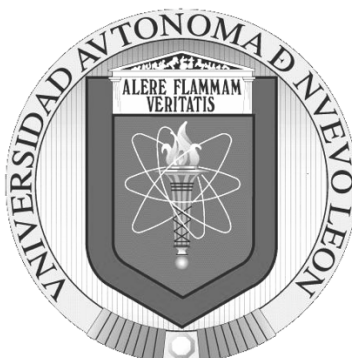


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



ANÁLISIS METAGENÓMICO DE LAS VARIACIONES DEL
VIROMA PLASMÁTICO HUMANO ASOCIADAS A LA OBESIDAD

Por

M.C.P. ALÍ FERNANDO RUIZ HIGAREDA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO
EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA **MOLECULAR E**
INGENIERÍA GENÉTICA

Agosto, 2025

Análisis metagenómico de las variaciones del viroma plasmático humano asociadas a la obesidad

Comité de Tesis



Dra. C. Ana María Guadalupe Rivas Estilla
Directora de tesis



Dr. C. Kame Alberto Galán Huerta
Co director de tesis



Dr. C. Daniel Arellanos Soto
Miembro de la comisión



Dr. Med. Felipe Arturo Morales
Subdirector de estudios de Posgrado

LUGAR DE TRABAJO Y DIRECCIÓN DE TESIS

El presente proyecto se lleva a cabo en el laboratorio de Infectología Molecular del departamento de Bioquímica y Medicina Molecular en la Facultad de Medicina de la UANL, bajo la dirección de la Dra. Ana María G. Rivas Estilla.

Este trabajo se realizó acorde a la declaración de Helsinki y el protocolo fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Medicina y el Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León con el siguiente número de registro: BI24-00002.

DEDICATORIA

A mis padres, a mi hermana, a mis hijos y a mí. Este trabajo no solo es fruto de mi esfuerzo, sino también del apoyo incondicional que me ha permitido llegar hasta aquí. Dicho apoyo proviene, principalmente, de mis padres, quienes además de darme la vida, me han brindado día a día el sustento para poder estar donde quiero estar. Este logro es para ellos. Se lo dedico también a mi hermana, quien junto a mis padres me ha ofrecido el respaldo que siempre he requerido.

Y, por supuesto, me lo dedico a mí. Sin caer en la soberbia, me atrevo a decir que en este pequeño pero significativo trabajo he plasmado mi dedicación, resiliencia, talento y esfuerzo.

Agradezco enormemente a mi familia y a mí mismo por nunca rendirnos y por siempre dar más de lo necesario para que yo pudiera cumplir mis sueños y alcanzar mis metas.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco plenamente a todas las personas e instituciones que me apoyaron desde el inicio en la realización de este proyecto de investigación, el cual me permitió obtener el grado académico de **Maestría en Ciencias con orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética**.

En primer lugar, expreso mi más sincero reconocimiento a mi directora de tesis, **Dra. C. Ana María G. Rivas Estilla**, por darme las oportunidades que me ha brindado, por compartir conmigo su conocimiento y experiencia, y por enseñarme tanto en el ámbito científico-profesional como en el personal. Su orientación y confianza fueron determinantes para la culminación de este trabajo.

Gracias también a todo el personal del **Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular**, y de manera muy especial a **Deyanira, Ruth y Vicky**, cuyo apoyo fue importante.

Extiendo mi agradecimiento a mis compañeros de **CIIViM**, tanto trabajadores como estudiantes de pregrado y posgrado, por el apoyo y la convivencia a lo largo de este proceso. En especial, agradezco a la **LBG Vianney Alfaro**, a la **LBG Cynthia**, a la **QCB Ilse**, a las **QCB Liz y Katya**, al **aptámero Frankie**, al **QCB Jona**, al **Dr. Sebastian Sánchez** y a **Mycoplasma spp.**, por la amistad, el respaldo y los momentos compartidos, que hicieron más llevadero este camino.

