UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

METABOLÓMICA NO DIRECCIONADA EN MUESTRAS DE SUERO DE PACIENTES INFECTADOS POR VIRUS ZIKA A TRAVÉS DE MALDI-TOF/MS

Proyecto de investigación previo a la obtención del Título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: KARLA ANDREA SEVILLANO OCHOA

TUTORA: PhD. NOROSKA GABRIELA SALAZAR MOGOLLÓN

COTUTOR: FERNANDA BERTUCCEZ CORDEIRO

COTUTOR: GIOVANNA CRISTINA MORÁN MARCILLO

Tena-Ecuador

2025

Ingeniería en Biotecnología

Declaración de derecho de autor, autenticidad y responsabilidad

Tena, 05 de agosto de 2025

Yo, Karla Andrea Sevillano Ochoa, con documento de identidad 1751055623, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología, son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Firma:

Firmado electrónicamente por:
KARLA ANDREA
SEVILLANO OCHOA

Karla Andrea Sevillano Ochoa

C.I: 1751055623

Ingeniería en Biotecnología

Autorización de publicación en el repositorio institucional

Tena, 05 de agosto de 2025

Yo, Karla Andrea Sevillano Ochoa, con documento de identidad 1751055623, en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: METABOLÓMICA NO DIRECCIONADA EN MUESTRAS DE SUERO DE PACIENTES INFECTADOS POR VIRUS ZIKA A TRAVÉS DE MALDI-TOF/MS, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ÓRGANICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN, reconozco a favor de la Universidad Regional Amazónica Ikiam una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Así mismo autorizo a la Universidad Regional Amazónica Ikiam para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma:

Firmado electrónicamente por:
KARLA ANDREA
SEVILLANO OCHOA

Karla Andrea Sevillano Ochoa

C.I: 1751055623

Ingeniería en Biotecnología

Certificado de dirección de trabajo de titulación

Tena, 05 de agosto de 2025

Certifico que el trabajo de titulación: “METABOLÓMICA NO DIRECCIONADA EN MUESTRAS DE SUERO DE PACIENTES INFECTADOS POR VIRUS ZIKA A TRAVÉS DE MALDI-TOF/MS”, aprobado bajo el mecanismo de titulación de tesis, fue realizado por Karla Andrea Sevillano Ochoa, bajo mi dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica IKIAM, para su entrega y defensa.

Firmado electrónicamente por:
NOROSKA GABRIELA SALAZAR MOGOLLON
Validar únicamente con FirmaEC

TUTORA
Noroska Gabriela Salazar Mogollón
C.I: 1757494453

Firmado electrónicamente por:
FERNANDA BERTUCCEZ CORDEIRO
Validar únicamente con FirmaEC

COTUTORA
Fernanda Cordeiro Bertuccez
C.I: 0963435136

Firmado electrónicamente por:
GIOVANNA CRISTINA MORAN MARCILLO
Validar únicamente con FirmaEC

COTUTORA
Giovanna Cristina Moran Marcillo
CI: 1313209064

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, agradezco a Dios, fuente de fortaleza y guía constante en este camino. Gracias por darme la valentía para seguir adelante, el ánimo para no rendirme y el aliento necesario en cada etapa. Por haberme consolado en los momentos de tristeza y haber llenado de paz mi corazón en los momentos de felicidad.

Segundo, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi tutora de tesis, PhD. Gabriela Salazar, por su invaluable orientación, paciencia y apoyo durante todo el desarrollo de este proyecto. A mi cotutora Fernanda Bertuccez quien también formó parte de este grandioso resultado. De igual manera, doy las gracias a Ricardo Correa quien, a pesar de estar lejos, su disposición para ayudar y compartir su conocimiento aportó enormemente esta experiencia. Asimismo, quiero agradecer a mi cotutora Giovanna Morán, su experiencia y conocimiento en el laboratorio fue fundamental en el desarrollo de este trabajo.

Agradezco también a mi amigo Brayan Zurita, gracias por mostrarme que las personas buenas existen y vivo rodeada de ellas, sus palabras de aliento y consejos me motivaron a dar el último esfuerzo en este proyecto y a mi tío Mario Sevillano por su compañía, consejos y apoyo incondicional en los momentos más difíciles.

Agradezco profundamente a mis padres, Henry Sevillano y Lorena Ochoa, por su amor, esfuerzo y dedicación incondicional. Gracias por ser mi ejemplo, por impulsarme a seguir adelante y por creer en mí incluso cuando yo dudaba.

Finalmente, y no menos importante, agradezco a la Universidad Regional Amazónica Ikiam, donde pude crecer personal y académicamente en estos años. Agradezco a aquellos profesores que sembraron en mí su amor por la ciencia y la investigación. Gracias a todos por ser parte de esta etapa y gracias a Dios por poner a cada uno en mi camino.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a Dios, por haber guiado cada uno de mis pasos con su amor y fortaleza. Su presencia constante me dio el valor necesario para culminar esta etapa con fe y determinación**.** A mis padres Lorena Ochoa y Henry Sevillano, gracias por su apoyo, por creer en mí, por sus consejos, por su sacrificio, su amor y por siempre darme la motivación para convertirme en lo que ahora soy. A mis abuelos Manuel Ochoa, Fanny Córdova y Amada Padilla quienes estuvieron pendientes en todo momento, dándome su ánimo. A pesar de la distancia el aliento que me brindaron fue una luz que me guio en cada uno de mis pasos para poner fin a este camino. A ustedes familia, les dedico este logro con sincero agradecimiento y admiración.

TABLA DE CONTENIDO

PORTADA
Declaración de derecho de autor, autenticidad y responsabilidad ii
Certificado de dirección de trabajo de titulación iv
AGRADECIMIENTO v
DEDICATORIA vi
TABLA DE CONTENIDO vii
ÍNDICE DE TABLA ix
ÍNDICE DE FIGURAS x
ÍNDICE DE ANEXOS xi
RESUMEN xii
ABSTRACT xiii
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACICÓN 114
1. 1 Antecedentes 14
1.1.1. Estructura molecular del ZIKV 15
1.1.2. Ciclo viral del ZIKV 16
1.1.3. Patogénesis 17
1.1.4. Órganos blanco del ZIKV 18
1.1.5. Técnicas de diagnóstico para la identificación de ZIKV 18
1.1.5.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) 19
1.1.5.2. Pruebas serológicas 19
1.1.6. Avance de las Ciencias Ómicas 20
1.1.6.1. La metabolómica en el desarrollo de diagnóstico del ZIKV 20
1.1.6.2. Metabolómica Dirigida 21
1.1.6.3. Metabolómica No Dirigida 21
1.1.6.4. Espectrometría de masas aplicada a la metabolómica 22
1.2. Planteamiento del problema 23
1.3. Justificación de la investigación 25
1.4. Objetivos de la investigación 26

1.4.1. Objetivo General 26
1.4.2. Objetivos Específicos 26
CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO 27
2.1. Declaración de la ética 27
2.2. Población de estudio 27
2.3. Recolección de muestras 27
2.4. Preparación de las muestras 28
2.5. Preparación de la matriz 28
2.6. Parámetros y condiciones operativas 28
2.7. Análisis Estadístico de los datos 29
2.8. Evaluación del Potencial del Biomarcador de los metabolitos 29
CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS 30
3.1. Normalización por Pareto Scaling 30
3.2. Análisis discriminante por mínimos cuadrados (PLS-DA) 31
3.3. Evaluación del potencial de los biomarcadores 36
3.4. Base de datos LIPID MAPS 46
CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN 49
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 52
REFERENCIAS
Anexos

ÍNDICE DE TABLA

Tabla 1-2. Metabolitos identificados en muestras de CONTROL y ZIKV..... 45
T**abla 2-2**. Identificación de lípidos en LIPID MAP..... 46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-2. Antes y después de la normalización por Pareto Scaling..... **31**
Figura 2-2. Diferenciación metabólica mediante análisis PLS-DA entre grupo..... **32**
Figura 3-2. Score plot del análisis PLS-DA entre grupo..... **33**
Figura 4-2. Evaluación del rendimiento del modelo PLS-DA..... **34**
Figura 5-2. Score plot del análisis PLS-DA entre grupo..... **35**
Figura 6-2. Análisis de las variables importantes en la proyección (VIP)..... **36**
Figura 7-2. Análisis de curvas ROC univariadas (Cont.)..... **37**
Figura 8-2. Análisis de curvas ROC univariadas (Cont.)..... **37**
Figura 9-2. Análisis de curvas ROC univariadas (Cont.)..... **38**
Figura 10-2. Análisis de curvas ROC univariadas (Cont.)..... **38**
Figura 11-2. Análisis de curvas ROC univariadas (Cont.)..... **39**
Figura 12-2. Análisis de curvas ROC univariadas (Cont.)..... **39**
Figura 13-2. Análisis de curvas ROC univariadas (Cont.)..... **40**
Figura 14-2. Análisis de curvas ROC univariadas (Cont.)..... **40**
Figura 15-2. Análisis de curvas ROC univariadas (Cont.)..... **41**
Figura 16-2. Análisis de curvas ROC univariadas (Cont.)..... **41**
Figura 17-2. Análisis de curvas ROC univariadas (Cont.)..... **42**
Figura 18-2. Análisis de curvas ROC univariadas (Cont.)..... **42**
Figura 19-2. Análisis de curvas ROC univariadas (Cont.)..... **43**
Figura 20-2. Análisis de curvas ROC univariadas..... **43**
Figura 21-2. Análisis de la curva ROC de los 15 metabolitos identificados..... **44**

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A. Libro de Excel de los 200 lípidos reportados en LIPID MAP **58**
Anexo B. Normalización por Pareto Scaling de los 15 metabolitos identificados.. **58**

RESUMEN

El presente proyecto se centró en el análisis de metabolitos en muestras de suero de mujeres infectadas por el virus del Zika (ZIKV), un arbovirus de ARN monocatenario que es transmitido principalmente por el mosquito hembra *Aedes aegypti*, este virus causa gran preocupación en las mujeres por ser el causante de múltiples anomalías en los fetos. Mediante el uso de la técnica de espectrometría de masas con tiempo de vuelo (MALDI-TOF/MS) se identificaron biomarcadores potenciales con fines de diagnóstico. En el estudio se incluyó una población 65 de mujeres en edades de 19 a 65 años, cuyas muestras fueron divididas en grupos de Control y ZIKV. Entre las participantes, para un subgrupo de Control, 9 mujeres estaban en embarazo y 12 no estaban en embarazo y para ZIKV, un subgrupo de 18 mujeres en embarazo y 26 sin embarazo. La extracción de los metabolitos se realizó siguiendo el protocolo de Glasgow Polyomics, seguido de análisis estadísticos multivariados en MetaboAnalyst 6.0 incluyendo PLS-DA. Estos análisis permitieron la identificación de 15 metabolitos, los cuales mostraron diferencias significativas entre los grupos estudiados. A pesar de ello, la evaluación mediante una curva ROC reveló que el área bajo la curva (AUC) no indicaba una alta eficacia de estos metabolitos como biomarcadores para el diagnóstico de ZIKV. Sin embargo, estos hallazgos contribuyen al entendimiento de los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad, destacando la relevancia continua de la metabolómica para los arbovirus en el campo de salud.

Palabras clave: Arbovirus, biomarcadores, espectrometría de masas, metabolómica.

ABSTRACT

This project focused on the analysis of metabolites in serum from women infected with the Zika virus (ZIKV), a single stranded RNA arbovirus mainly transmitted by the female *Aedes aegypti* mosquito, ZIKV is known for its significant impact on woman due to its ability to cause multiple fetal abnormalities. Using time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS), potential biomarkers for diagnostic purposes were identified. The project included a population of 65 women aged 19 to 65 years, divided into Control and ZIKV groups. Among the participants, Control group had 9 pregnant and 12 non-pregnant women, while the ZIKV group had 18 pregnant and 26 non-pregnant women. Metabolites were extracted following the Glasgow Polyomics protocol, followed by multivariate statistical analyses in MetaboAnalyst 6.0, including PLS-DA. These analyses allowed the identification of 15 metabolites, that showed significant differences between the studied groups. However, ROC curve evaluation revealed that the area under the curve (AUC) didn't indicate high effectiveness of these metabolites as biomarker for ZIKV diagnosis. Nevertheless, these findings contribute to understanding the disease´s pathophysiological mechanism, emphasizing the continued relevance of metabolomics in the field of arboviruses and health.

Key words: Arbovirus, biomarkers, mass spectrometry, metabolomics.

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACICÓN

1.1. Antecedentes

El virus Zika (ZIKV) es un virus de ARN monocatenario con envoltura lipídica de polaridad positiva que contiene información genética para la producción de tres proteínas estructurales, cápside, membrana y envoltura y siete proteínas no estructurales, las cuales son: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5(Cortés. N, 2022; Zhang et al., 2017). Pertenece a la familia Flaviviridae y es del género *Flavivirus*, y está clasificado en el grupo IV por la clasificación de Baltimore. El ZIKV es un arbovirus (virus transmitido por artrópodos) y es transmitido por la picadura del mosquito hembra *Aedes aegypti* (Cortés. N, 2022; Rakotonirina A. et al., 2022; Zhang et al., 2017). Este virus es común en lugares tropicales, aunque también pueden encontrarse en regiones templadas y frías (Kantor I., 2018). El ZIKV se descubrió en la sangre de un mono Rhesus (*Macaca mulatta*) en Uganda, África, en abril de 1947, durante una investigación sobre la fiebre amarilla. En 1952 se detectó la infección en humanos mediante pruebas serológicos en Uganda y la República Unida de Tanzania (Ciro C. et al., 2016).

Posteriormente, tras su aparición en América en la isla de Pascua (Chile) en 2014, se propagó al nordeste de Brasil en 2015. Inicialmente, el ZIKV se consideró una enfermedad leve sin mayores consecuencias. Sin embargo, en octubre de ese mismo año, las autoridades sanitarias destacaron la alarma por una posible relación entre la infección del ZIKV y la microcefalia fetal. Tras confirmarse estas asociaciones con trastornos neurológicos, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró una emergencia de salud pública, sobre todo dada la similitud de los síntomas del ZIKV con las infecciones por Dengue y Chikungunya, lo que complica la identificación clínica precisa de la enfermedad, así como las complicaciones en el embarazo (Gorozabel T. et al., 2023; Marchán, C., 2023).

En 2016, Ecuador sufrió un terremoto devastador. Tras este incidente, la presencia de agua estancada aumentó la probabilidad de transmisión de enfermedades arbovirales a través de vectores. El número de infecciones por ZIKV en todo el país aumentó de 92 a 1106, la mayoría de los casos se concentraron en las zonas afectadas por el terremoto. Las mujeres de 15 a 49 años fueron la categoría más susceptible, con 509 casos detectados, con un subgrupo de 73 casos de mujeres embarazadas (UNICEF, 2016).

Estos virus han mostrado un aumento tanto en la incidencia de la enfermedad como en su expansión geográfica, dando lugar a una epidemia fuera de control. A esta situación han contribuido las condiciones ambientales en continuo cambio, así como variables demográficas y socioeconómicas que han facilitado su propagación (Estébanez P., 2018). Los síntomas de la enfermedad aparecen normalmente entre 3 y 12 días después de la picadura de un mosquito portador del virus. Aunque la infección por el ZIKV no siempre provoca síntomas, cuando lo hace suelen clasificarse en cuatro síndromes clínicos: encefalitis, fiebre y mialgias, fiebres hemorrágicas y artritis. Y dentro de las complicaciones fetales: microcefalia, muerte embrionaria o fetal y abortos (Hernández P., 2016). Se ha confirmado que el ZIKV puede transmitirse a través del parto, las relaciones sexuales y por vía sanguínea (Arévalo A. & Suarez M., 2016).

