C39H60O5 | [M+2H]2+ |
| | | Esfingolípido | Cer 32:0;O2 | C32H65NO 3 | [M+H]+ |
| 512.550 11 | 0.04 64 | Ácido graso | NAE 30:0;O | C32H65NO 3 | [M+H]+ |
| | | Ácido graso | FA 32:1;O | C32H62O3 | [M+NH4] + |
| 758.708 25 | 0.00 42 | Tri(acilo alquilo)glicero | TG 100:10 | C103H182O 6 | [M+2H]2+ |
| | | Tri(acilo alquilo)glicero | TG O- 100:11;O | C103H182O 6 | [M+2H]2+ |
| | | Esteroles | ST 18:3;O4 | C18H24O4 | [M+H]+ |
| | | Ácido graso | FA 18:5;O3 | C18H26O5 | [M+H- H2O]+ |
| 305.175 08 | 0.00 04 | Esteroles | ST 18:2;O5 | C18H26O5 | [M+H- H2O]+ |
| | | Esteroles | ST 30:7;O2;Glc A | C36H48O8 | [M+2H]2+ |
| 393.435 18 | - | Sin atribución | - | - | - |
| 349.203 67 | 0.00 17 | Esteroles | ST 18:0;O;S | C18H30O4 SLi | [M+Li]+ |
| 780.089 36 | - | Sin atribución | - | - | - |
| 139.988 25 | - | Sin atribución | - | - | - |
| 437.474 52 | 0.03 92 | Mono(acilo alquilo)glicero | MG O-26:1 | C29H58O3 | [M+H- H2O]+ |
| 484.473 33 | 0.00 09 | Esfingolípido | Cer 30:0;O2 | C30H61NO 3 | [M+H]+ |
| | | Ácido graso | NAE 28:0;O | C30H61NO 3 | [M+H]+ |

| | Ácido graso | FA 30:1;O | C30H58O3 | [M+NH4] + |
|---------------|------------------|-----------|----------|--------------|
| 246.545 01 | - Sin atribución | - | - | - |

3.1.2. Panel de metabolitos seleccionado mediante MALDI-TOF-MS

Se exploró la identidad de los metabolitos al contrastar la lista de valores m/z de los iones precursores con la base de datos de metabolómica LipidMaps, ampliando la búsqueda entre todas las clases de lípidos y una tolerancia de $\pm 0.05 m/z$. Del panel de 15 metabolitos se logró clasificar 8 de ellos mediante anotación putativa. Los metabolitos fueron identificados entre los aductos positivos ($[M+H]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+2H]^2+$, $[M+H-H_2O]^+$, $[M+K]^+$, $[M+2Na]^2+$).

Los metabolitos de abundancias diferenciales que se logró identificar corresponden a las clases de los glicerofosfolípidos y esfingolípidos, todos más abundantes en el suero de niños con dengue comparado al control. De los glicerofosfolípidos, fueron identificados fosfatidilserina (PS), fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE). Con respecto a los esfingolípidos, ambas moléculas pertenecen al grupo de las glucosilceramidas (HexCer).

Tabla 10. *Atribución putativa de metabolitos (según LipidMaps) diferencialmente incrementados en el grupo dengue, obtenido vía metabolómica exploratoria por MALDI-MS del suero de niños infectados comparado con control.*

| Masa | Delta (Máx) | Clase | Nombre | Fórmula | Aducto |
|--------------|----------------|------------------------|---------|--------------------|------------------|
| 380.71 85 | 0.0081 | Glicerofosfolí pido | PS 31:3 | C37H66NO10 PNa2 | $[M+2Na]^2$ + |

| | | | | | |
|--------------|--------|------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| 380.73 79 | 0.0089 | Glicerofosfolí pido | PC 31:2 | C39H74NO8P Na2 | [M+2Na]2 + |
| | | Glicerofosfolí pido | PE 34:2 | C39H74NO8P Na2 | [M+2Na]2 + |
| 380.75 73 | 0.0207 | Glicerofosfolí pido | PS O-35:2 | C41H78NO9P | [M+2H]2+ |
| | | Glicerofosfolí pido | PE O-35:2 | C40H78NO7P Na2 | [M+2Na]2 + |
| | | Esfingolípido | HexCer 34:1;O3 | C40H77NO9N a2 | [M+2Na]2 + |
| 380.69 91 | - | Sin atribución | - | - | - |
| 380.77 67 | .0236 | Glicerofosfolí pido | PE 37:1 | C42H82NO8P | [M+2H]2+ |
| | | Esfingolípido | HexCer 36:1;O4 | C42H81NO10 | [M+2H]2+ |
| 380.67 97 | - | Sin atribución | - | - | - |
| 380.79 61 | 0.0183 | Glicerofosfolí pido | PE O-38:1 | C43H86NO7P | [M+2H]2+ |
| 380.81 55 | - | Sin atribución | - | - | - |
| 380.66 03 | - | Sin atribución | - | - | - |
| 380.83 48 | - | Sin atribución | - | - | - |
| 380.85 42 | - | Sin atribución | - | - | - |
| 380.64 09 | - | Sin atribución | - | - | - |
| 780.64 47 | 0.0206 | Esfingolípido | HexCer 40:2;O3 CerP 44:1;O2 | C46H87NO9 C44H88NO6P Na | [M+H- H2O]+ [M+Na]+ |
| 758.60 74 | 0.0096 | Esfingolípido | CerPE 40:3;O2 | C42H81N2O6 P | [M+NH4] + |
| 780.61 69 | 0.0419 | Esfingolípido | HexCer 37:1;O2 | C43H83NO8K | [M+K]+ |

Capítulo 4

4.1. Discusión

El registro de casos de dengue en años recientes muestra una preocupante tendencia en aumento en los últimos años. A pesar de que el dengue es endémico en la mayoría de países de América del Sur, varios países reportan desde el 2023 un aumento sin precedentes. Antes del 2023, el registro más alto se presentó en 2019 con más de 3 millones de casos, de los cuales 28208 con dengue severo y 1823 muertes (WHO, 2024). Debido al impacto del dengue en grupos etarios vulnerables, es crucial reconocer que niños menores a 14 años de edad y adultos mayores a 50 son particularmente vulnerables a la progresión hacia casos con signos de alarma y dengue severo, con mayor riesgo de hospitalización y muerte (Guzmán et al., 2002). El estudio de la población pediátrica gana relevancia por reportes sobre la incrementada probabilidad de los niños con dengue en progresar a SD y presentar disfunción hepática (Voge et al., 2016).

