

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos Autor.

CICESE@ 2022. Todos los derechos reservados

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Ciencias de la Vida
con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología**

**Estudio de las perturbaciones moleculares en el humano por la
enfermedad del coronavirus (COVID-19) a través de la
metabolómica y quimioinformática**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Rommel Alejandro Carballo Castañeda

Ensenada, Baja California, México
2022

Tesis defendida por
Rommel Alejandro Carballo Castañeda

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Aldo Moreno Ulloa

Director de tesis

Dra. Carolina Álvarez Delgado

Dra. Mónica Elizabeth Tentori Espinosa



Dra. Ana Denise Re Araujo

Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dr. Pedro Negrete Regagnon

Director de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Rommel Alejandro Carballo Castañeda** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida [con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología](#)

Estudio de las perturbaciones moleculares en el humano por la enfermedad del coronavirus (COVID-19) a través de la metabolómica y quimioinformática

Resumen aprobado por:

Dr. Aldo Moreno Ulloa
Director de tesis

En 2019 surgió un nuevo coronavirus denominado SARS-CoV-2, el agente causal de la enfermedad del coronavirus o COVID-19. A pesar de la vacunación y del tratamiento con fármacos antivirales, algunos sujetos experimentan síntomas severos y mueren. Estudios sugieren que la respuesta del hospedero (principalmente aquella del sistema inmune) contribuye al desarrollo de las complicaciones observadas. Sin embargo, poco se conoce de las perturbaciones que la patología causa en sistemas y órganos, más allá del sistema inmune. En este trabajo se propuso estudiar las perturbaciones moleculares que los sujetos con la COVID-19 experimentan comparado con sujetos sin la enfermedad, a través de una aproximación metabolómica. El proyecto consistió en la realización de un estudio piloto conformado por dos cohortes; 14 sujetos hospitalizados con diagnóstico de la COVID-19 (prueba positiva al SARS-CoV-2 por RT-PCR; denominados como “pacientes”) y 10 sujetos sin sintomatología de la enfermedad (trabajadores del hospital; denominados como “grupo control”). Muestras de plasma y orina de ambas cohortes fueron recolectadas para ser analizadas por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS2), quimioinformática y análisis estadísticos univariantes y multivariantes. No se observaron diferencias significativas entre las variables clínicas y demográficas entre ambas cohortes. De manera general, los resultados sugieren un mayor cambio en el metaboloma (conjunto de metabolitos) de la orina entre pacientes y sujetos sanos, mientras que el metaboloma del plasma distingue mejor a los pacientes con y sin ventilación mecánica. El análisis de enriquecimiento químico indica alteraciones en metabolitos asignados a las clases químicas de los oligopéptidos, péptidos cíclicos y las lisofosfatidilcolinas en pacientes, mientras que los oligopéptidos únicamente estuvieron enriquecidos en pacientes con ventilación mecánica. Particularmente, se encontró una alteración en los niveles (i.e., reducción) de metabolitos de la familia de las cininas (i.e., bradicinina, neurocinina y sustancia P) en pacientes, las cuales participan en la homeostasis del sistema circulatorio. En conclusión, los resultados de este estudio sugieren que los sujetos con la COVID-19 presentan alteraciones en el metabolismo, con mayor notoriedad en la orina, que pudiesen contribuir en el desarrollo de patologías del sistema cardiovascular.

Palabras clave: COVID-19, metabolómica, quimioinformática, espectrometría de masas

Abstract of the thesis presented by **Rommel Alejandro Carballo Castañeda** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in Biomedicine and Bionanotechnology

Study of molecular perturbations in humans by coronavirus disease (COVID-19) through metabolomics and cheminformatics

Abstract approved by:

Aldo Moreno Ulloa, PhD
Thesis Director

In 2019 a novel coronavirus originated named SARS-CoV-2, the causal agent of the coronavirus disease or COVID-19. Despite vaccination and antiviral drug therapy, some subjects diagnosed with COVID-19 still develop severe symptoms and die. Studies suggest that the host's response (principally that of the immune system) contributes to the development of the observed complications. Nevertheless, little is known about the molecular perturbations the pathology causes in organs and systems beyond the immune system. In this work, we proposed to study the molecular perturbations that subjects with COVID-19 present compared to subjects without the disease through a metabolomics approach. The project consisted of a pilot study comprising two cohorts; 14 hospitalized subjects diagnosed with COVID-19 (positive test to SARS-CoV-2 by RT-PCR; referred to as "patients") and 10 subjects without symptomatology (medical professionals; referred to as "control group"). Plasma and urine samples from both cohorts were collected for liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS2), chemoinformatic, and univariant and multivariant statistical analyses. No significant differences in clinical and demographic variables were noted among cohorts. Globally, results suggest a major change in the urine metabolome (group of metabolites) between patients and the control group, while the plasma metabolome better distinguishes patients with mechanical ventilation versus those without. Chemical enrichment analysis indicates alterations of metabolites classified as oligopeptides, cyclic peptides, and lysophosphatidylcholines in patients, while oligopeptides were uniquely enriched in mechanically ventilated patients. Particularly, we found altered levels (i.e., reduction) of metabolites from the kinin family (i.e., bradykinin, neurokinin, and substance P) that participate in the circulatory system homeostasis. In conclusion, the results suggest that subjects with COVID-19 present alterations in the metabolism, better observed in the urine, that could contribute to developing cardiovascular disease.

Keywords: COVID-19, metabolomics, cheminformatics, mass spectrometry

Dedicatoria

A mi tío, el Dr. Germán Valenzuela, que partió de este mundo durante la realización de este trabajo. Más allá de haber sido un excelente médico, con ética profesional y vasto conocimiento, fue un gran tío, padre, abuelo, y ser humano. Toda la familia lo recordaremos con cariño.

Agradecimientos

Agradezco al Conacyt por brindarme la oportunidad de estudiar un posgrado con el apoyo económico de la beca de maestría (CVU No. 1037209). También agradezco a CICESE y al Departamento de Innovación Biomédica por brindarme un espacio en sus instalaciones de nivel internacional.

A mis padres por apoyarme en mis estudios, darme un espacio en su casa cuando voy de visita y apoyarme en lo que pueden. Siempre los tengo presentes.

Al Dr. Aldo Moreno Ulloa, por su paciencia, enseñanza y tiempo de calidad como mentor, por su guía a lo largo de estos años y por apoyarme en mi desarrollo tanto profesional como personal.

A mis compañeros del Laboratorio MS2: Alan, Brandon, Jhordan, los cuales además de aprender de espectrometría de masas, metabolómica y análisis de datos, aprendí sobre la vida y cómo desenvolverme mejor en ella, además del apoyo cuando lo necesitaba.

A mis compañeros del posgrado, que fue un honor tanto tomar clases como convivir con ellos. Agradezco también a Anaíd, a Edna y a Sandra por permitirme participar en sus proyectos de posgrado. Me vi rodeado de mentes brillantes y aprendí mucho de ustedes.

A mis amigos de maestría: Eréndira, Jorge, Gabriela, David, Iván, y muchos más, que compartieron momentos muy bellos conmigo y pláticas tanto interesantes como emocionantes. Les agradezco mucho y les deseo un futuro exitoso y feliz.

A mi familia en Ensenada: mis tíos Ramón y Nora, mi tía Susana y mi prima Ximena y mi primo Alejandro, que no me han dejado solo durante mi estancia en Ensenada. Gracias tanto por darme tanto un espacio en su hogar como su apoyo, y por enseñarme siempre que la familia es primero.

A mis compañeros de casa: mis primos Horachek y Román, Carlos y Daniel, que estuvieron conmigo durante mi maestría, pasamos momentos divertidos y aprendí cosas que la escuela no me podría enseñar.

Por último, agradezco a quien, si no fuera por ella, no hubiera podido ni comenzar este posgrado: A mi amada abuela Sol, que me apoyó y me sigue apoyando en mis estudios. No hay forma de agradecer todo lo que has hecho por mí.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	ix
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.1.1 Enfermedad del coronavirus.....	1
1.1.2 Metabolómica.....	3
1.1.3 Herramientas utilizadas para el estudio del metaboloma.....	3
1.1.4 Metabolómica aplicada al estudio de la COVID-19.....	4
1.2 Justificación.....	6
1.3 Hipótesis.....	6
1.4 Objetivos.....	7
1.4.1 Objetivo general.....	7
1.4.2 Objetivos específicos.....	7
Capítulo 2. Metodología.....	8
2.1 Obtención de las muestras.....	8
2.2 Preparación de las muestras.....	9
2.3 Detección de RNA viral.....	9
2.4 Adquisición de datos por LC-MS/MS.....	10
2.5 Procesamiento de datos.....	11
2.6 Análisis estadístico.....	12
Capítulo 3. Resultados.....	14
Capítulo 4. Discusión.....	19
Capítulo 5. Conclusiones.....	25

Literatura citada	27
Anexos	35

Lista de figuras

Figura	Página
1. Esquema general de la metodología propuesta. Modificada de Moreno-Ulloa.....	8
2. Esquema general propuesto a seguir para el procesamiento de muestras y análisis de datos. Creada parcialmente con ChemDraw.....	11
3. Perspectivas de futuro sobre la aplicación del conocimiento generado en este estudio. Modificada de Moreno-Ulloa	13
4. Análisis de componentes principales (PCA) de los sets de datos de las cohortes por muestra. Los datos fueron transformados a escala logarítmica sin escalar. Las áreas sombreadas representan los intervalos del 95% de confianza	14
5. Representación de tipo volcán de los metabolitos cuantificados en plasma y orina entre los sujetos con la COVID-19 y sin la enfermedad. Aquellos que mostraron diferencias en abundancia (valores de corte: cambio $> \pm 50\%$, $p < 0.05$) se marcaron en azul; los que no cambian, en rojo	16
6. Representación de tipo volcán de los metabolitos cuantificados en plasma y orina entre los sujetos con la COVID-19 con y sin necesidad de ventilación mecánica. Aquellos que mostraron diferencias en abundancia (valores de corte: cambio $> \pm 50\%$, $p < 0.05$) se marcaron en azul; los que no cambian, en rojo.....	17
7. Análisis de enriquecimiento químico por comparación: COVID-19 y control (izquierda), y ventilados y no ventilados (derecha)	18
8. Efecto de la COVID-19 sobre otros metabolitos. Los resultados se muestran en promedios y rangos intercuantiles y se proyectan como diagramas de caja	18
9. Degradación de cininas alteradas en COVID-19. (A) Rutas de degradación de bradicinina (BK), neurocinina A (NKA) y la sustancia P (SP). Los cuadros encierran los fragmentos detectados. Aquellos en rojo o en azul indican que aumentan o disminuyen, respectivamente). (B) Vías de señalización promovidas por BK (amarillo), desarginina – 9 bradicinina (des-R9-BK) (naranja), NKA (rojo) y SP (amarillo). En azul se muestran segundos mensajeros y en verde la función biológica desencadenada. Creada parcialmente con Cytoscape, Bioicons y ChemDraw.....	21
10. Resumen gráfico de la metodología y los resultados del proyecto. Creada parcialmente con Bioicons y ChemDraw	26
11. Análisis de componentes principales de los sets de datos por muestra de distintas cohortes. Las cohortes se asignaron con base en la clasificación de COVID-19 por la OMS, de SIRA y por género. Los datos fueron transformados a escala logarítmica sin escalar. Las áreas sombreadas representan los intervalos del 95% de confianza	45
12. Clases químicas totales (predichas por CANOPUS) detectadas en las distintas muestras de plasma y orina.....	46

Lista de tablas

Tabla	Página
1. Clasificación clínica de la COVID-19 con base en los criterios de la OMS.....	2
2. Características clínicas y demográficas de los sujetos del estudio.	15
3. Parámetros utilizados en la selección de picos por MZmine 2.53.	35
4. Lista de anotaciones putativas de metabolitos diferencialmente abundantes en COVID-19 por muestra y cohorte. Las estructuras anotadas como <i>metabolite</i> fueron asignadas por KEGG MINE como metabolitos teóricos del compuesto original.....	36

Capítulo 1. Introducción

1.1 Antecedentes

1.1.1 Enfermedad del coronavirus

La enfermedad del coronavirus, o COVID-19 por sus siglas en inglés (*Coronavirus Disease 2019*), es una enfermedad infecciosa descrita por primera vez a finales del 2019 en un brote en la ciudad de Wuhan, República Popular China (F. Wu et al., 2020; Zhou et al., 2020). Después de su aparición, la COVID-19 generó una pandemia que repercutió negativamente en los sistemas de salud públicos y la economía global (Shrestha et al., 2020). El agente etiológico es el virus SARS-CoV-2, un virus de la familia *Coronaviridae*, la misma que incluye otros virus causantes de brotes pandémicos como SARS-CoV y MERS-CoV (Gorbalenya et al., 2020).

La sintomatología abarca desde fiebre, tos seca o dolor de garganta, comunes en enfermedades respiratorias; síntomas peculiares como la pérdida del gusto y olfato; hasta dificultad respiratoria e hipoxia, que en los casos más graves requieren terapias intensivas con suplementación de oxígeno o ventilación mecánica (Wiersinga et al., 2020). La clasificación de la enfermedad se basa en su gravedad, reflejada en las manifestaciones clínicas. La **Tabla 1** expone las clasificaciones de la enfermedad basadas en la guía clínica en línea de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (WHO (World Health Organization), 2021)

Las vías de transmisión involucran tanto directas, como la exposición a gotas de saliva en la interacción cercana entre personas; como indirectas, que incluye los fómites y la vía aérea. La vía directa se basa en la exposición a gotas respiratorias cuando una persona habla, tose, estornuda, canta, entre otras acciones. Estas llegan a un máximo aproximado de 2 metros desde la fuente y no permanecen suspendidas en el ambiente por mucho tiempo. La vía indirecta comienza cuando las gotas caen en superficies u objetos, éstos son tocados por una persona y se transfiere el virus al tocarse la boca, la nariz o los ojos. Además, aerosoles que quedan suspendidos por un tiempo considerable (hasta tres horas) en lugares sin ventilación se pueden respirar aún a distancia considerable de la fuente (hasta ocho metros). Debido a esto, las principales intervenciones no farmacológicas para prevenir la infección son el uso de mascarillas, el lavado

de manos y superficies, el distanciamiento social y la ventilación de espacios cerrados, entre otros (Lotfi et al., 2020; Tellier, 2022).

Tabla 1. Clasificación clínica de la COVID-19 con base en los criterios de la OMS.

Clasificación clínica	Descripción general
Leve	Paciente sintomático sin evidencia de neumonía viral o hipoxia.
Moderado (Neumonía)	Paciente con signos de neumonía (fiebre, tos, disnea, respiración rápida) y saturación de oxígeno (SpO_2) $\geq 95\%$ ($\geq 90\%$ en pacientes con enfermedad pulmonar crónica).
Severo (Neumonía severa)	Paciente con signos de neumonía y uno de los siguientes: <ul style="list-style-type: none"> • Tasa respiratoria > 30 respiraciones/min • Estrés respiratorio severo • $SpO_2 < 90\%$
Crítico (Síndrome de dificultad respiratoria aguda o SDRA)	Paciente con neumonía, por lo general después de una semana de manifestación, con síntomas respiratorios nuevos o peores. Infiltrado pulmonar sin explicación fuera de infección viral, cociente de presión parcial de oxígeno arterial/fracción de oxígeno inspirado (PaO_2/FiO_2) ≤ 300 mmHg.

Para el diagnóstico a través de pruebas de laboratorio, existen distintas técnicas con dos enfoques principales: la detección directa del virus y la respuesta inmunológica al virus. El primer enfoque tiene como principal herramienta a la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR), la cual detecta el genoma viral de RNA monocatenario positivo, y se destaca por su sensibilidad sobresaliente (Corman et al., 2020). Por otro lado, la detección de antígenos virales tiene como objetivo la detección de proteínas de la cápside, y tiene como ventaja su menor costo y tiempo de obtención de resultados que la RT-PCR, aunque menor sensibilidad (Linares et al., 2020). El segundo enfoque involucra la detección de entidades del sistema inmunológico, principalmente anticuerpos, generados como respuesta al virus. Esto permite indicar tanto una posible infección pasada como potencial protección contra el virus (Zhao et al., 2020), que a pesar de la reducción de anticuerpos con el tiempo, la respuesta inmunológica al virus permanece gracias a la inmunidad celular (Zuo et al., 2021). Al final, cualquier resultado que se obtenga de las pruebas se debe de acompañar de una interpretación clínica hecha por un profesional de la salud (Asai, 2021).

1.1.2 Metabolómica

La metabolómica es el estudio a gran escala de los metabolitos, moléculas químicamente diversas que conforman el metabolismo, en un momento y condición determinados, y a este conjunto de metabolitos se le denomina metaboloma. El metaboloma refleja la fisiología de los sistemas biológicos a nivel de las pequeñas moléculas (<1500 Da) (Bujak et al., 2015), las cuales tienen funciones bioenergéticas (Balcke et al., 2011), estructurales (Kus et al., 2018) y de señalización (Cui et al., 2016). Es descrito como el último nivel de respuesta a los cambios genéticos (endógenos) y ambientales (exógenos) (Fiehn, 2002).