1.1.1. Estructura molecular del ZIKV

El material genético del virus consiste en una molécula de ARN monocatenario con polaridad positiva y un único marco de lectura abierto. Este marco codifica una sola poliproteína que, tras la síntesis, se divide en tres proteínas estructurales: cápside, proteína precursora de membrana y proteína de envoltura. También contiene siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5). El virus tiene un diámetro de unos de 50 nanómetros y está formado por una nucleocápside rodeada por una bicapa lipídica que contiene las proteínas estructurales. Estas proteínas se organizan

en la superficie con una simetría icosaédrica, lo que les otorga estabilidad térmica (Marchán C., 2023; Morales C., 2023).

1.1.2. Ciclo viral del ZIKV

Los Flavivirus como el ZIKV poseen una envoltura que está compuesta por diversos lípidos, incluyendo glicerofosfolípidos, esfingolípidos y colesterol, estos desempeñan un papel importante en la unión, entrada, fusión y replicación del virus con la célula huésped. Los Flavivirus tienen un mecanismo de acción en la infección similar, al usar aquellos lípidos, sin embargo, la alteración lipídica en la célula huésped, puede variar (Morales C., 2023).

El primer paso es la unión del virus a la superficie de la célula mediante varios tipos de receptores. Algunos de estos receptores se adhieren a lípidos en la envoltura del virus, como la fosfatidilserina y la fosfatidiletanolamina, lo que facilita la entrada del virus en la célula huésped a través de un proceso que imita la muerte celular. Además, el colesterol es importante para la entrada del ZIKV porque está involucrado en la formación de estructuras especiales en la membrana celular llamadas balsas lipídicas (Onyango G. et al., 2021). Estas estructuras ayudan a agrupar los receptores del virus y proporcionan un entorno adecuado para que el virus entre en la célula. Una vez dentro de la célula, el ZIKV necesita liberar su material genético, esto sucede cuando la envoltura se fusiona con las membranas de la célula huésped conocidos como endosomas tardías, facilitado por el ambiente ácido en estos compartimentos (Ambrogi G. et al., 2021; Corda D. et al., 2009). Una vez que el ARN del ZIKV se libera en el citoplasma, se comporta como un mensajero que se traduce en una proteína larga, gracias a la expresión de las proteínas virales NS2B, NS4A NS4B. Esta proteína se divide en diez proteínas más pequeñas por acción de los enzimas tanto del virus como de la célula huésped. Las proteínas recién formadas se fijan a una parte de la célula llamada retículo endoplasmático, que sirve como un lugar para que el virus se replique y se construya. Durante este proceso, las proteínas del virus interactúan con las grasas

celulares para formar compartimentos especiales. Estos compartimentos, que se crean al remodelar las membranas celulares, funcionan como fábricas para hacer más virus (Marchán C., 2023; Marrs C. et al., 2016).

Durante la infección el ZIKV produce modificaciones notables en los lípidos celulares huéspedes. Afecta el perfil lipídico al incrementar los niveles de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina, además de aumentar los esfingolípidos como la ceramida y el colesterol, especialmente en la placenta. Estos cambios en los lípidos son cruciales para la replicación del virus y la formación de estructuras dentro de la célula que facilitan el proceso de infección. Finalmente, para el proceso de ensamblaje, las partículas virales se forman cuando las nucleocápsides, que contienen el ARN viral, se asocian con membranas del retículo endoplásmico que llevan proteínas virales específicas. Las gotas de lípidos (LD`s) juegan un papel importante, ya que actúan como sitios de almacenamiento y reclutamiento de lípidos necesarios para la formación del virus. Durante la infección, los LD`s pueden ayudar a encapsular el material genético viral y facilitar la producción de nuevas partículas virales. En células infectadas, especialmente vellosidades placentarias, existe una acumulación significativa de LD's (Dias S. et al., 2023; Morales C., 2023; Queiroz A. et al., 2019).

1.1.3. Patogénesis

Los mosquitos hembra *Aedes aegypti* infectados adquieren el virus al alimentarse de sangre contaminada y luego lo replican en su cuerpo antes de inyectarlo en su siguiente huésped durante otra alimentación. Tras la picadura, la piel del hospedador vertebrado se convierte en el primer lugar de replicación vírica, afectando a diversos tipos celulares epidérmicas, así como a células dendríticas inmaduras. A continuación, el virus se propaga a través de la sangre a los ganglios linfáticos y, por último, a los tejidos periféricos y órganos. Una vez dentro de la célula, el ARN viral se libera en el citosol, lo que provoca una reorganización celular y el desarrollo de la fábrica viral en el retículo endoplásmico. Este proceso favorece la replicación viral al tiempo que protege al virus

de los mecanismos de defensa celular. En adición, el ZIKV puede inhibir procesos celulares que, de otro modo, resultarían en la muerte celular(Diop F. et al., 2018). En mujeres embarazadas, el ZIKV replica e infecta las células placentarias, mostrando una alta afinidad por el sistema nervioso e induciendo la muerte celular de las neuronas, lo que afecta el desarrollo neurológico del feto (Marchán C., 2023).

1.1.4. Órganos blanco del ZIKV

La identificación de órganos vulnerables al ZIKV se basa en el análisis de muestras y biopsias, donde se ha logrado detectar la presencia del virus. Se ha confirmado que el ZIKV infecta y se prolifera en una variedad de órganos, entre ellos el tracto genital femenino, así como en sitios inmunológicamente privilegiados como los ojos, el cerebro y los testículos. Además, se ha observado que el virus puede persistir en varios fluidos corporales como el semen, la saliva, las lágrimas y la orina. Adicionalmente, el ZIKV tiene la capacidad de infectar y dañar principalmente las células progenitoras neurales, interfiriendo en su proliferación y desencadenando la apoptosis, lo que tiene un impacto negativo en el desarrollo cerebral durante las etapas embrionaria y fetal (Hernández P., 2016; Morales C., 2023).

1.1.5. Técnicas de diagnóstico para la identificación de ZIKV

Hasta ahora, se han realizado muchos esfuerzos para detectar y responder a la infección por ZIKV, lo que ha llevado al desarrollo de ciertos métodos de detección. La reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa y las pruebas serológicas, tales como: prueba de neutralización por reducción de placas y el ELISA, se usan para la confirmación en laboratorio de la infección por ZIKV y la diferenciación respecto a otras infecciones por flavivirus (Jääskeläinen et al., 2018).

1.1.5.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa (RT-PCR)

Debido a su gran sensibilidad y especificidad, está técnica se considera el patrón de oro para la detección del ZIKV. Esta técnica identifica el ARN viral en suero, saliva, orina y líquido amniótico. Se han desarrollado varios ensayos basados en RT-PCR, ya sea específicamente para ZIKV o para la detección combinada de ZIKV, Dengue y Chikungunya. Las desventajas de esta técnica incluyen la necesidad de procesar previamente las muestras para extraer el ARN viral, el uso de equipos especializados y la necesidad de personal capacitado, lo que dificulta su aplicación en todas las regiones afectadas (Petersen R. et al., 2016; Reyes M., 2021). No existen métodos establecidos de manera confiable para el diagnóstico de infección prenatal y perinatal causada por ZIKV. A pesar de identificar ARN viral en el líquido amniótico, la sensibilidad especifica de esta técnica aún se desconoce (Petersen R. et al., 2016).

1.1.5.2. Pruebas serológicas

Las pruebas serológicas se basan en la interacción de antígenos y anticuerpos. La prueba de neutralización por reducción de placas (PRNT) y el ELISA son las técnicas más utilizadas para identificar el ZIKV (Cortés. N, 2022; Reyes M., 2021). El ZIKV se diagnóstica mediante la detección de inmunoglobulinas M e inmunoglobulinas G (IgM, IgG) en muestras de suero (Landry M. & George K., 2017). Sin embargo, la alta reactividad cruzada de los anticuerpos contra otros flavivirus como: Dengue, Chikungunya, dificulta la interpretación de los resultados de los ensayos ELISA debido a su baja especificidad en particular contra el Dengue (Petersen R. et al., 2016). Por otro lado, PRNT es considerada la más específica para distinguir anticuerpos de virus idénticos y puede confirmar los resultados de ELISA. No obstante, esta prueba es laboriosa y costosa, requiere la manipulación de virus vivos, puede tardar hasta una semana en

realizarse y requiere reactivos estandarizados que a menudo no están disponibles (Barzon L. et al., 2016; Petersen R. et al., 2016; Reyes M., 2021).

1.1.6. Avance de las Ciencias Ómicas

En el ámbito científico han surgido nuevas tecnologías, basadas en las ciencias ómicas, para ayudar al diagnóstico temprano de esta enfermedad. El concepto de ciencias ómicas se refiere al estudio de un gran número de moléculas que participan en el funcionamiento de un organismo (Martínez A. et al., 2020). Los recientes avances técnicos y computacionales han permitido realizar análisis en profundidad del funcionamiento de genes, proteínas y metabolitos. Estos avances han dado lugar a disciplinas como la genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica (Yanes O., 2015). En la actualidad, se ha destacado el uso de la metabolómica debido a las diversas ventajas que presenta en comparación con las otras ciencias, entre ellas, producir una huella digital de los sistemas metabólicos que mejor indican el fenotipo clínico. La investigación metabolómica puede aumentar nuestra comprensión de las causas de una enfermedad

1.1.6.1. La metabolómica en el desarrollo de diagnóstico del ZIKV

La metabolómica se enfoca en el estudio de pequeñas moléculas presentes en los organismos, tales como aminoácidos, lípidos, nucleótidos, azúcares, hormonas y vitaminas, cubriendo una amplia gama de compuestos orgánicos (Byers M. et al., 2019). Los fluidos biológicos que se analizan comúnmente en metabolómica son, suero, plasma, orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, bilis, líquido amniótico, lágrimas, jugo pancreático, líquido intestinal y leche materna, además de tejidos humanos y células. Los metabolitos son productos finales de complejas redes de regulación celular y pueden influir significativamente en dicha regulación a través de mecanismos de regulación (Ren J. et al., 2018). Además, también se pueden analizar los cambios metabólicos de pequeñas

moléculas endógenas y obtener los biomarcadores correspondientes, los cuales pueden ser aprovechados como herramientas diagnósticas y pronósticas para enfermedades como el ZIKV (Martínez A. et al., 2020; Ren J. et al., 2018).

En el año 2020, se generó una demanda urgente de biomarcadores innovadores y precisos para diagnosticar y evaluar la gravedad del virus COVID-19. En respuesta, se desarrolló un panel específico de biomarcadores lipídicos con un alto potencial diagnóstico. Los resultados también proporcionaron que además de ser efectivos en el diagnóstico, los biomarcadores lipídicos pueden ser valiosos para el seguimiento de la recuperación (Gray N. et al., 2021).

Los enfoques principales en metabolómica se dividen en dirigida y no dirigida. Estos enfoques permiten una exploración completa del metaboloma, asegurando la identificación de nuevos compuestos y ofreciendo un análisis detallado (Utpott M. et al., 2022).

1.1.6.2. Metabolómica Dirigida

La metabolómica dirigida se especializa en el análisis de un grupo particular de metabolitos, generalmente asociados con una vía metabólica específica (Martínez A. et al., 2020). Este enfoque resulta eficaz en investigaciones farmacocinéticas y para evaluar los efectos metabólicos de cambios genéticos en una enzima particular (Yanes O., 2015). Aunque el término metabolómica dirigida es de reciente aparición, existe una extensa literatura que describe protocolos optimizados para preparar y analizar clases específicas de metabolitos en diversas matrices biológicas. Los estudios de metabolómica dirigida ofrecen ventajas significativas, como especificidad, reproducibilidad cuantitativa, alta sensibilidad (con límites de detección y cuantificación muy bajos) y alto rendimiento (Méndez K. et al., 2019; Yanes Óscar, 2015).

1.1.6.3. Metabolómica No Dirigida

Este enfoque implica la medición simultánea de la mayor cantidad posible de metabolitos, permitiendo la evaluación del estado de un sistema biológico al comparar, por ejemplo, individuos de control y pacientes enfermos. Además, facilita el estudio de la efectividad de un tratamiento específico en términos de pronóstico (Montani D. et al., 2012).

Las propiedades físicas y químicas de los metabolitos son diversas y, en muchas ocasiones, se distribuyen en una amplia variedad de concentraciones. Por ende, la investigación en metabolómica no dirigida viene de la mano de técnicas analíticas, la cual ayuda a brindar información molecular detallada, para el descubrimiento de biomarcadores (Méndez K. et al., 2019; Ren J. et al., 2018).

1.1.6.4. Espectrometría de masas aplicada a la metabolómica mediante MALDI-TOF/MS

Las herramientas de metabolómica que utilizan espectrometría de masas son útiles para examinar los cambios en los metabolitos *in vivo*, entender los posibles mecanismos y la patogénesis de enfermedades, y descubrir biomarcadores potenciales que podrían mejorar tanto el diagnóstico como el tratamiento médico (Ren J. et al., 2018).

Dentro de las técnicas que combinan la espectrometría de masas y son aplicadas en la metabolómica, la desorción/ionización laser asistida por matriz acoplada a espectrometría de masas (MALDI-TOF/MS) ha demostrado ser una herramienta exitosa para analizar la composición de lípidos los cuales se relacionan directamente con procesos de señalización celular, además, la estructura de los lípidos es más variada a comparación de los ácidos nucleicos, proteínas y carbohidratos, lo que permite la identificación de biomarcadores específicos (Kubicek S. et al., 2017). Este método arroja resultados en breves minutos a través de una ionización suave del analito, lo que permite el análisis de estructuras altamente complejas (Balsinde J., 2018; Croxatto A. et al., 2012; Tsuchida S. et al., 2020). La duración del análisis esta principalmente determinada por la

cantidad de disparos de láser necesarios para que el experimento sea apto para un análisis de alto rendimiento (Ren J. et al., 2018).

MALDI-TOF MS también se ha utilizado en el diagnóstico de enterovirus como poliovirus, coxsackievirus A y B, así como el echovirus en manos, pies y boca, además, estas infecciones son difíciles de distinguir clínicamente. Recientemente, se ha desarrollado una técnica basada en MALDI-TOF MS para un diagnóstico más rápido de estos virus(Peng J. et al., 2013). Este enfoque no solo facilita la detección de múltiples genotipos de enterovirus, sino que también mejora la vigilancia epidemiológica de estos patógenos, permitiendo un mejor entendimiento de su distribución y características clínicas (Cobo F., 2013).

Desde la identificación de lípidos en estructuras virales procariotas a finales de los años 70, ha habido un notable progreso en la comprensión de como estos lípidos desempeñan funciones estructurales y funcionales. Este avance se ha facilitado gracias al desarrollo de tecnologías avanzadas para el análisis de lípidos. Investigaciones recientes indican que MALDI-TOF MS es capaz de proporcionar datos sobre lípidos que son comparables a los obtenidos mediante otros métodos modernos de espectrometría de masas, pero de manera más rápida y conveniente (Cobo F., 2013; Vitale R. et al., 2013).

