

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias de la Vida

Diseño de una herramienta mediante el uso de la metabolómica para el diagnóstico y pronóstico de COVID-19

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Biología

Presentado por:

Yulai Yalile Pavón Carbo

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2020

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a mi familia y a todos los docentes que me han apoyado a lo largo de los años. Gracias a ellos el desconocimiento se convirtió en duda y la duda en la búsqueda continua de respuestas.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Miss Fernanda Bertuccez que me ha guiado a lo largo de este trabajo con predisposición y amabilidad. Así como a los demás miembros del Laboratorio de Investigaciones Biomédicas (LIB), donde adquirí el conocimiento y la práctica que me permitió concluir este trabajo.

DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, me corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; yo *Yulai Yalile Pavón Carbo* doy mi consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual”

A handwritten signature in blue ink that reads "Yulai Pavón". The signature is written in a cursive style with a horizontal line underlining the name.

Yulai Pavón

EVALUADORES



Firmado electrónicamente por:
**DIEGO ARTURO
GALLARDO
POLIT**

.....
Mgtr. Diego Arturo Gallardo Polit

PROFESOR DE LA MATERIA

**FERNANDA
BERTUCCEZ
CORDEIRO**

Digitally signed by
FERNANDA BERTUCCEZ
CORDEIRO
Date: 2021.02.24
19:13:53 -05'00'

.....
Fernanda Bertuccez Cordeiro Ph.D.

PROFESOR TUTOR

RESUMEN

La reciente pandemia de COVID-19 es una de las principales amenazas para la salud pública y el diagnóstico oportuno ha demostrado ser una herramienta esencial para combatirla. No obstante, las limitaciones de las pruebas actuales han tenido un impacto considerable en el manejo de esta crisis. Por ello se vuelve necesario diseñar nuevas herramientas para la detección y seguimiento clínico de la infección por SARS-CoV-2. Esto se logra a través del estudio de metabolitos, ya que permiten obtener información oportuna sobre el estado actual y progreso del paciente. Para ello se diseñó una metodología que va desde la selección de grupos de estudio hasta la interpretación biológica. Este proceso incluyó el análisis de metabolitos salivales mediante MALDI-TOF MS y la posterior determinación de biomarcadores. Pero dado que no fue posible llevar a cabo el componente práctico de este trabajo, se realizó una investigación bibliográfica. Como resultado se evidenció que los estudios actuales emplean diferentes técnicas y tipos de muestras biológicas. A partir de los cuales se han identificado biomarcadores diagnósticos y pronósticos para la infección por SARS-CoV-2, entre ellos varios lípidos circulantes y aminoácidos. No obstante, no se encontraron trabajos que empleen la herramienta MALDI-TOF MS en conjunto con muestras de saliva. En conclusión, este proyecto presenta el diseño de una herramienta para el diagnóstico y pronóstico de COVID-19 y representa una base de utilidad para trabajos futuros.

Palabras Clave: COVID-19, SARS-CoV-2, MALDI-TOF, biomarcador, metabolómica.

ABSTRACT

The recent COVID-19 pandemic is one of the main threats to public health and timely diagnosis has proven to be an essential tool in dealing with it. However, the limitations of current tests have had a considerable impact on the management of this crisis. Therefore, it is necessary to design new tools for the detection and clinical monitoring of SARS-CoV-2 infection. This is achieved through the study of metabolites, which allow obtaining timely information on the current status and progress of the patient. To do this, a methodology was designed that ranges from the selection of study groups to the biological interpretation. This process included the analysis of salivary metabolites using MALDI-TOF MS and the subsequent determination of biomarkers. But since it was not possible to carry out the practical component of this work, a bibliographic investigation was carried out. As a result, it was evidenced that current studies use different techniques and types of biological samples. From which diagnostic and prognostic biomarkers for SARS-CoV-2 infection have been identified, including several circulating lipids and amino acids. However, no studies were found using the MALDI-TOF MS tool with saliva samples. In conclusion, this project presents the design of a tool for the diagnosis and prognosis of COVID-19 and represents a useful base for future work.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, MALDI-TOF, biomarker, metabolomics.

ÍNDICE GENERAL

EVALUADORES	5
RESUMEN	I
<i>ABSTRACT</i>	II
ÍNDICE GENERAL	III
ABREVIATURAS	V
SIMBOLOGÍA	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
CAPÍTULO 1	9
1. Introducción.....	9
1.1 Descripción del problema	10
1.2 Justificación del problema.....	11
1.3 Objetivos.....	12
1.3.1 Objetivo General	12
1.3.2 Objetivos Específicos	12
1.4 Marco teórico	12
1.4.1 COVID-19.....	12
1.4.2 Biomarcadores	13
1.4.3 Metabolómica	14
1.4.4 Espectrometría de masas: MALDI-TOF	15
CAPÍTULO 2	17
2. Metodología	17
2.1 Grupo de estudio	17
2.2 Toma de muestras.....	18

2.3	Extracción de metabolitos (inactivación del virus)	19
2.4	Adquisición de datos: Espectrometría de masas MALDI-TOF	19
2.5	Análisis de datos.....	19
2.6	Identificación y evaluación de potenciales biomarcadores	20
2.7	Interpretación biológica.....	21
CAPÍTULO 3.....		22
3.	RESULTADOS Y ANÁLISIS	22
3.1	Biomarcadores metabolómicos.....	22
3.2	Alteraciones globales.....	27
3.3	Rutas metabólicas alteradas.....	27
3.4	Alteraciones a largo plazo.....	28
3.5	Aplicación de la herramienta.....	28
CAPÍTULO 4.....		30
4.	Conclusiones Y Recomendaciones.....	30
	Conclusiones	30
	Recomendaciones	30
BIBLIOGRAFÍA		32

ABREVIATURAS

COVID-19	Coronavirus Disease 2019
SARS-CoV-2	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2
SARS	Severe Acute Respiratory Syndrome
MERS	Middle East Respiratory Syndrome
RT-PCR	PCR con transcripción inversa en tiempo real
MALDI –TOF/MS	Espectrometría de masas por desorción/ ionización mediante láser asistida por matriz con analizador de tiempo de vuelo
ACE-2	Enzima Convertidora de Angiotensina-2
FDA-NIH	Food and Drug Administration- National Institutes of Health
RMN	Resonancia magnética nuclear
MS	Espectrometría de Masas
HMDB	Human Metabolome DataBase
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
PVDF	Fluoruro de polivinilideno

SIMBOLOGÍA

m/z Relación masa-carga específica (m/z)

μL Microlitros

μm Micrometros

°C Grados Celsius

RCF Fuerza centrífuga relativa

Da Dalton

ppm Partes por millón

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Curvas ROC con diferentes AUC. Fuente: Glen, (2019).....	21
Figura 3.2 Diagrama de procesos.....	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Grupos de estudio.....	18
Tabla 3.2 Estudios que usan compuestos individuales como biomarcadores.....	25
Tabla 3.3 Estudios que usan múltiples compuestos como biomarcadores	26