La metabolómica tiene dos enfoques principales: el primero es el dirigido, que consiste en la cuantificación absoluta de metabolitos con el uso de estándares. Esto nos permite responder preguntas sobre cambios en las concentraciones absolutas de estos metabolitos, útil para entender el efecto de alguna condición o perturbación sobre rutas metabólicas con funciones biológicas conocidas. Sin embargo, limita el estudio del metaboloma, ya que no permite describir más allá de aquello que se conoce en el momento del estudio. El segundo es el exploratorio, o no dirigido, el cual implica el extender el análisis a todos los potenciales metabolitos detectables por la técnica utilizada. Por lo general, la cuantificación es relativa, como producto de la comparación entre grupos controles y experimentales, pero permite el descubrimiento de nuevos metabolitos y generar hipótesis sobre su función biológica (X. Liu y Locasale, 2017).

1.1.3 Herramientas utilizadas para el estudio del metaboloma

Para el estudio del metaboloma, se utilizan herramientas que detecten una gran cantidad de metabolitos al mismo tiempo. Las principales herramientas consisten en la resonancia magnética nuclear (NMR) y la espectrometría de masas (MS). Una no reemplaza a la otra, y pueden utilizarse de manera complementaria para responder distintas preguntas, pero la MS tiene algunas ventajas sobre la NMR, como su mayor sensibilidad, menor volumen de muestra necesario para un análisis y una mayor cantidad de bases de datos para la identificación de metabolitos, entre otros. Sus características, comparaciones y aplicaciones en la metabolómica han sido revisadas previamente por otros autores (Bujak et al., 2015; Lindon y Nicholson, 2008). La MS es de las herramientas más utilizadas para estudiar el metaboloma, con una tendencia de aplicación que sobrepasa la de la NMR (Marshall y Powers, 2017).

La MS se basa en la detección de moléculas a través de la inducción de carga, su separación y detección por un valor adimensional de relación masa/carga (m/z), que es el cociente de la masa en u.m.a. o Da y las unidades de carga. El equipo empleado se denomina espectrómetro de masas, que consiste en tres partes principales: la fuente de iones, donde se induce la carga a las moléculas; el analizador de masas, con uno o varios detectores de masa que permiten seleccionar los iones de un valor o rango de m/z para ser analizados; y el detector, que envía las señales a la computadora para ser interpretadas. Para una mayor resolución, se acopla previamente un sistema de separación cromatográfica, lo que le brinda una dimensión más de tiempo de retención (RT). Un tipo de espectrometría de masas es la espectrometría de masas en tándem (MS/MS), que consiste en la colisión de iones con una celda de colisión, un tipo de detector de masa que fragmenta los iones. En esta variante, a los iones íntegros se les denomina iones precursores; a los fragmentos, iones producto. Al conjunto de iones producto asociados a un ion precursor se denomina patrón de fragmentación, asociado con la estructura y composición elemental del ion. Bajo condiciones experimentales similares, los iones generan un patrón de fragmentación reproducible, lo que permite identificar moléculas asociadas previamente con un patrón de fragmentación (Gross, 2017).

1.1.4 Metabolómica aplicada al estudio de la COVID-19

La metabolómica se ha aplicado previamente al estudio de la infección por SARS-CoV-2. Al ser infectadas las células, requieren una mayor actividad metabólica para cubrir la demanda energética, producto de la replicación viral. Uno de los principales tipos de biomoléculas involucradas en estos cambios son los lípidos que, además de ser potenciales fuentes de energía, son componentes importantes en la formación del virión, como en el caso de los coronavirus que necesitan una membrana lipídica (Abu-Farha et al., 2020).

En China, se demostró con un análisis metabolómico y lipidómico de plasma, este último enfocándose principalmente en lípidos, que no solo hay cambios en el metabolismo plasmático, sino que el grado de alteración en el metaboloma se correlaciona con la gravedad de la enfermedad. Un dato por destacar es que aquellos pacientes que mejoraron, a pesar de tener resultados de PCR negativos, permanecían hasta dos semanas después con un perfil metabolómico distinto a sujetos sanos, por lo que el impacto de la enfermedad sobre el metabolismo permanece incluso después de la recuperación. Entre las principales rutas metabólicas alteradas se encuentran las del metabolismo de pirimidinas, de fructosa, manosa y en general del metabolismo de carbono. También se han propuesto algunos biomarcadores de gravedad como el ácido málico, carbamoil fosfato, D-xilulosa 5 fosfato, monofosfato de guanosina y dihidouracilo. En la parte de la lipidómica, las rutas alteradas fueron principalmente de fosfolípidos, como fosfatidil-

inositol, síntesis de glicerofosfolípidos y otras vías como señalización a través de endocannabinoides y la autofagia, entre otras (D. Wu et al., 2020).

En México, otro estudio de suero correlacionó cambios en el metaboloma dependiendo de la severidad. Descubrieron una relación entre la hipoxia y el metabolismo de aminoácidos: en los casos más severos, se reportó el aumento de tres aminoácidos hidroxilados: ácido alfa hidroxiiisovalérico, ácido alfa hidroxibutírico y ácido dihidroxibutanóico, derivados de la oxidación de alfa cetoácidos. Estas reacciones permiten la reposición de NAD reducido (NADH), que disminuye en condiciones de hipoxia. A parte, la disminución del aminoácido glutamina refleja una mayor actividad de las transaminasas, la cual produce alfa cetoácidos. También hay una disminución de citrato, derivado de la disminución de la actividad del ciclo de Krebs. La propuesta terapéutica para estos casos es que se realice una terapia de suplementación de aminoácidos para promover la restauración de potencial reductor con NADH (Páez-Franco et al., 2021).

En Turquía, otro análisis indica que existe una alteración en el metabolismo de las purinas en COVID-19, donde metabolitos de la adenosina, como inosina e hipoxantina, aumentan su concentración. En condiciones de hipoxia, se promueve el uso de trifosfato de adenosina (ATP), que después se degrada en inosina y luego en hipoxantina. Además, la adenosina tiene un efecto antiinflamatorio a través de la señalización por receptores A2AR y A2BAR, lo que sugiere un mecanismo de compensación antiinflamatorio durante la infección. También se ven alteraciones en metabolitos relacionados con glutatión, que es crucial para la protección redox, y aumento del leucotrieno D4, un lípido que atrae ciertos leucocitos y regula procesos inflamatorios (Doğan et al., 2021). Debido a esto, un fármaco propuesto para disminuir las complicaciones en COVID-19 es el Montelukast, un antagonista del receptor de leucotrienos, con resultados favorables en un estudio retrospectivo de pacientes hospitalizados (Khan et al., 2021).

Otro estudio en los Estados Unidos indica una alteración en el metabolismo del aminoácido triptófano. Algunos metabolitos que disminuyen son serotonina, indolpiruvato y el mismo triptófano, y detectaron un aumento en las concentraciones de quinurenina, donde hay una correlación directa con la concentración de IL-6, una citocina proinflamatoria. Se especula que estos metabolitos tienen una actividad inmunosupresora, lo que puede contribuir a que el virus evada la respuesta inmune (Thomas et al., 2020).

Un metaanálisis, que incluyó los estudios metabolómicos en COVID-19 hasta noviembre del 2020, evidenció las principales rutas metabólicas alteradas en pacientes infectados, incluyendo el metabolismo del ácido araquidónico, la biosíntesis de ácidos grasos insaturados, el metabolismo de azúcares aminados, nucleótidos y porfirinas, y la degradación de los aminoácidos valina, leucina e isoleucina. También

encontraron diferencias entre los casos leves–moderados y los severos, como en el metabolismo de la glicina, serina, treonina, glioxilato, dicarboxilato y beta – alanina, entre otros. Además, hay otras alteraciones asociadas con casos letales que los diferencian de los severos, como el metabolismo de la vitamina B6, ascorbato (vitamina C) y aldarato, por mencionar algunos. Estos resultados refuerzan la teoría de que existen perturbaciones metabólicas dependientes de la gravedad de la enfermedad (Pang, Zhou, et al., 2021).

1.2 Justificación

La pandemia de la COVID-19 ha tenido un impacto negativo mundial en los sistemas de salud y en la economía. A pesar de las terapias actuales disponibles para prevenir o tratar la enfermedad (vacunación y fármacos antivirales) algunos individuos manifiestan complicaciones severas (involucrando a diversos sistemas y órganos) y mueren. Estudios sugieren que la respuesta del hospedero contribuye en el desarrollo de las complicaciones de la enfermedad. Una respuesta exacerbada del sistema inmune ha sido propuesta como un mecanismo causante del deterioro de la salud en sujetos con la enfermedad. Sin embargo, la utilización de diversos fármacos antiinflamatorios parece (salvo la dexametasona) no reducir las complicaciones ni la mortalidad en los sujetos con la enfermedad. Mas allá de las alteraciones en el sistema inmune, poco se conoce sobre las perturbaciones moleculares que ocurren en los sujetos enfermos. Es por esto que el presente trabajo se centra en utilizar una aproximación metabólica (análisis sistemático de los metabolitos) no dirigida, apoyada en la quimioinformática, para dilucidar las vías de señalización alteradas en los sujetos con la COVID-19 comparado con sujetos sin la enfermedad. El conocimiento generado con la realización de este estudio nos permitirá comprender con mayor exactitud cuales son las afectaciones sistémicas que experimentan los sujetos con la enfermedad. La aplicación de dicho conocimiento tiene el potencial de incidir en la selección de fármacos para ser evaluados en estudios clínicos con la capacidad de reducir las complicaciones derivadas de la patología y evidenciar el mecanismo molecular involucrado en el desarrollo de dichas complicaciones (**Figura 3**).

1.3 Hipótesis

El desarrollo de la COVID-19 se asocia con alteraciones en distintas vías de señalización intracelulares cuantificables en plasma y orina a través del empleo de la metabolómica.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Descripción exhaustiva de la respuesta molecular del humano ante el desarrollo de la COVID-19 para contribuir en la identificación de potenciales biomarcadores de daño o pronóstico y fármacos candidatos para ser evaluados en ensayos clínicos.

1.4.2 Objetivos específicos

- 1) Identificación y cuantificación de metabolitos alterados en plasma y orina de sujetos positivos a SARS-CoV-2 con distinta severidad de la COVID-19.
- 2) Descripción de las vías de señalización o mecanismos de respuesta del humano alterados ante la infección por el virus.
- 3) Identificación de potenciales biomarcadores de daño y pronóstico para ser evaluados en estudios posteriores.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Obtención de las muestras

Las muestras de sangre y orina de sujetos con la COVID-19 (n=14) se obtuvieron de pacientes del Hospital General de Ensenada que cumplieron con los criterios de inclusión (edad > 18 años) y ninguno de los de exclusión (embarazo actual) con sintomatología sugestiva de la COVID-19 y una prueba de RT-PCR positiva para SARS-CoV-2 en saliva. También se obtuvieron muestras de sujetos sanos (n=10) que cumplieron con criterios de inclusión (edad > 18 años) y ninguno de los de exclusión (embarazo actual, diagnóstico de infección o síntomas virales durante el último mes, cáncer o quimioterapia en el último año, insuficiencia hepática o cirrosis, tuberculosis, infección por VIH). Adicionalmente, se obtuvieron los datos antropométricos y clínicos. Todos los participantes firmaron un consentimiento informado para que sus muestras se utilizarán para este proyecto. El reclutamiento de los sujetos y la toma de muestra se representan en la **Figura 1**.

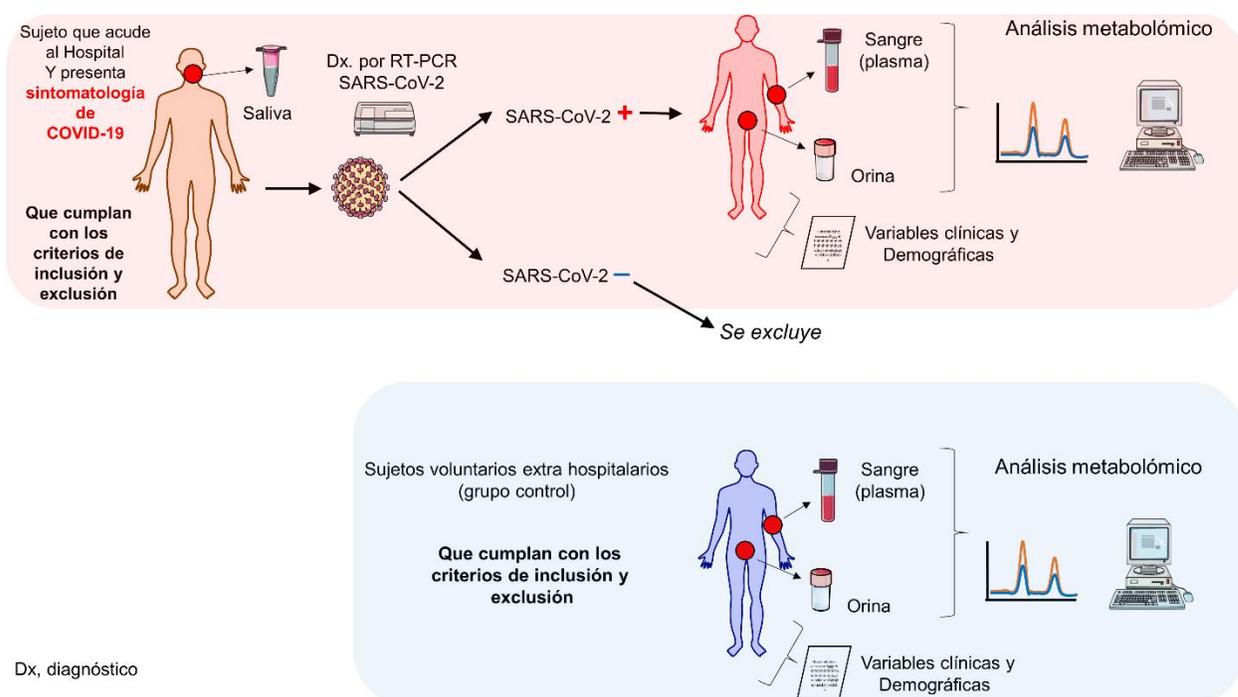


Figura 1. Esquema general de la metodología propuesta. Modificada de Moreno-Ulloa

2.2 Preparación de las muestras

Para obtener el plasma, las muestras de sangre total se centrifugaron a 1,500 g por 10 minutos a 4 °C en un tubo con anticoagulante (EDTA). Después, se tomó 1 mL de plasma obtenido y se transfirió a un tubo Vivaspin 3kDa para el ultrafiltrado de proteínas por centrifugación, que fue a 4,000 g por 30 minutos a 4 °C. Para una eliminación exhaustiva de las proteínas, del plasma filtrado se obtuvieron 50 µL y se mezclaron con 200 µL de acetonitrilo (ACN) grado masas. Esta mezcla se agitó por vórtex por 30 segundos y después se centrifugó a 20,817 g por 10 minutos a 4 °C. Para evaporar el solvente, se transfirieron 150 µL del sobrenadante y se procesaron por centrifugación al vacío a temperatura ambiente a 0.1 torr de presión hasta evaporar totalmente el solvente, quedando solo los metabolitos en el microtubo. Al final, se suspendieron en solución de inyección (95% agua, 5% ACN), se agitaron por vórtex 30 segundos y se centrifugaron a 20,817 g por 10 minutos a 4 °C para obtener una solución libre de partículas. De esta solución, se transfirieron 20 µL a viales de inyección para el análisis posterior.

Para el procesamiento de la orina, se transfirió 1 mL a microtubos y se centrifugaron a 20,817 g por 10 minutos a 4 °C. Luego, 100 µL del sobrenadante obtenido se mezclaron con 100 µL de solución de inyección. Esta mezcla se agitó por vórtex por 30 segundos y se centrifugó a 20,817 g por 10 minutos a 4 °C para obtener 180 µL de solución libre de partículas. De esta solución, se transfirieron 20 µL a viales de inyección para el análisis subsecuente. Una representación del procesamiento de las muestras y los análisis posteriores se muestra en la **Figura 2**.

Por cada tipo de muestras se generaron 6 controles de calidad (QC) para evaluar la precisión del método durante el análisis por HPLC-HRMS/MS y los análisis estadísticos subsecuentes. Estos QC consistieron en una mezcla del mismo volumen de todas las muestras, por cada tipo de fluido (plasma u orina).

2.3 Detección de RNA viral

De plasma y orina se obtuvieron 100 µL para realizar la detección de RNA viral. La extracción se realizó con el kit Quick-RNA (Zymo Research) con base en las instrucciones del fabricante. Luego, la amplificación del gen N de SARS-CoV-2 se realizó por qRT-PCR multiplex de un paso con los oligonucleótidos 2019-nCoV CDC EUA y las sondas RTqPCR qBio (PCR Biosystems).

Los parámetros para la reacción fueron los siguientes: un ciclo a 50 °C por 10 minutos, un ciclo a 95 °C por 2 minutos, 45 ciclos a 95 °C por 3 segundos, paso final de 55 °C por 31 segundos. Con un termociclador C100 Touch CFX-96 (RealTime Systems, BioRad). El valor de corte de umbral de ciclo (Ct) era de 38, por lo que una muestra con Ct mayor o igual a 38 se consideraba positiva a SARS-CoV-2. Las muestras con un Ct mayor a 38 o sin amplificación se consideraban negativas.

