

Escuela Superior Politécnica del Litoral

Facultad de Ciencias de la Vida

Análisis metabolómico del suero de niños infectados por arbovirosis: desarrollo
de diagnóstico diferencial por LC-MS

VIDA-409

Proyecto Integrador

Previo la obtención del Título de:

Biólogo

Presentado por:

Giuliana Camila Ramírez Ramos

Guayaquil - Ecuador

Año: 2025

Dedicatoria

Dedico este logro a mis papis, los JJR², a mis ñañitas, a mis abuelitos, a mi Leisi y a todos mis amigos. Ustedes han compartido sus luchas y esperanzas conmigo, lo que es un acto del amor más noble, y siempre han estado ahí cuando necesitaba guía, cariño y consejo. Estos años, he podido crecer como profesional y como persona, y espero que podamos seguir acompañándonos en las etapas que vengan.

Y dedico también este trabajo a la musa de los biólogos: a la vida; que se extiende a pesar de las fronteras, en muchas expresiones. Es un grato trabajo tratar de entenderla, desde la ciencia, con la ilusión de los niños, cada descubrimiento reavivando la entrega a nuestra profesión.

Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento a mi tutora, Fernanda Bertuccez Cordeiro, quién depositó su confianza en mi desde el primer día que llegué tocando a la puerta de su oficina.

Agradezco a Noroska Gabriela Salazar Mogollón, PhD, y a la IKIAM por hacer posible esta investigación.

Tomo este espacio para agradecer también al que en su momento fue el Laboratorio para Investigaciones Biomédicas, donde pude nutrirme de experiencia.

Y agradezco a todos los profesores que conformaron el cuerpo docente a lo largo de la carrera, por su apertura y voluntad de enseñar.

Declaración Expresa

Yo, Giuliana Camila Ramírez Ramos, acuerdo y reconozco que:

La titularidad de los derechos patrimoniales de autor (derechos de autor) del proyecto de graduación corresponderá al autor, 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.

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 durante el desarrollo del proyecto de graduación, pertenecerán de forma total, exclusiva e indivisible a la ESPOL, sin perjuicio del porcentaje que me corresponda de los beneficios económicos que la ESPOL reciba por la explotación de mi innovación, de ser el caso.

En los casos donde la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) de la ESPOL comunique al autor 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, 20 de mayo del 2025.



Giuliana Camila Ramírez Ramos

Evaluadores

Diego Arturo Gallardo Polit

Profesor de Materia

Fernanda Bertuccez Cordeiro

Tutor de proyecto

RESUMEN

Para la población pediátrica de la ciudad de Guayaquil, el diagnóstico de dengue, zika y chikunguña constituye un reto por la similitud de síntomas y el alto costo de las pruebas actuales. Como alternativa, se planteó la caracterización de perfiles metabolómicos séricos mediante LC-MS para buscar patrones que permitieran distinguir entre infecciones. Se analizaron muestras de suero de 66 niños guayaquileños con infección confirmada por RT-PCR (25 DENV, 8 ZIKV, 17 CHIKV) y controles febriles (n=16), aplicando análisis estadístico multivariado. Se seleccionó un panel de 15 metabolitos relevantes, de los cuales 9 fueron identificados como lípidos (esfingolípidos, glicerolípidos, esteroides y ácidos grasos). La validación mostró un poder discriminatorio elevado para dengue (AUC=0.867) y moderado para diferenciar pacientes infectados de controles (AUC=0.781), mientras que la separación entre zika (AUC=0.158) y chikunguña (AUC=0.542) resultó insuficiente. Estos resultados sugieren que la metabolómica puede aportar un primer marco para diseñar herramientas diagnósticas rápidas y de menor costo, con relevancia particular en contextos de salud pública donde el acceso a técnicas moleculares sigue siendo limitado.

Palabras Clave: metabolómica clínica, LC-MS, biomarcadores pediátricos, diagnóstico accesible

ABSTRACT

For children in Guayaquil, the diagnosis of dengue, Zika, and chikungunya poses a major challenge due to overlapping symptoms and the high cost of current tests. As an alternative, serum metabolomic profiling using LC-MS was applied to search for patterns capable of distinguishing between infections. Serum samples from 66 children from Guayaquil with RT-PCR–confirmed infection (25 DENV, 8 ZIKV, 17 CHIKV) and febrile controls (n=16) were analyzed through multivariate statistical methods. A panel of 15 relevant metabolites was selected, nine of which were identified as lipids (sphingolipids, glycerolipids, sterols, and fatty acids). Validation showed strong discriminatory power for dengue (AUC=0.867) and moderate performance in differentiating infected patients from controls (AUC=0.781), while separation for Zika (AUC=0.158) and chikungunya (AUC=0.542) was insufficient. These findings suggest that metabolomics may provide an initial framework for developing rapid and lower-cost diagnostic tools, with particular relevance in public health contexts where access to molecular techniques remains limited.

Keywords: *clinical metabolomics, LC-MS, pediatric biomarkers, accessible diagnostics*

:

Índice general

Índice general	iii
Abreviaturas.....	v
Simbología	vi
Capítulo 1.....	1
<i>1.1 Introducción.....</i>	<i>2</i>
<i>1.2 Descripción del Problema</i>	<i>2</i>
<i>1.3 Justificación del Problema</i>	<i>4</i>
<i>1.4 Objetivos</i>	<i>4</i>
<i>1.4.1 Objetivo general.....</i>	<i>4</i>
<i>1.4.2 Objetivos específicos.....</i>	<i>5</i>
<i>1.5 Marco teórico.....</i>	<i>5</i>
<i>1.5.1 Agente etiológico y manifestaciones clínicas de DENV, ZIKV y CHIKV.....</i>	<i>5</i>
<i>1.5.2 Técnicas de laboratorio estándar para el diagnóstico de arbovirus por viremia</i>	<i>7</i>
<i>1.5.3 Enfoque metabolómico aplicado a la biomedicina.....</i>	<i>9</i>
<i>1.5.4 La técnica LC-MS</i>	<i>10</i>
Capítulo 2.....	13
<i>2. Metodología.</i>	<i>14</i>
2.1 Selección de participantes.....	14
2.2 Colección, preparación y procesamiento de muestras para extracción de metabolitos	14
2.3 Análisis metabolómico.....	15
2.4 Análisis estadístico.....	19
2.5 Identificación y análisis de los potenciales biomarcadores	20
Capítulo 3.....	21
3. Resultados y análisis	22

3.1 Controles de calidad.....	22
3.2 Normalización de los datos.....	23
3.3 Panel de metabolitos.....	24
3.3.1 Agrupación de los metabolitos por el modelo PCA.....	24
3.3.2 Agrupación de los metabolitos por el modelo PLSDA	26
3.3.3 Selección del panel de metabolitos de interés	29
3.3.4 Validación del potencial diagnóstico del panel de metabolitos	30
3.4 Identificación de metabolitos.....	33
3.4.1 Breve contexto biológico de los metabolitos identificados	35
4.1 Conclusiones y recomendaciones.....	38
4.1.1 Conclusiones.....	38
4.1.2 Recomendaciones.....	39
Referencias.....	41
Apéndices	50

Abreviaturas

AUC	Área Bajo la Curva
CHIKV	Virus del Chikunguña
DENV	Virus del Dengue
KEGG	Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto
LC-MS	Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas
m/z	Relación Masa-Carga
NBI	Necesidades Básicas Insatisfechas
PCA	Análisis de Componentes Principales
PLS-DA	Análisis Discriminante por Mínimos Cuadrados Parciales
QC	Control de Calidad
ROC	Curva Característica de Operación del Receptor
RT	Tiempo de Retención
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa
UPLC	Cromatografía Líquida de Ultra Rendimiento
VIP	Valor de Importancia en la Proyección
ZIKV	Virus del Zika

Simbología

%	Porcentaje
°C	Grado Celsius
μL	Microlitro
Da	Dalton
g	Gravedad (unidad de fuerza centrífuga)
kV	Kilovoltio
<i>m/z</i>	Relación masa-carga
min	Minuto
×g	Fuerza gravitacional relativa (en centrifugación)

Índice de figuras

Figura 1	23
Figura 2	25
Figura 3	26
Figura 4	27
Figura 5	28
Figura 6	29
Figura 7	30
Figura 8	32

Índice de tablas

Tabla 1	8
Tabla 2	17
Tabla 3	34

Capítulo 1

1.1 Introducción

Los virus del dengue (DENV), zika (ZIKV) y chikunguña (CHIKV) son arbovirus transmitidos por mosquitos de la familia Culicidae. Su distribución geográfica está directamente condicionada por las preferencias de hábitat de estos vectores, que favorecen climas cálidos y regiones tropicales (p.ej. las Américas, África y las zonas sur de Asia) (Romanello et al., 2021). El DENV es un arbovirus endémico en América Latina y el Caribe, mientras que el ZIKV y CHIKV han mostrado una dinámica de transmisión asociada a arbovirus reemergentes (Hussain-Alkhateeb et al., 2021).

1.2 Descripción del Problema

En las dos décadas pasadas, en América del Sur, ha incrementado el número de contagios, secuelas a largo plazo y/o mortalidad por DENV, ZIKV y CHIKV, entre pacientes menores a dieciocho años (Santos et al., 2023); en adición, los niños han demostrado ser un grupo particularmente vulnerable durante las epidemias de DENV, ZIKV y CHIKV (Christie et al., 2023). El aumento de la densidad poblacional (p.ej. tugurización en grandes ciudades) y/o pertenecer a un estrato socioeconómico bajo (p.ej. inhabilidad de acceder a sistemas de salud) son posibles factores vinculados al aumento de contagios y al agravamiento de cuadros sintomatológicos (Power et al., 2022; Whiteman et al., 2020).

Ecuador es un país latinoamericano de 283,561 km² atravesado por la cordillera de los Andes, que divide el territorio en tres regiones—costa, sierra y oriente—, sin embargo, los mosquitos transmisores de DENV, ZIKV y CHIKV se encuentran solo en altitudes bajas (0-1650 msnm). Las provincias costeras —Esmeraldas, Manabí, Santa Elena, Guayas, Los Ríos y El Oro— presentan condiciones especialmente propicias para la reproducción de estos vectores debido a su temporada lluviosa de noviembre a mayo, que proporciona los criaderos

húmedos necesarios. Esta estacionalidad coincide con el incremento de contagios de los tres arbovirus entre marzo y julio, estableciendo la costa ecuatoriana como zona endémica crítica (Katzelnick et al., 2024).

En Guayaquil, durante el 2022, el 14,32 % de los niños -de 0 a 18 años- vivían en condiciones de pobreza según el índice de Necesidades Básicas Insatisfechas (INEC, 2022). Este contexto de vulnerabilidad socioeconómica crea una barrera adicional para el acceso oportuno a diagnósticos precisos, agravando el riesgo clínico en una población pediátrica ya expuesta a alta transmisión de arbovirus.

La diferenciación clínica entre dengue, zika y chikunguña es un desafío debido a la superposición de sus síntomas principales: fiebre, cefalea, exantema y dolor articular (Soni et al., 2023). Esta similitud hace indispensable el uso de diagnóstico de laboratorio (Collins & Pelc, 2023). Las técnicas actuales se basan en la detección del virus durante la fase de viremia mediante RT-PCR, o en la detección de anticuerpos mediante pruebas serológicas (Piantadosi & Kanjilal, 2020). Sin embargo, estos métodos pueden presentar limitaciones: la RT-PCR es útil solo en una ventana temporal breve, mientras que las pruebas serológicas pueden mostrar reactividad cruzada entre virus emparentados, comprometiendo su especificidad (Gomes da Silva et al., 2023; Chan et al., 2022).

Una propuesta novedosa como herramienta principal de diagnóstico es el análisis metabolómico del suero de los pacientes (Costa et al., 2021). Los metabolitos son moléculas que permiten observar alteraciones en la homeostasis de un organismo, lo que les convierte en potenciales biomarcadores para enfermedades (Mishra et al., 2022). Particularmente, la metabolómica no dirigida ha permitido identificar alteraciones características de los metabolitos de un paciente en respuesta a la infección por un arbovirus en particular (Cui et al., 2013; Shrinet et al., 2016). Este tipo de análisis emplea espectrometría de masas (que puede estar acoplada a diferentes formas de cromatografía, según la necesidad analítica)

(Nunes & Canuto, 2020), destacándose la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS) por su amplia cobertura y altas sensibilidad y especificidad (Zhang et al., 2024; Skogvold et al., 2025).

1.3 Justificación del Problema

La diferenciación precisa entre dengue, zika y chikunguña en infantes es crítica debido a la sintomatología superpuesta, el riesgo de complicaciones graves específicas de cada virus y la particular vulnerabilidad socioeconómica de la población pediátrica en ciudades endémicas como Guayaquil. Si bien las pruebas diagnósticas virales existentes-RT-PCR y las pruebas serológicas- son altamente precisas, su alto costo y limitada disponibilidad en el sistema público de salud los vuelve económicamente prohibitivos para una gran parte de la población, retrasando el acceso a un manejo clínico oportuno. En el ambiente hospitalario, una herramienta metabolómica permite realizar una triaje de los pacientes con respecto a su diagnóstico y proceder con el tratamiento adecuado de forma más rápida

El estudio de perfiles metabolómicos diferenciales en suero de niños y adolescentes infectados por arbovirosis permite desarrollar un enfoque diagnóstico mediante LC-MS. Con este enfoque es posible identificar biomarcadores específicos (y/o paneles de biomarcadores) que ofrezcan la posibilidad de una herramienta diagnóstica eficiente y adaptada al contexto epidemiológico local, mejorando así el pronóstico y tratamiento de los pacientes pediátricos.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Determinar perfiles metabolómicos en el suero de infantes infectados por diferentes arbovirosis mediante LC-MS para desarrollo de herramienta diagnóstica diferencial entre dengue, zika y chikunguña.

1.4.2 Objetivos específicos

1. Comparar los perfiles metabólicos del suero de infantes infectados por dengue zika y chikunguña mediante estadística multivariada.
2. Identificar potenciales biomarcadores metabólicos en el suero de infantes con enfermedades arbovirales para el desarrollo de herramientas accesorias.
3. Validar el potencial biomarcador de los metabolitos encontrados mediante análisis de receiver operating characteristic (curva ROC).

1.5 Marco teórico

Se realizó una búsqueda de artículos *open access*, publicados entre 2015-2025, en PubMed y Scispace, para resumir el estado del arte respecto a: a) el agente etiológico y la manifestación clínica de DENV, ZIKV y CHIKV; b) las fortalezas y limitaciones de las técnicas de laboratorio estándar para el diagnóstico de arbovirus por viremia y por serología; y c) el enfoque metabolómico aplicado a biomedicina y la técnica LC-MS.

Las palabras clave para cada búsqueda realizada fueron:

- a) Arboviruses, DENV, ZIKV, CHIKV, vector, clinical manifestation, symptoms.
- b) Arboviruses, DENV, ZIKV, CHIKV, viremia, serological tests, diagnosis.
- c) Metabolomics, metabolic, metabolic profiling, LC-MS.

1.5.1 Agente etiológico y manifestaciones clínicas de DENV, ZIKV y CHIKV

El dengue virus (DENV) y el zika virus (ZIKV) pertenecen a Flaviviridae, mientras que el chikunguña virus (CHIKV) a la familia Togaviridae (Jones et al., 2020). Ambas familias presentan ARN monocatenario de sentido positivo, aunque los flavivirus tienen sus proteínas estructurales en el extremo 5' del genoma (Jung et al., 2022), mientras que los

togavirus las tienen en el extremo 3' (Ryu, 2017). Los culícidos son vectores principales de arbovirus de las familias Flaviviridae y Togaviridae, cuyos hospedadores vertebrados son primates y humanos (Peydró et al., 2023).

Tras la ingestión de sangre infectada, los virus colonizan inicialmente el epitelio intestinal medio del mosquito (Agarwal et al., 2017). Los arbovirus alcanzan las glándulas salivales en 10-14 días (Vial et al., 2021), siendo inoculados mediante saliva en picaduras posteriores. La aptitud del vector para completar este proceso define su competencia vectorial. En América, *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* son vectores competentes para DENV y ZIKV en la naturaleza, pero únicamente *Aedes aegypti* lo es para CHIKV, lo que lo convierte en el vector dominante para los tres virus (Zardini et al., 2024).

