

Identificación de marcadores metabólicos asociados a la cardiomiopatía chagásica crónica

Mayra Alejandra Jaimes Campos

Trabajo de grado presentado para optar al título de Magister en Microbiología

Directora

Clara Isabel González Rugeles

PhD en Inmunogenética

Codirector

Enrique Mejía Ospino

PhD en Ciencias Químicas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Salud

Escuela de Microbiología

Maestría en Microbiología

Bucaramanga

2021

Dedicatoria

Dedico este trabajo a Dios y a mi familia, por su apoyo incondicional, su amor y la guía que me han brindado en las decisiones que he tomado en la vida.

Agradecimientos

A Dios por su inmensa bondad, guiar mis pasos e inspirarme todos los días, sin el nada sería posible.

A la Dra. Clara por haberme permitido ser parte de su grupo, por sus enseñanzas, por cada oportunidad que me ha brindado, su paciencia y dedicación.

Al Dr. Enrique por su apoyo y acompañamiento en la realización de este trabajo.

A mi madre y mis hermanos, por ser un apoyo y motor en mi vida.

A mi padre por ser un pilar fundamental, por sus enseñanzas y motivación que aún guían las decisiones que tomo cada día.

A Cristian por siempre brindarme su amor, comprensión y apoyo en cada proyecto.

A Elkyn y Martha Lucía por su amistad incondicional y sostén estos años.

A Ian por su apoyo en la parte experimental, paciencia y amistad.

Contenido

	Pág.
1. Enfermedad de Chagas	15
1.1 Agente etiológico de la ECh	15
1.1.1 Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	17
1.2 Vectores y reservorios de <i>T. cruzi</i>	20
1.3 Epidemiología.....	21
1.3.1 Mecanismos de transmisión.....	25
1.3.1.1 Transmisión vectorial.....	25
1.3.1.2 Transmisión por transfusión de sangre y trasplante de órganos.	26
1.3.1.3 Transmisión vertical.....	26
1.3.1.4 Transmisión oral.	27
1.3.1.5 Transmisión accidental.	27
1.4 Clínica de la ECh	28
1.4.1 Fase aguda.....	28
1.4.2 Fase crónica.	28
1.5 Diagnóstico de la ECh	34
1.6 Carga económica de la ECh.....	35
1.7 Tratamiento.....	36
2. Fisiopatología de la ECh.....	38
2.1 Respuesta inmune durante la fase aguda de la ECh.....	38

3. Biomarcadores en la ECh.....	47
4. Ómicas	49
5. Metabolómica	52
5.1 Técnicas analíticas en metabolómica.....	54
5.2 Cromatografía acoplada a espectrometría de masas	55
5.2.1 Cromatografía	55
5.2.2 Espectrometría de masas (MS)	58
5.2.3 Bases de datos en LC-MS	61
6. Quimiometría	62
6.1 Flujo de análisis de datos metabolómicos.....	62
7. Metabolómica en enfermedades infecciosas y crónicas	65
8. Metabolómica en ECh.....	75
9. Justificación	78
10. Objetivos.....	80
10.1 Objetivo General.....	80
10.2 Objetivos Específicos.....	80
11. Materiales y Métodos.....	81
11.1 Tipo de estudio.....	81
11.2 Variables clínicas	82
11.3 Tamaño de la muestra	83
11.4 Plan de recolección de datos	83
12. Análisis metabolómico.....	83
12.1 Extracción de suero de sangre periférica	83

12.2 Preparación de las muestras	84
12.3 Separación y detección de los metabolitos	85
12.4 Preprocesamiento y adquisición de los datos.....	86
12.5 Análisis estadístico.....	86
12.6 Identificación de metabolitos y análisis de vías.....	87
13. Resultados	88
13.1 Análisis de variables clínicas	88
13.2 Perfil metabólico entre los grupos de estudio	90
13.3 Análisis de datos	92
13.3.1 Análisis de componentes principales (PCA).....	92
13.3.2 Análisis Discriminante por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA) y Proyecciones Ortogonales para Análisis Discriminante de Estructuras Latentes (OPLS-DA)	96
13.3.3 Metabolitos alterados y vías metabólicas implicadas	98
13.3.4 Gráficas ROC.....	103
14. Discusión.....	105
15. Conclusiones	114
Referencias Bibliográficas	116
Apéndices.....	138

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Estadios morfológicos de <i>T. cruzi</i> . (A) Amastigote (B) Amastigote en división por fisión binaria (C) Epimastigote. (D) Tripomastigote metacíclico.	17
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
Figura 3. Distribución mundial de la enfermedad de Chagas.	22
Figura 4. Distribución de la prevalencia de enfermedad de Chagas en Colombia.	23
Figura 5. Distribución de la prevalencia de enfermedad de Chagas en el departamento de Santander.	24
Figura 6. Izquierda: Distribución geográfica de casos agudos confirmados en Colombia en el periodo de tiempo 2012 – 2019. Derecha: Brotes de transmisión oral en Colombia en 2019.	25
Figura 7. Izquierda: Distribución geográfica de casos agudos confirmados en Colombia en el periodo de tiempo 2012 – 2019. Derecha: Brotes de transmisión oral en Colombia en 2019.	30
Figura 8. Hallazgos clínicos comúnmente observados en la cardiomiopatía chagásica crónica. A. Forma segmentaria cardíaca. B. Forma cardíaca dilatada. AV, auriculoventricular; LAFB, bloqueo fascicular anterior izquierdo; MR, regurgitación mitral; TR, regurgitación tricuspídea RBBB, bloqueo de rama derecha.	32
Figura 9. Dinámica de la respuesta inmune en la enfermedad de Chagas.	43
Figura 10. Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masa de trampa de iones (HPLC-ESI-IT-MS). (A) Perfil del cromatograma BPC del suero en modo positivo y (B) modo negativo.	91

Figura 11. Resultados del PCA de los grupos analizados en modo positivo. (A) Gráfica de los primeros dos componentes principales del PCA construido con los datos procesados y su elipsis con el 95% de confianza de todos los grupos analizados incluidas las muestras QC. (B) Gráfica de los primeros dos componentes principales del PCA de los grupos analizados SN, AS, S-II y S-III-IV. (C-G) Gráfica del modelo de PCA para SP vs SN (C), AS vs S (D) AS vs SII (E) AS vs SIII-IV (F) y SII vs SIII-IV (G). SN están presentados como círculos naranjas, las muestras QC como círculos celestes, pacientes AS como cuadrados rosados, pacientes S-II como triángulos azul rey y pacientes S-III-IV como rombos verdes. 93

Figura 12. Resultados del PCA de los grupos analizados en modo negativo. (A) Gráfica de los primeros dos componentes principales del PCA construido con los datos procesados y su elipsis con el 95% de confianza de todos los grupos analizados incluidas las muestras QC. (B) Gráfica de los primeros dos componentes principales del PCA de los grupos analizados SN, AS, S-II y S-III-IV. (C-G) Gráfica del modelo de PCA para SP vs SN (C), AS vs S (D) AS vs SII (E) AS vs SIII-IV (F) y SII vs SIII-IV (G). SN están presentados como círculos verdes, las muestras QC como círculos celestes, pacientes AS como cuadrados rosados, pacientes S-II como triángulos azul rey y pacientes S-III-IV como rombos verdes. 95

Figura 13. Gráfica del modelo PLS-DA y OPLS-DA de los grupos analizados en modo positivo. (A-D) Gráfica del modelo de PLS-DA para AS vs S (A), AS vs S-II (B), AS vs SIII-IV (C), S-II vs SIII-IV (D). (E-H) Gráfica del modelo de OPLS-DA para AS vs S (E), AS vs S-II (F), AS vs SIII-IV (G) y S-II vs SIII-IV (H). (I-L) Gráfica S del modelo ortogonal para AS vs S (I), AS vs S-II (J), AS vs SIII-IV (K) y S-II vs SIII-IV (L). S como círculos celestes, pacientes AS como cuadrados rosados, pacientes S-II como triángulos azul rey y pacientes S-III-IV como rombos

verdes. Los criterios de evaluación del PLS-DA y OPLS-DA (R^2X , R^2Y , Q^2) son presentados para cada modelo, todos los gráficos presentan elipses con el 95% de confianza. 97

Figura 14. Gráfica Volcano de los grupos analizados en modo positivo. (A-E) Gráfica Volcano para AS vs S (A), AS vs S-II (B), AS vs SIII/IV (C) y S-II vs SIII/IV (D). Gráfica Volcano de los grupos analizados en modo negativo (E-H) Gráfica Volcano para AS vs S (E), AS vs S-II (F), AS vs SIII/IV (G) y S-II vs SIII/IV (H). 100

Figura 15. Gráfica Heat map de los grupos analizados. (A) Gráfica Heat map para AS vs S (A), AS vs SIII/IV (B), AS vs S-II (C) y S-II vs SIII-IV (D). 102

Figura 16. (A-B) Gráfica de enriquecimiento y red de enriquecimiento de los grupos analizados. 103

Figura 17. Análisis de biomarcadores (A-C) Curvas ROC y AUC fueron realizadas por grupos de metabolitos por cada grupo de comparación (A) S vs AS (B) S II vs AS (B) S III-IV vs AS. (D-F) Análisis de permutación por 500 veces del AUC de los conjuntos de metabolitos con mayor rendimiento. Todos los análisis dieron una $p < 0.05$. (G-I) Media de la importancia de los metabolitos para clasificar las comparaciones realizadas. 104

Figura 18. Modelo de metabolización de glicerofosfolípidos en células de la respuesta inmune. 111

Figura 19. (A-E) Gráfica del modelo de PLS-DA para SP vs SN (A), AS vs S (B), AS vs S-II (C), AS vs SIII/IV (D) y S-II vs SIII/IV (E). (F-J) Gráfica del modelo de OPLS-DA para SP vs SN (F), AS vs S (G), AS vs S-II (H), AS vs SIII/IV (I) y S-II vs SIII/IV (J). (K-O) Gráfica S del modelo ortogonal para SP vs SN (K), AS vs S (L), AS vs S-II (M), AS vs SIII/IV (N) y S-II vs SIII/IV (O). SN están presentados como círculos verdes, SP como cuadrados naranjas, S como círculos celestes, pacientes AS como cuadrados rosados, pacientes S-II como triángulos azul rey

y pacientes S-III/IV como rombos verdes. Los criterios de evaluación del PLS-DA y OPLS-DA (R2X, R2Y, Q2) son presentados para cada modelo, todos los gráficos presentan elipses con el

95% de confianza..... 142

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Clasificación de la ECh.....	32
Tabla 2. Resumen de las investigaciones de biomarcadores relacionadas con la enfermedad de Chagas.....	48
Tabla 3. Principales hallazgos hasta la fecha de estudios clínicos de metabolómica y enfermedad cardiovascular. CAD, enfermedad de la arteria coronaria; IM, infarto de miocardio; CABG, injerto de derivación de arteria coronaria; ECV, enfermedad cardiovascular; AIT: ataque isquémico transitorio; VLDL, lipoproteína de muy baja densidad; LDL, lipoproteína de baja densidad; HDL, lipoproteína de alta densidad; TCA, ácido tricarbóxico; TMAO, trimetilamina-N-óxido; BCAA indica un aminoácido de cadena ramificada.....	69
Tabla 4. Características clínicas y demográficas de la población. IMC, índice de masa corporal; SBP, presión sanguínea sistólica; DBP, presión sanguínea diastólica; IECA, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; BB, beta bloqueadores; ARA II, bloqueadores de los receptores de angiotensina II; ARM, antagonistas del receptor de mineralocorticoide; ASA, diuréticos.....	89
Tabla 5. Metabolitos detectados en el suero de los grupos de pacientes S vs AS, S-II vs AS, SIII-IV vs AS y SIII-IV vs SII analizados usando HPLC-ESI-IT-MS.	101

Lista de Apéndices

	Pág.
Apéndice A. Orden de inyección de las muestras por 5 días.....	138
Apéndice B. Procedimiento y configuración para MZmine 2.4	140
Apéndice C. Gráfica del modelo PLS-DA y OPLS-DA de los grupos analizados en modo negativo.....	142
Apéndice D. Tabla de metabolitos detectados en el suero de los grupos de pacientes S vs AS, S-II vs AS, SIII/IV vs AS y SIII/IV vs SII analizados usando HPLC-ESI-IT-MS.....	144

Resumen

Título: IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES METABÓLICOS ASOCIADOS A LA CARDIOMIOPATÍA CHAGÁSICA CRÓNICA *

Autor: MAYRA ALEJANDRA JAIMES CAMPOS**

Palabras claves: METABOLÓMICA NO DIRIGIDA, LC-MS, BIOMARCADORES, CARDIOMIOPATÍA CHAGÁSICA CRÓNICA (CCC), ENFERMEDAD DE CHAGAS (ECh).

Descripción:

La Cardiomiopatía Chagásica Crónica (CCC) es la presentación clínica más frecuente y grave de la Enfermedad de Chagas (ECh). Los mecanismos fisiopatológicos implicados en el desarrollo y progresión de la CCC son complejos y aún no están claramente establecidos. El estudio de los metabolitos está siendo utilizado en diferentes enfermedades para mejorar el diagnóstico, dilucidar objetivos terapéuticos más apropiados e identificar de forma temprana el desarrollo de una enfermedad. El objetivo de nuestro estudio fue identificar marcadores metabólicos asociados con la CCC en muestras de suero de pacientes asintomáticos y sintomáticos de la enfermedad de Chagas. Realizamos un análisis no dirigido del perfil metabólico en muestras de suero de pacientes seronegativos (n=25), asintomáticos (n=25) y sintomáticos con CCC en grado II (n=25) y grado III-IV (n=25), utilizando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (HPLC-ESI-IT-MS). Los resultados fueron analizados con los softwares MzMine y Metaboanalyst y la base de datos HMDB y METLIN. 16 metabolitos fueron detectados y anotados con las bases de datos, en la comparación entre S-II vs AS y 21 en la comparación S-III-IV vs AS (VIP >1,0 y p <0,05). Gangliósido GM1 (18:1), 1-estearoilglicerofosfoglicerol, TG (22:1) y 2beta-hidroxitestosterona fueron los metabolitos individuales con la mejor capacidad de clasificación entre AS vs S. Lisofosfolípido (16:1) y 1-estearoilglicerofosfoglicerol mostraron potencial para discriminar los pacientes S-II de AS y en la comparación SIII-IV vs SII, los metabolitos gangliósido GM1 (18:1), MG (0:0), Histidil-prolina, TG (22:6), PS (24:0), PS (18:3), cardiolipina (8:0) y glicerofosfocolina, en conjunto, clasificaron con mayor eficiencia los grupos. Son necesarios más estudios para confirmar el potencial de los biomarcadores aquí detectados, que ofrecen, para la ECh el potencial de reemplazar la necesidad de métodos especializados. Así mismo, permitirían plantear estrategias de tratamiento individualizadas a cada paciente, optimizando las estrategias para su manejo clínico.

* Trabajo de grado

** Facultad de Salud. Escuela de Microbiología. Maestría en Microbiología Directora: Clara Isabel González Rugeles
Codirector: Enrique Mejía Ospino

Abstract

Title: IDENTIFICATION OF METABOLIC MARKERS ASSOCIATED WITH CHRONIC CHAGAS CARDIOMYOPATHY *

Author: MAYRA ALEJANDRA JAIMES CAMPOS**

Keywords: NON-TARGETED METABOLOMICS, LC-MS, BIOMARKERS, CHRONIC CHAGAS CARDIOMYOPATHY (CCC), CHAGAS DISEASE (ECh).

Description:

Chronic Chagas Cardiomyopathy (CCC) is the most frequent and serious clinical presentation of Chagas Disease (ECh). The pathophysiological mechanisms involved in the development and progression of CCC are complex and not yet clearly established. The study of metabolites is being used in different diseases to improve diagnosis, elucidate more appropriate therapeutic objectives and identify early the development of a disease. The objective of our study was to identify metabolic markers associated with CCC in serum samples from asymptomatic and symptomatic patients with Chagas disease. We performed a non-targeted analysis of the metabolic profile in serum samples from seronegative (n=25), asymptomatic (n=25) and symptomatic patients with grade II CCC (n=25) and grade III-IV CCC (n=25), using liquid chromatography coupled to mass spectrometry (HPLC-ESI-IT-MS). The results were analyzed with the MzMine and Metaboanalyst software and the HMDB and METLIN database. 16 metabolites were detected and annotated with the databases, in the comparison between S-II vs AS and 21 in the comparison S-III-IV vs AS (VIP >1.0 and $p < 0.05$). Ganglioside GM1 (18:1), 1-stearoylglycerophosphoglycerol glycerol, TG (22:1) and 2-beta-hydroxytestosterone were the individual metabolites with the best classification capacity between AS vs S. Lysophospholipid (16:1) and 1-stearoylglycerophosphoglycerol showed potential to discriminate between S-II patients in AS and in the SIII-IV vs SII groups, the ganglioside metabolites GM1 (18:1), MG (0:0), Histidil-proline, TG (22:6), PS (24:0), PS (18:3), cardiolipin (8:0) and glycerophosphocholine, overall, ranked the groups more efficiently. Further studies are needed to confirm the potential of the biomarkers detected here, which offer the potential for ECh to replace the need for specialized methods. Likewise, they would allow us to propose individualized treatment strategies to each patient, optimizing the strategies for their clinical management.

* Master thesis

** Facultad de salud. Escuela de Microbiología. Maestría en Microbiología. Director: Clara Isabel González Rugeles. Co-director: Enrique Mejía Ospino

1. Enfermedad de Chagas

La Enfermedad de Chagas (ECh) fue descrita por el médico Carlos Chagas en 1909. Es causada por la infección con el parásito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* y transmitido por vectores hematófagos de la familia *Reduviidae* y subfamilia *Triatominae* (Bern, 2015; Pérez-Molina y Molina, 2018). Su transmisión al humano ocurrió de forma accidental y aumentó por los eventos de deforestación, invasión de ecótopos silvestres y adaptación de los triatominos a las viviendas (Coura y Borges-Pereira, 2010). Esta enfermedad, pertenece a una de las 17 enfermedades tropicales desatendidas que afecta personas de escasos recursos, principalmente en países en desarrollo, con consecuencias en términos de impacto socioeconómico y morbimortalidad en pacientes y sus comunidades (Bermúdez *et al.*, 2015).

1.1 Agente etiológico de la ECh

Trypanosoma cruzi es un protozoo flagelado perteneciente a la clase *Amastigophora*, orden *Kinoplastida*, familia *Tripanosomatidae*, cuyo ciclo de vida alterna entre diferentes especies de reservorios vertebrados e insectos hematófagos de la subfamilia *Triatominae*. *T. cruzi* presenta un ciclo de vida bifásico compuesto por cuatro formas celulares que alternan entre el hospedero (amastigotes y tripomastigotes sanguíneos) y el insecto vector (epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos). La clasificación de estos estadios depende principalmente de su forma, la posición del cinetoplasto con relación al núcleo y la presencia o ausencia de flagelo (Pan, 1978; De souza,

1981; Kessler *et al.*, 2017). Acorde con estos criterios, las formas celulares de *T. cruzi* presentan las siguientes características:

- ***Amastigote***. Forma intracelular, no flagelada, ovalada y replicativa en las células del hospedero. Tienen un tamaño de 3 ± 5 μm de diámetro (Figura A y B).

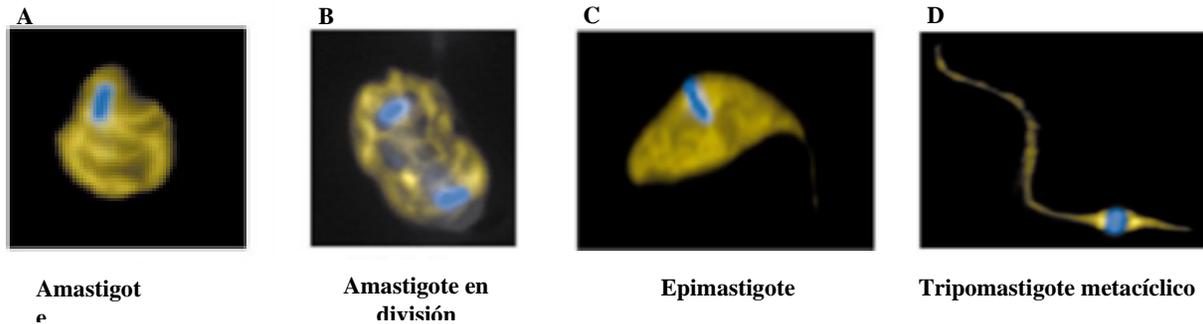
- ***Epimastigote***. Presenta una morfología variada que puede llegar a ser bastante larga, hasta 30 μm , tiene flagelo y el cinetoplasto se ubica de forma anterior al núcleo. Es la forma replicativa en el intestino medio del insecto vector (Figura C).

- ***Tripomastigote metacíclico***. Su forma es elongada, fina y larga. Presenta flagelo y el cinetoplasto se ubica posterior al núcleo. Es capaz de parasitar un amplio rango de células nucleadas en el hospedero mamífero, así como, encontrarse en el insecto vector, glándulas anales de mamíferos del género *Didelphis* y en cultivo axénico (Figura D).

- ***Tripomastigote sanguíneo***. Su forma es pleomórfica, caracterizada por presentar flagelo y cinetoplasto posterior al núcleo. Esta fase se desarrolla por la transformación de los amastigotes dentro de las células del hospedero, posteriormente, se libera al torrente sanguíneo donde infecta nuevas células (Tyler y Engman, 2001; De souza, 1984; Díaz *et al.*, 2014).

Figura 1.

Estadios morfológicos de T. cruzi. (A) Amastigote (B) Amastigote en división por fisión binaria (C) Epimastigote. (D) Tripomastigote metacíclico.



Nota. Modificado de: Kessler *et al.*, 2017.

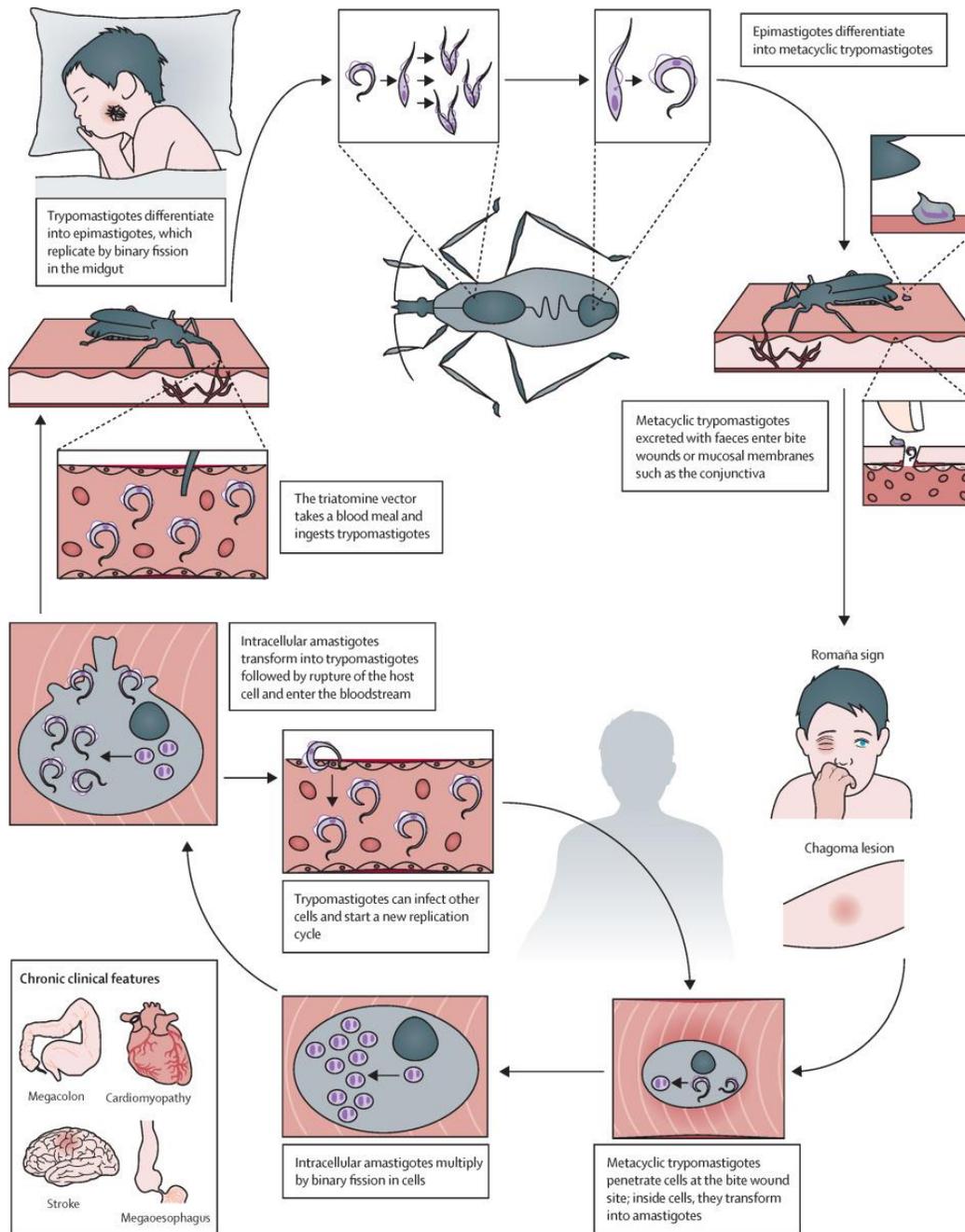
1.1.1 Ciclo de vida de *T. cruzi*

Durante el ciclo de vida de *T. cruzi* ocurren cuatro eventos de diferenciación: epimastigogénesis, metaciclogénesis (ocurren en el insecto vector), amastigogénesis y tripomastigogénesis (ocurren dentro de las células del hospedero) (Kessler *et al.*, 2017). El ciclo de vida de *T. cruzi* inicia cuando un insecto vector pica un hospedero vertebrado que se encuentre infectado, de esta forma, el insecto succiona sangre cargada con tripomastigotes sanguíneos que se desplazan hacia el intestino medio del insecto triatomino donde se transforman a la forma epimastigote, la cual, se divide principalmente por fisión binaria, aumentando su número. El agotamiento de nutrientes y la migración de los epimastigotes hacia el intestino posterior del insecto, conduce a la metaciclogénesis (transformación de las formas epimastigotes hacia tripomastigotes metacíclicos). La infección en el hospedero vertebrado ocurre cuando las heces del insecto triatomino (infectadas con tripomastigotes metacíclicos), ingresan al cuerpo a través de

heridas de la piel o mucosas. En el momento en que ingresan al torrente sanguíneo, los tripomastigotes metacíclicos infectan células nucleadas donde se transforman hacia las formas amastigotes, estos últimos, se dividen múltiples veces y se convierten nuevamente a tripomastigotes metacíclicos produciendo la lisis de la célula infectada y migrando hacia la circulación sanguínea, denominándose a esta forma, tripomastigotes sanguíneos. Los tripomastigotes sanguíneos infectan nuevas células para así continuar con el ciclo de división e infección dentro del hospedero. Cuando un insecto vector pica nuevamente al hospedero infectado, succiona tripomastigotes sanguíneos, iniciando nuevamente el ciclo (Figura 2) (Bern, 2015; Lidani *et al.*, 2017; Pérez-Molina y Molina, 2018).

Figura 2.

Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.



Nota. Tomado de: Pérez-Molina y Molina., 2018.

1.2 Vectores y reservorios de *T. cruzi*

Los insectos vectores de *T. cruzi* pertenecen a la subfamilia *Triatominae* (orden *Hemiptera*, familia *Reduviidae*). Su ciclo de vida se lleva a cabo en cinco etapas ninfales antes de alcanzar su madurez sexual. Actualmente, cerca de 140 especies de triatominos han sido descritos en América, muchas de las cuales pueden infectarse y transmitir *T. cruzi* (Rassi *et al.*, 2010; Bern, 2015). Triatominos de ambos sexos consumen sangre para su desarrollo en las diferentes etapas ninfales y tanto ninfas como adultos pueden infectarse con el parásito. La infección por *T. cruzi* es transmitida a animales silvestres por especies de triatominos selváticos y la transmisión doméstica ocurre de manera esporádica cuando triatominos silvestres migran hacia los domicilios atraídos por fuentes de luz o comida (Guhl, 2009). En zonas endémicas, del 25% al 100% de las casas pueden estar infestadas con el insecto vector. Las principales especies de triatominos en ambiente doméstico y peridoméstico en Latino América que cumplen un papel importante en la transmisión del parásito, son *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *Panstrongylus megistus* y *Triatoma brasiliensis* (Bern *et al.*, 2011).

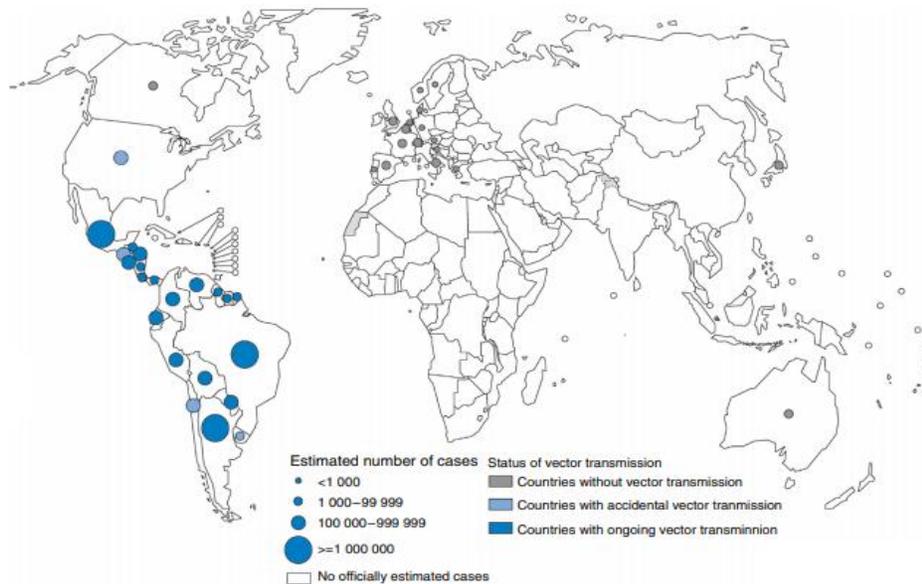
Entre los principales hospederos vertebrados reservorios naturales de *T. cruzi* se encuentran marsupiales, primates, murciélagos, armadillos, roedores, animales domésticos, entre otros (Noireau, Diosque y Jansen, 2009). Se considera que todos los mamíferos pueden ser susceptibles a la infección. Las aves son refractarias a la infección por *T. cruzi* debido a la lisis del parásito mediada por el complemento (Kierszenbaum *et al.*, 1981). El papel de los diferentes reservorios es significativo en el mantenimiento de la infección con *T. cruzi*, tanto en ambientes salvajes, como peridomésticos y domésticos, ya que son fuente continua de alimento para los triatominos e implica riesgo de infección para los humanos.

1.3 Epidemiología

La ECh es un grave problema de salud pública. Aproximadamente, 8 millones de personas en el mundo están infectadas con *T. cruzi*, 100 millones están en riesgo de adquirir la infección y cerca de 2 000 muertes al año se atribuyen a la enfermedad. Es endémica en 21 países de América en el área ubicada entre 40° de latitud norte (sur de Estados Unidos) y 45° de latitud sur (sur de Argentina y Chile). Bolivia es el país con más alta prevalencia (6,8% a 18%), seguido de Argentina (3,6%), Paraguay (2,1) y Colombia (2,0%) (Lidani *et al.*, 2019; Olivera *et al.*, 2019). En los países endémicos, la transmisión de la ECh se da principalmente por vía vectorial y en áreas rurales, debido en parte, a que las condiciones de vivienda promueven el entorno para el desarrollo y establecimiento del vector. Sin embargo, las tendencias migratorias de los últimos años han cambiado la epidemiología de la enfermedad (Salvador *et al.*, 2018). Países como Estados Unidos, Canadá, España y Australia han reportado casos de ECh por la migración de personas provenientes de países endémicos. Se estima que en Estados Unidos existen alrededor de 300 000 personas infectadas. España presenta aproximadamente de 45 000 a 67 000 casos y se consideran más de 100 000 casos en el continente europeo. Cerca de 1,2 millones de personas en estos países tienen CCC (Bern *et al.*, 2011; Salvador *et al.*, 2014; Sánchez-Montalvá *et al.*, 2016).

Figura 3.

Distribución mundial de la enfermedad de Chagas.

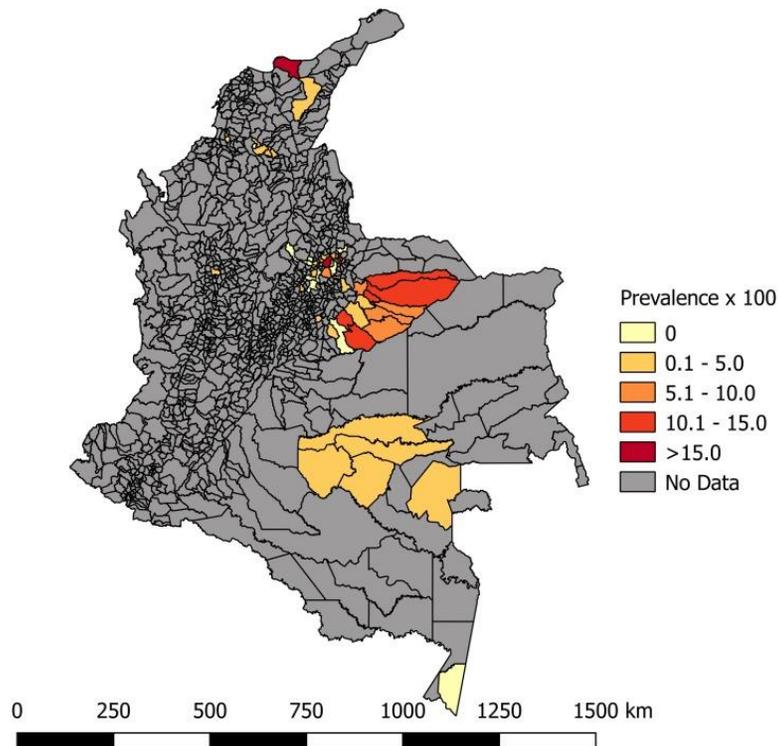


Nota. Tomado de: Molina, Salvador y Sánchez-Montalvá., 2015.

En Colombia entre 700 000 y 1 200 000 de habitantes padecen ECh y aproximadamente 8 millones se encuentran en riesgo de adquirir la infección (INS, 2010). Casanare, Arauca, Santander, Boyacá, Cundinamarca y Meta son los departamentos con mayor prevalencia en Colombia (Figura 4) (Cucunubá *et al.*, 2017). Las provincias más endémicas del departamento de Santander son la Comunera, Guanentina y García Rovira (Figura 5) (Olivera *et al.*, 2019).

Figura 4.

Distribución de la prevalencia de enfermedad de Chagas en Colombia.

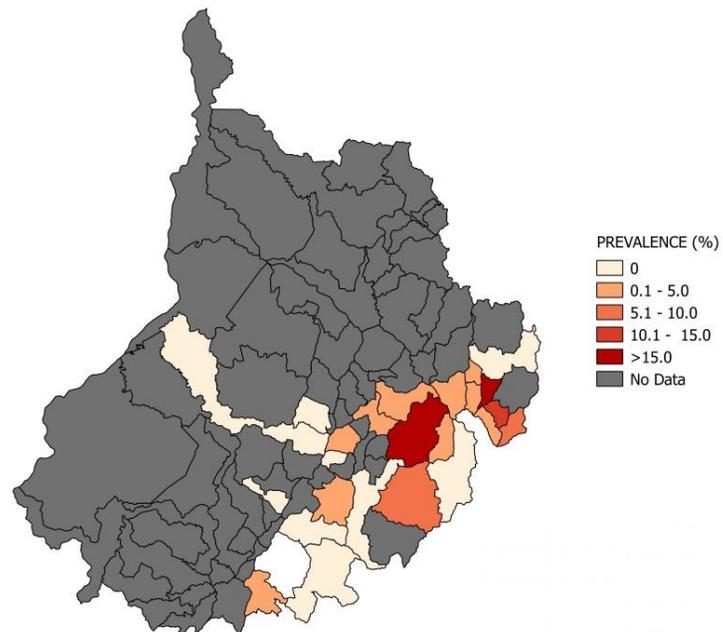


Nota. Tomado de: Olivera *et al.*, 2019.

En el año 2017 se reportaron en Colombia 1 089 casos, 26 en fase aguda y 1 063 en fase crónica, de estos últimos, 169 fueron notificados en Santander (15,9%) (INS, 2017). Al periodo epidemiológico 43 del 2018, en el país se confirmaron 347 casos de ECh, 70,8% correspondientes a indígenas, 28,0% a mujeres en gestación, 14,0% a poblaciones no priorizadas y 7,2% a menores de 18 años (INS, 2018). Respecto a brotes de Chagas agudo, al período epidemiológico 6 de 2019 se presentaron 5 brotes de transmisión oral, desde el año 2008 no se habían presentado en un solo año tantos reportes por esta vía de transmisión (Figura 6) (INS, 2019).