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

A pesar de los múltiples avances en salud pública, las enfermedades infecciosas continúan siendo una de las principales amenazas a nivel mundial. Especialmente debido a que en los últimos años se ha vuelto común la aparición de nuevas enfermedades infecciosas, así como el resurgimiento de aquellas que estaban en vías de erradicación o bajo control. Lo cual puede ocasionar epidemias e incluso pandemias, como la reciente pandemia de COVID-19, que ya ha acumulado más de 104 millones de infectados y 2 millones de muertes a escala global (WHO, 2021). Esta enfermedad fue descubierta en diciembre del 2019, en la provincia Hubei, China. Donde un brote de neumonía de origen desconocido llamó la atención de las autoridades locales, identificando como agente causal a SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2). Un nuevo coronavirus perteneciente al mismo género que los virus causantes de la epidemia de SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome) en 2002-2003 y MERS (Middle East Respiratory Syndrome) en 2012. Debido a su rápida expansión, la Organización Mundial de la Salud declaró en enero del 2020 la emergencia sanitaria y en marzo de 2020, con la infección reportada en más de 100 países, se declaró la pandemia (Casella et al., 2020) .El número de casos continúa aumentando y para hacer frente a esta amenaza, los esfuerzos se han centrado en el desarrollo de técnicas de diagnóstico, creación de vacunas e identificación de terapias eficaces (Ahsan et al., 2020). De manera que el diagnóstico rápido, preciso y económico es un punto clave para el manejo de esta pandemia (Zhu & Wong, 2020).

El diagnóstico de COVID-19 puede basarse en manifestaciones clínicas del paciente, PCR con transcripción inversa en tiempo real (RT-PCR), análisis de sangre serológicos, radiografía del tórax y tomografía computarizada (Esakandari et al., 2020). La herramienta de preferencia corresponde al diagnóstico mediante RT-PCR usando muestras de hisopado nasofaríngeo. No obstante, a pesar de sus múltiples beneficios, esta técnica también tiene limitaciones. Como aquellas relacionadas a la naturaleza de la prueba, de manera que puede identificar y cuantificar ácidos

nucleicos virales, pero no da información sobre la salud del individuo. Por otro lado, la pandemia de COVID-19 ha evidenciado que ante un evento de esta magnitud surge una alta demanda de pruebas diagnósticas. Así como mucho desconocimiento de aspectos relativos al desarrollo de la enfermedad. Por ende, se vuelve evidente la necesidad de desarrollar herramientas diagnósticas rápidas que además permitan evaluar el estado de salud del paciente. La ausencia de este tipo de técnicas ya ha ocasionado problemas en la práctica clínica. Los cuales están relacionados con el establecimiento de un diagnóstico oportuno, evaluación de casos, pronóstico y tratamiento de la enfermedad. De manera que constituyen un obstáculo considerable para el adecuado manejo de los infectados y control de la pandemia (McRae et al., 2020).

1.1 Descripción del problema

En la actualidad la pandemia de COVID-19 es considerada un gran reto para el personal médico. Especialmente en aquellos periodos donde el número de infectados aumenta, ocasionando una mayor demanda de pruebas diagnósticas y el colapso de los sistemas de salud. Entre las características que subyacen esta situación está su alta transmisibilidad. De manera que, aunque la mortalidad es significativamente menor en comparación con las epidemias de coronavirus pasadas. La transmisibilidad es mucho mayor, repercutiendo en un mayor número de casos y muertes. Por otro lado, COVID-19 tiene una presentación clínica variable. La cual va desde infectados asintomáticos a manifestaciones que requieren la hospitalización y posterior ingreso a la Unidad de Cuidados de Intensivos (UCI). Por ende, esta situación ocasiona que el personal de la salud tenga que tomar decisiones rápidas y complicadas en base a la información disponible (Debnath et al., 2020).

Las técnicas diagnósticas son una herramienta esencial para la toma de decisiones y en la actualidad la RT-PCR es considerada el estándar de oro. No obstante, la identificación de los infectados es solo el comienzo para los trabajadores de la salud. Y si bien es cierto las demás herramientas pueden ser complementarias a la RT-PCR. Las mismas también presentan limitaciones, como la necesidad de

personal especializado, tiempo ejecución, costo, entre otros. De manera que conforme aumenta el número de infectados, estas limitaciones cobran mayor importancia. Para aumentar la eficacia diagnóstica Younes et al., 2020 establecen tres acciones a tomar: la selección de muestras óptimas para el diagnóstico, el establecimiento de un enfoque usando múltiples herramientas y la inclusión de pruebas que permitan estudiar la evolución de la enfermedad. Entre las herramientas capaces de cumplir con estos requerimientos destacan las técnicas basadas en espectrometría de masas. Las cuales emplean un enfoque ómico para la detección de biomarcadores (Mahmud & Garrett, 2020).

1.2 Justificación del problema

De acuerdo a la OMS, (2018) las epidemias se están produciendo con mayor frecuencia, se propagan más rápido y se esparcen más lejos que nunca. Estos eventos son difíciles de predecir y afectan especialmente a aquellos países con ingresos bajos-medios y sistemas de salud deficientes. No obstante, y a pesar de la advertencia que representaron los brotes de coronavirus en años anteriores, la pandemia de COVID-19 ha evidenciado que aún estamos poco preparados para un evento de esta magnitud (Peeri et al., 2020). Además de que ante la ausencia de una vacuna o terapias específicas, el control de la enfermedad y la promoción de la salud del paciente dependen de un diagnóstico rápido y acertado (Lemos et al., 2020). Por ende, el desarrollo de nuevas herramientas sigue siendo una prioridad. Abordar esta necesidad mediante la espectrometría de masas aplicada a la metabolómica traería múltiples beneficios.

La espectrometría de masas permite elaborar perfiles metabolómicos de la respuesta del paciente frente a la infección y establecer posibles biomarcadores. De manera que su uso para la búsqueda de biomarcadores salivales correspondería a un método más rápido, económico y seguro en comparación con las técnicas actuales. Sobre todo si se considera que la toma de muestras sería un proceso menos invasivo y riesgoso que el uso de hisopados nasofaríngeo (Sapkota et al., 2020). El conocimiento generado a partir de esta técnica sería de utilidad para el diagnóstico, seguimiento clínico y pronóstico. Pudiendo incluso indicar la

transición de la respuesta inmune beneficiosa a la respuesta dañina observada en los pacientes más críticos. Y tomar medidas que permitan el tratamiento oportuno y eficaz así como la mejor administración de recursos (Struwe, et al. 2020).

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Diseñar una herramienta diagnóstica mediante el uso de la metabolómica para la detección y seguimiento clínico de la infección por SARS-CoV-2

1.3.2 Objetivos Específicos

- Aplicar la técnica de espectrometría de masas por desorción/ ionización mediante láser asistida por matriz con analizador de tiempo de vuelo (MALDI –TOF/MS) para la detección de perfiles metabolómicos de muestras de saliva.
- Comparar perfiles metabolómicos de muestras de saliva de personas infectadas y no infectadas por SARS-CoV-2 para la determinación de potenciales biomarcadores endógenos producidos en respuesta a la infección.

