

1

2 **Determinación de alteraciones en los metabolitos séricos en**
3 **pacientes infectados por SARS-CoV-2 sin comorbilidades de alto**
4 **riesgo para enfermedad moderada o grave/crítica**

5

6 Responsables técnicos: Dr. Alfredo Ulloa Aguirre, Dr. José Carlos Páez Franco,
7 Dr. Juan Manuel Germán Acacio. *Red de apoyo a la Investigación. Universidad*
8 *Nacional Autónoma de México-Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición*
9 *Salvador Zubirán*

10 Investigadores Asociados: Dra. Miriam Bobadilla, Dra. Fernanda González Lara,
11 Dr. Alfredo Ponce de León Rosales. *Departamento de Infectología, Instituto*
12 *Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán*

13 Patrocinio del proyecto: Coordinación de la Investigación Científica, UNAM.

14 **Resumen**

15 Se trata de un estudio prospectivo en el que empleando cromatografía de gases
16 acoplada a espectrometría de masas, se determinarán en un protocolo “no dirigido”,
17 los principales cambios en metabolitos séricos por efecto de la infección por SARS-
18 CoV-2 en población joven (30-50 años) y sin comorbilidades, y se correlacionarán
19 estos perfiles con la evolución de la enfermedad. El análisis de las vías metabólicas
20 relacionadas, en conjunto con el historial y la progresión clínica permitirá plantear
21 tratamientos y marcadores pronósticos de la gravedad de la enfermedad.

22 **Introducción**

23 COVID-19 es una enfermedad causada por el virus SARS-CoV-2, cuyas
24 manifestaciones iniciales incluyen fiebre, fatiga, tos seca y linfopenia. En casos
25 graves produce neumonía intersticial, síndrome de dificultad respiratoria aguda,
26 miocarditis y falla multiorgánica [1]. La infección por SARS-CoV-2 tiene un
27 pronóstico desfavorable cuando existen comorbilidades y enfermedades crónicas
28 como diabetes mellitus (DM), enfermedades cardiovasculares y/u obesidad [2]; sin
29 embargo, de acuerdo a estudios recientes, entre el 10 y 30% de los pacientes con
30 cuadros graves no presentan enfermedades preexistentes [3-8]. Este sector de la
31 población tiene una menor posibilidad de ser etiquetada en condiciones de riesgo al
32 momento del diagnóstico inicial en el triage.

33 El peor pronóstico derivado de comorbilidades puede ser trazado a condiciones
34 inflamatorias desfavorables y afectaciones al sistema inmune innato y adaptativo [9]
35 10]; no obstante, los cuadros graves y la mortalidad en población aparentemente
36 sana puede ser multifactorial y compleja de analizar [11].

37 En los últimos años, el uso de técnicas ómicas en asociación con datos clínicos
38 clásicos ha ayudado en el diagnóstico y tratamiento de diversas condiciones. Un
39 ejemplo de esto es el modelo desarrollado por Langley y colaboradores [8], el cual
40 predice si un paciente ingresado a urgencias por sepsis corre el riesgo de fallecer.
41 El modelo se basa en el análisis del historial clínico y de los perfiles proteómicos y
42 metabólicos en suero al momento del ingreso. En este contexto, se denomina
43 “flexibilidad metabólica” a los cambios transcriptómicos, proteómicos y metabólicos
44 (a nivel de factores de transcripción, enzimas, transportadores, neurotransmisores,
45 etc.) necesarios para la adaptación a ciertas condiciones patológicas [12].

46 Debido al relativamente corto tiempo que lleva esta emergencia sanitaria, poco se
47 conoce sobre los cambios en metabolitos séricos de pacientes con SARS-CoV-2,
48 sin embargo, otros agentes virales y bacterianos que provocan neumonía (influenza,
49 virus sincicial respiratorio, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*,
50 entre otros) ocasionan modificaciones metabólicas específicas que a nivel clínico
51 pueden ser de importancia en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento [13-17] . En
52 este sentido, el análisis de metabolitos séricos de pacientes canadienses con
53 influenza AH1N1 permitió diferenciar el agente etiológico (infección viral vs infección
54 bacteriana) y adicionalmente conocer el pronóstico al tratamiento [18].

55 Por otro lado, una de las terapias más eficaces para tratar la infección por SARS-
56 CoV-2, consiste en administrar plasma de pacientes convalecientes a pacientes
57 graves o críticos [19]. Se ha sugerido que el efecto protector de esta terapéutica es
58 mediada por anticuerpos neutralizantes contra el virus [20], sin embargo, la
59 activación y ejecución de la respuesta inmune es dependiente del estado metabólico
60 celular y sistémico, a cuyo efecto se le está prestando recientemente una mayor
61 atención [21]. Por otro lado, la composición del plasma convaleciente engloba
62 además otras proteínas, sales y compuestos orgánicos que actualmente no han
63 sido totalmente elucidados en cuanto a su papel terapéutico para COVID-19 y otras
64 infecciones [20].

65 En el presente proyecto se reclutarán pacientes con infección por SARS-CoV-2 sin
66 comorbilidades y se correlacionaran las diferencias en metabolitos séricos con su
67 progresión clínica a lo largo de 3 semanas (síntomas leves a moderados-
68 insuficiencia respiratoria-muerte). Los resultados del proyecto tendrán repercusión
69 en la identificación de factores metabólicos relevantes de riesgo en poblaciones sin
70 comorbilidades pero con infección por SARS-CoV-2 y (de manera indirecta) en el
71 empleo de plasma como terapia para la reciente infección.