Quiero expresar un reconocimiento muy especial a la **Dra. Med. Blanca Esthela Álvarez Salas**, a la **MC. Itzel Sarai Salmón Cабrales** y al **Dr. C. Martín Gerardo García Juárez**, quienes desempeñaron un papel fundamental en el desarrollo de este proyecto y en mi formación personal y profesional. Su apoyo, consejos y acompañamiento marcaron una diferencia decisiva en este camino. También agradezco a la **Dra. C. Sonia Amelia Lozano Sepúlveda**, por su constante apoyo y orientación, y al **Dr. Daniel Arellanos**, por el respaldo brindado especialmente en los inicios de mi trayectoria en **CIIViM**.

Asimismo, agradezco a la **Dra. Tania Guadalupe Heredia Torres**, a la **Dra. C. Cynthia Martínez** y a la **MC. Verónica Alvarado**, por sus valiosos consejos, respaldo y compañía a lo largo de esta etapa. De manera especial, quiero agradecer a **Julio Garza**, por la lección de vida que me dio; y al **Dr. C. Kame Alberto Galán Huerta**, por su apoyo y la amistad que en su momento me brindó. Mi gratitud también para la **MC. Karen López Riojas**, ya que sin ella no habría tenido la oportunidad laboral que me sostuvo en este tiempo.

Finalmente, agradezco profundamente a mi familia: a mis padres, **Alí Ruiz Guzmán** y **María Higareda Amezcua**, así como a mi hermana **Carol Ruiz Higareda** y a mis hijos **Leo Ruiz PhD**, **Venus** y **Lilith**, por lo ya expresado en la dedicatoria y por ser la base fundamental que me ha sostenido durante este proceso.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	7
ÍNDICE DE FIGURAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS	9
INTRODUCCIÓN	13
ANTECEDENTES	19
El viroma humano en la salud: inmunidad, homeostasis y microbioma	19
Secuenciación metagenómica del viroma humano: técnicas, hallazgos y limitaciones	23
Brecha de conocimiento: viroma circulante en sangre y su relación con la obesidad.....	26
JUSTIFICACIÓN	28
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	29
OBJETIVOS.....	29
Objetivo principal	29
Objetivos específicos	29
METODOLOGÍA	30
Reclutamiento de sujetos de investigación y obtención de plasma	31
Aislamiento de ácidos nucleicos	36
Amplificación de ARN por medios de SISPA.....	38
Amplificación de ADN por medio de MDA	40
Secuenciación de ácidos nucleicos	42
Análisis de datos.....	45
RESULTADOS	49
Objetivo 1. Caracterización clínica y antropométrica de los participantes	49
Distribución clínica de obesidad y hábitos de vida	52
Calidad de vida y síntomas psicológicos	53
Objetivo 2 y 3. Secuenciación metagenómica de virus circulantes	57
Estandarización del método SISPA	57
Estandarización del método MDA	59
Obtención de perfiles virómicos	60
Identificación específica de anellovirus mediante filogenia	70
Anellovirus secuenciados	72
Detección de virus ARN.....	73

Objetivo 4. Perfiles virómicos y obesidad.....	74
Asociación entre el viroma plasmático y obesidad	75
Presencia de Anellovirus según nivel de grasa corporal	75
Número total de virus ensamblados por paciente	76
Distribución del rango de grasa corporal en relación con anellovirus.....	77
<i>DISCUSIÓN.....</i>	79
Caracterización de sujetos de estudio	79
Perfiles virómicos	80
Asociaciones en composición del viroma plasmático y obesidad.....	82
<i>CONCLUSIÓN</i>	85
<i>REFERENCIAS.....</i>	87