2.4 Adquisición de datos por LC-MS/MS

Las muestras preparadas en los viales se analizaron por un cromatógrafo de líquidos Agilent nanoLC 1260 Infinity (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA) y una columna empacada con ZORBAX 80 SB-C18 (75 µm x 43 mm, 5 µm C18 con columna de trampa o enriquecimiento de 40 nL) con fases móviles A (ácido fórmico al 0.1 % en H₂O) y B (ácido fórmico al 0.1 % en ACN), con flujo de 300 nL/min para la columna de separación (nano bomba) y 2 µL/min para la de enriquecimiento (micro bomba). El gradiente comenzó con 5% B e incrementó linealmente a 20% B en 20 minutos, se mantuvo a 20% B por 5 minutos, luego incrementó linealmente a 100% B y se mantuvo por 5 minutos, regresó a 5% B en 1 minuto y se mantuvo en 5% B por 9 minutos antes de la siguiente muestra para asegurar el reequilibrio de la columna. Dos blancos que consistieron en 3 µL de 95% A y 5%B se corrieron entre muestras experimentales para minimizar acarreamiento potencial de otros compuestos. El eluato de la columna se llevó a un espectrómetro de masas 6530 Accurate-Mass Q-TOF (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA) a través de una interfaz HPLC-Chip Cube MS. La ionización fue por nano-aerosol en modo positivo. Los datos de MS se adquirieron en las siguientes condiciones: voltaje del capilar, 1830 V; temperatura del gas, 350 °C, flujo de gas de secado, 5 L/min; voltaje skimmer, 65 V; octapolo-RF, 75 V; voltaje del fragmentor, 175 V; tasa de adquisición de espectros, 4 espectros/s sobre un rango de masa de 110 a 2000 m/z. Las condiciones para los datos de MS₂ fueron: ventana de aislamiento, angosta (1.3 m/z); tasa de adquisición, 3 espectros/s; precursores máximos por ciclo, 5 sobre un rango de masa de 50-2000 m/z. La opción de exclusión activa fue activada, puesta en 2 espectros y liberación después de 0.25 minutos. La opción de energía de colisión en rampa (CE) fue usada con valores de pendiente de 6 y compensación de 4. El instrumento se calibró de manera externa cada 24 horas (antes de la adquisición de los datos) con una solución ESI-L Low Mix Concentration Tuning Mix (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA) para asegurar una exactitud de masa <5 ppm tanto para los datos de los niveles MS₁ como MS₂. El rendimiento del instrumento se monitoreó durante la adquisición de los datos al incluir controles de calidad cada 4 muestras experimentales y al evaluar las señales de las muestras del blanco. Las muestras se localizaron de manera aleatoria para la adquisición de los datos.

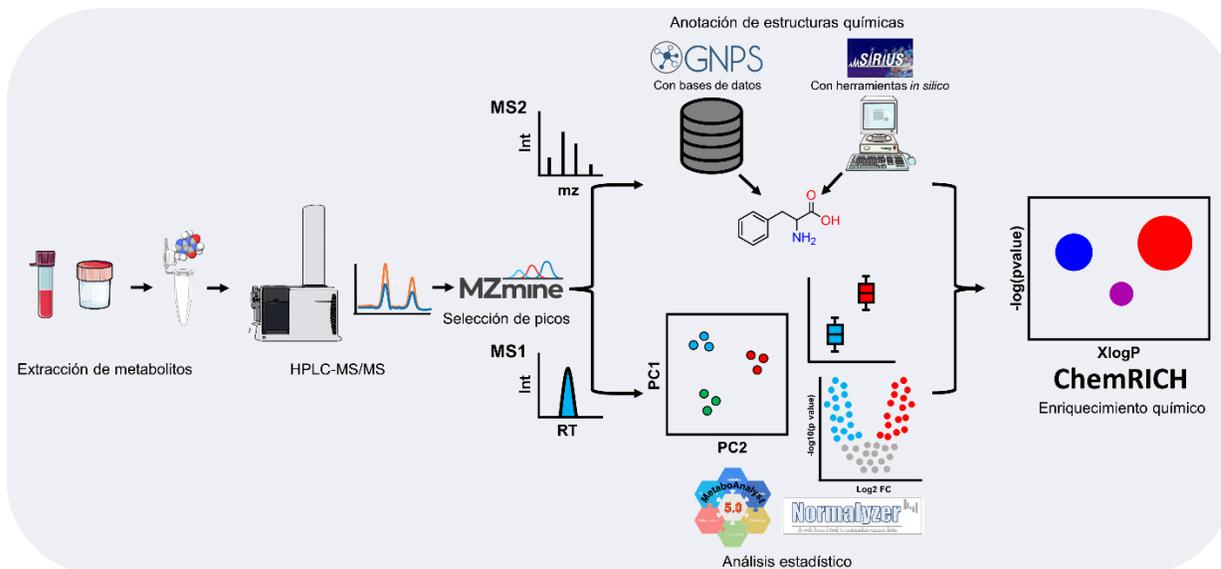


Figura 2. Esquema general propuesto a seguir para el procesamiento de muestras y análisis de datos. Creada parcialmente con ChemDraw

2.5 Procesamiento de datos

Los datos crudos se transformaron de formato del proveedor (.D) a un formato abierto (.mzXML) con el programa MSConvert (Chambers et al., 2012) para usar programas de libre acceso en su procesamiento.

Para la cuantificación relativa, los datos se procesaron con el programa MZmine 2.53 (Pluskal et al., 2010), con los parámetros mostrados en la **Tabla 3** en Anexos. De este programa se obtuvieron la tabla de cuantificación de iones totales (MS1), una tabla de cuantificación de los iones con patrón de fragmentación asociado (MS1 con MS2) y dos archivos de espectros de fragmentación: uno para la asignación de estructuras con bases de datos y otra para un método *in silico*.

Para la asignación de estructuras con bases de datos, se usó la plataforma *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS) (M. Wang et al., 2016), con el protocolo de redes moleculares basadas en picos (*Feature-Based Molecular Networking* [FBMN]) (Nothias et al., 2020). En este protocolo se usaron la tabla de cuantificación de MS1 con MS2 y uno de los archivos de espectros de fragmentación con el formato para FBMN. La asignación automática (*Spectral Match*) de estructuras en la base de datos se basó en un valor de corte de similitud (*cosine score*) de 0.6 y mínimo cuatro señales coincidentes con una tolerancia de masa para iones precursor y productos de 0.02 Da. Para la asignación de estructuras *in silico*, se usó el programa SIRIUS 4.9.12 (Dührkop et al., 2019), con el otro archivo .mgf, para asignar fórmulas

químicas con las bases de datos *Human Metabolome Database*, *MeSH*, *BioCyc*, *ChEBI*, *GNPS*, *KEGG* y *KEGG MINE*, y los aductos activados para la asignación de fórmula química fueron de protón (H^+), sodio (Na^+), potasio (K^+), amonio (NH_4^+) y pérdida de agua ($-H_2O + H^+$). Luego, fueron reclasificadas con el algoritmo ZODIAC (Ludwig et al., 2020) para mejorar las asignaciones. Después, se usó el algoritmo de CSI:FingerID (Dührkop et al., 2015) para asociar potenciales estructuras a los espectros de fragmentación de manera *in silico*, con estructuras que se encuentran en las mismas bases de datos. Además, también se usó el algoritmo CANOPUS (Dührkop et al., 2021) para la asignación de clases químicas con la ontología de ClassyFire (Feunang et al., 2016). Para mantener sólo asignaciones de alta calidad, se realizó un filtrado de asignaciones que tuvieran un error de masa mayor a 10 ppm, o que tuvieran halógenos (F, Cl, Br, I) o boro (B) en sus fórmulas, y que la asignación de estructura tenga un valor de confianza COSMIC

2.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos biométricos se realizó a través de comandos en R 4.1.2 (R Core Team, 2013). Para datos categóricos, se usó la prueba exacta de Fisher. Para las variables numéricas, se evaluó la normalidad con la prueba de D'Agostino-Pearson para los grupos "COVID-19", "Control" y "No Ventilados", y con la prueba de Shapiro-Wilk para el grupo "Ventilados". Al tener una distribución normal, se aplicó la prueba de t de Student para la existencia de diferencias significativas entre grupos. En el caso particular de la variable "Edad" en la comparación entre "Ventilados" y "No Ventilados", también se aplicó la prueba de t de Student con corrección de Welch.

El análisis estadístico de los datos espectrales se realizó con las abundancias (área bajo la curva) de los picos totales (MS1). Primero, se subieron a la plataforma NormalizerDE 1.5.4 (Willforss et al., 2019) para evaluar el mejor método de normalización, el cual fue CycLoess. Después, se obtuvieron los datos normalizados y se subieron a la plataforma MetaboAnalyst 5.0 (Pang, Chong, et al., 2021) para realizar un filtrado de picos que tuvieran una desviación estándar relativa (RSD) > 25% en el grupo de QC. En esta plataforma se realizó el análisis estadístico multivariante. Después de eliminar los picos asociados con fármacos anotados con bases de datos y transformar las abundancias normalizadas con logaritmo de base 10, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para observar patrones de agrupamiento en grupos control, COVID-19 sin ventilación mecánica y COVID-19 con ventilación mecánica. Por otro lado, los datos normalizados y filtrados por RSD > 25% en el grupo de QC se analizaron en NormalizerDE 1.5.4 para realizar el análisis estadístico univariante. Este consistió en identificar los picos que cambian en abundancia $\pm 50\%$ de razón de cambio (valor de logaritmo con base 2 de la razón de cambio [$\log_2 fold$]

change] de ± 0.58), y un valor de $p < 0.05$ por una prueba de t de Student con el paquete *limma* (Ritchie et al., 2015). Este análisis se realizó tanto en la comparación general (Control-COVID19) como en la sub-cohorte de ventilación mecánica (Ventilados-No Ventilados). Estos resultados se visualizaron en gráficas de volcán.

Para observar las clases de metabolitos sobrerrepresentados en la enfermedad, se realizó un análisis de enriquecimiento químico en la plataforma en línea ChemRICH, que utiliza la ontología química de MeSH (Barupal y Fiehn, 2017). Para esto, se utilizó la lista de los compuestos anotados tanto por bases de datos como herramientas *in silico* (Tabla 4, Anexos) que cambian significativamente en cada comparación (Control-COVID19, Ventilados-No Ventilados). Los análisis incluyen anotaciones de metabolitos presentes tanto en plasma como en orina.

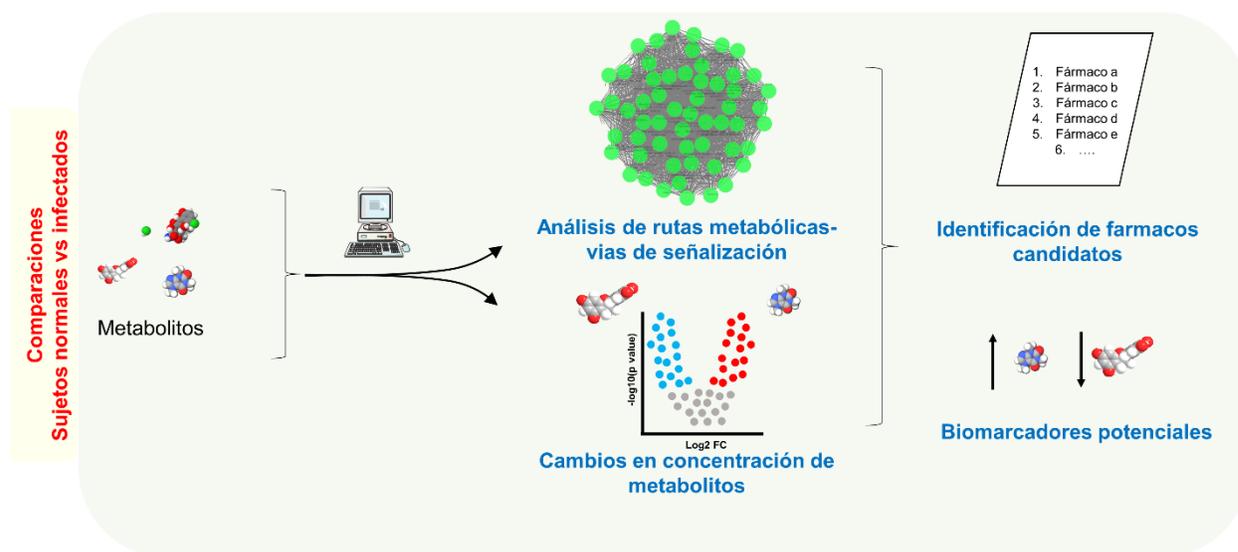


Figura 3. Perspectivas de futuro sobre la aplicación del conocimiento generado en este estudio. Modificada de Moreno-Ulloa

Capítulo 3. Resultados

En la **Tabla 2** podemos observar dos grupos de comparación: COVID-19 y control, y la sub-cohorte de ventilación mecánica. Existen diferencias significativas en el uso de fármacos, que dominan en COVID-19, como terapias con antibióticos, antivirales, esteroides y anticoagulantes, y en la condición de diabetes mellitus tipo 2. En la comparación de las sub-cohortes no observamos diferencias significativas.

Después del procesamiento por MZmine 2 y los distintos filtros aplicados, se obtuvieron dos listas de iones totales, una para cada muestra: 2480 en plasma y 2478 en orina. Estos iones, o picos, representan los potenciales metabolitos detectados.

En el PCA, podemos observar patrones de agrupamiento para cada muestra y comparación, como se representa en la **Figura 4**. En los Anexos, la **Figura 11** muestra PCA con las mismas muestras, pero con etiquetas basadas en la clasificación de la OMS, del síndrome de insuficiencia respiratoria aguda (SIRA) y el género de los sujetos.

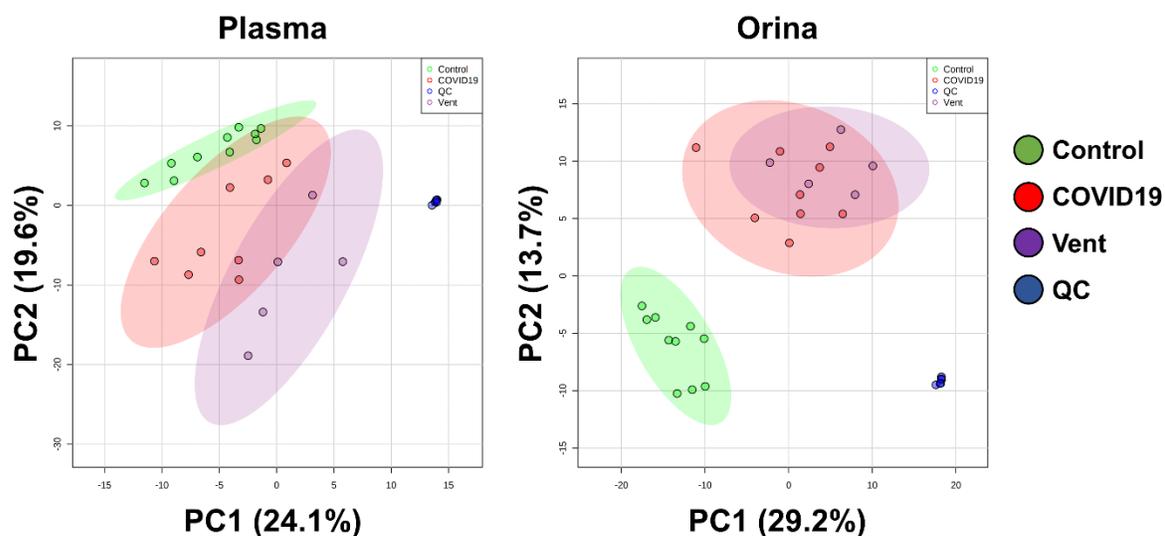


Figura 4. Análisis de componentes principales (PCA) de los sets de datos de las cohortes por muestra. Los datos fueron transformados a escala logarítmica sin escalar. Las áreas sombreadas representan los intervalos del 95% de confianza

Tabla 2. Características clínicas y demográficas de los sujetos del estudio.

Variables	COVID-19 vs Control			Ventilación mecánica (Vent) vs No Vent		
	COVID-19	Control	Valor <i>p</i>	Vent	No Vent	Valor <i>p</i>
Número de pacientes (n)	14	10		5	9	
Masculino/Femenino (n)	8/6	3/7	0.2397	2/3	6/3	0.5804
Altura (m ± D.E.)	1.65 ± 0.07	1.60 ± 0.09	0.1345	1.62 ± 0.10	1.67 ± 0.05	0.1887
Edad (años ± D.E.)	55.9 ± 11.2	51.2 ± 10.2	0.3009	62.4 ± 5.2	52.3 ± 12.2	0.05299*
Peso (kg ± D.E.)	76.9 ± 11.8	71.2 ± 12.0	0.1475	73.6 ± 10.4	78.8 ± 12.7	0.4525
IMC (kg/m ² ± D.E.)	28.1 ± 4.1	27.7 ± 2.7	0.7462	27.9 ± 3.7	28.3 ± 4.5	0.8795
Terapia farmacológica						
Terapia con inhibidores de ECA/ARA (n (%))	5 (36)	2 (20)	0.6529	2 (40)	3 (33)	1
Fármacos antiinflamatorios (n (%))	3 (21)	1 (10)	0.6146	0 (0)	3 (33)	0.2582
Terapia con antibióticos (n (%))	11 (79)	0 (0)	0.0001514	4 (80)	7 (78)	1
Terapia con antivirales (n (%))	7 (50)	0 (0)	0.01876	3 (60)	4 (44)	1
Terapia con esteroides (n (%))	13 (93)	0 (0)	5.609e-06	5 (100)	8 (89)	1
Anticoagulantes (n (%))	14 (100)	0 (0)	5.099e-07	5 (100)	9 (100)	1
Comorbilidades						
HAS (n (%))	8 (57)	2 (20)	0.1041	3 (60)	5 (56)	1
DMT2 (n (%))	6 (43)	0 (0)	0.02387	1 (20)	5 (56)	0.3007

ECA = Enzima Convertidora de Angiotensina, ARA = Antagonistas del Receptor de Angiotensina, HAS = Hipertensión Arterial Sistólica, DMT2 = Diabetes Mellitus tipo 2.