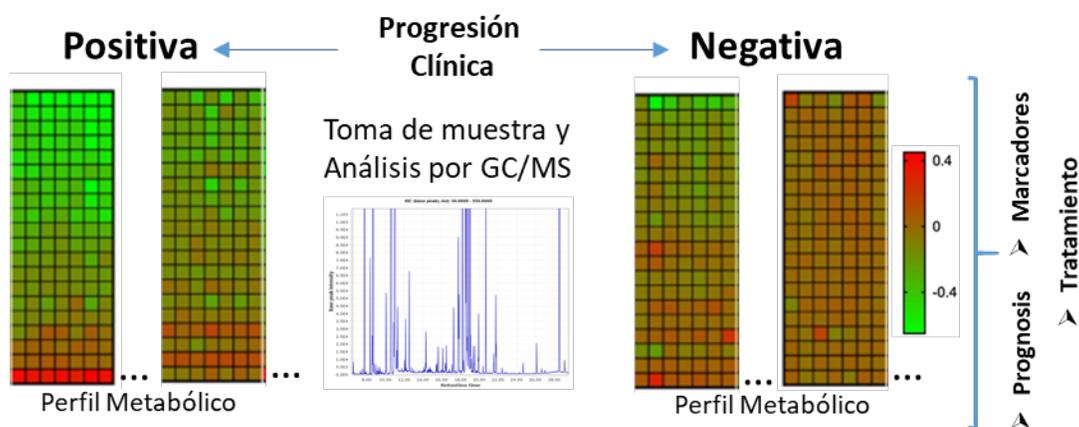
72 **Planteamiento del problema**

73 Una número importante de la población se encuentra en riesgo de enfermedad
74 moderada y grave/crítica por infección con SARS-CoV-2 debido a la falta de
75 predictores (genéticos, metabólicos y constitucionales, entre otros) asociados a la
76 infección o enfermedad al momento del diagnóstico en ausencia aparente de
77 comorbilidades. La identificación de los perfiles metabólicos asociados con la

78 progresión clínica podría ofrecer una explicación para el desarrollo y el riesgo a
79 presentar cuadros clínicos graves de COVID-19 en este sector de la población
80 (Fig.1).

81 **Importancia del proyecto**

82 Los resultados del presente proyecto tendrán repercusiones a nivel diagnóstico,
83 pronóstico y terapéutico. Aportarán información para establecer el pronóstico de la
84 enfermedad e identificar medidas preventivas y terapéuticas adecuadas para el
85 tratamiento de la infección por COVID-19. Es importante mencionar que
86 actualmente no existe información sobre los metabolitos séricos empleando
87 técnicas de metabolómica por cromatografía de gases-MS en pacientes COVID-19
88 con excepción de un artículo muy recientemente publicado [22].



89

90

Figura 1. Esquema general de análisis.

91

Objetivo

92 Identificar los perfiles de metabolitos en suero de pacientes infectados con SARS-
93 CoV-2, con manifestaciones leves y sin comorbilidades, compararlos con controles
94 negativos para la infección y asociar estos perfiles con la evolución clínica y
95 bioquímica de la enfermedad.

96

Hipótesis

97 Habrá diferencias cualitativas y/o cuantitativas en el tipo metabolitos en suero entre
98 pacientes con COVID-19 y controles sin infección y entre aquéllos con una evolución
99 favorable vs no favorable a COVID-19.

100

Criterios de inclusión

101

102

103

104

105

Pacientes del sexo masculino entre 30 y 50 años, que sean atendidos en el triage del servicio de urgencias del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición SZ (INCMNSZ) e hisopados, cuando cubran los criterios operativos correspondientes vigentes en el INCMNSZ (ver abajo) y la OMS (para pacientes con enfermedad moderada [23]), con resultados positivos o negativos para SARS-CoV-2, y que no

106 presenten antecedentes de enfermedad cardiovascular (incluyendo hipertensión
107 arterial detectada al momento de la consulta en el triage), obesidad, DM2,
108 enfermedades autoinmunes ni neoplasias malignas en tratamiento, y que *no*
109 *ameriten* hospitalización por ser clasificados como enfermedad leve. En el triage se
110 toma rutinariamente la presión arterial, por lo que podrán excluirse los pacientes
111 hipertensos desde esta etapa. Se seguirá el curso de la enfermedad a partir de la
112 entrega de los resultados para SARS-CoV-2 y se evaluará su progresión mediante
113 comunicación telefónica o a través de correo electrónico y en aquéllos que se
114 hospitalicen posteriormente, mediante la consulta del expediente electrónico y los
115 marcadores sanguíneos de mal pronóstico (ver abajo). En el caso de que sean
116 positivos y por haber aceptado participar en el estudio en su visita al triage, se
117 tomará una alícuota del suero obtenida previamente y almacenada en congelación,
118 para cuantificar las concentraciones de glucosa en suero. El resultado se corregirá
119 para plasma (diferencia de 1.15% más baja en suero [24]). No se incluirán pacientes
120 del sexo femenino por la posibilidad de que el perfil metabólico que se analizará de
121 forma “no dirigida” por cromatografía de gases, oscile durante el ciclo menstrual,
122 dados los cambios cíclicos en las concentraciones en suero de estrógenos y
123 progesterona, principalmente. Si esto no es considerado y se incluyen mujeres en
124 el estudio, se tendrían que incluir controles para cada fase del ciclo menstrual, lo
125 cual es poco factible.

126 **Criterios de exclusión**

127 Pacientes que no deseen participar en este estudio o en los que no se pueda
128 obtener la muestra adecuada o determinar la T.A., así como pacientes con historia
129 de enfermedades autoinmunes, comorbilidades tales como DM2, obesidad o
130 enfermedades cardiovasculares, presencia de enfermedades neoplásicas o que la
131 determinación de glucosa en el suero (para los positivos o negativos), sea mayor de
132 100 mg/dl después de su ajuste vs plasma.

133 **Criterios de eliminación**

134 Pacientes o controles reclutados en el triage, cuya glucemia en la muestra analizada
135 después del resultado del hisopado sugiera la presencia de DM-2 y cuando el
136 paciente decida voluntariamente abandonar el estudio.

137 **Grupos**

138 Asumiendo que la mayoría de los pacientes que se presenten al servicio de
139 urgencias del INCMNSZ será por condiciones clínicas de leves a graves, las
140 poblaciones que se estudiarán serán aquéllas que no ameriten internamiento
141 hospitalario: pacientes COVID-19 positivos sin comorbilidades. De acuerdo a los
142 criterios del INCMNSZ, los enfermos leves se agrupan en leves/moderados.
143 Actualmente la OMS [23], separa a estos en 2 grupos.