1.4 Marco teórico

1.4.1 COVID-19

COVID-19 es una enfermedad causada por el coronavirus SARS-CoV-2. El cual usa la Enzima Convertidora de Angiotensina-2 (ACE-2) como receptor para el ingreso a las células del huésped. Este receptor se encuentra en el epitelio del tracto respiratorio, epitelio gastrointestinal, células pancreáticas, mucosa oral, entre otros. La presentación clínica de la infección por COVID-19 puede variar desde la ausencia de síntomas hasta el desarrollo de una enfermedad crítica. De manera que los pacientes de mayor edad (60 años o más) y con comorbilidades son los que presentan un riesgo de muerte mucho mayor. Mientras que los niños

y jóvenes usualmente son asintomáticos o presentan síntomas leves (Casella et al., 2020).

Se distinguen 5 categorías para la infección por SARS-CoV-2: infección asintomática o pre-sintomática, enfermedad leve, enfermedad moderada, enfermedad grave y enfermedad crítica. La infección asintomática o pre-sintomática corresponde a aquellos individuos que presentan un diagnóstico positivo para la infección por SARS-CoV-2 pero que no muestran síntomas característicos de la enfermedad. Este grupo ha cobrado mucha relevancia durante la pandemia, ya que se estima que son los responsables de aproximadamente el 80% de la transmisión. La enfermedad leve comprende a los individuos que presentan signos o síntomas típicos de COVID-19. A excepción de anomalías en imágenes torácicas, disnea o dificultad respiratoria. Este grupo puede ser tratado de forma ambulatoria o en el hogar a través de herramientas tecnológicas. La enfermedad moderada se caracteriza porque presenta las anomalías excluidas de la categoría anterior. De manera que se evidencia la enfermedad de las vías respiratorias inferiores con una saturación de oxígeno (SpO₂) superior o igual al 94%. En la enfermedad grave se presenta una saturación de oxígeno (SpO₂) inferior al 94%, el índice de Kirby (PaO₂ / FiO₂) menor a 300mmHg, frecuencia respiratoria mayor a 30 respiraciones/minuto y/o infiltrados pulmonares mayor al 50%. Finalmente, en la enfermedad crítica los pacientes pueden presentar insuficiencia respiratoria, shock séptico o falla multiorgánica (NIH, 2020).

1.4.2 Biomarcadores

De acuerdo a FDA-NIH Biomarker Working Group, (2016) un biomarcador se define como una característica medible que actúa como indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o como respuesta biológica a alguna intervención o exposición. De acuerdo a sus aplicaciones pueden ser clasificados en 7 tipos: diagnósticos, de seguimiento, farmacodinámicos/de respuesta, predictivos, pronósticos, de seguridad y de susceptibilidad /riesgo. De manera que un solo biomarcador puede tener más de una aplicación, pero debe haber

evidencia que respalde la pertenencia a cada una. Los biomarcadores diagnósticos confirman una condición médica. Los de seguimiento son aquellos que pueden medirse en serie para evaluar el estado de la condición médica permitiendo buscar evidencia sobre la exposición a un determinado producto o agente y detectar el efecto del mismo. Los biomarcadores farmacodinámicos o de respuesta cambian de nivel como respuesta a un medicamento o agente ambiental. Los predictivos son aquellos cuya presencia o variación en un individuo predicen la probabilidad de un efecto favorable o desfavorable debido a un producto médico o agente ambiental. Los pronósticos muestran la probabilidad de que suceda un evento clínico, de su recurrencia o progresión en pacientes con una determinada condición médica. Los de seguridad se miden antes y después de la exposición para indicar la probabilidad, presencia o extensión de un efecto adverso. Y los de susceptibilidad o riesgo indican el potencial de que un individuo que no presenta una condición médica, la padezca en el futuro (Califf, 2018).

1.4.3 Metabolómica

La metabolómica es la ciencia ómica que tiene como objetivo la detección, cuantificación y elucidación de la estructura de los metabolitos. Moléculas de bajo peso molecular (<1000Da) definidas como el producto intermedio o final de las reacciones metabólicas. Los metabolitos presentes en una muestra biológica conforman el metaboloma, el cual es complejo, dinámico y refleja la fisiología del organismo en un momento dado. Lo cual incentiva su uso como biomarcador. El número de moléculas presentes en el metaboloma varía dependiendo del organismo e incluye tanto metabolitos endógenos como exógenos. De manera que los metabolitos endógenos son aquellos producidos de forma natural por el organismo, como aminoácidos, azúcares y vitaminas. Mientras que los exógenos hacen referencia a compuestos extraños generados de la interacción con el exterior, como drogas, aditivos alimentarios y toxinas (Yanes, 2015).

Los análisis metabolómicos se distinguen en dirigidos y no dirigidos. La metabolómica dirigida implica la cuantificación de metabolitos previamente conocidos, que son definidos de acuerdo con el problema biológico a tratar.

Mientras que la metabolómica no dirigida hace referencia a la determinación de todos los metabolitos posibles presentes en la muestra e implica tanto la cuantificación como la identificación. Dado que los metabolitos presentan una gran variedad de características químicas, se vuelve necesario el uso de plataformas y configuraciones analíticas que permitan aumentar la cobertura del metaboloma analizado. Así las dos técnicas más usadas para la identificación y cuantificación de metabolitos, corresponden a la resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrometría de masas (MS) (Gorrochategui et al., 2016).

1.4.4 Espectrometría de masas: MALDI-TOF

La espectrometría de masas es una técnica analítica que produce, separa y detecta iones en fase gaseosa de acuerdo a su relación masa-carga específica (m/z). Lo cual permite calcular el peso molecular exacto de los componentes de la muestra. De manera general un espectrómetro de masas está compuesto de tres elementos en una atmósfera de vacío: fuente de iones, analizador y detector. Además de un sistema de introducción de muestras y un sistema para el registro y procesamiento de los datos. El resultado final de esta técnica es un espectro de masas. Un gráfico que representa la abundancia relativa de las especies iónicas versus su relación m/z . De forma que cada pico corresponde a un componente con m/z único y la altura de los mismos su abundancia relativa (Perutka & Šebela, 2018).

La espectrometría de masas tiene muchas variantes de acuerdo a las características de los componentes. Una de estas es la espectrometría de masas MALDI-TOF, que emplea una fuente de ionización MALDI un analizador de tiempo de vuelo (TOF) y un detector. La ionización MALDI es una ionización suave que permite crear iones con una fragmentación mínima. Lo cual es de utilidad considerando que las técnicas tradicionales pueden descomponer o fragmentar moléculas grandes. En esta técnica la muestra se co-cristaliza con una matriz en una placa metálica, para luego ser impactada con un láser, originando la desorción e ionización. A continuación, el analizador TOF separa estas moléculas de acuerdo al tiempo de vuelo. Es decir, el tiempo que les toma chocar contra el

detector. De manera que las moléculas más ligeras llegan antes que las moléculas más pesadas (Hou et al., 2019).

Diversos estudios ya han evidenciado el potencial de la espectrometría de masas y la han aplicado para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades infecciosas. Como Shen et al., (2020), que elaboraron perfiles metabolómicos y proteómicos de la infección por SARS-CoV-2 a partir de muestras de suero. Lo cual permitió identificar potenciales biomarcadores y determinar cambios moleculares relacionados a la enfermedad. Por otro lado, estudios a largo plazo de SARS-CoV (12 años) han identificado alteraciones en el metabolismo de lípidos, repercutiendo en una mala calidad de vida como resultado del tratamiento con metilprednisolona (Wu et al., 2017). No obstante, estos estudios no emplean la espectrometría de masas MALDI-TOF. La cual se distingue por su rapidez, permitiendo caracterizar de forma oportuna biomarcadores de enfermedades usando diversas muestras biológicas (Hou et al., 2019).