1.2. Planteamiento del problema

El surgimiento, resurgimiento y rápida difusión de este virus constituyen actualmente un desafío para la salud pública a nivel global, dado que la infección puede tener consecuencias clínicas significativas, especialmente en poblaciones vulnerables. Las mujeres embarazadas presentan un mayor riesgo de infección y transmisión materno-fetal debido a los cambios fisiológicos en sus sistemas inmunológicos. La transmisión vertical del virus implica un peligro para el feto, con posibles afectaciones en su anatomía, principalmente en el sistema nervioso central, generando un impacto considerable. Las principales complicaciones vinculadas a la infección por el ZIKV incluyen eventos como abortos espontáneos, muerte fetal y perinatal, así como el

síndrome congénito del zika, caracterizado por una serie de anomalías que van desde microcefalia y malformaciones oculares hasta restricción del crecimiento intrauterino, episodios de convulsiones y diversas complicaciones en las funciones motoras y el desarrollo neurológico (Escalante O. et al., 2019; Hernández P., 2016)

Desde el año 2016, las provincias de la región Costa se han visto afectadas en la transmisión del virus ZIKV ya que, la detección del virus se torna más complicada debido a la presencia de los otros flavivirus circulando en el entorno y a su similitud en sus síntomas especialmente en los primeros 3 días de la enfermedad (UNICEF, 2016). En regiones endémicas, la detección del virus del ZIKV se torna más complicada debido a la presencia de los otros flavivirus circulando en el entorno y a su similitud en sus síntomas especialmente en los primeros 3 días de la enfermedad (Cortés. N, 2022; Organización Panamericana de la Salud, 2015). Por ejemplo, una infección reciente por el ZIKV puede generar un resultado positivo en la prueba ELISA para el dengue (Petersen R. et al., 2016). Aunque pueden ofrecer resultados rápidos, existe un riesgo considerable de reactividad cruzada, además de que la disponibilidad de reactivos y equipos es limitada. En contraste, la identificación del ARN viral durante una infección aguda, mediante la aplicación de técnicas como la reacción en cadena polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), ofrece resultados más específicos. Sin embargo, la detección del virus ZIKV es breve durante la fase aguda de la enfermedad. Además, las pruebas moleculares tienen limitaciones en su utilidad para el diagnóstico de infecciones agudas, ya que alrededor del 80% de los pacientes no experimentan síntomas que alertan al paciente o al médico sobre la infección, complicando el establecimiento de un marco de referencia para la fecha de inicio, además, su costo es más elevado en comparación con la técnica mencionada anteriormente (Contigiani de Minio M. et al., 2021; Cortés. N, 2022).

La falta de métodos precisos dificulta la identificación de la infección de este virus. Esta situación también obstaculiza la capacidad para la identificación del síndrome congénito de zika (CZS) y, por último, para reconocer las posibles complicaciones neurológicas futuras asociadas a la infección por ZIKV en los fetos (Cortés. N, 2022) . A su vez, no se

han definido protocolos de pruebas confiables para detectar la infección del ZIKV durante el embarazo y antes del parto (Hernández P., 2016).

1.3. Justificación de la investigación

Aunque el diagnóstico del ZIKV se realiza principalmente en laboratorios de salud pública, su importancia está creciendo, especialmente entre las mujeres embarazadas que buscan atención médica. Para estas mujeres, obtener el diagnóstico es crucial debido a las posibles implicaciones para el feto, ya que la infección intrauterina puede llevar a un síndrome congénito (Cabezas C. & García P., 2017). Además, todas estas técnicas demandan entornos de laboratorio específicos, lo que dificulta su aplicación en la mayoría de las áreas afectadas por la infección del ZIKV. Por lo tanto, es imperativo buscar alternativas más efectivas, como tecnologías de diagnóstico de fácil acceso, capaces de detectar rápidamente y con precisión enfermedades infecciosas emergentes en el lugar de atención, al mismo tiempo que contribuyen a la detección y vigilancia (Escalante O. et al., 2019).

La creciente adopción de la metabolómica, es especialmente por la capacidad de identificar modificaciones metabólicas internas de pequeñas moléculas, lo que permite la obtención de biomarcadores relacionados que tienen la utilidad de describir o identificar el estado en un momento específico, en este caso la infección de ZIKV (Katzelnick C. et al., 2020; Landry M. & George K., 2017). En investigaciones recientes se ha señalado que los flavivirus pueden causar cambios significativos en el lipidoma celular humano, afectando la síntesis de hormonas, esteroides, ácidos grasos, el catabolismo de fosfolípidos y la β-oxidación (Acebes M. et al., 2016). Este enfoque en los metabolitos lipídicos muestra promesas como un área poco explorada pero importante para comprender los mecanismos fisiopatológicos del ZIKV y su infección, ofreciendo potencial para mejorar el pronóstico y diagnóstico de esta enfermedad (Melo O. et al., 2017).

Esto junto a la técnica de MALDI-TOF MS, proporciona características distintivas como capacidad de análisis rápido, bajo consumo de muestra y bajos costos de consumibles por muestra en comparación con los métodos convencionales de identificación (Ren J. et al., 2018). Esto puede contribuir para una mejor respuesta médica especialmente direccionada a mujeres embarazadas (Cabezas C. & García P., 2017; Katzelnick C. et al., 2020; Landry M. & George K., 2017). Por lo tanto, esta investigación se centrará en el análisis de biomarcadores del ZIKV en muestras de suero de mujeres que facilitarán el diagnóstico temprano de la mismo.

1.4. Objetivos de la investigación

1.4.1. Objetivo General

Determinar biomarcadores en muestras de suero de mujeres por el virus zika a través de MALDI-TOF MS para el desarrollo de herramientas diagnósticas.

1.4.2. Objetivos Específicos

Caracterizar el perfil metabolómico del suero de mujeres infectadas por el virus Zika a través de MALDI-TOF MS.

Identificar posibles biomarcadores endógenos de las muestras de suero en mujeres infectadas con el virus Zika a través de análisis estadísticos multivariante.

Evaluar el potencial de los biomarcadores mediante análisis de curva ROC.

CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO

2.1. Declaración de la ética

El presente estudio se desarrolló en el marco de la Colaboración entre el Complejo Hospitalario Alejandro Mann y la Escuela Superior Politécnica del Litoral, con la aprobación del Comité de Ética en Investigación del Hospital Luis Vernaza de Guayaquil (Ecuador) bajo el código HLV-DOF-CEISH-013 para la colección de muestras de suero en participantes mediante el consentimiento informado por escrito de su participación en el estudio.

2.2. Población de estudio

Se llevó a cabo una investigación observacional de casos y controles entre mujeres con un rango de edad de entre 19 a 65 años. Con un total de 65 pacientes, 21 pacientes fueron de control, de estas 9 se encontraban en estado de gestación mientras que 12 no se encontraban en embarazo. Por otro lado, 44 pacientes fueron diagnosticadas con ZIKV, con un subgrupo de 18 en estado gestacional y 26 no estaban en embarazo. La confirmación de la presencia de ARN viral se realizó en paralelo en suero, plasma y sangre completa por medio de la transcripción inversa y amplificación semi-anidada mediante reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR y semi-nested PCR).

2.3. Recolección de muestras

Para la recolección de las muestras se realizó una punción venosa periférica y se utilizó un tubo sin anticoagulante para obtener la muestra de suero.

2.4. Preparación de las muestras

Los metabolitos se extrajeron según el protocolo de Glasgow Polyomics. La preparación de la muestra se realizó en tubos de 2mL en donde se diluyeron 50 µL de suero en 1 mL por volumen de muestra de Cloroformo/Metanol/Agua (1:3:1), a la temperatura de 4°C. Seguido, se llevó al vortex durante 5 min y posteriormente se centrifugó por 3 min a 13.000 *x* g a 4°C. Después de la centrifugación se observó la precipitación de proteínas de la muestra facilitando la extracción del sobrenadante (200 µL) que contiene los metabolitos a analizar. Los metabolitos fueron almacenados a -80°C. Por último, el sobrenadante se secó por 2 horas en un concentrador de vacío (Genevac miVac) para concentración de metabolitos, proceso en que se añadieron 10 µL de cloroformo (grado HPLC, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) a los tubos secos para la homogeneización y rápidamente se tomaron 2 µL de la suspensión colocándose en un spot de la placa del espectrómetro de masas Axima Confidence MALDI TOF MS (Shimadzu, Kyoto, Japón). Este paso se realizó por triplicado.

2.5. Preparación de la matriz

La matriz estuvo compuesta de 2,5 ácido dihidroxibenzoico (DHB 0.5M) disuelto en metanol (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) al 90% con 0.1% ácido trifluoroacético (TFA). Posteriormente en la placa con muestra ya seca se cubrió cada spot con 1 µL de matrix.

2.6. Parámetros y condiciones operativas de MALDI-TOF/MS Shimadzu

La lectura de la placa se realizó en un espectrómetro de masas Axima Confidence MALDI-TOF/MS, en modo reflectron positivo en un rango de 300 a 1000 *m/z*. Esto nos permitió analizar iones con una relación entre masa/carga dentro del rango. La tasa máxima de repetición del láser se estableció en 50.0 Hz. Esto con el fin de proporcionar

datos limpios en ausencia de ruido. La adquisición de los datos se realizó de manera automática con una potencia del láser de 88, 100 perfiles y 10 disparos acumulados por perfil. El equipo fue calibrado previamente con un estándar TOF MIX.

2.7. Análisis Estadístico de los datos

Los espectros de masas de cada muestra se analizaron utilizando el software MetaboAnalyst 6.0 (MetaboAnalyst, 2025) a través de análisis estadísticos multivariados en datos preprocesados, incluidas las intensidades iónicas relativas y valores de masa/carga. Como primer paso, se realizó una normalización por Pareto Scaling, esto se usó para un ajuste de los datos con una dispersión similar para un análisis comparativo. A continuación, se realizó un análisis discriminante por mínimos cuadrados (PLS-DA), para observar la separación de los diferentes grupos de acuerdo con su perfil metabólico.

2.8. Evaluación del Potencial del Biomarcador de los metabolitos

Para determinar el potencial del biomarcador se construyó una curva ROC (Característica Operativa del Receptor), permitiendo medir la sensibilidad y especificidad de los metabolitos identificados en el PLS-DA. Este análisis tiene como finalidad identificar el potencial de diagnóstico de cada metabolito. Finalmente se usa la base de datos LIPID Metabolites And Pathways Strategy (LIPID MAPS®), para obtener información detallada de los metabolitos obtenidos.

CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS

3.1. Normalización por Pareto Scaling

Para proporcionar un equilibrio entre los datos se realizó una normalización por Pareto Scaling, en la Figura 1 podemos observar un antes y un después de la normalización. Este método ajusta los datos centrándolos en la media y dividiéndolos por la raíz cuadrada de la desviación estándar de cada variable, lo que reduce las diferencias significativas entre sus intensidades y *m/z*. Antes de la normalización, la gráfica de densidad (figura 1a) muestra una distribución hacia el lado izquierdo debido a los bajos de intensidades, lo cual también se refleja en la figura 1b, donde los boxplot indican mayor cantidad de valores bajos y algunos de valores altos. Después de la normalización, la figura 1a presentó una distribución más centrada, facilitando la diferenciación de las muestras sin alterar los datos originales. Por otro lado, en la figura 1b, las intensidades se concentran alrededor de la media logrando una distribución más simétrica que mejora la interpretación de los datos.

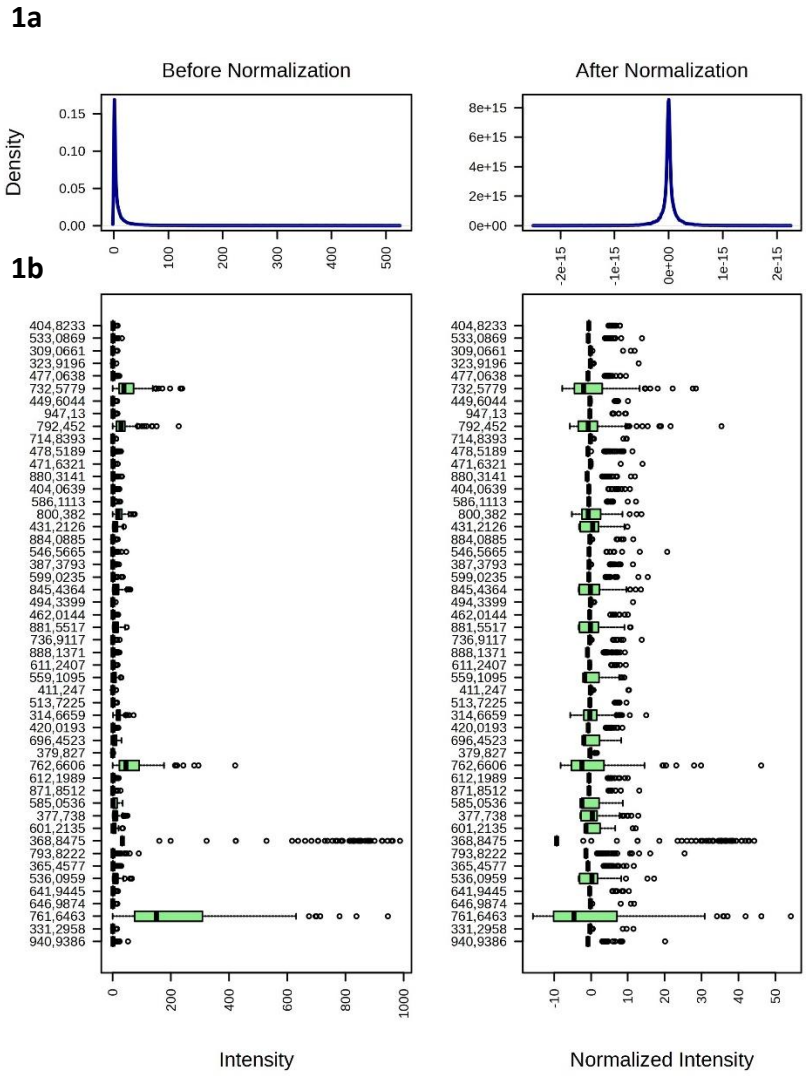


Figura 1-2. Antes y después de la normalización por Pareto Scaling. La figura 1a muestra el antes y después de la normalización, donde se observa un ajuste de datos, por otro lado, la figura 1b, indica la distribución alrededor de la media, obteniendo una simetría.

3.2. Análisis discriminante por mínimos cuadrados (PLS-DA)

Para realizar un análisis discriminante se utilizó PLS-DA, lo que permitió reducir la dimensionalidad de los datos y visualizar la separación de los grupos de CONTROL y ZIKV. En la Figura 2, se observó una tendencia de separación entre los grupos estudiados: los círculos rojos representan al grupo CONTROL y los triángulos verdes al grupo ZIKV. El

componente 1 mostró una varianza de 21.7%, siendo el que presentó mayores diferencias significativas. Aunque la diferenciación se reduce en los componentes 2, 3, 4 y 5, aún se pueden identificar áreas con cierta discriminación. La Figura 3 confirmó esta tendencia e indicó que los puntos superpuestos comparten características entre los grupos, mientras que la separación entre ellos destaca sus diferencias. Los ejes X e Y se representan por los componentes 2 y 1 respectivamente, ya que ofrecen una mejor discriminación entre los grupos, lo que resalta la eficacia del modelo PLS-DA en la distinción metabólica.

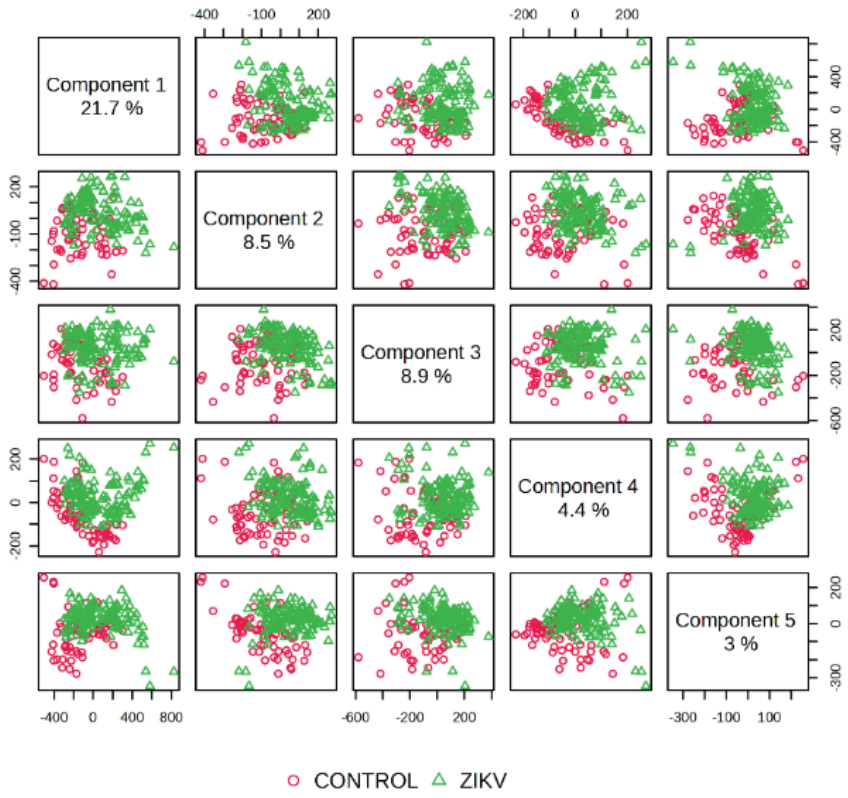


Figura 2-2. Diferenciación metabólica mediante análisis PLS-DA entre grupo CONTROL y el grupo de ZIKV.