*Se muestra el valor de *p* de la prueba de t de Student con corrección de Welch; t de Student *p* = 0.107.

Procedimos a realizar análisis univariantes, y observamos cambios en las concentraciones de metabolitos entre grupos, representados como gráficas de volcán en las **Figuras 5 y 6** para condiciones de COVID-19 y ventilación mecánica, respectivamente. En las gráficas observamos puntos que representan cada pico: los azules son los que cambian significativamente; los rojos, los no significativos. En COVID-19, detectamos en plasma el aumento de 410 y disminución de 552 picos, y en orina el aumento de 909 y disminución de 482 picos.

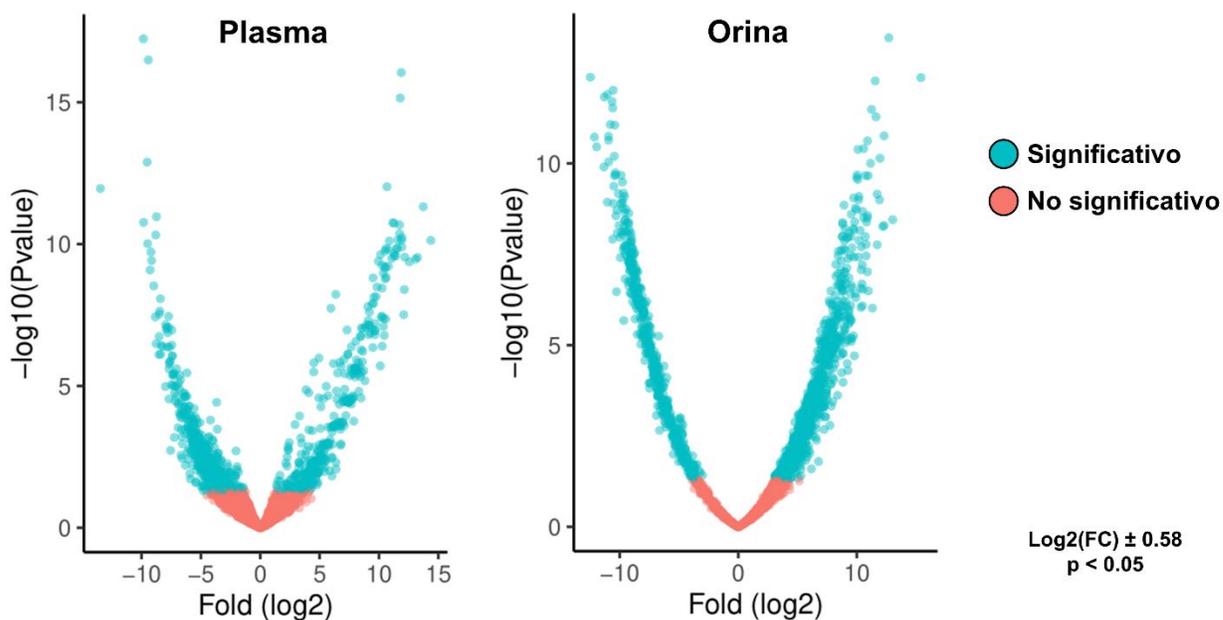


Figura 5. Representación de tipo volcán de los metabolitos cuantificados en plasma y orina entre los sujetos con la COVID-19 y sin la enfermedad. Aquellos que mostraron diferencias en abundancia (valores de corte: cambio $> \pm 50\%$, $p < 0.05$) se marcaron en azul; los que no cambian, en rojo

En el sub-cohorte de ventilación mecánica, observamos un aumento en plasma de 355 y una disminución de 163 picos, mientras que en orina aumentaron 345 y disminuyeron 107 picos.

Las técnicas empleadas permiten detectar una vasta diversidad de compuestos. Esto se ve reflejado en la **Figura 12** en Anexos, donde diagramas de pastel indican las distintas clases químicas, asignadas a través de CANOPUS, de los compuestos detectados tanto en plasma como en orina.

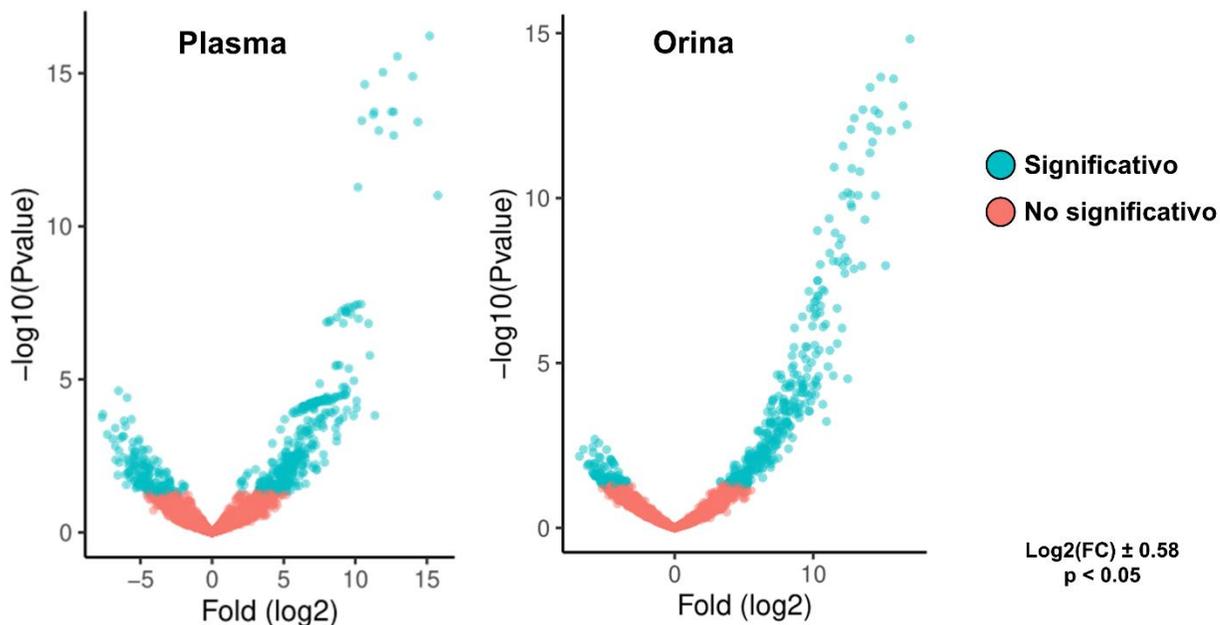


Figura 6. Representación de tipo volcán de los metabolitos cuantificados en plasma y orina entre los sujetos con la COVID-19 con y sin necesidad de ventilación mecánica. Aquellos que mostraron diferencias en abundancia (valores de corte: cambio $> \pm 50\%$, $p < 0.05$) se marcaron en azul; los que no cambian, en rojo

Con los datos de anotación de metabolitos producidos diferencialmente entre grupos, realizamos un análisis de enriquecimiento químico (**Figura 7**) por cada comparación: COVID-19 contra control, y ventilados contra no ventilados. Cada análisis tiene como resultado un plano con gráficos circulares que representan cada clasificación química enriquecida. Se localizan por el valor XlogP, o coeficiente de partición octanol:agua, relacionado con su hidrofobicidad, en el eje de las abscisas, y por el valor p del grupo en el eje de las ordenadas. El tamaño del círculo refleja directamente la cantidad de compuestos en esa clasificación, y el color la dirección de expresión de los compuestos: cuando aumentan, tiende al rojo; cuando disminuyen, al azul. En la comparación general, observamos enriquecidas cinco clasificaciones: oligopéptidos, péptidos cíclicos, cininas, lisofosfatidilcolinas (LPC) saturadas e insaturadas. Vemos que las LPC tienden a disminuir, mientras que los oligopéptidos, las cininas y los péptidos cíclicos tanto aumentan como disminuyen. En el análisis de enriquecimiento de la sub-cohorte de ventilación mecánica solo vemos que los oligopéptidos tienden tanto a aumentar como a disminuir.

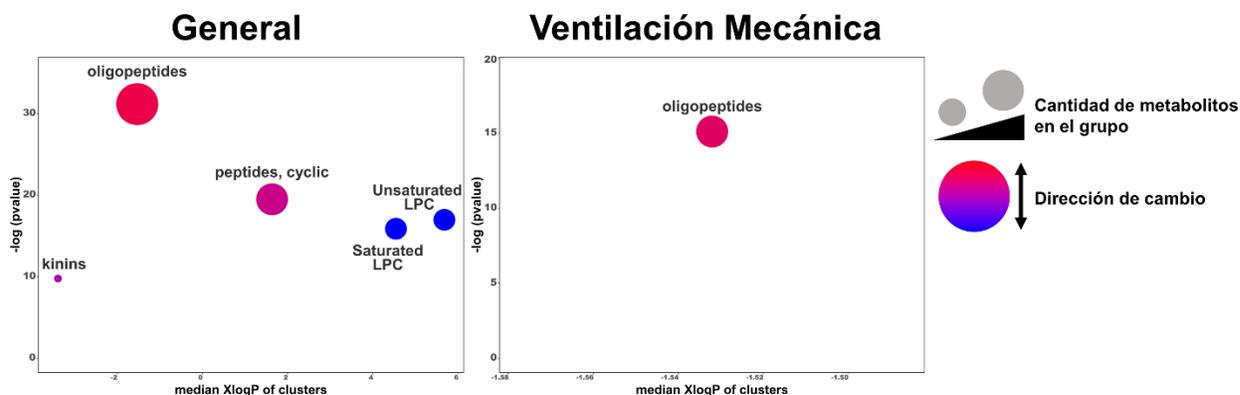


Figura 7. Análisis de enriquecimiento químico por comparación: COVID-19 y control (izquierda), y ventilados y no ventilados (derecha)

Por último, mostramos en la **Figura 8** metabolitos relacionados con la salud humana que, a pesar de no encontrarse sus clases químicas enriquecidas, son diferencialmente abundantes entre grupos. El fragmento de angiotensina I 1-3, se encontró disminuido en COVID-19, al igual que un ácido biliar. Otros, como metabolitos de vitaminas del complejo B (B1 y B9) disminuyen significativamente tanto en la infección en general como en los pacientes que requirieron ventilación mecánica.

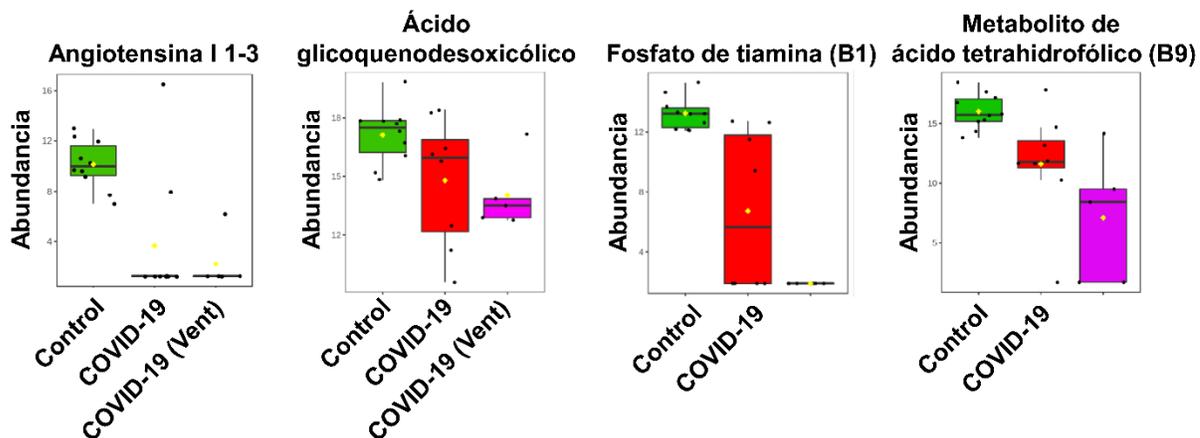


Figura 8. Efecto de la COVID-19 sobre otros metabolitos. Los resultados se muestran en promedios y rangos intercuantiles y se proyectan como diagramas de caja

Capítulo 4. Discusión

En los análisis multivariantes, vemos que en el plasma hay una separación moderada entre los grupos control (Control), COVID-19 sin ventilación mecánica (COVID19) y con ventilación mecánica (Vent). Por otro lado, en orina vemos una clara separación entre el grupo control y los dos grupos de COVID-19, pero no entre los sujetos ventilados y no ventilados. Estos datos indican que hay un mayor cambio en el metaboloma en orina comparado con el del plasma durante la enfermedad; pero en la condición de ventilación mecánica las diferencias son mayores en el metaboloma del plasma sobre la orina.

Entre las clases químicas enriquecidas se encuentran las cininas: péptidos que derivan de la degradación de proteínas precursoras denominadas cininógenos (Hamid et al., 2020). Tres péptidos derivados de la degradación de cininas se encuentran alterados. Específicamente, dos derivados de bradicinina (BK) y de la sustancia P (SP) se encuentran disminuidos, mientras que uno de la neurocinina A (NKA) está aumentado. La degradación de estos péptidos se muestra en la **Figura 9A**.

La BK proviene del cininógeno de alto peso molecular (HMWK), una proteína relacionada con la hemostasia a través de la vía intrínseca de la coagulación (Hofman et al., 2016). Este péptido y su derivado, desarginina – 9 bradicinina (des-R9-BK), son degradados por la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) a BK 1-7 (De Maat et al., 2020). Posteriormente, este derivado es degradado por ACE a BK 1-5, el péptido detectado en este estudio (Gangnus y Burckhardt, 2021). Cuando se evita su degradación, la vida media de BK se extiende, lo que puede exacerbar su actividad. Uno de los efectos resultantes de esta exacerbación es el angioedema: filtrado de líquido de los vasos sanguíneos debido a un aumento en la permeabilidad vascular (Cicardi y Zuraw, 2018). Los pacientes con COVID-19 desarrollan edemas pulmonares, lo que llevó a plantear potenciales mecanismos centrados en este péptido y sus derivados, ya que el SARS-CoV-2 usa la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) como diana para entrar a las células (De Maat et al., 2020). Además, BK 1-5 inhibe la agregación plaquetaria a través del bloqueo de la trombina (Murphey et al., 2006), por lo que puede estar implicada en la alteración de la hemostasia que caracteriza a la enfermedad (Joly et al., 2020).

La SP es miembro de la familia de las taquicininas, derivada de la proteína preprotaquicinina 1 (PPT1) (Hökfelt et al., 2001). Este péptido se produce principalmente en el sistema nervioso central y periférico, (Mitchell et al., 2013) y su alteración está asociada con diferentes enfermedades neurológicas, como Alzheimer (Peineau et al., 2018), Parkinson (Zheng et al., 2021) y esclerosis lateral amiotrófica

(Theoharides y Tsilioni, 2020). ACE es capaz de degradar a la SP; sin embargo, lo hace en los enlaces Phe₇-Phe₈, Phe₈-Gly₉ y Gly₉-Leu₁₀ (Feickert y Burckhardt, 2019). En este estudio encontramos disminuido el fragmento de SP 6-11, producto de la hidrólisis en el enlace Gln₅-Gln₆. A este sitio no se le ha descrito una enzima específica, pero el fragmento 6-11 se ha detectado en el sinaptosoma de ratas (Arzumanyan et al., 1985) y en microsomas hepáticos de ratas, ratones y humanos (Pailleux et al., 2013). Existe evidencia de que, en COVID-19, pacientes con enfermedades neurológicas empeoran su condición (Ferini-Strambi y Salsone, 2021), y al estar la SP vinculada con estas patologías, es posible que su perturbación contribuya a las complicaciones neurológicas asociadas con COVID-19.

La NKA, al igual que la SP, pertenece a las taquicininas y proviene del mismo precursor proteico, aunque NKA tiene mayor afinidad al receptor de neurocininas 2 (NK2R) (Regoli et al., 1990). Tiene un papel importante en la regulación de diversos procesos biológicos, como la percepción del dolor (Sculptoreanu et al., 2008), la contracción de músculo liso (Marson et al., 2018) y la inflamación en vías respiratorias (Kobayashi et al., 2012). En este estudio, se encontró aumentado el fragmento NKA 1-3. En contraste con las otras taquicininas, donde su degradación disminuye su actividad, NKA estimula al receptor NK2R al doble cuando es descompuesta en NKA 4-10, que es el producto complementario de NKA 1-3 (Regoli et al., 1990). Esto puede promover vías de señalización como la de la proteína cinasa C (Sculptoreanu et al., 2008). El fragmento NKA 4-10 se ha aislado en tumores ileales metastásicos (Theodorsson-Norheim et al., 1987).