Entre el 2% y hasta más del 25 % de los pacientes permanecen asintomáticos. Sin embargo, aquellos pacientes sintomáticos desarrollan manifestaciones que duran un promedio entre dos a siete días (Adam & Jassoy, 2021). Fiebre, náusea, sarpullido, dolor muscular y/o de articulaciones son síntomas en común para los tres virus durante este periodo. Otros síntomas son vómito, dolor detrás de los ojos, dolor de cabeza, conjuntivitis y mialgia (Soni et al., 2023).

Manifestaciones severas de DENV- cansancio, desasosiego, irritabilidad, dolor del estómago, hematemesis, hematoquecia, epistaxis y gingivorragia -ocurren de veinticuatro a veintiocho horas luego de que cesa la fiebre. Para CHIKV, los pacientes con sintomatología severa presentan mialgia y dolores de articulaciones severos, diez días desde el inicio de la enfermedad, que pueden persistir meses (Evans-Gilbert, 2020). El ZIKV, se asocia a complicaciones neurológicas (p.ej. los síndromes de Guillain-Barré y CZS) (Tsankova et al., 2016) y complicaciones hematológicas (Van Dyne et al., 2019; Zea-Vera & Parra, 2017).

1.5.2 Técnicas de laboratorio estándar para el diagnóstico de arbovirus por viremia

Para la detección de estos virus existen dos tipos de técnicas de laboratorio: las basadas en la presencia del virus en sangre (viremia), y las basadas en la respuesta inmune del hospedero frente al virus. Ambas clases de técnicas requieren la toma de una muestra biológica (sangre o suero) tras la valoración clínica del paciente (Ling et al., 2025)).

La viremia de DENV y CHIKV es alta desde el inicio de la sintomatología, mientras que la de ZIKV es más baja, aunque los tres virus alcanzan su concentración máxima en los primeros dos días tras la aparición de los síntomas (Waggoner et al., 2016; de Arruda et al., 2023; Landry & St George, 2017). Para una detección óptima, el diagnóstico molecular — basado en la detección directa del material genético viral— debe aplicarse durante este período de viremia temprana (primeros 3-7 días) (Piantadosi & Kanjilal, 2020).

Las técnicas serológicas (detección de anticuerpos IgM e IgG) se vuelven la herramienta diagnóstica principal a medida que disminuye la carga viral y se inicia la respuesta inmune. Estas pruebas son especialmente útiles a partir del quinto día de síntomas y son fundamentales para estudios epidemiológicos, por no depender de la presencia del virus en sangre (Chan et al., 2022).

Ambos enfoques son complementarios y su uso paralelo o secuencial permite obtener resultados más precisos que los que cada técnica podría proporcionar por separado (Sena et al., 2024). La Tabla 1 resume las técnicas más aplicadas de ambas clases, sus puntos fuertes y sus limitaciones.

Tabla 1

Resumen de las técnicas de laboratorio estándar más aplicadas para el diagnóstico de infecciones por arbovirus

Tipo	Prueba		Puntos fuertes*	Limitaciones
Serología	ELISA	Captura de IgM (MAC)	Disminución de las tasas de falsos positivos por unión inespecífica de anticuerpos.	Reactividad cruzada con otros virus de la misma familia
			Disminución de las tasas de falsos negativos por competencia con IgG preexistente.	Persistencia de IgM durante >1 año en algunos casos dificulta aplicación
		IgG indirecta	Un aumento de cuatro veces en el título identifica una infección reciente en presencia de IgM preexistente	Reactividad cruzada con otros virus de la misma familia IgG de larga duración de infecciones previas dificulta aplicación
	PRNT	Ensayo de avididad de IgG	Permite diferenciar entre infecciones recientes y pasadas.	No hay pruebas disponibles comercialmente
			Cuantifica los anticuerpos neutralizantes	Requiere personal altamente capacitado
			Altamente específicos	Requiere condiciones de bioseguridad de nivel 3
	IFA		No afectado por antecedentes de infecciones previas	Tiempo de respuesta lento
			Tan sensible como MAC ELISA	Interpretación subjetiva

	MIA	Puede ser altamente multiplexado	No disponible comercialmente
	IHC	Útil para el diagnóstico confirmatorio cuando hay tejido disponible.	Datos limitados sobre sensibilidad y especificidad
Diagnóstico Molecular	qRT-PCR	Alta sensibilidad y especificidad analítica Tiempos de respuesta rápidos Alto rendimiento	Limitado por el corto período de tiempo de replicación viral
	mNGS	No es necesaria ninguna hipótesis previa sobre el patógeno objetivo	Bajo rendimiento Limitado por el corto período de tiempo de replicación viral

Nota. Adaptada de (Piantadosi & Kanjilal, 2020); “*”: En comparación con otras pruebas de diagnóstico del mismo Tipo; MAC-ELISA: Ensayo de inmunoabsorción enzimática de captura de anticuerpos IgM; PRNT: Prueba de reducción de placa de neutralización; IFA: Inmunofluorescencia indirecta; MIA: Microarray de inmunoensayo; IHC: Inmunohistoquímica; qRT-PCR: PCR cuantitativa con transcriptasa inversa; mNGS: Secuenciación metagenómica de próxima generación.

1.5.3 Enfoque metabolómico aplicado a la biomedicina

Los metabolitos—sustratos o productos del metabolismo del huésped—son esenciales para el mantenimiento celular. Su síntesis sigue instrucciones genómicas, pero es modulada por factores externos (ambiente, patógenos) (Qiu et al., 2023). Las concentraciones de los metabolitos impactan el ambiente celular y se regulan homeostáticamente (Johnson et al., 2016). Como biomarcadores, ofrecen una medida cuantificable para identificar alteraciones en la homeostasis de un organismo (Mishra et al., 2022), mostrando cambios significativos en su concentración en respuesta a estímulos externos (Borts, 2019; Aggarwal et al., 2022). Por ello, su observación y análisis puede contribuir a mejorar el diagnóstico y pronóstico de los pacientes (Kumar et al., 2017).

Para poder plantear un estudio de esta índole, se debe contar con grupos individuos infectados con el o los virus de interés (en este caso: DENV, ZIKV y CHIKV), y con un grupo control, típicamente sano (Cui et al., 2017; Năstase et al., 2023). Cada grupo debe tener un número suficiente de participantes que permita compensar la variabilidad individual al identificar metabolitos por muestra (Byers et al., 2019). Cumpliendo esto, la información obtenida permite contrastar el comportamiento de los metabolitos presentes en cada grupo (El-Bacha et al., 2016). Sin embargo, para poder extrapolar a nivel poblacional los posibles biomarcadores metabolómicos encontrados, estos deben ser validados, ya sea en un subgrupo del estudio, pero preferiblemente en cohortes prospectivas independientes (Cui et al., 2018).

Las principales metodologías que se utilizan para su identificación y estudio son la metabolómica basada en espectrometría de masas no dirigida (exploratoria) y la dirigida. La primera tiene como objetivo perfilar todos los metabolitos detectables en una muestra sin conocimiento previo de su identidad, lo que se conoce como perfilado metabólico global (Newsom & McCall, 2018). Los análisis no dirigidos, implementados mediante espectrometría de masas de alta resolución, permiten caracterizar estructuralmente metabolitos y ofrecen una visión imparcial de las redes metabólicas interconectadas, facilitando el descubrimiento de biomarcadores (Zamboni et al., 2015). En este estudio se aplica para explorar biomarcadores que expliquen cómo cambia la regulación de metabolitos en respuesta al DENV, ZIKV y CHIKV.

1.5.4 La técnica LC-MS

La recuperación de metabolitos en estudios exploratorios depende críticamente de los métodos de análisis empleados (Bujak et al., 2015). En metabolómica, se emplean diversas técnicas de separación y detección, siendo, respectivamente, la cromatografía líquida (LC) y la espectrometría de masas (MS) de alta resolución unas de las más utilizadas para el análisis de metabolitos (Schrimpe-Rutledge et al., 2016).

LC contribuye a la separación de moléculas presentes en una muestra de acuerdo con su afinidad por solventes de diferentes polaridades, permitiendo su cuantificación individual. La optimización de columnas y condiciones experimentales incrementa la especificidad para analitos diana según sus propiedades fisicoquímicas en esta técnica. Tras la separación, los metabolitos se detectan y caracterizan mediante MS, que proporciona información detallada sobre el peso molecular y la estructura de los metabolitos, esencial para su identificación y cuantificación (Sahu et al., 2018).

La plataforma de análisis resultante al integrar ambas técnicas es conocida como LC-MS. Ofrece ventajas analíticas fundamentales en metabolómica. Su fase cromatográfica reduce la supresión iónica y separa especies isobáricas, mientras que el detector de masas cuantifica iones positivos y negativos con alta sensibilidad, precisión de masa y poder de resolución (Jacyna et al., 2019). Esta plataforma es idónea para analizar macromoléculas intactas (lípidos, dipéptidos, tripéptidos) y metabolitos de diversa polaridad (polares, semipolares, apolares) sin requerir mejoramiento químico de analitos. La versatilidad se amplía mediante fases estacionarias multifuncionales (fase reversa, intercambio iónico, interacción hidrofílica), que disminuyen la complejidad muestral. Adicionalmente, optimiza la eficiencia de nebulización y evaporación del solvente, consolidándose como herramienta integral para perfiles metabólicos complejos (Bandre et al., 2021).

Pese a estas ventajas, LC-MS es vulnerable a variabilidad inter-muestral e interferencias de fondo (Beger, 2018). Una medida para lidiar con estos factores es implementar procesos de control de calidad (QC) en el análisis metabolómico, lo que se complica en enfoques analíticos no dirigidos (Broadhurst et al., 2018). Se busca que los QC tengan una mezcla de analitos estables, con cobertura de masa completa (m/z 100–800), diversidad química (polaridad/ pK_a) y variabilidad en formación de aductos/fragmentación ionizante (Dmitrenko et al., 2022). Varios autores recomiendan que la implementación

rigurosa de control de calidad (QC) en LC-MS metabolómico emplee sistemáticamente muestras QC agrupadas (pooled) para evaluar objetivamente la calidad de datos en enfoques no dirigidos (Broeckling et al., 2023; Kirwan et al., 2022; Beger et al., 2019).

Capítulo 2

2. Metodología.

Este es un estudio observacional prospectivo de casos y controles que incluyó la participación de menores de 18 años con sospecha clínica de infección arboviral por DENV, ZIKV o CHIKV.

Este estudio recibió la aprobación del comité de ética en investigación en seres humanos del Hospital Luis Vernaza, con número HLV-DOF-CEI-004. Previamente a la toma de muestra de sangre para realización del diagnóstico molecular y del presente estudio, se obtuvo el consentimiento informado de los representantes legales de los menores de edad.

2.1 Selección de participantes

Se seleccionaron pacientes con un rango de edad desde 0 a 18 años, que acudieron a urgencias del Hospital de Niños Doctor Gilbert- en Guayaquil, Ecuador. Fueron incluidos en este estudio los pacientes ingresados durante los primeros cinco días de haber presentado sintomatología congruente con DENV, ZIKV o CHIKV. Específicamente, criterios de inclusión para el estudio fueron la presencia de: fiebre, además de síntomas autos reportados como dolor de cabeza, náusea, erupciones cutáneas, oftalmalgia, vómito, mialgia y/o artralgias. Se aplicó un diagnóstico por RT-PCR a los pacientes que presentaron la anterior sintomatología para poder discriminar a aquellos infectados de DENV (n= 25), de ZIKV (n= 8) y de CHIKV (n= 17). Aquellos que conforman el grupo control (n= 16), fueron pacientes que también presentaron síntomas febriles pero que, al someterse a la prueba RT-PCR, resultaron negativo para la presencia de los virus anteriormente mencionados. En su totalidad, este estudio contó con la participación de 66 individuos.

2.2 Colección, preparación y procesamiento de muestras para extracción de metabolitos

Las muestras de sangre fueron centrifugadas a $14000 \times g$ durante 15 minutos para separación del suero. Cada muestra de suero fue repartida en alícuotas de 250 μL y almacenada a $-80^{\circ}C$ hasta su análisis. Durante el proceso de extracción *per se*, se mantuvieron condiciones idénticas para todas las alícuotas muestrales, así como una temperatura constante de $4^{\circ}C$.

Para la extracción de metabolitos se realizó un protocolo de extracción del tipo líquido-líquido, con un reactivo de extracción que está compuesto de una mezcla de solventes cloroformo: metanol:agua (1:3:1 v:v:v). Todos los solventes utilizados son de grado HPLC. Por cada alícuota, se tomaron 25 µL de suero, a los que se adicionó 1 mL del reactivo de extracción. Cada uno de estos preparados fue llevado a vortex durante treinta segundos, para su homogeneización, y fue centrifugado a 13000 ×g por tres minutos.

De cada extracto, se recolectaron 200 µL de sobrenadante para su análisis por LC-MS. Estos extractos fueron concentrados centrifugándolos al vacío en un speedvac (miVac Duo Concentrator, GeneVac, UK). Después de centrifugados, a cada tubo seco se agregó 50 µL de agua ultrapura con ácido fórmico al 0.1% (Merck KGaA, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Paralelamente, se tomaron 5 µL de cada muestra para conformar pools de control de calidad (QC) representativos de cada grupo: DENV, ZIKV, CHIKV y control.

2.3 Análisis metabolómico

Para el análisis metabolómico se utilizó un cromatógrafo de ultra-eficiencia clase-I de (UPLC) acoplado a un espectrómetro de masas Xevo® G2QTOF de Waters (Waters Corporation, MA, USA). El flujo empleado fue de 0.5 mL/min, y la columna utilizada fue de 1.7 µm de tamaño de partícula, con dimensiones de 100 mm × 2.1 mm de diámetro interno, siendo el modelo C18 ACQUITY UPLC BEH (Waters Corporation, MA, USA).

Para las fases móviles de la cromatografía se emplearon una solución de agua con ácido fórmico al 0.1% (solución A) y acetonitrilo con ácido fórmico al 0.1% (solución B). Al iniciar el análisis cromatográfico, se inyectó un volumen de 10 µL, que en ese punto presentaba un gradiente de elución donde el 80% era de A y el 20% de B. Este gradiente se mantuvo durante un minuto, hasta que comenzó una transición lineal a 50% A y 50 % B, por otro minuto. Subsecuentemente, el gradiente pasó: a 35% A y 65% B, por 2 minutos; a 20% A y 80% B, por 3 minutos; y a 3% A y 97% B por 10 minutos. Se finalizó manteniendo el gradiente en las

condiciones iniciales (80% A y 20% B) por un minuto. Seguido, se condicionó y lavó la columna durante un minuto.

En paralelo, se empleó una fuente de ionización por electrospray para el espectrómetro de masas en modo positivo. Se estableció el modo de escaneo completo para la adquisición de los datos, el voltaje del capilar en 0.5 kV y unas tasas de flujo de cono y de flujo de gas de desolvación de 30 L/h y 900 L/h, respectivamente. En cuanto a la velocidad de escaneo, se usó 1s, abarcando un rango m/z de 100 Da a 1200 Da. En la Tabla 2 se presentan otros parámetros de interés para la construcción del cromatograma iones

En estas condiciones, cada muestra fue analizada por triplicado, siguiendo un orden aleatorio en el bloque de inyecciones. Por otra parte, a lo largo del ingreso de las muestras, se fueron ingresando los QC para su análisis, siendo cada uno inyectado dieciséis veces durante el análisis LC-MS.

Tabla 2*Parámetros para la construcción del cromatograma para el análisis por LC-MS*

Parámetro	Valor/Configuración	Nivel de MS	Tipo de Datos	Parámetros Adicionales	Valores
Método de datos crudos	Detección de masas	1	Centroide		
Nivel de ruido	5.0E1				
Detección de características	Cromatograma ADAP				
Tamaño mínimo de grupo (n° de escaneos)	4				
Umbral de intensidad de grupo	1.2E3				
Intensidad mínima máxima	6.0E3				
Precisión entre escaneos	0.0050 <i>m/z</i>				
Resolución de mínimos locales				Dimensión	Tiempo de retención
Umbral cromatográfico	95%				
Altura absoluta mínima	7.0E3				
Relación mínima pico superior/borde	1.70			Mín. puntos de datos	4

Método de suavizado de picos	Suavizado de pérdidas	Tolerancia de RT	0.03 min
Filtro de isótopos	Agrupador de isótopos ^{13}C		
Isótopo representativo	Más intenso	Tolerancia de m/z	0.002 m/z
Método de alineación	Alineador de unión	Tolerancia de RT	0.1 min
Peso para RT	1		
Peso para m/z	3	Tolerancia de m/z	0.005 m/z
Método de relleno de espacios	Buscador de picos (multihilo)		
Tolerancia de intensidad	50%	Tolerancia de RT	0.1 min
Min. Para puntos de datos	2	Tolerancia de m/z	0.002 m/z

Nota. Parámetros inicialmente propuestos por (Correa, 2025); Cromatograma ADAP: Algoritmo para detección de picos cromatográficos; Tolerancias (RT/m/z): Precisión requerida en tiempo de retención (RT) y relación masa/carga (m/z).