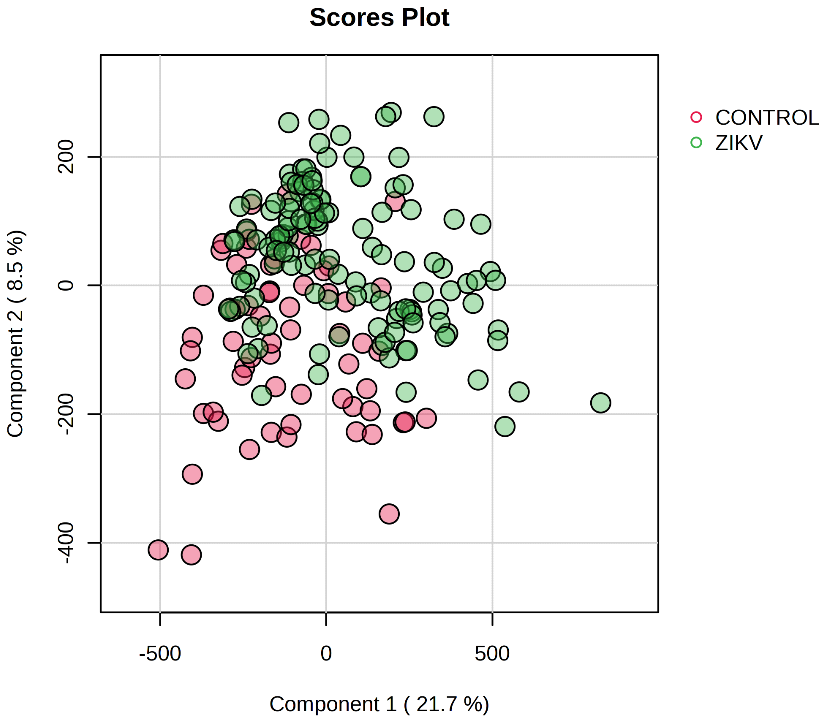


Figura 3-2. Score plot del análisis PLS-DA entre grupo CONTROL y el grupo de ZIKV PC1 vs PC2.

Para confirmar la habilidad predictiva del modelo, se utilizó la validación cruzada (Q2). Q2 es un indicador que determina la predicción de un modelo de PLS-DA basándose en las características de los datos de los grupos CONTROL Y ZIKV, reconociendo patrones que ayuden en la distinción de los grupos. En la Figura 4, se muestra una comparación del rendimiento del análisis PLS-DA, representado mediante barras, donde: Precisión (Accuracy) representada por el color azul, que mide las predicciones que están correctas, R2 por el color rosa, que mide cuánta dispersión hay en los datos y Q2 por el color celeste, que mide el rendimiento de predicción. Se observó que el componente 5 presentó el mayor rendimiento, mayor predicción y mayor dispersión.

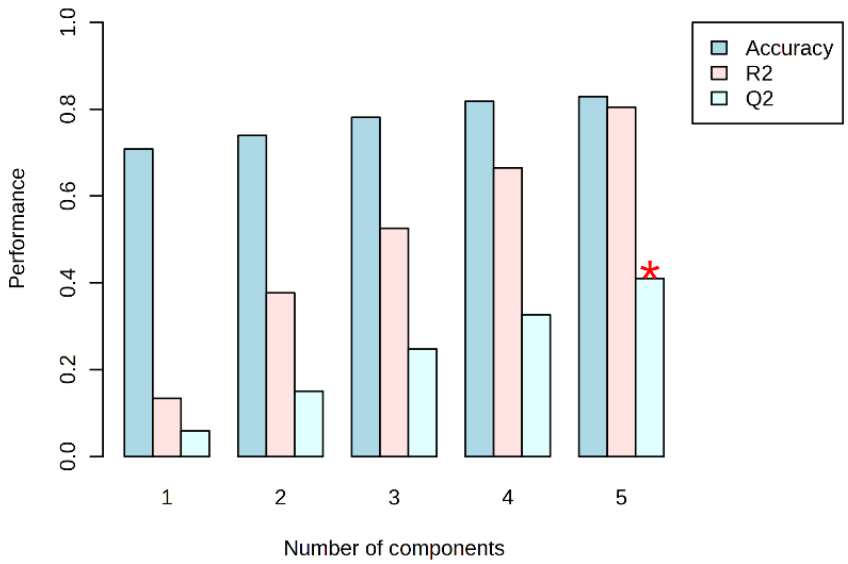


Figura 4-2. Evaluación del rendimiento del modelo PLS-DA basado en Validación Cruzada (Q2).

Un mayor rendimiento se traduce como la habilidad de ese componente explicar la posible diferenciación entre los grupos, por lo tanto, hemos realizado un nuevo PLS-DA ahora tomando en cuenta la PC1 y la PC5. En la figura 5 se puede observar una tendencia de separación en la que ambos grupos son diferenciados principalmente por la PC1. El grupo ZIKV se encuentra en el lado positivo de la PC2, mientras que el grupo control se ubica en el lado negativo.

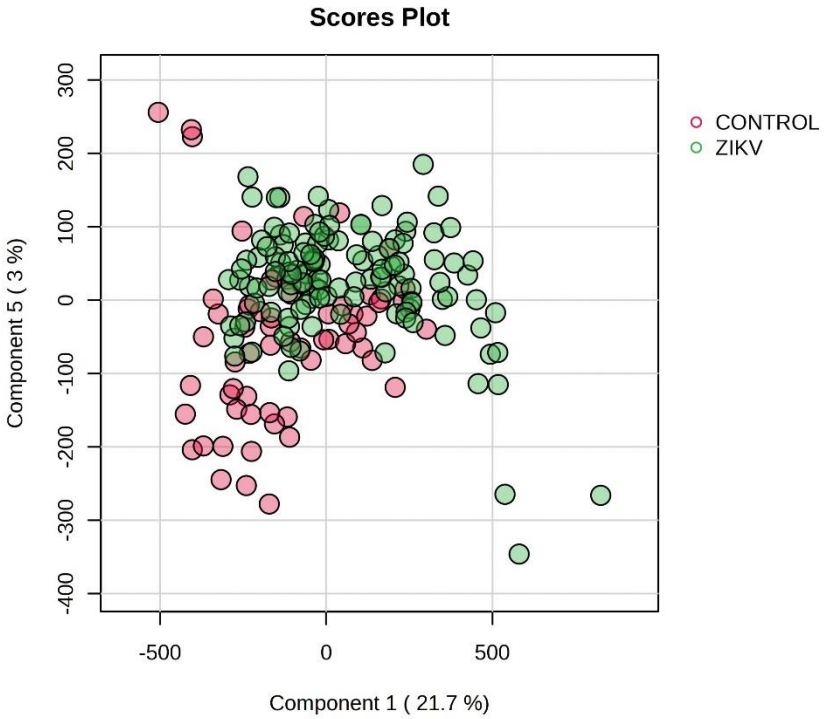


Figura 5-2. Score plot del análisis PLS-DA entre grupo CONTROL y grupo de ZIKV PC1 vs PC5.

Seguidamente se realizó un análisis de la Variable de importancia de proyección (VIP), considerando la Componente 5, lo que ayudó a identificar la masa de los metabolitos que más contribuyen a la discriminación entre los grupos CONTROL y ZIKV, siendo estos los posibles candidatos a biomarcadores. La Figura 6, presenta en el eje X los metabolitos o variables, mientras que en el eje Y los valores que indican la importancia de las variables basadas en sus diferencias entre los grupos. La escala de colores muestra las concentraciones relativas: el color azul indica concentraciones bajas y el color rojo concentraciones altas. Se lograron identificar 15 metabolitos como los más contribuyentes a la separación entre los grupos, siendo digno de mención que los metabolitos 496.0423 Da y 496.0645 Da son encontrados en altas concentraciones en muestras de pacientes sanos y muy bajos en pacientes enfermos, mientras que los 13 metabolitos restantes aumentan en concentración en pacientes infectados y disminuyen en pacientes sanos. Estas diferencias pueden ser indicativas claves para distinguir entre una persona sana y una con ZIKV.

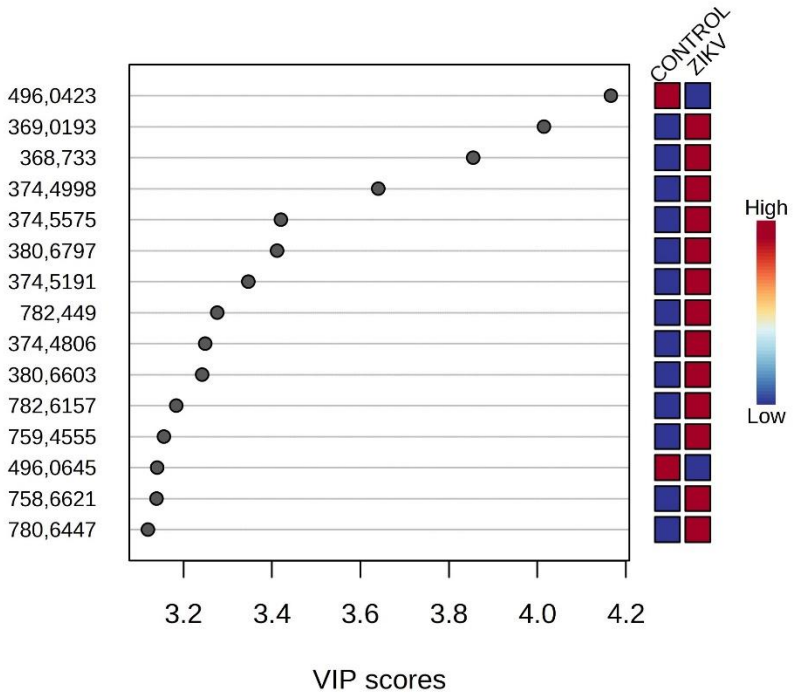


Figura 6-2. Análisis de las variables importantes en la proyección (VIP) para diferenciar el grupo CONTROL del grupo ZIKV.

3.3. Evaluación del potencial de los biomarcadores

Finalmente, se utilizó un análisis clásico de curvas ROC univariadas para identificar la sensibilidad y especificidad de los 15 metabolitos identificados en el VIP entre los grupos CONTROL y ZIKV. Las figuras A (7 a 20), muestran las curvas ROC de cada metabolito, donde la especificidad es representada por el eje X y la sensibilidad por el eje Y. El área bajo la curva (AUC) nos indica la capacidad de los metabolitos para la discriminación. Por otro lado, las figuras B (7 a 20), corresponden a una representación gráfica de la distribución de la abundancia del metabolito indicado en las muestras estudiadas. Esta herramienta nos permite visualizar la variabilidad de la abundancia del metabolito indicado en cada muestra e identificar posibles valores atípicos que no contribuyen para la sensibilidad deseada de un biomarcador diagnóstico.

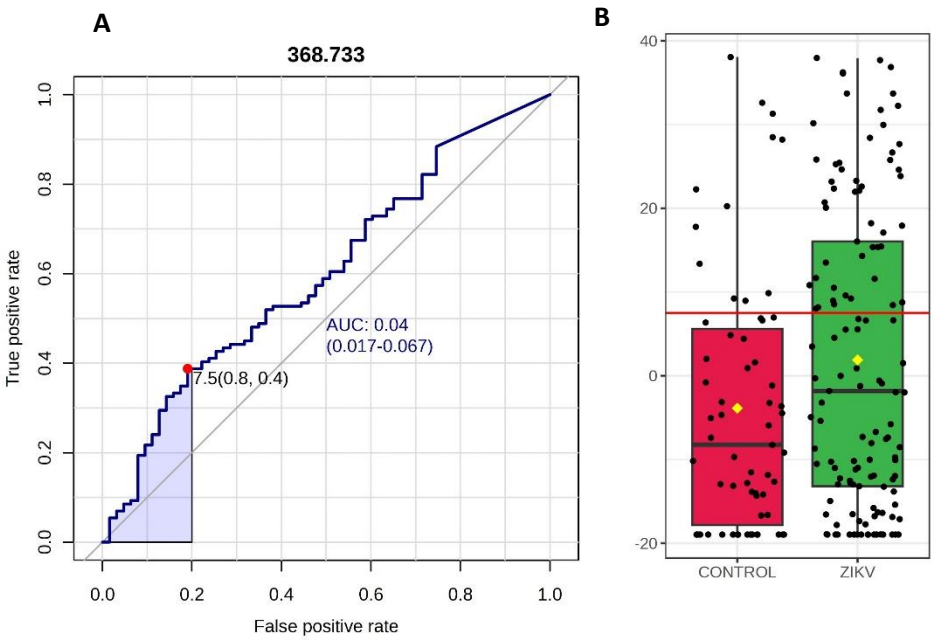


Figura 7-2. Análisis de curvas ROC univariadas (Cont.).

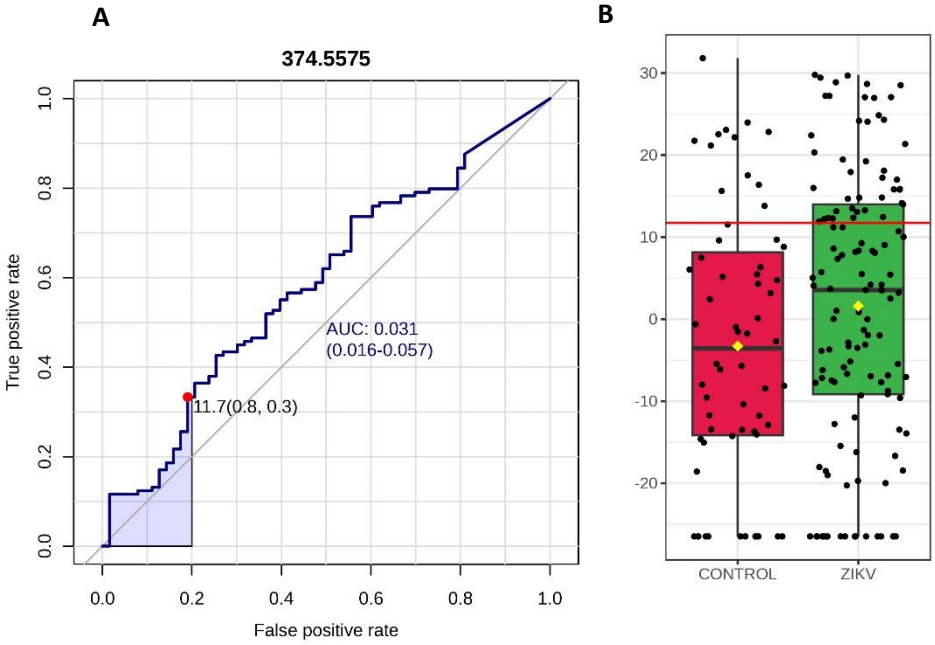


Figura 8-2. Análisis de curvas ROC univariadas (Cont.).