Nuestro estudio incluyó individuos entre 0 y 18 años, con un promedio de 6 años de edad (media=6.76, desv.est.=5.89). Las alteraciones metabólicas encontradas en este grupo están altamente asociadas a la infección con dengue, ya que los individuos fueron aceptados en un centro de atención pediátrica por fiebre como el síntoma principal. Adicionalmente, todos los participantes fueron diagnosticados por prueba de amplificación de ácidos nucleicos (RT-PCR) para confirmación de la presencia de dengue y exclusión de otros arbovirus.

Al no existir un tratamiento específico para la enfermedad, es necesaria una identificación temprana de casos probables para la prevención en la progresión a dengue severo (Organización Panamericana de la Salud, 2023)c. La combinación de factores como la variabilidad de los síntomas, una pobre vigilancia epidemiológica y la ausencia de diagnóstico oportuno crean un escenario de preocupación a los sistemas sanitarios (Ramos-Castañeda et al., 2017; WHO, 2024). Junto con estas manifestaciones, la infección desencadena cambios metabólicos relacionados a la respuesta inmune y disrupción de la homeostasis celular (Romagnolo & Carvalho, 2021).

La aplicación de la metabolómica al estudio del dengue y otras enfermedades es esencial para ampliar la comprensión de los mecanismos molecular involucrados en el curso de la infección (Cui et al., 2013; Nunes & Canuto, 2020). Adicionalmente, los enfoques metabolómicos cuentan con la sensibilidad para detectar diferencias sutiles que pueden resultar en el descubrimiento de biomarcadores que favorezcan al diagnóstico de estas infecciones(Romagnolo & Carvalho, 2021). Varios estudios del dengue, basados en metabolómica, han identificado metabolitos de diversa naturaleza usando muestras humanas, los cuales varían según el contexto y diferencias en el tipo de muestras y técnicas aplicadas (Khedr et al., 2016; Shahfiza et al., 2017).

En nuestro estudio aplicamos metabolómica basada en espectrometría de masas con un enfoque no-direccionado. Este enfoque exploratorio, tiene como premisa la identificación de la mayor cantidad de metabolitos posible en una muestra biológica (Byers et al., 2019; Patti et al., 2012).

Las aplicaciones de la MS en diversas ramas de las ciencias están ampliamente documentadas por su alta sensibilidad y selectividad (Byers et al., 2019). La inclusión de técnicas de separación cromatográfica acoplados a la MS incrementa la resolución, haciendo de la LC-MS la técnica más utilizada en descubrimiento y validación de metabolitos. Particularmente, en el estudio metabolómico se ha enfatizado en el potencial del uso de múltiples plataformas o enfoques híbridos para maximizar la cobertura del metaboloma (Gonzalez-Dominguez et al., 2017). En nuestro estudio, el suero de niños y adolescentes infectados con dengue se analizó bajo dos formas de ionización: ESI y MALDI que favorecen, bajo ciertas condiciones, la detección de compuestos polares y apolares, respectivamente (Engel et al., 2022).

El análisis estadístico incluyó PLS-DA, uno de los métodos de clasificación más usado en metabolómica (Szymańska et al., 2012), generando un modelo de regresión que permite la predicción de pertenencia de una muestra una variable categórica mediante la combinación lineal de las variables originales (Barker & Rayens, 2003). Como resultado de análisis multivariado se comprobó una tendencia de separación entre los grupos estudiados (DENGUE y CONTROL) con las dos técnicas de metabolómica aplicadas. Este método fue elegido sobre otros modelos de clasificación no-supervisados para asegurar la robustez e interpretabilidad de los resultados.

La terminología “no-direccionada” en metabolómica pretende abarcar aquellos estudios de descubrimiento, de preferencia con respecto a la naturaleza de los metabolitos involucrados (Patti et al., 2012; Snyder et al., 2013). Sin embargo, se debe mencionar que un determinado flujo de trabajo involucra cierta afinidad a un grupo de

compuestos sobre otros, por ello la importancia de documentar y reportar adecuadamente la naturaleza de la extracción, la afinidad con las fases móviles, la instrumentación durante la separación, condiciones de ionización y espectrometría de masas (Snyder et al., 2013).

Considerando que el método de extracción usado favorece los lípidos, el presente estudio identificó ácidos grasos (FA), esterolípidos (ST) y glicerolípidos (GL), principalmente. De los compuestos identificados mediante UPLC-MS, observamos que la mayoría de los compuestos estaban diferencialmente incrementados en controles sobre los pacientes con dengue. Por otro lado, los metabolitos identificados con MALDI-MS, principalmente glicerofosfolípidos (GP) y esfingolípidos (SP), presentaban mayores niveles en el grupo infectado comparado con el control. Estas tendencias sugieren que los mecanismos de la infección por dengue se asocian con la abundancia de lípidos en el suero.

Los estudios de metabolómica en dengue reportan más frecuentemente al metabolismo de lípidos, alterado principalmente por rutas asociadas a la síntesis y oxidación de ácidos grasos (Cui et al., 2013, 2017; Soe et al., 2020). Mediante la caracterización del metaboloma del suero de pacientes con diferentes clasificaciones de dengue se encontró un decremento de ácidos grasos (FA) en pacientes con dengue clásico (DF) comparados con pacientes con características clínicas desfavorables (SD) antes conocidas como fiebre hemorrágica (DHF) y síndrome de shock (DSS). La mayoría de estos FA asociados a la severidad del dengue correspondía a ácidos grasos polinsaturados (PUFA) los cuales suelen actuar como agentes antiinflamatorios, que

podrían disminuir la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y citoquinas inflamatorias (Voge et al., 2016). Otro estudio reveló que las alteraciones de metabolitos dentro de la misma clase de ácidos grasos libres FFA solían manifestarse en patrones similares, y específicamente en los FA: incluyendo PUFA's, ácido araquínódico (AA), ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido linoleico (Cui et al., 2013). Voge y colaboradores registraron un incremento en los niveles de DHA en pacientes con DF comparado con SD, lo que sugeriría una mitigación de la inmunopatología. En nuestro estudio encontramos una mayor abundancia de PUFA's de cadena larga (NAE30:0, FA32:1;0, FA18:5;03, NAE28:0;0, FA30:1;0) en los controles, lo que nos hace hipotetizar que la producción de PUFA's podría ser un mecanismo de protección que se vió perturbado en el grupo infectado. Cabe recalcar que los resultados son relativos a la muestra poblacional utilizada que podría acarrear sesgos genéticos y ambientales, pero resaltan la importancia de reproducir estudios con grupos bien caracterizados para obtener metabolitos con potencial diagnóstico del estado de la enfermedad o progresión de la misma (Voge et al., 2016).