Con base en las revisiones de literatura de la vía de señalización de BK (Rex et al., 2022), la de SP (Javid et al., 2019), y artículos sobre las vías activadas por NKA (Sculptoreanu et al., 2008), se creó una representación en red de estas vías con el uso del programa Cytoscape 3.9.1 (Shannon et al., 2003), como se muestra en la **Figura 9B**. Hay funciones biológicas generales activadas por estas vías como la migración celular, proliferación, inflamación e incremento en la permeabilidad celular, y otras más específicas como neovascularización, regulación de la presión intraocular, reclutamiento de neutrófilos y crecimiento de neuritas. Por lo tanto, alteraciones en las vías de señalización de las cininas puede contribuir a la fisiopatología de la enfermedad por daño endotelial, neurológico, y promoción de la inflamación.

Otro fragmento de un péptido vasoactivo, angiotensina I 1-3, se encontró disminuido en COVID-19. La angiotensina I es un péptido que forma parte del sistema renina-angiotensina, una ruta fisiológica de control de la presión arterial. Es transformada tanto por las enzimas ACE en angiotensina II, y esta última por ACE2 en el fragmento 1-7. Ambos productos regulan el sistema cardiovascular por mecanismos opuestos. El primer producto, la angiotensina II, posee actividad vasoconstrictora y proinflamatoria, compensada por el vasodilatador y antiinflamatorio fragmento 1-7. Como el virus bloquea la actividad de la ACE2, su receptor, puede redirigir la generación de estos productos a una mayor cantidad de angiotensina II, y esto sobrepasa la protección del fragmento 1-7 (K. Wang et al., 2020). El efecto probable sería un aumento en la presión arterial, lo que contribuye al mecanismo de daño cardiovascular por COVID-19.

En nuestro estudio encontramos una disminución en LPC, un tipo de lípidos derivados de la degradación de fosfatidilcolinas. Otros estudios metabolómicos encontraron también alteraciones en este tipo de fosfolípidos, tanto aumento en unas como disminución en otras (Caterino et al., 2021; Valdés et al., 2022). Las LPC son producto de la degradación de fosfatidilcolinas por la fosfolipasa 2 (PLA2) y la transferencia de ácidos grasos al colesterol por la lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT), con actividades proinflamatoria, proapoptótica y oxidante, las cuales han sido revisadas previamente (P. Liu et al., 2020). En contraste con los anteriores, en nuestro estudio encontramos que los LPC solo disminuyen. Algunos fármacos esteroideos, como los glucocorticoides, pueden disminuir la expresión de PLA2 (Gewert y Sundler, 1995), los cuales fueron utilizados por casi todos nuestros pacientes con COVID-19. Uno de éstos es la dexametasona, un fármaco aprobado para tratar pacientes con COVID-19 severo (Noreen et al., 2021), por lo que esta disminución consistente de LPC puede ser causada por estos medicamentos. Es importante destacar que, a pesar de su uso en todos los pacientes que requirieron ventilación mecánica, cuatro de los cinco pacientes fallecieron, lo que refuerza la importancia de proponer otras terapias para disminuir la mortalidad asociada con la infección severa.

Dos derivados de vitaminas se encontraron disminuidos en COVID-19, tanto en la comparación general como en ventilación mecánica: el fosfato de tiamina (B1) y un metabolito teórico del tetrahidrofolato (B9). Se ha encontrado que en pacientes hospitalizados por COVID-19 con deficiencias de ácido fólico hay una mayor prevalencia de enfermedad renal crónica y fibrilación auricular (Meisel et al., 2021), y en un metaanálisis, otra de las vitaminas del complejo B, la piridoxina (B6), era un marcador que diferenciaba a los pacientes severos de los fatales, disminuida en los segundos (Pang, Zhou, et al., 2021). Sin embargo, otro estudio dirigido a diversas vitaminas y minerales encontró una disminución significativa de la vitamina D y selenio en COVID-19, pero no de las B1, B6, B9 y B12, ni de zinc (Im et al., 2020).

La tiamina es el precursor del pirofosfato de tiamina, la forma activa de la vitamina B1. Ésta es necesaria para algunas reacciones del metabolismo de carbohidratos, y su deficiencia causa enfermedades como el Beriberi por desnutrición, y el síndrome de Wernicke-Korsakoff, principalmente como resultado de alcoholismo. Uno de los órganos más afectados por la deficiencia es el cerebro, ya que su principal fuente de energía es la glucosa, además de usar a la vitamina B1 como elemento estructural de sus membranas sinaptosómica, axoplásmica y mitocondrial. Su deficiencia afecta las funciones cognitivas, motoras y sensoriales en modelos experimentales, además de alterar el neurodesarrollo durante la etapa fetal y postnatal temprana (Fattal-Valevski, 2011).

El ácido fólico es el nombre común de la vitamina B9, y la reducción a tetrahidrofolato le confiere su actividad metabólica. Es una coenzima importante en el metabolismo de aminoácidos, biosíntesis de ácidos nucleicos y modificación de compuestos por metilación. Su deficiencia altera principalmente a los eritrocitos y al sistema nervioso, ya que ésta se asocia con anemia megaloblástica y alteraciones en la cognición, depresión y neuropatía, además que su suplementación es recomendada en mujeres embarazadas para evitar malformaciones neuronales en el desarrollo del feto (Sobczyn y Harrington, 2018).

Existen reportes donde, después de la infección por SARS-CoV-2, hay un conjunto de síntomas que se refieren como síndrome post-COVID, o COVID largo (*long COVID*). Una de sus características es la alteración de las habilidades cognitivas, aumento en el desarrollo de depresión y fatiga crónica (Ceban et al., 2022). A pesar de que las muestras son de pacientes con infección activa, es posible que uno de los mecanismos que contribuyen al desarrollo de estas secuelas sea una deficiencia de estas vitaminas.

Un ácido biliar, el ácido glicoquenodesoxicólico, se encontró disminuido en COVID-19 en este estudio. Otros trabajos reportaron alteraciones en los ácidos biliares, tanto aumento como disminución. Valdés y colaboradores encontraron un aumento en ácidos biliares durante la enfermedad, y una disminución al remitir la enfermedad (Valdés et al., 2022). En otro análisis, Escarcega y colaboradores encontraron cambios en diversos ácidos biliares de manera diferente entre sexos (Escarcega et al., 2022). Por otro lado, un estudio lipídómico encontró disminuidos a los ácidos biliares en COVID-19, y con modelos de aprendizaje de máquinas encontraron que son de los compuestos que más discriminan a los grupos control y COVID-19 positivos (Castañé et al., 2022).

Los ácidos biliares son compuestos producidos por el hígado y almacenados en la vesícula biliar. Estos son expulsados al intestino delgado para solubilizar compuestos lipofílicos de la dieta, lo que permite su mejor

absorción (Kiryama y Nochi, 2022). Al ser producidos en el hígado, cualquier daño a este órgano podría verse reflejado en cambios en la concentración de los ácidos biliares. En el caso de COVID-19, existe evidencia que sugiere daño hepático bajo un mecanismo molecular iniciado por promover la expresión de la proteína ACE2, receptor del virus, en el hígado bajo un ambiente proinflamatorio o hipóxico, y la subsecuente entrada del virus a las células hepáticas (Nardo et al., 2021).

Capítulo 5. Conclusiones

Los resultados de nuestro estudio demuestran que la COVID-19 altera el metaboloma humano. El análisis del metaboloma en orina distingue con mayor facilidad a los pacientes con COVID-19 sobre los sujetos sanos, mientras que el metaboloma del plasma diferencia más a los pacientes con ventilación mecánica contra los que no la necesitaron. El enriquecimiento químico indica que las clases químicas más alteradas en COVID-19 son los oligopéptidos, péptidos cíclicos y las fosfatidilcolinas, mientras que en ventilación mecánica fueron los oligopéptidos. Las cininas son una clase de péptido alterada en COVID-19, las cuales pueden contribuir a promover la fisiopatología de la enfermedad a través de la promoción de la inflamación, reclutamiento de leucocitos y aumento en la permeabilidad vascular. Otros metabolitos alterados indican alteraciones en distintos sistemas, como el neurológico, el cardiovascular, daño hepático y la hemostasia (**Figura 10**).

Aportaciones del estudio: Los resultados, además de reforzar resultados anteriores de una alteración en la vía de bradicinina causada por la COVID-19, sugieren cambios en otras cininas como la sustancia P y la neurocinina A. Esto se integra en una nueva teoría que propone la perturbación de las vías de las cininas como un mecanismo fisiopatológico en COVID-19.

Limitantes: La población estudiada, aunque es suficiente para realizar comparaciones con relevancia estadística, es una limitante para la construcción de modelos predictivos, necesarios para el descubrimiento de biomarcadores. Además, los sujetos no recibieron ninguna dosis de vacunación contra la enfermedad previo al estudio, ya que fueron reclutados al inicio de la pandemia, por lo que el efecto de la inmunización escapa del alcance de este estudio.

Perspectivas futuras: El conocimiento generado en este estudio contribuye a conocer la fisiopatología de la COVID-19. Al encontrarse alteradas en la enfermedad, las vías de señalización de las cininas pueden ser utilizadas como dianas terapéuticas para proponer terapias farmacológicas con potencial de revertir las complicaciones. Además, otros metabolitos identificados pueden ser evaluados como posibles biomarcadores de daño en distintos órganos. Al verse reflejado el efecto de la COVID-19 sobre distintos órganos y existir evidencia de daño persistente después de la enfermedad, este estudio puede servir como base para entender el COVID largo o *long COVID*, que afecta actualmente a millones de personas a lo largo del planeta.

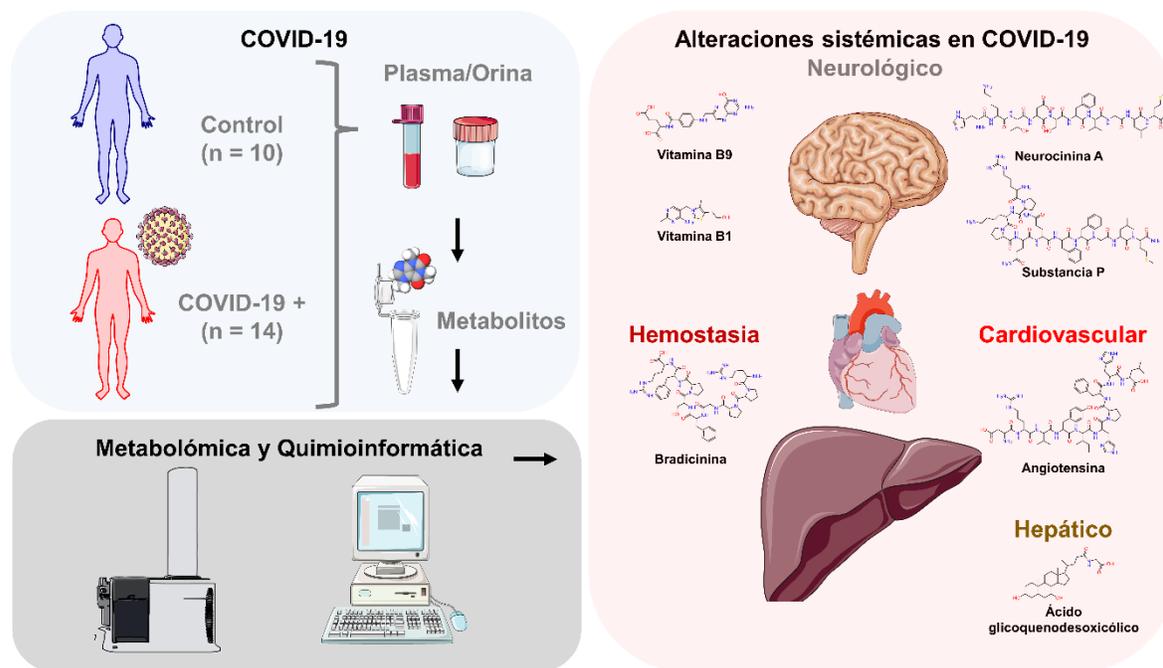


Figura 10. Resumen gráfico de la metodología y los resultados del proyecto. Creada parcialmente con Bioicons y ChemDraw

Literatura citada

- Abu-Farha, M., Thanaraj, T. A., Qaddoumi, M. G., Hashem, A., Abubaker, J., y Al-Mulla, F. 2020. The role of lipid metabolism in COVID-19 virus infection and as a drug target. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10), pp. 1–11. doi: 10.3390/ijms21103544
- Arzumanyan, A. M., Arutunyan, A. A., y Akopyan, T. N. 1985. Synaptosomal degradation of substance P and some other neuropeptides. *Neurochemical Research*, 10(12), pp. 1623–1634. doi: 10.1007/BF00988604
- Asai, T. 2021. COVID-19: accurate interpretation of diagnostic tests—a statistical point of view. *Journal of Anesthesia*, 35(3), pp. 328–332. doi: 10.1007/s00540-020-02875-8
- Balcke, G. U., Kolle, S. N., Kamp, H., Bethan, B., Looser, R., Wagner, S., Landsiedel, R., y van Ravenzwaay, B. 2011. Linking energy metabolism to dysfunctions in mitochondrial respiration - A metabolomics in vitro approach. *Toxicology Letters*, 203(3), pp. 200–209. doi: 10.1016/j.toxlet.2011.03.013
- Barupal, D. K. y Fiehn, O. 2017. Chemical Similarity Enrichment Analysis (ChemRICH) as alternative to biochemical pathway mapping for metabolomic datasets. *Scientific Reports*, 7(1), pp. 1–11. doi: 10.1038/s41598-017-15231-w
- Bujak, R., Struck-Lewicka, W., Markuszewski, M. J., y Kaliszan, R. 2015. Metabolomics for laboratory diagnostics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 113, pp. 108–120. doi: 10.1016/j.jpba.2014.12.017
- Castañé, H., Iftimie, S., Baiges-Gaya, G., Rodríguez-Tomás, E., Jiménez-Franco, A., López-Azcona, A. F., Garrido, P., Castro, A., Camps, J., y Joven, J. 2022. Machine learning and semi-targeted lipidomics identify distinct serum lipid signatures in hospitalized COVID-19-positive and COVID-19-negative patients. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 131, pp. 1–12. doi: 10.1016/j.metabol.2022.155197
- Caterino, M., Gelzo, M., Sol, S., Fedele, R., Annunziata, A., Calabrese, C., Fiorentino, G., D'Abbraccio, M., Dell'Isola, C., Fusco, F. M., Parrella, R., Fabbrocini, G., Gentile, I., Andolfo, I., Capasso, M., Costanzo, M., Daniele, A., Marchese, E., Polito, R., Russo, R., Missero, C., Ruoppolo, M., y Castaldo, G. 2021. Dysregulation of lipid metabolism and pathological inflammation in patients with COVID-19. *Scientific Reports*, 11(1), pp. 1–10. doi: 10.1038/s41598-021-82426-7
- Ceban, F., Ling, S., Lui, L. M. W., Lee, Y., Gill, H., Teopiz, K. M., Rodrigues, N. B., Subramaniapillai, M., Di Vincenzo, J. D., Cao, B., Lin, K., Mansur, R. B., Ho, R. C., Rosenblat, J. D., Miskowiak, K. W., Vinberg, M., Maletic, V., y McIntyre, R. S. 2022. Fatigue and cognitive impairment in Post-COVID-19 Syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Brain, Behavior, and Immunity*, 101, pp. 93–135. doi: 10.1016/j.bbi.2021.12.020
- Chambers, M. C., MacLean, B., Burke, R., Amodei, D., Ruderman, D. L., Neumann, S., Gatto, L., Fischer, B., Pratt, B., Egertson, J., Hoff, K., Kessner, D., Tasman, N., Shulman, N., Frewen, B., Baker, T. A., Brusniak, M. Y., Paulse, C., Creasy, D., Flashner, L., Kani, K., Moulding, C., Seymour, S. L., Nuwaysir, L. M., Lefebvre, B., Kuhlmann, F., Roark, J., Rainer, P., Detlev, S., Hemenway, T., Huhmer, A., Langridge, J., Connolly, B., Chadick, T., Holly, K., Eckels, J., Deutsch, E. W., Moritz, R. L., Katz, J. E., Agus, D. B., MacCoss, M., Tabb, D. L., y Mallick, P. 2012. A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nature Biotechnology*, 30(10), pp. 918–920. doi: 10.1038/nbt.2377