2.4 Análisis estadístico

Se empleó ProteoWizard para la conversión de los datos crudos obtenidos a formato *.mzML, y seguidamente se los procesó con la herramienta MS-DIAL ver. 4.9.221218, siguiendo lo establecido en la Tabla 2. Se decidió tratar los datos procesados una vez más, empleando el paquete “notame”, de R 4.2.2, corrigiendo desfases de análisis entre lotes muestrales. Se exportó la matriz de datos de m/z y tiempo de retención vs. intensidad en formato .txt, como complementario. Se realizó el análisis estadístico multivariado empleando el software open access Metaboanalyst 6.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/>). Desde el software, se comprobó la integridad de los datos. En las opciones de normalización se seleccionó el método “*Auto-scaling*”; esta técnica fue seleccionada por ser la más adecuada para datos crudos obtenidos por LC-MS. Permite comparar variables de diferentes escalas e intensidades, minimizando el impacto de ruido técnico y variaciones experimentales.

En primera instancia, se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) incluyendo los datos de QCs de todos los grupos. Este análisis permite evaluar la reproducibilidad y estabilidad del sistema analítico, ya que los QCs deben agruparse en un clúster compacto; si aparecen dispersos o con un patrón de deriva, indica problemas instrumentales o de procesamiento. Además, sirve para verificar la calidad de la normalización y asegurar que la variabilidad observada en las muestras biológicas no esté dominada por efectos técnicos. Seguido, se analizaron los datos sin los QC's, siguiendo los mismos parámetros de normalización de los datos. Se realizó un PCA para observar la separación de grupos seguido de un análisis discriminante de cuadrados mínimos parciales (PLS-DA), el cual genera un modelo de regresión combinando linealmente las variables originales ingresadas.

Se comprobó la agrupación resultante con un índice de predicción Q^2 (cross validation method: 5-fold CV), generado por el propio modelo PLS-DA; este mismo índice fue empleado para determinar el número de componentes a ser considerados para la clasificación. A

continuación, se determinó los metabolitos de importancia, mediante el valor estimado (VIP) de cada variable para el PLS-DA obtenido.

2.5 Identificación y análisis de los potenciales biomarcadores

A partir del análisis por PLS-DA, se seleccionó un panel de metabolitos como posibles biomarcadores de interés, a través de la gráfica de las variables con importancia para la proyección del modelo de PLS-DA. Estos metabolitos fueron sometidos a un análisis de potencial biomarcador, en el cual se evaluó su sensibilidad y especificidad aplicando el análisis clásico univariado de la curva ROC, se calculó el área bajo la curva (AUC) y se obtuvo el intervalo de confianza CI 95%. Se realizó empleando la herramienta *ROC Tester*, seleccionando la opción “*Class*” y también, uno por uno, cada grupo (DENV, CHIKV, ZIKV y control) junto con la opción “*v.s All Others*”. Se seleccionó manualmente al panel de metabolitos de interés para la curva ROC de cada grupo.

Para la identificación de los metabolitos seleccionados se empleó la base de datos LipidMaps (<https://www.lipidmaps.org/>), que consta de valores de referencia para metabolitos conocidos. En ella se realizó una búsqueda ingresando los valores de los metabolitos, seleccionando “All Positive Ions”, estableciendo una tolerancia de ± 0.05 *m/z* para los resultados disponibles y seleccionando “Even chains only”. Adicionalmente, para realizar la búsqueda se incluyeron todos los grupos de las clases principales disponibles en LipidMaps: “*Fatty Acyls*”, “*Glycerolipids*”, “*Glycerophospholipids*”, “*Sphingolipids*” y “*Sterol Lipids*”.

Adicionalmente, se procedió a obtener las rutas metabólicas en las cuales estos posibles biomarcadores juegan un rol. Para ello, se ingresó a la plataforma Cytoscape (<https://cytoscape.org/>), y se importaron los nombres de las clases principales asociados a los metabolitos, o sus respectivos KEGG ID, en el caso de no obtener resultados de búsqueda con sus clases principales. Por cada grupo de pacientes, se identificó las rutas metabólicas asociadas a los metabolitos presentes en mayor abundancia, dada por el VIP score.

Capítulo 3

3. Resultados y análisis

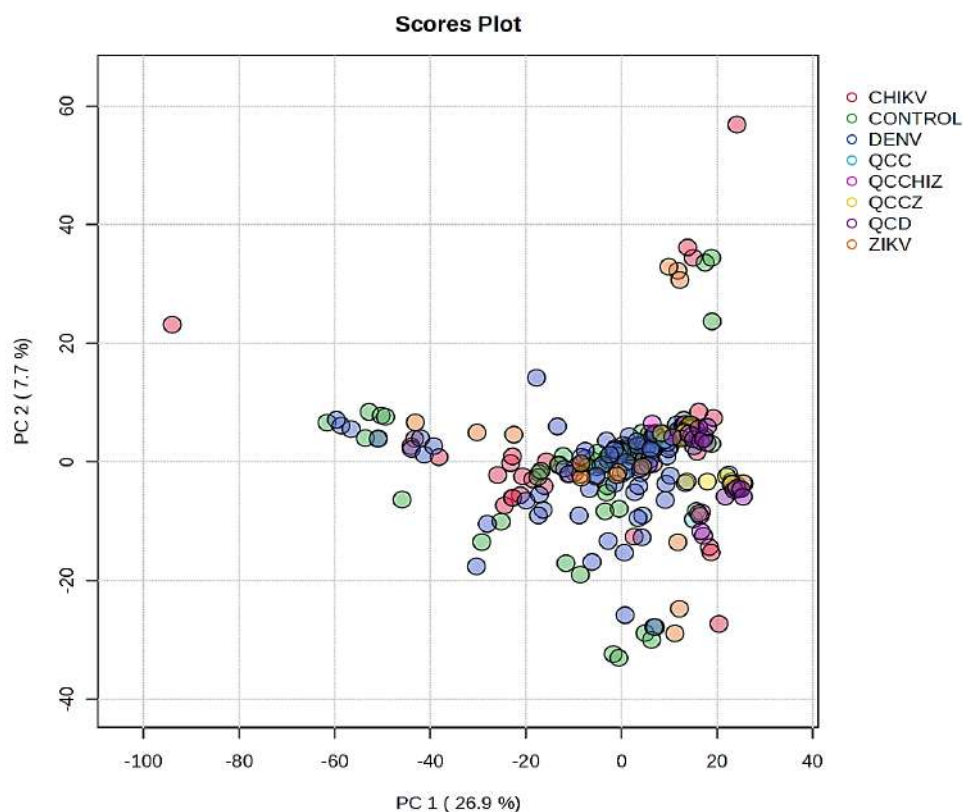
Se realizó un análisis exploratorio del suero de niños (0-18 años) infectados con sintomatología febril, clasificados en cuatro grupos: infectados con DENV (n= 25), infectados con ZIKV (n=8), infectados con CHIKV (n=17) y no infectados con arbovirus (n=16). Se obtuvo el perfil de metabolitos para los cuatro grupos de pacientes pediátricos mediante LC-MS, donde se analizó los espectros de masas de cada muestra, considerando sus grupos respectivos.

3.1 Controles de calidad

La Figura 1 presenta el PCA de las muestras y los QC respectivos para cada grupo de interés del estudio. En este gráfico se visualiza la distribución de los QC. Todos los QCs se encuentran dentro de clústeres formados por metabolitos asociados a los grupos control, DENV, CHIKV y ZIKV. No existe ninguna observación de QC que esté aislada de los clústeres. Esto indica que el procedimiento de obtención de las lecturas de los metabolitos mediante LC-MS (aleatorización del ingreso de las muestras de cada grupo) y la normalización posterior de estos datos fue exitosa (Broadhurst et al., 2018). Las curvas de comportamiento de los datos y los diagramas de caja-bigotes previo y después a la normalización de los datos con los QC, se encuentran en Apéndices (Figura 9).

Figura 1

Visualización de los QCs para los cuatro grupos de pacientes mediante PCA plot



Nota. QCD: QC de DENV, es morado; QCCZ: QC de ZIKV, es amarillo; QCCCHIZ: QC de CHIKV, es rosado claro; y QCC: QC del control, es color celeste.

3.2 Normalización de los datos

Pasando al análisis de las lecturas de los metabolitos (sin los QCs), la normalización de los datos por “*Autoscaling*” se muestra en Apéndices (Figura 10). El rango dinámico de lecturas por LC-MS permite identificar picos para señales de alta intensidad-generalmente relacionada a metabolitos presentes en abundancia- y de poca intensidad. Siendo este un estudio exploratorio, se consideró aplicar “*Autoscaling*” por ser este más efectivo al ecualizar la varianza de todos los metabolitos (Tokareva et al., 2021). De esta forma se buscó garantizar que los metabolitos con señales de pico de menor intensidad tuviesen el mismo peso que las señales de pico de alta intensidad en el posterior análisis multivariado. Sin embargo, “*Autoscaling*” es bastante riguroso con los ruidos en los datos, y puede llegar a, erróneamente, agrupar con estos a lecturas de muy baja intensidad (Gorrochategui et al., 2016).

Se puede observar que los diagramas de caja bigotes en *Features View* (Figura 10a) presentan un rango inter-cuartil de tamaño similar entre sí, lo que implica que tienen la misma desviación estándar. En *Samples Views* (Figura 10b) también se puede observar que, en general, los diagramas de caja bigotes también presentan un rango inter-cuartil similar entre sí, lo que apunta a que hubo una homogeneización de los datos. En conjunto, la Figura 10 parece indicar que la normalización permitió garantizar que no hubiera dominancia en las señales intensas.

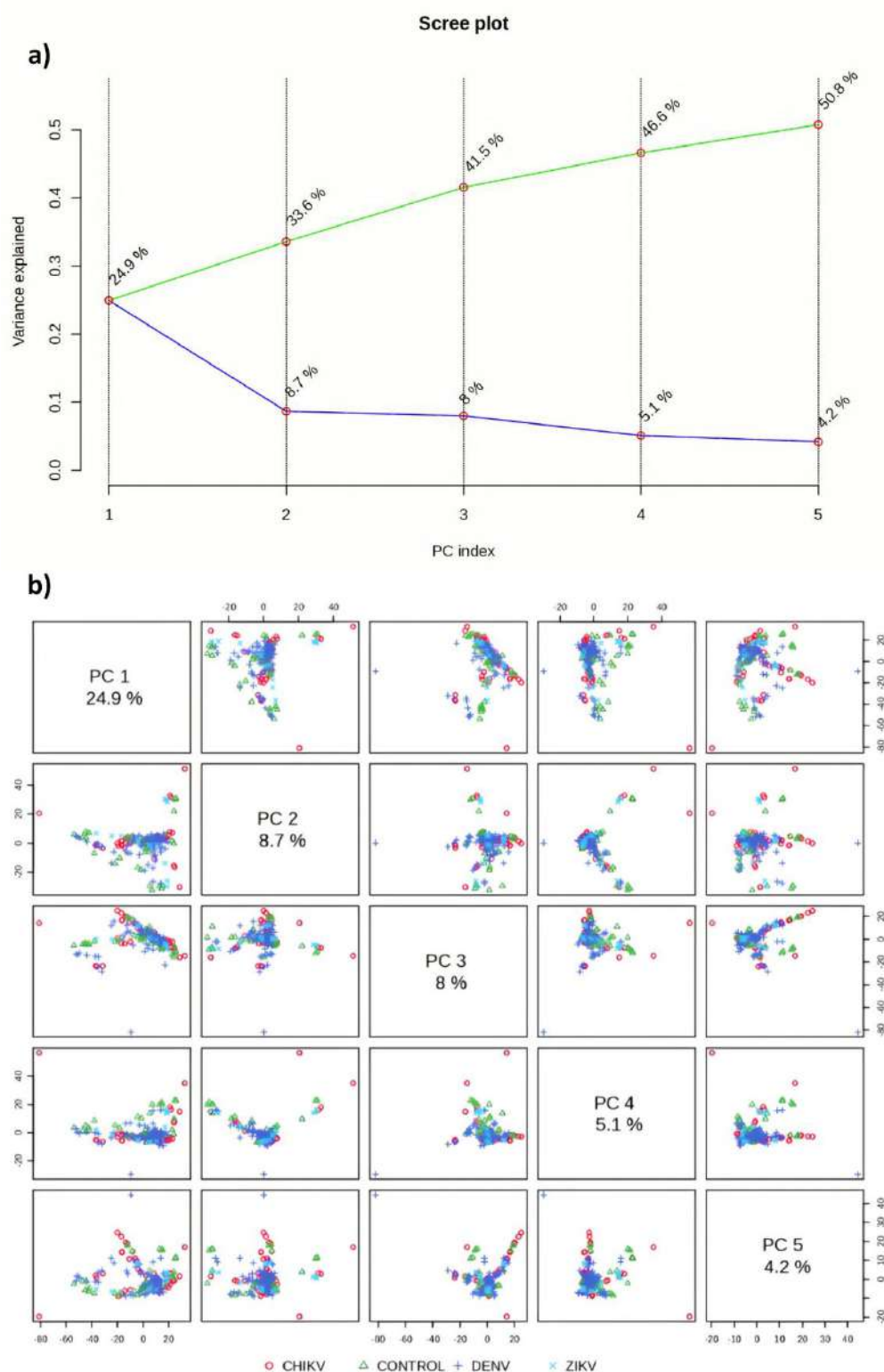
3.3 Panel de metabolitos

3.3.1 Agrupación de los metabolitos por el modelo PCA

Se realizó un PCA preliminar para visualizar el comportamiento de los datos normalizados, obteniendo la matriz de PCA *plots* para las cinco componentes principales y el *Scree Plot* del modelo (Figura 2). Las dos componentes que acumulan mayor varianza fueron PC1 y PC2, con una varianza acumulada del 33.6 % (Figura 2a); y en conjunto, todas las componentes solo acumulan 50.8% de la varianza original de los datos, por lo que, el modelo no tiene un alto valor predictivo. No se observó una agrupación distintiva de los metabolitos por grupos de pacientes, aunque hubo metabolitos del grupo CHIKV con comportamiento de *outlier* (Figura 2b). No obstante, el modelo el PCA realizado no es concluyente para considerar a estos posibles biomarcadores, siendo posible que dicho comportamiento sea debido a la técnica empleada para la normalización de los datos (Wu & Wang, 2015).