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

La reciente pandemia de COVID-19 ha evidenciado la necesidad de desarrollar nuevas herramientas, que permitan tanto el diagnóstico como la asesoría clínica. Entre las opciones para cubrir esta necesidad, resalta la espectrometría de masas con enfoques ómicos para la detección de biomarcadores. Aunque hay muchas variantes de esta técnica, la espectrometría de masas MALDI-TOF y la metabolómica han sido recomendadas. Debido a que la primera tiene características de gran utilidad para el diagnóstico oportuno y la segunda corresponde al producto final de los procesos celulares. Siendo la ciencia ómica que mejor representa al fenotipo, a diferencia de la genómica, transcriptómica y proteómica. Considerando esto, el presente trabajo empleó un diseño cualitativo y cuantitativo experimental. Donde se aplicó la técnica MALDI-TOF para identificar potenciales biomarcadores metabolómicos a partir de muestras de saliva. Lo cual es esencial para la implementación de esta nueva herramienta, ya que hay una gran cantidad de metabolitos en el cuerpo humano y es necesario centrar la atención en aquellos que realmente se ven afectados por la infección. La metodología abarcó el reclutamiento del grupo de estudio, la toma de muestras de saliva, extracción de los metabolitos presentes en la muestra, adquisición de los espectros de masas mediante MALDI-TOF, análisis de los datos, identificación y evaluación de los potenciales biomarcadores endógenos. Así como una interpretación biológica de los mismos.

2.1 Grupo de estudio

El grupo de estudio incluyó a 40 individuos atendidos en diferentes instituciones/laboratorios biomédicos de la ciudad de Guayaquil, Ecuador. Los cuales se dividieron en 4 categorías de acuerdo con los resultados de la RT-PCR con muestra de hisopado nasofaríngeo, prueba rápida de detección de anticuerpos y características clínicas. El grupo A (n=10) correspondió a individuos sanos con diagnóstico negativo para la infección por SARS-CoV-2. El grupo B (n=10) a individuos con diagnóstico positivo pero asintomáticos. El grupo C (n=10) a pacientes con diagnóstico positivo y sintomatología típica. Y el grupo D (n=10) a los pacientes con diagnóstico positivo y

sintomatología grave o crítica, que habían sido ingresados a la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI). Esta clasificación permitió no solo identificar los metabolitos asociados a la infección, sino también a la progresión de la enfermedad.

Tabla 2.1 Grupos de estudio

Grupo	Descripción		RT-PCR	Test serológico	Características clínicas
A (n=10)	Sin COVID-19	No infectado	Negativa	Negativa	Sin sintomatología
B (n=10)		Infectado asintomático	Positiva	Positiva	Asintomático o pre-sintomático
C (n=10)	Con COVID-19	Infectado sintomático I	Positiva	Positiva	Enfermedad leve/moderada
D (n=10)		Infectado sintomático II	Positiva	Positiva	Enfermedad grave/crítica

Para el reclutamiento de individuos se siguieron los principios establecidos en la declaración de Helsinki y todos los participantes firmaron un consentimiento informado.

2.2 Toma de muestras

La toma de muestras se realizó en horas de la mañana, preferiblemente entre las 8:00 am y 12:00 am, siguiendo las recomendaciones de Henson & Wong, (2010). Los participantes se abstuvieron de comer, beber, fumar o utilizar productos bucales por al menos 1 hora previo a la colección de saliva. Luego cada individuo enjuagó su boca con agua potable destilada durante 1 minuto y depositó saliva entera sin estimular en un tubo Falcon estéril de 50mL. Se recolectaron al menos 2 mL por cada paciente y las muestras fueron centrifugadas (10.000 rcf y 4°C) durante 10 minutos con el fin de eliminar material particulado. El sobrenadante fue transferido a tubos eppendorf y las muestras fueron almacenadas a -80 °C hasta la extracción de metabolitos. Tanto este como procesos posteriores se llevaron a cabo en un recipiente con hielo para evitar la pérdida de compuestos.

2.3 Extracción de metabolitos (inactivación del virus)

Las muestras se descongelaron usando un refrigerador de 4 °C y luego se homogeneizaron usando un vortex. El protocolo de Bligh & Dyer, (1959) fue usado como se muestra a continuación: Se tomaron 50 µL de la muestra y se añadieron 50 µL de agua ultrapura, 125 µL de cloroformo y 250 µL de metanol, formando una mezcla monofásica. Posteriormente los tubos fueron agitados durante 30 s usando un vortex y se indujo la separación de fases mediante la adición de 100 µL de agua y 125 µL de cloroformo. Ambas fases se recogieron evitando la capa intermedia de proteínas y se transfirieron a un nuevo microtubo, donde el contenido se secó usando un speedvac. Previo al análisis se recuperaron los metabolitos usando una combinación de acetronitrilo-agua en partes iguales. Finalmente se filtró la mezcla usando filtros membrana PVDF de 0,22 µm (Cordeiro et al., 2017).

2.4 Adquisición de datos: Espectrometría de masas MALDI-TOF

Se añadieron 2 µL de cada muestra a la placa MALDI y posteriormente 1 µL de la matriz 2,5-ácido dihidroxibenzoico (DBH 0.5 M) disuelto en 90% de metanol, para el análisis en modo positivo. El equipo usado fue un espectrómetro de masas MALDI-TOF con un intervalo de intensidad por carga de 100-1200 *m/z*.

2.5 Análisis de datos

2.5.1 Pre-procesamiento de los datos

El procesamiento de los datos se realizó de a través del software MassLynx 4.1. De manera que se llevó a cabo la eliminación del fondo, suavizado y centralización de picos. A continuación, los datos se exportaron a Excel, donde se eliminaron los iones que presentaron una intensidad de 0.0 para más del 50% de los registros por grupo. Esto se realizó con el fin de evitar la detección aleatoria de biomarcadores (Cordeiro et al., 2017).

2.5.2 Análisis estadísticos multivariados y univariados

La interpretación de la gran cantidad de datos obtenidos, usualmente requiere el uso de herramientas estadísticas avanzadas que permitan reducir su complejidad.

Lo cual se logra mediante técnicas de proyección, que convierten datos multidimensionales en un modelo simplificado gracias a la obtención de nuevas componentes. Por ello en este trabajo, se ingresaron datos normalizados (mediante la escala de Pareto) en el software MetaboAnalyst 4.0 para llevar a cabo un Análisis de Componente Principales (PCA) y un Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA). El primero consiste en un método no supervisado, es decir, un método que permite la construcción de un modelo estadístico sin conocimiento previo sobre los diferentes grupos de estudio. Y que además proporciona 2 gráficos que permiten la interpretación de los resultados: el score plot y el loading plot. En el primero cada punto representa una muestra y por ende permite detectar grupos de acuerdo con los perfiles metabolómicos, así como identificar muestras atípicas. Mientras que en el segundo, los puntos representan metabolitos y permite identificar cuáles son los responsables de la agrupación mostrada en el score-plot (Alonso et al., 2015).