Encontramos que los esteroides (ST) se encontraban en mayor abundancia en el suero de los individuos saludables. De esta clase de lípidos, el colesterol el más explorado en estudios epidemiológicos, conocido por fungir como el principal compuesto de la membrana celular y que evidencia un rol crucial en la infección con dengue (Gan et al., 2020; Ray et al., 1999). La inhibición en la biosíntesis de colesterol evidenció una afectación en la replicación viral del DENV en un modelo in vitro de crecimiento celular limitado de lípidos. Demostrando que dicha inhibición era revertida mediante

la adición de intermediarios de la ruta del colesterol (Rothwell et al., 2009). Existen resultados congruentes de varias fuentes donde los patrones lipídicos in vitro se manifiestan en muestras humanas. En nuestro estudio, los niveles bajos de colesterol en el suero de niños infectados podrían sugerir que la eficiencia de replicación viral del dengue requiere de este lípido desde la perspectiva de ingreso, replicación y génesis de viriones (Cui et al., 2013).

Al considerar los mecanismos subyacentes de la replicación viral en el organismo y su asociación con el colesterol, existe evidencia de que el DENV estimula la biosíntesis de novo del colesterol en el retículo endoplasmático, favoreciendo la formación de complejos de replicación vía reestructuración de estos organelos (Silva Afonso et al., 2018; Welsch et al., 2009). Este tipo de hallazgos contribuyen en la generación de hipótesis sobre el uso de fármacos inhibidores de la síntesis de novo de colesterol (como lovastatina), que a pesar de que los ensayos clínicos no han evidenciado suficientes beneficios, se recomienda estudios futuros relacionados (Whitehorn et al., 2015).

Otros metabolitos como esfingolípidos y glicerolípidos fueron ampliamente favorecidos entre los hallazgos por MALDI-MS, con mayor abundancia en niños con Dengue. Los esfingolípidos podrían estar involucrados en la respuesta inmune frente al dengue (Cui et al., 2013), ya que el sistema asociado a las células T citotóxicas se activa mediante esfingolípidos como las ceramidas, tal como sugieren nuestros metabolitos identificados por MALDI-MS a excepción de dos hallazgos de posibles triglicéridos encontrados por UPLC-MS en el suero de controles. Es importante considerar que

nuestros controles podrían haber presentado fiebre de otra etiología diferente a los arbovirus antes definidos, sugiriendo que estos metabolitos estarían involucrados en respuesta inmune en general.

Los controles presentaron mayor abundancia de di/tri(acilo|alquilo)glicerol (DG y TG) y mono(acilo|alquilo)glicerol (MG). Algunos estudios han sugerido que estos lípidos podrían estar asociados con el estrés oxidativo durante la infección por DENV y se han propuesto como marcadores de la enfermedad (Ray et al., 1999; Rojas et al., 2007). En tal contexto, el estrés oxidativo generaría un decremento generalizado de triacilglicerol en el suero, considerando que los TG son altamente susceptibles a los ROS (Rojas et al., 2007). Curiosamente, se ha descrito que altos niveles de triglicéridos ofrecen un efecto protector ante DHF, siendo útil para predecir el riesgo de desarrollar sus complicaciones. Consistente con estudios previos, los niveles alterados de triglicéridos en nuestro trabajo estarían asociados al estrés oxidativo provocado por la enfermedad. Con respecto a DG y MG, la literatura metabolómica es escasa usando muestras humanas, y los enfoques existentes lo han realizado en mosquitos (Molloy et al., 2016).

Se hipotetiza que la activación de la glicólisis y movilización de ácidos grasos mediante actividad de las lipasas, juegan un importante rol en los procesos de replicación viral por su alta demanda energética (Manchester & Anand, 2017; Melo et al., 2018).

Adicionalmente a la atribución de metabolitos según los niveles 2 y 3 sugeridos por la MSI, el análisis de la curva ROC nos permitió validar objetiva y estadísticamente el

potencial biomarcador de los compuestos (Xia et al., 2013; Xia & Wishart, 2016). En el presente trabajo, los valores AUC de la curva ROC univariada de los metabolitos presentaron una sensibilidad máxima del 78%. Por otro lado, al analizar el conjunto de metabolitos propuestos por el modelo de PLS-DA por AUROC multivariada, se alcanzó una sensibilidad del 96%.

A menudo el análisis clásico de la curva ROC ofrece una evaluación individual de un panel de metabolitos diferenciales con un poder de discriminación débil como biomarcadores de la enfermedad. Según Xia y colaboradores esto podría ofrecer una significancia en la asociación entre la concentración alterada de un compuesto y la enfermedad, pero con poco o nulo potencial en la práctica clínica. Sin embargo, la combinación de más de un biomarcador “débil” resultaría en un modelo multivariado que ofrezca ventajas para la discriminación de un determinado estado alterado de salud (Xia et al., 2013).

En nuestro panel de potenciales biomarcadores pudimos corroborar este fenómeno al usar la categorización del área bajo la curva AUC donde los rangos 0.5-0.6, 0.6-0.7, 0.7-0.8 y 0.8-0.9 corresponden a una utilidad del biomarcador nula, pobre, regular, y buena, respectivamente (Rashid et al., 2023). Esto podría sugerir que la aplicación de la metabolómica al diagnóstico del dengue se vería favorecida mediante un análisis de un grupo de moléculas.

El enfoque exploratorio de metabolómica provee información valiosa que permite mejorar la comprensión de los mecanismos subyacentes asociados al dengue. La

comparación de perfiles metabólicos del suero de niños infectados y controles mostraron una tendencia de separación congruentes con los síntomas y otras manifestaciones observables en la práctica clínica. La metabolómica por lo tanto resultaría útil como una herramienta accesoria o paralela al diagnóstico del dengue. Además, los metabolitos identificados en este estudio deberían ser investigados a futuro por su potencial como dianas terapéuticas en el tratamiento del dengue.

4.2.Conclusión

La metabolómica basada en espectrometría de masas permitió la identificación del perfil metabolómico del suero de individuos con dengue menores de 18 años en comparación con controles, resaltando diferencias entre los grupos.

El análisis de la curva ROC demostró que los metabolitos de mayor y de menor abundancia en el grupo de estudio pueden ser utilizados como biomarcadores, principalmente si consideramos un análisis de panel de biomarcadores para identificación de una infección por dengue.