Figura 5.

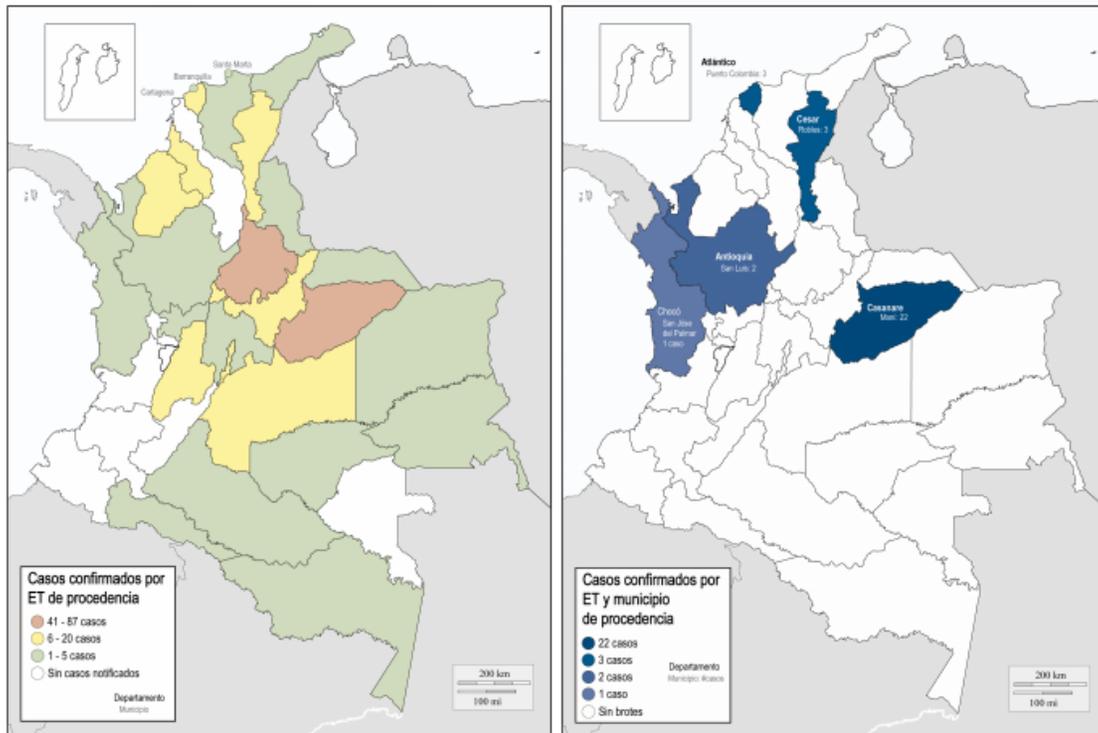
Distribución de la prevalencia de enfermedad de Chagas en el departamento de Santander.



Nota. Tomado de: Olivera *et al.*, 2019.

Figura 6.

Izquierda: Distribución geográfica de casos agudos confirmados en Colombia en el periodo de tiempo 2012 – 2019. Derecha: Brotes de transmisión oral en Colombia en 2019.



Nota. Tomado de: (INS, 2019).

1.3.1 Mecanismos de transmisión.

La transmisión de ECh puede ocurrir por diferentes causas.

1.3.1.1 Transmisión vectorial. Es el mecanismo de transmisión más importante en zonas endémicas y se ha mantenido debido a la domiciliación de los triatomíneos, sin embargo, ha disminuido considerablemente debido a los programas de control vectorial. La infección se transmite por el contacto de las mucosas o heridas de la piel del hospedero con heces infectadas

con tripomastigotes metacíclicos provenientes del vector. El signo de Romaña (edema uniparpebral) y la lesión cutánea (chagoma) son los principales signos de infección por esta vía de transmisión (Pinazo *et al.*, 2015; Bern, 2015; Bonney *et al.*, 2017).

1.3.1.2 Transmisión por transfusión de sangre y trasplante de órganos. Estos mecanismos de transmisión son de las principales causas de infección en zonas urbanas y países no endémicos. Ocurren al recibir transfusiones de hemoderivados u órganos de personas infectadas con *T. cruzi* por receptores sanos o inmunocomprometidos. El riesgo de adquirir la infección al ser transfundido con sangre de un donador infectado es del 10% al 20% y se presenta un mayor riesgo al ser transfundido con plaquetas respecto a otros componentes sanguíneos. El riesgo de muerte depende de la severidad de las enfermedades de base del receptor (Murcia *et al.*, 2013).

1.3.1.3 Transmisión vertical. La transmisión vertical o congénita, ocurre por la infección madre-hijo con las formas infectantes del parásito a través de la placenta, contacto con fluidos durante el parto o mediante la leche materna (Carlier *et al.*, 2019). Depende de la interacción de *T. cruzi* con la placenta, el sistema inmune materno y la respuesta inmune del feto en desarrollo (Carlier y Truyens, 2015; Kemmerling *et al.*, 2019). Este mecanismo de transmisión ha tomado relevancia en los últimos años debido a que se ha convertido progresivamente en uno de los principales mecanismos de transmisión en países no endémicos (Antinori *et al.*, 2017). Alrededor del 5% de mujeres infectadas crónicamente transmiten la infección al feto, por lo que, nacen aproximadamente 9 000 niños infectados en Latino América cada año. La mayoría de los recién nacidos son asintomáticos, sin embargo, presentan frecuencias más altas de nacimientos

prematuros, bajo peso al nacer y corren el riesgo de desarrollar patologías incapacitantes y potencialmente mortales durante su vida (Liempi *et al.*, 2016; Carlier *et al.*, 2015).

1.3.1.4 Transmisión oral. La transmisión de *T. cruzi* por vía oral es un mecanismo de transmisión reemergente, habitual en el ciclo enzoótico, pero circunstancial en el caso del hombre (Díaz y González, 2014). Se produce por la ingesta de alimentos contaminados con heces o con triatominos completos infectados, con alimentos rociados con secreciones de las glándulas anales odoríferas de animales infectados o por el consumo de carne de animales silvestres mal cocidos o sangre de estos reservorios. En los últimos años se han reportado, con tendencia al incremento, numerosos brotes de ECh por transmisión oral (Shikanai-Yasuda y Carvalho, 2012; Díaz *et al.*, 2015; Gascon *et al.*, 2010).

Las principales especies de triatominos vinculadas en la transmisión por vía oral en Colombia son *P. geniculatus* y *R. prolixus*. Desencadenantes como la alteración de las áreas boscosas periurbanas, luminosidad de las viviendas, frutas o alimentos expuestos a contaminación, aumentan el riesgo de transmisión por esta vía. La transmisión por vía oral se manifiesta con una alta mortalidad y peor pronóstico respecto a otros mecanismos de transmisión. Todos los reportes hasta el momento se han ubicado en Sudamérica, siendo el primer reporte registrado en 1965 en Brasil con 18 personas infectadas y 6 fallecidas por miocarditis aguda. Otros reportes se han registrado en Venezuela, Bolivia, Guyana francesa, Argentina, Ecuador y Colombia (Filigheddu, Gorgolas y Ramos., 2017; de Noya y González, 2019).

1.3.1.5 Transmisión accidental. La transmisión accidental es poco frecuente, ocurre en laboratorios y hospitales cuando el personal manipula diferentes tipos de materiales contaminados

con excretas de triatominos, cultivos de parásitos o sangre infectada de humanos y animales (Guhl, 2009; Rassi *et al.*, 2010).

1.4 Clínica de la ECh

La ECh presenta una fase aguda y una fase crónica, cada una con manifestaciones clínicas características. (Figura 7) (Pérez-Molina y Molina, 2018; Echeverría y Morillo, 2019).

1.4.1 Fase aguda.

La fase aguda presenta parasitemia detectable y síntomas no específicos como fiebre, malestar general, hepatoesplenomegalia y linfocitosis atípica. El período de incubación posterior a la transmisión por vía vectorial es de 1 a 2 semanas (Figura 7). La enfermedad aguda grave ocurre en menos del 1% de los pacientes, con manifestaciones clínicas como miocarditis aguda, meningoencefalitis o derrame pericárdico y se presenta con mayor frecuencia en los casos de infección por vía oral (Andrade *et al.*, 2011). Esta fase también puede ocurrir en estados inmunosupresores debido a trasplante de órganos o por reactivación (Nunes *et al.*, 2013; Acquatella, 2007).

1.4.2 Fase crónica.

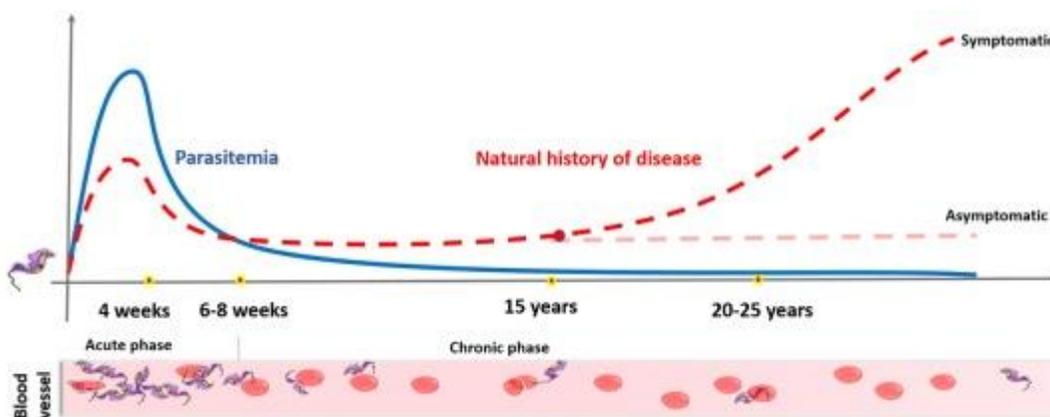
El curso clínico de la ECh es difícil de predecir. Una vez la fase aguda es superada, la respuesta inmune mediada por células controla al parásito, los síntomas se resuelven y la

parasitemia desaparece entre la semana 4 a 8 (Bern, 2015). Seguido a esto, los pacientes progresan a una fase crónica asintomática que se define por la presencia de infección con pruebas serológicas positivas para anticuerpos contra *T. cruzi*. Los pacientes presentan un electrocardiograma (ECG) normal, exámenes radiológicos de tórax, colon y esófago normales y ausencia de los síntomas y signos clínicos característicos de la enfermedad. Sin embargo, décadas después de la infección, del 30% a 40% de estos pacientes progresan a la fase crónica sintomática con presentaciones clínicas que afectan patológicamente órganos como el corazón, esófago o colon (Bocchi *et al.*, 2017; Echeverría y Morillo, 2019).

La CCC es la causa más común de cardiomiopatía no isquémica en Latinoamérica y la más frecuente en nuestro país. Las características patológicas de la CCC son heterogéneas con alteraciones macroscópicas como cardiomegalia y aumento de la masa cardiaca, adelgazamiento de las paredes ventriculares, lesiones aneurismáticas en diferentes regiones del ventrículo derecho e izquierdo y trombosis mural intracardiaca. En cuanto al examen histológico, se evidencia una miocarditis focal leve y crónica, así como, infiltrado de tipo linfocitario, fibrosis difusa, necrosis y cambios microvasculares (decapilarización, edema intersticial, agregación plaquetaria, engrosamiento de la membrana basal vascular y despoblación neuronal cardiaca) (Bonney *et al.*, 2017; Echeverría y Morillo, 2019).

Figura 7.

Izquierda: Distribución geográfica de casos agudos confirmados en Colombia en el periodo de tiempo 2012 – 2019. Derecha: Brotes de transmisión oral en Colombia en 2019.



Nota. Modificado de: de Bona *et al.*, 2018

Entre las manifestaciones clínicas que evidencian los pacientes con CCC se encuentran las anomalías en el sistema de conducción, bradiarritmias y taquiarritmias, aneurisma apical, tromboembolismo, falla cardíaca, síncope, muerte súbita, entre otras (Rassi *et al.*, 2012; Pérez-Molina y Molina, 2018; González y Mantilla, 2012). Las anomalías cardíacas en la CCC se manifiestan generalmente de manera progresiva, llegando incluso a presentarse en combinación en los estadios más tardíos de la enfermedad.

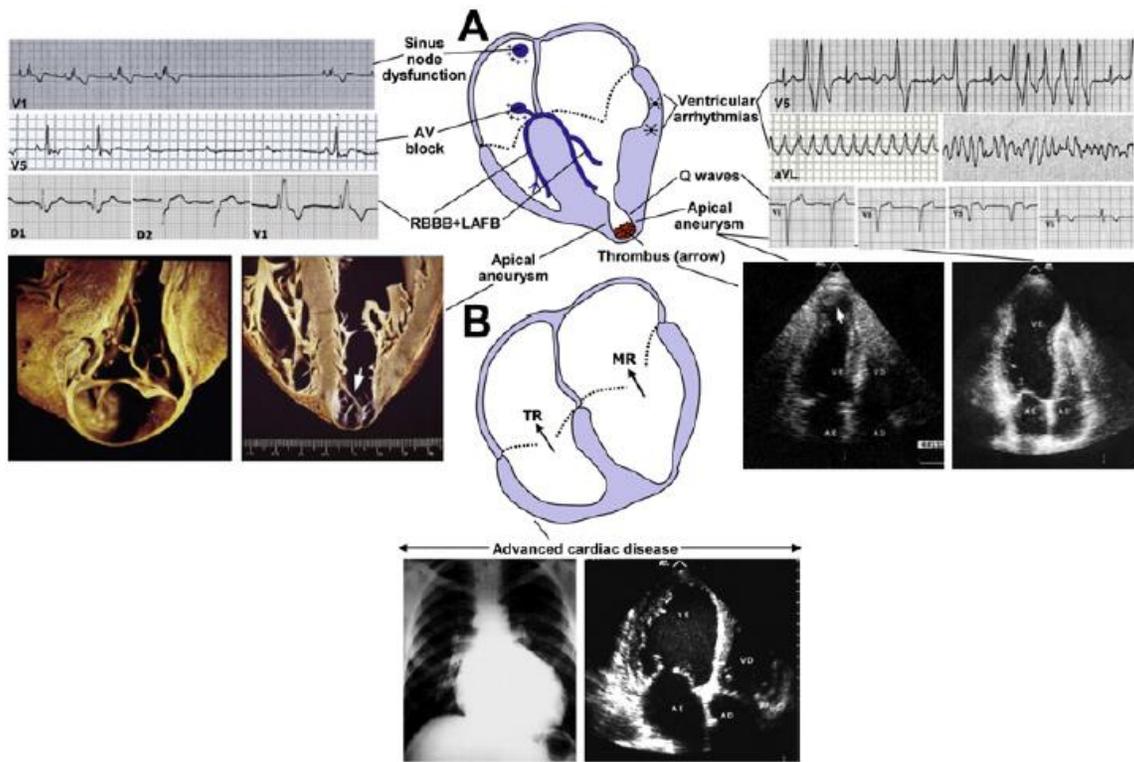
El examen clínico más utilizado para la clasificación clínica de la CCC es el ECG. Alteraciones electrocardiográficas como bloqueo de rama derecha con o sin hemibloqueo anterior izquierdo, más la asociación sintomática, permiten clasificar clínicamente a los pacientes e indican, por lo general, la transición de la fase asintomática hacia la CCC (Rassi *et al.*, 2012; González y Mantilla, 2012; Pérez-Molina y Molina, 2018). Características como el patrón hemodinámico de cardiomiopatía dilatada, distribución en el patrón fibrótico en la región posterior y apical del

ventrículo izquierdo, afectación en el sistema de conducción eléctrico y el nódulo sinusal, diferencian clínicamente la CCC de otras cardiomiopatías (Nunes *et al.*, 2018; Rojas *et al.*, 2018).

Así mismo, estudios asocian el aumento del riesgo de mortalidad en CCC con la etapa de clasificación clínica y las características demográficas de la población, alcanzando hasta el 85% en un período de tiempo de 10 años (Pérez-Molina y Molina, 2018). Diferentes variables han sido consideradas como posibles predictores de mortalidad en los pacientes con CCC, entre ellas, la disminución en el valor de fracción eyección del ventrículo izquierdo, sin embargo, la mayoría de estos son similares a cardiopatías de diferente etiología y, por ende, la estratificación del riesgo de mortalidad es similar al reportado en otras fallas cardíacas (Bocchi *et al.*, 2017; Martínez *et al.*, 2019).

Figura 8.

Hallazgos clínicos comúnmente observados en la cardiomiopatía chagásica crónica. A. Forma segmentaria cardíaca. B. Forma cardíaca dilatada. AV, auriculoventricular; LAFB, bloqueo fascicular anterior izquierdo; MR, regurgitación mitral; TR, regurgitación tricuspídea RBBB, bloqueo de rama derecha.



Tomado de: Rassi y Rezende, 2012.

Tabla 1.

Clasificación de la ECh

Grado I	Serología positiva sin compromiso clínico, radiológico o electrocardiográfico de lesión cardíaca.
Grado II	Serología positiva con sintomatología moderada a nula, radiología normal o indicativa de hipertrofia cardíaca leve o con alteraciones

electrocardiográficas como: extrasístoles, bloqueo aurículo-ventricular incompleto, bloque completo o incompleto de la rama derecha del haz de His, bloqueo completo o incompleto de la rama izquierda del haz de His, alteraciones primarias de repolarización.

Grado III Serología positiva con sintomatología evidente, hipertrofia cardiaca moderada y alteraciones electrocardiográficas como: bloqueo completo de la rama derecha del haz de His con desvío del eje eléctrico medio QRS para la izquierda (hemibloqueo anterior izquierdo), zonas eléctricas inactivas, bloqueo aurículo-ventricular completo, fibrilación o flutter auricular.

Grado IV Serología positiva con sintomatología pronunciada con insuficiencia cardiaca. Estudio radiológico que muestre cardiomegalia extrema o electrocardiograma con alteraciones graves o múltiples (arritmias completas y graves zonas eléctricamente inactivas).

Nota. Tomada de OPS-OMS. Tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas. Conclusiones de una consulta técnica. OPS/hcp/hct/140/99.

Por otra parte, la afectación gastrointestinal (megaesófago o megacolon) es menos común (10% a 21%) y se presenta con mayor frecuencia en países del cono Sur de Sudamérica (Argentina, Bolivia, Paraguay, Uruguay, Chile y partes de Brasil y Perú) (Salvador *et al.*, 2014). La manifestación esofágica varía desde acalasia leve hasta megaesófago severo, con presentaciones clínicas de disfagia, odinofagia, reflujo, pérdida de peso, tos, regurgitación y un mayor riesgo a desarrollar carcinoma esofágico. Asimismo, la manifestación del colon se presenta con estreñimiento y megacolon llevando a complicaciones por fecaloma, vólvulo e isquemia intestinal. Aunque el pronóstico de los pacientes con afectación gastrointestinal es bueno, en formas avanzadas podría ocasionar la muerte (Nunes *et al.*, 2018; Perez-Molina *et al.*, 2018).

1.5 Diagnóstico de la ECh

En la fase aguda, debido a la alta parasitemia se utilizan métodos directos para la identificación de tripomastigotes sanguíneos en muestras de sangre y, ocasionalmente, en fluidos como líquido cefalorraquídeo. Técnicas como coloración con Giemsa, gota gruesa, hemocultivo, Strout, microhematocrito y xenodiagnóstico son útiles para la detección temprana de parásitos en pacientes infectados (Alfonso, Ebell y Tarleton., 2012). Adicionalmente, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), desde los años noventa, fue propuesta como la herramienta molecular de elección para la detección de *T. cruzi*. Esta técnica es importante en el diagnóstico precoz de la transmisión congénita, diagnóstico de infección oral, detección temprana de infección en trasplante de órganos, monitoreo de reactivación en pacientes inmunosuprimidos y evaluación de la respuesta al tratamiento antiparasitario (Shijman, 2018).

Debido a que la carga parasitaria en la fase crónica es baja, el diagnóstico se basa en pruebas serológicas para la detección de anticuerpos IgG contra *T. cruzi*. Las pruebas más comunes son el ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI), hemaglutinación indirecta (HAI) y el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Alfonso, Ebell y Tarleton., 2012). Para confirmar el diagnóstico no hay una única prueba de referencia estándar disponible, por ende, se deben realizar por lo menos dos pruebas serológicas con diferentes antígenos y correlacionar con la información epidemiológica. En el caso de resultados discordantes, se recomienda realizar una tercera prueba de fundamento diferente o confirmar mediante PCR o Western blot (Guhl et al., 2002; Alfonso, Ebell y Tarleton., 2012).

La evaluación clínica inicial de un paciente diagnosticado con ECh crónico, incluye un examen físico general y un ECG en reposo de 12 derivaciones. Aquellos pacientes asintomáticos

que presentan un ECG sin alteraciones y sin síntomas cardiovasculares o gastrointestinales, tienen un pronóstico favorable y deben realizarse un seguimiento cada uno o dos años. Pacientes con alteraciones en el ECG asociadas a CCC, deben someterse a una evaluación cardiaca de rutina con monitoreo de Holter las 24 horas y prueba de esfuerzo para detectar arritmias y evaluar la capacidad funcional (Bocchi et al., 2017; Martínez et al., 2019; Echeverría y Morillo., 2019). La radiografía de tórax y ecocardiografía bidimensional (2D) se deben realizar para evaluar la función ventricular. Otras pruebas cardiológicas pueden realizarse según el caso (Rassi y de Rezende, 2012). Por otra parte, la deglución de bario y el uso de enema están indicados para pacientes con la forma digestiva. La manometría esofágica y la endoscopia digestiva son realizados en pacientes con resultados no concluyentes (López-Vélez, Norman y Bern., 2020).

1.6 Carga económica de la ECh

La ECh tiene una carga económica significativa para el paciente y la sociedad en términos de costos directos e indirectos asociados con atención médica, mortalidad, discapacidad y pérdida de productividad. Presenta costos económicos similares o superiores a otras enfermedades infecciosas y crónicas destacadas a nivel mundial como rotavirus (2 mil millones), cáncer de cérvix (4,7 mil millones) o enfermedad de Lyme (2,5 millones). Para una persona con enfermedad crónica, los costos anuales de atención médica se aproximan a \$383 dólares en Latino América, \$1762 en Europa y \$2162 en Estados Unidos. El costo total de por vida para la sociedad, teniendo en cuenta los costos de atención médica más las pérdidas económicas de productividad para una persona con enfermedad crónica es de aproximadamente \$24 245 dólares en Latinoamérica, \$76

919 en Europa y \$91 531 en Estados Unidos, Australia y Canadá (Lee et al., 2013; Schmuñis., 2013).

En Colombia, un estudio reciente evaluó el costo total estimado para la ECh sugiriendo un valor de \$13.1 millones de dólares anuales, que incluye los costos médicos directos (costos por atención clínica) e indirectos (viajes, comida, acomodación), el ausentismo (número de horas ausentes a la semana debido a síntomas cardiológicos), presentismo (número de horas perdidas a la semana debido al deterioro en la salud (asociado a síntomas cardiológicos) en el trabajo) y las muertes prematuras. Así mismo, el costo global estimado para la sociedad colombiana de una persona con ECh crónico es de \$4 226 dólares por año (Olivera y Buitrago., 2019).

1.7 Tratamiento

Actualmente existen dos fármacos antiparasitarios (benznidazol y nifurtimox) indicados en casos de infección aguda, infección congénita, menores de edad (<18 años), reactivación de la infección y coinfección con VIH. Estos fármacos presentan altas tasas de efectos secundarios, especialmente en adultos, y tiempos prolongados de administración (de 60 a 90 días), por ende, la tolerancia y adherencia al tratamiento es baja (López-Vélez, Normam y Bern, 2019; Crespillo-Andújar et al., 2019). El nifurtimox es un compuesto nitrofurano que actúa a través de la producción de radicales libres nitrogenados (superóxido y peróxido de hidrogeno) para los cuales el parásito presenta una tasa de desintoxicación mucho más baja que los vertebrados. El benznidazol, derivado de nitroimidazol, genera intermediarios de nitroreducción que se unen covalentemente a las moléculas del parásito. Este fármaco es mejor tolerado que el nifurtimox, por consiguiente, es considerado como el tratamiento de primera línea (Bermudez et al., 2016).

Entre los efectos secundarios de estos antiparasitarios se encuentran, efectos dermatológicos (erupción y dermatitis en diferentes grados), efectos en el tracto gastrointestinal (anorexia, náuseas, vómito, dolor abdominal, diarrea), afectación del SNC (irritabilidad, desorientación, parestesias, polineuritis aguda), supresión de la médula ósea y efectos adversos adicionales (pérdida de peso, mialgias, artralgias e insomnio). Así mismo, los dos fármacos son mutagénicos y teratogénicos en animales de experimentación, por lo tanto, es contraindicada la administración a mujeres en estado de embarazo (Pereira y Navarro, 2013; Morillo et al., 2015; Jackson, Wyssa y Chappuis., 2019).

El uso del tratamiento en la fase crónica es controversial debido a la baja parasitemia en esta fase, el bajo porcentaje de pacientes que podría progresar hacia la forma sintomática de la enfermedad (20% a 30%), los perfiles de toxicidad significativos y las bajas de tasas de curación (conversión hacia pruebas serológicas negativas) (Cucunubá et al., 2018). Adicionalmente, estudios de seguimiento a largo plazo no confirman su efectividad para evitar la progresión hacia las manifestaciones más graves de la CCC (Morillo et al., 2015). Por ende, el tratamiento de los pacientes con CCC se ha extrapolado de las pautas indicadas para insuficiencias cardíacas de diferente etiología y está enfocado en el manejo de las manifestaciones clínicas y en la prevención de una mayor morbi-mortalidad en esta fase.

Habitualmente, el tratamiento en CCC incluye una combinación de beta bloqueadores, bloqueadores de los receptores de angiotensina o inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, diuréticos, digoxina y anticoagulantes. Las únicas opciones terapéuticas para las fases más comprometidas de daño cardíaco en la CCC son el implante de dispositivos ventriculares y el trasplante cardíaco (Rassi et al., 2019; Passos et al., 2019). Este último procedimiento es de

elección para la insuficiencia cardíaca sistólica crónica en etapa terminal y refractaria, con el riesgo que ello implica debido a la inmunosupresión a la que deben ser sometidos los pacientes.

2. Fisiopatología de la ECh

La patogénesis de la ECh aún es desconocida. Modelos experimentales de infección con *T. cruzi* han asociado las alteraciones comúnmente observadas en humanos con eventos multifactoriales que involucran al parásito, el hospedero y el ambiente. Sin embargo, hasta el momento no se conocen las razones por las cuales sólo un pequeño porcentaje de individuos infectados en fase crónica desarrollan las formas severas de la enfermedad.

Diferentes estudios han apoyado la hipótesis del papel que tiene la respuesta inmune del hospedero en este proceso, asociado con la eliminación del parásito en la fase aguda y como la causa de daño tisular en la fase crónica. Por ende, las investigaciones que permitan dilucidar los mecanismos inmunológicos del hospedero, que puedan explicar la respuesta patológica o protectora, se han enfocado en esta área.

2.1 Respuesta inmune durante la fase aguda de la ECh

T. cruzi es un parásito intracelular obligado que presenta un mecanismo complejo de invasión a las células del hospedero. En la fase aguda, la inmunidad innata cumple un papel crítico en la resistencia a la infección por *T. cruzi*. Patrones moleculares del parásito son reconocidos por

receptores de reconocimiento de patrones (PRRs). Los receptores tipo Toll (TLR) son el conjunto de PRRs mejor caracterizado. La activación de TLR2 por *T. cruzi* induce el reclutamiento de leucocitos y la extravasación de proteínas plasmáticas en espacios intersticiales. TLR4 y TLR9 también participan en la activación de la respuesta innata reconociendo glicoinositolfosfolípidos (GIPLs) y DNA rico en CpG del parásito, respectivamente (Acevedo, Girard y Gómez., 2018). Otros receptores como tirosin quinasas, quininas (subtipos B1/B2), receptor TGF y EGF, cumplen a su vez un papel importante en la unión y/o invasión óptima del parásito (Zafra et al., 2008; Campos et al., 2004; Kayama et al., 2010; Bonney et al., 2017).

Adicionalmente, macrófagos, células dendríticas y células asesinas naturales (NK) desempeñan un rol importante en el control del parásito mediante la activación de una reacción inflamatoria intensa (Figura 9). El reconocimiento de *T. cruzi* por los TLR de estas células promueve la transmisión de la señal a través de dominios citoplasmáticos Toll/IL-1R para el reclutamiento de moléculas citosólicas, incluida la proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MyD88), para la posterior activación del factor nuclear κ B (NF κ B) y las vías dependientes del factor regulador de interferón (IRF) (Golgher y Gazzinelli., 2004; Tarleton., 2007). Lo anterior, conduce a la producción de mediadores proinflamatorios como citoquinas y quimiocinas (INF- γ , TNF- α , IL-12) que promueven la resistencia a la infección en estas células (Shoda et al., 2001).

De igual forma, el parásito expresa moléculas como el glicosilfosfatidilinositol (GPI) y mucinas que estimulan la síntesis de IL-12 y TNF- α por los macrófagos (Brenner y Gazzinelli., 1997). Además, la expresión de cruzipaina por *T. cruzi*, induce la activación de los receptores de bradiquinina B2 (B2R) para la maduración de las células dendríticas (Monteon., 2019). Por otra

parte, la producción de IL-10 y TGF- β están asociados con la susceptibilidad a la infección (Silva, Twardzik y Reed., 1991; Hölscher *et al.*, 2000)

Células presentadoras de antígeno no profesionales como miocitos y adipocitos, son probablemente los objetivos más importantes de *T. cruzi* para su replicación, particularmente posterior a la fase temprana de la infección (Nagajyothi y Weiss., 2019). Estudios han asociado el reconocimiento del parásito en cardiomiocitos a través de la interacción TLRs-PAMP, dando como resultado la activación de NF κ B e IL-1 β dependiente de TLR2 (Petersen, Krumholz y Burleigh., 2005).

Estudios recientes han descrito nuevos mecanismos del hospedero para mediar la infectividad en la infección por *T. cruzi*. Neutrófilos producen estructuras fibrosas llamadas trampas extracelulares de neutrófilos (NET) compuestas de ADN, elastasa, histonas y proteínas granulares. La actividad microbicida de las NET ha sido estudiada principalmente en la eliminación de bacterias, sin embargo, Sousa-Rocha y col. demostraron que las NET son inducidas por tripomastigotes y antígenos solubles de *T. cruzi* mediante la activación de TLR2 y TLR4. Este mecanismo es dependiente de la producción de especies reactivas de oxígeno y la activación del estallido respiratorio y reduce la infección al evitar el cambio de tripomastigotes sanguíneos a amastigotes en el entorno extracelular (Acevedo, Girard y Gómez., 2018).

En cuanto a las células NK, La producción de IL-12 por parte de los macrófagos inducen la producción de IFN- γ por estas células (Denker *et al.*, 1993). Esta citoquina a su vez induce en el macrófago la sobreproducción de IL-12, TNF- α y especies reactivas de oxígeno, evitando así, la diseminación de la infección y favoreciendo la diferenciación de los linfocitos hacia el fenotipo Th1 (Machado *et al.*, 2012). Cabe señalar que la activación no controlada de monocitos y células

NK podrían conducir a daño en el tejido y al desarrollo de las formas severas de la enfermedad (Hölscher *et al.*, 2000).

Otras estrategias del hospedero para la eliminación del parásito es la activación del complemento, la producción de anticuerpos y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (Lages-Silva *et al.*, 1987; Krautz, Kissinger y Krettli., 2000; Michailowsky *et al.*, 2003; Lidani *et al.*, 2017). El complemento comprende más de 35 proteínas que hacen parte de la inmunidad innata y pueden activarse mediante las vías lectina, clásica y alternativa (Ricklin *et al.*, 2010). Las vías de lectina y alternativa son particularmente importantes en la infección temprana con *T. cruzi*, ya que actúan contra el parásito independiente de las respuestas específicas de anticuerpos. A medida que la infección progresa, la respuesta de anticuerpos específica contra el parásito activa la vía clásica mediante la interacción con el complejo C1 (C1r y C1s). Finalmente, el complejo de ataque de membrana (MAC) se forma en el parásito como producto final de la activación del complemento, promoviendo su lisis (Cestari *et al.*, 2013).

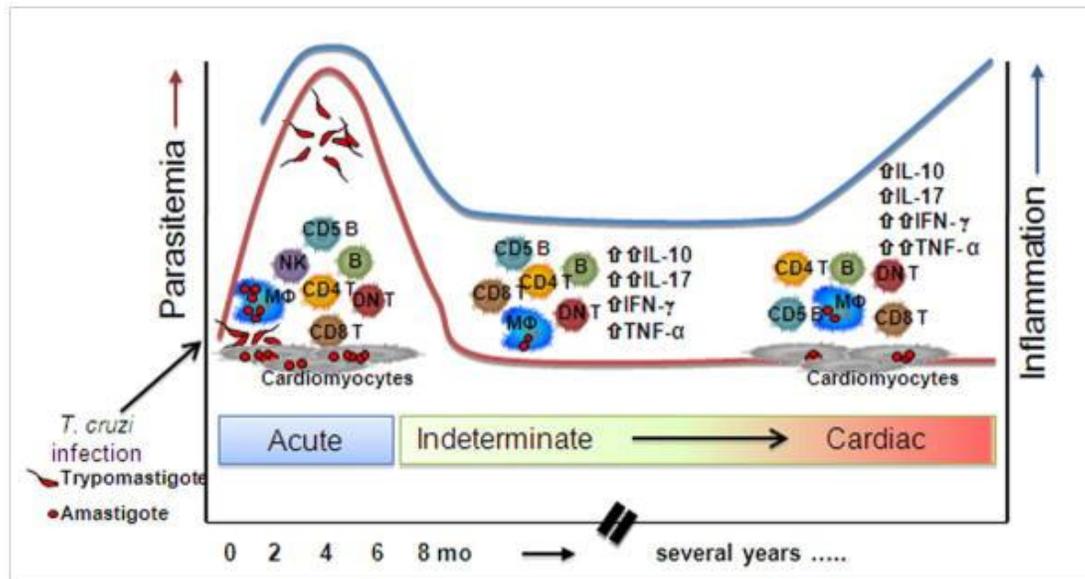
Adicionalmente, en la fase aguda quimiocinas y sus receptores activan la respuesta inmune celular contra *T. cruzi*. Linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ contribuyen a la eliminación del parásito en el tejido afectado (Fuenmayor *et al.*, 2005). Los linfocitos T CD8⁺ tienen gran importancia en el control de diversas infecciones virales y bacterianas y una menor participación en las infecciones por protozoos intracelulares, sin embargo, en la infección por *T. cruzi* juega un papel importante (Bixvy y Tarleton., 2008; Bustamante, Bixvy y Tarleton., 2008). Durante la infección, el parásito libera diferentes proteínas que son procesadas para su presentación por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I y detectadas por los LT CD8⁺. Una vez las células T CD8⁺ se activan, presentan una cinética similar a otras enfermedades virales y bacterianas. Un estudio realizado por Silva y col. en modelos murinos infectados con *T. cruzi* demostraron que linfocitos

T CD8⁺ IFN γ ⁺ Perforina⁻ se correlacionan con un menor daño cardíaco, mientras que la detección de linfocitos T CD8⁺ IFN γ ⁻ Perforina⁺ se correlaciona con daño tisular 120 días post infección. Así mismo, estudios en ratones demostraron que células T reguladoras, IL-17 y CD4⁺ CD25⁺ GITR⁺ Foxp3⁺ controlan la inflamación en el tejido y la resistencia a la infección por *T. cruzi* (Mariano *et al.*, 2008; da Matta *et al.*, 2010).

Por otra parte, estudios han resaltado la importancia de los niveles de anticuerpos en la resistencia contra el parásito (Brener y Gazzinelli., 1997). En la dinámica de la infección, *T. cruzi* desencadena una fuerte respuesta de células B en pacientes de fase aguda. Varios estudios han catalogado los anticuerpos que producen estas células en dos tipos, anticuerpos de diagnóstico y anticuerpos líticos, estos últimos participan en la lisis de las formas infecciosas del parásito y se correlacionan con la protección contra la infección (Takehara *et al.*, 1981; Krettli y Brener., 2009). Estudios en modelo murino han asociado la importancia de la respuesta de IgG en la fase aguda, especialmente los anticuerpos de la subclase IgG2 (Michailowsky *et al.*, 2003; Rodriguez *et al.*, 1981).

Figura 9.

Dinámica de la respuesta inmune en la enfermedad de Chagas.



Nota. Tomado de: Machado *et al*, 2012.