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación del estudio.	33
Tabla 3. Variables antropométricas recolectadas.	36
Tabla 4. Mezcla para amplificación en la ronda B del SISPA.	39
Tabla 5. Programa del termociclador para amplificación en ronda B del SISPA.	39
Tabla 6. Características clínicas de los sujetos según la presencia de grasa corporal elevada. ..	50
Tabla 7. Comparación de síntomas psicológicos y calidad de vida según porcentaje de grasa corporal.	54
Tabla 8. Comparación de puntajes de DASS-21 y IWQOL según la etapa del sistema EOSS. .	55
Tabla 9. Especies anellovirales detectadas por sujeto.	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Representación del viroma humano como un ecosistema dinámico.....	13
Figura 2 Interacciones del viroma humano con el huésped y el microbioma	14
Figura 3 Ilustración de las proteínas sensoras de productos virales y su integración para la transcripción génica.	15
Figura 4 Esquema de estrategia experimental general.	31
Figura 5. Esquema del flujo de trabajo para la secuenciación con tecnología Nanopore.....	42
Figura 6. Preparación rápida de la biblioteca de secuenciación con códigos de barras.	43
Figura 7. Flujo de trabajo bioinformático para el análisis metagenómico.....	45
Figura 8. Esquema del Flujo de Trabajo para el Análisis Estadístico.	47
Figura 9. Asociación entre IMC y porcentaje de de grasa corporal.	51
Figura 10. Distribución de pacientes según etapa clínica de obesidad (EOSS).....	52
Figura 11. Hábitos relacionados con el estilo de vida.....	53
Figura 12. Tendencia de puntajes de calidad de vida (IWQOL) según etapa de obesidad.	55
Figura 13. Distribución de puntajes DASS-21 según etapa de obesidad.	56
Figura 14 Concentración de ADNdc pre y post reacción de síntesis de doble cadena	57
Figura 15 Gel agarosa de productos de SISPA.	59
Figura 16 Gel de agarosa del producto del MDA.	60
Figura 17. Distribución de calidad de lecturas de secuenciación (Q score).....	61
Figura 18. Clasificación taxonómica por K-mers de lecturas secuenciadas en plasma.	62
Figura 19. Clasificación taxonómica de lecturas por individuo.	63
Figura 20. Clasificación taxonómica de lecturas no humanas por clase.	64
Figura 21. Perfil taxonómico del plasma en individuos con diferente porcentaje de grasa corporal.	65
Figura 22. Perfil viromico en plasma según el nivel de grasa corporal.	66
Figura 23. Clasificación de secuencias virales.	67
Figura 24. Estado de ensamblaje de genomas virales por individuo y grupo de grasa corporal.	68
Figura 25. Cobertura de lectura de un genoma viral ensamblado.	69
Figura 26. Relación filogenética de anellovirus detectados en plasma mediante análisis bayesiano.	71
Figura 27. Distribución de especies anellovirales según el porcentaje de grasa corporal.	74
Figura 28. Presencia de Anellovirus según el nivel de grasa corporal.....	75
Figura 29. Número total de virus ensamblados por paciente según el grupo de grasa corporal..	76
Figura 30. Efecto ajustado de la infección por anellovirus en el rango de grasa corporal.	77

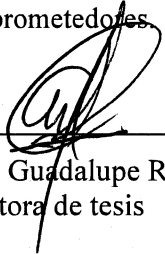
LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

Abreviatura	Significado
NGS	<i>Next-Generation Sequencing</i> (Secuenciación de Nueva Generación)
SISPA	<i>Sequence-Independent Single-Primer Amplification</i> (Amplificación de cebador único independiente de la secuencia)
MDA	<i>Multiple Displacement Amplification</i> (Amplificación por desplazamiento múltiple)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa)
RT-PCR	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa)
cDNA	<i>Complementary DNA</i> (ADN complementario)
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido ribonucleico)
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> (Ácido etilendiaminotetraacético)
TAE	<i>Tris-acetato-EDTA</i>
TBE	<i>Tris-borato-EDTA</i>
MCC	<i>Maximum Clade Credibility</i> (Máxima credibilidad del clado)
MCMC	<i>Markov Chain Monte Carlo</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BIC	<i>Bayesian Information Criterion</i> (Criterio de información bayesiano)
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
MAFFT	<i>Multiple Alignment using Fast Fourier Transform</i> (Alineación múltiple mediante la transformada rápida de Fourier)
BEAST	<i>Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees</i> (Árboles de muestreo del análisis evolutivo bayesiano)
IMC	<i>Índice de Masa Corporal</i>
EOSS	<i>Edmonton Obesity Staging System</i> (Sistema de estadificación de la obesidad de Edmonton)
IWQOL	<i>Impact of Weight on Quality of Life</i> (Impacto del peso en la calidad de vida)
DASS-21	<i>Depression, Anxiety and Stress Scale - 21 items</i> (Escala de depresión, ansiedad y estrés - 21 ítems)
TTV	<i>Torque teno virus</i>
TTMV	<i>Torque teno mini virus</i>
VPH	<i>Virus del papiloma humano</i>
HSV-1/2	<i>Herpes Simplex Virus tipo 1 y 2</i>
Ad-36	<i>Adenovirus serotipo 36</i>
CMV	<i>Cytomegalovirus</i>
EBV	<i>Epstein-Barr Virus</i>
VZV	<i>Varicella-Zoster Virus</i>