144 **Definiciones de acuerdo al INCMNSZ y a la OMS* (para enfermedad moderada**
145 **únicamente):**

146 Enfermedad leve: *Fiebre de 38 C o mayor, molestias faríngeas y tos seca, oximetría*
147 *>94% y/o anosmia o hiposmia o ageusia.*

148 *Enfermedad moderada: neumonía con evidencia clínica o de imagen, con fiebre, disnea,
149 tos, taquipnea >20 respiraciones/min, sin signos de neumonía severa, incluyendo SpO₂
150 ≥90% en aire ambiente. Este grupo de pacientes, es habitualmente hospitalizado en el
151 primer piso del hospital, cuando así se considera necesario. En el presente estudio,
152 únicamente se considerarán en este grupo aquéllos pacientes con clasificación inicial de
153 leve y que por agravamiento de la enfermedad regresen al INCMNSZ para re-valoración y
154 que sean ya sea internados o enviados a su domicilio pero reclasificados como moderados.

155 Enfermedad grave: *Las previas, con disnea, oximetría <93% con administración de*
156 *O₂, progresión de los infiltrados en estudio de imagen >50%, PAFI <300, frecuencia*
157 *respiratoria >30/min*

158 Enfermedad crítica: *Choque, falla orgánica o intubación orotraqueal.*

159 En cualquiera de las 2 últimas, se considerarán para el análisis biomarcadores
160 sanguíneos y bioquímicos tales como linfopenia, (<800 por 10³/microlitro)
161 alteraciones en la función hepática, elevación de DHL y de dímero-D (>1000 ng/ml),
162 elevación de 2 veces de la CPK, troponinas elevadas, ferritina en suero >300
163 microgramos/L.

164 Evolución favorable: Curación en aislamiento domiciliario, desaparición de signos y
165 síntomas en domicilio o en el hospital, alta de hospitalización y traslado a domicilio
166 u otro centro para convalecencia.

167 Evolución desfavorable: Progresión de la enfermedad leve a moderada a grave o
168 crítica.

169 Seguimiento: Curación o progresión clínica y/o bioquímica:

170 Leve → curación clínica

171 Leve → moderada→grave/crítica→muerte

172 Leve → grave/crítica→muerte

173 En los casos leves el seguimiento se realizará vía telefónica o mediante correo
174 electrónico, cada 3er. día por 14 días consecutivos. En el caso de los pacientes que
175 se hospitalicen, el seguimiento será por medio de la revisión del expediente
176 electrónico diariamente, de tal forma que en ambos casos se pueda conocer el
177 desenlace (curación, progresión, desenlace).

178

179 Los pacientes negativos a la prueba serán eliminados del estudio, por la posibilidad
180 de que sean falsos negativos. Se invitará a trabajadores del INCMNSZ negativos
181 para la prueba y asintomáticos para la enfermedad y que acepten participar en el
182 estudio como controles, lo cual facilitará su seguimiento.

183 **Número de pacientes:** Dado que no existen antecedentes experimentales para
184 este estudio “no dirigido” por cromatografía de gases, de acuerdo a lo sugerido por
185 Nyamundanda et al [25]. Se tomaron en cuenta los siguientes parámetros: 200
186 compartimentos espectrales, 20% de compartimentos experimentales significativos
187 y una tasa de falso descubrimiento del 5%. Considerando pérdidas del 10% por los
188 valores extremos, se estimó un número de 36 sujetos, 18 en cada grupo. La técnica
189 que se empleará en nuestro estudio puede analizar hasta 16 muestras diarias, lo
190 que permite aumentar el número de participantes de la siguiente forma: Suponiendo
191 que 40% de los pacientes que se envían a su casa e ingresan al estudio evolucionan
192 a moderados [23] (7 pacientes) y que el 15% evolucionan a graves [23] (N=3), se
193 añadirán 10 pacientes para un total de 38 por grupo, incluyendo a 10 sujetos
194 adicionales por grupo para la validación del sistema. Estos números son
195 conservadores considerando que un estudio reciente de proteómica y metabolómica
196 “dirigidos” reclutaron 46 COVID-19 y 53 controles, dividiendo a los enfermos en 2
197 grupos independientes añadiendo 10 pacientes para los estudios de validación [22].
198 Aquí es importante mencionar que las características de aquél estudio son
199 diferentes a las de nuestro estudio, que será “no dirigido”, con menos metabolitos
200 por analizar, pero con la ventaja de que se realizará seguimiento de la evolución de
201 leve a moderado/grave/crítico, para poder predecir factores metabólicos de riesgo,
202 que es el objetivo principal de nuestro estudio.

203 El que 73% de los pacientes que acuden al triage tengan manejo ambulatorio (por
204 ser clasificados como leves/moderados) (de 3382 pacientes examinados en el triage
205 del INCMNSZ, 2491 han sido manejados de forma ambulatoria -datos del Depto. de
206 Infectología del instituto-), hará que el reclutamiento de 38 pacientes sea altamente
207 que factible.

208 Costo del proyecto: \$30,000 pesos en total, incluyendo las determinaciones de glucosa
209 y el procedimiento de cromatografía de gases-MS

210 Incentivos: No se otorgarán incentivos económicos a los participantes. Se les informará
211 únicamente la positividad/negatividad del hisopado así como los resultados de la
212 determinación de glucosa en suero.

213 Ponderación riesgo-beneficio: El estudio es de riesgo bajo para los participantes, ya
214 que la venopunción podría provocar únicamente dolor al momento de la punción y con
215 menos frecuencia un pequeño hematoma. El beneficio potencial que se derivará de este
216 estudio será para la sociedad, ya que generará un nuevo conocimiento que consistirá
217 en la posible identificación de biomarcadores metabólicos tempranos de evolución
218 desfavorable en pacientes con enfermedad leve, que permitan intervenciones
219 aplicables al seguimiento y pronóstico de los pacientes. La relación riesgo/beneficio
220 será por lo tanto favorable.