2.2 Respuesta inmune durante la fase crónica de la ECh

Posterior al control de la parasitemia en sangre y tejidos, durante la fase crónica asintomática se disminuye la miocarditis y la activación policlonal de linfocitos (Figura 9). Sin embargo, hay una respuesta inmune robusta a pesar de la ausencia de síntomas clínicos. Estudios han correlacionado una mejor función cardíaca con la producción de IL-10 e IL-4 por linfocitos CD4⁺ y monocitos/macrófagos. Ratones infectados con *T. cruzi* KO para IL-10 mostraron altos niveles de expresión de TNF- α , INF- γ e IL-12, comparado con ratones control. A pesar de que los ratones KO para IL-10 presentaban una baja parasitemia, desarrollaban una respuesta inflamatoria exacerbada que conducía a la muerte de estos animales. Los ratones control por su parte, controlaban los altos niveles de parasitemia y sobrevivían a la infección. Así mismo, en los ratones

KO había una disminución de células TCD4⁺ y alta producción de IL-12 causando la muerte de estos ratones, lo cual sugiere la asociación de este perfil inmunológico con el desarrollo de la patología (Hunter et al., 1997).

Recuentos altos de células NK CD3⁻ D16⁺ CD56⁺ y CD3⁻ CD16⁺ CD56^{dim} aluden un papel protector de esta subpoblación celular. La subpoblación CD56^{dim} presenta más actividad citotóxica y podría estar contribuyendo al control de la parasitemia (Ayo *et al.*, 2013). Así mismo, la presencia de un perfil de macrófagos similares a células regulatorias CD14⁺ CD16⁺ promueven el mantenimiento de la forma asintomática (Vitelli-Avelar *et al.*, 2005).

Otras moléculas como el óxido nítrico (ON) y prostaglandinas cumplen un papel en esta fase. Diversos estudios han asociado la disminución en la producción de estas moléculas con el aumento de la respuesta proliferativa de los linfocitos T hacia antígenos parasitarios y la disminución de la producción de INF- γ , TNF- α e IL-2 (Pinge-Filho, Tadokoro y Abrahamsohn., 1999). Otro mecanismo regulatorio importante para el control proliferativo de los linfocitos durante la infección es la inducción de apoptosis en las células B y T. Esta apoptosis puede ser inducida por diferentes mecanismos dependientes e independientes de ON y/o FAS (Golgher *et al.*, 2004). Estos resultados, en conjunto, proponen que existe un equilibrio entre la respuesta pro y antiinflamatoria en la fase asintomática de la enfermedad, ya que estos mecanismos antiinflamatorios no suprimen la respuesta celular lo suficiente como para aumentar la parasitemia, pero sí para controlar la inflamación (Rassi et al., 2010; Dutra et al., 2014).

Por otra parte, durante la fase crónica sintomática, la respuesta mediada por *T. cruzi* se asocia con la presencia de infiltrado inflamatorio exacerbado en las lesiones cardiacas compuesto principalmente por LT CD8⁺ y CD4⁺ CD28⁻ en relación 2:1 (Rodrigues *et al.*, 2012). La IL-15 e IL-7 son críticas para el mantenimiento de estos linfocitos en el tejido (Fonseca *et al.*, 2007).

Individuos con las formas clínicas más severas presentan un fenotipo de células característico de agotamiento clonal gradual (LT CD8⁺ CD27⁻ CD28⁻). Esto ocurre posiblemente por la estimulación continua con el antígeno que podría conducir a su vez al establecimiento de la patología (Padilla, Bustamante y Tarleton., 2009; Guedes *et al.*, 2012; Silverio et al, 2012).

Así mismo, genes relacionados con la respuesta inmune se regulan positivamente en pacientes con CCC respecto a cardiopatías de diferente etiología. Cunha-Neto y Chevillard. en ensayos de expresión génica en tejido cardiaco de pacientes con CCC vs pacientes con cardiomiopatía dilatada idiopática no inflamatoria, identificaron múltiples genes inducibles por INF- γ fuertemente regulados, lo que sugiere una señalización importante de esta citoquina en las formas clínicas graves de la ECh.

Es conocido que otros mediadores inflamatorios pueden inducir la presentación clínica en la CCC. Ensayos de inmunofluorescencia confocal y qPCR realizados por Cunha-Neto y Chevillard evidenciaron niveles alterados de expresión de CCR5, CCR7, CCR2, CCR4 y CXCR3 en leucocitos derivados de miocardio de pacientes con CCC en relación con pacientes asintomáticos. Igualmente, se observó una mayor expresión de los ligandos CCL2, CXCL9, CCL9, CCL5, sugiriendo la participación de estas moléculas en la quimio-atracción de las células de tipo Th1, para la posterior acumulación de estas células en el tejido cardiaco. Los genes CCL5 y CCL9 han sido asociados fuertemente con la intensidad de la miocarditis (Cunha-Neto y Chevillard, 2014; Bonney *et al.*, 2017).

Así mismo, producción aumentada de citoquinas inflamatorias tipo Th1 (INF- γ , TNF- α , IL-15, IL-6 e IL-4) están correlacionados con la hipertrofia y el grado de función cardiaca y demuestran que la progresión hacia la forma clínica cardiaca está relacionada con la pérdida de la capacidad para controlar la respuesta inmune inflamatoria (Souza *et al.*, 2004; Dutra *et al.*, 2005;

Golgher y Gazzinelli., 2004). Este perfil inflamatorio produce clínicamente una miocarditis difusa acompañada de fibrosis e hipertrofia y podría ser un factor clave en el desarrollo de cardiomiopatía severa (Ayo *et al.*, 2013; Bocchi *et al.*, 2017). Otros mediadores inflamatorios aumentados en el miocardio de pacientes con CCC involucrados en la vía de señalización de TGF- β como el TNF- α , CCL2, IL-18, CCL21, pueden inducir hipertrofia y fibrosis en el tejido (Cunha-Neto y Chevillard., 2014).

En contraparte, se observó una expresión disminuida o indetectable de ARNm GATA3, FoxP3, and ROR γ T y factores de transcripción típicos de las poblaciones Th2, Treg y Th17 y sus citoquinas en pacientes con CCC (Nogueira *et al.*, 2012). De igual forma, en pacientes con CCC se observa una disminución de linfocitos T reguladores CD4⁺ CD25⁺ productores de IL-10 y linfocitos CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ en comparación con pacientes en fase asintomática (da Silveira *et al.*, 2009; Araujo *et al.*, 2007).

Es importante destacar que la inflamación es solo uno de varios procesos patológicos que contribuye al desarrollo de la enfermedad cardíaca chagásica. Estudios longitudinales demuestran que múltiples factores podrían a su vez tener una participación importante en el desarrollo de las formas graves de la enfermedad como: gravedad de la infección aguda, respuesta inmune del paciente, características genéticas tanto de la población como del parásito, sexo masculino, exposición a la reinfección, edad, estado nutricional, alcoholismo, el proceso de remodelación progresiva, trastornos neurogénicos y microvasculares y factores concomitantes adicionales (Teixeira *et al.*, 2011; Shen *et al.*, 2017; Nunes *et al.*, 2018; Echeverría y Morillo, 2019).

3. Biomarcadores en la ECh

La identificación de biomarcadores de diagnóstico y pronóstico en la ECh podrían facilitar la supervisión, toma de decisiones y manejo clínico de aquellos pacientes que tienen mayor probabilidad de desarrollar CCC. Estudios poblacionales han asociado marcadores genéticos con susceptibilidad a desarrollar CCC (Tabla 2). Se han analizado variantes genéticas de un solo nucleótido (SNP) en diferentes genes de respuesta inmune innata y adaptativa, debido al papel clave que juega la inflamación en el desarrollo y progresión de la enfermedad, encontrando asociación en alelos y haplotipos del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) y citoquinas como TNFA, IL6, IL1B, IL10, IL4, IL12, IL17A, IL18, CCR5, TGFB, IFNG.

Así mismo, se ha evaluado el uso de patrones de biomarcadores circulantes como indicadores de CCC. Los niveles séricos del péptido natriurético de tipo pro-B N-terminal (NT-proBNP) y péptido natriurético de tipo B (BNP) son indicadores de presencia de disfunción ventricular izquierda, arritmia ventricular y disfunción sistólica en pacientes con ECh que, en combinación con el resultado electrocardiográfico, permiten la detección de disfunción sistólica del ventrículo izquierdo y, por tanto, su uso se considera una opción promisoriosa (Ribeiro *et al.*, 2012; de Figueiredo Brito *et al.*, 2018). Adicionalmente, los niveles de NT-proBNP han permitido predecir el riesgo de accidente cerebrovascular o muerte y podría tener un papel importante en la evaluación de la progresión clínica en la CCC, a pesar de ello, más estudios son requeridos para evaluar su potencial como biomarcador de progresión (Tabla 2). Otros biomarcadores evaluados son la troponina T cardíaca de alta sensibilidad (Hs-cTnT) y citoquinas como el factor de necrosis

tumoral (TNF- α) e interferón gamma (INF- γ), sin embargo, la mayoría no son específicos para la detección de personas con CCC en comparación con otras cardiopatías (Keating *et al.*, 2015; Echeverría *et al.*, 2017; Sherbuk *et al.*, 2015; Pérez-Molina *et al.*, 2015; Bermúdez *et al.*, 2016; Bocchi *et al.*, 2017).

Tabla 2.

Resumen de las investigaciones de biomarcadores relacionadas con la enfermedad de Chagas.

Estudio	Nombre del biomarcador	Resultado
Cardiomiopatía chagásica	CCL2 y MAL/TIRAP	Mayor susceptibilidad
Cardiomiopatía chagásica	CCR5	Protección
Cardiomiopatía chagásica	Células Treg CD15s+	Protección
Cardiomiopatía chagásica	Células T CD27+CD28+CD8+	Protección
No específico	TIMP-1 y TIMP-2	Aumento de los niveles
No específico	Troponina I	Aumento de los niveles
No específico	TGF-O	Aumento de los niveles
Asintomático	IL-10	Aumento de los niveles
No específico	APOA1	Disminución de los niveles
No específico	Fibronectina	Aumento de los niveles
Asintomático	MMP-2	Aumento de los niveles
Cardiomiopatía chagásica	MMP-9	Aumento de los niveles
Cardiomiopatía chagásica	ANP, BNP, N-terminal pro-BNP, IFN- α , TNF- α , IL-1 e IL-6	Aumento de los niveles
Cardiomiopatía chagásica	miRNA-1, miRNA-133a y -133b, y miRNA-208a y -208b	Disminución de los niveles
Cardiomiopatía experimental y chagásica	PICP y PIIINP	Aumento de los niveles

Estudio	Nombre del biomarcador	Resultado
Cardiomiopatía experimental y chagásica	Syndecan-4, ICAM-1 y Galectin-3	Aumento de los niveles
Eficacia de nuevos fármacos	KMP11, HSP70, PAR2 y Tgp63	Aumento de los niveles absolutos.
Eficacia de nuevos fármacos	Antígeno 13 y SAPA	Aumento de los niveles absolutos.
Eficacia de nuevos fármacos	Tc24	Aumento de los niveles absolutos.

Nota. Modificado de: Pinho *et al.*, 2016.

4. Ómicas

Las tecnologías de alto rendimiento han permitido evaluar de manera global un conjunto de moléculas con propiedad bioquímica similares que, de acuerdo con el blanco de estudio, se categorizan en las ciencias: genómica, proteómica, transcriptómica y metabolómica. Las enfermedades humanas son el producto de redes dinámicas y complejas. Estas ciencias ÓMICAS han permitido la identificación de marcadores involucrados en el proceso de diferentes enfermedades y dan una idea de qué vías o procesos biológicos están ocurriendo en el grupo que presenta la enfermedad vs el grupo control, logrando así avances significativos en el entendimiento de muchas de las enfermedades que presentan mayor incidencia e impacto a nivel mundial y, por tanto, obteniendo avances importantes en la búsqueda de biomarcadores tempranos en el desarrollo de patologías (Hasin *et al.*, 2017; Kao *et al.*, 2017; Rotroff y Motsinger-Reif, 2016).

La genómica es la ciencia más antigua de las ómicas. Los estudios de asociación génica se han realizado para identificar las variantes asociadas con susceptibilidad o resistencia al desarrollo de diferentes enfermedades. Con el advenimiento de nuevas tecnologías de secuenciación se desarrollaron los estudios de asociación del genoma completo (GWAS), los cuales, permiten identificar múltiples alelos que podrían influir en el riesgo de una enfermedad compleja o mendeliana. Caracteriza más de un millón de variantes genéticas comunes en todo el genoma, por ende, estos estudios no requieren de hipótesis previa, al contrario, van generando hipótesis a medida que el estudio avanza. Los GWAS pueden utilizar numerosas tecnologías, por ejemplo, secuenciación del genoma completo (NGS), matrices de genotipos, secuenciación del exoma o matrices de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). La mayoría de los GWAS utilizan esta última herramienta (Hou y Zhao *et al.*, 2013; Visscher *et al.*, 2017).

La epigenómica se enfoca en la caracterización, en el genoma completo, de las modificaciones reversibles del ADN o proteínas asociadas. Las modificaciones epigenéticas pueden influir en el destino celular y son esenciales para el desarrollo normal. Generalmente se enfocan en las modificaciones covalentes del ADN, los procesos de metilación o las modificaciones postraduccionales de histonas. Estas modificaciones pueden ser duraderas o heredables y ser influenciadas por factores genéticos o ambientales. Estudios de asociación del epigenoma completo han evidenciado su importancia en los procesos biológicos y el desarrollo de enfermedades metabólicas, cardiovasculares, cáncer, entre otros. Los elementos reguladores distales, como los potenciadores o “enhancers” y sitios de unión al factor de transcripción, son las regiones con más interés por su influencia en el fenotipo (Heintzman *et al.*, 2009; Ziller *et al.*, 2013; Meissner., 2015). Diferentes consorcios han centrado sus esfuerzos en establecer mapas epigenómicos completos en múltiples tejidos humanos; los datos generados por estos estudios

permiten obtener información de modificaciones que se correlacionan con diversas enfermedades y, además, tienen gran potencial para mejorar la interpretación funcional de las variantes genéticas identificadas en estas regiones o de los marcadores epigenéticos que están asociados con determinado fenotipo (Kundaje *et al.*, 2015; Hasin, Seldin y Lusic., 2017).

La transcriptómica es el conjunto de transcritos en una etapa de desarrollo específica o en cierta condición fisiológica. Su entendimiento es útil para interpretar los mecanismos funcionales del genoma y revelar los componentes moleculares en células o tejidos. Esta ciencia utiliza diferentes plataformas para catalogar todas las especies de transcritos (mRNA, ncRNA, sRNA, lncRNA, entre otros), determinar la estructura transcripcional de los genes (sitio de comienzo 5' y fin 3', identificación de sitios de empalme, otras modificaciones postranscripcionales) y cuantificar los niveles de ARN de todo el genoma (Wang, Gerstein y Snyder., 2009; McGettigan., 2013; García-Huertas *et al.*, 2017). Las tecnologías que han sido desarrolladas para analizar el transcriptoma incluyen los enfoques basados en secuenciación y los ensayos de hibridación (Wang, Gerstein y Snyder., 2009; McGettigan., 2013; Crosetto, Bienko y Van Oudenaarden., 2015).

La proteómica es el conjunto de todas las proteínas expresadas en un organismo, tejido o célula como consecuencia de cambios en su entorno, situaciones de estrés, señales bioquímicas y el estado fisiológico o patológico (Njoku *et al.*, 2019). El objetivo de la proteómica es cuantificar la abundancia peptídica, así como, evaluar las modificaciones post-traduccionales interacciones y comportamiento dinámico en espacio y tiempo de todas las proteínas en las células (Lamond *et al.*, 2012). Dado que las proteínas son las moléculas efectoras finales en los sistemas vivos, tienen una correlación más estrecha con las funciones biológicas y trastornos, en comparación con los genes, y proporcionan un mejor conocimiento de la situación patobiológica del enfermo, lo que ha llevado a utilizar esta herramienta para establecer diferencias entre proteomas de enfermos y sanos. Se han

desarrollado diferentes tecnologías para recopilar información contenida en las propiedades de las proteínas. Entre estas se encuentran las electroforesis en gel de una o dos dimensiones “1DE/2DE”, cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS (MS)) y secuenciación a gran escala (Graves y Haystead., 2002; Patterson y Aebersold., 2003; Horgan y Kenny., 2011).

5. Metabolómica

La metabolómica es un campo emergente complementario a las ciencias ómicas y una herramienta potencial para caracterizar bioquímicamente la diversidad de una especie (Kim y Creek, 2015). El dogma central de la biología molecular definía que la información fluía de manera unidireccional desde el ADN hasta productos y sustratos que se integran en vías metabólicas estrechamente relacionadas. Si bien, ésto es cierto, actualmente se conoce que la comunicación celular se da a través de un complejo sistema de interacción entre el ADN, ARN, proteínas y metabolitos.

La metabolómica fue descrita a finales de los 90s y consiste en la identificación simultánea de múltiples tipos de moléculas con bajo peso molecular (<1500Da) incluyendo carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos, vitaminas, drogas, toxinas, especies inorgánicas, entre otros. A diferencia de otras ciencias ómicas, la metabolómica permite evaluar directamente la actividad bioquímica mediante el monitoreo de los sustratos y productos del metabolismo celular y, por ende, ofrece la medida más directa del estado fenotípico de un sistema biológico.

El metaboloma humano, a diferencia del genoma humano, no ha sido completamente caracterizado. Hasta el momento se desconoce el número de metabolitos en el cuerpo humano. Según los metabolitos identificados y confirmados experimentalmente por la Base de Datos del Metaboloma Humano (HMDB) existen alrededor de 40 514 metabolitos en diferentes tejidos y biofluidos. Los metabolitos presentes en el humano pueden haber sido ingeridos, catabolizados, metabolizados o haber estado en contacto con ellos. Por consiguiente, consiste en una mezcla de compuestos endógenos y exógenos.

Las perturbaciones fueran del rango normal en el metaboloma se dan en respuesta a procesos de estrés, enfermedad o terapia por la que esté atravesando el paciente; que no solamente actúan como biomarcadores, sino como señales reguladoras o indicativas del desarrollo de una enfermedad (Hasin *et al.*, 2017; Zampieri *et al.*, 2017).

Los estudios metabolómicos siguen principalmente dos enfoques: análisis dirigidos y no dirigidos.

- **Análisis dirigido.** Se requiere un conocimiento *a priori* del grupo de metabolitos de interés. El análisis se puede realizar de forma cuantitativa o semicuantitativa mediante el uso de estándares internos. Este enfoque aprovecha el conocimiento integral de las vías bioquímicas, la cinética y productos finales de enzimas metabólicas. Presentan la ventaja que la preparación de la muestra y las plataformas analíticas están optimizadas para detectar estos metabolitos en específico. Adicionalmente, dado que los metabolitos analizados están claramente definidos, los artefactos analíticos no interfieren en el análisis posterior (Dettmer, Aranov y Hammock., 2007; Roberts *et al.*, 2012).

- **Análisis no dirigido.** Es una herramienta exploratoria global que permite evaluar la huella metabólica característica de una muestra. Implica análisis quimiométricos de los datos como

los análisis multivariantes para disminuir la complejidad de las señales obtenidas por una o más plataformas analíticas y la subsecuente identificación de los metabolitos más significativos. Estas señales deben ser anotadas utilizando análisis *in silico* con bases de datos. Este enfoque es utilizado para estudios cuya finalidad es el hallazgo de biomarcadores (Creek *et al.*, 2011). Los principales desafíos radican en los protocolos de preparación de muestra, la sensibilidad y especificidad inherentes a la plataforma analítica empleada, el tiempo para procesar las grandes cantidades de datos generados, las dificultades para identificar y caracterizar los metabolitos y el sesgo por la detección preferencial de moléculas con alta abundancia (Fiehn., 2002; Griffiths *et al.*, 2010).

5.1 Técnicas analíticas en metabolómica

Una amplia gama de técnicas son utilizadas para la caracterización del metaboloma, incluidas la resonancia magnética nuclear (RMN), cromatografía de gases (GC) o líquida (LC) (y variantes de LC como cromatografía líquida de alta precisión (UPLC)) acopladas a espectrometría de masas (MS), electroforesis capilar acoplada a MS (CE-MS), espectroscopía de infrarrojo, espectroscopía Raman, detectores electroquímicos e inyección directa a MS. Debido a la variedad de clases químicas y propiedades físicas que constituyen los metabolitos y el rango dinámico de las concentraciones en órdenes de magnitud, una sola plataforma analítica no podría ser utilizada para detectar todos los metabolitos en una muestra biológica. Sin embargo, la RMN y LC/GC-MS se han convertido en los métodos de elección para los análisis metabolómicos en estas muestras (Yi *et al.*, 2016).

La metabolómica basada en RMN ofrece grandes ventajas. El alto rendimiento de la técnica permite obtener gran cantidad de información en los espectros. Adicionalmente, permite una

rápida identificación de biomarcadores, presenta alta reproducibilidad y el análisis de los datos es generalmente fácil. Igualmente, esta técnica permite obtener espectros en muestras biológicas ya que su análisis se da de forma no invasiva (Wu *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2011). Sin embargo, la baja sensibilidad de la RMN y la superposición espectral limitan la cantidad de metabolitos que pueden ser identificados simultáneamente (Tang *et al.*, 2016).

5.2 Cromatografía acoplada a espectrometría de masas

La MS es una técnica complementaria que presenta una sensibilidad más alta que la RMN. Debido a la complejidad de las muestras biológicas, es necesario acoplar la MS a un modo de separación eficiente, de esta forma, mejora la identificación de los metabolitos por problemas ocasionados por la presencia de compuestos isobáricos (en el caso de analizadores de masa de baja resolución), la supresión de iones causada por compuestos coeluyentes o la presencia de isómeros. Adicionalmente, una buena separación de compuestos permitirá mejorar los límites de detección y la calidad de los datos por la disminución del ruido de fondo (Fiehn., 2002; Zhang *et al.*, 2012; Vinaixa *et al.*, 2016; Tang *et al.*, 2016).

5.2.1 Cromatografía

GC se compone de columnas capilares con alta resolución cromatográfica y tiempos de retención reproducibles. Típicamente las columnas con fase estacionaria de metil-fenil son utilizadas en GC para el análisis del metaboloma. La separación en GC ocurre en un horno a altas temperaturas, por tanto, puede ser utilizada sólo para análisis de metabolitos volátiles y

termoestables, tales como, cetonas y alcoholes o que puedan ser volátiles por derivatización. La derivatización es un procesamiento adicional a la muestra que podría conducir a la pérdida de metabolitos. Muchos de los metabolitos presentes en plasma o en suero requieren ser derivatizados antes de su análisis. GC-MS tiene un rango de masa limitado (18 a ~350 Da) y regularmente los iones moleculares no son detectados debido a la fragmentación, lo cual, dificulta la identificación de compuestos desconocidos (Garcia y Barbas., 2012; Vinaixa *et al.*, 2016; Tang *et al.*, 2016).

Una forma de identificar los compuestos en GC-MS es mediante la comparación de espectros con bibliotecas espectrales como el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST, <https://www.nist.gov/>), la base de datos del metaboloma de Golm (<http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/>) y la base de datos de Fiehn (<https://fiehnlab.ucdavis.edu/projects/fiehnlib>), que contienen principalmente metabolitos derivatizados. La Fuente de Iones de Impacto Electrónico (EI) ha sido comúnmente asociada con GC-MS; genera espectros reproducibles incluso entre diferentes MS, lo que facilita la identificación de espectros con esta técnica (Vinaixa *et al.*, 2016; Tang *et al.*, 2016).

LC-MS se caracteriza por su versatilidad. Extensa variedad de analitos pueden ser analizados en esta plataforma comparado con GC-MS ya que permite el análisis directo de metabolitos no volátiles. No es necesaria la derivatización de las muestras porque no se necesitan altas temperaturas, pero, usualmente requiere un paso adicional de extracción de la muestra, especialmente en muestras biológicas. LC de fase reversa (RP) con columnas C₁₈ ha sido utilizada en análisis metabolómicos para diagnóstico e identificación de biomarcadores. Está enfocada principalmente en la separación de metabolitos hidrofóbicos y compuestos débilmente polares. Por consiguiente, su mayor limitación radica en la retención no adecuada de moléculas polares o

altamente hidrofílicas. Adicionalmente, la supresión de iones ocurre con mayor frecuencia por la coelución de metabolitos polares (Vinaixa *et al.*, 2016; Tang *et al.*, 2016).

LC de fase normal (NP) es utilizada para mejorar las condiciones de separación de los metabolitos polares. Sin embargo, una gran limitación de este tipo de cromatografía es su baja sensibilidad ya que utiliza solventes orgánicos puros o eluyentes no polares en la fase móvil, los cuales podrían no solubilizar los compuestos hidrofílicos y no ser compatible con el modo de ionización ESI-MS (Tang *et al.*, 2016).

La cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC) combina la fase móvil utilizada en RP y la fase estacionaria de NP. En la fase móvil presenta una mayor cantidad de agua (30%) y solventes orgánicos polares miscibles en agua, como acetonitrilo o metanol, lo que permite que los metabolitos polares se diluyan y tenga alta compatibilidad con MS. Su fase estacionaria es altamente hidrofílica compuesta de sílice o sílice derivatizada con grupos amino, diol, polisulfoetil aspartamida o polihidroxietil aspartamida. Las moléculas de agua son compatibles con los grupos polares de la fase estacionaria y forman una capa acuosa sobre la superficie. En consecuencia, un analito polar disuelto en la fase móvil presenta afinidad con la fase estacionaria cuando se encuentra en recorrido por la columna. Entre más hidrófilo es el analito, más se desplaza el equilibrio hacia la capa de agua en la fase estacionaria y, por tanto, el analito se retiene más. Además, interacciones electrostáticas, enlaces de hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo e interacciones hidrófobas débiles juegan también un papel importante en la retención en el modo HILIC (Zhang *et al.*, 2012; Vinaixa *et al.*, 2016; Tang *et al.*, 2016).

5.2.2 Espectrometría de masas (MS)

La MS es una técnica analítica para la medición del peso molecular de una muestra y diferenciar moléculas por su relación masa-carga (m/z). Ha sido rutinariamente utilizada tanto por la industria como por la investigación en la identificación de drogas, diagnóstico y análisis de muestras biológicas. Los MS se componen fundamentalmente por tres partes: fuente de ionización, analizador de masas y detector. Partes adicionales como una celda de colisión entre dos analizadores de masa (en MS/MS) o una parte de prefraccionamiento puede ser acoplada a la espectrometría para mejorar el rendimiento.

- **Fuente de ionización.** Esta parte ioniza la muestra y los vehículos de esta, permitiendo de esta manera que posteriormente sean diferenciados por su m/z en el analizador de masa. El método de ionización determina el tipo de muestra que puede ser analizada. En los inicios de la MS las fuentes de ionización eran agresivas y la ionización de la muestra ocurría por el impacto de electrones que podían generar gran cantidad de iones fragmentados. A medida que la tecnología fue avanzando, se crearon fuentes de ionización suaves como la ionización por electrospray (ESI) y la desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI). En estos métodos las muestras son ionizadas provocando una mínima fragmentación lo que permitió el análisis de muestras biológicas.

ESI es considerada la fuente de ionización más suave y su ionización es generalmente menor a la provocada por MALDI. Esta fuente transforma los elementos presentes en una muestra desde la fase líquida a la fase gaseosa y las ioniza manteniendo las interacciones inherentes de las moléculas (enlaces covalentes). Por lo tanto, puede ser fácilmente acoplada a LC y CE. Además, es la técnica de elección para evaluar la huella metabolómica por LC-MS en muestras biológicas.

Para obtener una cobertura amplia del metaboloma, la ionización se realiza en modo negativo y positivo.

En MALDI la muestra es cristalizada junto a la matriz. Pulsos de láser UV se utilizan para vaporizar la matriz y liberar las moléculas como iones gaseosos para ser evaluados por el analizador de masas. MALDI ha sido utilizada en la identificación de proteínas con alta precisión y resolución cuando es acoplada a un analizador de tiempo de vuelo (TOF). Otras fuentes de ionización como la ionización/desorción por electrospray (DESI) han sido desarrolladas en los últimos años, éste presenta un fundamento parecido a MALDI y ESI con una alta sensibilidad y especificidad química (Downard., 2007; Feng *et al.*, 2008; Niessen, 2006).

- **Analizador de masa.** Posterior al proceso de ionización, las moléculas ionizadas son separadas y resueltas por campos electromagnéticos acorde a su m/z . Los analizadores de masa más comunes son el cuadrupolo (Q), trampa de iones cuadrupolo (QIT), trampa de iones (IT), tiempo de vuelo (TOF), transformada de Fourier-Ion de resonancia ciclotron (FT-ICR) y Orbitrap. El analizador de masa Q, tiene cuatro barras con carga eléctrica, organizadas de forma paralela, que permiten producir campos hiperbólicos para filtrar selectivamente los iones de interés. El analizador QIT utiliza campos eléctricos oscilantes de tres dimensiones (3D) similar al analizador Q para atrapar los iones de forma controlada y secuencialmente expulsarlos de acuerdo con la m/z . IT trabaja de forma análoga a QIT, sin embargo, el campo eléctrico es de dos dimensiones (2D) lo cual le permite tener mayor eficiencia de inyección y capacidad de almacenamiento de iones en relación con el método QIT. TOF usa campos eléctricos para acelerar las moléculas ionizadas con la misma energía cinética (3000eV), las moléculas recorren una región de campo libre y se separan en grupos de acuerdo con su m/z hasta llegar al detector. En FT-ICR los iones son atrapados en un campo magnético uniforme compuesto de celdas que presentan conductividad eléctrica en sus

paredes. Los iones son excitados simultáneamente para moverse en una órbita circular y, cada vez, una frecuencia excitará una m/z particular para ser medido por la transformada de Fourier y obtener un espectro de masa. Orbitrap al igual que FT-ICR presenta una alta resolución y precisión de las masas detectadas, pero a diferencia de este último no incorpora un imán superconductor, lo que hace que el costo disminuya (Downard., 2007; Feng et al., 2008; Niessen, 2006).

- **Detector.** Una vez los iones hacen su recorrido por el analizador de masas pasan al detector de iones (a excepción del ICR) donde se genera una corriente de imagen. Actualmente existen diferentes tipos de detectores, su elección depende en gran parte de la naturaleza del analizador de masa. El detector más simple utilizado en espectrometría de masa es el Copa Faraday que consiste en una caja rectangular con una placa colectora generalmente inclinada con respecto al haz de iones, los iones positivos que ingresan golpean su estructura, se neutralizan con la ayuda de una resistencia y la corriente se amplifica y se registra. El detector multiplicador de electrones (EM) logra mayor eficiencia al amplificar los electrones secundarios. Se usan comúnmente con los analizadores Q. Un alto voltaje aplicado conduce a una diferencia de voltaje sucesivamente mayor entre cada superficie de placa continua, así, cuando los iones golpean la primera placa se produce un efecto cascada amplificando la corriente con ganancias de 10^5 a 10^8 . El detector electrónico multiplicador de placas de microcanales (MCP) se utiliza generalmente en los analizadores de masa TOF. Consiste en series de placas planas con pequeños canales ($\sim 10 \mu\text{m}$). Los iones pasan a cualquiera de los canales, golpean las paredes de la placa y emiten electrones que se pasan a la placa opuesta, este proceso se repite amplificando de esta forma la corriente en orden de 10^5 con una placa y aumentando de acuerdo con el número de placas. Los detectores de matriz de fotodiodos (PDA) son la forma más común de los detectores de matriz; presentan placas con microcanales similares a MCP, los iones ingresan a las placas y los electrones emiten líneas

en una pantalla con fluorescencia, esta superficie emite luz en forma de fotones que son transmitidas por canales de fibra óptica hacia un dispositivo de carga o de plasma (CCD o PCD), estos convierten los fotones en carga eléctrica, los datos se integran y se almacenan (Dettmer, Aranov y Hammock., 2007; Downard., 2007; Feng *et al.*, 2008; Horgan y Kenny., 2011; Gorrochategui *et al.*, 2016).

5.2.3 Bases de datos en LC-MS

Los métodos de MS acoplados a cromatografía líquida (LC-MS) generan datos que tienen información de la masa/carga (m/z), tiempo de retención (RT) e intensidad, que constituyen grandes cantidades de datos, ricos en información (Becker *et al.*, 2012; Gika *et al.*, 2016). Las bases de datos más comunes utilizadas en metabolómica no dirigida para la anotación de metabolitos son la base de datos del metaboloma Humano (HMDB) (<http://www.hmdb.ca/>), METLIN (<http://metlin.scripps.edu/>), MassBank ([http://www .massbank.jp](http://www.massbank.jp)), LIPID MAPS (LMSD, [http://www .lipidmaps.org/data/structure/](http://www.lipidmaps.org/data/structure/)), LipidMaps (<http://www.lipidmaps.org/data/standards/search.html>), NIST 14 y mzCloud (<https://www.mzcloud.org/>) (Vinaixa *et al.*, 2016).

6. Quimiometría

Las tecnologías utilizadas para el estudio de los análisis metabolómicos han hecho que los conjuntos de datos se hagan más extensos y con estructuras internas más complejas. La quimiometría se ha convertido en una herramienta crucial para la extracción de información valiosa de datos metabolómicos.

6.1 Flujo de análisis de datos metabolómicos

Los datos crudos obtenidos de los instrumentos analíticos deben ser procesados para generar una matriz de datos práctica. Para esto, debe eliminarse la varianza y el sesgo en el análisis de datos para reducir la complejidad y mejorar las señales características de metabolitos. Múltiples algoritmos y software han sido desarrollados para llevar a cabo este proceso. Entre estos, XCMS (https://xcmsonline.scripps.edu/landing_page.php?pgcontent=mainPage), MZmine (<http://mzmine.github.io/>), OpenMs (<https://www.openms.de/>) y MetAlign (<http://www.metalalign.nl>) se han convertido en las herramientas más utilizadas debido a su practicidad y efectividad. En general, los pasos básicos para el análisis de los datos crudos en metabolómica se describen a continuación.

- **Corrección de línea base y filtrado de ruido.** Este proceso corrige la línea base separando los componentes de las señales propias de la muestra, del ruido de fondo generado por

interferencias en el instrumento analítico o ruido por los buffers utilizados en la fase móvil en LC-MS.

- **Detección de picos y deconvolución.** Identifica, resuelve y cuantifica (si aplica) las señales correspondientes a metabolitos en la muestra, basado en el espacio de tres dimensiones (tiempo, masa e intensidad). Es primordial en el análisis de datos posterior, tal como el alineamiento de los datos y la identificación de biomarcadores. A su vez, reduce la complejidad de los datos.

- **Alineamiento.** Tiene como objetivo identificar y sincronizar los picos similares entre las diferentes corridas, de manera que, cada señal tenga el mismo tiempo de retención y desplazamiento químico en relación con su masa.

- **Normalización.** Este proceso se realiza dentro o entre la intensidad de los picos de los diferentes espectros. Elimina las variaciones de confusión atribuidas a las técnicas analíticas, como el sesgo experimental o el ruido analítico y hace que el perfil de los picos sea comparable en tamaño (Smith *et al.*, 2006; Goodacre *et al.*, 2007; Gorrochategui *et al.*, 2016).

- **Modelado de los datos.** Para explorar los conjuntos de datos de gran dimensión y obtener información valiosa, se han aplicado diferentes métodos de aprendizaje. Estos métodos pueden clasificarse en dos categorías, métodos supervisados y métodos no supervisados. Generalmente, los métodos no supervisados se utilizan para explorar la estructura general de los datos y encontrar tendencias o agrupaciones. Estos métodos presentan una visión imparcial de los datos, incluyen el análisis de componentes principales (PCA), el análisis jerárquico de conglomerados (HCA) y el mapeo de autoorganización (SOM). El **análisis de componentes principales (PCA)** es el ejemplo más utilizado en metabolómica; resume la variación de los datos en un número más pequeño de componentes, llamados PC, que presentan una mayor variación.

PCA permite obtener una proyección de las muestras en un espacio de PC de baja dimensión, lo que permite visualizar la distribución de las muestras. Por otra parte, los métodos supervisados evalúan estructuras de datos conocidas para generar patrones y reglas para predecir nuevos datos, al conocer el modelo general, es posible realizar la clasificación de las muestras y la identificación de los posibles biomarcadores. La clasificación se puede realizar por métodos lineales (mínimos cuadrados parciales (PLS) o proyecciones ortogonales a estructuras latentes (OPLS)) o no lineales (redes neuronales (NN) y máquinas de vectores de soporte (SVM)). El uso de estas técnicas depende de la hipótesis del estudio y la capacidad de clasificación del modelo. El método supervisado más utilizado para la clasificación es **PLS-DA**. Este método puede proporcionar información valiosa sobre la causa de la discriminación al confirmar el comportamiento de la variable (por ejemplo, VIP) y es una herramienta útil en la identificación de biomarcadores (Madsen *et al.*, 2010; Gromsky *et al.*, 2015; Yi *et al.*, 2016; Gorrochategui *et al.*, 2016).