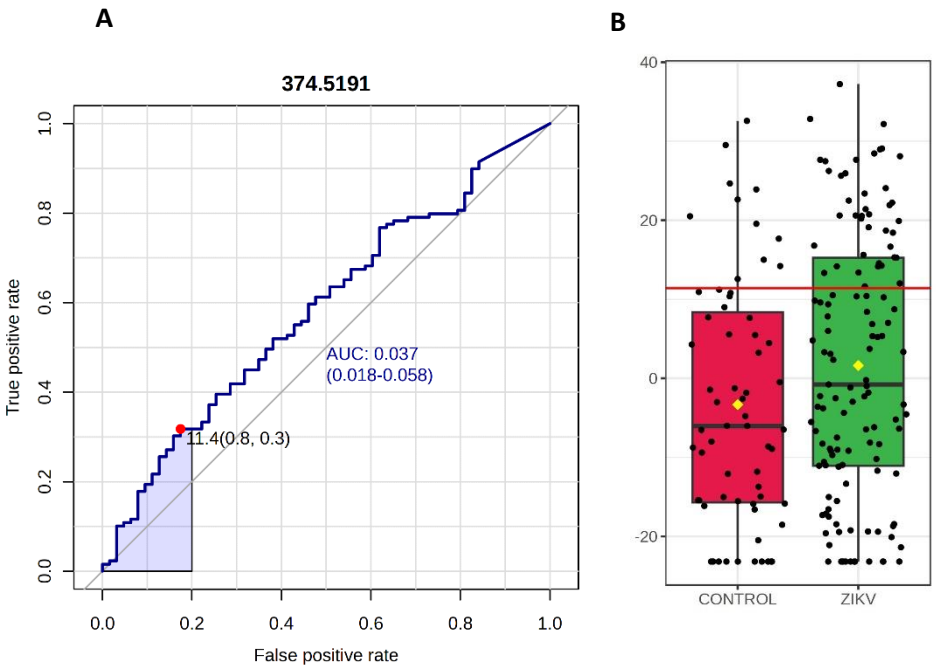


Figura 9-2. Análisis de curvas ROC univariadas (Cont.).

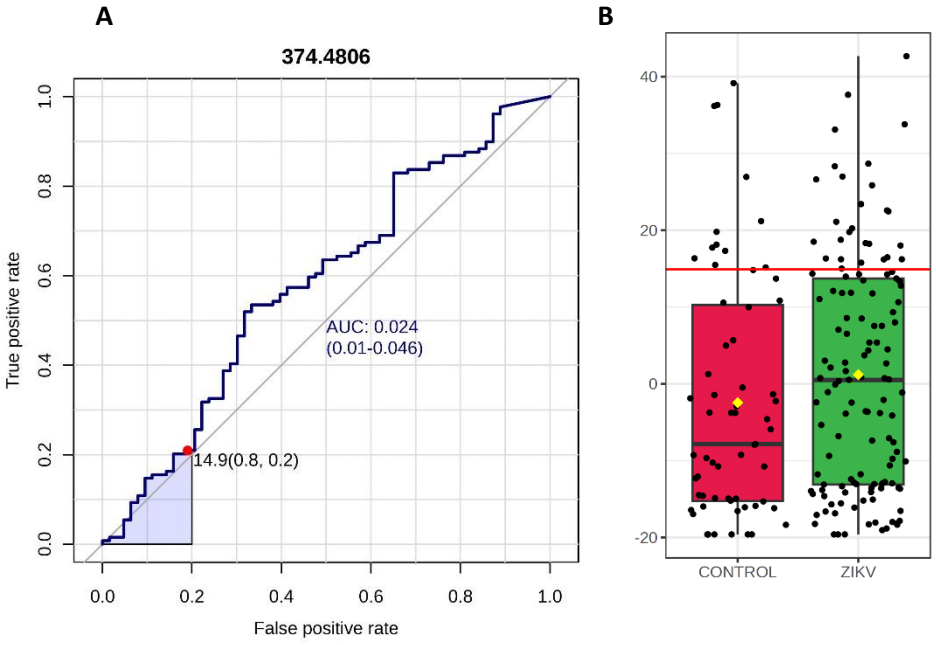


Figura 10-2. Análisis de curvas ROC univariadas (Cont.).

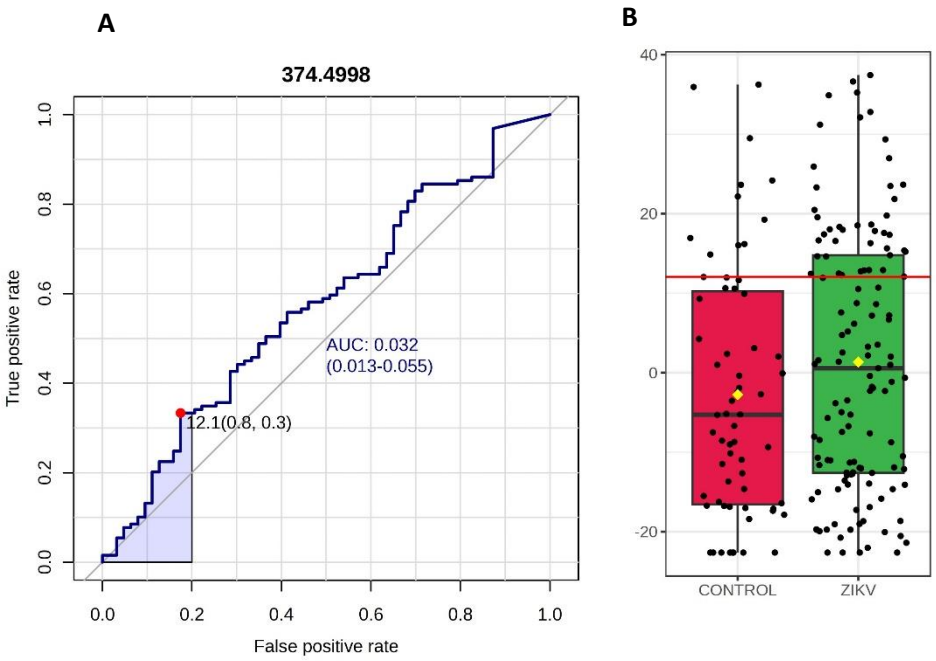


Figura 11-2. Análisis de curvas ROC univariadas (Cont.).

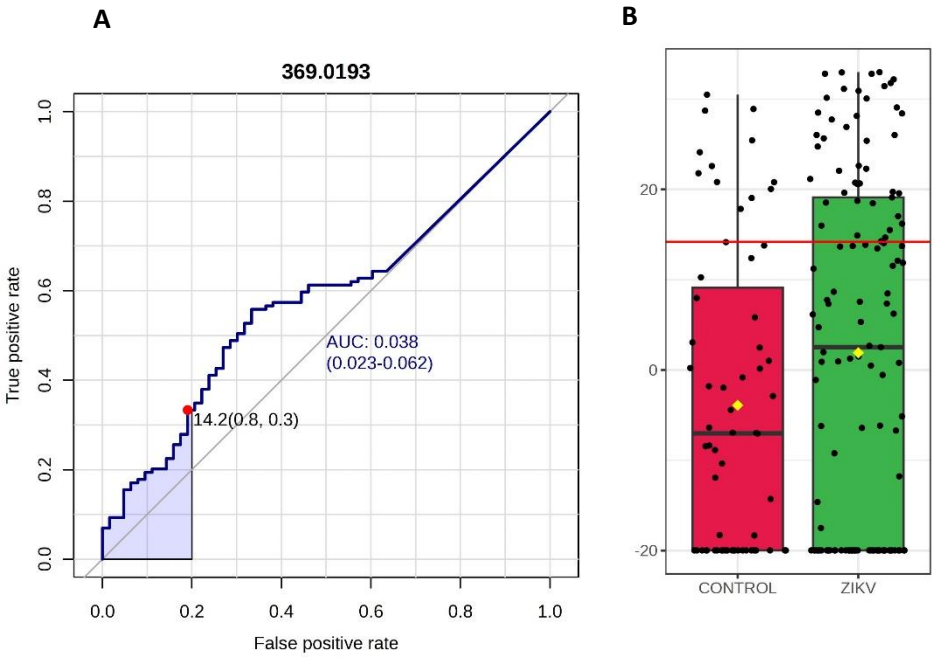


Figura 12-2. Análisis de curvas ROC univariadas (Cont.).

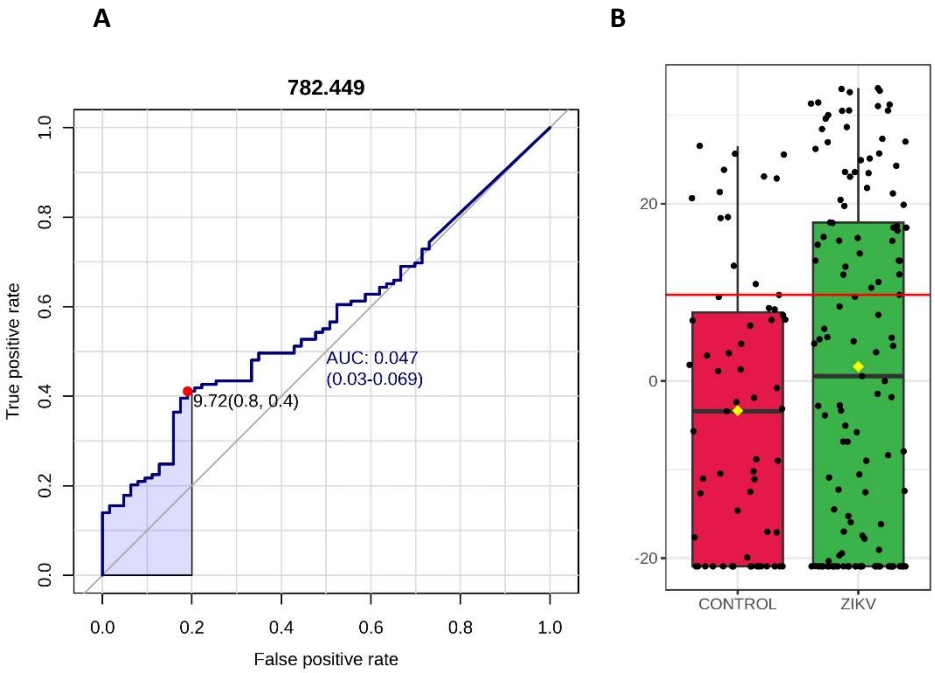


Figura 13-2. Análisis de curvas ROC univariadas (Cont.).

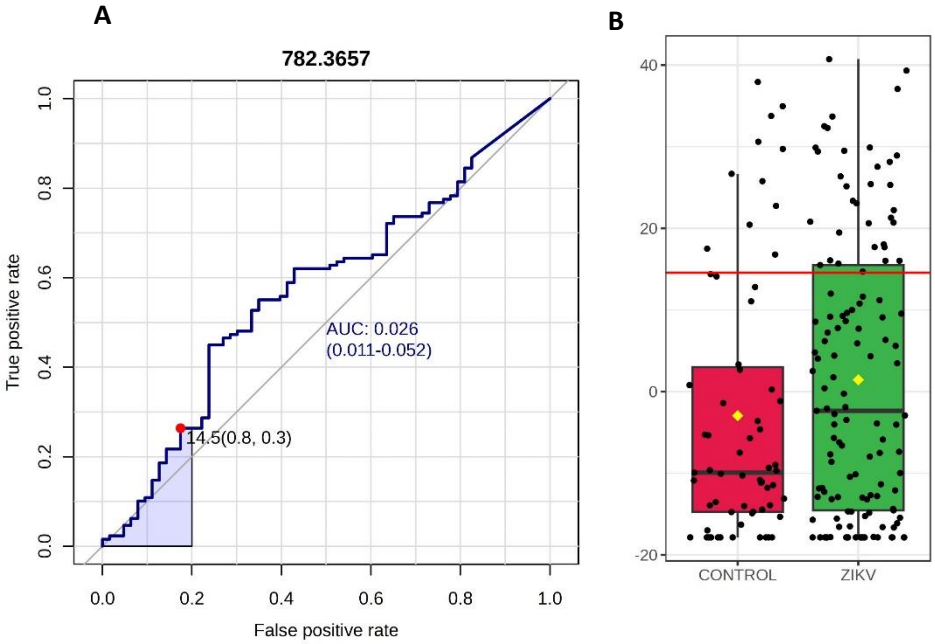


Figura 14-2. Análisis de curvas ROC univariadas (Cont.).

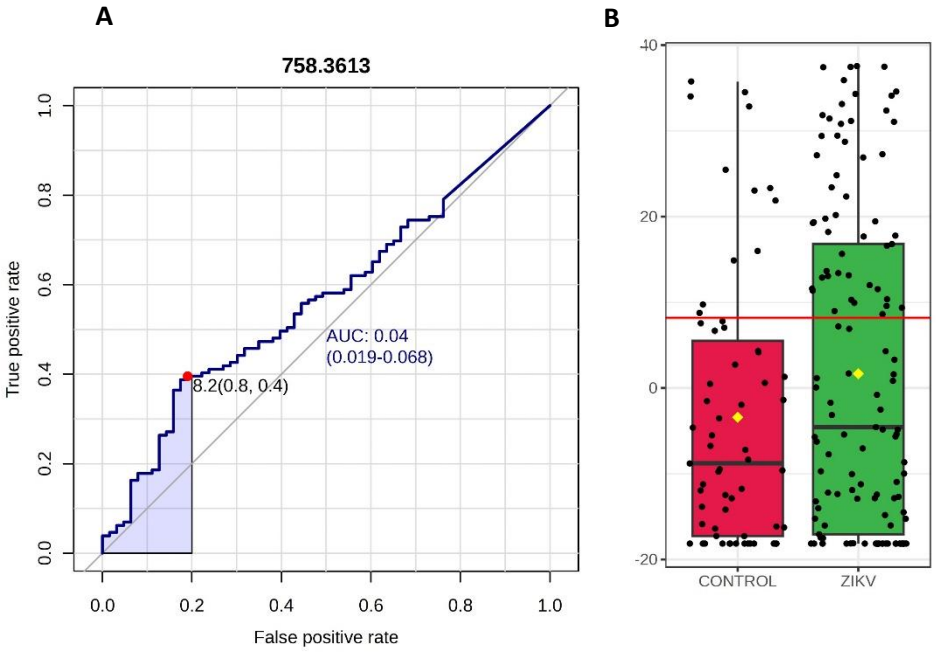


Figura 15-2. Análisis de curvas ROC univariadas (Cont.).

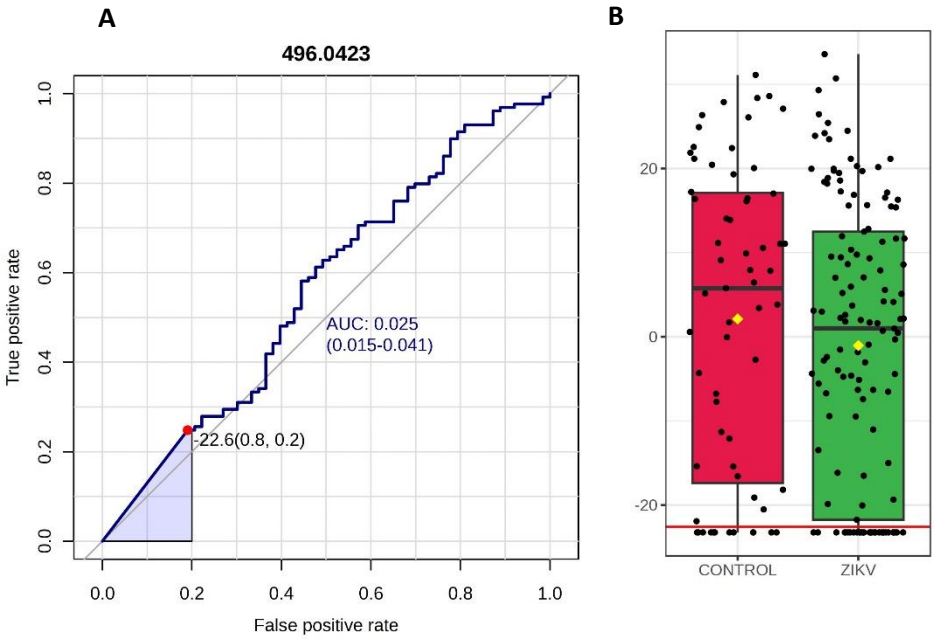


Figura 16-2. Análisis de curvas ROC univariadas (Cont.).