- Cicardi, M. y Zuraw, B. L. 2018. Angioedema Due to Bradykinin Dysregulation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 6(4), pp. 1132–1141. doi: 10.1016/j.jaip.2018.04.022
- Corman, V. M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D. K. W., Bleicker, T., Schneider, J., Schmidt, M. L., Mulders, D. G. J. C., Haagmans, B. L., Veer, B. Van Der, Den, S. Van, Wijsman, L., Goderski, G., Ellis, J., Zambon, M., Peiris, M., Goossens, H., Reusken, C., Koopmans, M. P. G., y Drosten, C. 2020. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*, 25(3), pp. 23–30. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045
- Cui, M., Wang, Q., y Chen, G. 2016. Serum metabolomics analysis reveals changes in signaling lipids in breast cancer patients. *Biomedical Chromatography*, 30(1), pp. 42–47. doi: 10.1002/bmc.3556
- De Maat, S., De Mast, Q., Danser, A. H. J., Van De Veerdonk, F. L., y Maas, C. 2020. Impaired Breakdown of Bradykinin and Its Metabolites as a Possible Cause for Pulmonary Edema in COVID-19 Infection. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 46(7), pp. 835–837. doi: 10.1055/s-0040-1712960
- Doğan, H. O., Şenol, O., Bolat, S., Yıldız, Ş. N., Büyüktuna, S. A., Sariismailoğlu, R., Doğan, K., Hasbek, M., y Hekim, S. N. 2021. Understanding the pathophysiological changes via untargeted metabolomics in COVID-19 patients. *Journal of Medical Virology*, 93(4), pp. 2340–2349. doi: 10.1002/jmv.26716
- Dührkop, K., Fleischauer, M., Ludwig, M., Aksenov, A. A., Melnik, A. V., Meusel, M., Dorrestein, P. C., Rousu, J., y Böcker, S. 2019. SIRIUS 4: a rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information. *Nature Methods*, 16(4), pp. 299–302. doi: 10.1038/s41592-019-0344-8
- Dührkop, K., Nothias, L. F., Fleischauer, M., Reher, R., Ludwig, M., Hoffmann, M. A., Petras, D., Gerwick, W. H., Rousu, J., Dorrestein, P. C., y Böcker, S. 2021. Systematic classification of unknown metabolites using high-resolution fragmentation mass spectra. *Nature Biotechnology*, 39(4), pp. 462–471. doi: 10.1038/s41587-020-0740-8
- Dührkop, K., Shen, H., Meusel, M., Rousu, J., y Böcker, S. 2015. Searching molecular structure databases with tandem mass spectra using CSI:FingerID. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(41), pp. 12580–12585. doi: 10.1073/pnas.1509788112
- Escarcega, R. D., Honarpisheh, P., Colpo, G. D., Ahnstedt, H. W., Couture, L., Juneja, S., Torres, G., Ortiz, G. J., Sollome, J., Tabor, N., Ganesh, B. P., Choi, H. A., y Liu, F. 2022. Sex differences in global metabolomic profiles of COVID-19 patients. *Cell Death and Disease*, 13(5), pp. 1–12. doi: 10.1038/s41419-022-04861-2
- Fattal-Valevski, A. 2011. Thiamine (Vitamin B1). *Journal of Evidence-Based Integrative Medicine*, 16(1), pp. 12–20. doi: 10.1177/1533210110392941
- Feickert, M. y Burckhardt, B. B. 2019. Substance P in cardiovascular diseases – A bioanalytical review. *Clinica Chimica Acta*, 495, pp. 501–506. doi: 10.1016/J.CCA.2019.05.014
- Ferini-Strambi, L. y Salsone, M. 2021. COVID-19 and neurological disorders: are neurodegenerative or neuroimmunological diseases more vulnerable? *Journal of Neurology*, 268, pp. 409–419. doi: 10.1007/s00415-020-10070-8
- Feunang, Y. D., Eisner, R., Knox, C., Chepelev, L., Hastings, J., Owen, G., Fahy, E., Steinbeck, C., Subramanian, S., y Bolton, E. 2016. ClassyFire: automated chemical classification with a comprehensive, computable taxonomy. *Journal of Cheminformatics*, pp. 1–20. doi: 10.1186/s13321-

016-0174-y

- Fiehn, O. 2002. Metabolomics - The link between genotypes and phenotypes. En C. Town (Ed.), *Functional Genomics 1.*^a ed.. Springer, Dordrecht.
- Gangnus, T. y Burckhardt, B. B. 2021. Sensitive mass spectrometric determination of kinin-kallikrein system peptides in light of COVID-19. *Scientific Reports*, 11(1), pp. 1–12. doi: 10.1038/s41598-021-82191-7
- Gewert, K. y Sundler, R. 1995. Dexamethasone down-regulates the 85 kDa phospholipase A2 in mouse macrophages and suppresses its activation. *Biochemical Journal*, 307(2), pp. 499–504. doi: 10.1042/BJ3070499
- Gorbalenya, A. E., Baker, S. C., Baric, R. S., de Groot, R. J., Drosten, C., Gulyaeva, A. A., Haagmans, B. L., Lauber, C., Leontovich, A. M., Neuman, B. W., Penzar, D., Perlman, S., Poon, L. L. M., Samborskiy, D. V., Sidorov, I. A., Sola, I., y Ziebuhr, J. 2020. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology*, 5(4), pp. 536–544. doi: 10.1038/s41564-020-0695-z
- Gross, J. H. 2017. *Mass Spectrometry, A textbook.* 3.^aed. Springer, Cham.
- Hamid, S., Rhaleb, I. A., Kassem, K. M., y Rhaleb, N. E. 2020. Role of Kinins in Hypertension and Heart Failure. *Pharmaceuticals*, 13(11), pp. 1–25. doi: 10.3390/PH13110347
- Hofman, Z., de Maat, S., Hack, C. E., y Maas, C. 2016. Bradykinin: Inflammatory Product of the Coagulation System. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 51(2), pp. 152–161. doi: 10.1007/S12016-016-8540-0/FIGURES/2
- Höckfelt, T., Pernow, B., y Wahren, J. 2001. Substance P: a pioneer amongst neuropeptides. *Journal of Internal Medicine*, 249(1), pp. 27–40. doi: 10.1046/J.0954-6820.2000.00773.X
- Im, J. H., Je, Y. S., Baek, J., Chung, M. H., Kwon, H. Y., y Lee, J. S. 2020. Nutritional status of patients with COVID-19. *International Journal of Infectious Diseases*, 100, pp. 390–393. doi: 10.1016/J.IJID.2020.08.018
- Javid, H., Mohammadi, F., Zahiri, E., y Hashemy, S. I. 2019. The emerging role of substance P/neurokinin-1 receptor signaling pathways in growth and development of tumor cells. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 75(4), pp. 415–421. doi: 10.1007/s13105-019-00697-1
- Joly, B. S., Siguret, V., y Veyradier, A. 2020. Understanding pathophysiology of hemostasis disorders in critically ill patients with COVID-19. *Intensive Care Medicine*, 46(8), pp. 1603–1606. doi: 10.1007/s00134-020-06088-1
- Khan, A. R., Misdary, C., Yegya-Raman, N., Kim, S., Narayanan, N., Siddiqui, S., Salgame, P., Radbel, J., Groote, F. De, Michel, C., Mehnert, J., Hernandez, C., Braciale, T., Malhotra, J., Gentile, M. A., y Jabbour, S. K. 2021. Montelukast in hospitalized patients diagnosed with COVID-19. *Journal of Asthma*, 59(4), pp. 780–786. doi: 10.1080/02770903.2021.1881967
- Kiriyama, Y. y Nochi, H. 2022. Physiological role of bile acids modified by the gut microbiome. *Microorganisms*, 10(1), pp. 1–17. doi: 10.3390/microorganisms10010068
- Kobayashi, M., Ashino, S., Shiohama, Y., Wakita, D., Kitamura, H., y Nishimura, T. 2012. IFN- γ elevates airway hyper-responsiveness via up-regulation of neurokinin A/neurokinin-2 receptor signaling in a

- severe asthma model. *European Journal of Immunology*, 42(2), pp. 393–402. doi: 10.1002/EJI.201141845
- Kus, K., Kij, A., Zakrzewska, A., Jaształ, A., Stojak, M., Walczak, M., y Chlopicki, S. 2018. Alterations in arginine and energy metabolism, structural and signalling lipids in metastatic breast cancer in mice detected in plasma by targeted metabolomics and lipidomics. *Breast Cancer Research*, 20(1), pp. 1–13. doi: 10.1186/s13058-018-1075-y
- Linares, M., Pérez-Tanoira, R., Carrero, A., Romanyk, J., Pérez-García, F., Gómez-Herruz, P., Arroyo, T., y Cuadros, J. 2020. Panbio antigen rapid test is reliable to diagnose SARS-CoV-2 infection in the first 7 days after the onset of symptoms. *Journal of Clinical Virology*, 133, pp. 1–4. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104659
- Lindon, J. C. y Nicholson, J. K. 2008. Spectroscopic and statistical techniques for information recovery in metabonomics and metabolomics. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 1, pp. 45–69. doi: 10.1146/annurev.anchem.1.031207.113026
- Liu, P., Zhu, W., Chen, C., Yan, B., Zhu, L., Chen, X., y Peng, C. 2020. The mechanisms of lysophosphatidylcholine in the development of diseases. *Life Sciences*, 247, pp. 1–10. doi: 10.1016/J.LFS.2020.117443
- Liu, X. y Locasale, J. W. 2017. Metabolomics: A Primer. *Trends in Biochemical Sciences*, 42(4), pp. 274–284. doi: 10.1016/j.tibs.2017.01.004
- Lotfi, M., Hamblin, M. R., y Rezaei, N. 2020. COVID-19: Transmission, prevention, and potential therapeutic opportunities. *Clinica Chimica Acta*, 508, pp. 254–266. doi: 10.1016/j.cca.2020.05.044
- Ludwig, M., Nothias, L., Dührkop, K., Koester, I., Fleischauer, M., Hoffmann, M. A., Petras, D., Vargas, F., Morsy, M., Aluwihare, L., Dorrestein, P. C., y Böcker, S. 2020. Database-independent molecular formula annotation using Gibbs sampling through ZODIAC. *Nature Machine Learning*, 2(10), pp. 629–641. doi: 10.1038/s42256-020-00234-6
- Marshall, D. D. y Powers, R. 2017. Beyond the paradigm: Combining mass spectrometry and nuclear magnetic resonance for metabolomics. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 100, pp. 1–16. doi: 10.1016/j.pnmrs.2017.01.001
- Marson, L., Thor, K. B., Katofiasc, M., Burgard, E. C., y Rupniak, N. M. J. 2018. Prokinetic effects of neurokinin-2 receptor agonists on the bladder and rectum of rats with acute spinal cord transection. *European Journal of Pharmacology*, 819, pp. 261–269. doi: 10.1016/J.EJPHAR.2017.12.017
- Meisel, E., Efros, O., Bleier, J., Halevi, T. B., Segal, G., Rahav, G., Leibowitz, A., y Grossman, E. 2021. Folate Levels in Patients Hospitalized with Coronavirus Disease 2019. *Nutrients*, 13(3), pp. 1–13. doi: 10.3390/nu13030812
- Mitchell, A. J., Lone, A. M., Tinoco, A. D., y Saghatelian, A. 2013. Proteolysis Controls Endogenous Substance P Levels. *PLoS One*, 8(7), pp. 1–9. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0068638
- Murphey, L. J., Malave, H. A., Petro, J., Biaggioni, I., Byrne, D. W., Vaughan, D. E., Luther, J. M., Pretorius, M., y Brown, N. J. 2006. Bradykinin and its metabolite bradykinin 1-5 inhibit thrombin-induced platelet aggregation in humans. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 318(3), pp. 1287–1292. doi: 10.1124/jpet.106.104026

- Nardo, A. D., Schneeweiss-Gleixner, M., Bakail, M., Dixon, E. D., Lax, S. F., y Trauner, M. 2021. Pathophysiological mechanisms of liver injury in COVID-19. *Liver International*, 41(1), pp. 20–32. doi: 10.1111/liv.14730
- Noreen, S., Maqbool, I., y Madni, A. 2021. Dexamethasone: Therapeutic potential, risks, and future projection during COVID-19 pandemic. *European Journal of Pharmacology*, 894, pp. 1–5. doi: 10.1016/J.EJPHAR.2021.173854
- Nothias, L. F., Petras, D., Schmid, R., Dührkop, K., Rainer, J., Sarvepalli, A., Protsyuk, I., Ernst, M., Tsugawa, H., Fleischauer, M., Aicheler, F., Aksenov, A. A., Alka, O., Allard, P. M., Barsch, A., Cachet, X., Caraballo-Rodriguez, A. M., Da Silva, R. R., Dang, T., Garg, N., Gauglitz, J. M., Gurevich, A., Isaac, G., Jarmusch, A. K., Kameník, Z., Kang, K. Bin, Kessler, N., Koester, I., Korf, A., Le Gouellec, A., Ludwig, M., Martin H, C., McCall, L. I., McSayles, J., Meyer, S. W., Mohimani, H., Morsy, M., Moyne, O., Neumann, S., Neuweger, H., Nguyen, N. H., Nothias-Esposito, M., Paolini, J., Phelan, V. V., Pluskal, T., Quinn, R. A., Rogers, S., Shrestha, B., Tripathi, A., van der Hoof, J. J. J., Vargas, F., Weldon, K. C., Witting, M., Yang, H., Zhang, Z., Zubeil, F., Kohlbacher, O., Böcker, S., Alexandrov, T., Bandeira, N., Wang, M., y Dorrestein, P. C. 2020. Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. *Nature Methods*, 17(9), pp. 905–908. doi: 10.1038/s41592-020-0933-6
- Páez-Franco, J. C., Torres-Ruiz, J., Sosa-Hernández, V. A., Cervantes-Díaz, R., Romero-Ramírez, S., Pérez-Fragoso, A., Meza-Sánchez, D. E., Germán-Acacio, J. M., Maravillas-Montero, J. L., Mejía-Domínguez, N. R., Ponce-de-León, A., Ulloa-Aguirre, A., Gómez-Martín, D., y Llorente, L. 2021. Metabolomics analysis reveals a modified amino acid metabolism that correlates with altered oxygen homeostasis in COVID-19 patients. *Scientific Reports*, 11(1), pp. 1–12. doi: 10.1038/s41598-021-85788-0
- Pailleux, F., Lemoine, J., y Beaudry, F. 2013. Investigation of the metabolic biotransformation of substance P in liver microsomes by liquid chromatography quadrupole ion trap mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, 27(1), pp. 39–47. doi: 10.1002/bmc.2746
- Pang, Z., Chong, J., Zhou, G., De Lima Morais, D. A., Chang, L., Barrette, M., Gauthier, C., Jacques, P. É., Li, S., y Xia, J. 2021. MetaboAnalyst 5.0: Narrowing the gap between raw spectra and functional insights. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), pp. W388–W396. doi: 10.1093/nar/gkab382
- Pang, Z., Zhou, G., Chong, J., y Xia, J. 2021. Comprehensive meta-analysis of COVID-19 global metabolomics datasets. *Metabolites*, 11(1), pp. 1–14. doi: 10.3390/metabo11010044
- Peineau, S., Rabiant, K., Pierrefiche, O., y Potier, B. 2018. Synaptic plasticity modulation by circulating peptides and metaplasticity: Involvement in Alzheimer's disease. *Pharmacological Research*, 130, pp. 385–401. doi: 10.1016/J.PHRS.2018.01.018
- Pluskal, T., Castillo, S., Villar-Briones, A., y Orešič, M. 2010. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics*, 11. doi: 10.1186/1471-2105-11-395
- R Core Team. 2013. R: A language y environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.
- Regoli, D., Rhaleb, N. E., Dion, S. phane, Tousignant, C., Rouissi, N., Jukic, D., and Drapeau, G. 1990. Neurokinin A. A pharmacological study. *Pharmacological Research*, 22(1), pp. 1–14. doi: 10.1016/1043-6618(90)90738-Y

- Rex, D. A. B., Deepak, K., Vaid, N., Dagamajalu, S., Kandasamy, R. K., Flo, T. H., y Keshava Prasad, T. S. 2022. A modular map of Bradykinin-mediated inflammatory signaling network. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 16(2), pp. 301–310. doi: 10.1007/s12079-021-00652-0
- Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., y Smyth, G. K. 2015. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, 43(7), pp. 1–13. doi: 10.1093/nar/gkv007
- Sculptoreanu, A., Aura Kullmann, F., y De Groat, W. C. 2008. Neurokinin 2 receptor-mediated activation of protein kinase C modulates capsaicin responses in DRG neurons from adult rats. *European Journal of Neuroscience*, 27(12), pp. 3171–3181. doi: 10.1111/J.1460-9568.2008.06267.X
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., y Ideker, T. 2003. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Research*, 13(11), pp. 2498–2504. doi: 10.1101/GR.1239303
- Shrestha, N., Shad, M. Y., Ulvi, O., Khan, M. H., Karamehic-Muratovic, A., Nguyen, U. S. D. T., Baghbanzadeh, M., Wardrup, R., Aghamohammadi, N., Cervantes, D., Nahiduzzaman, K. M., Zaki, R. A., y Haque, U. 2020. The impact of COVID-19 on globalization. *One Health*, 11, pp. 1–9. doi: 10.1016/j.onehlt.2020.100180
- Sobczyn, A. y Harrington, D. J. 2018. Laboratory assessment of folate (Vitamin B9) status. *Journal of Clinical Pathology*, 71(11), pp. 949–956. doi: 10.1136/jclinpath-2018-205048
- Tellier, R. 2022. COVID-19: the case for aerosol transmission. *Interface Focus*, 12(2), pp. 1–10. doi: 10.1098/RSFS.2021.0072
- Theodorsson-Norheim, E., Anderson, M., Jörnvall, H., Norheim, I., Öberg, K., y Jacobsson, G. 1987. Isolation and characterization of neurokinin A, neurokinin A(3–10) and neurokinin A(4–10) from a neutral water extract of a metastatic ileal carcinoid tumour. *European Journal of Biochemistry*, 166(3), pp. 693–698. doi: 10.1111/J.1432-1033.1987.TB13567.X
- Theoharides, T. C. y Tsilioni, I. 2020. Amyotrophic Lateral Sclerosis, Neuroinflammation, and Cromolyn. *Clinical Therapeutics*, 42(3), pp. 546–549. doi: 10.1016/J.CLINTHERA.2020.01.010
- Thomas, T., Stefanoni, D., Reisz, J. A., Nemkov, T., Bertolone, L., Francis, R. O., Hudson, K. E., Zimring, J. C., Hansen, K. C., Hod, E. A., Spitalnik, S. L., y D’Alessandro, A. 2020. COVID-19 infection results in alterations of the kynurenine pathway and fatty acid metabolism that correlate with IL-6 levels and renal status. *JCI Insight*, 5(14), pp. 1–16. doi: 10.1172/jci.insight.140327
- Valdés, A., Moreno, L. O., Rello, S. R., Orduña, A., Bernardo, D., y Cifuentes, A. 2022. Metabolomics study of COVID-19 patients in four different clinical stages. *Scientific Reports*, 12(1), pp. 1–11. doi: 10.1038/s41598-022-05667-0
- Wang, K., Gheblawi, M., y Oudit, G. Y. 2020. Angiotensin Converting Enzyme 2: A Double-Edge Sword. *Circulation*, 1(42), pp. 426–428. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.047049
- Wang, M., Carver, J. J., Phelan, V. V., Sanchez, L. M., Garg, N., Peng, Y., Nguyen, D. D., Watrous, J., Kapon, C. A., Luzzatto-Knaan, T., Porto, C., Bouslimani, A., Melnik, A. V., Meehan, M. J., Liu, W. T., Crüseman, M., Boudreau, P. D., Esquenazi, E., Sandoval-Calderón, M., Kersten, R. D., Pace, L. A., Quinn, R. A., Duncan, K. R., Hsu, C. C., Floros, D. J., Gavilan, R. G., Kleigrew, K., Northen, T., Dutton, R. J., Parrot,