Figura 2

Visualización de los metabolitos para los cuatro grupos de pacientes mediante el modelo PCA



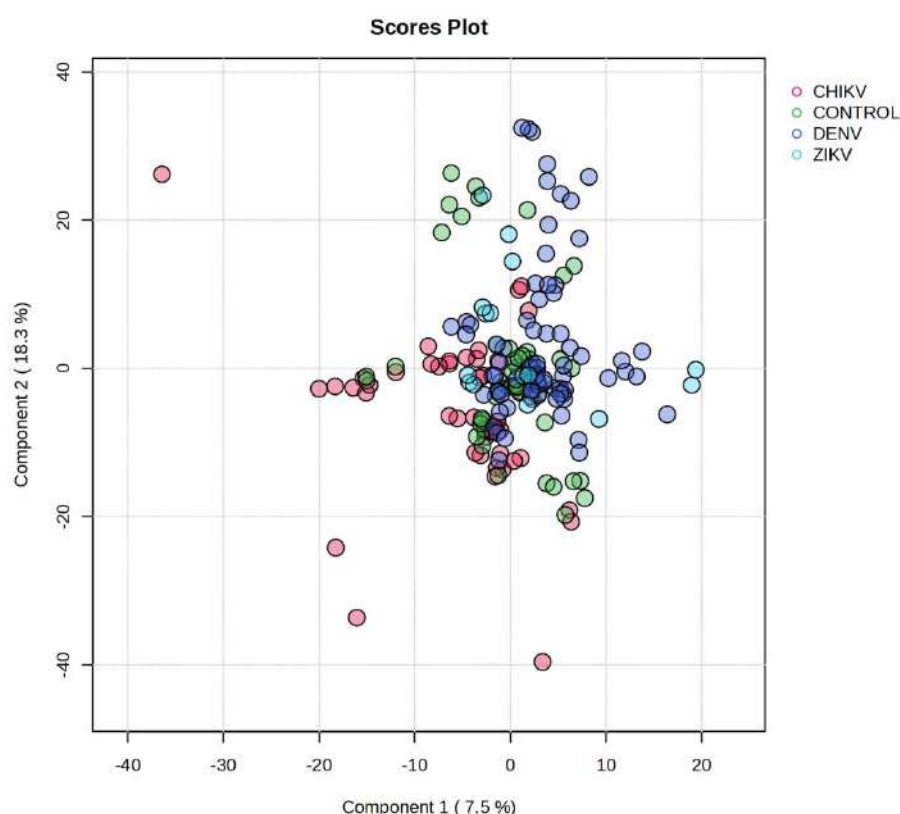
Nota. a) *Scree plot* que explica: la varianza acumulada por cada componente del modelo y la varianza acumulada de las componentes; b) Matriz *overview* de los *plots* generados para las cinco componentes principales del modelo PCA, donde se observa la agrupación de los metabolitos para los cuatro grupos de pacientes

3.3.2 Agrupación de los metabolitos por el modelo PLSDA

Esto era esperado, siendo preferido realizar PLS-DA para este tipo de análisis. La Figura 3 muestra el PLSDA predeterminado para el modelo, generado empleando PC1 y PC2. PC1 explica el 7.5% del modelo y PC2 el 18.3%, lo que no es ideal para que el análisis de la visualización sea significativo (Byers et al., 2019).

Figura 3

Visualización de la agrupación de los metabolitos para PC1 y PC2 del modelo PLSDA

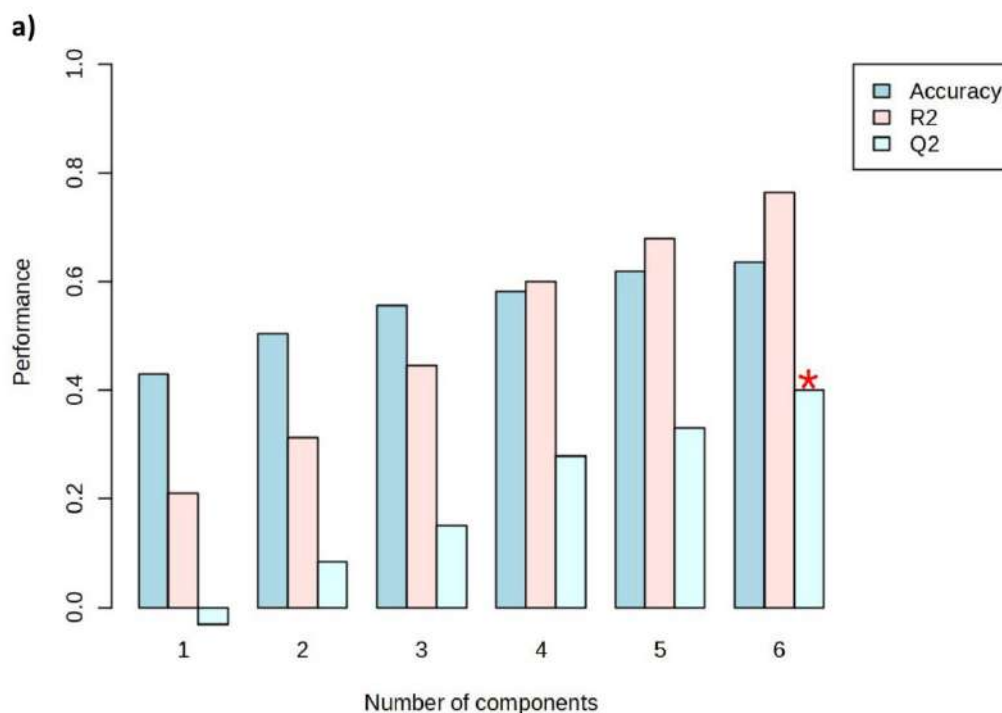


Para proseguir con el análisis por PSLDA, se decidió optimizar los componentes principales del modelo, y basarlo en otras componentes que tengan, en conjunto, un mejor porcentaje de predicción de las variables originales. Con este fin se realizó una verificación cruzada (*cross validation method: 5-fold CV*) (Figura 4), tomando el índice Q^2 como criterio de selección para la componente con mayor valor predictivo, por ser menos dado a presentar sobreajuste (Westerhuis et al., 2008).

Las componentes principales que mejor predicen el modelo son PC6 y PC5 (Figura 4a). PC6 explica un Q^2 de 0.40 y PC5 explica un Q^2 de 0.338 (Figura 4b).

Figura 4

Validación cruzada para las seis componentes del modelo PLSDA



b)

Measure	1 comps	2 comps	3 comps	4 comps	5 comps	6 comps
Accuracy	0.4287	0.50324	0.55618	0.58236	0.61963	0.63515
R2	0.20956	0.31231	0.44471	0.59956	0.67928	0.76344
Q2	-0.031191	0.084178	0.14964	0.27861	0.33101	0.40026

Nota. a) Representación gráfica de la validación cruzada para las seis componentes del modelo PLSDA, según su habilidad predictiva; b) Medidas e índices obtenidos de la validación cruzada del modelo PLSDA para las seis componentes

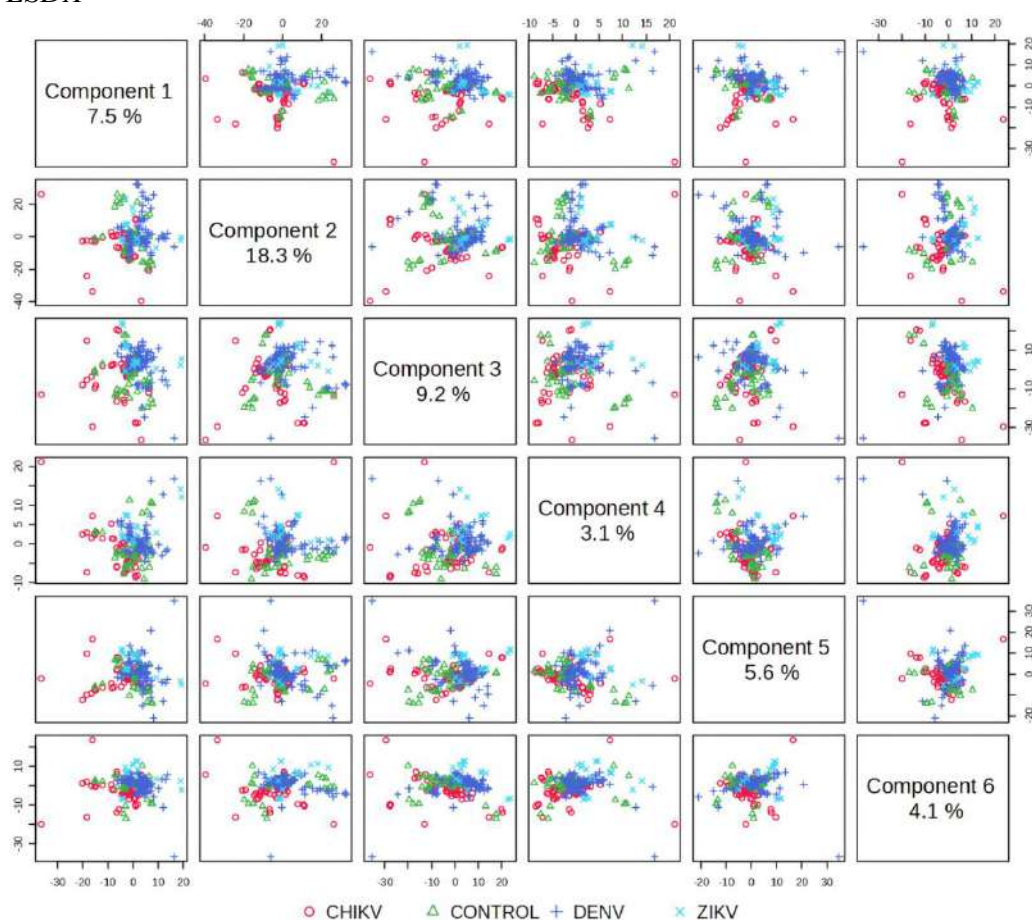
Se obtuvo preliminarmente la matriz de PLSDA para las seis componentes principales del modelo (Figura 5), y aunque PC6 y PC5 explican el modelo mejor que las demás componentes, aún no se visualiza un comportamiento claro de agrupación para los metabolitos (Figura 6). Esto puede deberse a que el número de muestras obtenidas por grupo fue inferior al

requerido para poder plantear un modelo que describa mejor la variabilidad de los metabolitos según cada grupo de pacientes (Kalivodová et al., 2015).

Otra posible causa es que los metabolitos candidatos a biomarcadores sean lecturas de muy baja intensidad, confundiéndose entre el ruido obtenido en las lecturas de nuestro análisis actual (Houriet et al., 2022). Por lo tanto, sería de gran interés repetir de nuevo el estudio contando con más muestras y cambiando los parámetros de lectura para ampliar el rango de intensidad de señal a considerar por el equipo.

Figura 5

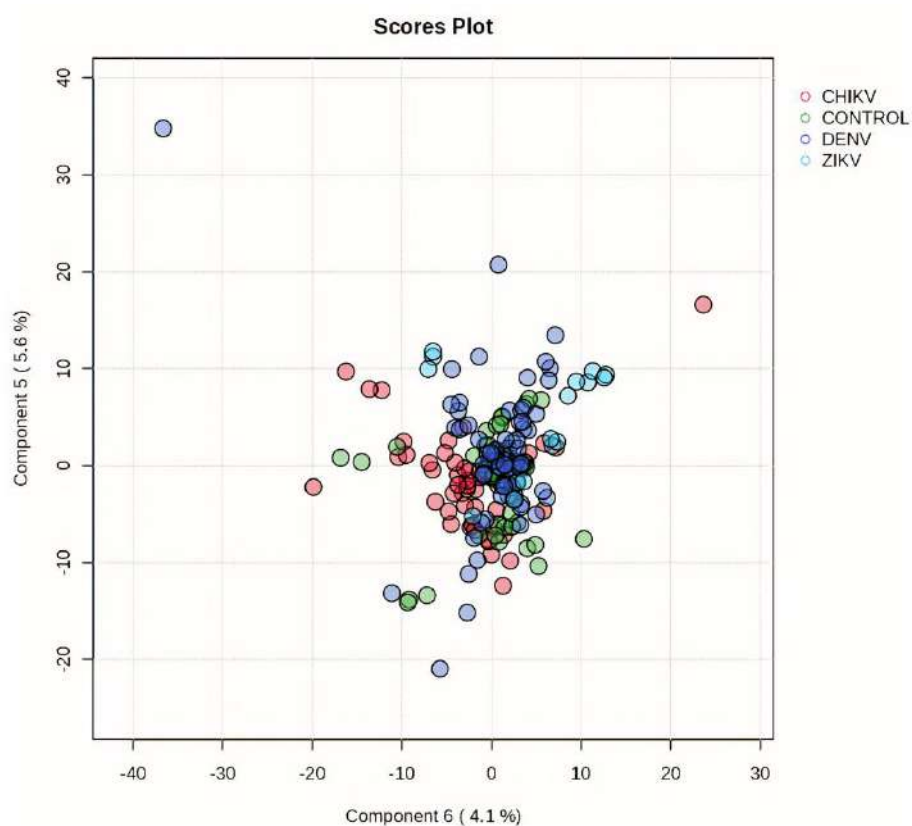
Visualización de los metabolitos para los cuatro grupos de pacientes mediante el modelo PLSDA



Nota. Overview de los *plots* generados para las seis componentes principales del modelo PLSDA, donde se observa la agrupación de los metabolitos para los cuatro grupos de pacientes.

Figura 6

Visualización de la agrupación de los metabolitos para PC6 y PC5 del

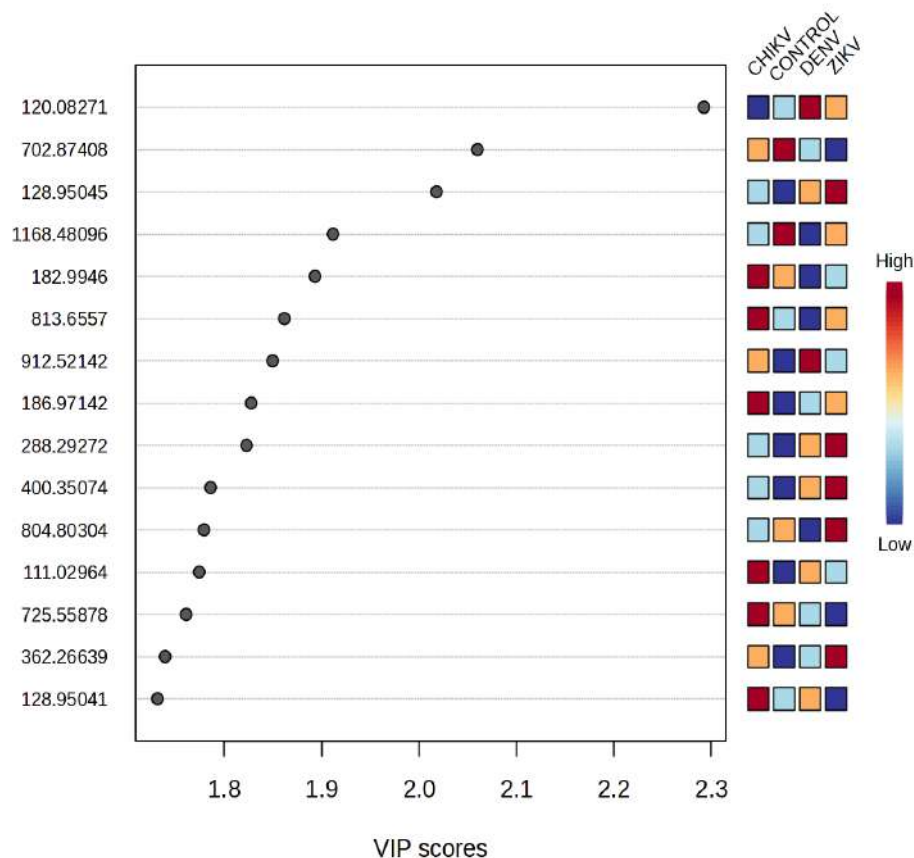


3.3.3 Selección del panel de metabolitos de interés

Siendo la componente 6 la que mejor predice los datos para el modelo PLSDA, en base a ella se obtuvo un panel con las masas de las 15 moléculas de mayor importancia de la variable en la proyección (VIP score), como se observa en la Figura 7 (Xu et al., 2024).

Figura 7

Visualización del panel de los 15 metabolitos más relevantes según su VIP score



Nota. A la izquierda del gráfico se tiene a los 15 metabolitos de mayor relevancia, representados con sus masas moleculares. A la izquierda del gráfico, se tiene una representación cualitativa de las abundancias de cada metabolito para los cuatro grupos de pacientes.