- **Identificación de metabolitos.** Diferentes herramientas y bases de datos están disponibles públicamente para la identificación de metabolitos con LC-MS. En general las herramientas actuales se basan en la masa precisa, la distribución isotópica y los espectros MS/MS.
- **Selección de variables.** Tiene como objetivo seleccionar los metabolitos importantes de un grupo de metabolitos detectados que permiten responder preguntas biológicas. Este proceso se puede dividir en dos tipos de enfoques: clasificación de la variable y selección de un subconjunto de variables. La **clasificación de variable** se utiliza para identificar metabolitos informativos o biomarcadores; el proceso asigna una medida de importancia a cada variable de acuerdo con ciertos criterios. Los criterios basados en PLS son los más comúnmente usados. Este método utiliza los pesos de carga (LW), la variable de importancia en el proyecto (VIP), el coeficiente de regresión (RC), la proyección objetivo (TP) y relación de selectividad (SR). Hasta el momento, VIP es el

método de elección en metabolómica. La **selección de un subconjunto de variables** se refiere a la búsqueda de un subconjunto óptimo entre todas las variables que satisfacen un criterio de elección. Cualquier método de clasificación de variables podría ser utilizado con este fin mediante la introducción de un umbral en los valores de importancia. Este umbral puede ser subjetivo, por lo general, se debe considerar una compensación entre la precisión de la predicción del modelo y el número de variables seleccionadas (Trygg, Holmes, Lundstedt., 2006; Gorrochategui *et al.*, 2016).

- **Ajuste de modelo y validación.** El coeficiente de variación (CV) es el método de elección para ajustar el modelo. El CV selecciona el modelo en función de la capacidad de predicción. Por otra parte, la validación del modelo es un proceso para confirmar las relaciones hipotéticas entre las variables identificadas y las respuestas. Este proceso proporciona una estimación de la capacidad de predicción del modelo. Se puede evaluar por la sensibilidad, la especificidad y la precisión con métodos como la curva de características operativas del receptor (ROC) y el coeficiente de determinación de validación cruzada (Q^2). El valor de la especificidad, sensibilidad y el área debajo de la curva ROC (AUC) deben estar cerca de 1 para una clasificación perfecta (Goodacre *et al.*, 2007; Gorrochategui *et al.*, 2016).

7. Metabolómica en enfermedades infecciosas y crónicas

En los últimos años han aumentado las publicaciones de estudios que conducen a un mayor conocimiento de enfermedades crónicas (Villaseñor et al., 2017; Rhee et al., 2016) e infecciosas (Voge et al., 2016; Preidis et al., 2015). Los marcadores metabólicos ofrecen una visión sobre la interacción en diferentes sistemas del hospedero y, por lo tanto, mejoran el entendimiento de procesos fisiopatológicos, el riesgo de enfermedad, el pronóstico y la respuesta a tratamiento (Torii et al., 2017; Cui et al., 2018; Stipetic et al., 2016).

En cuanto a enfermedades infecciosas, algunos estudios han descrito marcadores metabólicos que podrían mejorar la clasificación del riesgo en pacientes con sepsis e infecciones. Ferrario y col. evidenciaron en plasma cambios tempranos en los niveles de ácidos grasos y kinurenina asociados con mayor mortalidad en pacientes con shock séptico severo. Alteraciones en el metabolismo de los lípidos parece ser una característica importante para diferenciar a los sobrevivientes de sepsis respecto a los no sobrevivientes. Adicionalmente, se identificaron niveles elevados de acil-carnitina en pacientes que no sobrevivieron, lo cual sugiere defectos metabólicos en la vía de la β -oxidación de los ácidos grasos a nivel de la lanzadera de carnitina.

En malaria se encontraron diferencias fundamentales en la respuesta metabólica del hospedero frente a la infección con *Plasmodium* respecto a enfermedades febriles no relacionadas con malaria. Una huella de corticosteroides clasificó correctamente a pacientes febriles con malaria grave de pacientes sin malaria (AUC 0,82; IC del 95%: 0,70-0,93). En las infecciones bacterianas del torrente sanguíneo se estimó que una huella de dos metabolitos biliares tenían una alta sensibilidad (98.1% IC 95%: 80.2–100) y especificidad (82.9% IC 95%: 54.7–99.9) para identificar estas infecciones en niños menores de 5 años respecto a niños de la misma edad con malaria grave (Decuyperre et al., 2016). Mediante HPLC-MS se identificaron ácidos plasmáticos

fuertemente relacionados con la acidosis en malaria. 10 de los ácidos plasmáticos fueron asociados a un origen microbiano intestinal. De igual manera, los pacientes con malaria grave tenían bajos niveles de L-citrulina, un marcador que indicaba una disminución en la integridad de la barrera intestinal. De esta forma, los datos sugieren que un compromiso en la función de la barrera intestinal podría contribuir a la patogénesis en malaria grave (Leopold *et al.*, 2018). Otro estudio realizado en el parásito para evaluar la huella metabólica resultante después del tratamiento antimalárico encontró clases principales de disrupción metabólica (biosíntesis de mtETC/pirimidina, biosíntesis de folato, catabolismo de hemoglobina u homeostasis global) que permitieron predecir el modo de acción para muchos de los fármacos. Estos resultados sugieren que *Plasmodium* podría tener un número limitado de funciones biológicas necesarias para la viabilidad y que son susceptibles a intervención farmacológica. Gracias a estos resultados, las futuras terapias podrían seleccionar la combinación de medicamentos apropiadas que estén dirigidas simultáneamente a estas vías (Allman *et al.*, 2016).

Así mismo, la metabolómica se ha considerado una herramienta válida para explorar las interacciones entre el humano y las infecciones ocasionadas por virus. En infección por el virus del Zika, Diop y col. estudiaron los cambios en el perfil metabólico de células microgliales. Los resultados mostraron que la infección en estas células condujo a la modulación de numerosos metabolitos involucrados en la diferenciación neuronal, la regulación de la apoptosis, la estructura del virión y la replicación viral, incluidos lípidos como la lisofosfatidilcolina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, ceramina y esfingomiélna. Los ácidos carboxílicos y los ácidos dodecanodécico y undecanodécico también fueron anotados *in silico* con bases de datos.

En infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana VIH, se detectaron cambios metabólicos en plasma de pacientes infectados durante el primer año de terapia antirretroviral

combinada. Se utilizó el enfoque de metabolómica dirigida. Hallaron alteración de metabolitos implicados en la respuesta inmune como lípidos y aminas biogénicas en pacientes infectados no tratados, afectaciones que habían sido asociadas de forma independiente con la fisiopatología de la enfermedad cardiovascular y los desórdenes neurocognitivos asociados con la infección por VIH. Después de 12 meses de tratamiento antirretroviral, aún se identificaron cambios metabólicos para algunas aminas biogénicas, mientras que se revelaron niveles crecientes en los metabolitos lipídicos, lo cual los investigadores asociaron con las comorbilidades presentes en pacientes infectados con supresión viral (Peltenburg *et al.*, 2018).

Las enfermedades crónicas son trastornos complejos que duran largos períodos de tiempo y progresan lentamente. Actualmente representan la principal causa de muerte en todo el mundo, tanto en países desarrollados como en países en desarrollo. Las principales investigaciones metabolómicas se han centrado en enfermedades cardiovasculares, diabetes y enfermedades respiratorias. La diabetes tipo 1 (DT1) se caracteriza por la incapacidad del cuerpo para producir insulina. Ciertos cambios metabólicos parecen relacionarse con un mayor riesgo de DT1. Aminoácidos aromáticos como la fenilalanina y tirosina están relacionados con mayor riesgo de desarrollar DT1. Otros estudios han relacionado el desarrollo autoinmune de DT1 con cambios en el metabolismo de los lípidos. Alteraciones específicas en los niveles de fosfolípidos, triglicéridos, ésteres de colesterol, esfingolípidos y glicerofosfolípidos en plasma han sido asociados con mayor riesgo de desarrollar la enfermedad (Bar-Peled *et al.*, 2012; Bloomgarden., 2018; Arneth, Arneth y Shams., 2019). Por otra parte, en enfermedad renal crónica un estudio con enfoque no dirigido en plasma humano y plasma de modelo murino identificó la combinación de 7 biomarcadores metabólicos (ácido ricinoleico, ácido esteárico, citosina, 3-metilhistidina, ácido lipofosfatídico 16:0 y 18:0 y ácido arginínico) en pacientes con enfermedad renal crónica respecto a sujetos sanos

(sensibilidad de 83,3% y especificidad de 96,7%). De igual manera, estos marcadores presentaron resultados prometedores para monitorear la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento (Zhan *et al.*, 2016).

Las alteraciones en el metabolismo cardiaco subyacen a la mayoría de las enfermedades cardiovasculares. Los resultados de estos estudios han dilucidado los cambios metabólicos que ocurren en estas afectaciones y han contribuido a la identificación de nuevos biomarcadores (Rhee *et al.*, 2012; McGarrah *et al.*, 2018). Todos estos hallazgos confirman el rol relevante del perfil metabolómico del hospedero en la variabilidad de la presentación clínica de una enfermedad. En la Tabla 3 se proporciona una visión general de los estudios de metabolómica en enfermedades cardiovasculares.

Tabla 3.

Principales hallazgos hasta la fecha de estudios clínicos de metabolómica y enfermedad cardiovascular. CAD, enfermedad de la arteria coronaria; IM, infarto de miocardio; CABG, injerto de derivación de arteria coronaria; ECV, enfermedad cardiovascular; AIT: ataque isquémico transitorio; VLDL, lipoproteína de muy baja densidad; LDL, lipoproteína de baja densidad; HDL, lipoproteína de alta densidad; TCA, ácido tricarbóxico; TMAO, trimetilamina-N-óxido; BCAA indica un aminoácido de cadena ramificada.

Autores	Diseño de estudio y tamaño de muestra	Método analítico	Principales descubrimientos
Brindle <i>et al.</i> , 2002	Casos y controles: n = 36 pacientes con CAD de múltiples vasos en	RMN	Demostró que los analitos más discriminantes son los lípidos, principalmente

Autores	Diseño de estudio y tamaño de muestra	Método analítico	Principales descubrimientos
	<p>comparación con n = 30 pacientes con coronarias normales</p> <p>Transversal: n = 76 pacientes con CAD con enfermedad de 1, 2 o 3 vasos</p>		<p>VLDL, LDL, HDL y colina.</p> <p>Los cambios químicos de RMN de δ1.30 y δ3.22 (que representan variantes de LDL y otros elementos lipídicos) discriminaron la gravedad de CAD, mientras que no discrimina los factores de riesgos clínicos tradicionales</p>
Lewis <i>et al.</i> , 2008	<p>Experimental: n = 36 pacientes con IM planificado</p> <p>Transversal: 12 pacientes con infarto agudo de miocardio; 9 pacientes sin CAD</p>	LC-MS dirigida	<p>Experimental: los metabolitos implicados en el metabolismo de la pirimidina, el ciclo TCA y la vía de la pentosa fosfato se alteraron después de un IM planificado</p> <p>Sección transversal: ácido aconítico, hipoxantina, TMAO y treonina distinguieron presencia versus</p>

Autores	Diseño de estudio y tamaño de muestra	Método analítico	Principales descubrimientos
Turer <i>et al.</i> , 2009	Experimental: n = 37 pacientes sometidos a CABG	LC-MS dirigida	ausencia de IM espontáneo Se observaron tasas más bajas de producción de acetilcarnitina y 3-hidroxi-butirilcarnitina por el miocardio después de la reperfusión intraoperatoria
Shah <i>et al.</i> , 2010	Transversal y prospectivo: n = 757 pacientes en total (3 grupos pareados de casos y controles con CAD)	LC-MS dirigida	Transversal: los BCAA y los metabolitos del ciclo de la urea se asociaron con la presencia de CAD en cohortes de derivación y validación. Prospectivo: dicarboxilacilcarnitinas predicen eventos de CAD
Wang <i>et al.</i> , 2011	Transversal: n = 1876 pacientes sometidos a cateterismo cardíaco electivo	LC-MS dirigida	Los niveles más altos de TMAO, colina y betaína se asociaron con la presencia de ECV

Autores	Diseño de estudio y tamaño de muestra	Método analítico	Principales descubrimientos
Shah <i>et al.</i> , 2012	Prospectivo: n = 2023 pacientes sometidos a cateterismo cardíaco electivo	LC-MS dirigida	Las dicarboxilacilcarnitinas de cadena larga, los BCAA y los ácidos grasos se asociaron con la muerte o el infarto de miocardio Las acilcarnitinas de cadena media también se asociaron con la muerte.
Koeth <i>et al.</i> , 2012	Transversal y prospectivo: n = 2595	LC-MS dirigida	Una mayor presencia de L-carnitina en plasma se asoció con ECV prevalente y eventos coronarios, accidentes cerebrovasculares y mortalidad incidentes en individuos con niveles concurrentes de TMAO altos
Tang <i>et al.</i> , 2013	Prospectivo: n = 4007 pacientes sometidos a cateterismo cardíaco electivo	LC-MS dirigida	Una TMAO basal más alto se asoció con un evento cardiovascular adverso mayor (muerte, infarto de

Autores	Diseño de estudio y tamaño de muestra	Método analítico	Principales descubrimientos
Zheng <i>et al.</i> , 2013	Prospectiva: n = 1744 negros	LC-MS dirigida	miocardio o accidente cerebrovascular) Dos nuevos metabolitos desconocidos se asociaron con insuficiencia cardíaca incidente en modelos multivariados: ácido dihidroxi-docosatrienoico y una isoforma de hidroxileucina o hidroxiiisoleucina.
Bhattacharya <i>et al.</i> , 2013	Transversal: n = 1983 pacientes sin CAD frente a pacientes con CAD	LC-MS dirigida	Dos factores distintos de metabolitos derivados del PCA se asociaron tanto con la presencia de CAD como con la severidad de CAD en modelos ajustados: 1 factor estaba compuesto de BCAA y el otro estaba compuesto de acilcarnitinas de cadena corta

Autores	Diseño de estudio y tamaño de muestra	Método analítico	Principales descubrimientos
Ganna <i>et al.</i> , 2013	Prospectivo: n = 3668 de 3 cohortes de derivación y replicación separadas	MS no dirigida	Cuatro metabolitos se asociaron con CAD incidente: lisofosfatidilcolina 18:1, lisofosfatidilcolina 18:2, monoglicéridos 18:2 y esfingomielina 28:1
Jové <i>et al.</i> , 2015	Prospectiva y transversal: n = 131 pacientes con AIT en derivación y n = 162 en cohortes de validación	LC-MS dirigida	Prospectivo: bajo nivel de lisofosfatidilcolina (16:0) se asoció con un mayor riesgo de accidente cerebrovascular Transversal: los niveles más bajos de lisofosfatidilcolina (20:4) y lisofosfatidilcolina (22:6) también demostraron un riesgo potencial de accidente cerebrovascular o aterosclerosis
Würtz <i>et al.</i> , 2015	Multicohorte prospectivo: n = 7256; derivación; n = 2622 y replicación n = 3536	RMN y LC-MS dirigida	Cuatro metabolitos se asociaron con ECV incidente en metaanálisis: aumento de fenilalanina y ácidos

Autores	Diseño de estudio y tamaño de muestra	Método analítico	Principales descubrimientos
			grasos monoinsaturados; disminución de ácidos grasos omega-6 y ácidos docosaheptaenoicos.

Nota. Modificado de: Cheng *et al.*, 2018.

8. Metabolómica en ECh

En la ECh se han realizado pocos estudios metabolómicos. Las investigaciones hasta el momento se han enfocado en el conocimiento de las alteraciones en los metabolitos del parásito, el vector y modelos murinos. Un reporte evaluó el perfil metabólico de *T. cruzi* en el proceso de metacicloogénesis utilizado un enfoque de metabolómica dirigida. Esta publicación reveló cambios adaptativos en el parásito, del metabolismo de la glucosa hacia el metabolismo de los aminoácidos. Esta modificación podría ser clave en el paso de epimastigote a tripomastigote sanguíneo y ser un blanco potencial de estudio (Barisón *et al.*, 2017). Otro artículo en el cual se realizó un análisis en parásitos tratados con Benznidazol (Bnz) reveló un patrón de alteraciones metabólicas de productos de reducción del fármaco. Adicionalmente, se hallaron moléculas relacionadas con el agotamiento de tioles de bajo peso molecular (triptanotona, glutatión, γ -glutamilcisteína, glutatión ilpermidina, cisteína y ovotiol A), sugiriendo que estos metabolitos podrían estar interactuando

covalentemente con el Bzn y ser la causa principal de la toxicidad del fármaco contra *T. cruzi* (Trochine *et al.*, 2014). Por otra parte, Antunes y col. hallaron en heces de vectores infectados con *T. cruzi* una huella dactilar metabólica diferencial según la especie considerada, que podría afectar la competencia del vector triatomino para la infección con cepas específicas del parásito. El grupo de metabolitos variables estaba compuesto principalmente por aminoácidos, lípidos, esteroides, ácidos grasos y derivados, fenoles, ácido benzoico y derivados, flavonoides, glicerofosfolípidos, benzopiranos y quinolonas (Antunes *et al.*, 2013).

A nivel del estudio de la patogénesis, un estudio en ratones infectados con *T. cruzi* en el que se realizó metabolómica no dirigida y secuenciación del gen 16S ARNr en el tracto gastrointestinal, observó cambios en la composición microbiana y en metabolitos derivados de ácido linoleico conjugado. Estos metabolitos estarían asociados al proceso antiinflamatorio en pacientes con manifestaciones gastrointestinales e influir en la persistencia del parásito a largo plazo en este tejido (McCall *et al.*, 2018). Una evidencia reciente evaluó cambios metabólicos inducidos por seis diferentes fármacos en mioblastos infectados con *T. cruzi*. Tres drogas pertenecían a Bzn, Nifurtimox y Pozaconazol y tres a drogas candidato. Se aplicó un enfoque dirigido por MS de inyección directa y RMN para identificar metabolitos polares, lípidos y proteínas. Para el tratamiento con los fármacos antiparasitarios, la glucosa, piruvato, citrato, succinato y acetato fueron claramente afectados. Las principales clases de lípidos alterados en estos ensayos fueron: fosfatidiletanolaminas (PE), fosfatidilcolinas (PC), PC PE oxidadas, Lyso-PE (LPE) y lyso-PC (LPC), plasmógenos con grupos PE y PC, esfingolípidos (SL) ceramidas y esfingomielina. Sin embargo, los resultados de este estudio no fueron concluyentes ya que no se logró atribuir vías específicas a la acción de los diferentes fármacos (Hennig *et al.*, 2019).

Otro estudio metabolómico en tejido cardíaco de ratones infectados observó metabolitos derivados de nucleótidos y eicosanoides que podrían estar asociados con la respuesta inmune y el subsecuente daño del tejido. Además, se identificaron miembros de la familia de la carnitina y fosfatidilcolina de alto peso molecular en ratones infectados con cepas letales, lo que sugiere una relación con la gravedad y el resultado final de la infección (McCall *et al.*, 2017). Gironés y col. realizaron un análisis metabolómico en plasma y tejido de ratones infectados con *T. cruzi* en fase aguda de la enfermedad; encontraron alteraciones de metabolitos en vías como la glucosa, vía del sorbitol, síntesis de fosfolípidos y ácidos grasos alterados en tejido cardíaco y plasma. Lizardo y col. realizaron un análisis metabolómico en suero de ratones infectados crónicamente con *T. cruzi* que se alimentaron con diferentes dietas. Identificaron biomarcadores metabólicos específicos del ventrículo cardíaco que podrían definir la gravedad de la CCC. Fueron identificados biomarcadores como acilcarnitinas, aminoácidos, aminos biogénicas, glicerofosfolípidos y esfingolípidos.

Hasta el momento no se han publicado estudios en los que se realice metabolómica en muestras de pacientes infectados con *T. cruzi*. Recientemente en el GIEM se realizó un estudio metabolómico en tejido de pacientes con CCC en grado IV de la fase crónica de la enfermedad en el que se identificaron alteraciones en los metabolitos implicados en las vías de la glucólisis, ácidos grasos, vía de las pentosas fosfato, entre otros (Díaz *et al.*, 2018).

9. Justificación

La ECh es una de la parasitosis más relevante en Latinoamérica con una prevalencia 7,5 veces mayor que la malaria. Es considerada la causa principal de cardiomiopatía infecciosa a nivel mundial. La importancia de la enfermedad radica en su alta prevalencia, la falta de tratamiento efectivo y el costo económico para el paciente y la sociedad. Adicionalmente, no existen biomarcadores que permitan identificar a los pacientes que desarrollarían la forma clínica grave, por ende, el manejo de los pacientes seropositivos es expectante y el manejo clínico de aquellos que décadas después de la infección desarrollan problemas cardíacos es sintomático y no específico para la cardiomiopatía causada por la infección con *T. cruzi* (Bern, 2015; Pérez-Molina y Molina, 2018; Echeverría y Morillo, 2018).

La CCC es la forma clínica más frecuente y severa de la fase crónica de la ECh y una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en Latinoamérica. Se estima que existen aproximadamente 31 474 pacientes con CCC en Colombia (INS, 2014). Se ha establecido que la respuesta inmune y la inflamación crónica juegan un papel determinante en el desarrollo de la CCC. Es así como, se han realizado estudios de asociación genética y de expresión génica, en genes que codifican para proteínas y moléculas de la respuesta inmune inflamatoria (Mukherjee *et al.*, 2003; Zafra *et al.*, 2007; Torres *et al.*, 2009; Borrás *et al.*, 2009; Criado *et al.*, 2012; Deng *et al.*, 2013; Ayo *et al.*, 2013; Machuca *et al.*, 2014; Koopmann *et al.*, 2014; León *et al.*, 2016). A pesar de los hallazgos reportados en estos estudios, los procesos inmunopatogénicos del daño cardíaco son complejos y aún no están completamente dilucidados.

Reportes recientes han asociado el grado de inflamación crónica en los pacientes con cardiopatías de diferente etiología y procesos de desregulación metabólica (Abel, 2011; Alexander et al., 2011; Palomer et al., 2016). En la ECh, estudios metabolómicos en modelo murino detectaron variaciones en el perfil de metabolitos relacionados con el grado de inflamación en el tejido cardíaco (McCall et al., 2017). Así mismo, un estudio metabólico en modelo murino con cardiomiopatía chagásica aguda evidenció alteraciones en el metabolismo en muestras de tejido cardíaco y plasma, identificando biomarcadores específicos útiles para monitorear la severidad clínica de la fase aguda (Gironès et al., 2014). El grupo GIEM y sus colaboradores en los últimos años han trabajado en la identificación de potenciales biomarcadores de variantes ómicas asociadas con la patogénesis y el desarrollo de la CCC. Dado que el análisis de los metabolitos ofrece la medida más directa del estado fenotípico de un sistema biológico, identificar los patrones metabolómicos asociados con susceptibilidad al desarrollo o gravedad de la CCC permitirían, junto con los marcadores genómicos y proteómicos que han sido identificados por el GIEM, establecer un perfil de biomarcadores que permitan identificar la población susceptible de progresar a las formas severas de la enfermedad. De igual manera, la relación entre los marcadores metabólicos y el fenotipo de la CCC conduciría a un mejor entendimiento de la patogénesis de la enfermedad. Por lo anterior, el presente estudio tiene como finalidad responder las siguientes preguntas de investigación: ¿existen metabolitos serológicos asociados con el desarrollo de cardiomiopatía chagásica crónica? y ¿permiten estos metabolitos clasificar a los pacientes en los diferentes estadios de la fase crónica de la enfermedad?

10. Objetivos

10.1 Objetivo General

Identificar marcadores metabólicos asociados con la cardiomiopatía chagásica crónica en muestras de suero de pacientes asintomáticos y sintomáticos de la enfermedad de Chagas.

10.2 Objetivos Específicos

- Determinar el perfil de metabolitos en el suero de pacientes asintomáticos y sintomáticos de la enfermedad de Chagas.
- Establecer las diferencias y similitudes entre los patrones de metabolitos de los grupos analizados.
- Correlacionar los patrones de metabolitos de las muestras analizadas con la patogénesis de la enfermedad.

11. Materiales y Métodos

11.1 Tipo de estudio

Observacional transversal.

Población de estudio: adultos, hombres y mujeres seronegativos y seropositivos a antígenos de *T. cruzi* de zona endémica del departamento de Santander. Estas muestras fueron recolectadas entre el 2015 y 2018 por estudios previos realizados en el Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular (GIEM) de la Escuela de Microbiología, Universidad Industrial de Santander (UIS).

Criterios de inclusión:

- Edad mayor de 40 años, anticuerpos IgG positivos y negativos para *T. cruzi*, utilizando dos pruebas de inmunoabsorción ligado a enzimas, ELISA (Antígenos totales (Grupo Bios) y antígenos recombinantes (Chile y Vircell).
- Pacientes que residieron por lo menos durante 10 años en las provincias guanentina y comunera del departamento de Santander con condiciones ambientales y socioeconómicas similares.
- Pacientes que hayan firmado el consentimiento informado para el almacenamiento de sus muestras y su estudio encaminado a mejorar el conocimiento de la enfermedad de Chagas. Se cumplió con la aprobación y las normas establecidas del Comité de Ética de Investigación de la Universidad Industrial de Santander.

- Pacientes seropositivos evaluados clínicamente y con pruebas electrocardiográficas para ser clasificados en asintomáticos y sintomáticos teniendo en cuenta los parámetros estipulados por la OMS-OPS para la ECh (Tabla 1).

Criterios de exclusión:

- Pacientes con cardiopatía de otro origen: hipertensiva, valvular, viral, isquémica, congénita.

- Pacientes con enfermedades autoinmunes o enfermedades crónicas de diferente etiología.

Controles: pacientes seronegativos (SN) a antígenos de *T. cruzi*.

Casos: pacientes asintomáticos (AS) sin alteraciones cardiacas demostradas por la valoración clínica y las pruebas electrocardiográficas (grado I) y pacientes sintomáticos (S) en grado II, III-IV con evidencia en pruebas clínicas y electrocardiográficas de trastornos de la conducción y/o cardiopatía estructural (Tabla 1).

11.2 Variables clínicas

Entre las variables clínicas recolectadas, se recopiló la información de la edad, índice de masa corporal (IMC), comorbilidades y tratamientos farmacológicos concomitantes al momento de la toma de muestra. En la existencia de comorbilidad asociada, se centró en patologías como la diabetes, hipertensión, antecedentes renales y digestivos.

11.3 Tamaño de la muestra

Para el presente estudio se analizó el perfil metabólico de muestras de suero de 100 pacientes que fueron distribuidos equitativamente entre los pacientes SN (n=25) y seropositivos en los diferentes grados de la enfermedad, AS-I (n=25), S-II (n=25), S-III-IV (n=25). Estos fueron seleccionados de forma aleatoria del total de las muestras recolectadas por el GIEM cumpliendo con los criterios de inclusión y exclusión.

11.4 Plan de recolección de datos

Se tuvieron en cuenta los datos de la encuesta, examen físico y clasificación cardiológica de los participantes. Se verificaron los criterios de inclusión y exclusión. Este estudio contó con la aprobación del Comité de Ética de Investigación Científica de la Universidad Industrial de Santander (CEINCI-UIS).

12. Análisis metabólico

12.1 Extracción de suero de sangre periférica

Las muestras de sangre de los sujetos de estudio fueron tomadas mediante venopunción por el personal de la salud en las salidas de campo realizadas por el GIEM en el marco del proyecto

“Estudio multicéntrico para la evaluación de marcadores genéticos asociados con el desarrollo de la enfermedad de Chagas en Colombia” código COLCIENCIAS: 38974 y se contó con la autorización del investigador del estudio primario para su uso. En cada extracción se obtuvieron 6 mL de sangre en un tubo tapa roja sin anticoagulante. Dentro de las dos primeras horas posteriores a la extracción, cada muestra fue centrifugada a 2,500 rpm durante 10 minutos. Tras la centrifugación se observaban las dos fases claramente diferenciadas en el tubo. La fase superior, de color amarillo correspondiente al suero, fue alicuotado con una micropipeta a tubos Eppendorf. Las muestras fueron congeladas a -20° por un período máximo de 2 días y fueron transportadas hasta el laboratorio manteniendo la temperatura. Al llegar al laboratorio, las muestras fueron inmediatamente congeladas a -80°C hasta su análisis.

12.2 Preparación de las muestras

Para la extracción de los metabolitos a partir de las muestras de suero se utilizó el método de digestión de proteínas, precipitación con solventes orgánicos, centrifugación y filtración del sobrenadante según Wawrzyniak *et al*, 2018. Brevemente, a $100\mu\text{L}$ de suero se adicionaron $2\mu\text{L}$ de proteinasa K (PANREAC, 20 mg/mL) para promover la digestión de las proteínas y liberar los metabolitos asociados y $2\mu\text{L}$ CaCl_2 (Sigma, 250mM) para asegurar la actividad óptima de la enzima. Se incubó 15 minutos a 37°C . Posteriormente, se adiciona $150\mu\text{L}$ de una mezcla fría de clorofomo:metanol (1:1 v/v), se dio vortex por 5 minutos y se almacenó a -80°C durante toda la noche. Se centrifugó a 15.000 r.p.m por 15 minutos a 4°C , se separó el sobrenadante y se dispuso en un frasco de vidrio tipo HPLC para su análisis por LC-MS. Para asegurar la reproducibilidad en la medición se prepararon controles de calidad (QC) de las muestras. El QC se preparó

adicionando 10 μ L de cada muestra en un solo vial, se dio vortex y se tomaron 100 μ L de la mezcla, posteriormente, se realizó la extracción de los metabolitos como se describió previamente. Para la corrección de la línea base se preparó un blanco. Se tomaron 100 μ L de agua tipo MiliQ y se realizó el protocolo de extracción como se describió previamente. La extracción de las muestras, blanco y QC se realizó de forma aleatoria para evitar el sesgo de reproducibilidad.

12.3 Separación y detección de los metabolitos

Configuración experimental LC-MS:

La separación de los metabolitos por LC se llevó a cabo utilizando una cromatografía de interacción hidrofílica con columna HILIC 150mm x 4,6 mm, 5 μ m (Phenomenex), operada por un sistema de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con el equipo Hitachi LaChrom Elite L-2200. La fase móvil se trabajó en gradiente iniciando con 95% de solución B a 75% sobre el minuto 5, seguido por 30% de solución B sobre el minuto 8, se mantuvo con 30% de B hasta el minuto 14, el gradiente finalizó aumentando la rampa a 95% de B y 6 minutos de reequilibrio con 95% de B. El solvente B fue 0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo y el solvente A 10Mm de acetato de amonio pH: 5 en agua MiliQ. La tasa de flujo fue de 400 μ L/min, la columna se mantuvo a temperatura ambiente, el volumen de inyección fue 10 μ L y las muestras fueron mantenidas a 4°C hasta su análisis. La espectrometría de masas fue realizada usando un espectrómetro de masas ESI-IT amaZonX (Bruker Daltonic Inc). El espectrómetro fue operado en polaridad de ion alternativo (modo positivo y negativo), con los siguientes ajustes: rango 70-2000 m/z , gas de secado 11 L/min, temperatura de secado 350°C, salida de capilar 140 V, fuente de capilar \pm 3500 V, desplazamiento de placa \pm 500 V, nebulizador 15 psi. La calibración de la masa se realizó antes

y después de cada corrida en cada lote de análisis con estándares (Sigma). Las muestras fueron inyectadas de forma aleatoria y analizadas en 5 lotes (Anexo 1). Los equipos LC-MS estaban ubicados en el Laboratorio de Espectrometría de Masas del Parque Tecnológico de Guatiguará, Universidad Industrial de Santander.

12.4 Preprocesamiento y adquisición de los datos

Los datos crudos fueron convertidos a formato mzXML con el programa DataAnalysis 4.4 (Bruker). Los espectros fueron separados en el modo ionización positivo y negativo y se realizó procesamiento de los datos a cada modo de ionización incluyendo, filtración del ruido, detección de picos, construcción del cromatograma, deconvolución, deisotoping, alineamiento y relleno de vacíos con la plataforma MZmine 2.51 (<http://mzmine.github.io>). Los parámetros para cada paso están listados en el Anexo 2. Los datos fueron exportados en formato *csv* para los análisis estadísticos posteriores. La normalización se realizó basados en las muestras QC en Metaboanalyst 4.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/>).

12.5 Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de las características de la población estudiada (edad, sexo y clasificación clínica). Las variables categóricas son presentadas como números absolutos y proporción y las variables continuas son expresadas en términos de media y desviación estándar.

Para los análisis estadísticos, una matriz que incluía el número de pico, RT, m/z , y la intensidad de los picos fueron analizados por PCA. Para explorar la clasificación de huella

metabólica de los grupos analizados, se realizó un PLS-DA. La calidad del modelo se visualizó con los parámetros Q2, R2X y R2Y. Para identificar los metabolitos expresados diferencialmente, se realizó un diagrama de dispersión volcano. Se tuvieron en cuenta los metabolitos que presentaron nivel de significancia estadística ($P < 0,05$) y “fold change” ($FC > 1$ o $FC < 0,5$). Se visualizó la abundancia relativa y la magnitud diferencial en los niveles de intensidad de la señal de los metabolitos identificados con diferencia estadística en los grupos analizados por medio de un Heat map. Los anteriores análisis fueron realizados en Metaboanalyst 4.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/>).

12.6 Identificación de metabolitos y análisis de vías

La identificación de los metabolitos se realizó por el “match” de la relación masa/carga (m/z) con una ventana de precisión m/z de 0,05 Da y 5 ppm, con relación a las bases de datos: HMDB (<http://www.hmdb.ca>) y METLIN (<http://metlin.scripps.edu/>). Para los metabolitos significativos entre los grupos ($p < 0,05$), se realizó el análisis de vías utilizando el portal web Metaboanalyst®.

De igual forma, se realizó un análisis de enriquecimiento para evaluar si hay grupos de metabolitos biológicamente significativos en términos de vías, que estén enriquecidos en los datos. Finalmente, se realizó un análisis de correlación calculando el *odds ratio* teniendo en cuenta el Log_2 de la diferencia en la cantidad de los metabolitos identificados (*fold change*) y se correlacionó este resultado con la progresión en la fase crónica de la ECh. Adicionalmente, se realizó un análisis ROC para evaluar la capacidad diagnóstica de los posibles biomarcadores identificados.

13. Resultados

13.1 Análisis de variables clínicas

Las características demográficas y clínicas de los participantes se observan en la Tabla 3. La población de estudio estuvo conformada por 100 individuos. Sujetos seronegativos SN (n=25), seropositivos asintomáticos AS (n=25) y seropositivos con CCC S-II (n=25) y S-III-IV (n=25) fueron escogidos de forma aleatoria provenientes de una cohorte de pacientes. La edad prominente en los individuos osciló entre los 51 y 59 años con una media de edad cercana entre los grupos (Tabla 3). La distribución de la población entre hombres y mujeres y el IMC fue homogénea. El IMC en los pacientes seropositivos se categorizó dentro de los rangos normales. 7 individuos de grado III-IV y 1 individuo de grado II presentaban HTA en el momento de la toma de muestra. Una baja cantidad de individuos eran fumadores. 1 paciente en grado III-IV presentaba antecedente de insuficiencia renal y 1 paciente en grado asintomático tenía nefrolitiasis. 3 pacientes en grado II presentaban gastritis como antecedente digestivo. En grado III-IV, 2 pacientes tomaban medicamentos IECA (Enalapril), 6 tomaban BB (Carvedilol (n=3) y Metoprolol tartrato (n=3)), 3 ARA II (Losartán), 2 ARM (Espironolactona), 2 diuréticos de asa (Furosemida) y 2 medicamentos AINES antiagregantes (ácido acetilsalicílico). Todos los individuos eran de origen mestizo. Ninguno de estos pacientes mostraban evidencias clínicas de coinfección.

Tabla 4.

Características clínicas y demográficas de la población. IMC, índice de masa corporal; SBP, presión sanguínea sistólica; DBP, presión sanguínea diastólica; IECA, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; BB, beta bloqueadores; ARA II, bloqueadores de los receptores de angiotensina II; ARM, antagonistas del receptor de mineralocorticoide; ASA, diuréticos.