Abreviatura	Significado
HHV-7	<i>Herpesvirus humano 7</i>
RIG-I	<i>Retinoic acid-Inducible Gene I (Gen inducible por ácido retinoico I)</i>
MDA-5	<i>Melanoma Differentiation-Associated protein 5 (Proteína asociada a la diferenciación del melanoma 5)</i>
cGAS	<i>cyclic GMP-AMP Synthase (GMP-AMP cíclico sintasa)</i>
ORF1	<i>Open Reading Frame 1 (marco de lectura abierto 1)</i>
TLR	<i>Toll-Like Receptor (Receptor tipo Toll)</i>
ORF1	<i>Open Reading Frame 1 (marco de lectura abierto 1)</i>
DMSO	<i>Dimetilsulfóxido</i>
DTT	<i>Ditiotreitol</i>
dNTPs	<i>Deoxynucleotide Triphosphates (Trifosfatos de desoxinucleótidos)</i>
ng	<i>nanogramo (10^{-9} gramos)</i>
µg o ug	<i>microgramo (10^{-6} gramos)</i>
mg	<i>miligramo (10^{-3} gramos)</i>
g	<i>gramo</i>
µL o uL	<i>microlitro (10^{-6} litros)</i>
mL	<i>mililitro (10^{-3} litros)</i>
L	<i>litro</i>
nM	<i>nanomolar (10^{-9} moles/L)</i>
µM o uM	<i>micromolar (10^{-6} moles/L)</i>
mM	<i>milimolar (10^{-3} moles/L)</i>
M	<i>molar (moles por litro)</i>
ng/µL	<i>nanogramos por microlitro</i>
ng/mL	<i>nanogramos por mililitro</i>
µg/mL	<i>microgramos por mililitro</i>
s	<i>segundos</i>
min	<i>minutos</i>
h	<i>horas</i>
°C	<i>grados Celsius</i>
K	<i>kelvin (rara vez usada aquí)</i>
bp	<i>base pairs (pares de bases)</i>
kb o Kb	<i>kilobase pairs (mil pares de bases)</i>
Mb	<i>megabase pairs (millón de pares de bases)</i>
rpm	<i>revoluciones por minuto (centrífuga)</i>
g (centrífuga)	<i>fuerza centrífuga relativa</i>
Ct	<i>Cycle threshold (en PCR)</i>