El PLS-DA es un método supervisado, en el cual se tiene conocimiento de los grupos y por ende se puede maximizar la discriminación de los mismos. Para evaluar estos modelos se empleó el parámetro de bondad de ajuste (R^2) y capacidad predictiva (Q^2). Los cuales aumentan conforme el número de componentes y presentan valores entre 0 y 1. En este trabajo se consideró que un modelo discriminante era de buena calidad cuando su Q^2 fue mayor a 0.5 y la diferencia entre R^2 y Q^2 no fue superior a 0.2-0.3 (Triba et al., 2015). A partir de los resultados del PCA y PLS-DA se identificaron los metabolitos con mayor poder discriminante y se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) para confirmar su relevancia estadística. La hipótesis nula fue que las medias de la frecuencia absoluta m/z entre los 4 grupos de estudio es diferente. Finalmente se realizó un mapa de calor para observar de mejor forma las diferencias entre los grupos.

2.6 Identificación y evaluación de potenciales biomarcadores

Los metabolitos de interés fueron identificados mediante una búsqueda por masa molecular en la Human Molecular Database (HMDB) (considerando una tolerancia de 0.1Da y asumiendo un error máximo de 50ppm). La HMDB es una base datos que

contiene información detallada sobre los metabolitos presentes en el cuerpo humano. Al momento de la búsqueda esta registraba 934 metabolitos endógenos salivales, entre detectados cuantificados y no cuantificados. Con el fin de evaluar el potencial de los biomarcadores para la correcta clasificación, se realizaron Curvas características Operativas del Receptor (ROC). Una curva ROC corresponde a una representación gráfica de la sensibilidad vs la 1-especificidad. De manera que el Área Bajo la Curva (AUC) permite evaluar el potencial diagnóstico de un posible biomarcador al clasificarlo como: pobre (<0.7), aceptable ($0.7-0.8$), excelente ($0.8-0.9$) o sobresaliente (>0.9) (Mandrekar, 2010).



Figura 2.1 Curvas ROC con diferentes AUC. Fuente: Glen, (2019)

2.7 Interpretación biológica

Esta etapa consistió en identificar las rutas metabólicas en las que participan los biomarcadores y establecer relaciones con la patología estudiada. Para ello se obtuvo información química y biológica de HMDB y se analizaron las rutas metabólicas implicadas. Lo cual se realizó mediante la base de datos de rutas metabólicas KEGG.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Dado que el presente trabajo no pudo ser llevado a cabo en su ámbito experimental, se realizó una búsqueda en PUBMED con el fin de identificar los metabolitos que pueden ser usados como biomarcadores. Para ello se usaron las palabras clave “COVID-19” y “metabolomics”. De manera que solo se tomaron en cuenta los trabajos que implicaban el estudio de metabolitos mediante técnicas de MS. Como resultado se identificaron artículos que emplean diferentes técnicas y tipos de muestras biológicas (suero, plasma, orina, exhalados, entre otros). Además, no se encontraron estudios que usen la herramienta MALDI-TOF MS para la identificación de biomarcadores en muestras de saliva.

3.1 Biomarcadores metabolómicos

Diversos estudios solo identificaron los metabolitos que varían significativamente debido a la infección. Mientras que otros determinaron cuales podían ser usados como biomarcadores y realizaron validaciones individuales (tabla 3.2) o grupales (tabla 3.3) considerando el AUC. La cual en la mayoría de los casos fue superior a 0.90 indicando que el o los metabolitos usados permiten distinguir eficientemente entre los grupos de estudio y que por ende podrían ser usados como biomarcadores.

Shen et al., (2020) analizaron el perfil proteómico y metabolómico del suero de pacientes con COVID-19 y lo compararon con otros grupos, identificando cambios moleculares implicados en la desregulación de macrófagos, desgranulación de plaquetas y desregulación de las vías del sistema del complemento, además de una supresión metabólica masiva. Con respecto a los metabolitos, se evidenciaron 373 cambios significativos en pacientes con COVID-19, de los cuales 204 se correlacionaron con la gravedad de la enfermedad y 80 de estos estaban involucrados en los procesos previamente descritos. Dichos metabolitos pertenecen a 10 clases: aminoácidos,

bilirrubinas, carbohidratos, colina, ácidos grasos, glicerofosfolipidos, serotoninas, espingolipidos, hormonas esteroideas y ácidos biliares. En este estudio también se identificó un panel de 22 proteínas y 7 metabolitos que pueden ser usados como biomarcadores y se evaluaron a través de un modelo de aprendizaje automático (AUC=0,957). Los metabolitos usados fueron un producto de degradación de la bilirrubina, quinurenina, ácido tauroquenodesoxicólico, N-palmitoil-esfingosina, tiroxina, N,N-dimetil-pro-pro y glucuronato.

La importancia de la vía de la quinurenina en la infección por SARS-CoV-2 ha sido observada en varios estudios. Por ejemplo Thomas et al., (2020) realizaron análisis metabolómicos entre pacientes sanos y COVID-19 positivos, observando una desregulación generalizada del metabolismo del nitrógeno (especialmente la homeostasis, el catabolismo y la transaminación de los aminoácidos) y el metabolismo del carbono (niveles de glucosa y ácidos grasos libres). Aunque este trabajo no estaba enfocado en el estudio de biomarcadores, se identificó el metabolismo alterado del triptófano en la vía de la quinurenina y se evidenció que la disminución del triptófano (AUC=0.965) y aumento de quinurenina (AUC=0.953) podrían ser usados como biomarcadores. Lo cual concuerda con los resultados de Fraser et al., (2020), donde se analizaron los perfiles metabolómicos de pacientes UCI COVID-19 positivo, UCI COVID-19 negativo y pacientes sanos (control). Las alteraciones metabólicas estuvieron dominadas por variaciones en quinurenina, arginina, sarcosina y lisofosfatidilcolinas. De manera que la quinurenina fue el principal metabolito discriminante y la relación arginina/quinurenina fue usada como un posible biomarcador diagnóstico entre el control vs COVID-19 positivo (AUC=1) y entre los pacientes en UCI (AUC = 0,98). Mientras que la creatinina sola o la relación creatinina/arginina fue usada para predecir la mortalidad con un 100% de precisión. Por ende, se evidencia que la quinurenina, triptófano, creatinina y arginina son metabolitos de interés para el diagnóstico y pronóstico.

A los trabajos ya mencionados se suma el de Blasco et al., (2020) donde se resaltó el papel de las vías de la citosina y el triptófano-nicotinamida en la discriminación de pacientes. De manera que se identificaron 2 metabolitos altamente discriminantes: la citocina y el ácido indol-3-acético. La primera es una de las cinco bases nitrogenadas

que conforman los ácidos nucleicos (adenina, timina, guanina, citosina y uracilo) y es un coordinador del metabolismo celular. Sus niveles elevados se deben al acoplamiento entre el metabolismo de la célula huésped y la síntesis de partículas virales, cuyo ARN contiene menos citosina. Mientras que el ácido indol-3-acético es un producto de degradación del metabolismo del triptófano.