A partir de la atribución de los metabolitos a potenciales clases de lípidos fue posible identificar vías metabólicas alteradas y comprender los mecanismos fisiopatológicos asociados a la respuesta inmune de individuos con dengue, además de procesos involucrados en la infección por el virus del dengue, lo que puede contribuir, en el futuro, para el desarrollo de nuevas terapias y prevención de la gravedad de la enfermedad.

Referencias

- Ajlan, B. A., Alafif, M. M., Alawi, M. M., Akbar, N. A., Aldigs, E. K., & Madani, T. A. (2019). Assessment of the new World Health Organization's dengue classification for predicting severity of illness and level of healthcare required. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *13*(8), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007144>
- Aresta, A., Calvano, C. D., Palmisano, F., Zambonin, C. G., Monaco, A., Tommasi, S., Pilato, B., & Paradiso, A. (2008). Impact of sample preparation in peptide/protein profiling in human serum by MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *46*(1), 157–164. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.10.015>
- Barker, M., & Rayens, W. (2003). Partial least squares for discrimination. *Journal of Chemometrics*, *17*(3), 166–173. <https://doi.org/10.1002/cem.785>
- Birungi, G., Chen, S. M., Loy, B. P., Ng, M. L., & Li, S. F. Y. (2010). Metabolomics approach for investigation of effects of dengue virus infection using the EA.hy926 cell line. *Journal of Proteome Research*, *9*(12), 6523–6534. <https://doi.org/10.1021/pr100727m>
- Brown, C. D., & Davis, H. T. (2006). Receiver operating characteristics curves and related decision measures: A tutorial. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, *80*(1), 24–38. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2005.05.004>
- Byers, N. M., Fleshman, A. C., Perera, R., & Molins, C. R. (2019). Metabolomic insights into human arboviral infections: Dengue, chikungunya, and zika viruses. *Viruses*, *11*(3), 1–30. <https://doi.org/10.3390/v11030225>
- Chambers, M. C., MacLean, B., & Burke, R. (2012). A Cross-platform Toolkit for Mass Spectrometry and ProteomicsZwane's mining charter lunacy. *Nat. Biotechnology*, *30*(10), 1. <https://doi.org/10.1038/nbt.2377.A>
- Charrel, R. N. (2016). Diagnosis of arboviral infections - A quagmire of cross reactions and complexities. *Travel Medicine and Infectious Disease*, *14*(1), 11–12. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2016.01.006>
- Chotiwan, N., Andre, B. G., Sanchez-Vargas, I., Islam, M. N., Grabowski, J. M., Hopf-Jannasch, A., Gough, E., Nakayasu, E., Blair, C. D., Belisle, J. T., Hill, C. A., Kuhn, R. J., & Perera, R. (2018). Dynamic remodeling of lipids coincides with dengue virus replication in the midgut of *Aedes aegypti* mosquitoes. In *PLoS Pathogens* (Vol. 14, Issue 2). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006853>
- Costa, J., Ferreira, E. C., & Santos, C. (2021). Covid-19, chikungunya, dengue and zika diseases: An analytical platform based on maldi-tof ms, ir spectroscopy and rt-qpcr for

- accurate diagnosis and accelerate epidemics control. *Microorganisms*, 9(4).
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9040708>
- Costa, M. M., Corbel, V., Ben Hamouda, R., & Almeras, L. (2024). MALDI-TOF MS Profiling and Its Contribution to Mosquito-Borne Diseases: A Systematic Review. *Insects*, 15(9), 651. <https://doi.org/10.3390/insects15090651>
- Cui, L., Fang, J., Ooi, E. E., & Lee, Y. H. (2017). Serial Metabolome Changes in a Prospective Cohort of Subjects with Influenza Viral Infection and Comparison with Dengue Fever. *Journal of Proteome Research*, 16(7), 2614–2622.
<https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00173>
- Cui, L., Lee, Y. H., Kumar, Y., Xu, F., Lu, K., Ooi, E. E., Tannenbaum, S. R., & Ong, C. N. (2013). Serum Metabolome and Lipidome Changes in Adult Patients with Primary Dengue Infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(8).
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002373>
- Cui, L., Lu, H., & Lee, Y. H. (2018). Challenges and emergent solutions for LC-MS/MS based untargeted metabolomics in diseases. *Mass Spectrometry Reviews*, 37(6), 772–792. <https://doi.org/10.1002/mas.21562>
- Cui, L., Pang, J., Lee, Y. H., Ooi, E. E., Ong, C. N., Leo, Y. S., & Tannenbaum, S. R. (2018). Serum metabolome changes in adult patients with severe dengue in the critical and recovery phases of dengue infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(1), 1–15.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006217>
- Dhooria, G. S., Bhat, D., & Bains, H. S. (2008). Clinical profile and outcome in children of dengue hemorrhagic fever in north India. *Iranian Journal of Pediatrics*, 18(3), 222–228.
- Dunn, W. B., Broadhurst, D., Begley, P., Zelena, E., Francis-Mcintyre, S., Anderson, N., Brown, M., Knowles, J. D., Halsall, A., Haselden, J. N., Nicholls, A. W., Wilson, I. D., Kell, D. B., & Goodacre, R. (2011). Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nature Protocols*, 6(7), 1060–1083.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2011.335>
- El-Bacha, T., Struchiner, C. J., Cordeiro, M. T., Almeida, F. C. L., Marques, E. T., & Da Poian, A. T. (2016). ¹H Nuclear Magnetic Resonance Metabolomics of Plasma Unveils Liver Dysfunction in Dengue Patients. *Journal of Virology*, 90(16), 7429–7443. <https://doi.org/10.1128/jvi.00187-16>
- Engel, K. M., Prabutzki, P., Leopold, J., Nimptsch, A., Lemmnitzer, K., Vos, D. R. N., Hopf, C., & Schiller, J. (2022). A new update of MALDI-TOF mass spectrometry in lipid research. *Progress in Lipid Research*, 86(December 2021), 101145.
<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2021.101145>