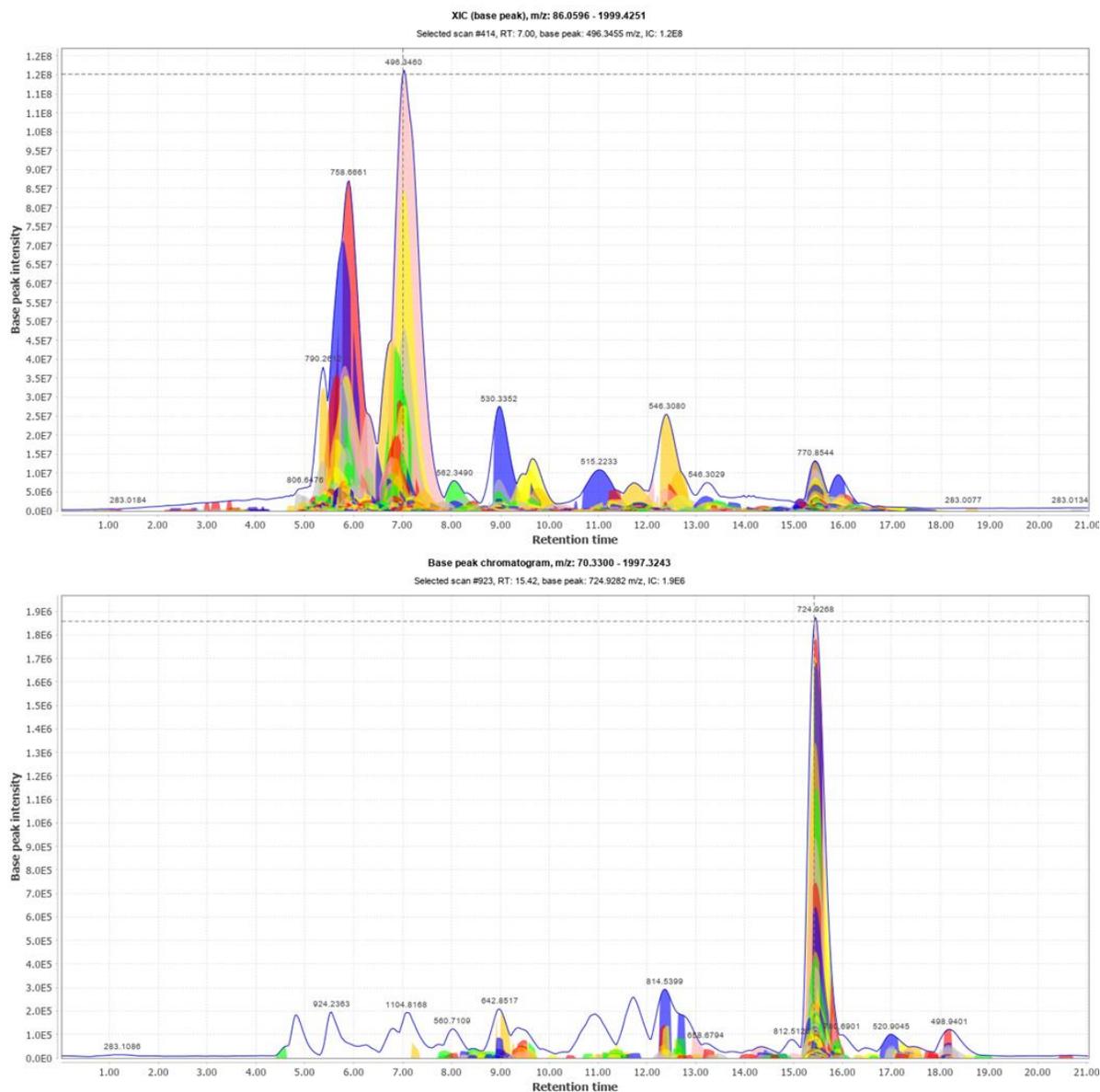
<i>Variables</i>	<i>Seronegativos</i>	<i>Asintomáticos</i>	<i>Sintomáticos</i>	
	<i>(N=25)</i>	<i>(N=25)</i>	<i>(N= 50)</i>	
<i>Característica</i>		<i>Grado I</i> <i>n=25</i>	<i>Grado II</i> <i>n=25</i>	<i>Grado III-IV</i> <i>n=25</i>
<i>Masculino</i>	12 (12%)	12 (12%)	13 (13%)	14 (14%)
<i>Femenino</i>	13 (13%)	13 (13%)	12 (12%)	11 (11%)
<i>Edad</i> <i>(Media ± DE)</i>	51,29 ± 11,83	52,40 ± 9,31	53,36 ± 9,50	59,72 ± 10,55
<i>IMC (Kg/m²)</i>	-	19,19 ± 3,03	19,12 ± 2,65	20,39 ± 1,92
<i>Hipertensión</i>	-	0 (0%)	1 (4%)	7 (28%)
<i>SBP, mm Hg</i>	-	115,72 ± 7,01	119,16 ± 13,10	129,27 ± 48,93
<i>DBP, mm Hg</i>	-	75,24 ± 7,69	73,20 ± 8,57	66,82 ± 32,47
<i>Fumadores</i>	2 (8%)	1 (4%)	2 (8%)	1 (4%)
<i>Antecedentes renales (%)</i>	0 (0%)	1 (4%)	0 (0%)	1 (4%)
<i>Antecedentes digestivos (%)</i>	0 (0%)	0 (0%)	3 (12%)	0 (0%)
<i>Medicamentos</i>				
<i>IECA</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (8%)
<i>BB</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	6 (24%)
<i>ARA II</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (12%)
<i>ARM</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (8%)
<i>ASA</i>	1 (4%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (8%)
<i>Antiagregantes</i>	1 (4%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (8%)

13.2 Perfil metabólico entre los grupos de estudio

Para obtener el perfil metabólico en el suero de los pacientes seropositivos y seronegativos, una vez preparada la muestra, se realizó la separación de los metabolitos y su análisis. En este proyecto se utilizó HPLC-ESI-IT-MS, que permitió una buena separación cromatográfica, reduciendo la complejidad de la muestra y mejorando la resolución. El proyecto se centró en los analitos ionizables de bajo peso molecular ($<1500 m/z$) presentes en al menos el 50% de las muestras de cada grupo. Los perfiles espectrales se obtuvieron con alta calidad y produciendo señales características de biomoléculas específicas (Figura 10).

Figura 10.

Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masa de trampa de iones (HPLC-ESI-IT-MS). (A) Perfil del cromatograma BPC del suero en modo positivo y (B) modo negativo.



13.3 Análisis de datos

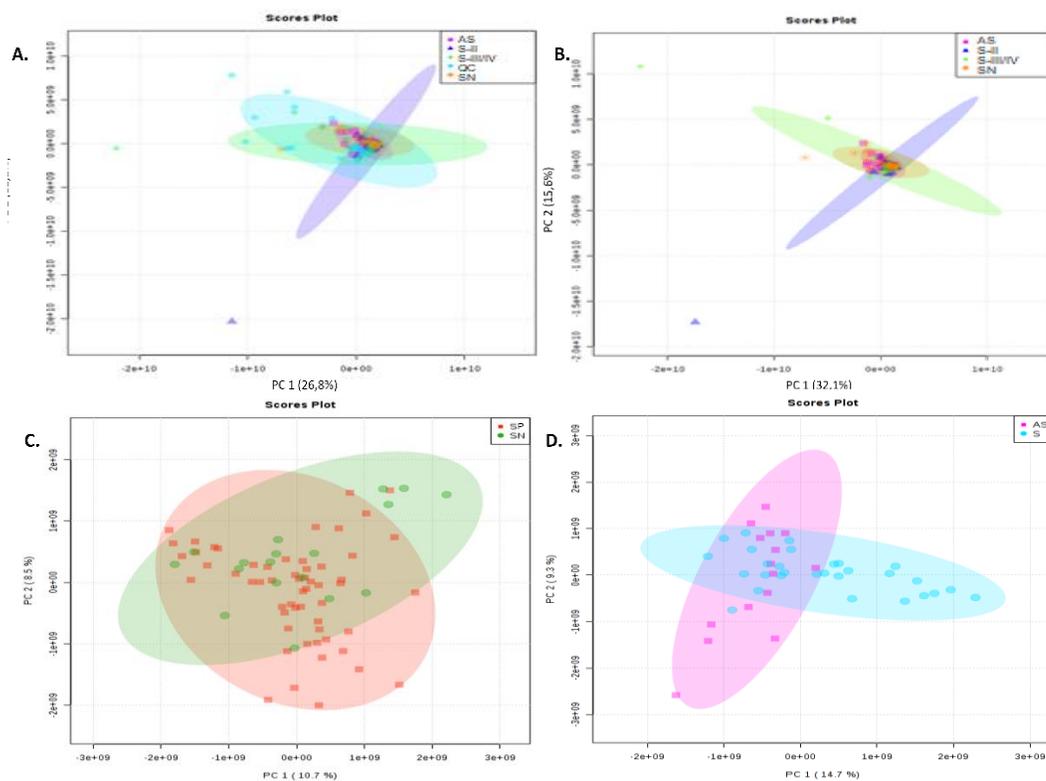
Para el análisis de los datos, se utilizaron métodos quimiométricos, los cuales permitieron obtener información relevante procedente de la matriz compleja de datos metabólicos. Las aproximaciones multivarianza más empleadas para el análisis de datos metabólicos son el PCA (análisis no supervisado) y el PLS-DA (análisis supervisado). En nuestro caso, utilizamos primero el análisis no supervisado (PCA) y posteriormente el análisis supervisado (PLS-DA y OPLS-DA).

13.3.1 Análisis de componentes principales (PCA)

Inicialmente, un modelo de PCA fue construido para visualizar las diferencias entre los grupos casos y control. El PCA permite el análisis y modelamiento de datos complejos para extraer y visualizar la variación sistemática en los datos, esto conduce a una visión general de todas las muestras (Trygg, Holmes y Lundstedt., 2006). La visualización de las características obtenidas con el PCA resultó en una agrupación entre los grupos evaluados AS, S-II, S-III-IV, SN y QC tanto en el modo positivo como en el modo negativo, mas no, en la separación de los grupos (Figura 11A y 12A). La agrupación del QC demostró que el sistema de análisis tuvo una gran estabilidad y repetibilidad. La gráfica de los primeros dos componentes (explicando la varianza total del PC1 32,1%; PC2 15,6% y PC1 46%; PC2 11,3%) se observa en la Figura 11B y 12B. Al analizar las Figuras 11C-F, del modo de ionización positivo, se observa una diferenciación entre los grupos evaluados, sugiriendo la existencia de una firma metabólica específica para cada grupo, siendo un poco menos evidente en el modo de ionización negativo (Figuras 12C-G). La gráfica PCA entre los grupos S-II y SIII-IV no muestra una diferenciación clara entre los grupos (Figura 11G).

Figura 11.

Resultados del PCA de los grupos analizados en modo positivo. (A) Gráfica de los primeros dos componentes principales del PCA construido con los datos procesados y su elipsis con el 95% de confianza de todos los grupos analizados incluidas las muestras QC. (B) Gráfica de los primeros dos componentes principales del PCA de los grupos analizados SN, AS, S-II y S-III-IV. (C-G) Gráfica del modelo de PCA para SP vs SN (C), AS vs S (D) AS vs SII (E) AS vs SIII-IV (F) y SII vs SIII-IV (G). SN están presentados como círculos naranjas, las muestras QC como círculos celestes, pacientes AS como cuadrados rosados, pacientes S-II como triángulos azul rey y pacientes S-III-IV como rombos verdes.



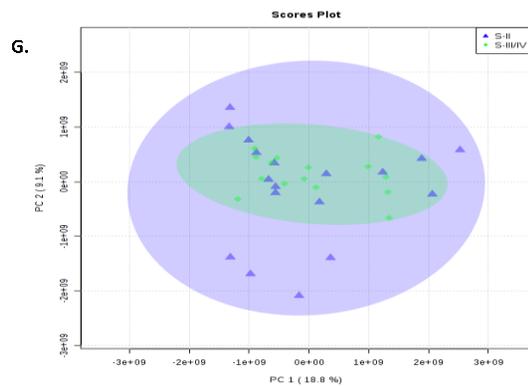
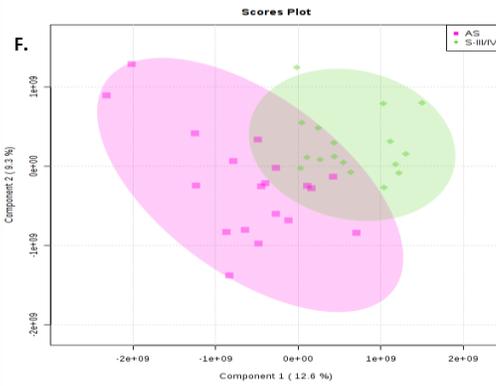
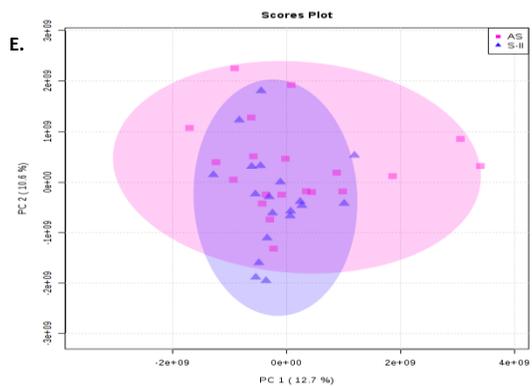
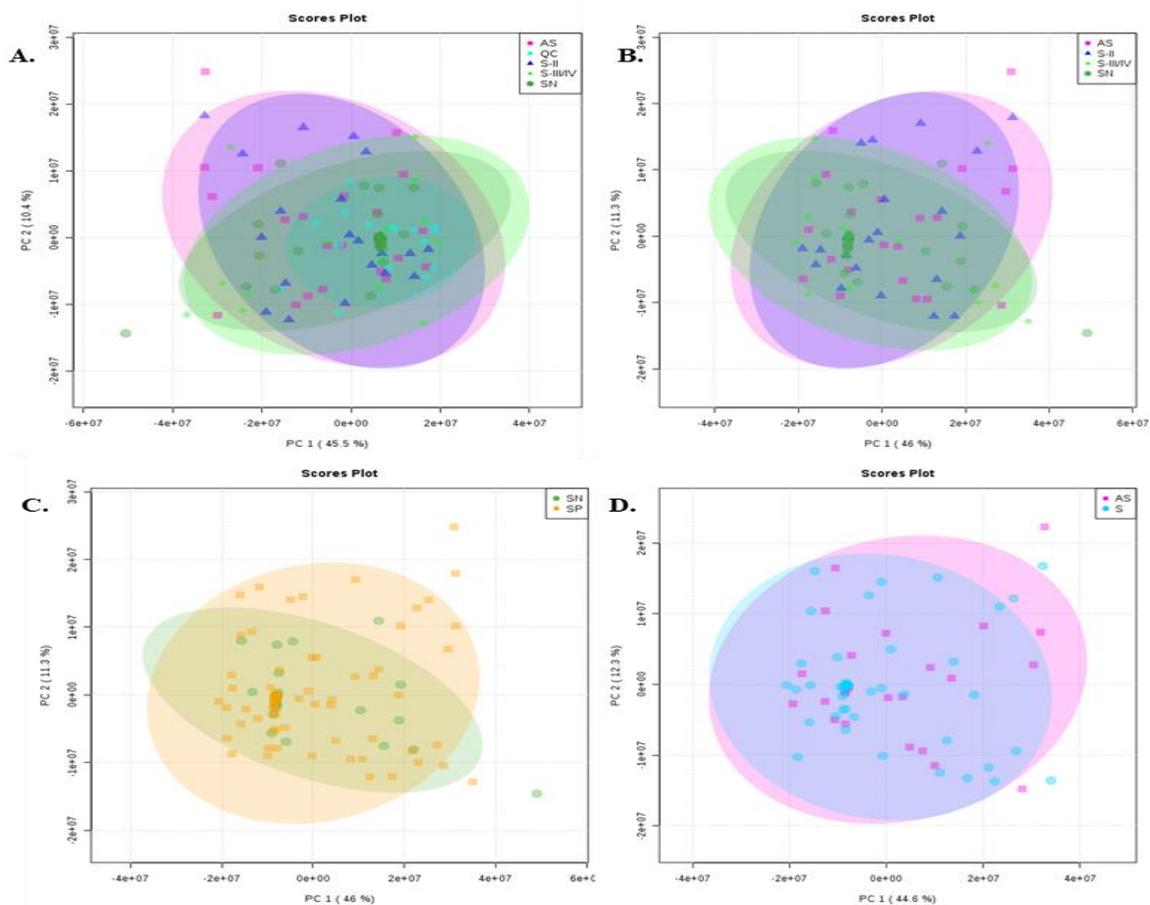
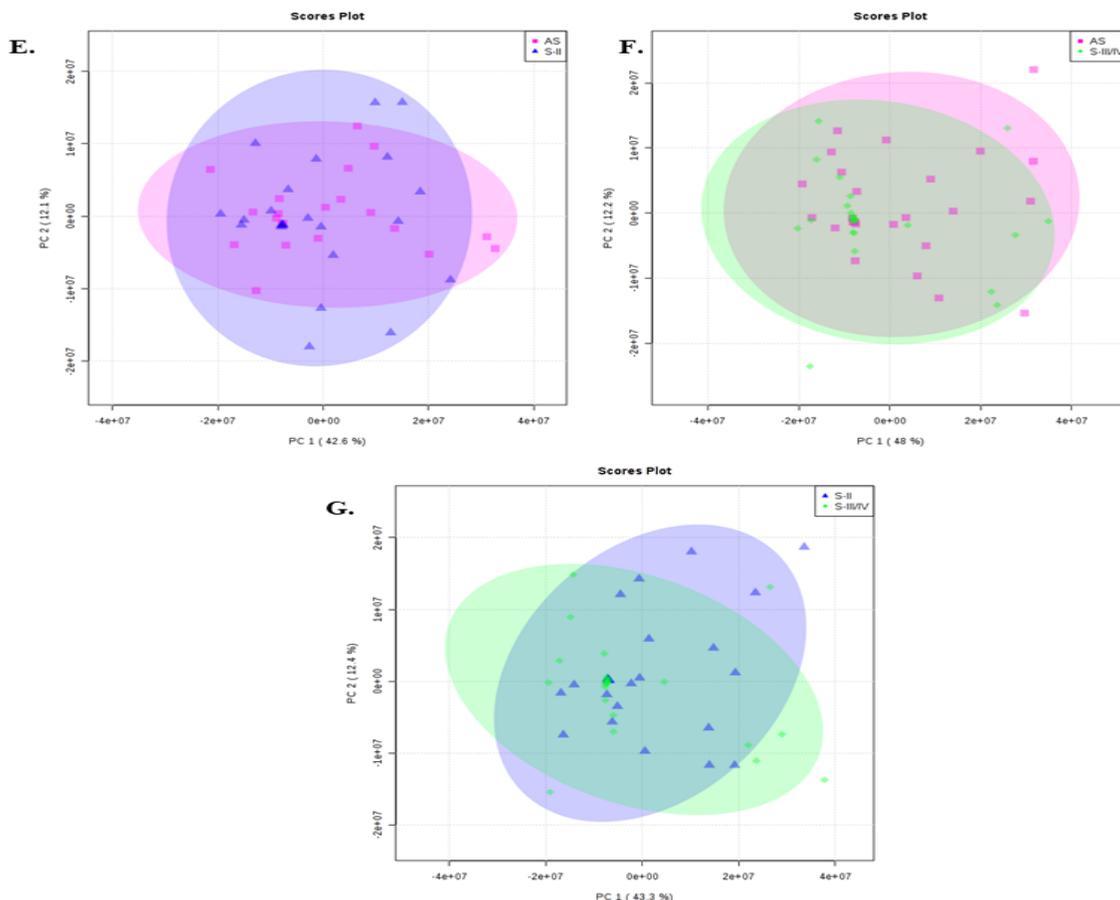


Figura 12.

Resultados del PCA de los grupos analizados en modo negativo. (A) Gráfica de los primeros dos componentes principales del PCA construido con los datos procesados y su elipsis con el 95% de confianza de todos los grupos analizados incluidas las muestras QC. (B) Gráfica de los primeros dos componentes principales del PCA de los grupos analizados SN, AS, S-II y S-III-IV. (C-G) Gráfica del modelo de PCA para SP vs SN (C), AS vs S (D) AS vs SII (E) AS vs SIII-IV (F) y SII vs SIII-IV (G). SN están presentados como círculos verdes, las muestras QC como círculos celestes, pacientes AS como cuadrados rosados, pacientes S-II como triángulos azul rey y pacientes S-III-IV como rombos verdes.





13.3.2 Análisis Discriminante por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA) y Proyecciones Ortogonales para Análisis Discriminante de Estructuras Latentes (OPLS-DA)

Con el fin de obtener una mejor separación de los grupos asintomáticos vs sintomáticos y facilitar la identificación de las variables, se realizaron dos análisis supervisados (PLS-DA y OPLS-DA) para cada grupo. La principal ventaja de estos métodos quimiométricos es el manejo de datos altamente colineales y ruidosos, características comunes de los datos metabólicos. Adicionalmente, permite identificar rápidamente los biomarcadores usando herramientas estadísticas como el VIP.

Los resultados mostraron que los grupos se separaron basados en las diferencias metabólicas en los dos modos de ionización (Figura 13 y Anexo 3). En cuanto a los resultados de validación cruzada obtenida para la separación, los modelos mostraron una mediana capacidad de ajuste y capacidad predictiva indicada por los parámetros R^2Y y $Q^2 > 0,2$ en cada comparación, a excepción de la comparación SII vs SIII-IV (Figura 13E, J).

Figura 13.

Gráfica del modelo PLS-DA y OPLS-DA de los grupos analizados en modo positivo. (A-D)

Gráfica del modelo de PLS-DA para AS vs S (A), AS vs S-II (B), AS vs SIII-IV (C), S-II vs SIII-IV

(D). (E-H) Gráfica del modelo de OPLS-DA para AS vs S (E), AS vs S-II (F), AS vs SIII-IV (G) y

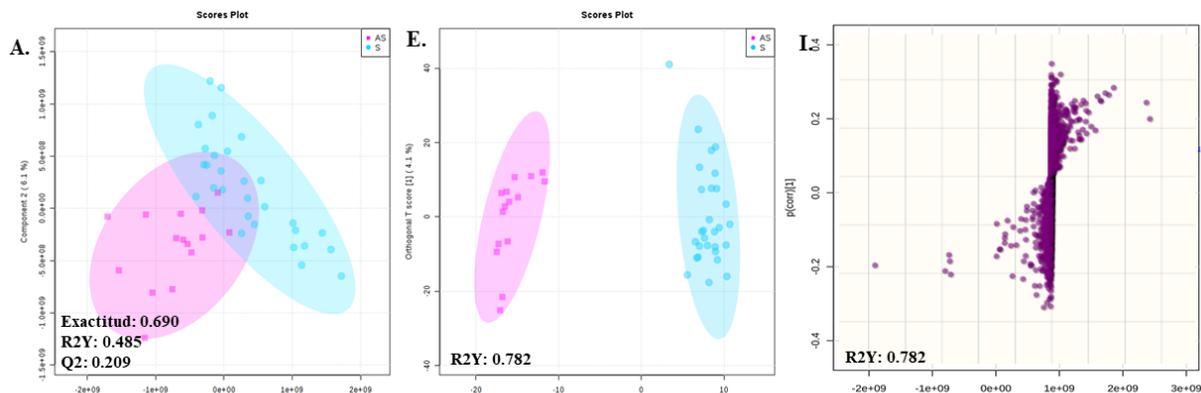
S-II vs SIII-IV (H). (I-L) Gráfica S del modelo ortogonal para AS vs S (I), AS vs S-II (J), AS vs

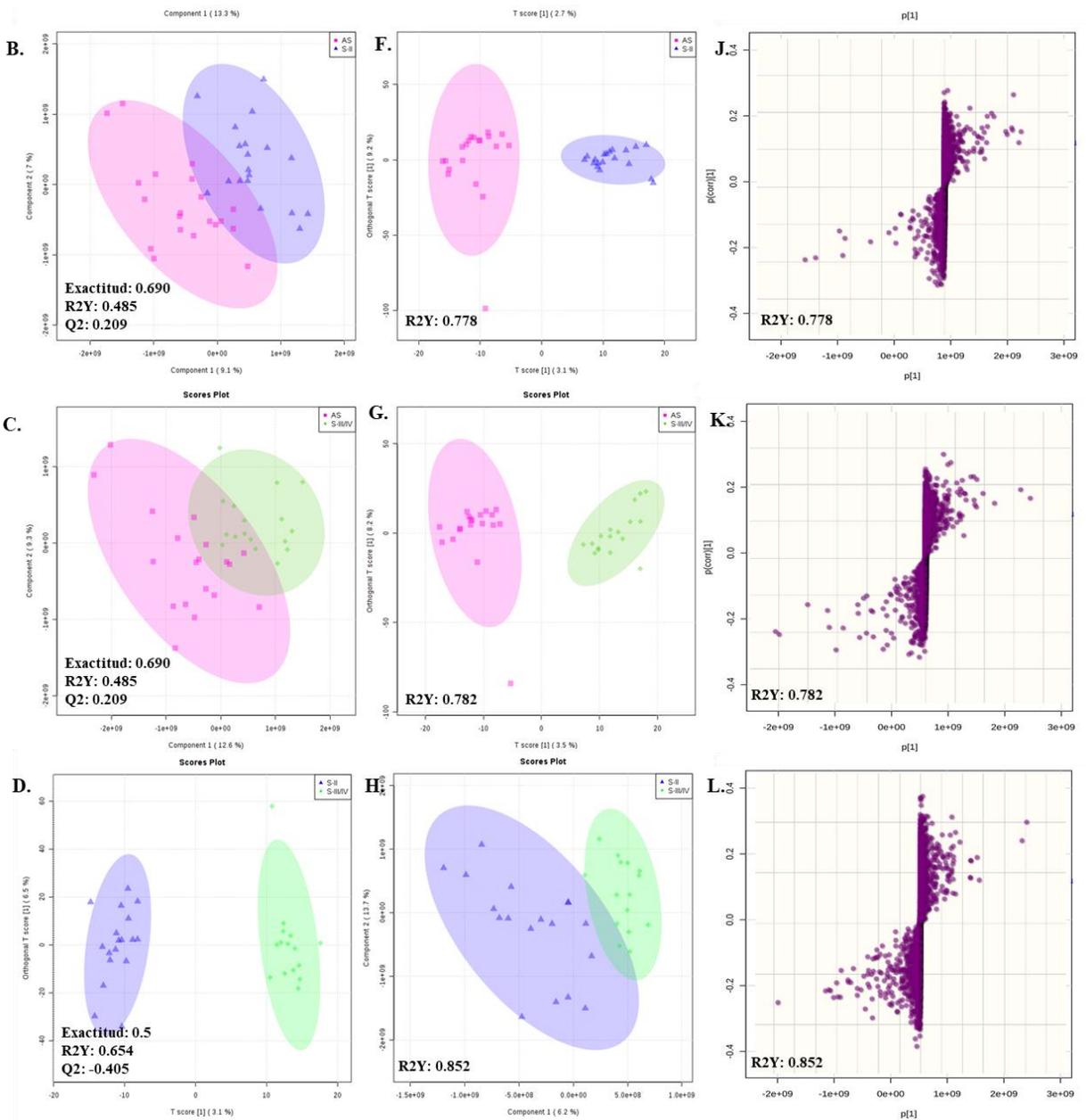
SIII-IV (K) y S-II vs SIII-IV (L). S como círculos celestes, pacientes AS como cuadrados rosados,

pacientes S-II como triángulos azul rey y pacientes S-III-IV como rombos verdes. Los criterios

de evaluación del PLS-DA y OPLS-DA (R^2X , R^2Y , Q^2) son presentados para cada modelo,

todos los gráficos presentan elipsis con el 95% de confianza.





13.3.3 Metabolitos alterados y vías metabólicas implicadas

Las variables confirmadas como potenciales biomarcadores se detectaron con un valor de VIP >1,0 y $p < 0,05$ mostrando alta relevancia para explicar las diferencias entre los grupos analizados. 16 metabolitos fueron detectados y anotados con las bases de datos, en la comparación

entre S-II vs AS y 21 en la comparación S-III-IV vs AS. La gráfica Volcano del modelo estadístico de regresión vs el log-2 del “fold change” está representado en la Figura 15. Los resultados de los metabolitos detectados en los grupos analizados se observan de forma resumida en la Tabla 4 y completa en el Anexo 4. La ECh estuvo altamente asociada con altos niveles de fosfatidilserina (24:1), gangliósido GM2 (d18:1) y fenilalanilriptófano (SN vs SP), mientras que un perfil general desregulado en el metabolismo de los lípidos entre los pacientes sintomáticos en los diferentes grados de la enfermedad (SII, SIII-IV) respecto a los pacientes asintomáticos, presentaron las diferencias más notables (Anexo 4, Figura 16 y 17), estos hallazgos son congruentes con análisis metabolómicos previos en enfermedades crónicas (Mendes-Frias *et al.*, 2020). Entre los metabolitos lipídicos más notables entre los grupos, se encuentran: lisofosfolípidos (LysoPC), gangliósidos (GM), ácido lisofosfatídico (LysoPA), triglicéridos (TG), carnitinas, fosfatidiletanolamina (PE), glicerofosfolípidos (GPC), metabolitos del glicerol, entre otros. De acuerdo con la gráfica de enriquecimiento, los metabolitos detectados participan principalmente en vías metabólicas implicadas en la biosíntesis de fosfolípidos, metabolismo de glicerolípidos, biosíntesis de novo de triglicéridos, vía del glicerol fosfato y biosíntesis de carnitinas.

Otros cambios significativos incluyeron un alto nivel del aminoácido N-Lactoilfenilalanina en los grados tardíos de la enfermedad, así como, niveles bajos de adenosin octofosfato y N-palmitoiltaurina entre las comparaciones SIII-IV vs SII. Estos hallazgos también corroboran que el enfoque de la metabolómica no dirigida ofrece un potencial para el descubrimiento de nuevos biomarcadores para la ECh.

Figura 14.

Gráfica Volcano de los grupos analizados en modo positivo. (A-E) Gráfica Volcano para AS vs S (A), AS vs S-II (B), AS vs SIII/IV (C) y S-II vs SIII/IV (D). Gráfica Volcano de los grupos analizados en modo negativo (E-H) Gráfica Volcano para AS vs S (E), AS vs S-II (F), AS vs SIII/IV (G) y S-II vs SIII/IV (H).

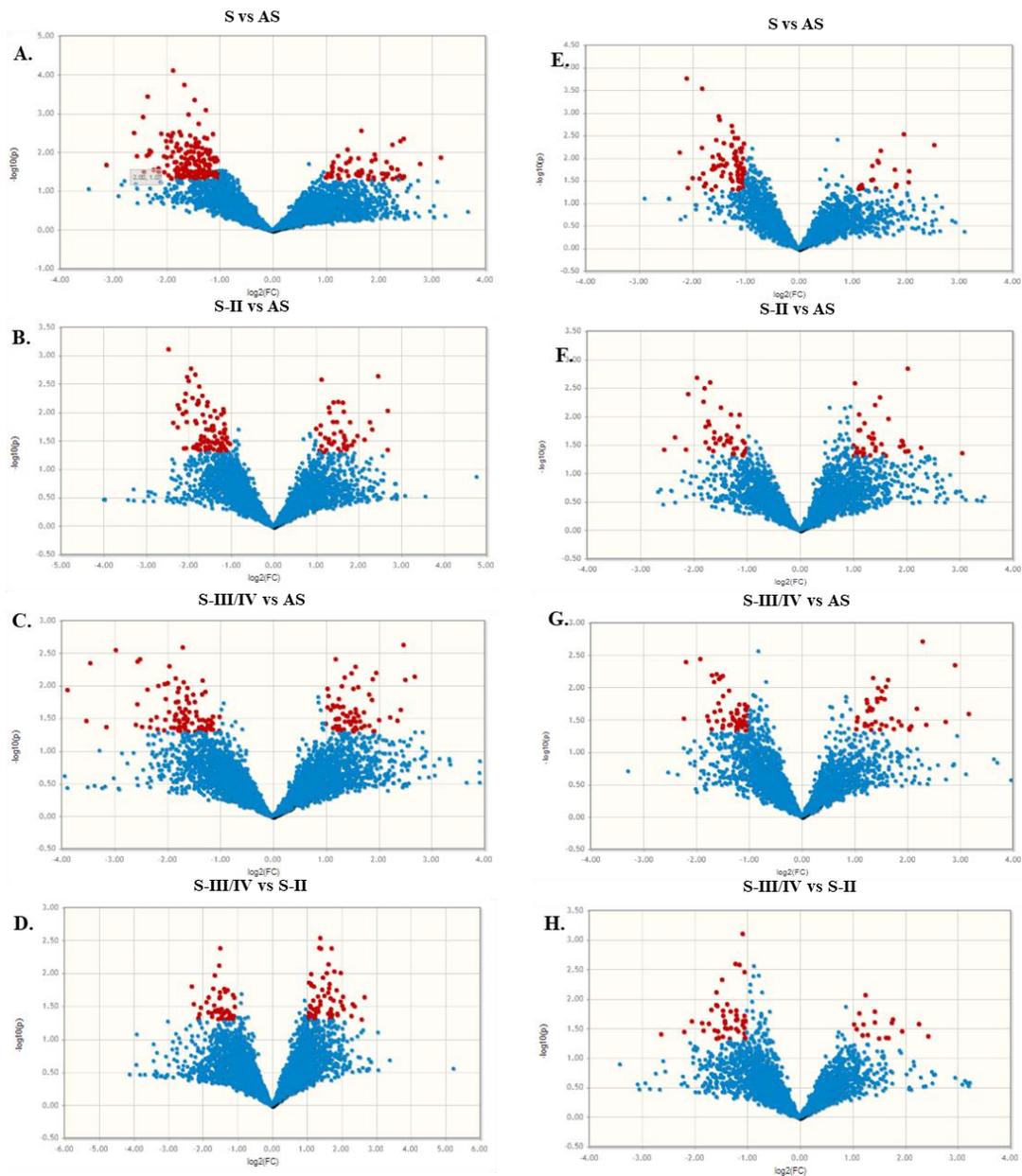


Tabla 5.

Metabolitos detectados en el suero de los grupos de pacientes S vs AS, S-II vs AS, SIII-IV vs AS y SIII-IV vs SII analizados usando HPLC-ESI-IT-MS.

ID ^a	Metabolito	Sigla	Modo de ionización	m/z	RT (min)	Fórmula	Regulación	Log Fold Change	VIP ^b	valor de P
S vs AS										
32527	Gangliósido GM1 (18:1)	GM1 (18:1)	+	782.462	16.15	C73H131N3O31	down	-2.4274	2.242	0.0012053
3873	1-estearoilglicerofosfoglicerol	1-estearoilglicerofosfoglicerol	+	530.35	8.67	C24H49O9P	up	2.2366	7.589	0.023879
3119	2beta-hidroxitestosterona	SM(d18:0/24:1)	+	609.415	6.16	C19H28O3	up	2.3528	1.8514	0.026958
4151	Triglicérido de ácido monoarácídico (22:1)	TG(22:1)	+	963.82	7.12	C66H110O6	down	-1.8004	1.8091	0.04205
S-II vs AS										
35497	Lisofosfolípido (16:1)	LysoPC(16:1)	+	987.67	11.09	C24H48NO7P	down	-2.458	1.5022	0.0007666
3873	1-estearoilglicerofosfoglicerol	1-estearoilglicerofosfoglicerol	+	530.35	8.67	C24H49O9P	up	1.979	6.8352	0.025486
S-III/IV vs AS										
32527	Gangliósido GM1 (18:1)	GM1 (18:1)	+	782.462	16.15	C73H131N3O31	down	-2.2446	2.2773	0.0011509
11804	Glicerofosfolina	GPC	+	515.215	10.86	C8H20NO6P	down	-2.0392	4.6895	0.0092893
17616	Cardiolipina (8:0)	CL (8:0)	+	564.343	6.31	C51H98O17P2	down	-3.8777	16.097	0.011469
4769	Histidinil-prolina	Histidinil-prolina	+	546.29	11.58	C11H16N4O3	down	-2.5573	4.7356	0.018929
9315	Triglicérido de ácido monodocosahexaenoico (22:6)	TG (22:6)	+	987.699	11.29	C69H98O6	down	-2.1763	1.1318	0.02424
7092	Fosfatidilserina (18:3)	PS (18:3)	+	744.477	17.29	C39H70NO10P	down	-1.8489	1.4084	0.033144
15126	Monoradigliceroles (0:0)	MG (0:0)	+	783.699	6.24	C24H48O4	down	-2.0589	6.5831	0.04566
16050	Fosfatidilserina (24:0)	PS (24:0)	+	1042.84	6.73	C54H106NO10P	up	1.5285	1.1553	0.047432
S-III/IV vs SII										
22775	N-lactoilfenilalanina	N-lactoilfenilalanina	+	516.233	11	C12H15NO4	up	1.65	1.6132	0.016589
21436	Postina	Postina	+	496.335	7.95	C22H40N8O5	up	2.6745	13.62	0.022708
24477	Octafofato de adenosina	AP8A	-	1268.91	15.47	C20H32N10O31P8	down	-1.4114	1.6095	0.025435
7870	Lisofosfolípido (P-16:0)	LysoPC(P-16:0)	+	986.675	11.05	C24H50NO6P	up	1.7801	3.8044	0.025457
50	Gangliósido GD2 (d18:0/14:0)	Ganglioside GD2 (d18:0/14:0)	-	808.903	15.5	C75H133N3O34	down	-1.5424	10.38	0.034779
6253	Triglicérido de ácido monoarácídico	TG(20:4)	-	851.665	9.93	C57H90O6	up	1.6907	1.228	0.044658
23598	N-palmitoiltaurina	N-palmitoiltaurina	+	432.236	5.9	C18H37NO4S	down	-2.1173	2.9116	0.047138

^a ID es el número de identificación que fue asignado por el software MzMine 2 en el pre-procesamiento de los datos. ^b VIP es la variable de importancia en el proyecto, su valor por encima de 1.0 muestra la relevancia del metabolito para explicar las diferencias entre los grupos.

Figura 15.