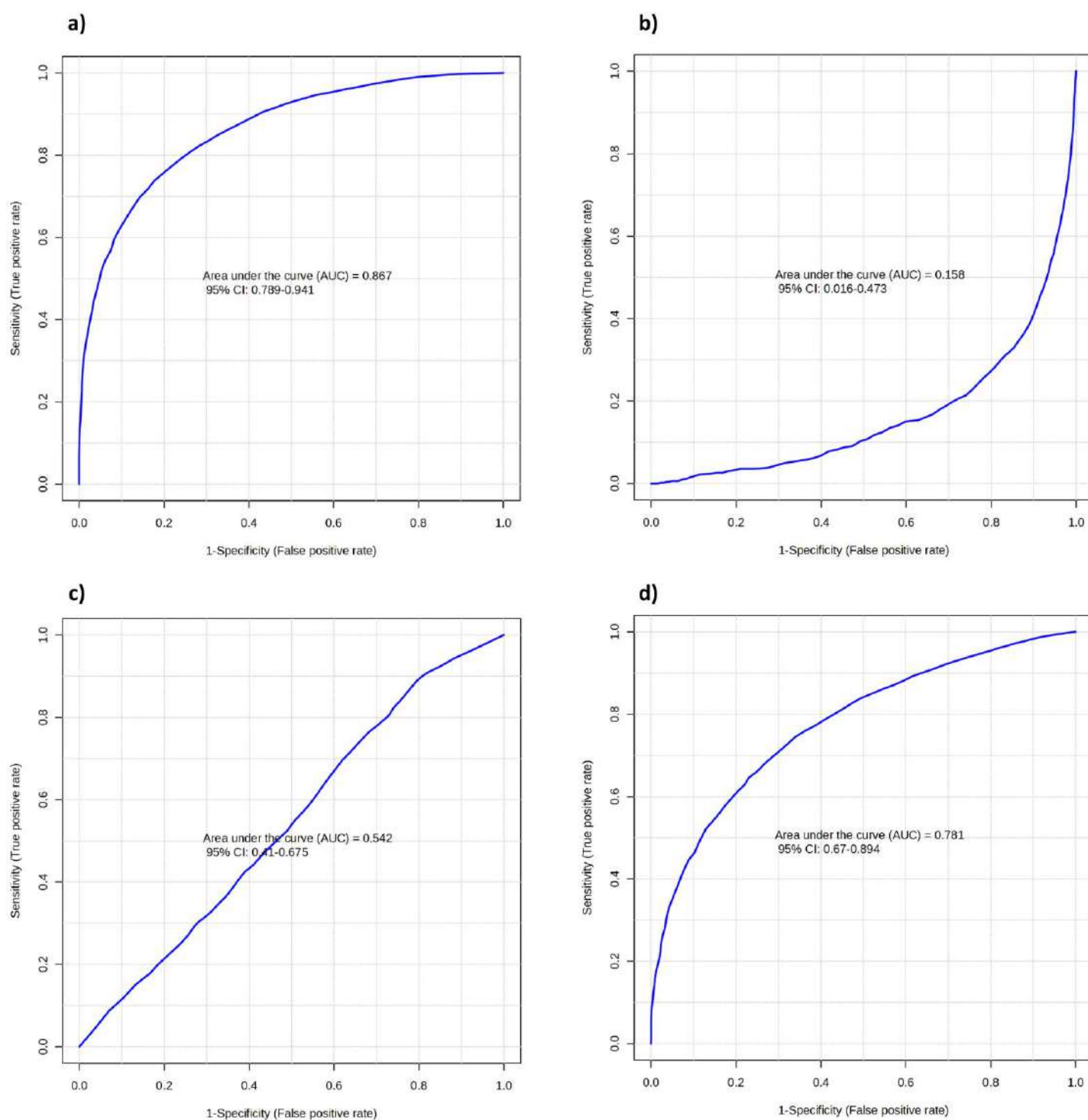
3.3.4 Validación del potencial diagnóstico del panel de metabolitos

Con este panel de metabolitos se obtuvo una curva ROC por cada grupo de pacientes (Figura 8). Cuando se trabaja con un panel de metabolitos, el gráfico de una curva ROC permite determinar qué tan bien el panel puede distinguir entre dos grupos, y esta capacidad es cuantificada por el área bajo la curva (AUC) (Long et al., 2018). El panel de los 15 metabolitos permite distinguir a los pacientes de DENV del resto de grupos en el 86.7% de los casos (AUC= 0.867) teniendo un poder discriminante bastante bueno (Figura 8a) (Lima et al., 2019). Sin embargo, el panel de metabolitos permite distinguir a los pacientes de ZIKV del resto solo en el 15.8% de los casos (AUC= 0.158), lo que implica una capacidad de discriminación inexistente para este grupo

(Figura 8b). En el caso de los pacientes de CHIKV, el panel permite diferenciarlos de los otros grupos en el 54,2% de los casos ($AUC=0.542$), lo que no le da suficiente valor como discriminante en un contexto biomédico (Figura 8c) (Zhang et al., 2024). Para los pacientes con síntomas febriles no asociados a arbovirosis (control), el panel permite distinguirlos de los pacientes con alguno de los tres arbovirus de interés en el 78,1 % de los casos ($AUC= 0.781$) (Figura 8d). En el contexto de este estudio, aunque se obtuvo un $AUC < 7$ para el panel aplicado al control, su utilidad como herramienta de diferenciación es limitada (Yu et al., 2024), al no permitir discriminar entre este grupo y los demás en el 21,9% de los pacientes con síntomas. Esto equivaldría a que de entre cien personas ingresadas con fiebre y con sospecha de arbovirosis, si se utilizara el panel como herramienta de diagnóstico para saber si están infectados de DENV, ZIKV o CHIKV, a veintidós se les diría erróneamente que no padecen arbovirosis.

Figura 8

Validación de la capacidad diagnóstica del panel de metabolitos según el estadístico ROC



Nota. a) ROC del panel para DENV vs. los otros virus;
b) ROC del panel para ZIKV vs. los otros virus;
c) ROC del panel para CHIKV vs. los otros virus;
d) ROC del panel para el control vs. los otros virus.

3.4 Identificación de metabolitos

De los 15 metabolitos de interés, se logró identificar a 9 usando la base de datos *Lipid Maps* (Tabla 3). Para esos 9 metabolitos, se observó una mayor frecuencia de ácidos grasos (Fatty Acyls – FA) en el grupo ZIKV en comparación con el grupo control. De manera similar, los glicerolípidos (Glycerolipids - GL) mostraron una mayor abundancia en el grupo ZIKV, mientras que el grupo CHIKV presentó la menor abundancia de esta clase lipídica. Los esteroides (Sterol Lipids - ST) fueron más abundantes en el grupo ZIKV y menos en el grupo control.

En contraste, los esfingolípidos (Sphingolipids -SP) no exhibieron una tendencia de regulación consistente a nivel de clase. Sin embargo, se identificaron patrones diferenciales en sus subclases: las esfingomielinas (Sphingomyelins - SM) fueron más abundantes en CHIKV y menos en ZIKV; las bases esfingoides (Sphingoid Bases - SPB) fueron más abundantes en los pacientes con ZIKV y menos en el grupo control; las ceramidas (Ceramides -Cer) tuvieron una abundancia mayor en ZIKV y una menor en DENV; y las PI- ceramidas (PI-Ceramides - PI-Cer) presentaron mayor abundancia en DENV y menor en control. Finalmente, las manosil-di-PI-ceramidas (Mannosyl-di-PI-ceramides - Mannosyl-PI-Cer) mostraron una expresión diferencial entre los metabolitos identificados: el compuesto 1168.48096 presentó mayor abundancia en control y menor en DENV, mientras que el 702.87408 mostró mayor abundancia en control y menor en ZIKV.

Tabla 3

Información asociada a los nueve metabolitos identificados por LipidMaps

Masa	Delta	Nombre	Fórmula	Aducto	Clase principal	Abundancia
702.87408	0,008	M(IP)2C 48:5;O4	C48H87NO24P2Na2	[M+2Na-H] ⁺	Sphingolipids	control ↑
1168.48096	0,0005	M(IP)2C 30:3;O2	C47H92O7Na2	[M+2Na-H] ⁺	Sphingolipids	control ↑
813.6557	0,0002	DG 44:0;O2	C47H92O7Na2	[M+2Na-H] ⁺	Glycerolipids	CHIKV ↑
813.6557	0,0002	TG O-44:0;O2	C42H84NO15PK	[M+K] ⁺	Glycerolipids [	CHIKV ↑
912.52142	0,0004	IPC 36:0;O6	C18H35NO1Li	[M+Li] ⁺	Sphingolipids	DENV ↑
288.29272	0,0054	SPB 18:2;O	C55H90O3	[M+2H] ²⁺	Sphingolipids	ZIKV ↑
400.35074	0,001	CE 28:5;O	C54H103NO2Li	[M+Li] ⁺	Sterol Lipids	ZIKV ↑
804.80304	0,0113	Cer 54:3;O	C41H77N2O6P	[M+H] ⁺	Sphingolipids	ZIKV ↑
725.55878	0,0004	SM 36:4;O2	C41H79N2O7P	[M+H-H2O] ⁺	Sphingolipids	CHIKV ↑
725.55878	0,0004	SM 36:3;O3	C20H37NO3Na	[M+Na] ⁺	Sphingolipids	CHIKV ↑
362.26639	0,0002	NAE 18:2;O	C20H37NO3Na	[M+Na] ⁺	Fatty Acyls	ZIKV ↑
362.26639	0,0002	SPB 20:3;O3	C66H119NO26P2	[M+2H] ²⁺	Sphingolipids	ZIKV ↑

Nota. a) Masa: masa molecular del metabolito obtenida por LC-MS; b) Delta: diferencia entre la Masa de cada metabolito y el valor encontrado en LipidMaps; c) Nombre: el nombre reportado en LipidMaps; d) ↑: abundancia del metabolito mayor de lo normal.

3.4.1 Breve contexto biológico de los metabolitos identificados

La producción de esfingolípidos ocurre en el hígado (donde tiene lugar la síntesis de novo de ceramidas a través de la acción concertada de las serina palmitoiltransferasa y ceramida sintasas) (Clarke et al., 2019), en las células endoteliales (que sintetizan esfingolípidos para mantener la integridad y funcionalidad de sus membranas) (Hari et al., 2025) y en el sistema nervioso central (donde los oligodendrocitos producen esfingomielinas para la mielinización axonal) (Wattenberg, 2019; Gault et al., 2010). En condiciones de homeostasis pediátrica, los niveles equilibrados de estos metabolitos son esenciales para procesos críticos como el desarrollo cerebral, donde modulan la neurogénesis y la sinaptogénesis, y para la regulación de la permeabilidad del endotelio capilar, actuando como segundos mensajeros en la señalización vascular (Giussani et al., 2021).

Por otro lado, en homeostasis, la producción del colesterol y otros esteroides se lleva a cabo fundamentalmente en el hígado (donde ocurre la síntesis de *novo* a través de la vía del mevalonato y la HMG-CoA reductasa, destinada en gran parte a la producción de ácidos biliares) (Benson, 2019; Nathan, 2020), en las glándulas suprarrenales (que utilizan el colesterol como precursor inmediato para la síntesis de hormonas corticosteroides y mineralocorticoides) (Gwynne et al., 1976), y en la piel (donde el escualeno, un intermediario hidrocarbonado de la biosíntesis del colesterol, es un componente fundamental del sebo cutáneo que protege contra patógenos y la pérdida de agua) (Luo et al., 2020; Faulkner & Jo, 2022). Una vez sintetizado, el colesterol es empaquetado en lipoproteínas de baja densidad (LDL) para su transporte en el torrente sanguíneo hacia tejidos periféricos, incluido el sistema nervioso central. Allí, es captado por las neuronas y células gliales a través de receptores específicos (ej. LDLR) para contribuir decisivamente a la formación y mantenimiento de las membranas neuronales, la mielinización y la sinapsis (Björkhem & Meaney, 2004).

La síntesis y metabolismo de ácidos grasos—una clase que incluye acil-CoAs, acil-carnitinas, eicosanoides y ésteres de ácidos grasos hidroxilados (FAHFs)— ocurre en el hígado (elongación y saturación de ácidos grasos, síntesis de acil-CoAs) (Zhang et al., 2025), el tejido adiposo (almacenamiento y liberación de ácidos grasos, síntesis de FAHFs) (Li et al., 2024), y en células inmunes como macrófagos (producción de eicosanoides proinflamatorios) (Norris et al., 2014). En condiciones de homeostasis pediátrica, estos metabolitos son esenciales para la producción de energía (vía β -oxidación mitocondrial), la señalización celular (e.g., prostaglandinas) y la integridad de las membranas (Zhao et al., 2025). Por otro lado, la producción de esfingolípidos—como ceramidas, esfingomielinas y gangliósidos— se localiza en el hígado (ceramidas), células endoteliales (esfingolípidos de membrana) y el sistema nervioso central (esfingomielinas para mielinización) (Hannun & Obeid, 2018). En niños, el equilibrio de estas moléculas es crítico para la integridad de membranas celulares, la señalización apoptótica y la función inmune (Gault et al., 2010). Por cada grupo de pacientes, se identificó las rutas metabólicas asociadas a los subgrupos de metabolitos presentes en mayor abundancia, presentadas en Apéndices.

Capítulo 4

4.1 Conclusiones y recomendaciones

Tras la ejecución de las fases metodológicas planteadas en este estudio, que incluyeron el procesamiento de muestras, el análisis metabolómico por LC-MS, el tratamiento estadístico multivariado y la validación de biomarcadores, se presentan a continuación las conclusiones principales derivadas de los hallazgos, así como recomendaciones para futuras investigaciones.

4.1.1 Conclusiones

Al poner en práctica el primer objetivo específico, la aplicación de técnicas de estadística multivariada (PCA y PLS-DA) permitió observar una superposición entre los grupos DENV, ZIKV, CHIKV y control. En conjunto con la baja varianza explicada por los modelos -50.8% el modelo PCA y 40.0% el modelo PLSDA- esto indica que, con el tamaño muestral y la metodología analítica empleada, se dificulta una diferenciación visual clara y robusta de los metabolitos por grupos de pacientes.

Siguiendo al segundo objetivo específico, se logró identificar un panel de 15 metabolitos con VIP elevado, de los cuales 9 fueron identificados utilizando la base de datos LipidMaps. Estos metabolitos, predominantemente lípidos (esfingolípidos, glicerolípidos, ácidos grasos y esteroides), mostraron patrones distintivos entre los grupos de estudio, lo que los señala como potenciales biomarcadores para el diseño de herramientas diagnósticas para arbovirosis.

Pasando al tercer objetivo específico, la validación del potencial diagnóstico del panel de metabolitos mediante curvas ROC reveló una capacidad discriminatoria desigual. El panel demostró un alto desempeño para distinguir infecciones por DENV del resto de condiciones ($AUC = 0.867$) y un desempeño moderado para identificar pacientes no infectados (control vs. infectados, $AUC = 0.781$). No obstante, su capacidad para discriminar casos de ZIKV ($AUC = 0.158$) y CHIKV ($AUC = 0.542$) fue insuficiente para ser considerado una herramienta diagnóstica diferencial confiable para estos virus de forma individual con la configuración actual.

Finalmente, en relación con el objetivo general, el estudio logró determinar perfiles metabolómicos en el suero de infantes e identificó un panel de metabolitos con potencial para el desarrollo de una herramienta de diagnóstico. Sin embargo, los resultados indican que el panel propuesto, en su estado actual, tiene una utilidad primaria para apoyar la identificación de dengue, pero no para apoyar un diagnóstico diferencial completo entre los tres arbovirus.

4.1.2 Recomendaciones

Considerando los hallazgos y las limitaciones encontradas en este estudio, se pensaron las siguientes recomendaciones:

1. Se recomienda repetir el estudio con una cohorte más grande y balanceada, especialmente para el grupo ZIKV que presentó el menor número de participantes (n=8). Aunque la obtención de permisos bioéticos para realizar un segundo estudio sea un factor limitante -por tratarse de un estudio biomédico en una cohorte pediátrica-, contar con un tamaño muestral mayor permitiría reducir la variabilidad inherente. Se podría aumentar el poder estadístico de los modelos multivariados y confirmar la solidez de los perfiles metabólicos y los biomarcadores identificados. Por otra parte, también es posible que se obtengan mejores resultados con los mismos parámetros analíticos y tamaños muestral si se compara en simultáneo menos grupos.
2. Para superar la limitación de las señales de baja intensidad que podrían confundirse con ruido, se sugiere optimizar los parámetros de adquisición en el equipo LC-MS. Ajustar la sensibilidad del espectrómetro y explorar modos de ionización negativa podría capturar un rango más amplio de metabolitos, incluyendo aquellos potencialmente más específicos para ZIKV y CHIKV que no fueron detectados efectivamente en este estudio. Otra alternativa para lograr el mismo objetivo es optar por una herramienta de análisis metabólico que se especialice en lecturas de señales de baja intensidad, como el MALDI-TOF, para repetir la investigación.
3. Futuras investigaciones deberían considerar un enfoque multi-ómico, integrando datos metabolómicos con proteómica o transcriptómica. Esto podría proporcionar una visión más

comprehensiva de las vías patogénicas alteradas por cada virus y descubrir biomarcadores en cascadas complementarias que mejoren la precisión del diagnóstico diferencial.