221 **Obtención de las muestras**

222 La muestra de sangre deberá ser de aproximadamente 2 ml, obtenida por
223 venopunción de una vena antecubital en el servicio de Urgencias del INNMSZ. Se

224 obtendrá el suero (aprox. 1 ml) de cada muestra y se almacenará a -70°C hasta su
225 extracción orgánica y derivatización. El médico encargado del triage notificará a la
226 investigadora asociada al proyecto (Dra. Fernanda González Lara), cuando se
227 presente un candidato para ser invitado al estudio. Se obtendrá suero de la muestra
228 y éste será sometido a extracción orgánica en un laboratorio con nivel de
229 bioseguridad BSL-2 (Dra. Miriam Bobadilla).

230 **Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas**

231 Se seguirá un método de análisis tipo no dirigido (untargeted metabolomics) el cual
232 busca evaluar a gran escala los diferentes metabolitos de un sistema biológico en
233 una condición específica. A diferencia de los análisis dirigidos (targeted
234 metabolomics), en esta aproximación se trata de identificar un perfil de los
235 metabolitos y los resultados son semicuantitativos.

236 Utilizando este método (y después del proceso de deconvolución) se pueden
237 detectar alrededor de 120 eventos (picos en cromatograma, Fig.2) y de estos,
238 alrededor de 50 diferentes metabolitos son identificables usando la biblioteca
239 espectral NIST2.0. De entre los principales metabolitos que se pueden identificar se
240 encuentran: ácidos grasos, alcoholes, aminoácidos, hidroxiaácidos, esteroides,
241 catecolaminas, fármacos y toxinas.

242 Se realizará un análisis aleatorizado donde cada 10 muestra y se intercalará una
243 poza consistente en un volumen fijo de cada una de las muestras por analizar, con
244 el fin de realizar el proceso de normalización de los datos.

245

246 **Análisis de datos**

247 Los cromatogramas serán analizados con el software Mzmine2.53, donde se
248 realizará el proceso de deconvolución y normalización. Se compararán las alturas
249 cromatográficas de los metabolitos detectados (t-student con un nivel de
250 significancia $p < 0.05$) y se utilizará el software MetaboAnalyst (versión 3.0)
251 para identificar las vías metabólicas y las posibles enzimas involucradas en los
252 cambios. A partir de los datos recabados, se realizarán dos análisis multivariados:
253 cluster jerárquico y análisis de componentes principales (PCA) con los
254 metabolitos que se encuentren englobados dentro de las categorías mencionadas
255 anteriormente. Las técnicas multivariadas podrán identificar grupos extra que
256 podrían contener a los co-infectados para considerar el impacto de frecuencia de
257 co-infección de SARS-CoV-2 con otros virus [aprox. 10.7% de co-infección con
258 adenovirus, rinovirus, virus sincicial respiratorio, influenza B y coronavirus hku1 en
259 el INCMNSZ (información obtenida del Depto. de Infectología del INCMNSZ al 1º.
260 de mayo del 2020 en 824 pacientes con infección por SARS-CoV2)]

261

262

263 **Preparación de las muestras**

264 Cantidad mínima de muestra: 65 µL de suero. Una vez obtenido el suero, se
265 congelará a -70 °C hasta su purificación. En un tubo de 1.5 mL se agregarán 50 µL
266 de plasma (descongelado a temperatura ambiente) y se añadirán 150 µL de una
267 mezcla metanol-cloroformo (3:1, v/v) y 10 µL de estándar interno (1mg/mL de 5α-
268 colestano, 1mg/mL metiltricosanoato, 1mg/mL ácido tridecanoico). La mezcla
269 anterior se incubará a -20° C por 20 minutos. Posteriormente, se centrifugará a
270 14000 g a 4° C por 15 minutos y se transferirán 160 µL del sobrenadante a un tubo
271 de microcentrifuga de 1.5 mL. Se evaporará la muestra mediante speedvac durante
272 2 horas hasta desecación. Posteriormente se añadirán 80 µL de clorhidrato de
273 metoxiamina en piridina (40 mg/mL) y se incubará en un agitador con calentamiento
274 a 37 °C durante 90 min. Después del periodo de incubación, la muestra se secará
275 en speedvac durante 1 hora y se añadirán 80 µL de BSTFA 1% TMCS, incubándose
276 a 37°C por 30 minutos. Posteriormente se centrifuga a 14000 rpm durante 1 minuto.
277 Finalmente, el sobrenadante se transferirá a un inserto de vidrio de 200 µL y se
278 inyectará al cromatógrafo bajo las siguientes especificaciones (Tablas 1 y 2):
279

Tabla 1.- Parámetros uso GC/MS			
Temperatura del inlet	200 °C	Sistema de Inyeccion	Automático G4513A
Temperatura del cuadrupolo	150 °C	Tipo de inyección	Estándar
Temperatura de la fuente	230 °C	Volumen de Inyección	1 µL
Velocidad de Flujo	1 mL/min	Splitless	

280 La corrida cromatográfica será de 37.5 minutos totales y consistirá en el siguiente
281 programa de temperaturas (Tabla 2).