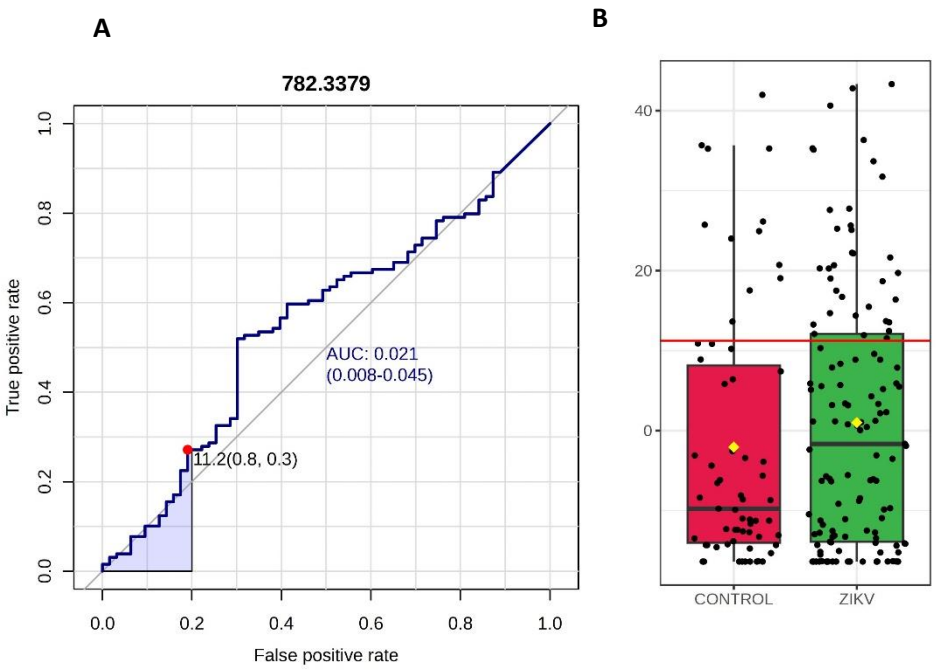


Figura 17-2. Análisis de curvas ROC univariadas (Cont.).

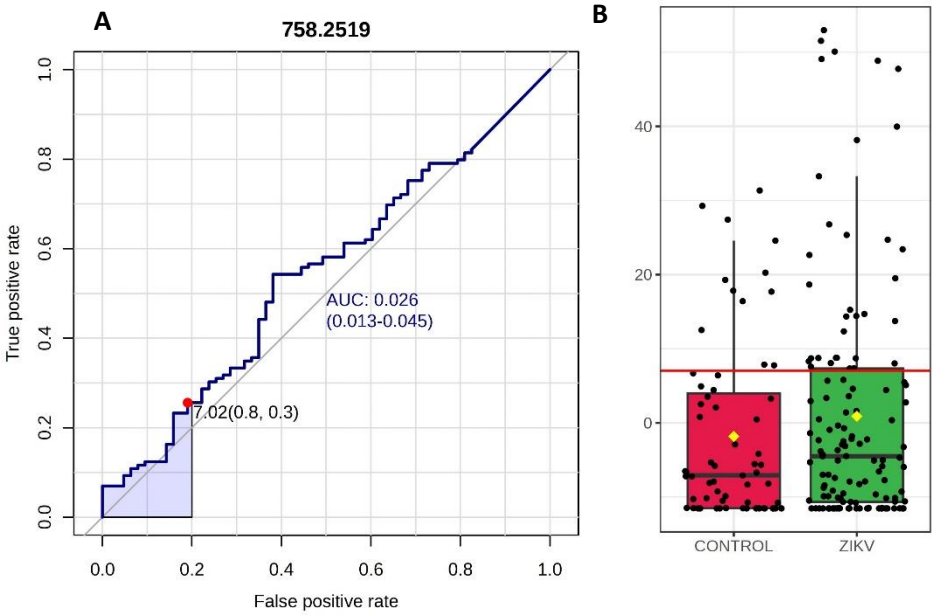


Figura 18-2. Análisis de curvas ROC univariadas (Cont.).

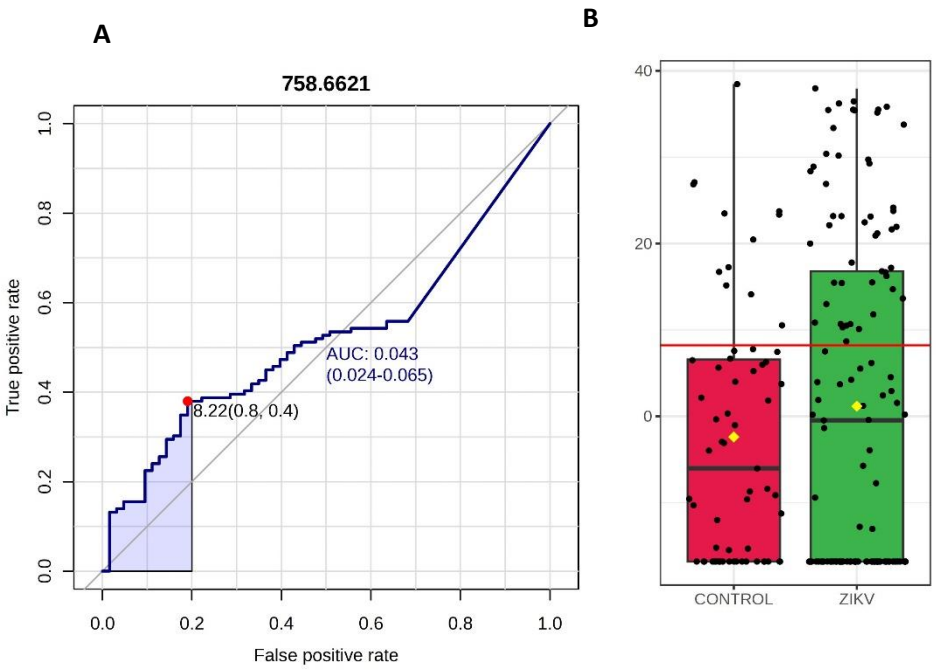


Figura 19-2. Análisis de curvas ROC univariadas (Cont.).

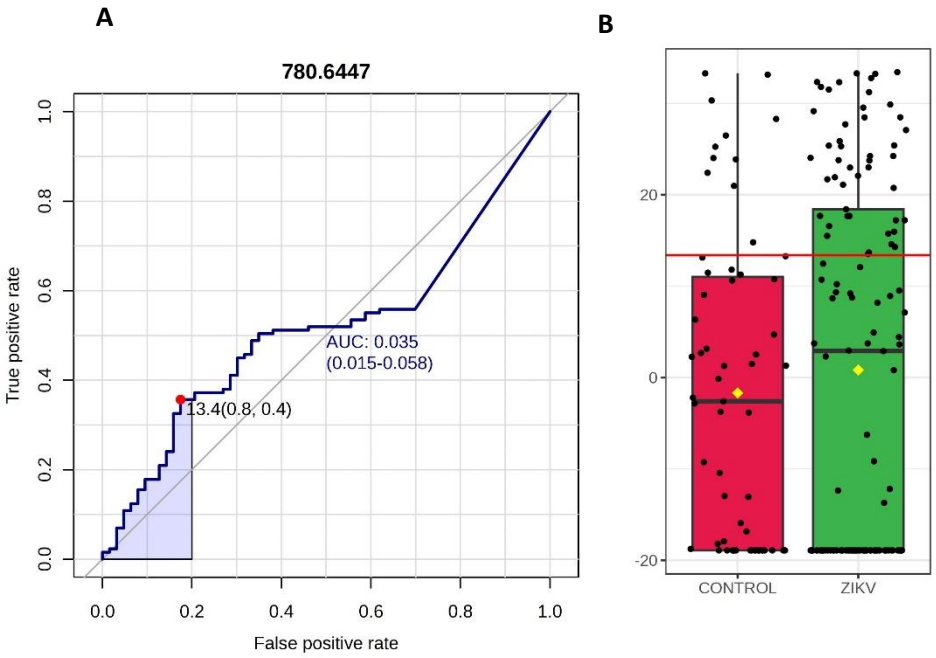


Figura 20-2. Análisis de curvas ROC univariadas. Las figuras A muestran la discriminación de los metabolitos entre el grupo CONTROL Y ZIKV, donde el eje Y ilustra la sensibilidad (Tasa de verdaderos positivos) y el eje X ilustra la especificidad (Tasas de falsos positivos). El área bajo la curva (AUC) es un indicador de la capacidad de discriminación de cada metabolito. Las figuras B nos indican las

concentraciones de la característica de cada metabolito representado por los puntos negros.

La figura 21, es la evaluación de la capacidad de los 15 metabolitos para distinguir entre pacientes sanos y enfermos mediante una curva ROC, resultando un AUC de 0.584. Este valor nos indica una capacidad moderada del modelo para la diferenciación. El punto de corte con valor de 498.577,300 es el punto óptimo para alcanzar el equilibrio entre la sensibilidad de 0.791 (79%) y especificidad de 0.381 (38%), sugiriendo que el modelo tiene alta capacidad de clasificar a los pacientes infectados, aunque con una tasa considerable de falsos positivos.

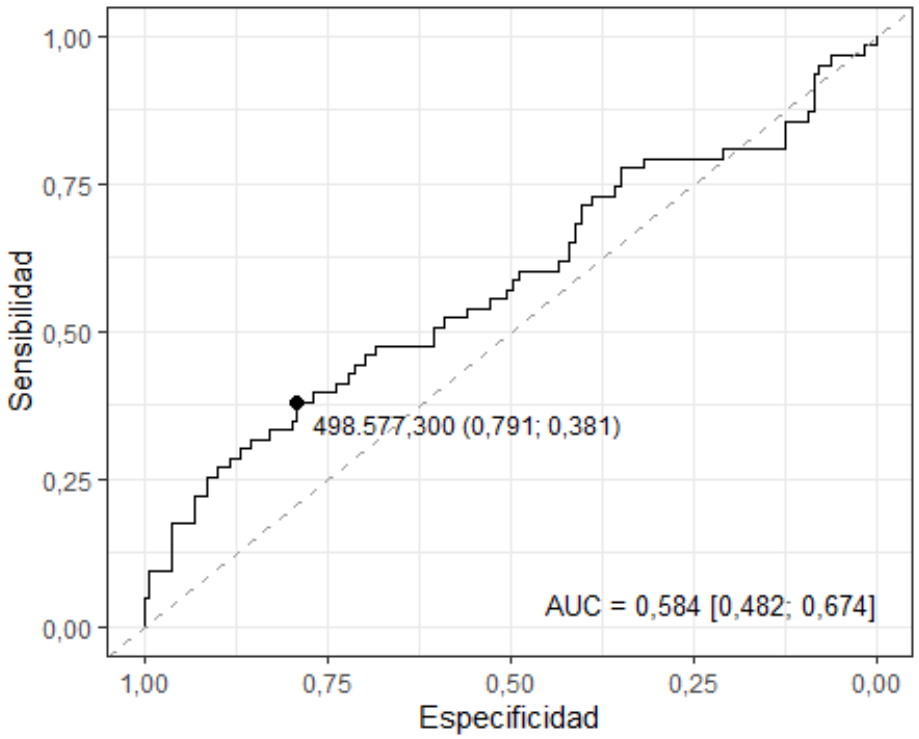


Figura 21-2. Análisis de la curva ROC de los 15 metabolitos identificados. El valor de AUC de 0.584 indica que el modelo posee la capacidad de distinción entre los grupos, el punto de corte de 498.577,300 es el punto en el que el modelo alcanzo el equilibrio entre sensibilidad (79.1%) y la especificidad (38.1).

En la tabla 1 se presenta la identificación de los 15 metabolitos más relevantes para la separación entre los grupos CONTROL y ZIKV reportados en el análisis VIP de la componente 5, por otro lado, su valor de AUC de 0.5, nos indica la eficacia moderada de los metabolitos para diferenciar entre los casos positivos y negativos. Las variaciones en sus concentraciones entre los grupos representado por flechas, donde las rojas indican una alta concentración y las azules, una baja concentración.

Tabla 1-2. Metabolitos identificados en muestras de CONTROL y ZIKV. Metabolitos identificados en muestras de CONTROL y ZIKV. Los valores VIP, nos indican el orden del más importante al menos importante, la concentración en cada grupo viene dada por las flechas, donde el color azul nos indica baja concentración y las flechas rojas alta concentración. Su valor de AUC indica la capacidad discriminativa de entre cada grupo.

Masa	VIP Score Comp5	CONTROL	ZIKA	AUC
369.0193	7.7869	↓	↑	0.57647
496.0423	7.5631	↑	↓	0.56171
368.733	7.4511	↓	↑	0.59961
374.4998	7.349	↓	↑	0.57709
782.6157	6.8286	↓	↑	0.53156
374.4806	6.7968	↓	↑	0.58183
374.5575	6.6921	↓	↑	0.58742
374.5191	6.632	↓	↑	0.58558
782.449	6.5503	↓	↑	0.57223
780.6447	6.5392	↓	↑	0.51526
758.6621	6.5174	↓	↑	0.52012
758.2519	6.3618	↓	↑	0.54171
782.3379	6.2263	↓	↑	0.55309
782.3657	6.1652	↓	↑	0.57186
758.3613	6.163	↓	↑	0.56977

Fuente: Sevillano, 2024.

3.4. Base de datos LIPID MAPS

Teniendo esto claro, se prosiguió al reconocimiento de estos metabolitos en la base de datos LIPID MAPS, esta base es un sitio web con gran cantidad de información sobre lipidómica, la cual nos ayudó con la información de 200 lípidos relacionados en composición química, de estos, 10 metabolitos tuvieron una masa emparejada con los identificados en el análisis anterior (tabla 2), siendo reconocidos: Lípidos esteroles, esfingolípidos, glicerofosfolípidos, ceramidas y glicerolípidos. A su vez, el nivel de concentraciones cuando el paciente tiene ZIKV nos indica que 9 de ellos aumentan mientras que 1 disminuye.

Tabla 2-2. Identificación de lípidos en LIPID MAP. La tabla presenta la identificación de lípidos en muestras de pacientes con ZIKV indicando la masa molecular conocida y la masa emparejada. El Delta muestra la diferencia entre la masa conocida y la masa emparejada, ofreciendo precisión de identificación. Los lípidos están clasificados según su estructura química y categoría bioquímica, como lípidos esteroles, esfingolípidos, glicerofosfolípidos, ceramidas y glicerolípidos, acompañados de sus fórmulas moleculares. Las flechas representan la concentración de los lípidos presente en un paciente con ZIKV. El rojo indica una alta concentración y el azul, baja concentración.