Por otro lado, Song et al., (2020) usaron un panel de 10 metabolitos plasmáticos (AUC=0,975). Los cuales incluían lisofosfolípidos, lípidos neutros y esfingolípidos. Interesantemente en este trabajo se analizaron los lipidomas plasmático y exosomal, determinando que son similares. Además de que el aumento de un esfingolípidos (gangliósido de monosialodihexosilo (GM3)) estaba correlacionado fuerte y negativamente con el recuento de células T y células T CD4⁺. De manera que estos disminuyen progresivamente conforme aumenta la gravedad de la enfermedad. De Silva et al., (2020) identificaron biomarcadores lipídicos que pertenecían principalmente a fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), lípidos de esteroles (ST) y diglicéridos (DG). La mayoría de los cuales están involucrados en los principales procesos bioquímicos como el ciclo de Krebs, la vía de las pentosas fosfato (PPP) y la síntesis de purinas y pirimidinas. Estos resultados concuerdan con los de Barberis et al., (2020), donde se determinó que varios lípidos circulantes pueden actuar como posibles biomarcadores diagnósticos, como la fosfatidilcolina 14:0 22:6 (AUC=0,96), la fosfatidilcolina 16:1 22:6 (AUC=0,97) y la fosfatidiletanolamina 18:1 20:4 (AUC=0,94). Además de que los niveles de triglicéridos y ácidos grasos libres están correlacionados con el progreso de la enfermedad. En especial FA 18:1 y FA 20:4 que corresponden al ácido araquidónico (AUC=0,99) y el ácido oleico (AUC=0,98). Otros biomarcadores reportados corresponden al colesterol, la d-manosa, tirosina, L-fenilalanina y bilirrubina Pang et al., (2021).

Tabla 3.2 Estudios que usan compuestos individuales como biomarcadores

Autor	Muestra	Metabolitos	AUC individual	AUC grupal
Thomas et al., (2020)	Suero	Triptófano	0,965	-
		quinurenina	0,953	-
Fraser et al., (2020),	Plasma	arginina/quinurenina	0,98	-
		Creatinina	1	-
		creatinina/arginina	1	-
Barberis et al., (2020)	Plasma	fosfatidilcolina 14:0 22:6	0,96	0,97
		fosfatidilcolina 16:1 22:6	0,97	
		fosfatidiletanolamina 18:1 20:4	0,94	
		ácido araquidónico	0,99	1
		ácido oleico	0,98	
		glicerofosfoetanolaminas PE (O-18: 2_20: 4)	0,92	
		glicerofosfoetanolaminas PE (O-16: 1_18: 2)	0,92	0,95
		ácido 2-hidroxi-3-metilbutírico	0,86	
		ácido 2,3,4-trihidroxibutírico	0,79	
		3- ácido hidroxiiisovalérico	0,79	-
		ácido palmítico	0,78	-
		ácido L-piroglutámico	0,75	-
		ácido 2-hidroxibutírico	0,75	-
		ácido butanodioico	0,72	-
		galactopiranososa	0,72	-
ácido mirístico	0,70	-		
ácido heptanoico	0,67	-		

Tabla 3.3 Estudios que usan múltiples compuestos como biomarcadores

Autor	Muestra	Biomarcadores	AUC
Song et al., 2020	Plasma	10 metabolitos: <ul style="list-style-type: none"> • Esfingosina-1-fosfato d18:1 • Esfingomielina d18:1/18:1 • Triacilglicerol 60:3(18:1) • Ácido lisofosfatídico 18:1, • Biliverdina • Triacilglicerol 48:1(18:0) • Diacilglicerol 34:1(16:1/18:0) • Gangliósido de monosialodihexosilo d18:1/25:0 • Lisofosfatidilcolina 18:1 • 5-hidroxi-L-triptófano 	0.975
Shen et al., (2020)	Suero	22 proteínas y 7 metabolitos: <ul style="list-style-type: none"> • Producto de degradación de bilirrubina • quinurenina • Ácido tauroquenodesoxicólico • N-palmitoil-esfingosina • Tiroxina • N,N-dimetil-pro-pro • Glucuronato 	0,957
De Silva et al., (2020)	Hisopos mixtos (NP+OP)	11 metabolitos <ul style="list-style-type: none"> • Ácido aminooxiacético • Hidroxietilmetilsulfuroa • 3-hidroxipiridinea • N-Pyrrylcarbinola • Bencilamina • Ácido 3-hidroxipicolínico • Glicerol-3-fosfato + 2Ha • Acido palmítico • Linoleamide + Oa • Acido araquidónico + 2Ha • LPE (0:0/20:2) + OOHa 	93.3% correlación con la clasificación PCR
Grassin-Delye S et al., 2020	Aliento exhalado	Modelo completo Modelo con los 4 metabolitos más destacados: <ul style="list-style-type: none"> • 4 metabolitos metilpent-2-enal • 2,4-octadieno • 1-cloroheptano • nonanal. 	0,94-0,96* 0,89-0,95*
Blasco et al., (2020)	plasma	<ul style="list-style-type: none"> • Citosina • L-isoleucina • Ácido indol-3-acético • 1-NH₂ ciclopropano-1-carboxilato de etilo • Urato • L-asparagina • Leucina • 2-aminofenol • Cortisol • Xantina 	0.879

*Cada modelo de clasificación empleo tres algoritmos de aprendizaje automático, resultando en tres curvas ROC cuyos AUC se muestran en forma de rango.

3.2 Alteraciones globales

Se ha evidenciado que los pacientes con COVID-19 presentan perfiles clínicos y composiciones metabólicas que dependen de la gravedad de la enfermedad. La comparación entre pacientes sanos y leves, evidenció que la mayoría de las moléculas implicadas en el metabolismo de aminoácidos, nucleótidos y carbohidratos aumentan. Mientras que los lípidos generalmente disminuyen. Por otro lado, las transiciones leves a moderadas y moderadas a severas fueron similares y evidenciaron una preferencia marcada hacia la disminución de lípidos y aminoácidos. En este trabajo se observó que los casos leves y moderados difieren, mientras que los casos moderados y severos presentan patrones similares. Esta evidencia indica un entorno pro-inflamatorio estresado que puede estar acompañado de la disminución de recursos metabólicos y signos de disfunción hepática (Su et al., 2020).

3.3 Rutas metabólicas alteradas

Pang et al., (2021) realizaron un meta-análisis integral que resultó en la selección de 7 conjuntos de datos. A partir de esta información se identificaron 30 vías metabólicas alteradas entre pacientes COVID-19 positivos y controles sanos. Las 5 vías principales corresponden al metabolismo de las porfirinas; degradación de valina, leucina e isoleucina; metabolismo del ácido araquidónico, biosíntesis de ácidos grasos insaturados; metabolismo de amino azúcares y nucleótido azúcares.