282

Tabla 2.- Corrida cromatográfica			
Velocidad °C/min	Temperatura	Tiempo mantenido	Tiempo de corrida
Inicial	60	1	1
10	325	10	37.5

283

284 **Resultados esperados**

285 Se muestra un cromatograma de un paciente sano empleando la técnica descrita
286 en la sección de métodos (Fig.2). Los metabolitos detectados fueron los siguientes:

2-ácido aminobutírico	Acido aspártico	Ácido glioxílico
5-oxo-prolina	Acido benzoico	Acido glutámico
Ácido adípico	Ácido cítrico	Ácido isobutírico
Ácido araquídico	Ácido glicólico	Ácido isovalérico

Ácido ketoisocapróico	Ácido úrico	Lantionina
Ácido láctico	Adenosina	Leucina
Ácido málico	Alanina	Lisina
Ácido malónico	Cisteína	Metionina
Ácido mirístico	Colesterol	Mio-inositol
Ácido octadecanoico	Creatinina	Norleucina
Ácido octanoico	Cys-GlyD	Ornitina
Ácido oléico	Fenilalanina	Prolina
Ácido oxálico	Galactosa	Serina
Ácido palmítico	Glicerol	Tirosina
Ácido pantoténico	Glicina	Treitól
Ácido pentadecanoico	Glucosa	Treonina
Ácido pirúvico	Glutamina	Urea
Ácido succínico	Homocistina	Valina
Ácido tetradecanoico	Hidroxiprolina	

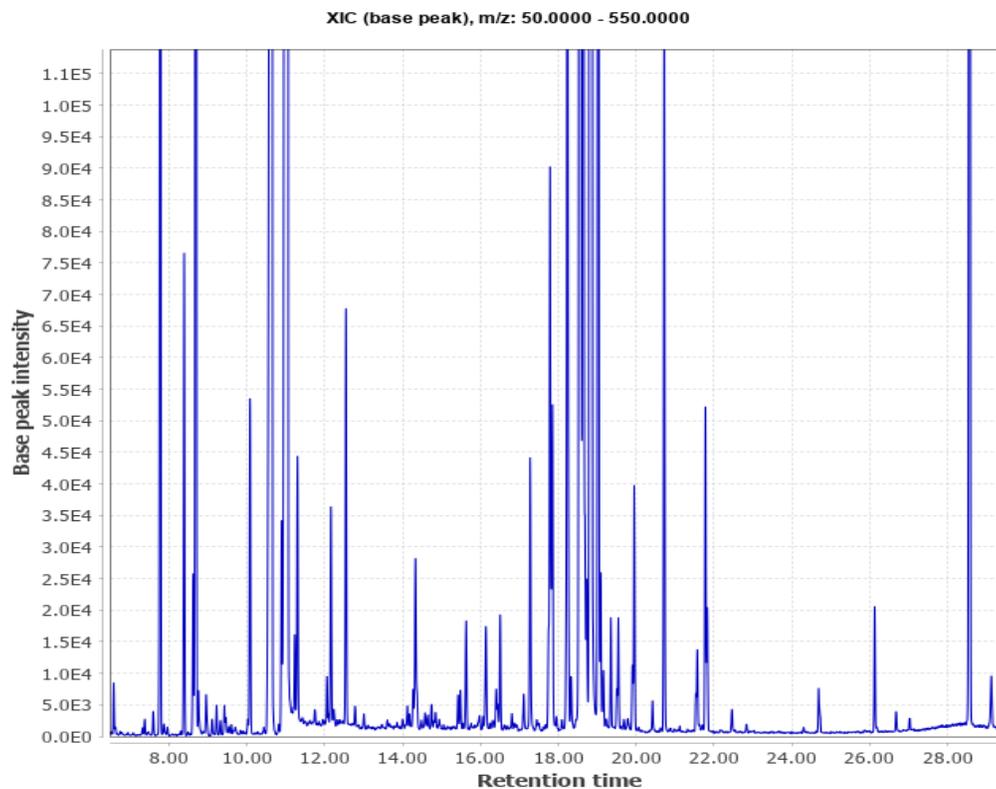


Figura 2. Cromatograma de una muestra de suero de un individuo sano.

Bibliografía:

- [1] M. A. Lake, "What we know so far: COVID-19 current clinical knowledge and

- research.," *Clin. Med.*, pp. 124–127, 2020.
- [2] J. Yang *et al.*, "Prevalence of comorbidities in the novel Wuhan coronavirus (COVID-19) infection: a systematic review and meta-analysis," *Int. J. Infect. Dis.*, 2020.
 - [3] F. Zhou *et al.*, "Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study," *Lancet*, vol. 395, no. 10229, pp. 1054–1062, 2020.
 - [4] X. Wang *et al.*, "Comorbid Chronic Diseases and Acute Organ Injuries Are Strongly Correlated with Disease Severity and Mortality among COVID-19 Patients: A Systemic Review and Meta-Analysis," *Research*, vol. 2020, pp. 1–17, 2020.
 - [5] O. Article, "Analysis on 54 mortality cases of Coronavirus disease 2019 in the Republic of Korea from January 19 to March 10, 2020," *J. Korean Med. Sci.*, vol. 35, no. 12, pp. 1–9, 2020.
 - [6] Q. Ruan, K. Yang, W. Wang, L. Jiang, and J. Song, "Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China," *Intensive Care Med.*, vol. 46, no. 5, pp. 846–848, 2020.
 - [7] Y. Chen, M. Zhao, Y. Wu, and S. Zang, "Epidemiological analysis of the early 38 fatalities in Hubei, China, of the coronavirus disease 2019," *J. Glob. Health*, vol. 10, no. 1, pp. 1–9, 2020.
 - [8] G. Zhang *et al.*, "Clinical features and short-term outcomes of 221 patients with COVID-19 in Wuhan, China," *J. Clin. Virol.*, vol. 127, 2020.
 - [9] K. A. Kulcsar, C. M. Coleman, S. E. Beck, and M. B. Frieman, "Comorbid diabetes results in immune dysregulation and enhanced disease severity following MERS-CoV infection," *JCI Insight*, vol. 4, no. 20, 2019.
 - [10] S. Ferlita *et al.*, "Type 2 Diabetes Mellitus and Altered Immune System Leading to Susceptibility to Pathogens, Especially Mycobacterium tuberculosis," *J. Clin. Med.*, vol. 8, no. 12, p. 2219, 2019.
 - [11] J. R. Petrie, T. J. Guzik, and R. M. Touyz, "Diabetes, Hypertension, and Cardiovascular Disease: Clinical Insights and Vascular Mechanisms," *Can. J. Cardiol.*, vol. 34, no. 5, pp. 575–584, 2018.
 - [12] B. H. Goodpaster and L. M. Sparks, "Metabolic Flexibility in Health and Disease," *Cell Metab.*, vol. 25, no. 5, pp. 1027–1036, 2017.
 - [13] A. Ferrarini *et al.*, "Discriminant biomarkers of acute respiratory distress syndrome associated to H1N1 influenza identified by metabolomics HPLC-QTOF-MS/MS platform," *Electrophoresis*, vol. 38, no. 18, pp. 2341–2348, 2017.
 - [14] J. L. Izquierdo-Garcia *et al.*, "Metabolomic profile of ards by nuclear magnetic resonance spectroscopy in patients with h1n1 influenza virus pneumonia,"

Shock, vol. 50, no. 5, pp. 504–510, 2018.