- Fontaine, K. A., Sanchez, E. L., Camarda, R., & Lagunoff, M. (2015). Dengue Virus Induces and Requires Glycolysis for Optimal Replication. *Journal of Virology*, *89*(4), 2358–2366. <https://doi.org/10.1128/jvi.02309-14>
- Gan, E. S., Tan, H. C., Le, D. H. T., Huynh, T. T., Wills, B., Seidah, N. G., Ooi, E. E., & Yacoub, S. (2020). Dengue virus induces PCSK9 expression to alter antiviral responses and disease outcomes. *Journal of Clinical Investigation*, *130*(10), 5223–5234. <https://doi.org/10.1172/JCI137536>
- Gika, H., Virgiliou, C., Theodoridis, G., Plumb, R. S., & Wilson, I. D. (2019). Untargeted LC/MS-based metabolic phenotyping (metabonomics/metabolomics): The state of the art. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *1117*(April), 136–147. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.04.009>
- Gonzalez-Dominguez, A., Duran-Guerrero, E., Fernandez-Recamales, A., Lechuga-Sancho, A. M., Sayago, A., Schwarz, M., Segundo, C., & Gonzalez-Dominguez, R. (2017). An Overview on the Importance of Combining Complementary Analytical Platforms in Metabolomic Research. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, *17*(30), 3289–3295. <https://doi.org/10.2174/1568026618666171211144918>
- Guzmán, M. G., Kouri, G., Bravo, J., Valdes, L., Susana, V., & Halstead, S. B. (2002). Effect of age on outcome of secondary dengue 2 infections. *International Journal of Infectious Diseases*, *6*(2), 118–124. [https://doi.org/10.1016/S1201-9712\(02\)90072-X](https://doi.org/10.1016/S1201-9712(02)90072-X)
- Hasebe, F., Parquet, M. C., Pandey, B. D., Mathenge, E. G. M., Morita, K., Balasubramaniam, V., Saat, Z., Yusop, A., Sinniah, M., Natkunam, S., & Igarashi, A. (2002). Combined detection and genotyping of Chikungunya virus by a specific reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of Medical Virology*, *67*(3), 370–374. <https://doi.org/10.1002/jmv.10085>
- Haslauer, K. E., Hemmler, D., Schmitt-kopplin, P., & Heinzmann, S. S. (2019). *Guidelines for the Use of Deuterium Oxide (D₂O) in ¹H NMR Metabolomics*. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b01580>
- Ivanisevic, J., & Thomas, A. (2018). Metabolomics as a tool to understand pathophysiological processes. *Methods in Molecular Biology*, *1730*, 3–28. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7592-1_1
- Khalil, M. B., Hou, W., Zhou, H., Elisma, F., Swayne, L. A., Blanchard, A. P., Yao, Z., Bennett, S. A. L., & Figeys, D. (2010). Lipidomics era: accomplishments and challenges. *Mass Spectrometry Reviews*, *29*, 877–929. <https://doi.org/10.1002/mas>
- Khedr, A., Hegazy, M. A., Kammoun, A. K., & Shehata, M. A. (2016). Phospholipidomic identification of potential serum biomarkers in dengue fever, hepatitis B and hepatitis C using liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry.

Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 1009–1010, 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.12.011>

- Kok, B. H., Lim, H. T., Lim, C. P., Lai, N. S., Leow, C. Y., & Leow, C. H. (2023). Dengue virus infection – a review of pathogenesis, vaccines, diagnosis and therapy. *Virus Research*, 324(October 2022), 199018. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2022.199018>
- Lanciotti, R. S., Kosoy, O. L., Laven, J. J., Velez, J. O., Lambert, A. J., Johnson, A. J., Stanfield, S. M., & Duffy, M. R. (2008). Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerging Infectious Diseases*, 14(8), 1232–1239. <https://doi.org/10.3201/eid1408.080287>
- Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, & Vorndam AV. (1992). Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(3), 545–551.
- Manchester, M., & Anand, A. (2017). Metabolomics: Strategies to Define the Role of Metabolism in Virus Infection and Pathogenesis. In *Advances in Virus Research* (1st ed., Vol. 98). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2017.02.001>
- Melo, C. F. O. R., Delafiori, J., Dabaja, M. Z., de Oliveira, D. N., Guerreiro, T. M., Colombo, T. E., Nogueira, M. L., Proenca-Modena, J. L., & Catharino, R. R. (2018). The role of lipids in the inception, maintenance and complications of dengue virus infection. *Scientific Reports*, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30385-x>
- Messina, J. P., Brady, O. J., Golding, N., Kraemer, M. U. G., Wint, G. R. W., Ray, S. E., Pigott, D. M., Shearer, F. M., Johnson, K., Earl, L., Marczak, L. B., Shirude, S., Davis Weaver, N., Gilbert, M., Velayudhan, R., Jones, P., Jaenisch, T., Scott, T. W., Reiner, R. C., & Hay, S. I. (2019). The current and future global distribution and population at risk of dengue. *Nature Microbiology*, 4(9), 1508–1515. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0476-8>
- Molloy, J. C., Sommer, U., Viant, M. R., & Sinkins, S. P. (2016). Wolbachia modulates lipid metabolism in *Aedes albopictus* mosquito cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(10), 3109–3120. <https://doi.org/10.1128/AEM.00275-16>
- Nachtigall, F. M., Pereira, A., Trofymchuk, O. S., & Santos, L. S. (2020). Detection of SARS-CoV-2 in nasal swabs using MALDI-MS. *Nature Biotechnology*, 38(10), 1168–1173. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0644-7>
- Năstase, A. M., Barrett, M. P., Cárdenas, W. B., Cordeiro, F. B., Zambrano, M., Andrade, J., Chang, J., Regato, M., Carrillo, E., Botana, L., Moreno, J., Regnault, C., Milne, K., Spence, P. J., Rowe, J. A., & Rogers, S. (2023). Alignment of multiple metabolomics LC-MS datasets from disparate diseases to reveal fever-associated metabolites. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 17(7 July), 1–22.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011133>