Gráfica Heat map de los grupos analizados. (A) Gráfica Heat map para AS vs S (A), AS vs SIII/IV (B), AS vs S-II (C) y S-II vs SIII-IV (D).

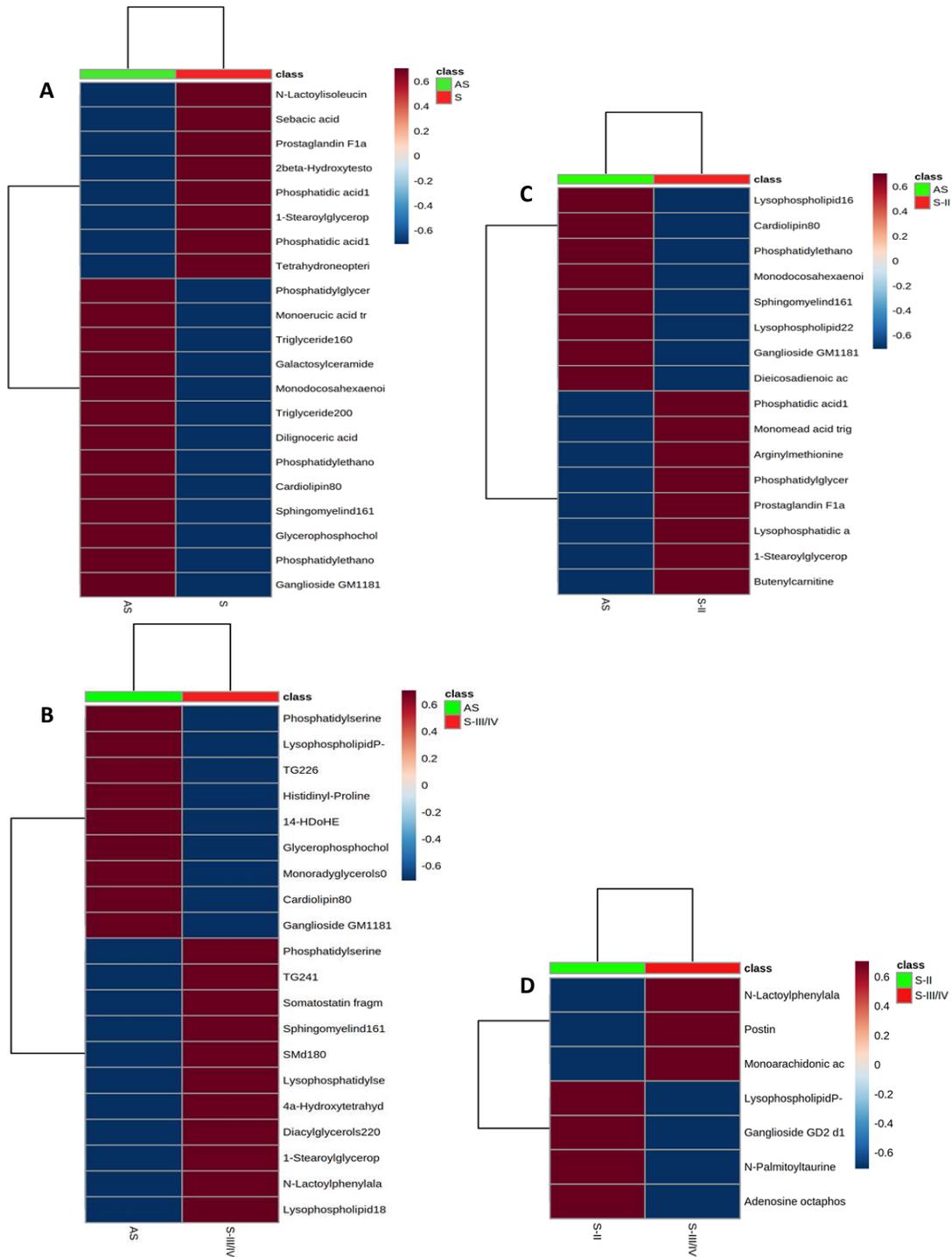
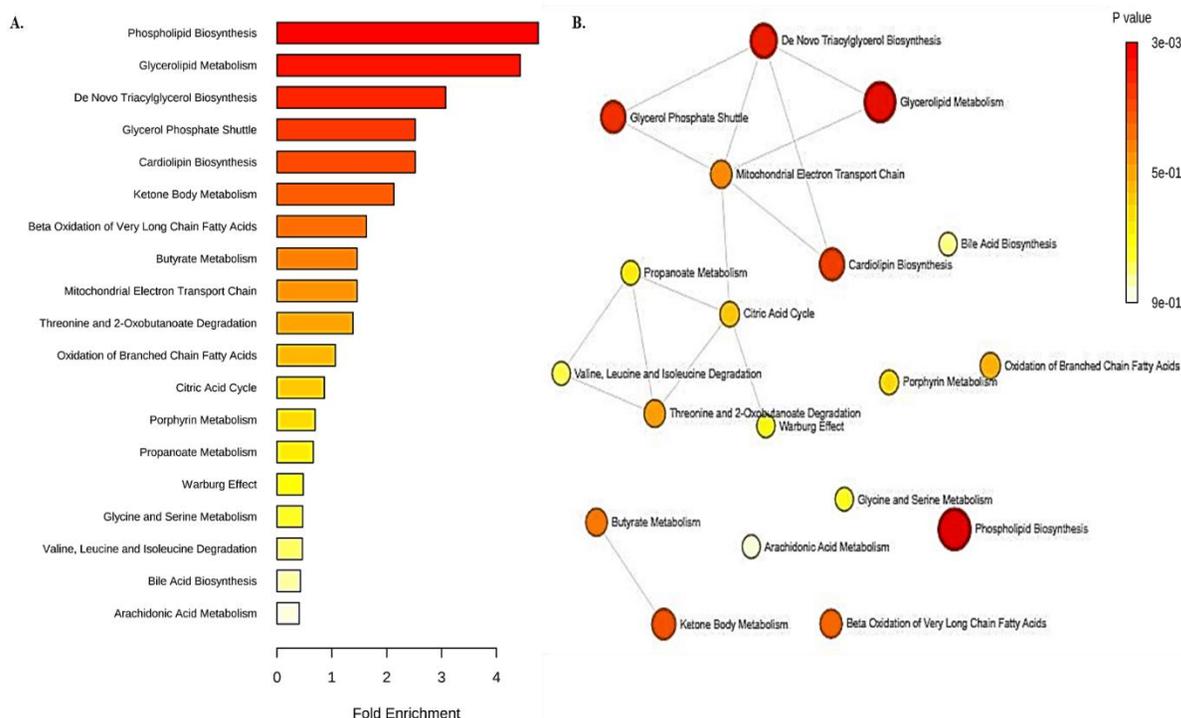


Figura 16.

(A-B) Gráfica de enriquecimiento y red de enriquecimiento de los grupos analizados.



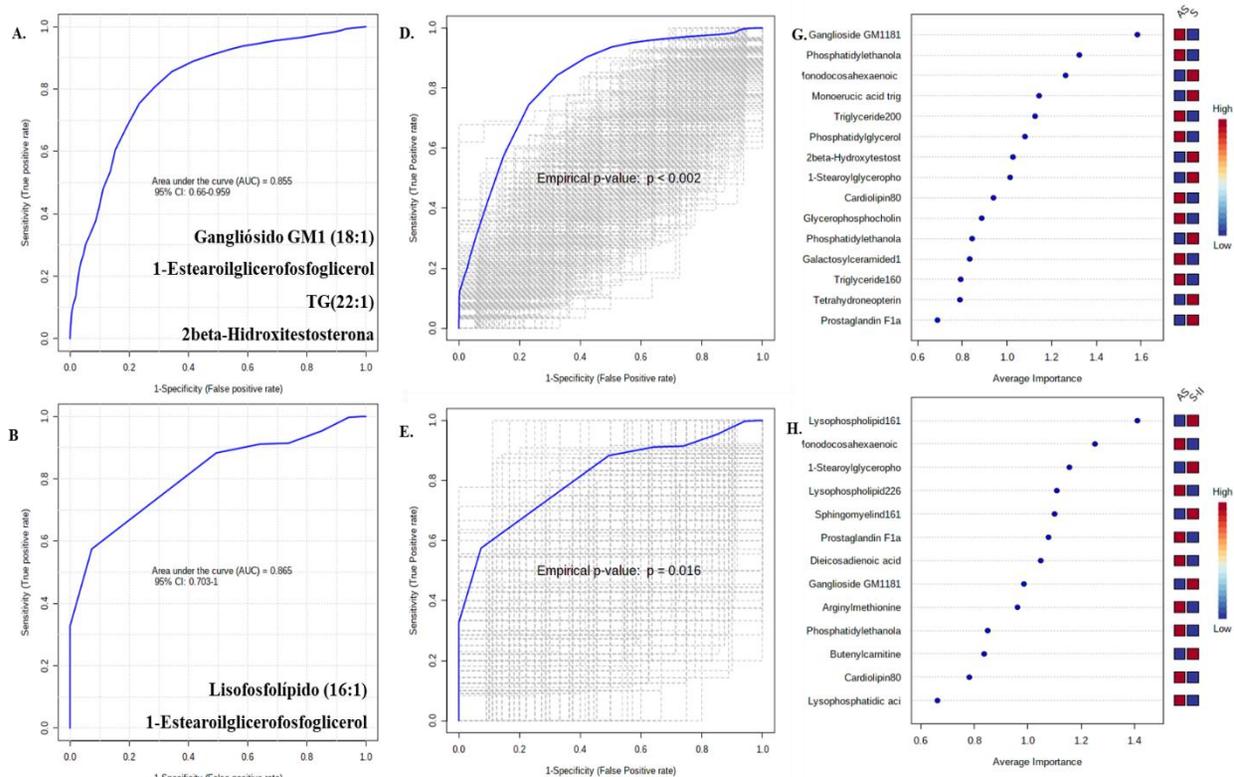
13.3.4 Gráficas ROC

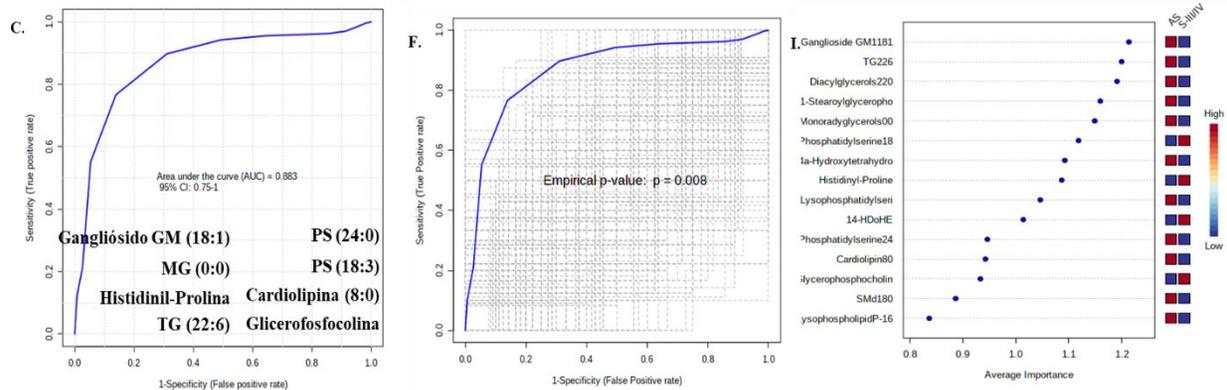
Con el fin de evaluar el potencial de los metabolitos anotados como biomarcadores para los pacientes SII o SIII-IV vs AS, curvas ROC fueron graficadas por metabolito para cada grupo de comparación. Los metabolitos con los valores más altos de AUC fueron subsecuentemente incorporados en una prueba de evaluación del modelo basado en la curva ROC (Tester). Gangliósido GM1 (18:1), 1-estearoilglicerofosfoglicerol, TG (22:1) y 2beta-hidroxitestosterona fueron los metabolitos individuales con la mejor capacidad de clasificación entre AS vs S, que fue considerablemente mejorado por su inclusión en el análisis Tester (AUC: 0,855 CI: [0,66-0,959]). Lisofosfolípido (16:1) y 1-estearoilglicerofosfoglicerol mostraron potencial para discriminar los

pacientes S-II de AS, mejorados en el análisis en conjunto (AUC: 0,865 CI: [0,703-1,0]). En la comparación SIII-IV vs SII, los metabolitos gangliósido GM1 (18:1), MG (0:0), Histidil-prolina, TG (22:6), PS (24:0), PS (18:3), cardiolipina (8:0) y glicerofosfocolina, en conjunto, clasificaron con mayor eficiencia los grupos (AUC: 0,883 CI: [0,75-1,0]) (Figura 18).

Figura 17.

Análisis de biomarcadores (A-C) Curvas ROC y AUC fueron realizadas por grupos de metabolitos por cada grupo de comparación (A) S vs AS (B) S II vs AS (C) S III-IV vs AS. (D-F) Análisis de permutación por 500 veces del AUC de los conjuntos de metabolitos con mayor rendimiento. Todos los análisis dieron una $p < 0.05$. (G-I) Media de la importancia de los metabolitos para clasificar las comparaciones realizadas.





14. Discusión

La ECh es un problema de salud pública a nivel mundial. Presenta alta morbilidad y mortalidad generando graves implicaciones clínicas a largo plazo. La CCC es la manifestación clínica más grave de la fase crónica y tiene peor pronóstico respecto a cardiopatías de diferente etiología. Hasta el momento, no existe tratamiento terapéutico específico para prevenir o tratar la CCC y el tratamiento actual para la ECh, es altamente tóxico sin evidencia clínica de su efectividad en la fase crónica. A pesar de los estudios que se han realizado, no existen biomarcadores específicos que permitan tener de forma rápida una aproximación del grado clínico que presenta el paciente o predecir el riesgo a desarrollar CCC durante la fase asintomática, pasos críticos para la prevención y tratamiento de la CCC.

En los últimos años los avances tecnológicos han permitido la búsqueda de biomarcadores para el diagnóstico y progresión de diferentes enfermedades (Hasin et al., 2017; Kao et al., 2017; Rotroff y Motsinger-Reif, 2016; Jacob *et al.*, 2019). En este proyecto de grado investigamos por

medio de un enfoque de metabolómica no dirigida, el cambio en suero del perfil metabólico acorde al grado de CCC (AS, S-II, S III-IV), utilizando HPLC-ESI-IT-MS. Se evaluaron un total de 100 individuos distribuidos de manera equitativa en cuatro grupos. Aunque se podría pensar que es un número bajo de muestras, diferentes estudios concuerdan que, debido a la alta complejidad de los datos, no existe hasta ahora un método estadístico para el cálculo del tamaño muestral (Wei *et al.*, 2013). Por lo general, la cantidad de individuos por grupo de comparación utilizado en este estudio es semejante a los utilizadas en diferentes investigaciones (Gironès *et al.*, 2014; Lizardo *et al.*, 2019; Hasin *et al.*, 2017; Kao *et al.*, 2017).

En cuanto a las variables clínicas, un factor relevante a considerar en este tipo de investigaciones es la adecuada selección de los controles, en este sentido, en nuestro estudio la edad media de los individuos en todos los grupos es mayor a 50 años, por lo cual, es una ventaja tener pacientes asintomáticos de edad avanzada y asegurar, de esta forma, su caracterización como individuos control. Adicionalmente, se seleccionaron individuos de la misma zona geográfica, para así, asegurar condiciones genéticas, socioeconómicas y ambientales similares. Los individuos seropositivos fueron evaluados con los mismos parámetros clínicos, electrocardiográficos y por el mismo cardiólogo. A su vez, se seleccionaron individuos con variables homogéneas entre las poblaciones, para minimizar al máximo los posibles factores de confusión y que los cambios metabólicos hallados sean consecuencia del grado de CCC de los pacientes.

Por otra parte, teniendo en cuenta que no todas las moléculas se ionizan de la misma forma, la obtención de los datos por ESI-IT-MS en los modos de ionización positivo y negativo, permitió un análisis más completo del metaboloma del suero, dando así, una ventaja adicional a este estudio.

Los resultados fueron comparados por análisis estadísticos multivariantes y visualizados en gráficas PCA, PLS-DA y OPLS-DA. En los análisis multivariantes el valor de Q^2 no tiene un

estándar de comparación o valor crítico que infiera un valor significativo, tiene un valor máximo teórico de 1 y un valor aceptable inferido empíricamente para un modelo biológico $\geq 0,4$. Asimismo, aunque no es estrictamente una medida de validación cruzada, el valor R^2 de un modelo dado, puede usarse para evaluar el grado de ajuste a los datos, aunque, igual que el valor Q^2 no tiene un dato estándar de comparación (Worley y Power; 2013). Nuestros resultados mostraron valores R^2 y $Q^2 > 0.2$ en cada comparación y los valores fueron cercanos entre los dos parámetros, a excepción de la comparación S III-IV vs SII. Se considera que estos valores cercanos entre Q^2 y R^2 son un indicador de un ajuste correcto del modelo en el análisis supervisado.

Encontramos que los metabolitos anotados contribuyeron a las diferencias entre los grupos analizados y fueron asociados en su mayoría con alteraciones en el metabolismo lipídico, a su vez, el análisis de enriquecimiento reveló las vías moduladas diferencialmente en los grupos analizados. La biosíntesis de fosfolípidos, metabolismo de glicerolípidos, biosíntesis de *novo* de triacilglicerol, fueron las vías más significativas y diferenciadas en el suero de los pacientes incluidos en el estudio ($p < 0,001$). Hasta ahora, es la primera aproximación para obtener el perfil metabólico en suero de pacientes con diferentes grados de CCC que revela alteraciones significativas en el patrón de metabolitos, permitiendo de esta forma, reflejar la dinámica en las vías metabólicas.

Los lípidos son fundamentales para la homeóstasis celular. Actúan en diferentes procesos como: tráfico de moléculas entre membranas, acción como segundos mensajeros, mantenimiento de las reservas energéticas y desempeñan un rol fundamental para mantener la arquitectura celular (Maxfield y Tabas., 2005). Se conoce que el metabolismo de los lípidos perturba directamente los procesos inflamatorios, por tanto, su alteración subyace a la etiología de diferentes enfermedades, incluidas las enfermedades crónicas, autoinmunes, cáncer, hipertensión, arterosclerosis, cardiovasculares, entre otras (Jury *et al.*, 2007; Maxfield y Tabas., 2005; Anand *et al.*, 2020). En

ECh, varios estudios indican que la CCC está asociada con una lipidopatía cardíaca y que, tanto el tejido adiposo como la lipotoxicidad cardíaca, juegan un papel importante en la patogénesis de la enfermedad (Lizardo *et al.*, 2018; Zaki *et al.*, 2020; Nagajyothy *et al.*, 2014; Lizardo *et al.*, 2017). Nagajyothy y col. observaron que una dieta alta en grasa en modelo murino protegió a los ratones del daño cardíaco inducido por la infección por *T. cruzi* en fase aguda. En contraste, Lizardo y col. observaron que, esta dieta en modelo murino en fase crónica perturbó el metabolismo lipídico y junto con la inducción de estrés oxidativo, exacerbó la patología cardíaca con agravamiento de la lipotoxicidad cardíaca, acumulación cardíaca y vascular de gotas lipídicas y dilatación vascular. Así mismo, genes que codifican apolipoproteínas (Apo) y genes que regulan el metabolismo del colesterol y ácidos grasos se vieron alterados en ratones infectados vs ratones control. Por ende, estos datos sugieren que la infección por *T. cruzi* y la dieta, alteran la homeostasis lipídica, que junto con la inflamación y el estrés oxidativo contribuyen a los eventos observados en la CCC.

Así mismo, los cambios en el perfil metabolómico en hospedero murino infectado con *T. cruzi* fueron demostrados durante la fase aguda y fase crónica de la enfermedad por diferentes estudios (Gironès *et al.*, 2014; Lizardo *et al.*, 2019). Las alteraciones metabólicas halladas durante la fase aguda no son extrapolables para evaluar la fase crónica y, por tanto, no serán discutidas en este trabajo, sin embargo, Lizardo y col. realizaron metabolómica dirigida en suero de ratones infectados con *T. cruzi* en fase crónica sometidos a dieta rica en grasa, dieta rica en carbohidratos y sin alteración en la dieta, demostrando diferencias significativas en niveles de metabolitos lipídicos entre los ratones infectados vs no infectados, siendo incluso más evidente en los ratones sometidos a las diferentes dietas. Alteraciones en los niveles de esfingomielinas (SM16:1, SM18:0), lisofosfolípidos (LysoPC16:1, LysoPC18:1) y carnitinas (ButenilcarnitinaC4, propionilcarnitina C3), se hallaron asociados con la CCC tanto en el estudio de modelo murino

como en nuestro estudio, con el mismo sentido de mayor o menor presencia para cada metabolito. Encontrándose niveles aumentados significativamente de SM18:0 y ButenilcarnitinaC4, mientras que, se identificaron niveles disminuidos significativamente de SM16:1, propionilcarnitina C3, LysoPC16:1 y LysoPC18:1. Estas alteraciones observadas podrían estar relacionados con la patología cardíaca desencadenada en la fase crónica de la infección.

Para cubrir los requerimientos energéticos necesarios, el cuerpo oxida cantidades considerables de lípidos adicionales a la glucosa. La cantidad alterada de carnitinas C3 y C4 en suero de pacientes SP vs SN y S-II vs SI, de acuerdo con reportes realizados en modelo murino infectado con *T. cruzi*, puede atribuirse a bajos niveles de oxidación de ácidos grasos (Lizardo *et al.*, 2019). Cuando la oxidación de los ácidos grasos no ocurre correctamente, las grasas liberadas del tejido adiposo no se pueden oxidar y se acumulan en órganos como los músculos esquelético y cardíaco, lo que deteriora su función (Longo, Frigeni y Pasquali., 2016; Hoppel., 2016). Estos resultados son confirmados por la disminución en el metabolismo de carnitinas en tejido cardíaco de pacientes con ECh en grado III-IV en relación con pacientes seronegativos (Díaz *et al.*, 2018).

Igualmente, niveles alterados de glicerofosfolípidos (fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina), TAG, LysoPA y GM fueron anotados significativamente entre los diferentes grados de la fase crónica. El metabolismo de los glicerofosfolípidos fue una de las vías metabólicas con más significancia en el suero de los pacientes positivos en los diferentes grados de la enfermedad. La disminución de glicerofosfolípidos en los pacientes con CCC, observado en nuestros resultados, podría estar relacionado con su metabolización. El papel de monocitos y linfocitos se han relacionado como parte importante en la respuesta inmune inflamatoria durante la CCC. Nuestros resultados muestran una desregulación en el metabolismo de los glicerofosfolípidos que podrían estar contribuyendo al fenotipo inflamatorio en células de la

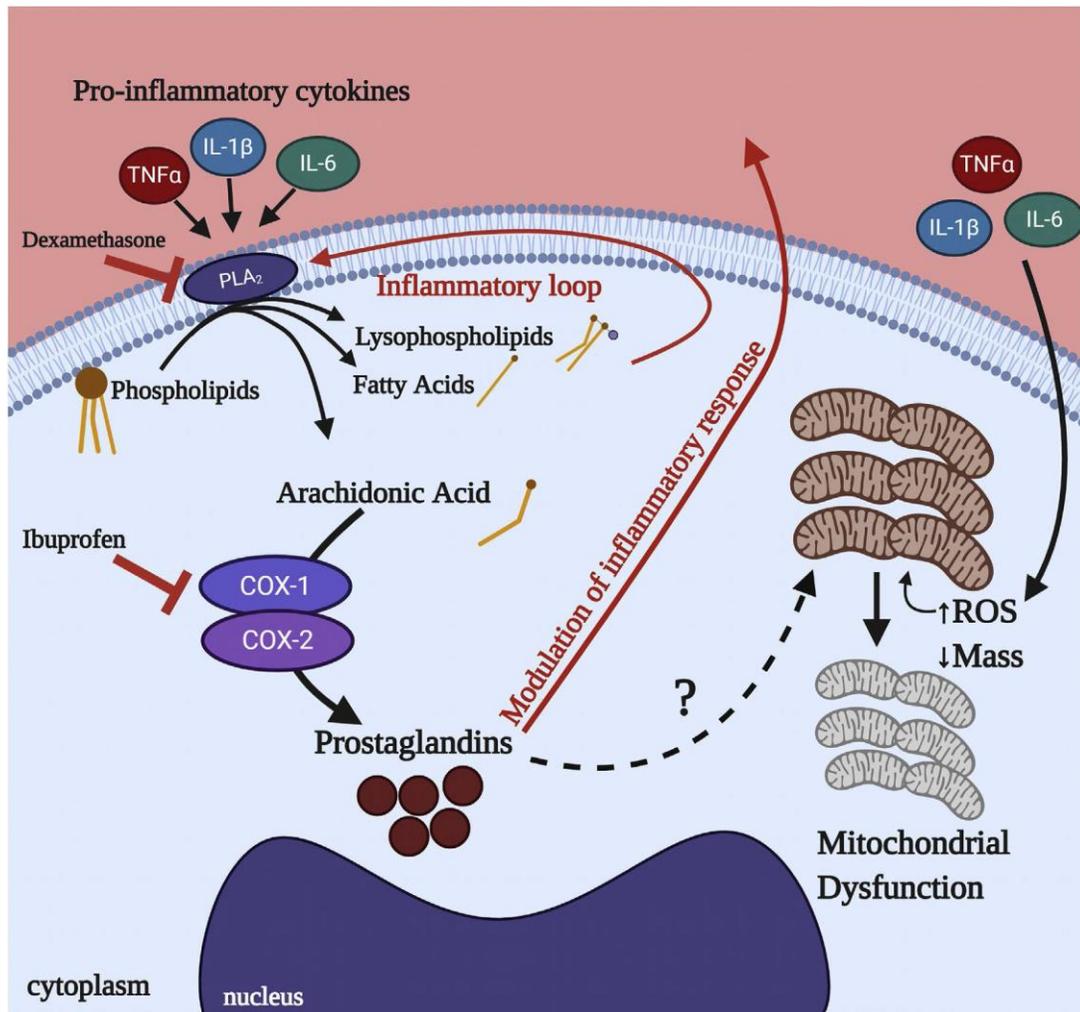
respuesta inmune. Estudios han demostrado que la activación de esta vía produce ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), ácidos grasos omega 3 y 6 y ácido araquidónico (Stephenson *et al.*, 2017). Algunos de estos lípidos pueden ser metabolizados en mediadores que participan en la señalización proinflamatoria. En ambientes proinflamatorios, citoquinas inducen la participación de las enzimas fosfolipasas A2 (PLA2) en la membrana celular de células de la respuesta inmune donde se encuentran los glicerofosfolípidos, ocasionando su metabolización. Los glicerofosfolípidos se activan y convierten en PUFAs produciendo oxilipinas, que conducen hacia procesos inflamatorios (Hirano *et al.*, 2019; Mendes-Frias *et al.*, 2020).

Así mismo, evidencias han demostrado que el calcio y citoquinas proinflamatorias tales como IL1 y TNF- α contribuyen a la inducción de PLA2 y su acción se mantiene a través del tiempo, convirtiéndose en uno de los procesos más significativos que conduce a necrosis en fibras musculares (Gati *et al.*, 2007; Whitehead *et al.*, 2005; Hoxha., 2018). Evidencias en isquemia cardiaca aguda sugieren que la hidrólisis excesiva de glicerofosfolípidos de membrana por PLA2 conducen a taquiarritmias ventriculares malignas (D'Souza, Nzirorera y Kienesberger., 2016). Así mismo, la acción de PLA2 sobre los glicerofosfolípidos promueve la liberación de lisofosfolípidos, ácidos grasos y ácido araquidónico, este último ha sido relacionado como parte fundamental en procesos proagregantes e inflamatorios, activando factores moduladores de la cascada inflamatoria como NF-kB (Wang *et al.*, 2019; Gai *et al.*, 2018) y desencadenando la producción de prostaglandinas por la ciclooxigenasa-2 (Figura 19). Se ha confirmado que el ácido araquidónico también puede influir en la presentación clínica de diferentes enfermedades cardiovasculares mediante la generación de eicosanoides via lipooxigenasas, ciclooxigenasas y citocromo P450. La vía de señalización de eicosanoides cardiacos desempeña un rol importante en las funciones fisiopatológicas al activar los canales iónicos y las proteínas quinasas y está implicado con el

infarto de miocardio, el remodelamiento hipertrófico y la arritmogénesis (D'Souza, Nzirorera y Kienesberger., 2016; Nelson y Raskin., 2019).

Figura 18.

Modelo de metabolización de glicerofosfolípidos en células de la respuesta inmune.



Nota. Tomado de: Mendes-frias *et al*, 2020.

A nivel estructural, se conoce que las membranas biológicas presentan una composición heterogénea de fosfolípidos a través de diferentes tipos de células y tejidos e incluso en diferentes

ubicaciones subcelulares, lo cual es importante para mantener la homeostasis celular. Entre los cuatro fosfolípidos principales se encuentran la fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS) y esfingomielina (SM). La fosfatidiletanolamina comprende del 20 al 50% de los fosfolípidos totales siendo el segundo más abundante en las células de mamíferos, mientras que la fosfatidilserina representa un menor porcentaje (2 al 10%) (Elvas, Stroobants y Wyffels., 2017). La pérdida de homeóstasis de lípidos en la membrana plasmática se ha involucrado en procesos fisiopatológicos como apoptósis y necrosis. La PE parece jugar un papel importante en el tejido cardíaco. Las enfermedades cardiovasculares se caracterizan por un aumento de los niveles de muerte celular después de una lesión cardíaca, la PE se exterioriza a la parte externa de las membranas sarcolémicas y a medida que avanza la lesión, la pérdida de la estabilidad en la bicapa da lugar a muerte celular y daños en los miocitos cardíacos (Musters *et al.*, 1993; Post *et al.*, 1993; Elvas, Stroobants y Wyffels., 2017). Así mismo, la abundancia relativa de PC y PE regula el tamaño y la dinámica de las gotas de lipídicas. En las mitocondrias, los cambios en la relación molar PC/PE afectan la producción de energía y están relacionados con la progresión de enfermedades crónicas (Van der Veen *et al.*, 2017)

Adicionalmente, se hallaron niveles alterados de lisofosfolípidos (LysoPC). LysoPC es una molécula de señalización con acción en diversas funciones biológicas. Participa en la regulación de la proliferación celular e inflamación (Smani *et al.*, 2015). En específico, LysoPC es un factor quimiotáctico que estimula las células inmunes y regula el equilibrio entre las citoquinas antiinflamatorias y proinflamatorias (Mansilla *et al.*, 2009), como la CCC se asocia con manifestaciones inflamatorias, su alteración en las fases graves de la CCC podría relacionarse con las perturbaciones inmunológicas observadas en la ECh.

Otro lípido que es liberado de las células es el ácido lisofosfatídico (LPA) el cual actúa a nivel paracrino y endocrino por medio de la unión a la familia de receptores acoplados a la proteína G. La mayor parte del LPA en sangre es producido por la catabolización del LPC y LPS a través de la lisofosfolipasa D. Cardiomiocitos expresan receptores sarcolémicos a través de los cuales lípidos circulantes como el LPA inducen vías de señalización descendentes a través de receptores acoplados a la proteína G incluyendo PI3K/Akt, adenilil ciclasa cAMP, Ras-p42/p44MAPK, Rho-Rho kinasa, y fosfolipasa C. La activación de estas cascadas de señalización pueden tener efectos importantes en la supervivencia, estructura, función y metabolismo celular. Específicamente, la señalización de LPA se ha implicado en el desarrollo de hipertrofia de cardiomiocitos a través de los receptores LPA1 y LPA3. Además, se ha demostrado que la señalización de LPA altera la contractibilidad de los cardiomiocitos, lo que sugiere que el aumento del LPA circulante, como se observa en nuestros resultados, podría contribuir a la disfunción cardíaca (D'Souza, Nzirorera y Kienesberger., 2016). A su vez, LPA junto con eicosanoides específicos, puede modular la expresión génica por la unión a activadores de transcripción sensibles a lípidos, lo cual, contribuye a la alteración de la homeostasis lipídica y diferenciación celular, atribuido a la progresión de diferentes enfermedades crónicas (Wymann y Schneider., 2008), incluso, se ha sugerido que LPA puede mejorar la expresión de miR23a, un inductor conocido de hipertrofia cardíaca.

Del mismo modo, los resultados revelan una disminución en los TAG en los grupos de sintomáticos en los diferentes grados de la enfermedad. Los TAG son almacenados en tejido cardíaco en gotas citosólicas lipídicas para asegurar su uso en la oxidación mitocondrial. Por consiguiente, la reducción de éstos sugiere su poca participación en el proceso energético, conduciendo hacia una función deteriorada del tejido. La disminución de TAG también se ha confirmado en cardiomiopatía dilatada idiopática (Alexander *et al.*, 2011).

Muestras de suero son tomadas de forma rutinaria en zonas rurales y urbanas para el diagnóstico de la ECh y lo ideal sería identificar un biomarcador que pudiera estratificar la CCC de manera fácil y rápida. Varios biomarcadores fueron encontrados alterados significativamente en los pacientes con grado S II y III-IV en comparación con los pacientes AS. Catorce de ellos tuvieron la capacidad de producir un modelo capaz de estratificar a los pacientes con sintomatología *vs* los pacientes AS, resultado relevante debido a que podrían identificar a los pacientes que comienzan o presentan alteraciones graves asociadas a CCC respecto a los asintomáticos. Como se observa en la curva ROC de la Figura 18, utilizando los modelos de regresión logística, pudimos detectar cambios en los niveles de lisofosfolípido (16:1) y 1-estearoilglicerofosfoglicerol en suero que fueron predictivos de la presencia del grado II de la enfermedad. Seis metabolitos fueron predictivos de la presencia del grado III-IV. El análisis de permutación arrojó resultados significativos entre todas las comparaciones.

15. Conclusiones

Este estudio revela el poder del enfoque de metabolómica no dirigida para identificar biomarcadores en la ECh. Los metabolitos lisofosfolípido (16:1) y 1-estearoilglicerofosfoglicerol tuvieron la capacidad de discriminar entre los pacientes que presentaron CCC grado II, de los pacientes asintomáticos. Por otra parte, los metabolitos GM (18:1), MG (0:0), histidil-prolina, TG (22:6), PS (24:0), PS (18:3), cardiolípidina (8:0) y glicerofosfocolina discriminaron los pacientes con CCC grado III-IV de pacientes asintomáticos.

El hallazgo de metabolitos capaces de discriminar entre los diferentes grados de la ECh prueba la existencia de una firma metabólica y, aunque se centra en una cohorte relativamente pequeña de pacientes, lleva a pensar que, el análisis metabolómico en una muestra no invasiva como el suero, podría ser útil para definir nuevos biomarcadores.

A pesar de los estudios que han sido publicados sobre metabolómica en ECh, hasta donde conocemos, en este trabajo, se presenta por primera vez la exploración de posibles biomarcadores en suero de individuos diagnosticados con ECh y estratificados según el grado de CCC. Son necesarios más estudios para confirmar el potencial de los biomarcadores aquí detectados, que ofrecen, para la ECh el potencial de reemplazar la necesidad de métodos especializados como el ECG, Holter y prueba de esfuerzo, no disponibles por lo general en las zonas más afectadas por la enfermedad. Así mismo, permitirían plantear estrategias de tratamiento individualizadas a cada paciente, optimizando las estrategias para su manejo clínico.

A su vez, estos resultados abren un camino para conocer aún más la fisiopatología de la enfermedad y para identificar vías metabólicas con potencial intervención de manejo terapéutico o farmacológico. A pesar de que el papel de los metabolitos identificados en la patogénesis de la enfermedad sigue siendo especulativo, los resultados que confirman la correlación entre los pacientes y los grados de CCC de las diferentes muestras, avalan la aplicación de este método para dilucidar las alteraciones metabólicas en estas fases.

Sería muy interesante seguir explorando los resultados de este proyecto para confirmar si los metabolitos detectados podrían usarse para estratificar la ECh. Igualmente, en este estudio no se lograron identificar todas las características detectadas; sería útil obtener identificaciones verdaderas de todos los metabolitos observados. Esto podría lograrse utilizando MS/MS o la estrategia de metabolómica dirigida.

Referencias Bibliográficas

- Abel, E. (2011). A new twist in the function of the cardiac lipid droplet. *Nature medicine*, 17(9), 1045.
- Afonso, AM., Ebell, MH., y Tarleton, RL. (2012). A systematic review of high-quality diagnostic tests for Chagas disease. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(11), e1881.
- Alexander, D., Lombardi, R., Rodriguez, G., Mitchell, M., y Marian, A. (2011). Metabolomic distinction and insights into the pathogenesis of human primary dilated cardiomyopathy. *European journal of clinical investigation*, 41(5), 527-538.
- Allman, EL., Painter, HJ., Samra, J., Carrasquilla, M., y Llinás, M. (2016). Metabolomic profiling of the malaria box reveals antimalarial target pathways. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(11), 6635-6649.
- Andrade, J., Neto, M., Antonio, J., Paola, A., Vilas-Boas, F., Oliveira, G., ... y Moreira, M. (2011). I Latin American Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas' heart disease: executive summary. *Arquivos brasileiros de cardiologia*, 96(6), 434-442.
- Antinori, S., Galimberti, L., Bianco, R., Grande, R., Galli, M., y Corbellino, M. (2017). Chagas disease in Europe: a review for the internist in the globalized world. *European Journal of Internal Medicine*, 43, 6-15.
- Antunes, L., Han, J., Pan, J., Moreira, C., Azambuja, P., Borchers, C., y Carels, N. (2013). Metabolic signatures of triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi* unveiled by metabolomics. *PloS one*, 8(10), e77283.