- [15] K. N. Turi *et al.*, “Using urine metabolomics to understand the pathogenesis of infant respiratory syncytial virus (RSV) infection and its role in childhood wheezing,” *Metabolomics*, vol. 14, no. 10, p. 0, 2018.
- [16] D. Antcliffe, B. Jiménez, K. Veselkov, E. Holmes, and A. C. Gordon, “Metabolic Profiling in Patients with Pneumonia on Intensive Care,” *EBioMedicine*, vol. 18, pp. 244–253, 2017.
- [17] N. A. Dang, H. G. Janssen, and A. H. J. Kolk, “Rapid diagnosis of TB using GC-MS and chemometrics,” *Bioanalysis*, vol. 5, no. 24, pp. 3079–3097, 2013.
- [18] M. M. Banoei *et al.*, “Plasma metabolomics for the diagnosis and prognosis of H1N1 influenza pneumonia,” *Crit. Care*, vol. 21, no. 1, pp. 1–15, 2017.
- [19] J. H. Tanne, “Covid-19: FDA approves use of convalescent plasma to treat critically ill patients,” *BMJ*, vol. 368, no. March, p. m1256, 2020.
- [20] M. Rojas *et al.*, “Autoimmunity Reviews Convalescent plasma in Covid-19 : Possible mechanisms of action,” *Autoimmun. Rev.*, no. April, p. 102554, 2020.
- [21] J. S. Ayres, “Immunometabolism of infections,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 20, no. 2, pp. 79–80, 2020.
- [22] B. Shen *et al.*, “Proteomic and Metabolomic Characterization of COVID-19 Patient Sera,” *Cell*, Jun. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.032>
- [23] WHO. “Clinical management of COVID-19: interim guidance, 27 May 2020,” World Health Organization, 2020. WHO/2019-nCoV/clinical/2020.5
- [24] E. A. Frank, M. C. Shubha, and C. J. M. D’Souza, “Blood glucose determination: Plasma or serum?,” *J. Clin. Lab. Anal.*, vol. 26, no. 5, pp. 317–320, 2012.
- [25] G. Nyamundanda, I. C. Gormley, Y. Fan, W. M. Gallagher, and L. Brennan, “MetSizeR: Selecting the optimal sample size for metabolomic studies using an analysis based approach,” *BMC Bioinformatics*, vol. 14, no. 1, pp. 1–8, 2013.

Anexo 1

Proceso de estandarización del método de análisis.

Se utilizaron dos métodos de extracción para purificar los metabolitos de una muestra de suero. En la figura 1 se muestran los cromatogramas obtenidos con cada extracción. En rojo se utilizó una mezcla de metanol-cloroformo (3:1) y en azul una mezcla metanol-cloroformo-H₂O (8:4:3). La cantidad de picos cromatográficos y metabolitos detectados es menor utilizando la extracción de metanol-cloroformo-H₂O por lo que se optó por el método de metanol-cloroformo.

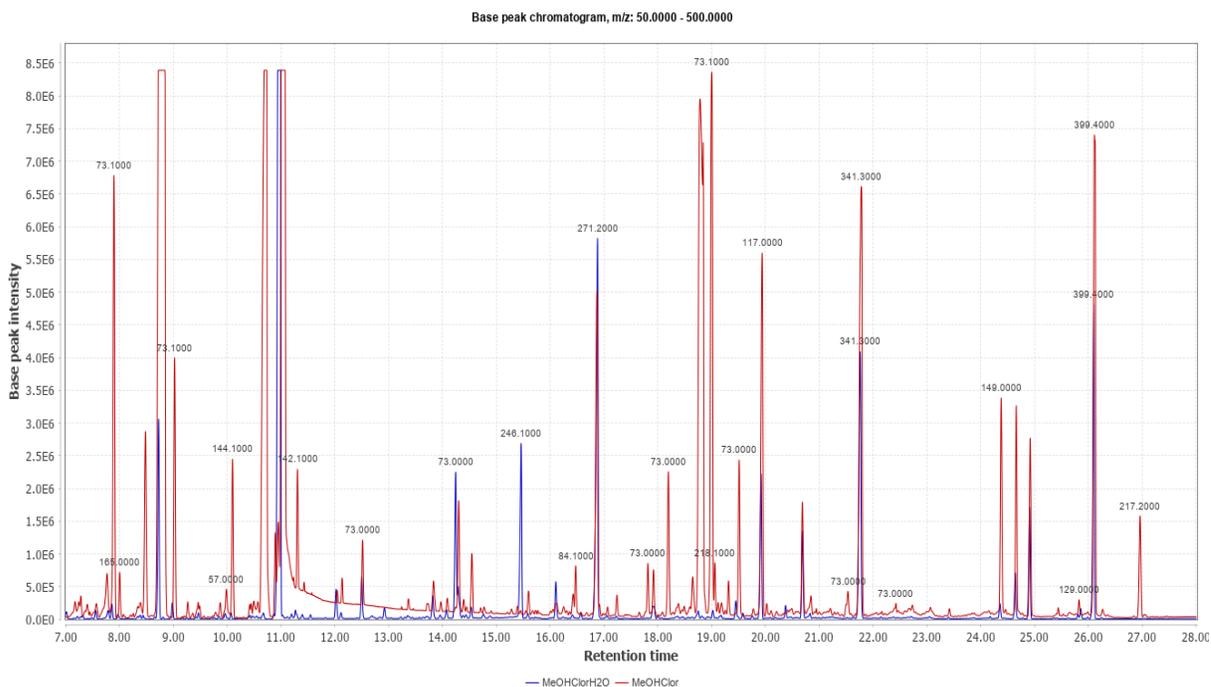


Fig.1. Cromatograma con muestras extraídas por medio de diferentes métodos de extracción. Picos detectados: Rojo 222 vs Azul 123. Número de metabolitos detectados: Rojo 53 vs Azul 22