- Nunes, E. da C., & Canuto, G. A. B. (2020). Metabolomics applied in the study of emerging arboviruses caused by *Aedes aegypti* mosquitoes: A review. *Electrophoresis*, *41*(24), 2102–2113. <https://doi.org/10.1002/elps.202000133>
- Organización Panamericana de la Salud. (2023). *Case definitions, clinical classification, and disease phases Dengue, Chikungunya, and Zika*. <https://www.paho.org/en/documents/case-definitions-clinical-classification-and-disease-phases-dengue-chikungunya-and-zika>
- Patel, S. K., Rajora, N., Kumar, S., Sahu, A., Kochar, S. K., Krishna, C. M., & Srivastava, S. (2019). Rapid Discrimination of Malaria- and Dengue-Infected Patients Sera Using Raman Spectroscopy. *Analytical Chemistry*, *91*(11), 7054–7062. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05907>
- Patti, G. J., Yanes, O., & Siuzdak, G. (2012). Metabolomics: the apogee of the omic trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, *13*(4), 263–269. <https://doi.org/10.1038/nrm3314>
- Peeling, R. W., Artsob, H., Pelegrino, J. L., Buchy, P., Cardoso, M. J., Devi, S., Enria, D. A., Farrar, J., Gubler, D. J., Guzman, M. G., Halstead, S. B., Hunsperger, E., Kliks, S., & Margolis, H. S. (2010). Evaluation of diagnostic tests : dengue. *Nature Publishing Group*, *12*, S30–S37. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2459>
- Ploypetch, S., Jaresitthikunchai, J., Phaonakrop, N., Sakcamduang, W., Manee-in, S., Suriyaphol, P., Roytrakul, S., & Suriyaphol, G. (2022). Utilizing MALDI-TOF MS and LC-MS/MS to access serum peptidome-based biomarkers in canine oral tumors. *Scientific Reports*, *12*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-26132-y>
- Ramos-Castañeda, J., Barreto dos Santos, F., Martínez-Vega, R., Galvão de Araujo, J. M., Joint, G., & Sarti, E. (2017). Dengue in Latin America: Systematic Review of Molecular Epidemiological Trends. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *11*(1), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005224>
- Rashid, M. M., Varghese, R. S., Ding, Y., & Ransom, H. W. (2023). Biomarker Discovery for Hepatocellular Carcinoma in Patients with Liver Cirrhosis Using Untargeted Metabolomics and Lipidomics Studies. *Metabolites*, *13*(10). <https://doi.org/10.3390/metabo13101047>
- Rathnakumar, S., Kambhampati, N. S. V., Saiswaroop, R., Pradhan, S. S., Ramkumar, G., Beeraka, N., Muddu, G. K., Kumar, S., Javvaji, S. K., Parangoankar, A., Sivaramakrishnan, V., & Ramamurthy, S. S. (2023). Integrated clinical and metabolomic analysis of dengue infection shows molecular signatures associated with host-pathogen interaction in different phases of the disease. *Metabolomics*, *19*(5), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s11306-023-02011-z>

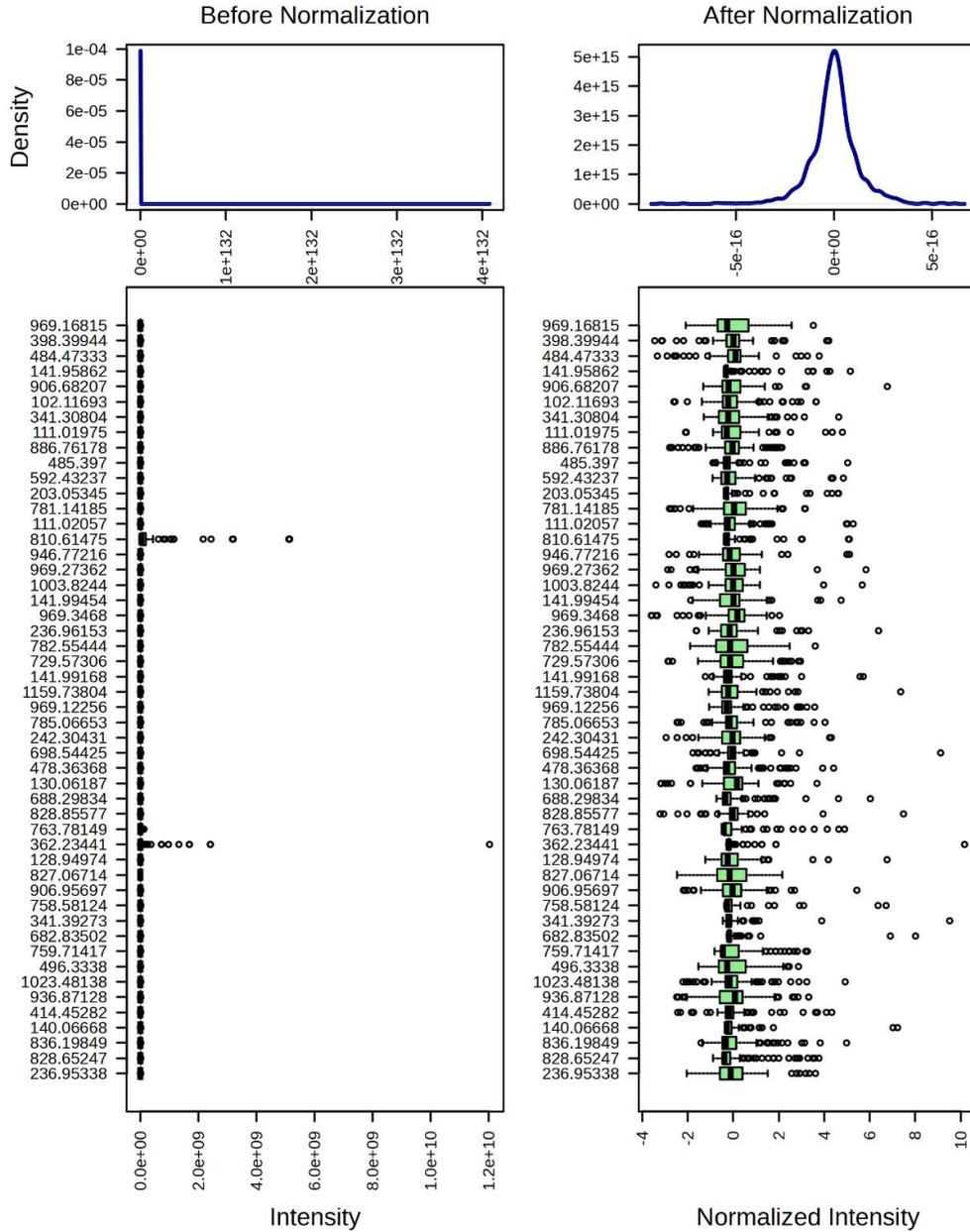
- Ray, G., Kumar, V., Kapoor, A. K., Dutta, A. K., & Batra, S. (1999). Status of antioxidants and other biochemical abnormalities in children with dengue fever. *Journal of Tropical Pediatrics*, *45*(1), 4–7. <https://doi.org/10.1093/tropej/45.1.4>
- Rojas, E. M., Díaz-quijano, F. A., Coronel-ruiz, C., Martínez-vega, R. A., Rueda, E., & Villar-centeno, L. A. (2007). Association between glutathione peroxidase levels and clinical manifestations of dengue. *Rev Méd Chile*, *135*, 743–750.
- Romagnolo, A. G., & Carvalho, K. I. (2021). Dengue and metabolomics in humans. *Metabolomics*, *17*(3), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11306-021-01783-6>
- Rothwell, C., LeBreton, A., Young Ng, C., Lim, J. Y. H., Liu, W., Vasudevan, S., Labow, M., Gu, F., & Gaither, L. A. (2009). Cholesterol biosynthesis modulation regulates dengue viral replication. *Virology*, *389*(1–2), 8–19. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.03.025>
- Shahfiza, N., Osman, H., Hock, T. T., & Abdel-Hamid, A. H. Z. (2017). Metabolomics approach for multibiomarkers determination to investigate dengue virus infection in human patients. *Acta Biochimica Polonica*, *64*(2), 215–219. <https://doi.org/10.18388/abp.2015>
- Shrinet, J., Shastri, J. S., Gaiind, R., Bhavesh, N. S., & Sunil, S. (2016). Serum metabolomics analysis of patients with chikungunya and dengue mono/co-infections reveals distinct metabolite signatures in the three disease conditions. *Scientific Reports*, *6*(October), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep36833>
- Silva Afonso, M., Marcondes Machado, R., Ferrari Lavrador, M. S., Rocha Quintao, E. C., Moore, K. J., & Lottenberg, A. M. (2018). Molecular pathways underlying cholesterol homeostasis. *Nutrients*, *10*(6), 1–18. <https://doi.org/10.3390/nu10060760>
- Silva, Á. S. A. da, Carvalho, F. L., Pinto, G. A., Saad, L. S. R., Curado, M. O., Dombroski, T. C. D., Hoffmann-Santos, H. D., & Elias, R. M. (2024). Analysis of signs and symptoms in confirmed cases of severe dengue among children aged 0 to 10 years old. *Einstein (Sao Paulo, Brazil)*, *22*, eAO0546. https://doi.org/10.31744/einstein_journal/2024AO0546
- Snyder, N. W., Khezam, M., Mesaros, C. A., Worth, A., & Blair, I. A. (2013). Untargeted metabolomics from biological sources using ultraperformance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (UPLC-HRMS). *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, *75*, 1–8. <https://doi.org/10.3791/50433>
- Soe, H. J., Manikam, R., Raju, C. S., Khan, M. A., & Sekaran, S. D. (2020). Correlation of host inflammatory cytokines and immune-related metabolites, but not viral NS1 protein, with disease severity of dengue virus infection. *PLoS ONE*, *15*(8 August), 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237141>