- Araujo, FF., Gomes, JA., Rocha, MO., Williams-Blangero, S., Pinheiro, VM., Morato, MJ., y Correa-Oliveira, R. (2007). Potential role of CD4+ CD25HIGH regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 12, 2797-2806.
- Arneth, B., Arneth, R., y Shams, M. (2019). Metabolomics of Type 1 and Type 2 Diabetes. *International journal of molecular sciences*, 20(10), 2467.
- Ayo, CM., Dalalio, MMDO., Visentainer, JEL., Reis, PG., Sippert, EÂ., Jarduli, LR., ... y Sell, AM. (2013). Genetic susceptibility to Chagas disease: an overview about the infection and about the association between disease and the immune response genes. *BioMed research international*, 2013.
- Barbosa, A., Cardinalli Neto, A., Otaviano, A., Rocha, B., y Bestetti, R. (2011). Comparison of outcome between Chagas cardiomyopathy and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Arquivos brasileiros de cardiologia*, 97(6), 517-525.
- Barisón, M., Rapado, L., Merino, E., Pral, E., Mantilla, B., Marchese, L., ... y Cassera, M. (2017). Metabolomics profiling reveals a finely tuned, starvation-induced metabolic switch in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Journal of Biological Chemistry*, 291(21), 8964-8977.
- Bar-Peled, L., Schweitzer, LD., Zoncu, R., y Sabatini, DM. (2012). Ragulator is a GEF for the rag GTPases that signal amino acid levels to mTORC1. *Cell*, 150(6), 1196-1208.
- Becker, S., Kortz, L., Helmschrodt, C., Thiery, J., y Ceglarek, U. (2012). LC-MS-based metabolomics in the clinical laboratory. *Journal of Chromatography B*, 883, 68-75.
- Bermudez, J., Davies, C., Simonazzi, A., Real, JP., y Palma, S. (2016). Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. *Acta tropica*, 156, 1-16.
- Bern, C. (2015). Chagas' disease. *New England Journal of Medicine*, 373(5), 456-466.
- Bern, C., Kjos, S., Yabsley, MJ., y Montgomery, SP. (2011). *Trypanosoma cruzi* and Chagas' disease in the United States. *Clinical microbiology reviews*, 24(4), 655-681.

- Bixby LM, y Tarleton RL. (2008). Stable CD8+ T cell memory during persistent *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol.* 181(4):2644-50
- Bloomgarden, Z. (2018). Diabetes and branched-chain amino acids: What is the link? *Journal of diabetes*, 10(5), 350-352.
- Bocchi, E., Bestetti, R., Scanavacca, M., Neto, E., y Issa, V. (2017). Chronic Chagas heart disease management: from etiology to cardiomyopathy treatment. *Journal of the American College of Cardiology*, 70(12), 1510-1524.
- Borrás, SG., Racca, L., Cotorruelo, C., Biondi, C., Beloscar, J., y Racca, A. (2009). Distribution of HLA-DRB1 alleles in Argentinean patients with Chagas' disease cardiomyopathy. *Immunological Investigations*, 38(3-4), 268-275.
- Bustamante, JM., Bixby, LM., y Tarleton, RL. (2008). Drug-induced cure drives conversion to a stable and protective CD8+ T central memory response in chronic Chagas disease. *Nature medicine*, 14(5), 542-550.
- Carlier Y, Sosa-Estani S, Luquetti AO, y Buekens P. Congenital Chagas disease: an update. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015 May; 110(3):363-8.
- Carlier Y, y Truyens C. Congenital Chagas disease as an ecological model of interactions between *Trypanosoma cruzi* parasites, pregnant women, placenta and fetuses. *Acta Trop.* 2015 Nov; 151():103-15.
- Carlier, Y., Altcheh, J., Angheben, A., Freilij, H., Luquetti, AO., Schijman, AG., ... y Vinas, PA. (2019). Congenital Chagas disease: Updated recommendations for prevention, diagnosis, treatment, and follow-up of newborns and siblings, girls, women of childbearing age, and pregnant women. *PLoS neglected tropical diseases*, 13(10).
- Cheng, S., Shah, SH., Corwin, EJ., Fiehn, O., Fitzgerald, RL., Gerszten, RE., ... y Jain, M. (2017). Potential impact and study considerations of metabolomics in cardiovascular health and disease: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 10(2), e000032.

- Coura, JR., y Borges-Pereira, J. (2010). Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta tropica*, 115(1-2), 5-13.
- Creek, D., Jankevics, A., Breitling, R., Watson, D., Barrett, M., y Burgess, K. (2011). Toward global metabolomics analysis with hydrophilic interaction liquid chromatography–mass spectrometry: improved metabolite identification by retention time prediction. *Analytical chemistry*, 83(22), 8703-8710.
- Crespillo-Andújar, C., López-Vélez, R., Trigo, E., Norman, F., Díaz-Menéndez, M., Monge-Maillo, B., ... y Pérez-Molina, JA. (2019). Comparison of the toxicity of two treatment schemes with benznidazole for chronic Chagas disease: a prospective cohort study in two Spanish referral centres. *Clinical Microbiology and Infection*.
- Criado, L., Flórez, O., Martín, J., y González, C. (2012). Genetic polymorphisms in TNFA/TNFR2 genes and Chagas disease in a Colombian endemic population. *Cytokine*, 57(3), 398-401.
- Crosetto, N., Bienko, M., y Van Oudenaarden, A. (2015). Spatially resolved transcriptomics and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 16(1), 57-66.
- Cucunubá, ZM., Nouvellet, P., Peterson, JK., Bartsch, SM., Lee, BY., Dobson, AP., y Basáñez, MG. (2018). Complementary paths to chagas disease elimination: The impact of combining vector control with etiological treatment. *Clinical Infectious Diseases*, 66(suppl_4), S293-S300.
- Cui, L., Pang, J., Lee, Y. H., Ooi, E., Ong, C., Leo, Y., y Tannenbaum, S. (2018). Serum metabolome changes in adult patients with severe dengue in the critical and recovery phases of dengue infection. *PLoS neglected tropical diseases*, 12(1), e0006217.
- da Matta Guedes, PM., Gutierrez, FR., Maia, FL., Milanezi, CM., Silva, GK., Pavanelli, WR., y Silva, JS. (2010). IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. *PLoS neglected tropical diseases*, 4(2), e604.
- da Silveira, AB., de AraÚjo, FF., Freitas, MAR., Gomes, JAS., Chaves, AT., de Oliveira, EC., ... y Fujiwara, R. (2009). Characterization of the presence and distribution of Foxp3+ cells in chagasic patients with and without megacolon. *Human immunology*, 70(1), 65-67.

- De Bona, E., Lidani, KCF., Bavia, L., Omidian, Z., Gremski, LH., Lucas Sandri, T., y de Messias-Reason, IJ. (2018). Autoimmunity in chronic Chagas disease: a road of multiple pathways to cardiomyopathy? *Frontiers in immunology*, 9, 1842.
- de Figueiredo Brito, BO., Pinto-Filho, MM., Cardoso, CS., Oliveira, CDL., Ferreira, AM., de Oliveira, LC., ... y Ribeiro, ALP. (2018). Association between typical electrocardiographic abnormalities and NT-proBNP elevation in a large cohort of patients with Chagas disease from endemic area. *Journal of electrocardiology*, 51(6), 1039-1043.
- De Hoffmann, E. (2000). Mass spectrometry. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*.
- de Noya, BA., y González, ON. (2019). Orally Transmitted Chagas Disease: Biology, Epidemiology, and Clinical Aspects of a Foodborne Infection. In *Chagas Disease* (pp. 225-241). Springer, Cham.
- De Souza, W. (1984). Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. In *International review of cytology* (Vol. 86, pp. 197-283). Academic Press.
- Decuypere, S., Maltha, J., Deborggraeve, S., Rattray, NJ., Issa, G., Bérenger, K., ... y Goodacre, R. (2016). Towards Improving Point-of-Care Diagnosis of Non-malaria Febrile Illness: A Metabolomics Approach. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(3), e0004480.
- Deng, X., Sabino, EC., Cunha-Neto, E., Ribeiro, AL., Ianni, B., Mady, C., ... y Seielstad, M. (2013). Genome wide association study (GWAS) of Chagas cardiomyopathy in *Trypanosoma cruzi* seropositive subjects. *PloS one*, 8(11), e79629.
- Dettmer, K., Aronov, PA., y Hammock, BD. (2007). Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass spectrometry reviews*, 26(1), 51-78.
- Díaz, M., Burguess, K., Burchmore, R., Echeverría, L.E., Murillo, C., Forero, P., y González, C. (septiembre de 2018). Desregulación metabólica en corazón con cardiomiopatía chagásica crónica. En R. Villamizar (Presidencia). *Simposio llevado a cabo en el II Encuentro Internacional en Ciencias de la Salud*, Bucaramanga, Colombia.
- Díaz, M., Leal, S., Mantilla, J., Molina-Berríos, A., López-Muñoz, R., Solari, A., ...y González, C. (2015). Acute chagas outbreaks: molecular and biological features of *Trypanosoma cruzi*

- isolates, and clinical aspects of acute cases in Santander, Colombia. *Parasites & vectors*, 8(1), 608.
- Díaz, ML., y González, CI. (2014). Enfermedad de Chagas agudo: transmisión oral de *Trypanosoma cruzi* como una vía de transmisión re-emergente. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 46(2), 177-188.
- Diop, F., Vial, T., Ferraris, P., Wichit, S., Bengue, M., Hamel, R., ... y Marti, G. (2018). Zika virus infection modulates the metabolomic profile of microglial cells. *PloS one*, 13(10), e0206093.
- Downard, K. (2007). *Mass spectrometry: a foundation course*. Royal Society of Chemistry.
- D'Souza, K., Nzirorera, C., y Kienesberger, PC. (2016). Lipid metabolism and signaling in cardiac lipotoxicity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1861(10), 1513-1524.
- Echeverría, L., Rojas, L., Calvo, L., Roa, Z., Rueda-Ochoa, O., Morillo, C., ... y Franco, O. (2017). Profiles of cardiovascular biomarkers according to severity stages of Chagas cardiomyopathy. *International journal of cardiology*, 227, 577-582.
- Echeverria, LE., y Morillo, CA. (2019). American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious Disease Clinics*, 33(1), 119-134.
- Elvas, F., Stroobants, S., y Wyffels, L. (2017). Phosphatidylethanolamine targeting for cell death imaging in early treatment response evaluation and disease diagnosis. *Apoptosis*, 22(8), 971-987.
- Feng, X., Liu, X., Luo, Q., y Liu, BF. (2008). Mass spectrometry in systems biology: an overview. *Mass spectrometry reviews*, 27(6), 635-660.
- Fiehn, O. (2002). Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes. In *Functional genomics* (pp. 155-171). Springer, Dordrecht.

- Filigheddu, MT., Gorgolas, M., y Ramos, JM. (2017). Orally-transmitted Chagas disease. *Medicina Clínica (English Edition)*, 148(3), 125-131.
- Flórez, O., Zafra, G., Morillo, C., Martín, J., y González, C. (2006). Interleukin-1 gene cluster polymorphism in chagas disease in a Colombian case-control study. *Human immunology*, 67(9), 741-748.
- Fonseca, SG., Reis, M. M., Coelho, V., Nogueira, LG., Monteiro, SM., Mairena, EC., ... y Liew, FY. (2007). Locally Produced Survival Cytokines IL-15 and IL-7 may be Associated to the Predominance of CD8+ T cells at Heart Lesions of Human Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy. *Scandinavian journal of immunology*, 66(2-3), 362-371.
- Fuenmayor, C., Higuchi, M., Carrasco, H., Parada, H., Gutierrez, P., Aiello, V., y Palomino, S. (2005). Acute Chagas' disease: immunohistochemical characteristics of T cell infiltrate and its relationship with T. cruzi parasitic antigens. *Acta cardiologica*, 60(1), 33-37.
- Gai, Z., Visentin, M., Gui, T., Zhao, L., Thasler, WE, Häusler, S., ... y Kullak-Ublick, GA (2018). Efectos de la activación del receptor farnesoide X sobre el metabolismo del ácido araquidónico, la señalización de NF-κB y la inflamación hepática. *Farmacología molecular*, 94 (2), 802-811.
- Garcia, A., y Barbas, C. (2011). Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)-based metabolomics. In *Metabolic Profiling* (pp. 191-204). Humana Press.
- Gascon, J., Bern, C., y Pinazo, MJ. (2010). Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta tropica*, 115(1-2), 22-27.
- Gika, HG., Theodoridis, GA., Plumb, RS., y Wilson, ID. (2014). Current practice of liquid chromatography–mass spectrometry in metabolomics and metabonomics. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 87, 12-25.
- Gironès, N., Carbajosa, S., Guerrero, NA., Poveda, C., Chillón-Marinas, C., y Fresno, M. (2014). Global metabolomic profiling of acute myocarditis caused by Trypanosoma cruzi infection. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(11), e3337.

- Golgher, D., y Gazzinelli, RT. (2004). *Innate and Acquired Immunity in the Pathogenesis of Chagas Disease*. *Autoimmunity*, 37(5), 399–409. doi:10.1080/08916930410001713115
- González, CI., y Mantilla, JC. (2012). *Chagas Heart Disease, Cardiomyopathies—From Basic Research to Clinical Management*, Prof. Josef Veselka (Ed.), ISBN: 978-953-307-834-2
- Goodacre, R., Broadhurst, D., Smilde, AK., Kristal, BS., Baker, JD., Beger, R., ... y Ebbels, T. (2007). Proposed minimum reporting standards for data analysis in metabolomics. *Metabolomics*, 3(3), 231-241.
- Gorrochategui, E., Jaumot, J., Lacorte, S., y Tauler, R. (2016). Data analysis strategies for targeted and untargeted LC-MS metabolomic studies: Overview and workflow. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 82, 425-442.
- Gorrochategui, E., Jaumot, J., Lacorte, S., y Tauler, R. (2016). Data analysis strategies for targeted and untargeted LC-MS metabolomic studies: Overview and workflow. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 82, 425-442.
- Graves, PR., y Haystead, T. A. (2002). Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 66(1), 39-63.
- Griffiths, WJ., Koal, T., Wang, Y., Kohl, M., Enot, D. P., y Deigner, HP. (2010). Targeted metabolomics for biomarker discovery. *Angewandte Chemie International Edition*, 49(32), 5426-5445.
- Gromski, PS., Muhamadali, H., Ellis, D. I., Xu, Y., Correa, E., Turner, M. L., y Goodacre, R. (2015). A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis—a marriage of convenience or a shotgun wedding. *Analytica chimica acta*, 879, 10-23.
- Guhl, F. (2007). Chagas disease in Andean countries. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102, 29-38.
- Guhl, F. (2009). Enfermedad de Chagas: realidad y perspectivas. *Revista Biomedica*, 20(3), 228-234.

- Hasin, Y., Seldin, M., y Luskis, A. (2017). Multi-omics approaches to disease. *Genome biology*, 18(1), 83.
- Heintzman, ND., Hon, GC., Hawkins, RD., Kheradpour, P., Stark, A., Harp, L. F., ... y Ching, KA. (2009). Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression. *Nature*, 459(7243), 108.
- Hennig, K., Abi-Ghanem, J., Bunescu, A., Meniche, X., Biliaut, E., Ouattara, AD., ... y Chatelain, E. (2019). Metabolomics, lipidomics and proteomics profiling of myoblasts infected with *Trypanosoma cruzi* after treatment with different drugs against Chagas disease. *Metabolomics*, 15(9), 117.
- Hirano, Y., Gao, YG., Stephenson, DJ., Vu, NT., Malinina, L., Simanshu, DK., ... y Brown, RE. (2019). Structural basis of phosphatidylcholine recognition by the C2-domain of cytosolic phospholipase A2 α . *Elife*, 8, e44760.
- Hölscher, C., Mohrs, M., Dai, WJ., Köhler, G., Ryffel, B., Schaub, GA., ... y Brombacher, F. (2000). Tumor Necrosis Factor Alpha-Mediated Toxic Shock in *Trypanosoma cruzi*-Infected Interleukin 10-Deficient Mice. *Infection and immunity*, 68(7), 4075-4083.
- Hoppel, C. (2003). The role of carnitine in normal and altered fatty acid metabolism. *American Journal of Kidney Diseases*, 41, S4-S12.
- Horgan, RP., y Kenny, LC. (2011). ‘Omic’ technologies: genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics. *The Obstetrician & Gynaecologist*, 13(3), 189-195.
- Hou, L., y Zhao, H. (2013). A review of post-GWAS prioritization approaches. *Frontiers in genetics*, 4, 280.
- Hoxha, M. (2019). Duchenne muscular dystrophy: Focus on arachidonic acid metabolites. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 110, 796-802.
- Hunter, CA., Ellis-Neyes, L.A., Slifer, T., Kanaly, S., Grunig, G., Fort, M., Rennick, D. and Araujo, FG. (1997) “IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*”, *J. Immunol.* 158, 3311–3316

Instituto Nacional de Salud. (13 de Mayo de 2010). *Protocolo para la vigilancia en salud pública de Chagas*. Disponible en <https://www.minsalud.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/PROTOCOLO%20C H A G A S % 2 0 m a y o % 2 0 d e % 2 0 2 0 1 0 . p d f>

Instituto Nacional de Salud. (Diciembre de 2017). Boletín epidemiológico semanal. Semana epidemiológica 52-Diciembre 24 al 30 de 2017. Obtenido de <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2017%20Bolet%20C3%ADn%20epidemiol%20B3gico%20semana%2052.pdf>

Jackson, Y., Wyssa, B., y Chappuis, F. (2019). Tolerance to nifurtimox and benznidazole in adult patients with chronic Chagas' disease. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.

Jacob, M., Lopata, AL., Dasouki, M., y Abdel Rahman, AM. (2019). Metabolomics toward personalized medicine. *Mass spectrometry reviews*, 38(3), 221-238.

Jury, EC., Flores-Borja, F., y Kabouridis, PS. (2007, October). Lipid rafts in T cell signalling and disease. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 18, No. 5, pp. 608-615). Academic Press.

Kao, P., Leung, K., Chan, L., Yip, S., y Yap, M. (2017). Pathway analysis of complex diseases for GWAS, extending to consider rare variants, multi-omics and interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1861(2), 335-353.

Keating, S., Deng, X., Fernandes, F., Cunha-Neto, E., Ribeiro, A., Adesina, B., ... y Sabino, E. (2015). Inflammatory and cardiac biomarkers are differentially expressed in clinical stages of Chagas disease. *International journal of cardiology*, 199, 451-459.

Kessler, RL., Contreras, VT., Marlière, NP., Aparecida Guarneri, A., Villamizar Silva, LH., Mazzarotto, GA., ... y Probst, C. M. (2017). Recently differentiated epimastigotes from *Trypanosoma cruzi* are infective to the mammalian host. *Molecular microbiology*, 104(5), 712-736.

Kierszenbaum F, et al. (1981) Antibody-independent, natural resistance of birds to *Trypanosoma cruzi* infection. *The Journal of Parasitology*; p. 656-660.

- Koopmann, TT., Adriaens, ME., Moerland, PD., Marsman, RF., Westerveld, ML., Lal, S., ... y Bishopric, NH. (2014). Genome-wide identification of expression quantitative trait loci (eQTLs) in human heart. *PLoS One*, 9(5), e97380.
- Krautz, GM., Kissinger, JC., y Krettli, AU. (2000). The targets of the lytic antibody response against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today*, 16(1), 31-34.
- Kundaje, A., Meuleman, W., Ernst, J., Bilenky, M., Yen, A., Heravi-Moussavi, A., ... y Amin, V. (2015). Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. *Nature*, 518(7539), 317.
- Lages-Silva, Eliane., Ramirez, LE., Krettli, AU., y Brener, Z. (1987). Effect of protective and non-protective antibodies in the phagocytosis rate of *Trypanosoma cruzi* blood forms by mouse peritoneal macrophages. *Parasite immunology*, 9(1), 21-30.
- Le Belle, J., Harris, N., Williams, S., y Bhakoo, K. (2016). A comparison of cell and tissue extraction techniques using high-resolution ¹H-NMR spectroscopy. *NMR in Biomedicine*, 29(4), 527-527.
- Lee, BY., Bacon, KM., Bottazzi, M. E., y Hotez, PJ. (2013). Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *The Lancet infectious diseases*, 13(4), 342-348.
- Leon, DA., Carmona, FD., Echeverría, LE., González, CI., y Martin, J. (2016). IL18 Gene variants influence the susceptibility to chagas disease. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(3), e0004583.
- Leopold, SJ., Ghose, A., Allman, L., Kingston, HW., Hossain, A., Dutta, A. K., ... y Winterberg, M. (2018). Identifying the Components of Acidosis in Patients With Severe *Plasmodium falciparum* Malaria Using Metabolomics. *The Journal of infectious diseases*, 219(11), 1766-1776.
- Lidani KC., Bavia L., Ambrosio AR., de Messias-Reason IJ. (2017) The Complement System: A Prey of *Trypanosoma cruzi*. *Front. Microbiol.*; 8:607.
- Lidani, K. CF., Andrade, FA., Bavia, L., Damasceno, FS., Beltrame, MH., Messias-Reason, IJ., y Sandri, TL. (2019). Chagas disease: from discovery to a worldwide health problem. *Frontiers in public health*, 7.

- Lizardo, K., Ayyappan, JP., Cui, MH., Balasubramanya, R., Jelicks, LA., y Nagajyothi, JF. (2019). High fat diet aggravates cardiomyopathy in murine chronic Chagas disease. *Microbes and infection*, 21(1), 63-71.
- Longo, N., Frigeni, M., y Pasquali, M. (2016). Carnitine transport and fatty acid oxidation. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-molecular cell research*, 1863(10), 2422-2435.
- López-Vélez, R., Norman, FF., y Bern, C. (2020). American Trypanosomiasis (Chagas disease). In *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases* (pp. 762-775).
- Ma LH, Li Y, Djuric' PM, Maletic'-Savatic' M. 2011. Systems biology approach to imaging of neural stem cells. *Methods Mol Biol* 711:421– 434.
- Machado, F., Dutra, W., Esper, L., Gollob, K., Teixeira, M., Factor, S., ... y Garg, N. (2012). Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Seminars in immunopathology*, 34(6), 753-770.
- Machuca, M., Suárez, E., Echeverría, L., Martín, J., y González, CI. (2014). SNP/haplotype associations of CCR2 and CCR5 genes with severity of chagasic cardiomyopathy. *Human immunology*, 75(12), 1210-1215.
- Madsen, R., Lundstedt, T., y Trygg, J. (2010). Chemometrics in metabolomics—a review in human disease diagnosis. *Analytica chimica acta*, 659(1-2), 23-33.
- Mansilla, F., da Costa, KA., Wang, S., Kruhøffer, M., Lewin, TM., Ørntoft, TF., ... y Birkenkamp-Demtröder, K. (2009). Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAT1) overexpression in human colorectal cancer. *Journal of Molecular Medicine*, 87(1), 85-97.
- Mariano, FS., Gutierrez, FR., Pavanelli, WR., Milanezi, CM., Cavassani, KA., Moreira, AP., ... y Silva, JS. (2008). The involvement of CD4+ CD25+ T cells in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes and Infection*, 10(7), 825-833.
- Martinez, F., Perna, E., Perrone, SV., y Liprandi, AS. (2019). Chagas Disease and Heart Failure: An Expanding Issue Worldwide. *European Cardiology Review*, 14(2), 82.

- Maxfield, FR., y Tabas, I. (2005). Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature*, 438(7068), 612-621.
- McCall, L., Morton, J., Bernatchez, J., de Siqueira-Neto, J., Knight, R., Dorrestein, P., y McKerrow, J. (2017). Mass spectrometry-based chemical cartography of a cardiac parasitic infection. *Analytical chemistry*, 89(19), 10414-10421.
- McCall, L., Tripathi, A., Vargas, F., Knight, R., Dorrestein, P., y Siqueira-Neto, J. (2018). Experimental Chagas disease-induced perturbations of the fecal microbiome and metabolome. *PLoS neglected tropical diseases*, 12(3), e0006344.
- McGarrah, RW., Crown, SB., Zhang, GF., Shah, SH., y Newgard, CB. (2018). Cardiovascular metabolomics. *Circulation research*, 122(9), 1238-1258.
- McGettigan, P. A. (2013). Transcriptomics in the RNA-seq era. *Current opinion in chemical biology*, 17(1), 4-11.
- Meissner, A. (2015). Epi) genomics approaches and their applications. *Methods (San Diego, Calif.)*, 72, 1.
- Mendes-Frias, A., Santos-Lima, B., Furtado, DZS., Ruperez, FJ., Assunção, NA., Matias, M. J., ... y Capela, C. (2020). Dysregulation of glycerophospholipid metabolism during Behçet's disease contributes to a pro-inflammatory phenotype of circulating monocytes. *Journal of Translational Autoimmunity*, 100056.
- Molina, I., Salvador, F., & Sánchez-Montalvá, A. (2016). Actualización en enfermedad de Chagas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 34(2), 132-138.
- Moncayo, A. (2003). Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(5), 577-591.
- Monteon, V. (2019). Trypanosoma cruzi: The early contact between insect-derived metacyclic trypomastigotes and the mammalian cells. *Annals of Parasitology*, 65(3), 193-204.

- Morillo, CA., Marin-Neto, JA., Avezum, A., Sosa-Estani, S., Rassi Jr, A., Rosas, F., ... y Guhl, F. (2015). Randomized trial of benznidazole for chronic Chagas' cardiomyopathy. *New England Journal of Medicine*, 373(14), 1295-1306.
- Mukherjee, S., Belbin, TJ., Spray, DC., Iacobas, DA., Weiss, LM., Kitsis, RN., ... y Tanowitz, HB. (2003). Microarray analysis of changes in gene expression in a murine model of chronic chagasic cardiomyopathy. *Parasitology research*, 91(3), 187-196.
- Murcia, L., Carrilero, B., Saura, D., Iborra, M., y Segovia, M. (2013). Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 31, 26-34.
- Musters RJ., Otten E., Biegelmann E., Bijvelt J., Keijzer JJ., Post JA., Op den Kamp JA., y Verkleij AJ (1993) Loss of asymmetric distribution of sarcolemmal phosphatidylethanolamine during simulated ischemia in the isolated neonatal rat cardiomyocyte. *Circ Res* 73(3):514–523
- Nagajyothi, F., Weiss, LM., Zhao, D., Koba, W., Jelicks, LA., Cui, MH., ... y Tanowitz, HB. (2014). High fat diet modulates Trypanosoma cruzi infection associated myocarditis. *PLoS Negl Trop Dis*, 8(10), e3118.
- Nagajyothi, JF., y Weiss, LM. (2019). Advances in understanding the role of adipose tissue and mitochondrial oxidative stress in Trypanosoma cruzi infection. *F1000Research*, 8.
- Nelson, JR y Raskin, S. (2019). La relación ácido eicosapentaenoico: ácido araquidónico y su utilidad clínica en la enfermedad cardiovascular. *Medicina de posgrado*, 131 (4), 268-277.
- Nogueira, LG., Santos, RHB., Ianni, BM., Fiorelli, AI., Mairena, EC., Benvenuti, LA., ... y Wang, HTL. (2012). Myocardial chemokine expression and intensity of myocarditis in Chagas cardiomyopathy are controlled by polymorphisms in CXCL9 and CXCL10. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(10), e1867.
- Noireau, F., Diosque, P., y Jansen, AM. (2009). Trypanosoma cruzi: adaptation to its vectors and its hosts. *Veterinary research*, 40(2), 1-23.

- Nunes, M., Dones, W., Morillo, C., Encina, J., y Ribeiro, A. (2013). Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(9), 767-776.
- Nunes, MCP., Beaton, A., Acquatella, H., Bern, C., Bolger, AF., Echeverria, LE., ... y Ribeiro, ALP. (2018). Chagas cardiomyopathy: an update of current clinical knowledge and management: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, 138(12), e169-e209.
- Olivera, M.J., y Buitrago, G. (2019). Economic costs of Chagas disease in Colombia in 2017: a social perspective. *International Journal of Infectious Diseases*.
- Organización Mundial de la Salud. (Agosto de 2018). *La Enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis americana)*. Disponible en: <http://www.who.int/chagas/en/>
- Padilla, AM., Bustamante, JM., y Tarleton, RL. (2009). CD8+ T cells in Trypanosoma cruzi infection. *Current opinion in immunology*, 21(4), 385-390.
- Palomer, X., Barroso, E., Zarei, M., Botteri, G., y Vázquez-Carrera, M. (2016). PPAR β/δ and lipid metabolism in the heart. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1861(10), 1569-1578.
- Passos, LCS., Melo, RMVD., Lira, YM., Oliveira, NCFD., Trindade, T., Carvalho, W., y Fagundes, A. (2019). Chagas disease is associated with a poor outcome at 1-year follow-up after cardiac resynchronization therapy. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 65(11), 1391-1396.
- Patterson, SD., y Aebersold, RH. (2003). Proteomics: the first decade and beyond. *Nature genetics*, 33(3s), 311.
- Peltenburg, NC., Schoeman, JC., Hou, J., Mora, F., Harms, AC., Lowe, SH., ... y Boonstra, A. (2018). Persistent metabolic changes in HIV-infected patients during the first year of combination antiretroviral therapy. *Scientific reports*, 8(1), 16947.
- Pereira, P., y Navarro, E. (2013). Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, 19(1), 34.

- Pérez-Molina, JA., y Molina, I. (2018). Chagas disease. *The Lancet*, 391: 82–94
- Petersen, CA., Krumholz, KA., y Burleigh, BA. (2005). Toll-like receptor 2 regulates interleukin-1 β -dependent cardiomyocyte hypertrophy triggered by *Trypanosoma cruzi*. *Infection and immunity*, 73(10), 6974-6980.
- Pewzner-Jung, Y., Ben-Dor, S., y Futerman, AH. (2006). When do Lasses (longevity assurance genes) become CerS (ceramide synthases)? Insights into the regulation of ceramide synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 281(35), 25001-25005.
- Pinge-Filho, P., Tadokoro, C.E. y Abrahamsohn, I.A. (1999) “Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection”, *Cell Immunol.* 193, 90–98.
- Post JA., Clague JR., y Langer GA (1993) Sarcolemmal phospholipid asymmetry and Ca fluxes on metabolic inhibition of neonatal rat heart cells. *Am J Physiol* 265(2 Pt 2):H461–H468
- Rassi Jr., Rassi, A., y Marin-Neto, J. (2010). Chagas disease. *The Lancet*, 375(9723), 1388-1402.
- Rassi Jr., Rassi, S., y Rassi, A. (2001). Sudden death in Chagas' disease. *Arquivos brasileiros de cardiologia*, 76(1), 86-96.
- Rassi, A., y de Rezende, J. (2012). American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infectious Disease Clinics*, 26(2), 275-291.
- Rassi, F. M., Minohara, L., Rassi Jr, A., Correia, LCL., Marin-Neto, JA., Rassi, A., y da Silva Menezes Jr, A. (2019). Systematic review and meta-analysis of clinical outcome after implantable cardioverter-defibrillator therapy in patients with Chagas heart disease. *JACC: Clinical Electrophysiology*, 5(10), 1213-1223.
- Rhee, EP., y Gerszten, RE. (2012). Metabolomics and cardiovascular biomarker discovery. *Clinical chemistry*, 58(1), 139-147.
- Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K., y Lambris, JD. (2010). Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature immunology*, 11(9), 785.

- Roberts, LD., Souza, AL., Gerszten, RE., y Clish, CB. (2012). Targeted metabolomics. *Current protocols in molecular biology*, 98(1), 30-2.
- Rodrigues, DBR., Dos Reis, MA., Romano, A., Pereira, SADL., Teixeira VD., Tostes Junior, S., y Rodrigues, V. (2012). In situ expression of regulatory cytokines by heart inflammatory cells in Chagas' disease patients with heart failure. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012.
- Rodriguez, AM., Santoro, F., Afchain, D., Bazin, H., y Capron, A. (1981). Trypanosoma cruzi infection in B-cell-deficient rats. *Infection and Immunity*, 31(2), 524-529.
- Rojas, LZ., Glisic, M., Pletsch-Borba, L., Echeverría, LE., Bramer, WM., Bano, A., ... y Chowdhury, R. (2018). Electrocardiographic abnormalities in Chagas disease in the general population: A systematic review and meta-analysis. *PLoS neglected tropical diseases*, 12(6), e0006567.
- Rotroff, D., y Motsinger-Reif, A. (2016). Embracing integrative multiomics approaches. *International journal of genomics*, 2016.
- Salvador, F., Sánchez-Montalvá, A., Sulleiro, E., Moreso, F., Berastegui, C., Caralt, M., ... y Gavalda, J. (2018). Prevalence of Chagas Disease among Solid Organ-Transplanted Patients in a Nonendemic Country. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 98(3), 742-746.
- Salvador, F., Treviño, B., Sulleiro, E., Pou, D., Sánchez-Montalvá, A., Cabezos, J., ...y Molina, I. (2014). *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic country: epidemiological and clinical profile. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(7), 706-712.
- Sánchez-Montalvá, A., Salvador, F., Rodríguez-Palomares, J., Sulleiro, E., Sao-Avilés, A., Roure, S., ... y Molina, I. (2016). Chagas cardiomyopathy: usefulness of EKG and echocardiogram in a non-endemic country. *PloS one*, 11(6), e0157597.
- Schijman, AG. (2018). Molecular diagnosis of *Trypanosoma cruzi*. *Acta tropica*, 184, 59-66.
- Schmuñis, G. (2013). Status of and cost of Chagas disease worldwide. *The Lancet infectious diseases*, 13(4), 283-284.

- Shen, L., Ramires, F., Martinez, F., Bodanese, LC., Echeverría, LE., Gómez, EA., ... y Rouleau, JL. (2017). Contemporary characteristics and outcomes in chagasic heart failure compared with other nonischemic and ischemic cardiomyopathy. *Circulation: Heart Failure*, 10(11), e004361.
- Sherbuk, J., Okamoto, E., Marks, M., Fortuny, E., Clark, E., Galdos-Cardenas, G., ...y Flores-Franco, J. (2015). Biomarkers and mortality in severe Chagas cardiomyopathy. *Global heart*, 10(3), 173-180.
- Shikanai-Yasuda, MA., y Carvalho, NB. (2012). Oral transmission of Chagas disease. *Clinical Infectious Diseases*, 54(6), 845-852.
- Shoda, L., Kegerreis, K., Suarez, C., Roditi, I., Corral, R., Bertot, G., ... Brown, W. C. (2001). DNA from protozoan parasites *Babesia bovis*, *Trypanosoma cruzi*, and *T. brucei* is mitogenic for B lymphocytes and stimulates macrophage expression of interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide. *Infection and immunity*, 69(4), 2162-2171.
- Silva, JS., Twardzik, DR., y Reed, SG. (1991). Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). *Journal of Experimental Medicine*, 174(3), 539-545.
- Smani, Y., Domínguez-Herrera, J., Ibáñez-Martínez, J., y Pachón, J. (2015). Therapeutic efficacy of lysophosphatidylcholine in severe infections caused by *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(7), 3920-3924.
- Smith, CA., Want, EJ., O'Maille, G., Abagyan, R., y Siuzdak, G. (2006). XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Analytical chemistry*, 78(3), 779-787.
- Sousa-Rocha, D., Thomaz-Tobias, M., Diniz, LFA., Souza, PSS., Pinge-Filho, P., y Toledo, KA. (2015). *Trypanosoma cruzi* and its soluble antigens induce NET release by stimulating toll-like receptors. *PloS one*, 10(10), e0139569.
- Souza, PE., Rocha, MO., Rocha-Vieira, E., Menezes, CA., Chaves, AC., Gollob, KJ., y Dutra, WO. (2004). Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. *Infection and immunity*, 72(9), 5283-5291.