Al analizar las alteraciones con respecto a la gravedad de la enfermedad, se identificaron seis principales rutas metabólicas alteradas entre pacientes leves/moderados y graves. Las cuales corresponden en su mayoría a aminoácidos y son: glicina, serina y treonina; glioxilato y dicarboxilato; beta alanina; propanoato; cisteína y metionina; purina. Finalmente las alteraciones metabólicas entre pacientes graves y muertes se redujeron al estudio de dos bases de datos, identificando en uno cinco vías metabólicas enriquecidas (biosíntesis de ácidos biliares primarios; metabolismo de D-glutamina y D-glutamato; biosíntesis de esteroides; biosíntesis de ubiquinona y otras terpenoides-

quinonas; metabolismo de alanina, aspartato y glutamato) y en el otro tres (biosíntesis de arginina; metabolismo de la tirosina; biosíntesis de pantotenato y coenzima A (CoA))

3.4 Alteraciones a largo plazo

En la actualidad aún es muy pronto para establecer los efectos a largo plazo de la infección por SARS-CoV-2. No obstante, un estudio de (Wu et al., 2017) analizó estos efectos en pacientes recuperados de SARS que habían recibido un tratamiento con metilprenidoloma. Este trabajo evaluó a los pacientes 12 años después de la infección y determinó varios trastornos metabólicos séricos. Las desregulaciones predominantes correspondieron a los niveles de fosfatidilinositol (IP), lisofosfatidilinositol (LPI), ácidos grasos libres (FFA) y lisofosfatidilcolina (LPC). De manera que LPI e IP estuvieron notablemente regulados a la alza en comparación con los demás metabolitos. Por ende este trabajo evidencia las consecuencias de un tratamiento específico y su relación con la metabolómica. Además de que respalda la aplicación de la metabolómica en muestras de saliva para estudios a largo plazo.

3.5 Aplicación de la herramienta

La aplicación de la herramienta se describió en cinco pasos (Figura 3.2). De manera que inicia con la identificación del paciente y concluye con la entrega de resultados. Los cuales son obtenidos en base al análisis de biomarcadores metabolómicos para el diagnóstico y pronóstico. Aunque no está incluido en el diagrama, se consideró el transporte de muestras como un proceso importante. Para ello se debe seguir el sistema triple empaque y demás medidas descritas por la OMS, (2019).



Figura 3.2 Diagrama general de procesos

Es importante mencionar que este diagrama de procesos puede ser modificado de acuerdo a las necesidades del paciente. De manera que la toma de muestras puede ser llevada a cabo en un centro autorizado, campañas a terreno o mediante el envío de un kit. El cual contenga la documentación requerida por el laboratorio, instrucciones de uso y un recipiente adecuado para la auto-colecta y transporte de muestras. Estas modificaciones fueron consideradas gracias a las ventajas de las muestras de saliva, ya que su colecta corresponde a un método no invasivo que no requiere personal especializado.

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En este proyecto se ha desarrollado el diseño de una herramienta diagnóstica mediante el uso de la metabolómica para la detección y seguimiento clínico de la infección por SARS-CoV-2.

Conclusiones

- De manera similar a las técnicas descritas en la literatura, MALDI-TOF MS tiene potencial para determinar metabolitos cuyos niveles se ven alterados debido a la infección por SARS-CoV-2.
- Se propone el uso de la metabolómica mediante MALDI-TOF MS para la detección de biomarcadores en muestras de saliva de pacientes infectados por SARS-CoV-2.

Recomendaciones

- Tener en cuenta que el presente trabajo consolida el conocimiento actual y que los artículos analizados emplean diferentes metodologías en cuanto a la técnica de espectrometría de masas, muestra biológica utilizada, grupos de estudio, entre otros. Lo cual podría ocasionar diferencias al comparar estos resultados con trabajos futuros.
- Para estudios que realicen el componente experimental, se recomienda emplear grupos de estudios que representen los diferentes grados de la enfermedad. Además de un grupo control (pacientes sanos) y un grupo COVID-19 negativo UCI que posea características clínicas similares a pacientes COVID-19 positivo en UCI. Esto permitirá evaluar las concentraciones de los metabolitos en

diferentes etapas de la enfermedad y tener una visión más clara de las variaciones específicas para esta condición.

- Dado que algunos metabolitos pueden degradarse o evaporarse con facilidad se recomienda prestar mucha atención a la integridad de las muestras, manteniendo las condiciones de temperatura especificadas y realizando el análisis con la mayor prontitud posible.
- Prestar especial atención a condiciones relativas al paciente tales como alimentación, enfermedades subyacentes y medicamentos. Ya que los mismos pueden alterar los perfiles metabolómicos ocasionando interpretaciones erróneas.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahsan, W., Alhazmi, H. A., Patel, K. S., Mangla, B., Al Bratty, M., Javed, S., Najmi, A., Sultan, M. H., Makeen, H. A., Khalid, A., Mohan, S., Taha, M. M. E., & Sultana, S. (2020). Recent Advancements in the Diagnosis, Prevention, and Prospective Drug Therapy of COVID-19. In *Frontiers in Public Health*. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.00384>
- Alonso, A., Marsal, S., & Julià, A. (2015). Analytical methods in untargeted metabolomics: State of the art in 2015. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00023>
- Barberis, E., Timo, S., Amede, E., Vanella, V. V., Puricelli, C., Cappellano, G., Raineri, D., Cittone, M. G., Rizzi, E., Pedrinelli, A. R., Vassia, V., Casciaro, F. G., Priora, S., Nerici, I., Galbiati, A., Hayden, E., Falasca, M., Vaschetto, R., Sainaghi, P. P., ... Manfredi, M. (2020). Large-scale plasma analysis revealed new mechanisms and molecules associated with the host response to sars-cov-2. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms21228623>
- BLIGH, E. G., & DYER, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Califf, R. M. (2018). Biomarker definitions and their applications. *Experimental Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.1177/1535370217750088>
- Cascella, M., Rajnik, M., Cuomo, A., Dulebohn, S. C., & Di Napoli, R. (2020). Features, Evaluation and Treatment Coronavirus (COVID-19). In *StatPearls*.
- Cordeiro, F. B., Cataldi, T. R., do Vale Teixeira da Costa, L., de Souza, B. Z., Montani, D. A., Fraietta, R., Labate, C. A., Cedenho, A. P., & Lo Turco, E. G. (2017). Metabolomic profiling in follicular fluid of patients with infertility-related deep endometriosis. *Metabolomics*. <https://doi.org/10.1007/s11306-017-1262-3>
- De Silva, I. W., Nayek, S., Singh, V., Reddy, J., Granger, J. K., & Verbeck, G. F. (2020). Paper spray mass spectrometry utilizing Teslin® substrate for rapid detection of lipid metabolite changes during COVID-19 infection. *Analyst*. <https://doi.org/10.1039/d0an01074j>
- Debnath, S., Barnaby, D. P., Coppa, K., Makhnevich, A., Kim, E. J., Chatterjee, S., Tóth,