- Swiatly, A., Horala, A., Hajduk, J., Matysiak, J., Nowak-Markwitz, E., & Kokot, Z. J. (2017). MALDI-TOF-MS analysis in discovery and identification of serum proteomic patterns of ovarian cancer. *BMC Cancer*, *17*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3467-2>
- Szymańska, E., Saccenti, E., Smilde, A. K., & Westerhuis, J. A. (2012). Double-check: Validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies. *Metabolomics*, *8*, 3–16. <https://doi.org/10.1007/s11306-011-0330-3>
- Tsugawa, H., Cajka, T., Kind, T., Ma, Y., Higgins, B., Ikeda, K., Kanazawa, M., VanderGheynst, J., Fiehn, O., & Arita, M. (2015). MS-DIAL: Data Independent MS/MS Deconvolution for Comprehensive. *Nat Methods*, *12*(6), 523–526. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3393>.MS-DIAL
- Voge, N. V., Perera, R., Mahapatra, S., Gresh, L., Balmaseda, A., Loroño-Pino, M. A., Hopf-Jannasch, A. S., Belisle, J. T., Harris, E., Blair, C. D., & Beaty, B. J. (2016). Metabolomics-Based Discovery of Small Molecule Biomarkers in Serum Associated with Dengue Virus Infections and Disease Outcomes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *10*(2), 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004449>
- Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C. K. E., Walther, P., Fuller, S. D., Antony, C., Krijnse-Locker, J., & Bartenschlager, R. (2009). Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites. *Cell Host and Microbe*, *5*(4), 365–375. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.03.007>
- Whitehorn, J., Nguyen, C. V. V., Khanh, L. P., Kien, D. T. H., Quyen, N. T. H., Tran, N. T. T., Hang, N. T., Truong, N. T., Hue Tai, L. T., Cam Huong, N. T., Nhon, V. T., Van Tram, T., Farrar, J., Wolbers, M., Simmons, C. P., & Wills, B. (2015). Lovastatin for the Treatment of Adult Patients with Dengue: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Clinical Infectious Diseases*, *62*(4), 468–476. <https://doi.org/10.1093/cid/civ949>
- WHO. (2024). *Disease Outbreak News*. World Health Organization. Dengue - Global Situation. <https://www.who.int/emergencies/disease%0A-%0Aoutbreak%0A-%0Anews/item/2023%0A-%0ADON498>
- Xia, J., Broadhurst, D. I., Wilson, M., & Wishart, D. S. (2013). Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: An introductory tutorial. *Metabolomics*, *9*(2), 280–299. <https://doi.org/10.1007/s11306-012-0482-9>
- Xia, J., & Wishart, D. S. (2016). Using metaboanalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis. *Current Protocols in Bioinformatics*, *2016*(September), 14.10.1-14.10.91. <https://doi.org/10.1002/cpbi.11>
- Yousefi, M., Lee, W. S., Yan, B., Cui, L., Yong, C. L., Yap, X., Tay, K. S. L., Qiao, W., Tan, D., Nurazmi, N. I., Linster, M., Smith, G. J. D., Lee, Y. H., Carette, J. E., Ooi, E. E.,