Referencias

- Adam, A., & Jassoy, C. (2021). Epidemiology and laboratory diagnostics of dengue, yellow fever, Zika, and Chikungunya virus infections in Africa. *Pathogens*, 10(10), 1324.
<https://doi.org/10.3390/pathogens10101324>
- Agarwal, A., Parida, M., & Dash, P. K. (2017). Impact of transmission cycles and vector competence on global expansion and emergence of arboviruses. *Reviews in Medical Virology*, 27(5), e1941. <https://doi.org/10.1002/rmv.1941>
- Aggarwal, S., Banerjee, N., Parihari, S., Roy, J., Bojak, K., & Shah, R. (2022). Metabolomics. In *Multi-Pronged Omics Technologies to Understand COVID-19* (pp. 75–99). CRC Press.
- Bandre, J. U., Basule, P. R., Hemke, A. T., & Umekar, M. J. (2021). LC-MS technique & its metabolomic based approaches in science and technology. *Global Journal for Research Analysis*, 211–216. <https://doi.org/10.36106/gjra/2114152>
- Beger, R. D. (2018). Interest is high in improving quality control for clinical metabolomics: Setting the path forward for community harmonization of quality control standards. *Metabolomics*, 15(1), 1. <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1453-6>
- Beger, R. D., Dunn, W. B., Bandukwala, A., Bethan, B., Broadhurst, D., Clish, C. B., ... Zanetti, K. A. (2019). Towards quality assurance and quality control in untargeted metabolomics studies. *Metabolomics*, 15(1), 4. <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1460-7>
- Benson, H. E. (2019). Lanosterol biosynthesis pathway (version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. *IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE*, 2019 (4).
<https://doi.org/10.2218/gtopdb/f104/2019.4>
- Björkhem, I., & Meaney, S. (2004). Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24 (5), 806–815.
<https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000120374.59826.1b>
- Borts, D. J. (2019). Biomarkers detection for toxicity testing using metabolomics. In *Biomarkers in Toxicology* (pp. 1111–1124). Elsevier.
- Broadhurst, D., Goodacre, R., Reinke, S. N., Kuligowski, J., Wilson, I. D., Lewis, M. R., & Dunn, W. B. (2018). Guidelines and considerations for the use of system suitability and quality control samples in mass spectrometry assays applied in untargeted clinical metabolomic studies. *Metabolomics*, 14 (6), 72. <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1367-3>
- Broeckling, C. D., Beger, R. D., Cheng, L. L., Cumeras, R., Cuthbertson, D. J., Dasari, S., ... Mosley, J. D. (2023). Current practices in LC-MS untargeted metabolomics: A scoping review on the

use of pooled quality control samples. *Analytical Chemistry*, 95 (51), 18645–18654.

<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c02924>

Bujak, R., Struck-Lewicka, W., Markuszewski, M. J., & Kaliszan, R. (2015). Metabolomics for laboratory diagnostics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 113, 108–120.

<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.12.017>

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), 225.

<https://doi.org/10.3390/v11030225>

Chan, K. R., Ismail, A. A., Thergarajan, G., Raju, C. S., Yam, H. C., Rishya, M., & Sekaran, S. D. (2022). Serological cross-reactivity among common flaviviruses. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 975398. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.975398>

Christie, C. D. C., Lue, A. M., & Melbourne-Chambers, R. H. (2023). Dengue, chikungunya and zika arbovirus infections in Caribbean children. *Current Opinion in Pediatrics*, 35 (2), 155–165. <https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000001229>

Clarke, B. A., Majumder, S., Zhu, H., Lee, Y. T., Kono, M., Li, C., Khanna, C., Blain, H., Schwartz, R., Huso, V. L., Byrnes, C., Tuymetova, G., Dunn, T. M., Allende, M. L., & Proia, R. L. (2019). The Ormdl genes regulate the sphingolipid synthesis pathway to ensure proper myelination and neurologic function in mice. *eLife*, 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.51067>

Collins, M. H., & Pelc, R. S. (2023). Serologic diagnosis of arbovirus infections. In *ClinMicroNow* (pp. 1–8). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781683670438.cmph0146>

Correa, R. (2025). *Análisis metabólico del suero de niños infectados por el virus del dengue para la detección de potenciales biomarcadores endógenos* [Master's thesis, Escuela Superior Politécnica del Litoral]. <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/65994>

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), 708.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms9040708>

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), e2373.

<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>
- de Arruda, T. B., Bavia, L., Mosimann, A. L. P., Aoki, M. N., Sarzi, M. L., Conchon-Costa, I., ... Bordignon, J. (2023). Viremia and inflammatory cytokines in dengue: Interleukin-2 as a biomarker of infection, and interferon- α and - γ as markers of primary versus secondary infection. *Pathogens*, 12(11), 1362. <https://doi.org/10.3390/pathogens12111362>
- Dmitrenko, A., Reid, M., & Zamboni, N. (2022). A system suitability testing platform for untargeted, high-resolution mass spectrometry. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9, 1026184. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.1026184>
- El-Bacha, T., Struchiner, C. J., Cordeiro, M. T., Almeida, F. C. L., Marques, E. T., Jr, & 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>
- Evans-Gilbert, T. (2020). Vertically transmitted chikungunya, Zika and dengue virus infections: The pathogenesis from mother to fetus and the implications of co-infections and vaccine development. *International Journal of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 7(3), 107–111. <https://doi.org/10.1016/j.ijpam.2019.05.004>
- Faulkner, R., & Jo, Y. (2022). Synthesis, function, and regulation of sterol and nonsterol isoprenoids. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9, 1006822. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.1006822>
- Gault, C. R., Obeid, L. M., & Hannun, Y. A. (2010). An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 688, 1–23. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6741-1_1
- Giussani, P., Prinetti, A., & Tringali, C. (2021). The role of Sphingolipids in myelination and myelin stability and their involvement in childhood and adult demyelinating disorders. *Journal of Neurochemistry*, 156(4), 403–414. <https://doi.org/10.1111/jnc.15133>
- Gomes da Silva, P., Seixas Dos Reis, J. A., Nogueira Rodrigues, M., da Silva Ardaya, Q., & Mesquita, J. R. (2023). Serological cross-reactivity in zoonotic flaviviral infections of medical importance. *Antibodies*, 12(1), 18. <https://doi.org/10.3390/antib12010018>
- Gorrochategui, E., Jaumot, J., Lacorte, S., & Tauler, R. (2016). Data analysis strategies for targeted and untargeted LC-MS metabolomic studies: Overview and workflow. *Trends in Analytical Chemistry: TRAC*, 82, 425–442. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.07.004>
- Gwynne, J. T., Mahaffee, D., Brewer, H. B., Jr, & Ney, R. L. (1976). Adrenal cholesterol uptake from plasma lipoproteins: regulation by corticotropin. *Proceedings of the National Academy*

of Sciences of the United States of America, 73(12), 4329–4333.

<https://doi.org/10.1073/pnas.73.12.4329>

Hannun, Y. A., & Obeid, L. M. (2018). Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(3), 175–191.

<https://doi.org/10.1038/nrm.2017.107>

Hari, A., Balik-Meisner, M. R., Mav, D., Phadke, D. P., Scholl, E. H., Shah, R. R., Casey, W., Auerbach, S. S., Wallqvist, A., & Pannala, V. R. (2025). Genome-scale metabolic modeling predicts per- and polyfluoroalkyl substance-mediated early perturbations in liver metabolism. *Toxics*, 13 (8), 684. <https://doi.org/10.3390/toxics13080684>

Houriet, J., Vidar, W. S., Manwill, P. K., Todd, D. A., & Cech, N. B. (2022). How low can you go? Selecting intensity thresholds for untargeted metabolomics data preprocessing. *Analytical Chemistry*, 94(51), 17964–17971. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c04088>

Hussain-Alkhateeb, L., Rivera Ramírez, T., Kroeger, A., Gozzer, E., & Runge-Ranzinger, S. (2021). Early warning systems (EWSs) for chikungunya, dengue, malaria, yellow fever, and Zika outbreaks: What is the evidence? A scoping review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 15(9), e0009686. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009686>

INEC. (2022). *Visualizador de resultados, Censo Ecuador*. Instituto Nacional de Estadística y Censos. <https://cubos.inec.gob.ec/AppCensoEcuador/>

Jacyna, J., Kordalewska, M., & Markuszewski, M. J. (2019). Design of Experiments in metabolomics-related studies: An overview. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 164, 598–606. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.11.027>

Johnson, C. H., Ivanisevic, J., & Siuzdak, G. (2016). Metabolomics: Beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(7), 451–459. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.25>

Jones, R., Kulkarni, M. A., Davidson, T. M. V., RADAM-LAC Research Team, & Talbot, B. (2020). Arbovirus vectors of epidemiological concern in the Americas: A scoping review of entomological studies on Zika, dengue and chikungunya virus vectors. *PLOS ONE*, 15(2), e0220753. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220753>

Jung, H.-G., Cho, H., Kim, M., Jung, H., Bak, Y., Lee, S.-Y., ... Oh, J.-W. (2022). Influence of Zika virus 3'-end sequence and nonstructural protein evolution on the viral replication competence and virulence. *Emerging Microbes & Infections*, 11(1), 2447–2465. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2128433>

- Kalivodová, A., Hron, K., Filzmoser, P., Najdekr, L., Janečková, H., & Adam, T. (2015). PLS-DA for compositional data with application to metabolomics: PLS-DA for Compositional Data. *Journal of Chemometrics*, 29(1), 21–28. <https://doi.org/10.1002/cem.2657>
- Katzelnick, L. C., Quentin, E., Colston, S., Ha, T.-A., Andrade, P., Eisenberg, J. N. S., ... Cevallos, V. (2024). Increasing transmission of dengue virus across ecologically diverse regions of Ecuador and associated risk factors. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 18(1), e0011408. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011408>
- Kirwan, J. A., Gika, H., Beger, R. D., Bearden, D., Dunn, W. B., Goodacre, R., ... Wilson, I. D. (2022). Quality assurance and quality control reporting in untargeted metabolic phenotyping: mQACC recommendations for analytical quality management. *Metabolomics*, 18(9), 70. <https://doi.org/10.1007/s11306-022-01926-3>
- Kumar, N., Hoque, M. A., Shahjaman, M., Islam, S. M. S., & Mollah, M. N. H. (2017). Metabolomic biomarker identification in presence of outliers and missing values. *BioMed Research International*, 2017, 2437608. <https://doi.org/10.1155/2017/2437608>
- Landry, M. L., & St George, K. (2017). Laboratory diagnosis of Zika virus infection. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 141(1), 60–67. <https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0406-SA>
- Li, L., Wang, P., Jiao, X., Qin, S., Liu, Z., Ye, Y., Song, Y., & Hou, H. (2024). Fatty acid esters of hydroxy fatty acids: A potential treatment for obesity-related diseases. *Obesity Reviews*, 25(6), e13735. <https://doi.org/10.1111/obr.13735>
- Lima, A.R., Pinto, J., Azevedo, A.I. et al. Identification of a biomarker panel for improvement of prostate cancer diagnosis by volatile metabolic profiling of urine. *Br J Cancer* 121, 857–868 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0585-4>
- Ling, J., Zhu, Y., He, Y., Li, S., Xu, C., & Wang, J. (2025). Isolation and identification of arboviruses from mosquitoes in Yuxi region of Yunnan, China. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*. <https://doi.org/10.1177/15303667251372145>
- Long, N.P., Yoon, S.J., Anh, N.H. et al. A systematic review on metabolomics-based diagnostic biomarker discovery and validation in pancreatic cancer. *Metabolomics* 14, 109 (2018). <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1404-2>
- Mishra, S., Lee, Y., & Park, J. W. (2022). Atomic force microscopy and detecting a DNA biomarker of a few copies without amplification. In *Single-Molecule Science* (pp. 111–124). Cambridge University Press.
- Năstase, A.-M., Barrett, M. P., Cárdenas, W. B., Cordeiro, F. B., Zambrano, M., Andrade, J., ... Rogers, S. (2023). Alignment of multiple metabolomics LC-MS datasets from disparate

- diseases to reveal fever-associated metabolites. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 17(7), e0011133. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011133>
- Nathan, J. A. (2020). Squalene and cholesterol in the balance at the ER membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(15), 8228–8230. <https://doi.org/10.1073/pnas.2003388117>
- Newsom, S. N., & McCall, L.-I. (2018). Metabolomics: Eavesdropping on silent conversations between hosts and their unwelcome guests. *PLoS Pathogens*, 14(4), e1006926. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006926>
- Norris, P. C., Gosselin, D., Reichart, D., Glass, C. K., & Dennis, E. A. (2014). Phospholipase A2 regulates eicosanoid class switching during inflammasome activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(35), 12746–12751. <https://doi.org/10.1073/pnas.1404372111>
- 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>
- Peydró, R. J., Peña, D. L., Bañeres, A. B., & Garí, J. V. F. (2023). Dinámicas en el establecimiento de las especies de mosquitos (Diptera: Culicidae) y enfermedades vectoriales humanas asociadas al cambio climático. *Revista de Salud Ambiental*, 23(1), 66–76. <https://ojs.diffundit.com/index.php/ras/article/view/1345>
- Piantadosi, A., & Kanjilal, S. (2020). Diagnostic approach for arboviral infections in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 58(12), e01926-19. <https://doi.org/10.1128/JCM.01926-19>
- Power, G. M., Vaughan, A. M., Qiao, L., Sanchez Clemente, N., Pescarini, J. M., Paixão, E. S., ... Brickley, E. B. (2022). Socioeconomic risk markers of arthropod-borne virus (arbovirus) infections: A systematic literature review and meta-analysis. *BMJ Global Health*, 7(4), e007735. <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2021-007735>
- Qiu, S., Cai, Y., Yao, H., Lin, C., Xie, Y., Tang, S., & Zhang, A. (2023). Small molecule metabolites: Discovery of biomarkers and therapeutic targets. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 132. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01399-3>
- Romanello, M., McGushin, A., Di Napoli, C., Drummond, P., Hughes, N., Jamart, L., ... Hamilton, I. (2021). The 2021 report of the Lancet Countdown on health and climate change: Code red for a healthy future. *The Lancet*, 398(10311), 1619–1662. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)01787-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)01787-6)

- Ryu, W. S. (2017). Other positive-strand RNA viruses. In *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses* (pp. 177–184). Elsevier.
- Sahu, P. K., Ramiseti, N. R., Cecchi, T., Swain, S., Patro, C. S., & Panda, J. (2018). An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 147, 590–611.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.05.006>
- Santos, L. L. M., de Aquino, E. C., Fernandes, S. M., Ternes, Y. M. F., & Feres, V. C. de R. (2023). Dengue, chikungunya, and Zika virus infections in Latin America and the Caribbean: A systematic review. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 47, e34.
<https://doi.org/10.26633/RPSP.2023.34>
- Schrimpe-Rutledge, A. C., Codreanu, S. G., Sherrod, S. D., & McLean, J. A. (2016). Untargeted metabolomics strategies—Challenges and emerging directions. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 27(12), 1897–1905. <https://doi.org/10.1007/s13361-016-1469-y>
- Sena, B. F., Herrera, B. B., Bruneska Gondim Martins, D., & Lima Filho, J. L. (2024). Advancing arbovirus diagnosis in Brazil: Strengthening diagnostic strategies and public health data collection. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 28(3), 103766.
<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2024.103766>
- 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, 36833.
<https://doi.org/10.1038/srep36833>
- Skogvold, H. B., Sand, E. S., & Elgstøen, K. B. P. (2025). Global metabolomics using LC-MS for clinical applications. *Methods in Molecular Biology*, 2855, 23–39.
https://doi.org/10.1007/978-1-0716-4116-3_2
- Soni, S., Gill, V. J. S., Anusheel, Singh, J., Chhabra, J., Gill, G. J. S., & Bakshi, R. (2023). Dengue, Chikungunya, and Zika: The causes and threats of emerging and re-emerging arboviral diseases. *Cureus*, 15(7), e41717. <https://doi.org/10.7759/cureus.41717>
- Tokareva, A.O., Chagovets, V.V., Kononikhin, A.S. *et al.* Normalization methods for reducing interbatch effect without quality control samples in liquid chromatography-mass spectrometry-based studies. *Anal Bioanal Chem* **413**, 3479–3486 (2021).
<https://doi.org/10.1007/s00216-021-03294-8>