D., Carlson, E. E., Aigle, B., Michelsen, C. F., Jelsbak, L., Sohlenkamp, C., Pevzner, P., Edlund, A., McLean, J., Piel, J., Murphy, B. T., Gerwick, L., Liaw, C. C., Yang, Y. L., Humpf, H. U., Maansson, M., Keyzers, R. A., Sims, A. C., Johnson, A. R., Sidebottom, A. M., Sedio, B. E., Klitgaard, A., Larson, C. B., Boya, C. A. P., Torres-Mendoza, D., Gonzalez, D. J., Silva, D. B., Marques, L. M., Demarque, D. P., Pociute, E., O'Neill, E. C., Briand, E., Helfrich, E. J. N., Granatosky, E. A., Glukhov, E., Ryffel, F., Houson, H., Mohimani, H., Kharbush, J. J., Zeng, Y., Vorholt, J. A., Kurita, K. L., Charusanti, P., McPhail, K. L., Nielsen, K. F., Vuong, L., Elfeki, M., Traxler, M. F., Engene, N., Koyama, N., Vining, O. B., Baric, R., Silva, R. R., Mascuch, S. J., Tomasi, S., Jenkins, S., Macherla, V., Hoffman, T., Agarwal, V., Williams, P. G., Dai, J., Neupane, R., Gurr, J., Rodríguez, A. M. C., Lamsa, A., Zhang, C., Dorrestein, K., Duggan, B. M., Almaliti, J., Allard, P. M., Phapale, P., Nothias, L. F., Alexandrov, T., Litaudon, M., Wolfender, J. L., Kyle, J. E., Metz, T. O., Peryea, T., Nguyen, D. T., VanLeer, D., Shinn, P., Jadhav, A., Müller, R., Waters, K. M., Shi, W., Liu, X., Zhang, L., Knight, R., Jensen, P. R., Palsson, B., Pogliano, K., Lington, R. G., Gutiérrez, M., Lopes, N. P., Gerwick, W. H., Moore, B. S., Dorrestein, P. C., y Bandeira, N. 2016. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology*, 34(8), pp. 828–837. doi: 10.1038/nbt.3597

WHO (World Health Organization). 2021. COVID-19 clinical management: living guidance. Geneva.

Wiersinga, W. J., Rhodes, A., Cheng, A. C., Peacock, S. J., y Prescott, H. C. 2020. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. *JAMA*, 324(8), pp. 782–793. doi: 10.1001/jama.2020.12839

Willforss, J., Chawade, A., y Levander, F. 2019. NormalizerDE: Online Tool for Improved Normalization of Omics Expression Data and High-Sensitivity Differential Expression Analysis. *Journal of Proteome Research*, 18(2), pp. 732–740. doi: 10.1021/acs.jproteome.8b00523

Wu, D., Shu, T., Yang, X., Song, J.-X., Zhang, M., Yao, C., Liu, W., Huang, M., Yu, Y., Yang, Q., Zhu, T., Xu, J., Mu, J., Wang, Y., Wang, H., Tang, T., Ren, Y., Wu, Y., Lin, S.-H., Qiu, Y., Zhang, D.-Y., Shang, Y., y Zhou, X. 2020. Plasma metabolomic and lipidomic alterations associated with COVID-19. *National Science Review*, 7(7), pp. 1157–1168. doi: 10.1093/nsr/nwaa086

Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y. M., Wang, W., Song, Z. G., Hu, Y., Tao, Z. W., Tian, J. H., Pei, Y. Y., Yuan, M. L., Zhang, Y. L., Dai, F. H., Liu, Y., Wang, Q. M., Zheng, J. J., Xu, L., Holmes, E. C., y Zhang, Y. Z. 2020. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 579(7798), pp. 265–269. doi: 10.1038/s41586-020-2008-3

Zhao, J., Yuan, Q., Wang, H., Liu, W., Liao, X., Su, Y., Wang, X., Yuan, J., Li, T., Li, J., Qian, S., Hong, C., Wang, F., Liu, Y., Wang, Z., He, Q., Li, Z., He, B., Zhang, T., Fu, Y., Ge, S., Liu, L., Zhang, J., Xia, N., y Zhang, Z. 2020. Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients with Novel Coronavirus Disease 2019. *Clinical Infectious Diseases*, 71(16), pp. 2027–2034. doi: 10.1093/cid/ciaa344

Zheng, Y., Zhang, L., Xie, J., y Shi, L. 2021. The Emerging Role of Neuropeptides in Parkinson's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13, pp. 90. doi: 10.3389/FNAGI.2021.646726/BIBTEX

Zhou, P., Yang, X. Lou, Wang, X. G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H. R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C. L., Chen, H. D., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R. Di, Liu, M. Q., Chen, Y., Shen, X. R., Wang, X., Zheng, X. S., Zhao, K., Chen, Q. J., Deng, F., Liu, L. L., Yan, B., Zhan, F. X., Wang, Y. Y., Xiao, G. F., y Shi, Z. L. 2020. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579(7798), pp. 270–273. doi: 10.1038/s41586-020-2012-7

Zuo, J., Dowell, A. C., Pearce, H., Verma, K., Long, H. M., Begum, J., Aiano, F., Amin-Chowdhury, Z., Hallis,

B., Stapley, L., Borrow, R., Linley, E., Ahmad, S., Parker, B., Horsley, A., Amirthalingam, G., Brown, K., Ramsay, M. E., Ladhani, S., y Moss, P. 2021. Robust SARS-CoV-2-specific T cell immunity is maintained at 6 months following primary infection. *Nature Immunology*, 22(5), pp. 620–626. doi: 10.1038/s41590-021-00902-8

Anexos

Tabla 3. Parámetros utilizados en la selección de picos por MZmine 2.53.

Módulo	Parámetro	Valor para Plasma	Valor para Orina
Detección de masa	Nivel de ruido MS1	400	600
	Nivel de ruido MS2	20	20
Construcción del cromatograma con ADAP	Número de señales	5	5
	Umbral de intensidad de grupo	400	600
	Intensidad mínima de picos	800	1200
	Tolerancia de m/z	0.02 Da, 0.0 ppm	0.02 Da, 0.0 ppm
Deconvolución del cromatograma	Método	Ondículas (ADAP)	Ondículas (ADAP)
	Relación señal/ruido (S/N)	7	7
	Estimador de S/N	Ventana de intensidad S/N	Ventana de intensidad S/N
	Intensidad mínima de picos	800	1200
	Umbral de razón coeficiente/área	10	10
	Ancho de picos en tiempo de retención (RT)	0.08 - 2.00	0.08 - 2.00
	Ancho de ondículas	0.01 - 0.07	0.05 - 0.08
Agrupamiento de picos isotópicos	Tolerancia de m/z	0.02 Da, 0.0 ppm	0.02 Da, 0.0 ppm
	Tolerancia de RT	0.5 min	0.5 min
	Forma monotónica	Seleccionado	Seleccionado
	Carga máxima	1	1
	Isótopo representativo	Más intenso	Más intenso
Alineamiento por RANSAC	Tolerancia de m/z	0.02 Da, 0.0 ppm	0.02 Da, 0.0 ppm
	Tolerancia de RT	0.25 min	0.25 min
	Tolerancia de RT después de la corrección	0.125 min	0.125 min
	Iteraciones de RANSAC	0	0
	Mínimo número de puntos	20%	20%
	Valor de corte	1	1
Llenado de espacios con la misma ventana de m/z y RT	Tolerancia de m/z	0.02 Da, 0.0 ppm	0.02 Da, 0.0 ppm
Filtrado de duplicados	Tolerancia de m/z	0.006 Da, 0.0 ppm	0.006 Da, 0.0 ppm
	Tolerancia de RT	0.25 min	0.25 min

Tabla 4. Lista de anotaciones putativas de metabolitos diferencialmente abundantes en COVID-19 por muestra y cohorte. Las estructuras anotadas como *metabolite* fueron asignadas por KEGG MINE como metabolitos teóricos del compuesto original.

Nombre	Fórmula molecular	Aducto	Masa teórica	Masa experimental	Error de masa	Tiempo de retención (min)	Asignación automática/COSMIC	Razón de cambio	Muestra	Cohorte
<i>Lyso PC (18:2)</i>	C26H50NO7P	[M + H] ⁺	520.3397	520.3384	-2.4845	26.9	Asignación automática	0.225	Plasma	General
<i>Glycochenodeoxycholic acid</i>	C26H43NO5	[M + H] ⁺	450.3213	450.318	-7.3166	25.2	Asignación automática	0.162	Plasma	General
<i>Dodecanedioic acid</i>	C12H22O4	[M - H ₂ O + H] ⁺	213.1491	213.1501	4.609	26.1	Asignación automática	0.09	Plasma	General
<i>1,2-Dioctanoyl PC</i>	C24H48NO8P	[M + H] ⁺	510.319	510.3151	-7.6163	25.1	Asignación automática	0.078	Plasma	General
<i>1-Myristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine</i>	C22H46NO7P	[M + H] ⁺	468.3084	468.3081	-0.7097	26.3	Asignación automática	0.078	Plasma	General
<i>Lyso PC (18:3)</i>	C26H48NO7P	[M + H] ⁺	518.324	518.3253	2.4228	26.4	Asignación automática	0.076	Plasma	General
<i>Lyso PC (12:0)</i>	C20H42NO7P	[M + H] ⁺	440.2771	440.2802	6.9664	25.2	Asignación automática	0.064	Plasma	General
<i>Lyso PC (22:6)</i>	C30H50NO7P	[M + H] ⁺	568.3397	568.3391	-1.0685	26.8	Asignación automática	0.06	Plasma	General
<i>1-Pentadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine</i>	C23H48NO7P	[M + H] ⁺	482.324	482.3238	-0.4053	26.8	Asignación automática	0.052	Plasma	General
<i>Piperine</i>	C17H19NO3	[M + H] ⁺	286.1437	286.144	1.2229	25.8	Asignación automática	0.023	Plasma	General
<i>Butyrylchitin</i>	C32H55N3O17	[M + H] ⁺	754.3603	754.3654	6.7002	22.9	1	0.173	Plasma	General
<i>Fengycin metabolite</i>	C25H49N3O5	[M + Na] ⁺	494.357	494.3563	-1.3827	18.5	1	0.063	Plasma	General
<i>5-O-Desosaminyleryt hronolide A oxime</i>	C31H56N2O11	[M + Na] ⁺	655.3782	655.3783	0.1787	16.9	1	0.067	Plasma	General

<i>1-palmitoyl-2-(5-oxo-valeroyl)-sn-glycero-phosphoethanolamine</i>	C26H50NO9P	[M + H] ⁺	552.3295	552.3274	-3.8151	21.9	0.97	0.02	Plasma	General
<i>Glucacyclopeptide A</i>	C28H47N7O7	[M + H] ⁺	594.3609	594.3562	-7.9606	16.5	0.97	0.041	Plasma	General
<i>Bradykinin (1-5)</i>	C27H40N8O6	[M - H ₂ O + H] ⁺	555.3043	555.3022	-3.8395	15.1	0.96	0.064	Plasma	General
<i>1-(1Z,12Z-nonadecadienyl)-sn-glycero-3-phosphocholine</i>	C27H54NO6P	[M + Na] ⁺	542.3586	542.3606	3.553	25.1	0.96	0.018	Plasma	General
<i>Ociltide</i>	C31H40N6O7S	[M + Na] ⁺	663.2577	663.2512	-9.8229	18.2	0.95	259.388	Orina	General
<i>2-[[5-(2,6-dimethoxyphenyl)-1-[4-(3-dimethylaminopropyl-methylcarbonyl)-2-propan-2-ylphenyl]pyrazole-3-carbonyl]amino]adamantane-2-carboxylic acid</i>	C39H51N5O6	[M + H ₃ N + H] ⁺	703.4183	703.4115	-9.7034	17.6	0.93	0.036	Plasma	General
<i>Cimicifugoside metabolite</i>	C37H56O12	[M + H] ⁺	693.3844	693.3878	4.9963	14.6	0.92	1512.876	Plasma	General
<i>Cimicifugoside metabolite</i>	C37H56O12	[M + H] ⁺	693.3844	693.3878	4.9963	14.6	0.92	17.782	Plasma	Ventilación mecánica
<i>Thiamine phosphate</i>	C12H17N4O4PS	[M + K] ⁺	383.0345	383.0346	0.3009	15	0.92	0.003	Plasma	General
<i>Thiamine phosphate</i>	C12H17N4O4PS	[M + K] ⁺	383.0345	383.0346	0.3009	15	0.92	0.035	Plasma	Ventilación mecánica
<i>Kalbreclasine metabolite</i>	C20H21NO13	[M + H] ⁺	484.1085	484.1091	1.1922	19.7	0.92	33.024	Orina	General

<i>Kalbreclasine metabolite</i>	C20H21NO13	[M + H] ⁺	484.1085	484.1091	1.1922	19.7	0.92	297.057	Orina	Ventilación mecánica
<i>Morpholin-4-yl-[4-[3-(4-morpholin-4-ylsulfonylphenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]piperidin-1-yl]methanone</i>	C22H29N5O6S	[M + Na] ⁺	514.1736	514.174	0.6596	16.2	0.92	267.477	Plasma	Ventilación mecánica
<i>Cyanostatin A</i>	C38H57N5O9	[M - H ₂ O + H] ⁺	710.4129	710.4136	0.9514	14.6	0.92	360.604	Plasma	General
<i>Cyanostatin A</i>	C38H57N5O9	[M - H ₂ O + H] ⁺	710.4129	710.4136	0.9514	14.6	0.92	90.058	Plasma	Ventilación mecánica
<i>Lysophosphatidylcholine(20:5)</i>	C28H48NO7P	[M + H] ⁺	542.324	542.3267	4.9332	26.5	0.92	0.01	Plasma	General
<i>N-(2-Nitro-4-azidobenzoyl)puromycin</i>	C29H31N11O8	[M + H] ⁺	662.2429	662.2447	2.7371	17.8	0.9	1404.087	Orina	General
<i>Exorphin C</i>	C29H45N5O8	[M + H] ⁺	592.334	592.3285	-9.3571	27.7	0.89	62.815	Orina	General
<i>N-(tert-butoxycarbonyl)leucylleucine</i>	C17H32N2O5	[M + H] ⁺	345.2383	345.2358	-7.3006	16.4	0.88	34.51	Plasma	General
<i>Ala-Leu-Leu-Thr</i>	C19H36N4O6	[M + Na] ⁺	439.2533	439.2518	-3.2805	13.7	0.87	101.049	Plasma	General
<i>L-alanyl-L-leucyl-L-leucyl-L-threonine</i>	C19H36N4O6	[M + Na] ⁺	439.2533	439.2518	-3.2805	13.7	0.87	87.42	Plasma	Ventilación mecánica
<i>Chromozym PL</i>	C26H34N6O7S	[M + K] ⁺	613.1847	613.1872	4.1833	21.1	0.87	122.273	Orina	Ventilación mecánica
<i>(1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-3-methyl)methanethiosulfonate</i>	C10H18NO3S2	[M + K] ⁺	303.0365	303.0362	-1.0607	21.7	0.87	96.827	Orina	General
<i>(1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrr</i>	C10H18NO3S2	[M + K] ⁺	303.0365	303.0362	-1.0607	21.7	0.87	130389.1	Orina	Ventilación mecánica