Una vez establecido el método de extracción adecuado, se determinó la desviación estándar relativa (RSD) para el análisis cromatográfico (GC/MS). Se obtuvieron valores de variación de inyecciones múltiples continuas (de una misma muestra) menores al 10%. Estos datos demuestran que el método de análisis cromatográfico es reproducible a lo largo del tiempo de análisis (Fig. 2). Aquellos metabolitos que

debido a su estabilidad varíen en más del 20% son removidos del análisis (flechas rojas en Fig. 2).

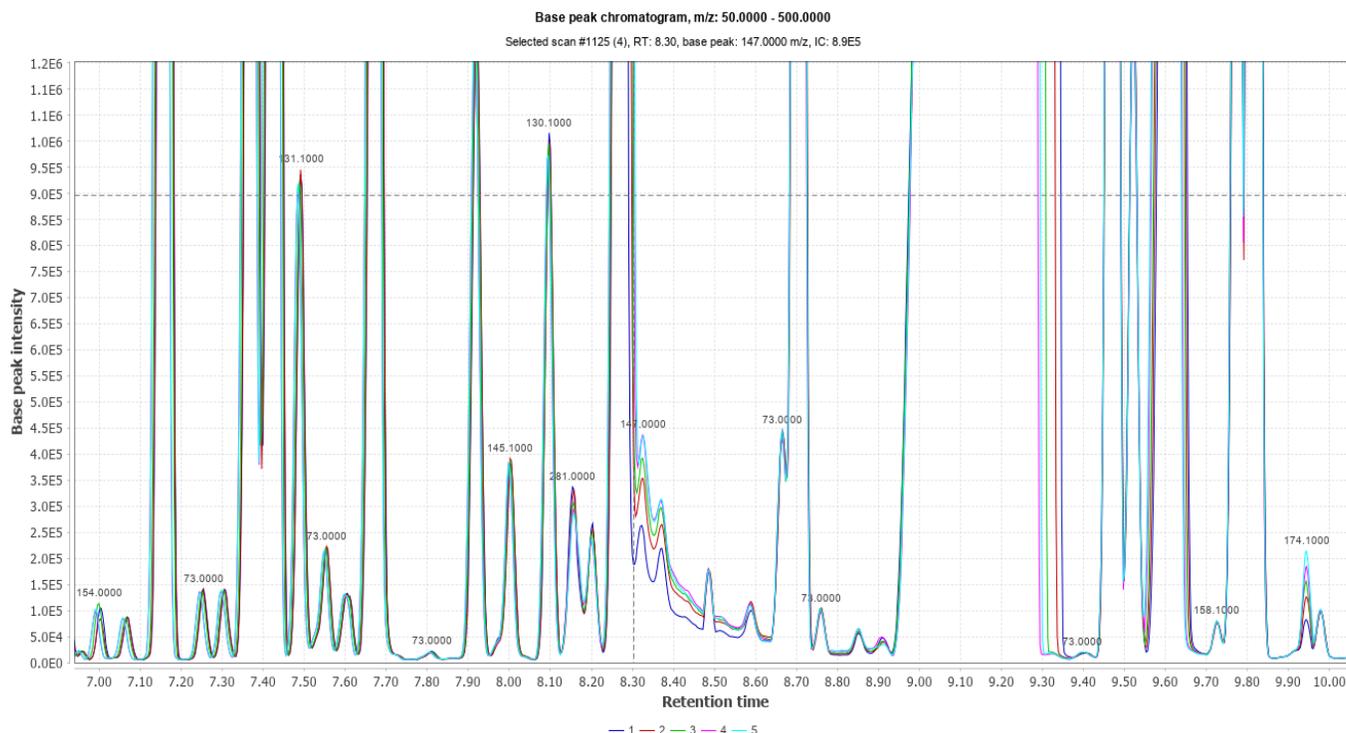


Fig.2. Cromatogramas de inyecciones continuas de una misma muestra de análisis (min 7-10).

Asimismo, se determinó el %RSD entre réplicas analíticas. Se inyectaron por duplicado tres muestras analíticas que fueron purificadas y derivatizadas de manera independiente. Un método idóneo para análisis del tipo no dirigido (untargeted metabolomics) requiere un RSD menor al 30% para los metabolitos detectados [1]. Con el método utilizado, se obtuvieron en promedio valores de %RSD menores al 12%. Aquellos analitos que varían en más del 30% son excluidos del análisis (flechas rojas en Fig.3) Estos resultados nos muestran que para la mayoría de los metabolitos detectados, el método de extracción y derivatización es adecuado (RSD<30% - Figura 3 y Tabla 1).