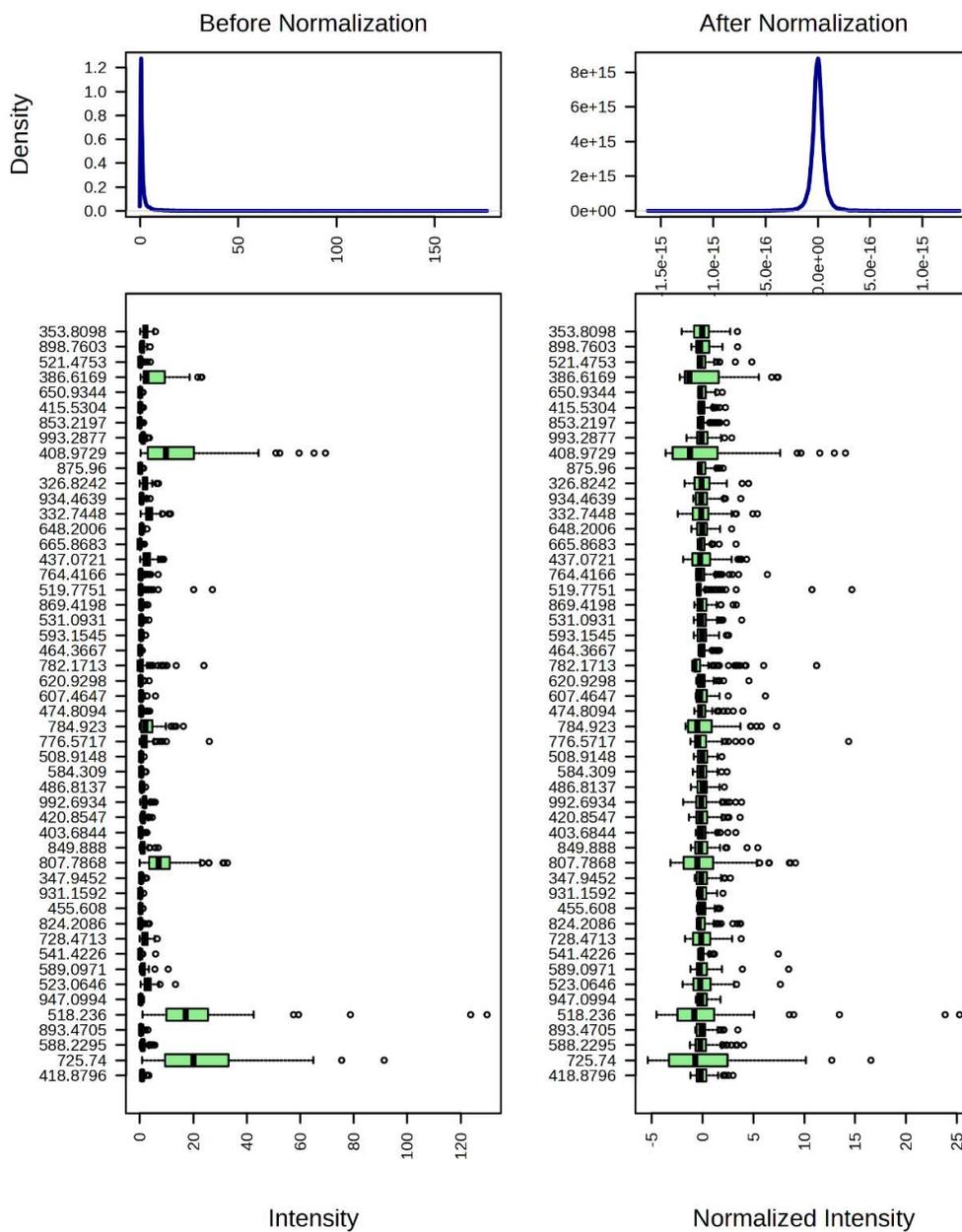
Chan, K. R., & Ooi, Y. S. (2022). TMEM41B and VMP1 modulate cellular lipid and energy metabolism for facilitating dengue virus infection. *PLoS Pathogens*, *18*(8), 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010763>

Anexos

Anexo I. Efecto de normalización mediante auto-escalado de la base de datos generada por LC-MS en el estudio metabolómico del suero de niños con dengue comparado con control, realizado en el software Metaboanalyst 6.0.



Anexo 2. Efecto de normalización mediante escalado por Pareto de la base de datos generada por MALDI-MS en el estudio metabolómico del suero de niños con dengue comparado con control, realizado en el software Metaboanalyst 6.0.



Anexo 3. Lista complementaria de atribución de metabolitos analizados por LC-MS en el estudio del dengue en niños comparado con control. Metabolitos identificados por bases de datos complementarias (HMDB y Metabolomics Workbench)

| Mass | DENGUE | Name | Formula | Ion | Delta | Exact mass | Main class |
|-----------|--------|----------------------|---------------|------------|-------|------------|--|
| 246.2655 | ↑ | SPB 18:3 | C18H32NO-1 | [M+H-H2O]+ | .0075 | 246.2580 | Sphingoid bases |
| | | PE(16:0/16:0) | C37H74NO8P | M+H+2Na | .0058 | 246.271259 | Diacylglycerophosphoethanolamines |
| 349.26489 | ↓ | FA 20:1;O | C20H38O3Na | [M+Na]+ | .0064 | 349.2713 | Fatty Acids and Conjugates |
| | | ST 22:1;O3 | C22H36O3 | [M+H]+ | .0088 | 349.2737 | Bile acids and derivatives |
| 305.22946 | ↓ | DG 36:8 | C39H60O5 | [M+2H]2+ | .0002 | 305.2293 | Diradylglycerols |
| | | FA 16:0;O3 | C16H32O5 | [M+H]+ | .0028 | 305.2322 | Fatty Acids and Conjugates |
| 512.55011 | ↓ | Cer(d18:0/14:0) | C32H65NO3 | [M+H]+ | 0.067 | 283.2673 | Ceramides |
| 758.70825 | ↓ | Cer 47:1;O3 | C47H93NO4Na | [M+Na]+ | .0086 | 758.6997 | Ceramides |
| 305.17508 | ↓ | ST 18:3;O4 | C18H24O4 | [M+H]+ | | 304.16746 | Steroids |
| | | FA 14:0;O2 | C14H28O4Na2 | [M+2Na-H]+ | .0052 | 305.1699 | Fatty Acids and Conjugates |
| 393.43518 | ↓ | Not attributed | | | | | |
| 349.20367 | ↓ | FA 20:5;O4 | C20H30O6 | [M+H-H2O]+ | .0027 | 349.2009 | Eicosanoids |
| | | FA 18:3;O3 | C18H30O5Na | [M+Na]+ | .0051 | 349.1985 | Fatty Acids and Conjugates, Octadecanoids, Eicosanoids |
| 128.95227 | ↑ | Not attributed | | | | | |
| 780.08936 | ↓ | Not attributed | | | | | |
| 274.60077 | ↑ | ST 21:2;O7;T | C23H37NO9SNa2 | [M+2Na]2+ | .0021 | 274.5987 | Sterol Lipids |
| | | LPS 17:4 | C23H38NO9PNa2 | [M+2Na]2+ | .0027 | 274.6034 | Glycerophosphoserines |
| 139.98825 | ↓ | Not attributed | | | | | |
| 437.47452 | ↓ | 1,11-Triacontanediol | C30H62O2 | M+H-H2O | .0022 | 437.472281 | Fatty Alcohols |
| 484.47333 | ↓ | FA 30:1;O | C30H58O3 | [M+NH4]+ | .0009 | 484.4724 | Fatty Acids and Conjugates |
| 246.54501 | ↓ | Cyanidin 3-glucoside | C21H21O11 | M+2Na | .0089 | 246.536135 | Flavonoids |
| | | DG(PGD1/0:0/i-21:0) | C44H80O8 | M+3H | .0093 | 246.535716 | Diradylglycerols |