<i>oline-3-methyl)methanethiosulfonate</i>										
<i>1,3-Bis(4-(p-methoxyphenyl)piperazinyl)-2-propanol</i>	C25H36N4O3	[M + H] ⁺	441.2859	441.2901	9.3183	20	0.86	0.039	Plasma	General
<i>N-Ethylmaleimide-S-glutathione</i>	C18H26N4O9S	[M + K] ⁺	513.1058	513.1045	-2.3836	20.5	0.86	208.894	Orina	Ventilación mecánica
<i>Acetazolone</i>	C32H46O4	[M + Na] ⁺	517.3294	517.3277	-3.1948	24.3	0.85	0.048	Plasma	General
<i>Glu-Leu-Val-Ile-Ser</i>	C25H45N5O9	[M + H] ⁺	560.3289	560.3337	8.5345	25.2	0.85	0.132	Plasma	General
<i>Heptyl phosphinate</i>	C12H26NO4P	[M + H] ⁺	280.1671	280.1673	0.5941	13.7	0.85	624.378	Plasma	General
<i>Heptyl phosphinate</i>	C12H26NO4P	[M + H] ⁺	280.1671	280.1673	0.5941	13.7	0.85	16.856	Plasma	Ventilación mecánica
<i>Eleutherazine B</i>	C22H36N4O6	[M + H ³ N + H] ⁺	470.2979	470.2938	-8.5291	18.6	0.85	7.021	Plasma	General
<i>Angiotensin I (1-3)</i>	C15H29N7O5	[M + Na] ⁺	410.2128	410.2098	-7.331	25.3	0.85	0.008	Orina	General
<i>N-(6-Aminohexanoyl)-6-aminohexanoate phosphate</i>	C12H25N2O6P	[M + H] ⁺	325.1522	325.1548	7.9859	23.2	0.84	156.969	Plasma	Ventilación mecánica
<i>N-Acetyl-O-demethylpuromycin</i>	C21H24N6O7	[M + H ³ N + H] ⁺	490.205	490.2059	1.8033	20.1	0.84	0.036	Plasma	General
<i>N-[4-[[4-(4-acetamidoanilino)-6-(4-ethyl-1-piperazinyl)-1,3,5-triazin-2-yl]amino]phenyl]acetamide</i>	C25H31N9O2	[M + K] ⁺	528.2238	528.2245	1.4293	17	0.84	0.07	Plasma	General

<i>Ethametsulfuro n methyl</i>	C15H18N6O6S	[M + H3N + H] ⁺	428.1352	428.1386	7.989	17.3	0.82	203.406	Plasma	Ventilación mecánica
<i>Syringolin A</i>	C19H30N4O5	[M + H] ⁺	395.2288	395.2267	-5.4795	16.3	0.82	3.166	Plasma	General
<i>Substance P (6-11)</i>	C36H49N7O7S	[M + H3N + H] ⁺	741.3758	741.3703	-7.4176	24.6	0.81	0.032	Plasma	General
<i>3-Hydroxytridecanoyl carnitine</i>	C20H39NO5	[M - H2O + H] ⁺	356.2801	356.2779	-6.1479	25.8	0.8	0.257	Plasma	General
<i>Macbecin</i>	C30H42N2O8	[M + H3N + H] ⁺	576.3285	576.3272	-2.2933	23.6	0.79	0.024	Plasma	General
<i>[3,4-dihydroxy-5-[6-(oxolan-3-ylamino)purin-9-yl]oxolan-2-yl]methyl N-methylcarbamate</i>	C16H22N6O6	[M - H2O + H] ⁺	377.1573	377.1568	-1.4565	20.7	0.79	1084.438	Plasma	Ventilación mecánica
<i>Cyclo(pro-gly)3</i>	C21H30N6O6	[M + H] ⁺	463.2299	463.2314	3.2766	19.5	0.78	0.077	Plasma	General
<i>Pip-leu-gly-amide</i>	C14H26N4O3	[M + Na] ⁺	321.1903	321.1884	-5.8657	17	0.77	2.607	Plasma	General
<i>Neurokinin A (1-3)</i>	C16H29N7O4	[M + H] ⁺	384.2353	384.2346	-1.7117	15.2	0.77	7.597	Plasma	General
<i>n,n'-Bis(2-aminobenzyl)-4,13-diaza-18-crown-6</i>	C26H40N4O4	[M - H2O + H] ⁺	455.3022	455.3019	-0.6059	22	0.77	0.035	Plasma	General
<i>Capsianside A</i>	C23H38O8	[M + Na] ⁺	465.2464	465.2448	-3.5901	18.5	0.76	0.034	Plasma	Ventilación mecánica
<i>C2 Phytoceramide</i>	C20H41NO4	[M + Na] ⁺	382.2933	382.2958	6.4542	26	0.76	0.36	Plasma	General
<i>Dolastatin 15</i>	C43H61N5O10	[M + Na] ⁺	830.4316	830.4358	5.0947	18.2	0.75	0.07	Plasma	General
<i>S-Formylmycothiol metabolite</i>	C18H28N2O12S	[M + K] ⁺	535.1	535.0959	-7.6677	17.9	0.75	143.712	Orina	General
<i>S-Formylmycothiol metabolite</i>	C18H28N2O12S	[M + K] ⁺	535.1	535.0959	-7.6677	17.9	0.75	4993.516	Orina	Ventilación mecánica

<i>CoA-glutathione metabolite</i>	C15H24N4O8S2	[M + Na] ⁺	475.0933	475.0915	-3.8983	16	0.75	236.84 4	Orina	General
<i>2-diethoxyphosphinothioxy-5-methylpyrazolo[1,5-a]pyrimidine-6-carboxylic acid</i>	C12H16N3O5PS	[M + H3N + H] ⁺	363.0892	363.092	7.7211	25.8	0.75	322.66 3	Orina	Ventilación mecánica
<i>Xanthine amine congener</i>	C21H28N6O4	[M + H3N + H] ⁺	446.2516	446.2524	1.8443	17.6	0.74	0.002	Plasma	General
<i>3,4,5-Trihydroxy-6-(3-methoxy-3-oxopropanoyl)oxyoxane-2-carboxylic acid</i>	C10H14O10	[M + Na] ⁺	317.0485	317.0509	7.5942	20.8	0.74	21.717	Plasma	General
<i>3,4,5-Trihydroxy-6-(3-methoxy-3-oxopropanoyl)oxyoxane-2-carboxylic acid</i>	C10H14O10	[M + Na] ⁺	317.0485	317.0509	7.5942	20.8	0.74	396.76 3	Plasma	Ventilación mecánica
<i>Bacitracin A</i>	C26H45N5O7S	[M + Na] ⁺	594.2937	594.2929	-1.4057	15.5	0.73	51.118	Plasma	General
<i>4-[[[3-(4-Morpholinylsulfanyl)phenyl]oxomethyl]amino]benzoic acid ethyl ester</i>	C20H22N2O6S	[M + K] ⁺	457.0836	457.0827	-1.9104	17	0.73	107.57 2	Orina	General
<i>4-[[[3-(4-Morpholinylsulfanyl)phenyl]oxomethyl]amino]benzoic acid ethyl ester</i>	C20H22N2O6S	[M + K] ⁺	457.0836	457.0827	-1.9104	17	0.73	47.321	Orina	Ventilación mecánica

<i>Enkephalin metabolite</i>	C22H27N5O5	[M + Na] ⁺	464.191	464.1927	3.6184	18.3	0.73	0.018	Plasma	General
<i>Enkephalin metabolite</i>	C22H27N5O5	[M + Na] ⁺	464.191	464.1927	3.6184	18.3	0.73	0.024	Plasma	Ventilación mecánica
<i>Cyanophycin metabolite</i>	C11H21N5O7	[M + Na] ⁺	358.1339	358.1329	-2.6655	17.7	0.72	0.001	Orina	General
<i>(E)-1-N'-(cyclopropylmethyl)-1-N-[2-[[5-[[dimethylamino)methyl]furan-2-yl]methylsulfanyl]ethyl]-2-nitroethene-1,1-diamine</i>	C16H26N4O3S	[M + H3N + H] ⁺	372.2069	372.2088	5.0219	20.5	0.71	78.066	Orina	General
<i>(E)-1-N'-(cyclopropylmethyl)-1-N-[2-[[5-[[dimethylamino)methyl]furan-2-yl]methylsulfanyl]ethyl]-2-nitroethene-1,1-diamine</i>	C16H26N4O3S	[M + H3N + H] ⁺	372.2069	372.2088	5.0219	20.5	0.71	1242.691	Orina	Ventilación mecánica
<i>Tetrahydrofolic acid metabolite</i>	C19H25N7O7	[M + H] ⁺	464.1887	464.1919	6.8921	17.7	0.71	0.014	Plasma	General
<i>Tetrahydrofolic acid metabolite</i>	C19H25N7O7	[M + H] ⁺	464.1887	464.1919	6.8921	17.7	0.71	0.044	Plasma	Ventilación mecánica
<i>Enkephalin-leu,ala(2)</i>	C29H39N5O7	[M + H3N + H] ⁺	587.3193	587.3244	8.6114	12.8	0.71	7.509	Plasma	General
<i>Dapacryl</i>	C15H18N2O6	[M + Na] ⁺	345.1063	345.1046	-4.7388	22.2	0.68	83.813	Plasma	General
<i>1-(1,3-Benzothiazol-2-yl)-3-phenylurea</i>	C14H11N3OS	[M + Na] ⁺	292.0521	292.052	-0.1581	24.7	0.68	14.963	Plasma	General
<i>1-(1,3-Benzothiazol-2-yl)-3-phenylurea</i>	C14H11N3OS	[M + Na] ⁺	292.0521	292.052	-0.1581	24.7	0.68	1135.095	Plasma	Ventilación mecánica

<i>Pseudodestruxin B</i>	C36H55N5O7	[M - H ₂ O + H] ⁺	652.4074	652.4081	1.0458	14	0.67	71.937	Plasma	General
<i>2-(1,3-benzothiazol-2-ylthio)-N-(4-methylphenyl)sulfonamide</i>	C16H14N2O3S3	[M + H ₃ N + H] ⁺	396.051	396.0473	-9.3555	15.2	0.67	700.372	Orina	General
<i>Argiopinin II</i>	C16H35N7O3	[M + Na] ⁺	396.2699	396.2707	1.8745	24	0.67	0.041	Plasma	General
<i>2-(6-Carboxy-3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl)propanedioic acid</i>	C9H12O10	[M + Na] ⁺	303.0328	303.0334	1.8599	22.1	0.67	13.281	Plasma	General
<i>2-(6-Carboxy-3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl)propanedioic acid</i>	C9H12O10	[M + Na] ⁺	303.0328	303.0334	1.8599	22.1	0.67	832.5	Plasma	Ventilación mecánica
<i>Carthamone metabolite</i>	C14H14O11	[M + H] ⁺	359.0608	359.0586	-6.083	19.9	0.66	29.327	Plasma	General
<i>Carthamone metabolite</i>	C14H14O11	[M + H] ⁺	359.0608	359.0586	-6.083	19.9	0.66	6529.767	Plasma	Ventilación mecánica
<i>3-Methyl-1-phenyl-1H-thieno[2,3-c]pyrazole-5-carboxylic acid N''-(2-phenoxyacetyl)-hydrazide</i>	C21H18N4O3S	[M + H ₃ N + H] ⁺	424.1443	424.1413	-7.0496	23	0.66	369.033	Orina	Ventilación mecánica
<i>{{(2R)-2-azaniumyl-3-{{(1E)-N-hydroxy-2-(1H-indol-3-</i>	C15H18N4O4S	[M + Na] ⁺	373.0946	373.0965	4.9291	19.7	0.66	0.052	Orina	General

<i>yl)ethanimidoyl] sulfanyl}propanoyl]amino}acetate</i>										
<i>S-(indole-3-acetohydroximoyl)-L-cysteinyglycine</i>	C15H18N4O4S	[M + Na] ⁺	373.0946	373.0965	4.9291	19.7	0.66	0.029	Orina	Ventilación mecánica

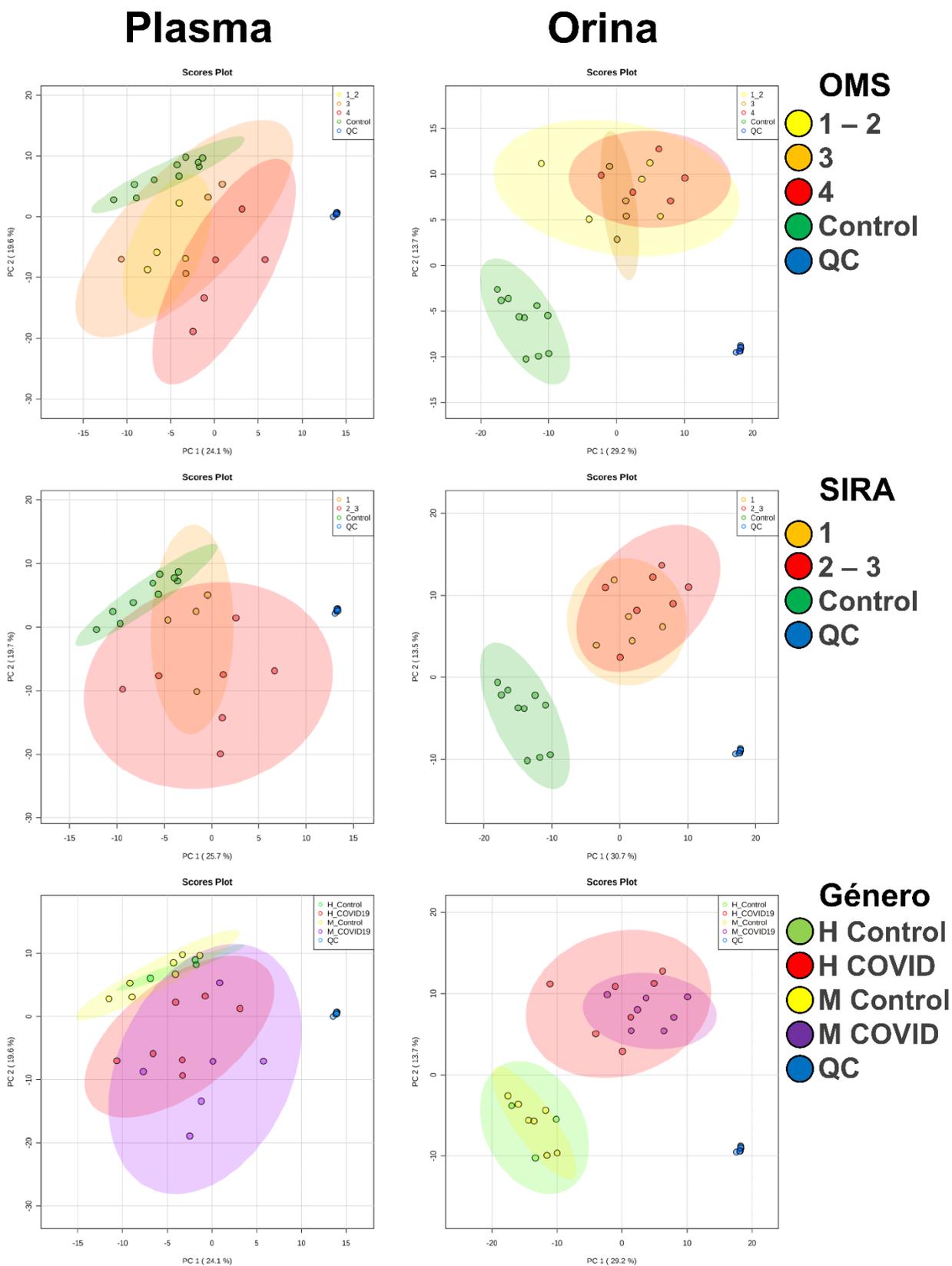


Figura 11. Análisis de componentes principales de los sets de datos por muestra de distintas cohortes. Las cohortes se asignaron con base en la clasificación de COVID-19 por la OMS, de SIRA y por género. Los datos fueron transformados a escala logarítmica sin escalar. Las áreas sombreadas representan los intervalos del 95% de confianza

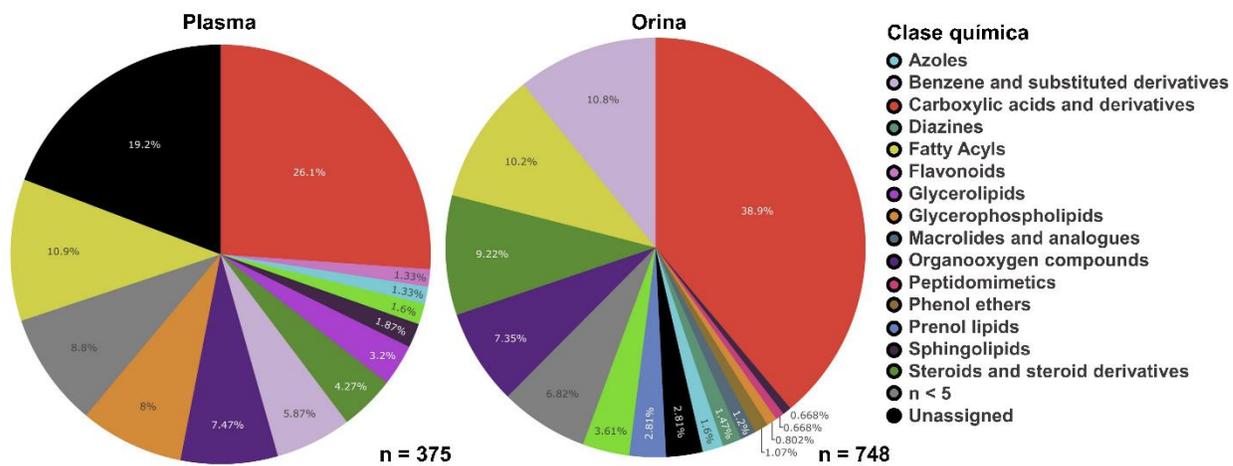


Figura 12. Clases químicas totales (predichas por CANOPUS) detectadas en las distintas muestras de plasma y orina