Masa	Zika	Masa Emparejada	Delta	Nombre	Clase Principal	Fórmula
496.0423	↓	496.0519	0.0096	ST 18:5;O5;Gly	Glycine Sterol conjugates	C20H23NO7Ag
368.733	↑	368.7327	0.0003	HexCer 30:1;O5	Hexosyl ceramides (HexCer)	C36H69NO11Na2
		368.7310	0.0020	PC 32:7;O	Glycerophosphocholines (PC)	C40H66NO9P
782.6157	↑	782.6170	0.0013	CerPE 42:5;O2	PE-ceramides (CerPE)	C44H81N2O6P
		782.6141	0.0016	HexCer 39:3;O3	Hexosyl ceramides (HexCer)	C45H83NO9
782.449	↑	782.4484	0.0006	SHexCer 33:4;O2	Sulfatides (SHexCer)	C39H69NO11SNa
		782.4482	0.0008	Cer 41:5;O5	PE-ceramides (CerPE)	C41H73NO6Ag
780.6447	↑	780.6452	0.0005	ACer 46:1;O3	1-O-acyl ceramides (ACer)	C46H89NO5Na2
		780.6453	0.0006	CerP 44:1;O3	PE-ceramides (CerPE)	C44H88NO7PLi
758.6621	↑	758.6633	0.0012	ACer 46:1;O3	1-O-acyl ceramides (ACer)	C46H89NO5Na
		758.6653	0.0032	TG 94:6;O2	Tri(acyl|alkyl)glycerols (TG)	C97H178O8Na2
758.2519	↑	758.2505	0.0014	ST 26:4;O6;HexNAc	N-acetylhexosamine Sterol conjugates	C34H51NO11Ag
		758.2549	0.0030	PIP 21:6;O	Glycerophosphoinositol phosphates (PIP)	C30H46O17P2
782.3379	↑	782.3368	0.0011	SHexCer 28:4;O5	Sulfatides (SHexCer)	C34H59NO14SNa2
		782.3391	0.0012	ST 30:3;O4;HexNAc	N-acetylhexosamine Sterol conjugates	C38H61NO9Ag
782.3657	↑	782.3641	0.0016	IPC 31:6;O3	PI-ceramides (IPC)	C37H62NO12PK

		782.3630	0.0027	NAT 34:3;O4	N-acyl taurines (NAT)	C36H67NO8SAg
758.3613	↑	758.3616	0.0003	IPC 30:6;O2	PI-ceramides (IPC)	C36H60NO11PNa2
		758.3603	0.0010	SHexCer 28:5;O6	Sulfatides (SHexCer)	C34H57NO15SLi

Fuente: Sevillano, 2024.

CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN

El siguiente estudio determinó posibles biomarcadores en muestras de suero en pacientes con ZIKV mediante la técnica MALDI/TOF MS y análisis estadísticos con el programa MetaboAnalyst.

El análisis de PLS-DA genera un modelo discriminante que permite la clasificación de las muestras de acuerdo con el perfil de metabolitos de las mismas. En este caso, la separación entre grupos se basa en componentes principales que consideran 15 metabolitos con mayor potencial de separación entre los grupos estudiados. Está técnica ha revelado una separación clara entre los perfiles metabólicos de ambos grupos, lo que destaca la alteración en la composición de metabolitos debido a la infección (Bleijerveld O. & Houweling M., 2006; Odir F. et al., 2016).

Sin embargo, cabe destacar que se observó una leve superposición entre las muestras. Esto podría deberse a la naturaleza de la enfermedad en estudio, ya que el síntoma más predominante es la fiebre, la cual no genera un cambio drástico en el metabolismo del paciente. Por lo tanto, los pacientes que no presentan una sintomatología marcada no contribuyen significativamente a la separación de los grupos(Kantor I., 2018; Marrs C. et al., 2016).

La curva ROC de todos los metabolitos evalúo la eficacia del potencial de los biomarcadores para diagnóstico. En el campo del desarrollo de herramientas diagnósticas, el AUC mínimo debe considerarse un nivel de probabilidad, es decir, AUC=0.5. A la medida que el AUC disminuye o llega al 0, significa que la prueba clasifica incorrectamente los casos positivos y negativos. Sin embargo, algunos estudios mencionan que, para considerar un biomarcador clínico, es importante obtener un AUC mayor o igual a 0.8 (Hajian-Tilaki K., 2013; Vélez N. et al., 2021).

La identificación lipídica de los metabolitos con alteración metabólica en la base de datos LIPID MAPS (Tabla 2), reportó 10 lípidos pertenecientes a las siguientes subclases: esfingolípidos, lípidos esteroles, glicerofosfolípidos, glicerolípidos y ceramidas.

Para la entrada viral, y la replicación, el virus altera el metabolismo lipídico de la célula huésped para que se adapte a sus propios requisitos (Stoyanova G. et al., 2023; To K. et al., 2016). En los resultados obtenidos, se observó un aumento de esfingolípidos en aquellos pacientes infectados con ZIKV esto va de la mano con un estudio realizado por Leier et al. (2020), el cual reportó que los esfingolípidos son esenciales para el ZIKV por su capacidad de infectar células progenitoras neuronales. Este virus, que muestra una afinidad por el sistema nervioso, infecta principalmente las células neuronales en el feto, lo que puede resultar en el desarrollo de microcefalia. El ZIKV es capaz de alterar el metabolismo de los esfingolípidos en las células para aumentar la producción de ceramidas, las cuales luego ayudarán en los sitios donde ocurre la replicación viral (Dias S. et al., 2023; Leier H. et al., 2020).

De la misma manera, se observó un aumento en glicerofosfolípidos en el suero de pacientes infectadas, un estudio similar reveló que mujeres embarazadas que estuvieron afectadas con ZIKV mostraron un desequilibrio en el metabolismo de los glicerofosfolípidos, lo que se presentó en bebés con microcefalia. Los glicerofosfolípidos tienen un rol importante en la señalización celular, la apoptosis, y algunos de ellos forman parte de la membrana de células neuronales, por lo que durante la infección estos son requeridos por el virus para infectar la célula huésped (Diop F. et al., 2018; Sosa P. et al., 2024). Durante el embarazo existe un transporte de lípidos hacia los tejidos placentarios y fetales para el desarrollo fetal, por lo que hay una disminución de los niveles de glicerofosfolípidos en el líquido amniótico, esto causa que el ZIKV tenga la posibilidad de evitar con facilidad esa barrera, llegando al feto e infectando sus células (Diop F. et al., 2018). Investigar estas alteraciones metabólicas provocadas por el ZIKV es fundamental, ya que permite distinguir los distintos estados de la enfermedad y su desenlace (Onyango G. et al., 2021). Esto a su vez permitiría destacar a estos metabolitos como biomarcadores en el momento de gestación y evitar complicaciones.

El aumento de los glicerofosfolípidos es debido a que, el ZIKV induce la autofagia (proceso de degradación de células dañadas o defectuosas), posiblemente para aumentar la β-oxidación y facilitar la replicación viral. La célula hospedadora aumenta

los niveles de PIP (Tabla 2), para limitar la autofagia y evitar que el ZIKV consuma los nutrientes que necesita de la β-oxidación. Sin embargo, las proteínas NS4A y NS4B del ZIKV inhiben la vía de señalización activada por los PIP, lo que permite la autofagia y reduce el mecanismo de defensa de la célula hospedadora (Driggers W. et al., 2016; Melo O. et al., 2017; Salazar J., 2011).

El análisis de las rutas metabólicas, muestra que las más afectadas en la infección del ZIKV son las vías de los esfingolípidos y los glicerofosfolípidos. El aumento de los glicerofosfolípidos tiene influencia en la flexibilidad y estructura de las membranas celulares del huésped, esto es esencial para adaptar las membranas a la estructura del virus. Por otro lado, la alteración de las vías metabólicas de los esfingolípidos facilita la multiplicación del ZIKV (Byers M. et al., 2019; Corda D. et al., 2009; Sandhoff K. & Suzuki K., 2012).

Finalmente se observó una alteración en la concentración de lípidos esteroles en las muestras de pacientes infectados, en un estudio de Queiroz et al, 2019 reportaron que la disminución de lípidos esteroles es debido a que el ZIKV inhibe el correcto funcionamiento de estos por medio de su proteína NS2A y así lograr su replicación (Dias S. et al., 2023; Queiroz A. et al., 2019). Nuestro estudio reportó a glicina esterol conjugado y la N-acetilhexosamina esterol conjugados, estos lípidos no han sido investigados en su totalidad por su participación en la infección de ZIKV. Sin embargo, estos compuestos están involucrados en la estructura de las membranas celulares y en la señalización celular, lo que probablemente al ser alterados o inhibidos permiten la entrada del ZIKV a la célula huésped (Alvarado & Schwartz, 2017; Routhu N. et al., 2019)

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El avance de las ciencias ómicas como la metabolómica ha dado complemento en la búsqueda de biomarcadores que ayudan en el diagnóstico de enfermedades. A su vez, las técnicas analíticas como MALDI-TOF MS junto con análisis estadísticos multivariados, han mostrado la capacidad para un análisis rápido en las muestras de suero de mujeres embarazadas con ZIKV, demostrando ser una herramienta efectiva en la identificación rápida de biomarcadores. En este sentido, se identificaron perfiles de metabolitos con capacidad diferencial en suero de pacientes con ZIKV, mediante el análisis de PLS-DA fue posible considerar 15 metabolitos como posibles biomarcadores. La integración de estos resultados con datos de la base LIPID MAP reveló que, los esfingolípidos, glicerofosfolípidos, ceramidas y lípidos esteroles presentan patrones de concentración distintivos entre pacientes infectados y sanos. Estos metabolitos participan en procesos biológicos clave como señalización celular, apoptosis y formar parte de la estructura de la membrana. En particular, se observó que los esfingolípidos y glicerofosfolípidos aumentan en pacientes infectados, mientras que los lípidos esteroles muestran una tendencia opuesta, disminuyendo en pacientes infectados.

Por otro lado, aunque el análisis de la curva ROC indica una eficacia moderada en la diferenciación entre casos positivos y negativos, la técnica ha mostrado un potencial significativo para la identificación de biomarcadores.

A pesar de que la eficacia de estos metabolitos como biomarcadores para el diagnóstico de ZIKV no es alta, los hallazgos de esta investigación proporcionan una comprensión más profunda de como el ZIKV altera el metabolismo lipídico y como evade la respuesta inmune de las células, afectando al feto directamente. Estos resultados refuerzan la importancia continua de la metabolómica en el estudio de arbovirus y la importancia para el desarrollo de biomarcadores diagnósticos más efectivos. Se recomienda realizar estudios adicionales para validar y expandir el potencial de estos metabolitos como

herramientas diagnósticas en la infección por ZIKV y así evitar las complicaciones en las mujeres embarazadas y en el feto.

REFERENCIAS

Acebes M., Vázquez A., & Saiz J. (2016). Lipids and flaviviruses, present and future perspectives for the control of dengue, Zika, and West Nile viruses. *Progress in Lipid Research*, *64*, 123–137. https://doi.org/10.1016/J.PLIPRES.2016.09.005

Alvarado, M. G., & Schwartz, D. A. (2017). Zika virus infection in pregnancy, microcephaly, and maternal and fetal health: What we think, what we know, and what we think we know. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, *141*(1), 26–32. https://doi.org/10.5858/ARPA.2016-0382-RA

Ambrogi G., Brito L., & Diniz D. (2021). The vulnerabilities of lives: Zika, women and children in Alagoas State, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, *36*(12), e00032020. https://doi.org/10.1590/0102-311X00032020

Arévalo A., & Suarez M. (2016). VIRUS ZIKA. *Rev Med La Paz*, *1*, 1–5.

Balsinde J. (2018). *Lipidómica y metabolómica: análisis por espectrometría de masas*.

Barzon L., Trevisan M., Sinigaglia A., Lavezzo E., & Palù G. (2016). Zika virus: From pathogenesis to disease control. *FEMS Microbiology Letters*, *363*(18). https://doi.org/10.1093/FEMSLE/FNW202

Bleijerveld O., & Houweling M. (2006). *Article in Analytical Biochemistry*. https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.02.016

Byers M., Fleshman C., Perera R., & Molins R. (2019). Metabolomic Insights into Human Arboviral Infections: Dengue, Chikungunya, and Zika Viruses. *Viruses*, *11*(3). https://doi.org/10.3390/V11030225

Cabezas C., & García P. (2017). Diagnóstico de la infección por el virus Zika. *Anales de la Facultad de Medicina*, *78*(1), 89–93. https://doi.org/10.15381/ANALES.V78I1.13028

Ciro C., Vargas M., Maguiña C., & Galán E. (2016). El virus Zika: una revisión de literatura. *Acta Médica Peruana*, *33*(1), 35–41. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172016000100007&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Cobo F. (2013). Application of MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Virology: A Review. *The Open Virology Journal*, *7*(1), 84. https://doi.org/10.2174/1874357920130927003

Contigiani de Minio M., Diaz L., Spinsanti L., & Tauro L. (2021). Arbovirus. *Investigaciones sobre mosquitos de Argentina*, 119–141. https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/135687

Corda D., Zizza P., Varone A., Filippi B., & Mariggiò S. (2009). The glycerophosphoinositols: Cellular metabolism and biological functions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *66*(21), 3449–3467. https://doi.org/10.1007/S00018-009-0113-4/METRICS

Cortés. N. (2022). *"Revisión bibliográfica sobre los virus Zika, Dengue y Chikungunya y sus métodos de diagnóstico".* Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. https://repositorio.unicolmayor.edu.co/handle/unicolmayor/5669

Croxatto A., Prod'hom G., & Greub G. (2012). Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*, *36*(2), 380–407. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x

Dias S., Cunha T., Soares V., De Almeida C., & Bozza P. (2023). Lipid droplets in Zika neuroinfection: Potential targets for intervention? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *118*, e230044. https://doi.org/10.1590/0074-02760230044

Diop F., Vial T., Ferraris P., Wichit S., Bengue M., Hamel R., Talignani L., Liegeois F., Pompon J., Yssel H., Marti G., & Missé D. (2018). Zika virus infection modulates the metabolomic profile of microglial cells. *PLOS ONE*, *13*(10), e0206093. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0206093

Driggers W., Ho C., Korhonen M., Kuivanen S., Jääskeläinen J., Smura T., Rosenberg A., Hill D., DeBiasi L., Vezina G., Timofeev J., Rodriguez J., Levanov L., Razak J., Iyengar P., Hennenfent A., Kennedy R., Lanciotti R., du Plessis. A., & Vapalahti O. (2016). Zika Virus Infection with Prolonged Maternal Viremia and Fetal Brain Abnormalities. *New England Journal of Medicine*, *374*(22), 2142–2151. https://doi.org/10.1056/NEJMOA1601824

Escalante O., Gavilán G., García M., Marcelo A., Pacheco E., Cabezas C., & Yamazaki W. (2019). Development and validation of loop-mediated isothermal amplification for the detection of the Zika virus. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, *36*(3), 442–447. https://doi.org/10.17843/RPMESP.2019.363.3941

Estébanez P. (2018). *Enfermedades Víricas transmitidas por artrópodos (Enfermedades por arbovirus)*. Medicina humanitaria. https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=KmxTDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA255&dq=arbo

virus+historia&ots=lfgUj9CU3a&sig=WA3b6N1olh0yy_GvomteZJjqeiM&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false

Gorozabel T., Álava S., Aveiga S., & Cantos Y. (2023). Arbovirus en el ecuador: epidemiología, diagnóstico, manifestaciones clínicas. *MQRInvestigar* , *7*(1), 3017–3032. https://doi.org/10.56048/MQR20225.7.1.2023.3017-3032

Gray N., Lawler N., Zeng A., Ryan M., Bong S., Boughton B., Bizkarguenaga M., Bruzzone C., Embade N., Wist J., Holmes E., Millet O., Nicholson J., & Whiley L. (2021). Diagnostic potential of the plasma lipidome in infectious disease: Application to acute sars-cov-2 infection. *Metabolites*, *11*(7), 467. https://doi.org/10.3390/METABO11070467/S1

Hajian-Tilaki K. (2013). Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation. *Caspian Journal of Internal Medicine*, *4*(2), 627. /pmc/articles/PMC3755824/

Hernández P. (2016). Infección por Virus Zika en el embarazo. *Salus*, *20*(1), 52–57. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-71382016000100009&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Jääskeläinen, A. J., Korhonen, E. M., Huhtamo, E., Lappalainen, M., Vapalahti, O., & Kallio-Kokko, H. (2018). *Validation of serological and molecular methods for diagnosis of zika virus infections*. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.10.011

Kantor I. (2018). *Dengue, zika, chikungunya y el desarrollo de vacunas*. Scielo. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S0025-76802018000100005&script=sci_arttext&tlng=en

Katzelnick C., Narvaez C, Arguello S., Mercado B., Collado D., & Ampie O. (2020). Zika virus infection enhances future risk of severe dengue disease. *Science*, *369*(6507), 1123–1128. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABB6143/SUPPL_FILE/ABB6143_KATZELNICK_SM.PDF

Kubicek S., Jessica Z., Vu D., Mendez H., Jakhar S., & Mukundan H. (2017). Detection of Lipid and Amphiphilic Biomarkers for Disease Diagnostics. *Biosensors 2017, Vol. 7, Page 25*, *7*(3), 25. https://doi.org/10.3390/BIOS7030025

Landry M., & George K. (2017). Laboratory Diagnosis of Zika Virus Infection. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, *141*(1), 60–67. https://doi.org/10.5858/ARPA.2016-0406-SA

Leier H., Weinstein J., Kyle J., Lee J., Bramer L., Stratton K., Kempthorne D., Navratil A., Tafesse E., Hornemann T., Messer W., Dennis E., Metz T., Barklis E., & Tafesse F. (2020). *A global lipid map defines a network essential for Zika virus replication*. https://doi.org/10.1038/s41467-020-17433-9

Marchán C. (2023). *Factores asociados al nivel de conocimiento sobre el Zika en un Centro de Salud de Tumbes, 2023*. https://orcid.org/0000-0003-3894-6793

Marrs C., Olson G., Saade G., Hankins G., Wen T., Patel J., & Weaver S. (2016). Zika Virus and Pregnancy: A Review of the Literature and Clinical Considerations. *American Journal of Perinatology*, *33*(7), 625–639. https://doi.org/10.1055/S-0036-1580089/ID/JR160063-20/BIB

Martínez A., Zazpe G., Cuervo M., & Garaulet M. (2020). *Spanish Journal of Human Nutrition and Dietetics Cultura alimentaria, sociología, antropología de la alimentación y psicología*. 1–111.