- V., Levy, T. J., Paradis, M. D., Cohen, S. L., Hirsch, J. S., Zanos, T. P., & Northwell COVID-19 Research Consortium. (2020). Machine learning to assist clinical decision-making during the COVID-19 pandemic. *Bioelectronic Medicine*. <https://doi.org/10.1186/s42234-020-00050-8>
- Esakandari, H., Nabi-afjadi, M., Fakkari-afjadi, J., Farahmandian, N., Miresmaeili, S., & Bahreini, E. (2020). *A comprehensive review of COVID-19 characteristics*. 2, 1–10.
- FDA-NIH Biomarker Working Group. (2016). BEST (Biomarkers , EndpointS , and other Tools) Resource [Internet]. In *Updated, September 25*.
- Fraser, D. D., Slessarev, M., Martin, C. M., Daley, M., Patel, M. A., Miller, M. R., Patterson, E. K., O’Gorman, D. B., Gill, S. E., Wishart, D. S., Mandal, R., & Cepinskas, G. (2020). Metabolomics Profiling of Critically Ill Coronavirus Disease 2019 Patients: Identification of Diagnostic and Prognostic Biomarkers. *Critical Care Explorations*. <https://doi.org/10.1097/cce.0000000000000272>
- Glen, S. (9 de Marzo de 2019). *Datasciencecentral*. Obtenido de <https://www.datasciencecentral.com/profiles/blogs/roc-curve-explained-in-one-picture>
- Gorrochategui, E., Jaumot, J., Lacorte, S., & Tauler, R. (2016). Data analysis strategies for targeted and untargeted LC-MS metabolomic studies: Overview and workflow. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.07.004>
- Henson, B. S., & Wong, D. T. (2010). Collection, storage, and processing of saliva samples for downstream molecular applications. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-820-1_2
- Hou, T. Y., Chiang-Ni, C., & Teng, S. H. (2019). Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. In *Journal of Food and Drug Analysis*. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2019.01.001>
- Lemos, J., Pizzol, D., Pousada, V., Reis, A. J., Vianna, J., Ramis, I., Groll, A. Von, & Almeida, P. (2020). *Mini Review Laboratory diagnosis for Covid-19 : A mini-review*. August, 1–5.
- Mahmud, I., & Garrett, T. J. (2020). Mass Spectrometry Techniques in Emerging Pathogens Studies: COVID-19 Perspectives. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. <https://doi.org/10.1021/jasms.0c00238>
- Mandrekar, J. N. (2010). Receiver operating characteristic curve in diagnostic test

- assessment. *Journal of Thoracic Oncology*.
<https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181ec173d>
- McRae, M. P., Simmons, G. W., Christodoulides, N. J., Lu, Z., Kang, S. K., Fenyo, D., Alcorn, T., Dapkins, I. P., Sharif, I., Vurmaz, D., Modak, S. S., Srinivasan, K., Warhadpande, S., Shrivastav, R., & McDevitt, J. T. (2020). Clinical decision support tool and rapid point-of-care platform for determining disease severity in patients with COVID-19. *Lab on a Chip*. <https://doi.org/10.1039/d0lc00373e>
- OMS. (2019). Guía sobre la reglamentación relativa al transporte de sustancias infecciosas 2019–2020. Ginebra, Suiza.
- Pang, Z., Zhou, G., Chong, J., & Xia, J. (2021). Comprehensive Meta-Analysis of COVID-19 Global Metabolomics Datasets. *Metabolites*.
<https://doi.org/10.3390/metabo11010044>
- Peeri, N. C., Shrestha, N., Rahman, M. S., Zaki, R., Tan, Z., Bibi, S., Baghbanzadeh, M., Aghamohammadi, N., Zhang, W., & Haque, U. (2020). The SARS, MERS and novel coronavirus (COVID-19) epidemics, the newest and biggest global health threats: what lessons have we learned? *International Journal of Epidemiology*, 49(3), 717–726. <https://doi.org/10.1093/ije/dyaa033>
- Sapkota, D., Sølrand, T. M., Galtung, H. K., Sand, L. P., Giannecchini, S., To, K. K. W., Mendes-Correa, M. C., Giglio, D., Hasséus, B., & Braz-Silva, P. H. (2020). COVID-19 salivary signature: diagnostic and research opportunities. *Journal of Clinical Pathology*. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2020-206834>
- Shen, B., Yi, X., Sun, Y., Bi, X., Du, J., Zhang, C., Quan, S., Zhang, F., Sun, R., Qian, L., Ge, W., Liu, W., Liang, S., Chen, H., Zhang, Y., Li, J., Xu, J., He, Z., Chen, B., ... Guo, T. (2020). Proteomic and Metabolomic Characterization of COVID-19 Patient Sera. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.032>
- Song, J. W., Lam, S. M., Fan, X., Cao, W. J., Wang, S. Y., Tian, H., Chua, G. H., Zhang, C., Meng, F. P., Xu, Z., Fu, J. L., Huang, L., Xia, P., Yang, T., Zhang, S., Li, B., Jiang, T. J., Wang, R., Wang, Z., ... Shui, G. (2020). Omics-Driven Systems Interrogation of Metabolic Dysregulation in COVID-19 Pathogenesis. *Cell Metabolism*. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.06.016>
- Struwe, W., Emmott, E., Bailey, M., Sharon, M., Sinz, A., Corrales, F. J., Thalassinou, K., Braybrook, J., Mills, C., Barran, P., & C-19 M. C. (2020). No Title. *The COVID-19*

- MS Coalition-Accelerating Diagnostics, Prognostics, and Treatment.*, 1761–1762.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31211-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31211-3)
- Su, Y., Chen, D., Yuan, D., Lausted, C., Choi, J., Dai, C. L., Voillet, V., Duvvuri, V. R., Scherler, K., Troisch, P., Baloni, P., Qin, G., Smith, B., Kornilov, S. A., Rostomily, C., Xu, A., Li, J., Dong, S., Rothchild, A., ... Heath, J. R. (2020). Multi-Omics Resolves a Sharp Disease-State Shift between Mild and Moderate COVID-19. *Cell*.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.10.037>
- Thomas, T., Stefanoni, D., Reisz, J., Nemkov, T., Bertolone, L., Francis, R., Hudson, K., Zimring, J., Hansen, K., Hod, E., Spitalnik, S., & D'Alessandro, A. (2020). COVID-19 infection results in alterations of the kynurenine pathway and fatty acid metabolism that correlate with IL-6 levels and renal status. *MedRxiv: The Preprint Server for Health Sciences*. <https://doi.org/10.1101/2020.05.14.20102491>
- Triba, M. N., Le Moyec, L., Amathieu, R., Goossens, C., Bouchemal, N., Nahon, P., Rutledge, D. N., & Savarin, P. (2015). PLS/OPLS models in metabolomics: The impact of permutation of dataset rows on the K-fold cross-validation quality parameters. In *Molecular BioSystems*. <https://doi.org/10.1039/c4mb00414k>
- WHO. (2 de Febrero de 2021). *World Health Organization*. Obtenido de <https://covid19.who.int/>
- Wu, Q., Zhou, L., Sun, X., Yan, Z., Hu, C., Wu, J., Xu, L., Li, X., Liu, H., Yin, P., Li, K., Zhao, J., Li, Y., Wang, X., Li, Y., Zhang, Q., Xu, G., & Chen, H. (2017). Altered Lipid Metabolism in Recovered SARS Patients Twelve Years after Infection. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09536-z>
- Younes, N., Al-Sadeq, D. W., AL-Jighefee, H., Younes, S., Al-Jamal, O., Daas, H. I., Yassine, H. M., & Nasrallah, G. K. (2020). Challenges in laboratory diagnosis of the novel coronavirus SARS-CoV-2. *Viruses*, 12(6), 1–27.
<https://doi.org/10.3390/v12060582>
- Zhu, N., & Wong, P. K. (2020). Advances in Viral Diagnostic Technologies for Combating COVID-19 and Future Pandemics. In *SLAS Technology*.
<https://doi.org/10.1177/2472630320953798>