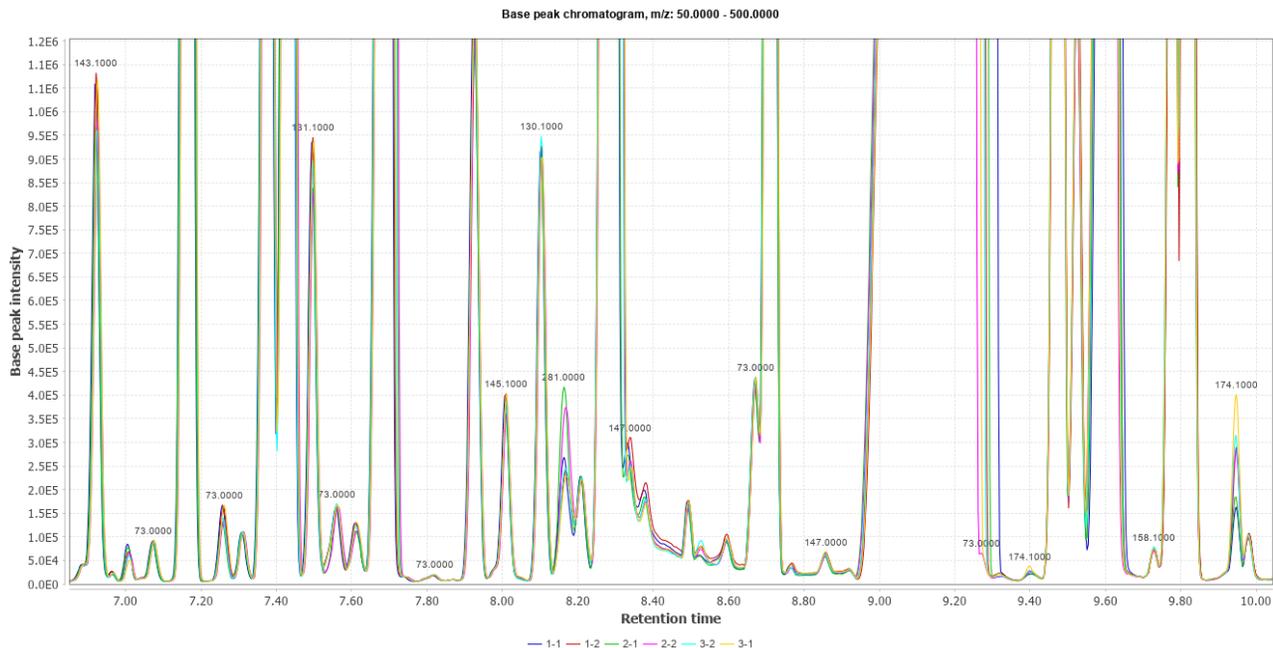


Fig. 3. Cromatograma de tres muestras de suero extraídas y derivatizadas de manera independiente (inyectadas por duplicado).

Se muestran las identificaciones y las alturas de pico cromatográficas para los metabolitos detectados en el cromatograma de la Fig.2.

Tabla 1. Alturas cromatográficas (cuentas por segundo) para los metabolitos detectados en Fig.2.
Librería NIST 2.0 - Probability>80%.

Metabolito	Muestra 1-1	Muestra 1-2	Muestra 2-1	Muestra 2-2	Muestra 3-1	Muestra 3-2	Media	DE	% RSD*
5-hydroxypentanoic acid	49416.45	50192.00	44544.00	45616.00	39960.00	46472.00	46033.41	3371.70	7.32
Ethyl pipercolinate	75559.98	77903.97	73727.97	73695.97	65559.97	76511.97	73826.64	3983.40	5.40
Glyceric Acid	134592.00	137280.00	122536.00	125352.00	114064.00	138048.00	128645.33	8747.53	6.80
Nonanoic Acid	818624.00	856960.00	825216.00	827392.00	702848.00	834688.00	810954.67	49831.72	6.14
2,3-Dihydroxybutanoic acid (2)	145385.05	149448.57	128895.08	129933.85	119520.19	135467.42	134775.03	10157.80	7.54
Serine	2498556.42	2527229.56	2405884.74	2384380.88	2246140.83	2526716.37	2431484.80	99967.70	4.11
Threonine	2469376.00	2625536.00	2400256.00	2394624.00	2359296.00	2729984.00	2496512.00	135626.54	5.43
3,4-dihydroxybutanoic acid	60520.00	59144.00	52336.00	52472.00	49696.00	53976.00	54690.67	3867.34	7.07
Malic Acid	139839.62	138047.63	99087.89	99680.00	93639.71	98799.89	111515.79	19501.98	17.49
5-oxo proline	2109951.59	2081791.76	2009599.71	1981437.43	1982975.84	2068991.74	2039124.68	50135.16	2.46
4-hydroxyproline	336566.42	342450.25	327018.22	324662.27	317030.25	345468.59	332199.33	10115.82	3.05
Threonic Acid	145737.13	158549.45	115048.00	113013.22	110951.07	122328.00	127604.48	18083.75	14.17
Cystein	219391.75	228479.75	266815.72	257279.74	294975.61	312751.18	263282.29	33260.96	12.63
Creatinine	331199.75	345782.72	419007.21	432703.56	393726.53	479486.09	400317.64	50761.82	12.68
Erythronic Acid	98504.00	96670.40	348811.74	71952.00	112560.00	130632.00	143188.36	93641.13	65.40
alpha-Ketoglutaric acid	138464.54	142139.94	132642.72	132689.02	121095.16	134848.00	133646.57	6535.24	4.89

Ornithine	1210879.75	1127423.74	1028672.00	913728.00	1099264.00	1019328.00	1066549.25	93653.72	8.78
Glutamic Acid	399103.60	405823.60	395840.00	390144.00	381824.00	424575.98	399551.86	13430.72	3.36
Phenylalanine 2TMS	1333758.52	1373695.21	1310719.19	1292799.17	1233407.75	1293959.68	1306389.92	42746.15	3.27
Taurine	0.00	78919.91	69087.91	85503.89	63527.86	95135.88	65362.57	30998.48	47.43
Asparagine	200208.63	190829.93	172067.17	172068.73	219780.17	208077.07	193838.62	17669.42	9.12
Lysine	1805135.45	1612452.09	1646377.67	1409669.10	1698235.35	1533235.98	1617517.61	124417.82	7.69

*Desviación estándar relativa

Conclusión

Los métodos de extracción, derivatización y análisis cromatográficos son adecuados para realizar el análisis tipo no dirigido (untargeted metabolomics) de metabolitos séricos.

Bibliografía

- 1.- Fiehn, O. Metabolomics by Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Combined Targeted and Untargeted Profiling. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **114**, 30.4.1-30.4.32 (2016).