- Stephenson, DJ., Hoferlin, LA., y Chalfant, CE. (2017). Lipidomics in translational research and the clinical significance of lipid-based biomarkers. *Translational Research*, 189, 13-29.
- Stipetic, L., Dalby, M., Davies, R., Morton, F., Ramage, G., y Burgess, K. (2016). A novel metabolomic approach used for the comparison of *Staphylococcus aureus* planktonic cells and biofilm samples. *Metabolomics*, 12(4), 75.
- Takehara, HA., Perini, A., da Silva, MH., y Mota, I. (1981). *Trypanosoma cruzi*: Role of different antibody classes in protection against infection in the mouse. *Experimental Parasitology*, 52(1), 137-146. doi:10.1016/0014-4894(81)90069-2
- Tang, DQ., Zou, L., Yin, XX., y Ong, CN. (2016). HILIC-MS for metabolomics: An attractive and complementary approach to RPLC-MS. *Mass spectrometry reviews*, 35(5), 574-600.
- Tarleton, RL. (2007). Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Current opinion in immunology*, 19(4), 430-434.
- Teixeira, AR., Hecht, MM., Guimaro, MC., Sousa, AO., y Nitz, N. (2011). Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. *Clinical microbiology reviews*, 24(3), 592-630.
- Torii, Y., Kawano, Y., Sato, H., Fujimori, T., Sasaki, K., Kawada, J. I., ... y Ito, Y. (2017). Metabolome analysis reveals the association between the kynurenine pathway and human herpesvirus 6 encephalopathy in immunocompetent children. *Metabolomics*, 13(11), 126.
- Torres, O., Calzada, J., Beraún, Y., Morillo, C., González, C., González, A., y Martín, J. (2009). Association of the macrophage migration inhibitory factor- 173G/C polymorphism with Chagas disease. *Human Immunology*, 70(7), 543-546.
- Trochine, A., Creek, D., Faral-Tello, P., Barrett, M. P., y Robello, C. (2014). Benznidazole biotransformation and multiple targets in *Trypanosoma cruzi* revealed by metabolomics. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(5), e2844.
- Trygg, J., Gullberg, J., Johansson, A. I., Jonsson, P., y Moritz, T. (2006). Chemometrics in metabolomics—an introduction. In *Plant metabolomics* (pp. 117-128). Springer, Berlin, Heidelberg.

- Tyler, KM., y Engman, DM. (2001). The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International journal for parasitology*, 31(5-6), 472-481.
- Van der Veen, JN., Kennelly, JP., Wan, S., Vance, JE., Vance, DE., y Jacobs, RL. (2017). The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease.
- Vinaixa, M., Schymanski, E.L., Neumann, S., Navarro, M., Salek, RM., y Yanes, O. (2016). Mass spectral databases for LC/MS-and GC/MS-based metabolomics: State of the field and future prospects. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 78, 23-35.
- Visscher, PM., Wray, NR., Zhang, Q., Sklar, P., McCarthy, M. I., Brown, MA., y Yang, J. (2017). 10 years of GWAS discovery: biology, function, and translation. *The American Journal of Human Genetics*, 101(1), 5-22.
- Vitelli-Avelar, DM., Sathler-Avelar, R., Dias, J. C. P., Pascoal, VPM., Teixeira-Carvalho, A., Lage, PS., ... y Martins-Filho, O. A. (2005). Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3+ CD16–CD56+ natural killer T cells and CD4+ CD25high regulatory T lymphocytes. *Scandinavian journal of immunology*, 62(3), 297-308.
- Wang, T., Fu, X., Chen, Q., Patra, JK., Wang, D., Wang, Z., y Gai, Z. (2019). Arachidonic acid metabolism and kidney inflammation. *International journal of molecular sciences*, 20(15), 3683.
- Wang, Z., Gerstein, M., y Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews genetics*, 10(1), 57.
- Wei, S., Liu, L., Zhang, J., Bowers, J., Gowda, GN., Seeger, H., ... y Raftery, D. (2013). Metabolomics approach for predicting response to neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Molecular oncology*, 7(3), 297-307.
- Whitehead, NP., Yeung, EW., y Allen, DG. (2005). Muscle damage in mdx (dystrophic) mice: The role of calcium and reactive oxygen species. In *Proceedings of the Australian Physiological Society* (Vol. 36, pp. 111-117).
- Gati, I., Danielsson, O., Betmark, T., Ernerudh, J., Öllinger, K., y Dizdar, N. (2007). Effects of inhibitors of the arachidonic acid cascade on primary muscle culture from a Duchenne

- muscular dystrophy patient. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids*, 77(3-4), 217-223.
- Worley, B., y Powers, R. (2013). Multivariate analysis in metabolomics. *Current Metabolomics*, 1(1), 92-107.
- Wu CL, Jordan KW, Ratai EM, Sheng J, Adkins CB, Defeo EM, Jenkins BG, Ying L, McDougal WS, y Cheng LL. 2010. Metabolomic imaging for human prostate cancer detection. *Sci Transl Med* 2:16ra8.
- Wymann, MP., y Schneider, R. (2008). Lipid signalling in disease. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(2), 162-176.
- Yi, L., Dong, N., Yun, Y., Deng, B., Ren, D., Liu, S., y Liang, Y. (2016). Chemometric methods in data processing of mass spectrometry-based metabolomics: A review. *Analytica chimica acta*, 914, 17-34.
- Zafra, G., Morillo, C., Martín, J., González, A., y González, C. (2007). Polymorphism in the 3' UTR of the IL12B gene is associated with Chagas' disease cardiomyopathy. *Microbes and Infection*, 9(9), 1049-1052.
- Zaki, P., Domingues, EL., Amjad, FM., Narde, MB., Gonçalves, KR., Viana, ML., ... y Sherer, PE. (2020). The role of fat on cardiomyopathy outcome in mouse models of chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitology research*, 1-15.
- Zampieri, M., Sekar, K., Zamboni, N., y Sauer, U. (2017). Frontiers of high-throughput metabolomics. *Current opinion in chemical biology*, 36, 15-23.
- Zhang, T., Creek, DJ., Barrett, MP., Blackburn, G., y Watson, DG. (2012). Evaluation of coupling reversed phase, aqueous normal phase, and hydrophilic interaction liquid chromatography with Orbitrap mass spectrometry for metabolomic studies of human urine. *Analytical chemistry*, 84(4), 1994-2001.
- Zhang, ZH., Chen, H., Vaziri, ND., Mao, J. R., Zhang, L., Bai, X., y Zhao, YY. (2016). Metabolomic signatures of chronic kidney disease of diverse etiologies in the rats and humans. *Journal of proteome research*, 15(10), 3802-3812.

Ziller, MJ., Gu, H., Müller, F., Donaghey, J., Tsai, LTY., Kohlbacher, O., ... y Gnirke, A. (2013). Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome. *Nature*, 500(7463), 477.

Apéndices

Apéndice A. Orden de inyección de las muestras por 5 días

Lote 1			Lote 2			Lote 3		
Orden de inyección	ID de la muestra	Clasificación	Orden de inyección	ID de la muestra	Clasificación	Orden de inyección	ID de la muestra	Clasificación
1	QC 1		1	QC 10		1	QC 19	
2	QC 2		2	QC 11		2	QC 20	
3	QC 3		3	QC 12		3	QC 21	
4	QC 4		4	QC 13		4	QC 22	
5	QC 5		5	QC 14		5	QC 23	
6	Estándar		6	Estándar		6	Estándar	
7	Muestra 1 (4409)	Grado III-IV	7	Muestra 21 (3991)	Grado II	7	Muestra 41 (4604)	Seronegativo
8	Muestra 2 (3802)	Grado II	8	Muestra 22 (3988)	Grado II	8	Muestra 42 (4627)	Seronegativo
9	Muestra 3 (3535)	Grado III-IV	9	Muestra 23 (4446)	Grado II	9	Muestra 43 (3568)	Grado I
10	Muestra 4 (3472)	Grado III-IV	10	Muestra 24 (4095)	Grado III-IV	10	Muestra 44 (3542)	Grado I
11	Muestra 5 (3498)	Grado I	11	Muestra 25 (3412)	Grado III-IV	11	Muestra 45 (3989)	Grado III-IV
12	QC 6		12	QC 15		12	QC 24	
13	Blanco 1		13	Blanco 4		13	Blanco 7	
14	Muestra 6 (4377)	Grado III-IV	14	Muestra 26 (3703)	Grado III-IV	14	Muestra 46 (4629)	Seronegativo
15	Muestra 7 (4456)	Grado II	15	Muestra 27 (4641)	Seronegativo	15	Muestra 47 (4633)	Seronegativo
16	Muestra 8 (4250)	Grado II	16	Muestra 28 (4749)	Seronegativo	16	Muestra 48 (3591)	Grado I
17	Muestra 9 (4244)	Grado II	17	Muestra 29 (3791)	Seronegativo	17	Muestra 49 (3742)	Grado I
18	Muestra 10 (4631)	Seronegativo	18	Muestra 30 (4473)	Grado I	18	Muestra 50 (4465)	Grado II
19	QC 7		19	QC 16		19	QC 25	
20	Muestra 11 (4385)	Grado II	20	Muestra 31 (3746)	Grado I	20	Muestra 51 (4503)	Seronegativo
21	Muestra 12 (4096)	Grado II	21	Muestra 32 (3780)	Grado I	21	Muestra 52 (164)	Grado III-IV
22	Muestra 13 (4424)	Grado III-IV	22	Muestra 33 (3576)	Grado III-IV	22	Muestra 53 (4660)	Seronegativo
23	Muestra 14 (4646)	Grado I	23	Muestra 34 (3377)	Grado II	23	Muestra 54 (3741)	Grado I
24	Muestra 15 (4257)	Grado III-IV	24	Muestra 35 (3374)	Grado I	24	Muestra 55 (4413)	Grado I
25	QC 8		25	QC 17		25	QC 26	
26	Muestra 16 (4380)	Grado II	26	Muestra 36 (3368)	Grado I	26	Muestra 56 (3511)	Grado II
27	Muestra 17 (4668)	Grado III-IV	27	Muestra 37 (3392)	Grado I	27	Muestra 57 (3422)	Grado I
28	Muestra 18 (3965)	Grado III-IV	28	Muestra 38 (4647)	Seronegativo	28	Muestra 58 (4693)	Seronegativo
29	Muestra 19 (3777)	Grado II	29	Muestra 39 (3524)	Grado I	29	Muestra 59 (4699)	Seronegativo
30	Muestra 20 (4447)	Grado II	30	Muestra 40 (4615)	Seronegativo	30	Muestra 60 (158)	Grado II
31	QC 9		31	QC 18		31	QC 27	
32	Blanco 2		32	Blanco 5		32	Blanco 8	
33	Blanco 3		33	Blanco 6		33	Blanco 9	
34	Estándar		34	Estándar		34	Estándar	

Lote 4		
Orden de inyección	ID de la muestra	Clasificación
1	QC 28	
2	QC 29	
3	QC 30	
4	QC 31	
5	QC 32	
6	Estándar	
7	Muestra 61 (4484)	Grado I
8	Muestra 62 (4415)	Grado III-IV
9	Muestra 63 (4614)	Grado III-IV
10	Muestra 64 (4694)	Seronegativo
11	Muestra 65 (4508)	Seronegativo
12	QC 33	
13	Blanco 10	
14	Muestra 66 (3982)	Grado I
15	Muestra 67 (4469)	Grado III-IV
16	Muestra 68 (3803)	Grado I
17	Muestra 69 (4681)	Grado I
18	Muestra 70 (3526)	Grado III-IV
19	QC 34	
20	Muestra 71 (3504)	Grado II
21	Muestra 72 (3577)	Grado I
22	Muestra 73 (3694)	Grado II
23	Muestra 74 (3710)	Grado III-IV
24	Muestra 75 (4727)	Seronegativo
25	QC 35	
26	Muestra 76 (3676)	Grado III-IV
27	Muestra 77 (4732)	Seronegativo
28	Muestra 78 (3561)	Grado III-IV
29	Muestra 79 (4504)	Seronegativo
30	Muestra 80 (3425)	Grado I
31	QC 36	
32	Blanco 11	
33	Blanco 12	
34	Estándar	

Lote 5		
Orden de inyección	ID de la muestra	Clasificación
1	QC 37	
2	QC 38	
3	QC 39	
4	QC 40	
5	QC 41	
6	Estándar	
7	Muestra 81 (3735)	Grado III-IV
8	Muestra 82 (3453)	Grado III-IV
9	Muestra 83 (4720)	Seronegativo
10	Muestra 84 (4491)	Seronegativo
11	Muestra 85 (3373)	Grado III-IV
12	QC 42	
13	Blanco 13	
14	Muestra 86 (4512)	Seronegativo
15	Muestra 87 (4517)	Seronegativo
16	Muestra 88 (3477)	Grado II
17	Muestra 89 (3689)	Grado I
18	Muestra 90 (3567)	Grado III-IV
19	QC 43	
20	Muestra 91 (4898)	Grado III-IV
21	Muestra 92 (4717)	Seronegativo
22	Muestra 93 (3331)	Grado II
23	Muestra 94 (3431)	Grado II
24	Muestra 95 (3479)	Grado II
25	QC 44	
26	Muestra 96 (3593)	Seronegativo
27	Muestra 97 (3454)	Grado II
28	Muestra 98 (4499)	Grado I
29	Muestra 99 (3439)	Grado III-IV
30	Muestra 100(3541)	Grado II
31	QC 45	
32	Blanco 14	
33	Blanco 15	
34	Estándar	

Apéndice B. Procedimiento y configuración para MZmine 2.4

1. Filtración de ruido	5. Relleno de vacíos
<ul style="list-style-type: none"> - Nivel MS: 1 - Usar “bins” MS: si - Ancho del “bin” MS: 1.0 - Método de corrección: corrección basal asimétrica: <ul style="list-style-type: none"> Suavizado: 1E6 Asimetría: 0.01 - Motor R: R caller 	<ul style="list-style-type: none"> - Peak Finder <ul style="list-style-type: none"> Tolerancia de intensidad: 20.0% Tolerancia m/z: 0.001 m/z o 0.0 ppm Tolerancia de RT: 3.0 absoluto
2. Detección de picos	
2.1 Detección de masa	
<ul style="list-style-type: none"> - Nivel de ruido: 1.0E4 	
2.2 Construcción de cromatograma ADAP	
<ul style="list-style-type: none"> - Tamaño mínimo del grupo en número de escaneos: 5 - Umbral de intensidad del grupo: 5.0e3 - Intensidad máxima mínima: 1.0E4 - m/z tolerance: 0.05 m/z o 0.0 ppm 	
2.3 Deconvolución	
<ul style="list-style-type: none"> - Algoritmo: Wavelets (ADAP): <ul style="list-style-type: none"> Umbral S/N: 10 Estimador S/N: ventana de intensidad S/N Altura mínima de característica: 300.000 Umbral coef/área: 20 	

Rango de duración del pico: 0.01-1.60

Rango de onda RT: 0.01-1.45

3. Deisotoping

- Tolerancia m/z : 0.005 m/z o 0.0 ppm
- Tolerancia de RT: 3.0 relativo %
- Carga máxima: 2
- Isótopo representativo: más intenso

4. Alineamiento

- Joing aligner

Tolerancia m/z : 0.005 m/z o 0.0 ppm

Peso para m/z : 20

Tolerancia de RT: 3.0 relativo %

Peso para RT: 10

Comparar el patrón isotópico:

tolerancia isótopo m/z : 0.005 m/z o 0.0

ppm

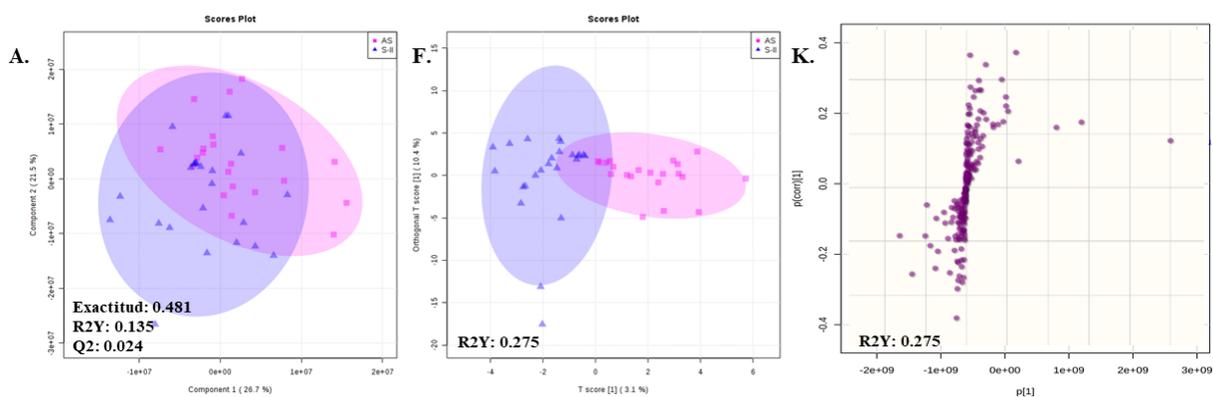
Intensidad mínima absoluta: 1.0E3

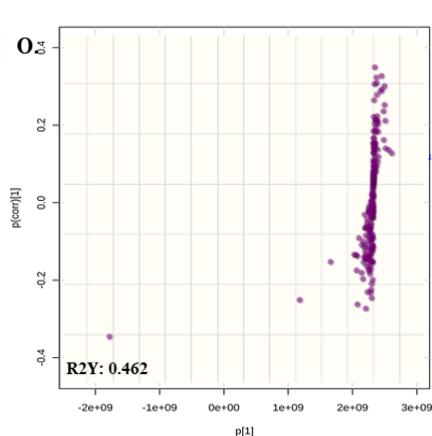
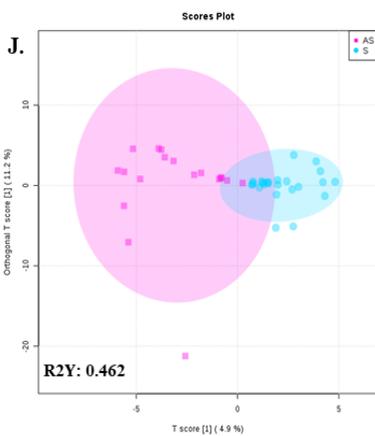
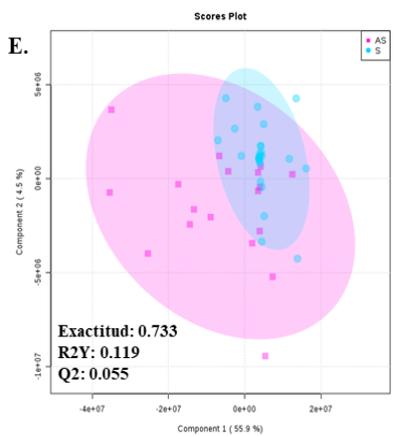
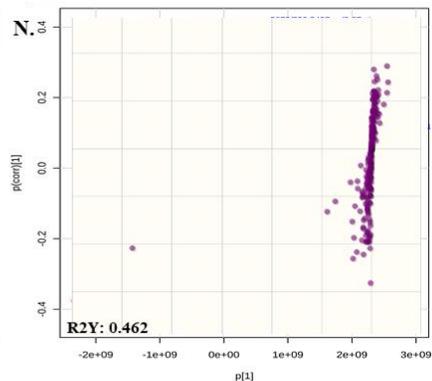
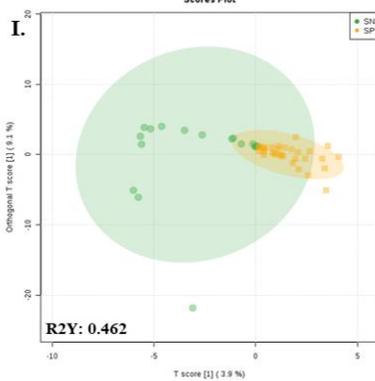
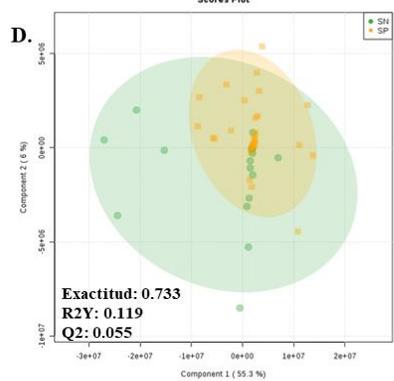
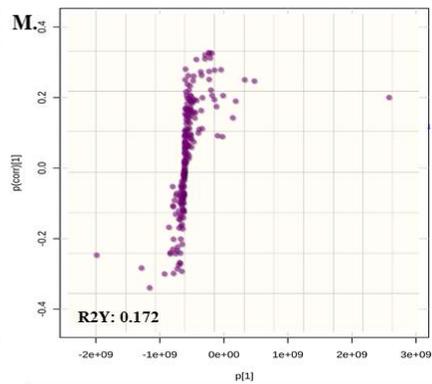
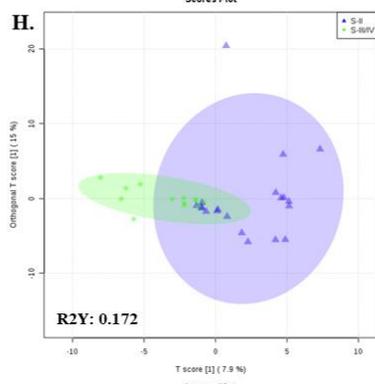
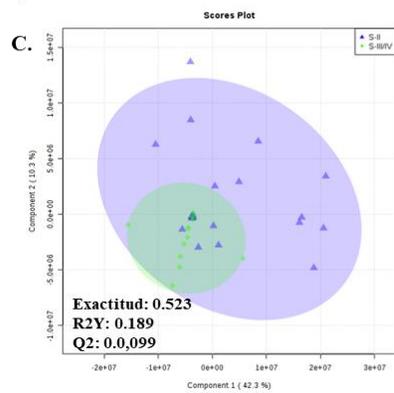
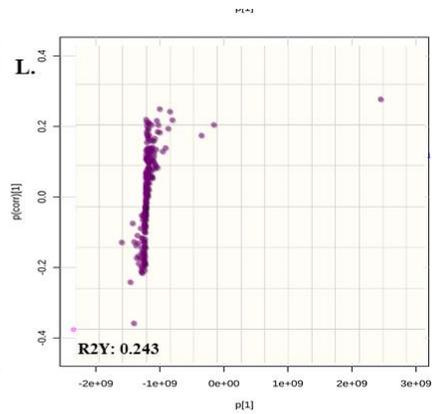
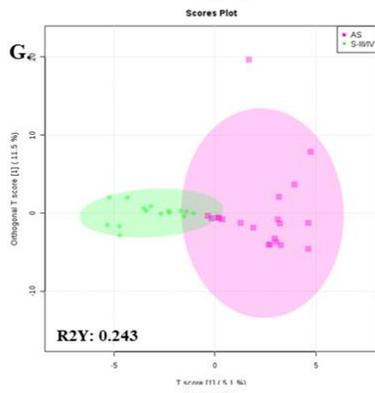
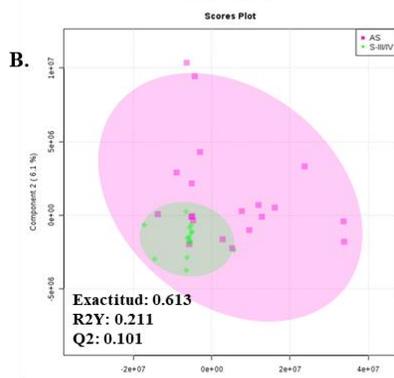
Puntaje mínimo: 65%

Apéndice C. Gráfica del modelo PLS-DA y OPLS-DA de los grupos analizados en modo negativo

Figura 19.

(A-E) Gráfica del modelo de PLS-DA para SP vs SN (A), AS vs S (B), AS vs S-II (C), AS vs S-III/IV (D) y S-II vs S-III/IV (E). (F-J) Gráfica del modelo de OPLS-DA para SP vs SN (F), AS vs S (G), AS vs S-II (H), AS vs S-III/IV (I) y S-II vs S-III/IV (J). (K-O) Gráfica S del modelo ortogonal para SP vs SN (K), AS vs S (L), AS vs S-II (M), AS vs S-III/IV (N) y S-II vs S-III/IV (O). SN están presentados como círculos verdes, SP como cuadrados naranjas, S como círculos celestes, pacientes AS como cuadrados rosados, pacientes S-II como triángulos azul rey y pacientes S-III/IV como rombos verdes. Los criterios de evaluación del PLS-DA y OPLS-DA (R^2X , R^2Y , Q^2) son presentados para cada modelo, todos los gráficos presentan elipsis con el 95% de confianza.





Apéndice D. Tabla de metabolitos detectados en el suero de los grupos de pacientes S vs AS, S-II vs AS, SIII/IV vs AS y SIII/IV vs SII analizados usando HPLC-ESI-IT-MS.

ID	Metabolito	Sigla	Modo de ionización	m/z	RT (min)	Fórmula	Regulación	Log Fold Change	VIP	valor de P
SP vs SN										
4031	Fosfatidilserina (24:1)	PS (24:1)	-	1068.7256	16.37	C54H102NO10P	down	-2.821	1.558	3.818E-05
32935	Gangliósido GM2 (d18:1)	GM2 (d18:1)	+	387.1718	5.84	C61H109N3O26	down	-2.5536	4.891	0.0004497
6059	Fenilalaniltriptófano	Fenilalaniltriptófano	+	393.1952	7.5	C20H21N3O3	down	-1.6245	2.809	0.0009527
1544	Cardiolipina (8:0)	CL(8:0)	+	564.3420	6.32	C51H98O17P2	down	-1.9024	15.11	0.0025865
3155	Fosfatidilserina (15:0)	PS(15:0)	+	743.5059	17.22	C39H70NO10P	down	-1.7331	1.035	0.0040918
33849	Bradiquinina hidroxiprolina	Bradiquinina hidroxiprolina	+	547.3025	11.7	C50H73N15O12	down	-1.5707	2.593	0.0044704
6828	Monometilfosfatidiletanolamina (24:1)	PE-NMe(24:1)	-	984.7128	11.75	C50H98NO8P	down	-1.9456	2.262	0.0067236
3613	Triglicérido de ácido monodocosapentaenoico (22:5)	TG(22:5)	+	1066.8960	6.92	C71H118O6	up	1.8805	1.394	0.0068784
33899	Fosfatidilglicerol (i-12:0/i-12:0)	PG(i-12:0/i-12:0)	+	652.4277	6.8	C30H59O10P	down	-2.0172	5.559	0.0085192
3571	Triglicérido (20:0)	TG(20:0)	+	1047.9320	6.74	C69H122O6	up	2.5248	8.043	0.014948
3783	Triglicérido de ácido dieicosadienoico (20:2n6)	TG(20:2n6)	-	1067.754	16.33	C63H102O6	down	-1.5866	1.145	0.019318
7374	Triglicérido de ácido monodocosapentaenoico (22:5)	TG(22:5)	-	1083.773	17.03	C65H110O5	down	-1.7117	1.321	0.024347
20543	Gangliósido GA2 (d18:1)	GA2 (d18:1)	-	1089.7138	12.28	C56H102N2O18	down	-2.076	1.115	0.026014
21403	Dimetilfosfatidiletanolamina (22:6)	PE-NMe2(22:6)	-	900.6589	10.24	C53H92NO8P	down	-3.4798	2.776	0.027104
42533	Propionilcarnitina	Propionilcarnitina	+	476.2988	6.78	C10H19NO4	down	-1.5242	3.972	0.041666
15234	Gangliósido GM2 (d18:1/18:0)	GM2 (d18:1/18:0)	-	690.9329	15.67	C67H121N3O26	up	2.2422	2.198	0.043307

S vs AS										
32527	Gangliósido GM1(18:1)	GM1(18:1)	+	782.4621	16.15	C73H131N3O3 1	down	-2.4274	2.242	0.0012053
965	Triglicérido de ácido dilignocérico (24:0)	TG(24:0)	+	1063.8697	6.91	C71H114O6	down	-2.0867	2.473	0.0032562
8940	Fosfatidiletanolamina (14:0)	PE(14:0)	+	650.4568	5.55	C37H68NO8P	up	2.4696	1.517	0.0043626
11804	Glicerofosfocolina	Glicerofosfocolina	+	515.2152	10.86	C8H20NO6P	down	-1.611	4.99	0.0064756
34936	Esfingomielina (d16:1)	SM(d16:1)	+	758.6542	6.42	C43H87N2O6P	down	-1.9772	15.63	0.0073286
12096	Cardiolipina (8:0)	CL(8:0)	+	530.3274	9.73	C52H100O17P2	down	-1.7195	2.446	0.0080169
4210	Triglicérido de ácido monodocosahexaenoico (22:6)	TG(22:6)	+	987.7022	11.33	C69H98O6	down	-2.3578	1.295	0.011902
2379	Fosfatidiletanolamina (P-18:1)	PE(P-18:1)	+	815.5699	17.09	C45H76NO7P	down	-2.0339	1.35	0.012449
17212	Ácido fosfatídico (10:0)	PA(10:0)	+	564.3621	6.1	C26H51O8P	up	3.1686	10.09	0.013348
928	Triglicérido (20:0)	TG(20:0)	+	992.8587	6.67	C62H110O6	down	-1.8353	26.96	0.017701
38503	Ácido fosfatídico (14:0)	PA(14:0)	+	696.4888	6.14	C39H69O8P	up	2.7788	17.51	0.019444
4153	Galactosilceramida (d18:1)	GalCer(d18:1)	+	704.5764	5.59	C38H73NO8	down	-1.9719	1.392	0.020946
3873	1-estearoilglicerofosfoglicerol	1-estearoilglicerofosfoglicerol	+	530.3497	8.67	C24H49O9P	up	2.2366	7.589	0.023879
3119	2 beta-hidroxitestosterona	SM(d18:0/24:1(15Z)(OH))	+	609.4146	6.16	C19H28O3	up	2.3528	1.851	0.026958
29236	Tetrahidroneopterina	Tetrahidroneopterina	+	515.2304	10.84	C9H15N5O4	up	1.6898	3.901	0.032723
10611	Prostaglandina F1a	PG F1a	+	740.537	6.11	C20H36O5	up	2.0633	8.003	0.034514
15126	Triglicérido (16:0)	TG(16:0)	+	783.6992	6.24	C47H90O6	down	-1.9486	8.381	0.038355
21924	Ácido sebácico	Ácido sebácico	+	432.2665	6.24	C10H18O4	up	2.3957	5.138	0.038718
4151	Triglicérido de ácido monoerúico (22:1)	TG(22:1)	+	963.8197	7.12	C66H110O6	down	-1.8004	1.809	0.04205
40150	Fosfatidilglicerol (i-12:0)	PG(i-12:0)	+	652.4275	5.89	C30H59O10P	down	-1.5202	7.891	0.046415
41048	N-Lactoilsoleucina	N-Lactoilsoleucina	+	432.2672	6.24	C10H18O4	up	2.2617	4.863	0.046881

S-II vs AS										
35497	Lisofosfolípido (16:1)	LysoPC(16:1)	+	987.6699	11.09	C24H48NO7P	down	-2.458	1.502	0.0007666
10611	Prostaglandina F1a	PG F1a	+	740.537	6.11	C20H36O5	up	2.4649	11.17	0.002273
35527	Gangliósido GM1 (18:1)	GM1(18:1)	+	782.4621	16.15	C73H131N3O31	down	-2.0544	2.237	0.0045968
14650	Ácido lisofosfatídico (22:1)	LysoPA(22:1)	+	525.358	6.56	C25H49O7P	up	1.5271	1.165	0.0064176
60067	Triglicérido de ácido dieicosadienoico (20:2)	TG(20:2)	+	515.216	6.9	C65H106O6	down	-1.7841	19.57	0.0070718
14581	Lisofosfolípido (22:6)	LysoPC(22:6)	+	633.3008	5.62	C30H50NO7P	up	2.6899	4.213	0.0091823
3873	1-estearoilglicerofosfoglicerol	1-estearoilglicerofosfoglicerol	+	530.3497	8.67	C24H49O9P	up	1.979	6.835	0.025486
26348	Fosfatidilglicerol (a-13:0)	PG(a-13:0)	+	652.4487	6.09	C33H65O10P	up	2.25	4.457	0.030776
13592	Butenilcarnitina	Butenilcarnitina	+	476.298	6.14	C11H19NO4	up	1.8944	6.951	0.031643
2641	Arginilmetonina	Arginilmetonina	+	652.3446	15.91	C11H23N5O3S	up	1.6533	2.617	0.035316
4746	Esfingomielina (d16:1)	SM(d16:1)	+	758.6546	6.4	C43H87N2O6P	down	-1.7886	20.11	0.035706
4232	Triglicérido de ácido monodocosahexaenoico (22:6)	TG(22:6)	+	987.6946	11.35	C69H98O6	down	-1.7855	1.289	0.03924
2379	Fosfatidiletanolamina (P-18:1)	PE(P-18:1)	+	815.5699	17.09	C45H76NO7P	down	-1.8571	1.206	0.039252
17616	Cardiolipina (8:0)	CL(8:0)	+	564.3433	6.31	C51H98O17P2	down	-2.047	13.73	0.041537
36648	Triglicérido (20:3)	TG(20:3)	+	1015.828	6.86	C65H106O6	down	-1.5744	19.59	0.043101
38503	Ácido fosfatídico (14:0)	PA(14:0)	+	696.4888	6.14	C39H69O8P	up	1.7206	11.62	0.044072

S-III/IV vs AS										
32527	Gangliósido GM1(18:1)	GM1(18:1)	+	782.4621	16.15	C73H131N3O31	down	-2.2446	2.277	0.0011509
3119	2 beta-hidroxitestosterona	SM(d18:0/24:1(15Z)(OH))	+	609.4146	6.16	C19H28O3	up	2.4741	2.428	0.0023418
30928	14-HDoHE	14-HDoHE	+	740.4914	10.07	C23H32O3	down	-1.9502	2.018	0.0049547
11804	Glicerofosocolina	GPC	+	515.2152	10.86	C8H20NO6P	down	-2.0392	4.69	0.0092893
2379	Fosfatidiletanolamina (P-18:1)	PE(P-18:1)	+	815.5699	17.09	C45H76NO7P	down	-2.2103	1.127	0.010379
17616	Cardiolipina (8:0)	CL(8:0)	+	564.3433	6.31	C51H98O17P2	down	-3.8777	16.1	0.011469
22775	N-lactoifenilalanina	N-lactoifenilalanina	+	516.2329	11	C12H15NO4	up	1.8249	1.053	0.013448
3672	Lisofosfolípido (18:0)	LysoPC(18:0)	+	524.3735	7.05	C26H54NO7P	down	-1.6247	10.95	0.014361
4769	Histidinil-prolina	Histidinil-prolina	+	546.2904	11.58	C11H16N4O3	down	-2.5573	4.736	0.018929
40572	Lisofosfatidilserina (18:1)	LysoPS(18:1)	+	565.3293	5.8	C24H46NO9P	up	2.422	1.546	0.023037
9315	Triglicérido de ácido monodocosahexaenoico (22:6)	TG(22:6)	+	987.699	11.29	C69H98O6	down	-2.1763	1.132	0.02424
28164	Lisofosfolípido (P-16:0)	LysoPC(P-16:0)	+	986.6672	10.92	C24H50NO6P	down	-1.5748	1.388	0.02488
16432	1-estearoilglicerofosfoglicerol	1-estearoilglicerofosfoglicerol	+	530.3475	8.8	C24H49O9P	up	1.7267	6.188	0.025256
34936	Esfingomielina (d16:1)	SM(d16:1)	+	758.6542	6.42	C43H87N2O6P	down	-2.194	19.31	0.029836
11295	Diacilgliceroles (22:0)	DG(22:0)	+	732.6534	6.05	C44H82O5	up	2.2221	3.014	0.030077
7092	Fosfatidilserina (18:3)	PS(18:3)	+	744.4769	17.29	C39H70NO10P	down	-1.8489	1.408	0.033144
15115	4a-hidroxitetrahidrobiopterina	4a-HTHB	+	515.2337	10.79	C9H15N5O4	up	2.0134	2.701	0.033177
8374	Fragmento de somatostatina 3-14	Fragmento de somatostatina 3-14	+	770.8424	15.51	72H98N16O17S	down	-1.6869	2.05	0.042062
2117	Triglicérido de ácido mononervónico (24:1)	TG(24:1)	+	1069.9224	6.81	C71H120O6	down	-1.9146	1.344	0.043295
15126	Monoradigliceroles (0:0)	MG(0:0)	+	783.6992	6.24	C24H48O4	down	-2.0589	6.583	0.04566
16050	Fosfatidilserina (24:0)	PS(24:0)	+	1042.837	6.73	C54H106NO10P	up	1.5285	1.155	0.047432

S-III/IV vs SII										
22775	N-lactoifenilalanina	N-lactoifenilalanina	+	516.2329	11	C12H15NO4	up	1.65	1.613	0.016589
21436	Postina	Postina	+	496.335	7.95	C22H40N8O5	up	2.6745	13.62	0.022708
24477	Octafosfato de adenosina	AP8A	-	1268.9087	15.47	20H32N10O31P	down	-1.4114	1.61	0.025435
7870	Lisofosfolípido (P-16:0)	LysoPC(P-16:0)	+	986.6745	11.05	C24H50NO6P	up	1.7801	3.804	0.025457
50	Gangliósido GD2 (d18:0/14:0)	GM GD2 (d18:0/14:0)	-	808.903	15.5	C75H133N3O34	down	-1.5424	10.38	0.034779
6253	licérido de ácido monoaraquidó	TG(20:4)	-	851.6654	9.93	C57H90O6	up	1.6907	1.228	0.044658
23598	N-palmitoiltaurina	N-palmitoiltaurina	+	432.2357	5.9	C18H37NO4S	down	-2.1173	2.912	0.047138