- Tsankova, G. S., Kasimova, Z., Todorova, T. T., Avdzhiyska, M., & Tsankova, D. (2016). Outbreak of Zika virus disease and its complications. *Journal of IMAB*, 22(2), 1136–1138.
<https://doi.org/10.5272/jimab.2016222.1136>
- Van Dyne, E. A., Neaterour, P., Rivera, A., Bello-Pagan, M., Adams, L., Munoz-Jordan, J., ... Sharp, T. M. (2019). Incidence and outcome of severe and nonsevere thrombocytopenia associated with Zika virus infection—Puerto Rico, 2016. *Open Forum Infectious Diseases*, 6(1), ofy325.
<https://doi.org/10.1093/ofid/ofy325>
- Vial, T., Marti, G., Missé, D., & Pompon, J. (2021). Lipid interactions between flaviviruses and mosquito vectors. *Frontiers in Physiology*, 12, 763195.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2021.763195>
- Waggoner, J. J., Gresh, L., Vargas, M. J., Ballesteros, G., Tellez, Y., Soda, K. J., ... Pinsky, B. A. (2016). Viremia and clinical presentation in Nicaraguan patients infected with Zika virus, Chikungunya virus, and dengue virus. *Clinical Infectious Diseases*, 63(12), 1584–1590.
<https://doi.org/10.1093/cid/ciw589>
- Wattenberg, B. W. (2019). Intra- and intercellular trafficking in sphingolipid metabolism in myelination. *Advances in Biological Regulation*, 71, 97–103.
<https://doi.org/10.1016/j.jbior.2018.11.002>
- Whiteman, A., Loaiza, J. R., Yee, D. A., Poh, K. C., Watkins, A. S., Lucas, K. J., ... Oguzie, J. U. (2020). Do socioeconomic factors drive Aedes mosquito vectors and their arboviral diseases? A systematic review of dengue, chikungunya, yellow fever, and Zika Virus. *One Health*, 11, 100188. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2020.100188>
- Xu, S., Bai, C., Chen, Y., Yu, L., Wu, W., & Hu, K. (2024). Comparing univariate filtration preceding and succeeding PLS-DA analysis on the differential variables/metabolites identified from untargeted LC-MS metabolomics data. *Analytica Chimica Acta*, 1287, 342103. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2023.342103>
- Yu, J., Yuan, J., Liu, Z., Ye, H., Lin, M., Ma, L., Liu, R., Ding, W., Li, L., Ma, T., Tang, S., & Pang, Y. (2024). Combined urine proteomics and metabolomics analysis for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Clinical Proteomics*, 21(1), 66. <https://doi.org/10.1186/s12014-024-09514-4>
- Zamboni, N., Saghatelian, A., & Patti, G. J. (2015). Defining the metabolome: Size, flux, and regulation. *Molecular Cell*, 58(4), 699–706. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.04.021>
- Zardini, A., Menegale, F., Gobbi, A., Manica, M., Guzzetta, G., d'Andrea, V., ... Poletti, P. (2024). Estimating the potential risk of transmission of arboviruses in the Americas and Europe: A

modelling study. *The Lancet Planetary Health*, 8(1), e30–e40. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(23\)00252-8](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(23)00252-8)

Zea-Vera, A. F., & Parra, B. (2017). Zika virus (ZIKV) infection related with immune thrombocytopenic purpura (ITP) exacerbation and antinuclear antibody positivity. *Lupus*, 26(8), 890–892. <https://doi.org/10.1177/0961203316671816>

Zhang, J., Wu, S., Xu, Y., Zhang, L., Cong, C., Zhang, M., Jiang, Y., & Liu, Y. (2025). Lipid overload meets S-palmitoylation: a metabolic signalling nexus driving cardiovascular and heart disease. *Cell Communication and Signaling*, 23(1), 392. <https://doi.org/10.1186/s12964-025-02398-3>

Zhang, L., Zheng, J., Ahmed, R., Haince, J., Torres-Calzada, C., Mandal, R., Maksymuik, A., Tappia, P. S., Joubert, P., Rolfo, C. D., & Wishart, D. S. (2024). Clinical validation of metabolite markers for early lung cancer detection. In *medRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2024.11.25.24317901>

Zhang, L., Zheng, J., Johnson, M., Mandal, R., Cruz, M., Martínez-Huélamo, M., ... Wishart, D. S. (2024). A comprehensive LC-MS metabolomics assay for quantitative analysis of serum and plasma. *Metabolites*, 14(11), 622. <https://doi.org/10.3390/metabo14110622>

Zhao, Y., Wang, C., Liu, B., Zhang, S., Wang, Y., Qian, Y., Gong, Z., Zhao, J., Yang, X., Bai, Y., & Mao, W. (2025). Regulatory effect of PGE2-EP2/EP4 receptor pathway on *Staphylococcus aureus*-induced inflammatory factors in dairy cow neutrophils. *Biomolecules*, 15(8), 1062. <https://doi.org/10.3390/biom15081062>

Apéndices

Figura 9

Normalización de los datos crudos por Autoscaling, incluyendo a los QCs

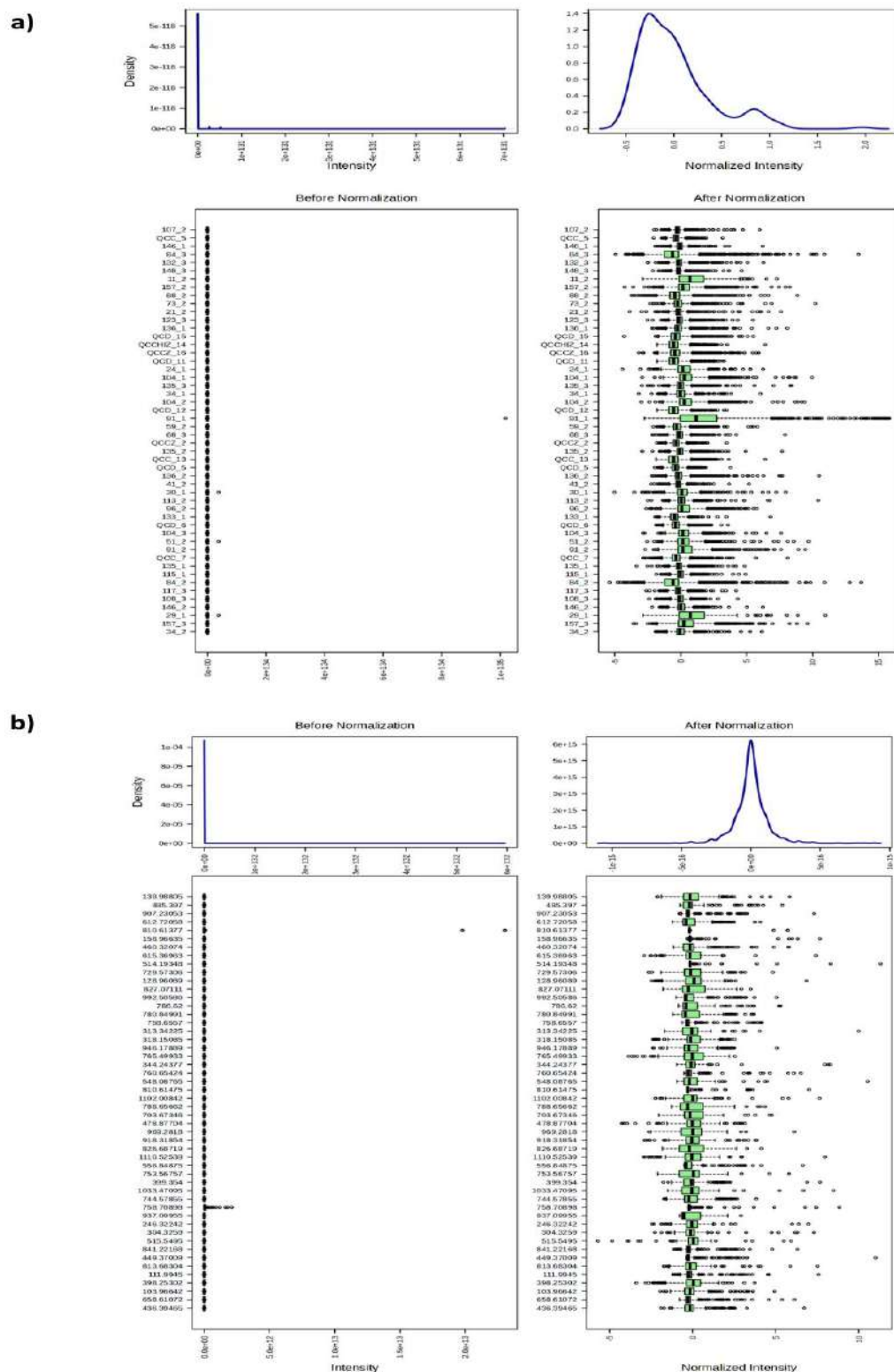
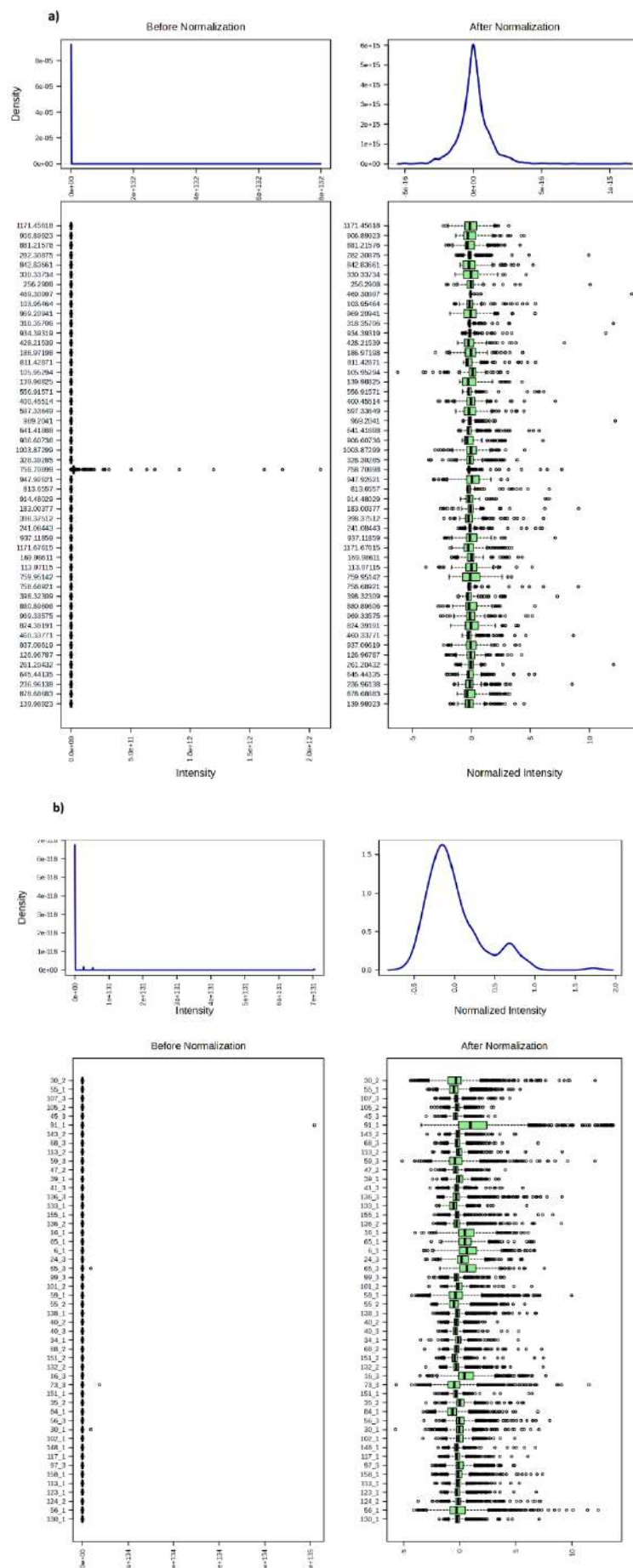


Figura 10

Normalización de los datos crudos de los metabolitos por Autoscaling



Nota. a) Features View; b) Sample View

Figura 11

Metabolismo de glicosfingolípidos, acrecentado en pacientes pediátricos de DENV

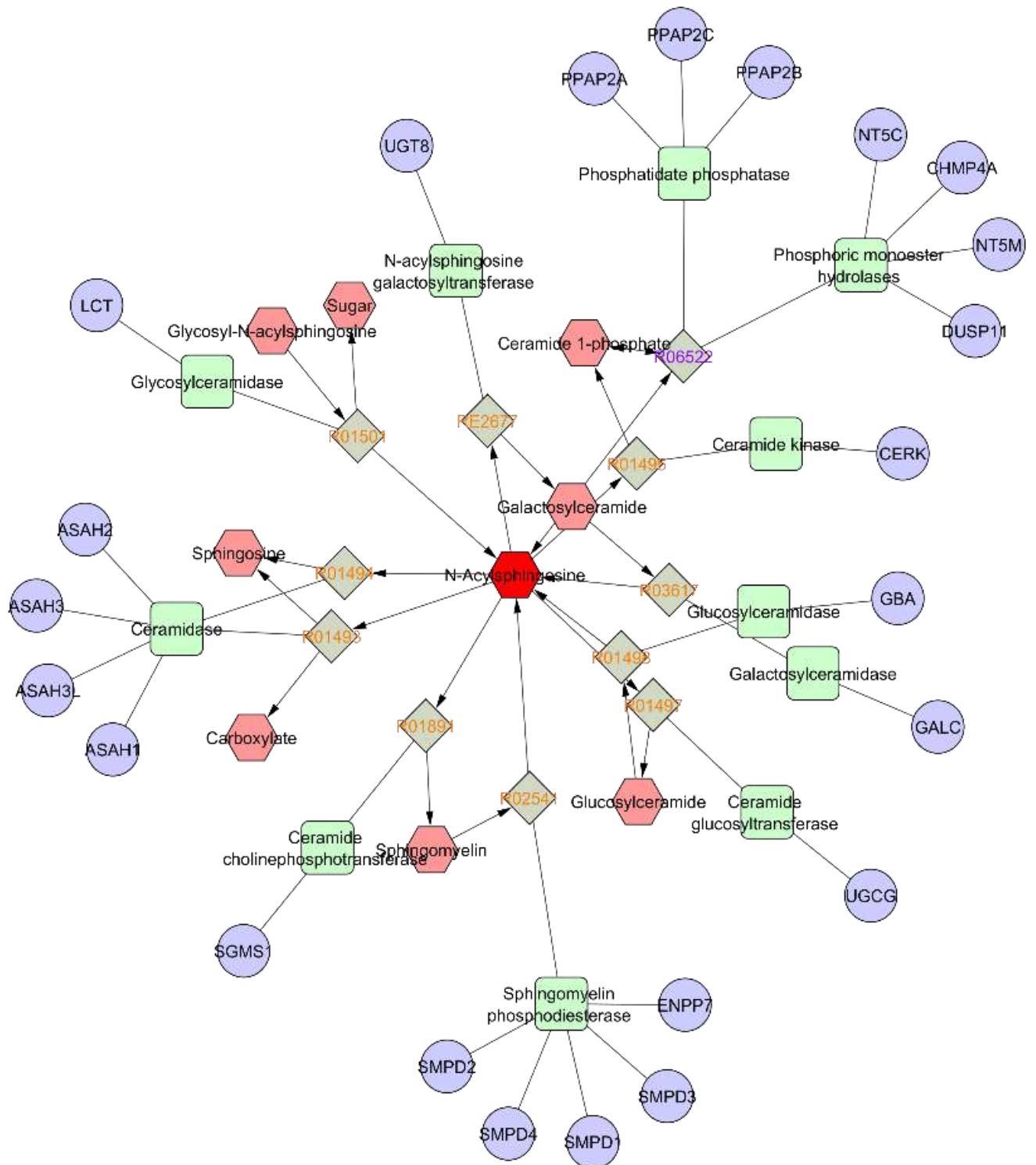


Figura 12

Metabolismo y biosíntesis de escualeno y colesterol, acrecentados en pacientes pediátricos de ZIKV