Melo O., Delafiori J., de Oliveira N., Guerreiro M., Esteves Z., Lima O., Pando V., Catharino R., Milanez P., do Nascimento M., Freitas R., Angerami R., Costa F., Arns C., Resende M., Amaral E., Junior R., Ribeiro-do-Valle C., Milanez H., … Costa M. (2017). Serum metabolic alterations upon ZIKA infection. *Frontiers in Microbiology*, *8*(OCT), 300686. https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.01954/BIBTEX

Méndez K., Santoyo M., Saldaña K., Rodríguez M., Flores R., & Pérez F. (2019). *Vista de Metabolómica como nueva herramienta para el diagnóstico oportuno en enfermedades no transmisibles | Revista de Salud Ambiental*. Revista Salud Ambiental. https://ojs.diffundit.com/index.php/rsa/article/view/942/947

MetaboAnalyst. (2025). *MetaboAnalyst*. https://www.metaboanalyst.ca/

Montani D., Cordeiro F., Regiani T., Victorino A., Pilau E., Gozzo F., Ferreira C., Fraietta R., & Lo Turco E. (2012). The follicular microenviroment as a predictor of pregnancy: MALDI-TOF MS lipid profile in cumulus cells. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *29*(11), 1289. https://doi.org/10.1007/S10815-012-9859-Y

Morales C. (2023). Estudio del efecto de la metformina durante la infección por Zika y Dengue in vitro e in vivo. *Cinvestav*.

Odir F., Noin de Oliveira D., de Oliveira E., Melina T., Zanardi C., Marques R., Alello M., Paler G., Weis C., Proenca J., Souza J., & Ramos R. (2016). *A Lipidomics Approach in the Characterization of Zika-Infected Mosquito Cells: Potential Targets for Breaking the Transmission Cycle*. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164377

Onyango G., Attardo M., Kelly E., Bialosuknia M., Stout J., Banker E., Kuo L., Ciota T., & Kramer D. (2021). Corrigendum: Zika Virus Infection Results in Biochemical Changes Associated with RNA Editing, Inflammatory and Antiviral Responses in Aedes albopictus (Frontiers in Microbiology, (2020), 11, 559035, 10.3389/fmicb.2020.559035). *Frontiers in Microbiology*, *11*, 642886. https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.642886/BIBTEX

Organización Panamericana de la Salud. (2015). *Situación epidemiológica de infección por Virus Zika en América. Aviso Epidemiológico*. https://www.paho.org/es/temas/zika

Peng J., Yang, F., Xiong Z., Guo J., Du, J., Hu Y., & Jin Q. (2013). Sensitive and rapid detection of viruses associated with hand foot and mouth disease using multiplexed MALDI-TOF analysis. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, *56*(2), 170–174. https://doi.org/10.1016/J.JCV.2012.10.020

Petersen R., Jamieson D., Powers A., & Honein M. (2016). Zika Virus. *https://doi.org/10.1056/NEJMra1602113*, *374*(16), 1552–1563. https://doi.org/10.1056/NEJMRA1602113

Queiroz A., Pinto I., Lima M., Giovanetti M., De Jesus J., Barreto F., Canuto G., Do Amaral H., De Filippis A., Mascarenhas D., Falcão M., Santos N., De Carvalho A., Yoshinaga M., Miyamoto S., & Alcantara L. (2019). Lipidomic analysis reveals serum alteration of plasmalogens in patients infected with ZIKA virus. *Frontiers in Microbiology*, *10*(APR), 442969. https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00753/BIBTEX

Rakotonirina A., Pol M., Raharimalala N., Ballan V., Kainiu M., Boyer S., Kilama S., Marcombe S., Russet S., Barsac E., Vineshwaran R., Selemago K., Jessop V., Robic G., Girod R., Brey T., Colot J., Dupont M., Richard V., & Pocquet N. (2022). MALDI-TOF MS: An effective tool for a global surveillance of dengue vector species. *PloS one*, *17*(10). https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0276488

Ren J., Zhang A., Kong L., & Wang X. (2018). Advances in mass spectrometry-based metabolomics for investigation of metabolites. *RSC Advances*, *8*(40), 22335–22350. https://doi.org/10.1039/C8RA01574K

Reyes M. (2021). *Evaluación de anticuerpos contra el virus de Zika para su incorporación en sistemas de diagnóstico*.

Routhu N., Lehoux D., Rouse A., Bidokhti M., Giron B., Anzurez A., Reid S., Abdel-Mohsen M., Cummings D., & Byrareddy N. (2019). Glycosylation of Zika Virus is Important in Host–Virus Interaction and Pathogenic Potential. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(20), 5206. https://doi.org/10.3390/IJMS20205206

Salazar J. (2011). *Replicación viral y producción de óxido nítrico y malondialdehído en cultivos celulares y ratones tratados preventivamente con melatonina, minociclina y ácido ascórbico infectados por el virus de encefalitis equina venezolana*. https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=103136&info=resumen&idioma=SPA

Sandhoff K., & Suzuki K. (2012). *Review My journey into the world of sphingolipids and sphingolipidoses*. https://doi.org/10.2183/pjab.88.554

Sosa P., Evaristo G., Evaristo J., Carneiro G., Quiñones M., Monnerat G., Melo A., Garcez P., Nogueira F., & Domont B. (2024). Amniotic fluid metabolomics identifies impairment of glycerophospholipid and amino acid metabolism during congenital Zika syndrome development. *PROTEOMICS – Clinical Applications*, *18*(1), 2300008. https://doi.org/10.1002/PRCA.202300008

Stoyanova G., Jabeen S., Landazuri J., Ghosh S., Lockshin A., & Zakeri Z. (2023). Zika virus triggers autophagy to exploit host lipid metabolism and drive viral replication. *Cell Communication and Signaling*, *21*(1), 1–12. https://doi.org/10.1186/S12964-022-01026-8/FIGURES/5

To K., Lee Ki., Wong Y., Sze K., Ke Y., Lui Y., Tang F., Li S., Lau P., Hung N., Law C., Lam C., & Yuen K. (2016). Lipid metabolites as potential diagnostic and prognostic biomarkers for acute community acquired pneumonia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *85*(2), 249–254. https://doi.org/10.1016/J.DIAGMICROBIO.2016.03.012

Tsuchida S., Umemura H., Nakayama T., Mauri, P. L., Marchetti D., & Canetti D. (2020). *Current Status of Matrix-Assited Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in Clinical Diagnostic Microbiology*. https://doi.org/10.3390/molecules25204775

UNICEF. (2016). *Casos de Zika incrementan casi doce veces desde el terremoto en Ecuador*. UNICEF. https://www.unicef.org/ecuador/comunicados-prensa/casos-de-zika-incrementan-casi-doce-veces-desde-el-terremoto-en-ecuador

Utpott M., Rodrigues E., Rios A., Mercali G., & Flôres S. (2022). Metabolomics: An analytical technique for food processing evaluation. *Food Chemistry*, *366*, 130685. https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2021.130685

Vélez N., Congregado M., Moreno S., López M., Valido A., & Jiménez R. (2021). Determinación de la utilidad de la ecografía pulmonar en el diagnóstico del neumotórax postquirúrgico. *Revista española de patología torácica, ISSN-e 1889-7347, Vol. 33, Nº. 1, 2021, págs. 6-15*, *33*(1), 6–15. https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7987546&info=resumen&idioma=SPA

Vitale R., Roine E., Bamford D., & Corcelli A. (2013). Lipid fingerprints of intact viruses by MALDI-TOF/mass spectrometry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1831*(4), 872–879. https://doi.org/10.1016/J.BBALIP.2013.01.011

Yanes O. (2015). *Metabolómica: la ciencia ómica más multidisciplinaria*. https://www.studocu.com/ec/document/universidad-de-guayaquil/bioquimica/42-metabolomica-la-ciencia-omica-mas-multidisciplinaria/49346387

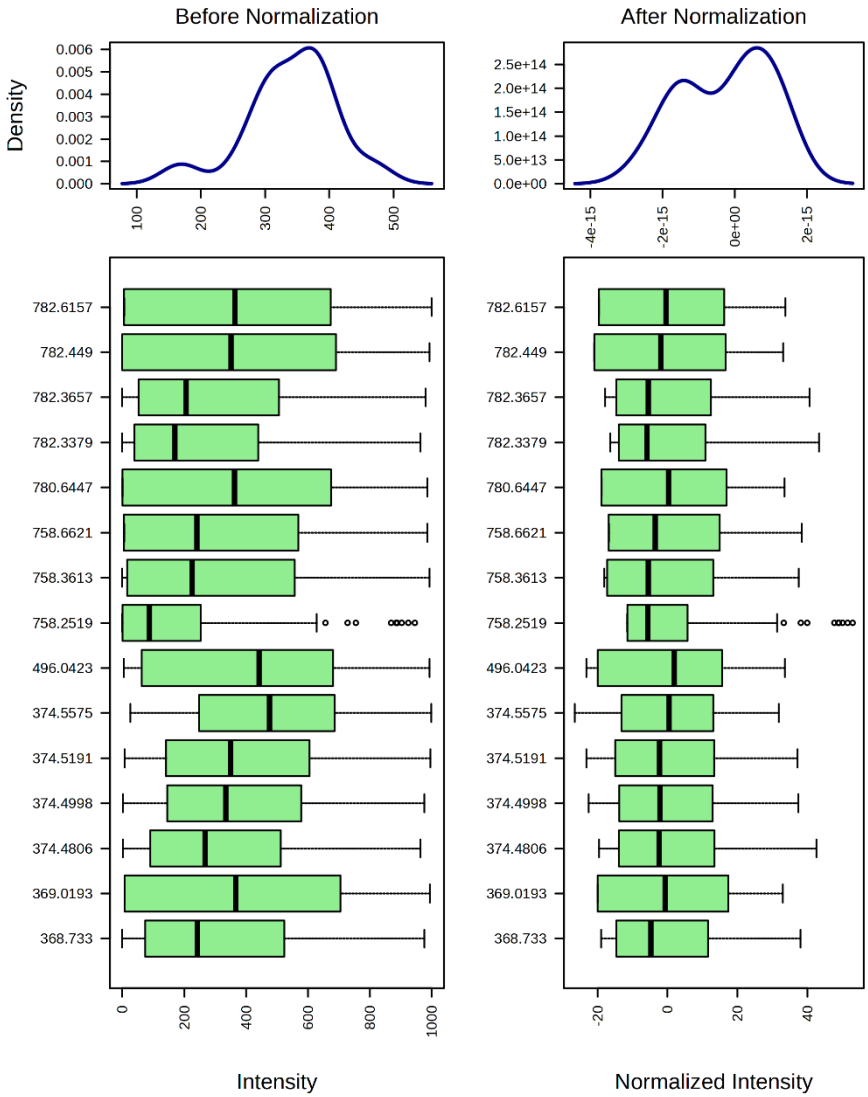
Zhang, Q., Sun, K., Chinazzi, M., Piontti, A., Dean, N., Rojas, D., Merler, S., Mistry, D., Poletti, P., Rossi, L., Bray, M., Halloran, M., Longini, I., & Vespignani, A. (2017). Spread of Zika virus in the Americas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(22), E4334–E4343. https://doi.org/10.1073/PNAS.1620161114/-/DCSUPPLEMENTAL

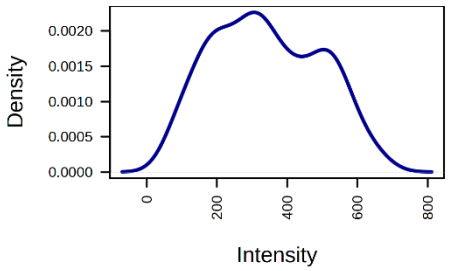
Anexos

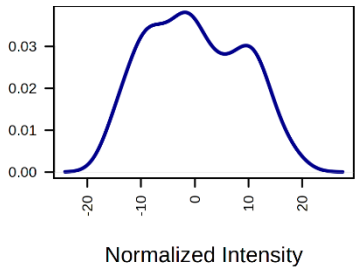
Anexo A. Libro de Excel de los 200 lípidos reportados en LIPID MAP

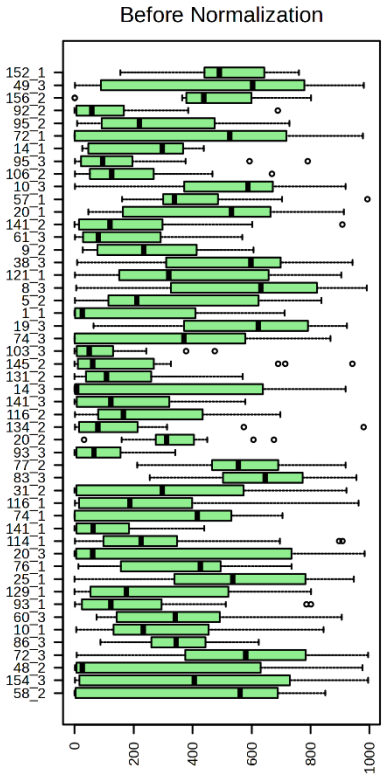
https://1drv.ms/x/c/8ddcd7949e14c39b/EVdfw-eHTcZMoideeKpjaSkBKIMon6IZsRS3Czn_lCv9bA

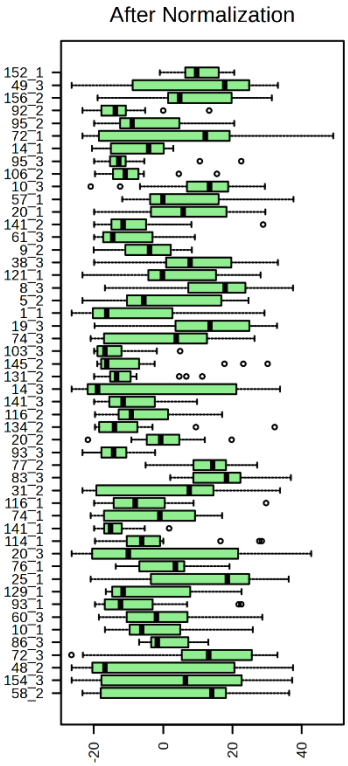
Anexo B. Normalización por Pareto Scaling de los 15 metabolitos identificados en el análisis VIP.




Density
0.0020
0.0015
0.0010
0.0005
0.0000
0
200
400
600
800
Intensity


0.03
0.02
0.01
0.00
-20
-10
0
10
20
Normalized Intensity


Before Normalization
0
200
400
600
800
1000


After Normalization
-20
0
20
40