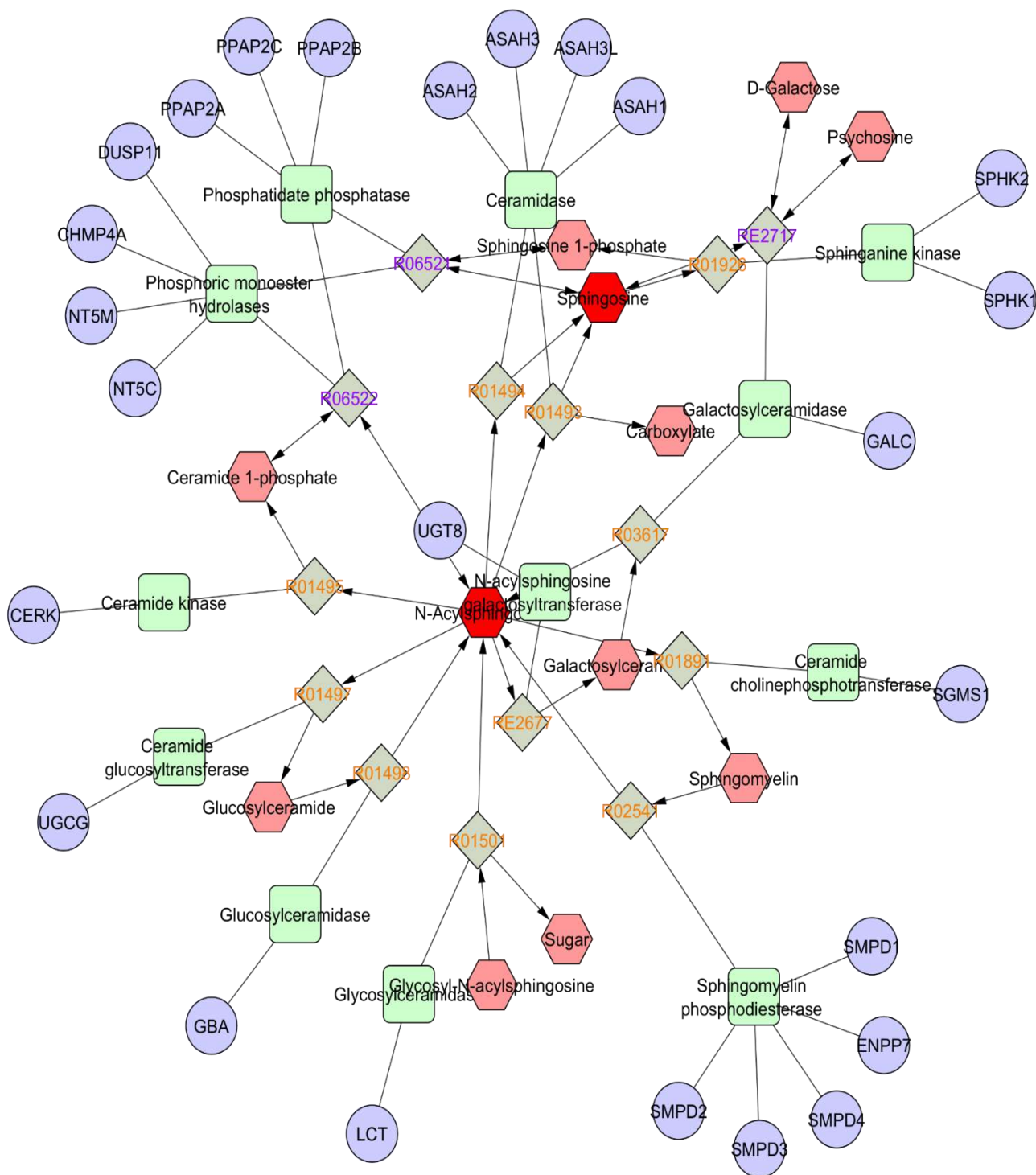


Figura 13

Metabolismo y biosíntesis de la hormona glicerofosfolípida esteroide C21 y del bilis, acrecentados en pacientes pediátricos de ZIKV

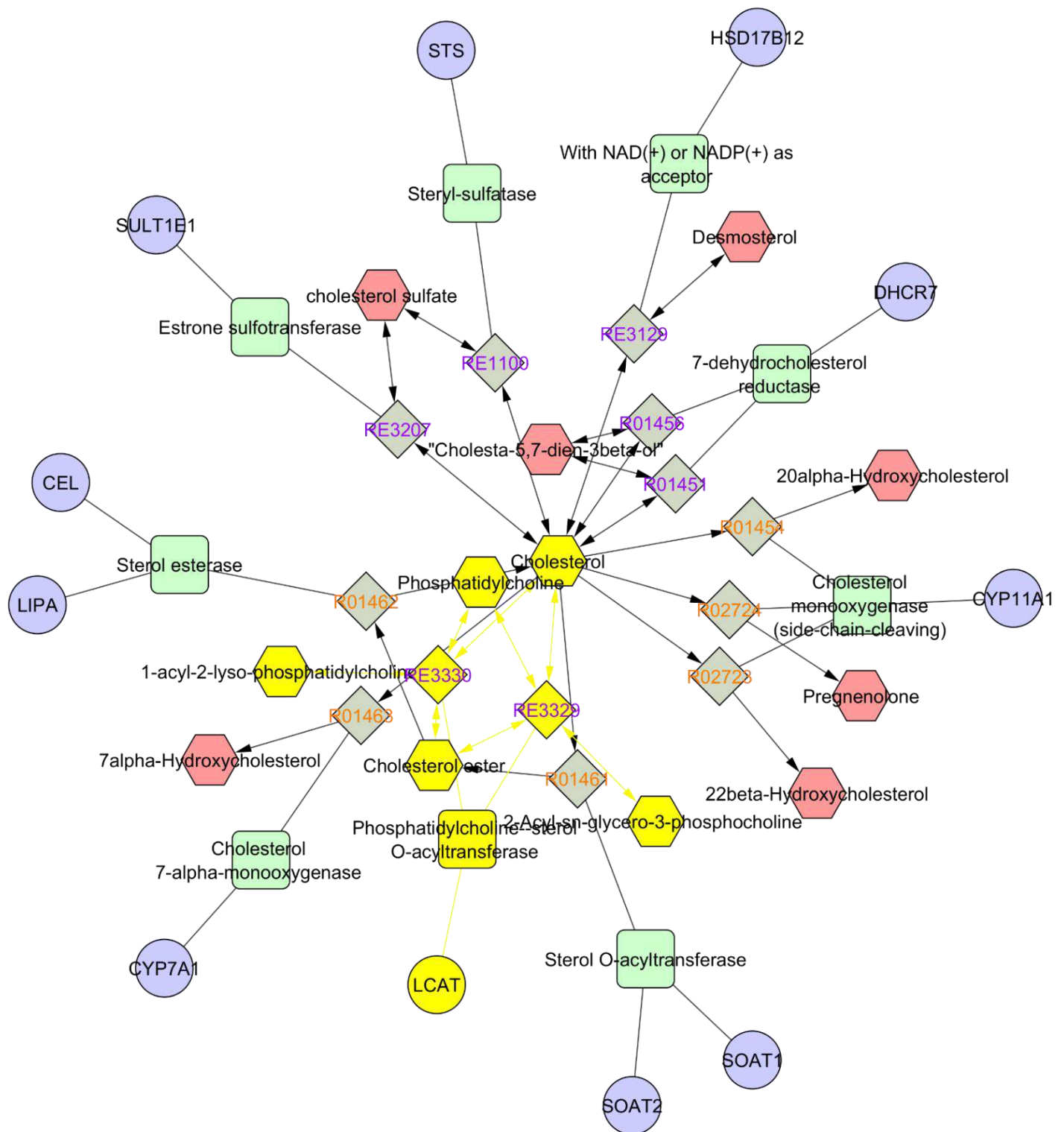


Figura 14

Metabolismo de formación de prostaglandina a partir de ácido araquidónico, acrecentado en pacientes pediátricos de ZIKV

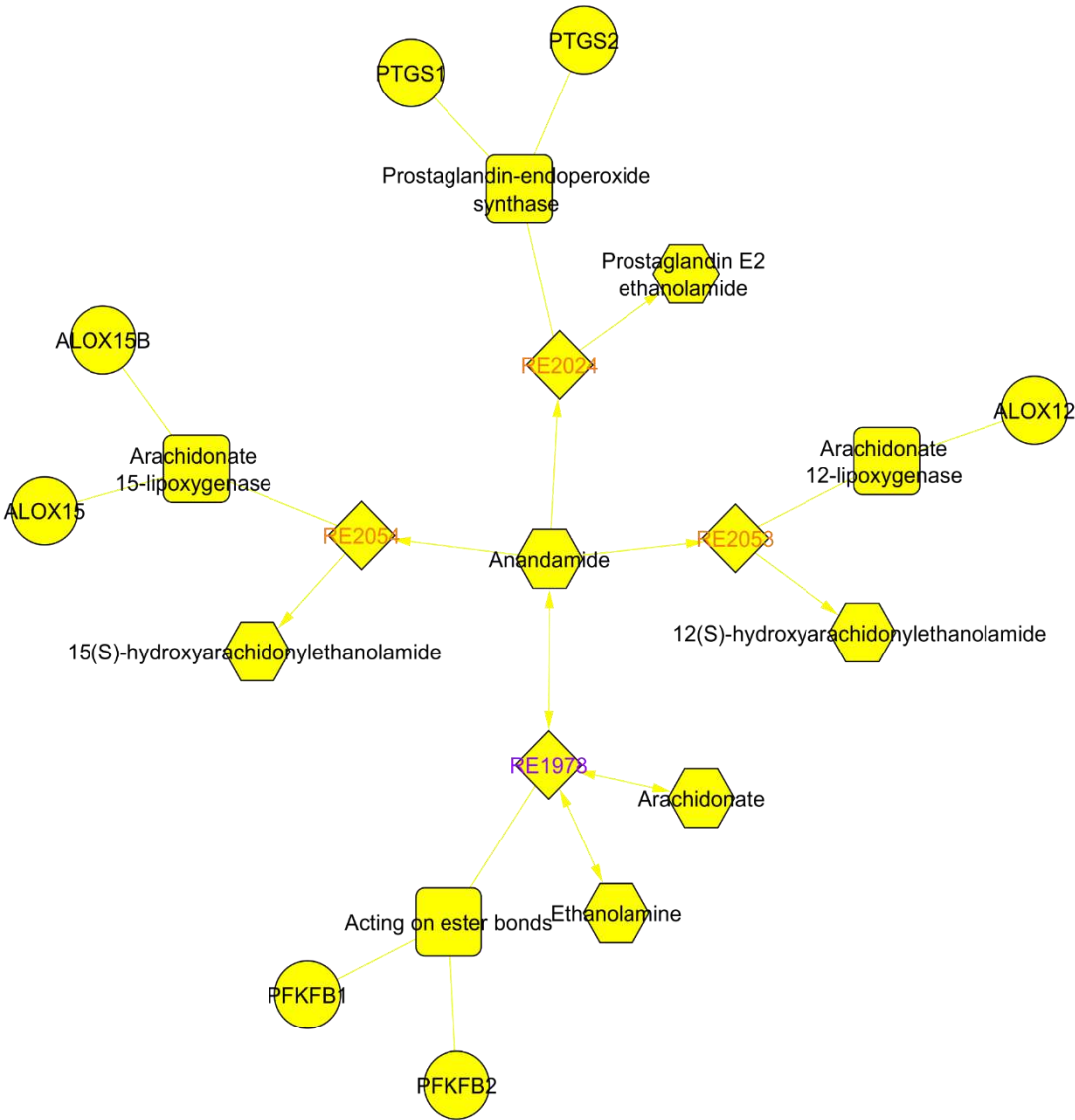


Figura 15

Metabolismo de glicerofosfolípidos, acrecentados en pacientes pediátricos de CHIKV

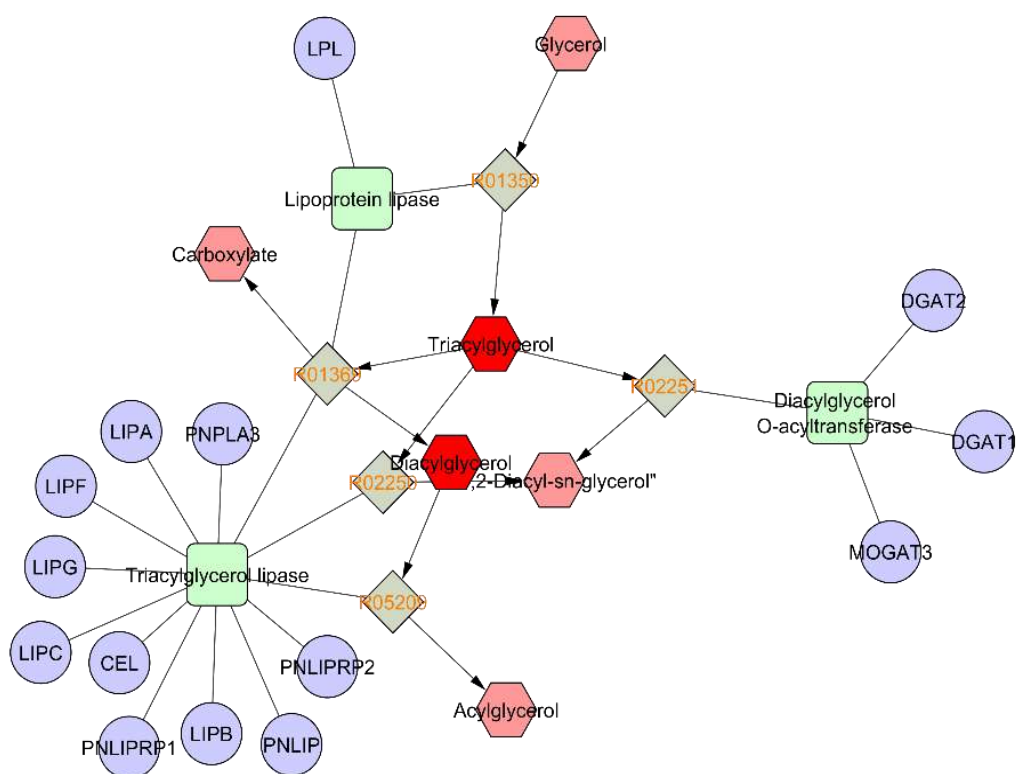
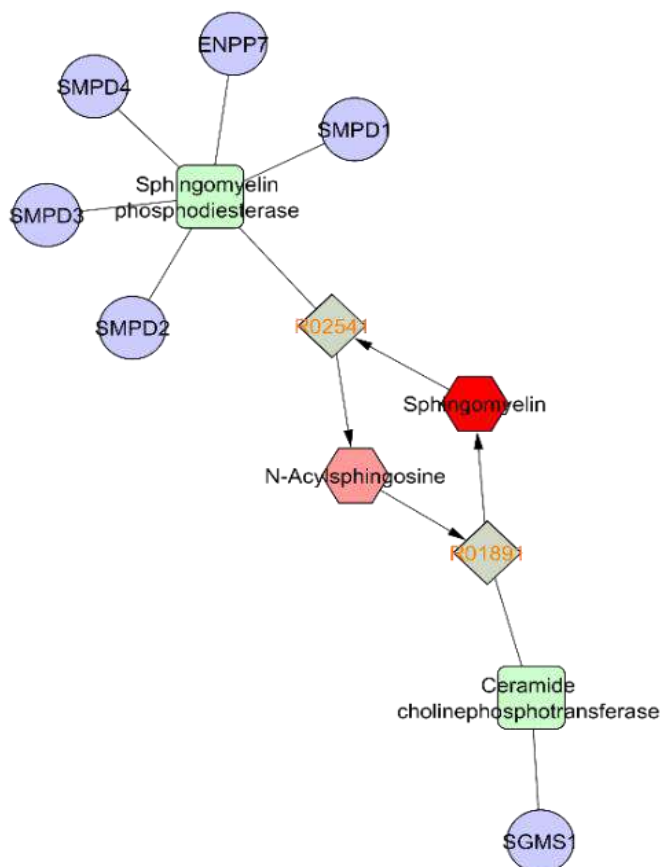


Figura 16

Metabolismo de glicosfingolípidos, acrecentados en pacientes pediátricos de CHIKV



Metabolismo de glicoesfingolípidos, acrecentado en el grupo control