RESUMEN

Introducción: El viroma humano, componente esencial del microbioma, incluye virus eucariotas, bacteriófagos y elementos virales endógenos que interactúan con el sistema inmunológico e influyen en la salud metabólica. Su estudio relacionado con la adiposidad ofrece una perspectiva novedosa sobre enfermedades crónicas. **Objetivo:** Caracterizar el viroma plasmático humano en adultos con y sin enfermedad crónica basada en adiposidad, mediante secuenciación metagenómica. **Métodos:** Se reclutaron 20 adultos (edad media: 45 ± 10 años) mediante muestreo por conveniencia, emparejados por sexo y edad, a partir de cuyo plasma se procesaron los ácidos nucleicos virales de forma diferenciada: el ARN se amplificó con la técnica SISPA y el ADN con MDA. Las bibliotecas genéticas resultantes se secuenciaron en una plataforma MinION (Oxford Nanopore) y los datos se analizaron bioinformáticamente para filtrar lecturas humanas, realizar una clasificación taxonómica (Kraken2/Bracken), ensamblar genomas *de novo* (Flye) y aplicar análisis de filogenia bayesiana para una identificación precisa. Finalmente, se utilizaron pruebas estadísticas en R para correlacionar la composición del viroma con las variables clínicas y antropométricas de los participantes. **Resultados:** La caracterización de los participantes ($n=20$) mostró diferencias entre el grupo con grasa corporal elevada ($n=14$) y el control ($n=6$). El grupo adiposo presentó mayor IMC y porcentaje de grasa corporal ($p<0.05$), junto con menor puntuación en IWQOL ($p=0.013$). El viroma plasmático consistió exclusivamente en virus de ADN, sin detección de virus ARN. Se observó mayor prevalencia de anellovirus en el grupo adiposo (71.4%, 10/14) vs. control (16.7%, 1/6; $p=0.0498$, Fisher exacta). La riqueza viral (número de genomas distintos) fue superior en el grupo adiposo ($p=0.033$, Mann-Whitney U). Especies detectadas de Anelloviridae incluyeron TTV-3, TTV-9, TTV-13, TTV-16, TTV-17, TTV-18, TTV-24 (Alphatorquevirus) y TTMV-1 (Betatorquevirus), confirmadas mediante filogenia bayesiana basada en ORF1. **Conclusión:** Este estudio vincula cuantitativamente viroma plasmático y adiposidad. Prevalencia de Anelloviridae superior en grupo con grasa elevada (10/14, 71.4%) vs. control (1/6, 16.7%; $p=0.0498$), extendida a mayor riqueza viral ($p=0.033$). Viroma exclusivo de ADN (e.g., Torque teno virus) sugiere disbiosis viral específica ligada a estados metabólicos alterados, posicionando estos virus como biomarcadores prometedores.



Dra. C. Ana María Guadalupe Rivas Estilla
Directora de tesis

ABSTRACT

Introduction: The human virome, an essential component of the microbiome, includes eukaryotic viruses, bacteriophages, and endogenous viral elements that interact with the immune system and influence metabolic health. Its study in relation to adiposity offers a novel perspective on chronic diseases. **Objective:** To characterize the human plasma virome in adults with and without adiposity-based chronic disease, through metagenomic sequencing. **Methods:** Twenty adults (mean age: 45 ± 10 years) were recruited by convenience sampling, matched for sex and age, from whose plasma viral nucleic acids were processed differentially: RNA was amplified using the SISPA technique, and DNA with MDA. The resulting genetic libraries were sequenced on a MinION (Oxford Nanopore) platform, and the data were bioinformatically analyzed to filter human reads, perform taxonomic classification (Kraken2/Bracken), assemble de novo genomes (Flye), and apply Bayesian phylogenetic analysis for precise identification. Finally, statistical tests in R were used to correlate virome composition with the clinical and anthropometric variables of the participants. **Results:** Characterization of the participants ($n=20$) showed differences between the high body fat group ($n=14$) and the control group ($n=6$). The adipose group showed higher BMI and body fat percentage ($p<0.05$), along with a lower IWQOL score ($p=0.013$). The plasma virome consisted exclusively of DNA viruses, with no detection of RNA viruses. A higher prevalence of anelloviruses was observed in the adipose group (71.4%, 10/14) vs. the control group (16.7%, 1/6; $p=0.0498$, Fisher's exact test). Viral richness (number of distinct genomes) was higher in the adipose group ($p=0.033$, Mann-Whitney U test). Detected Anelloviridae species included TTV-3, TTV-9, TTV-13, TTV-16, TTV-17, TTV-18, TTV-24 (Alphatorquevirus), and TTMV-1 (Betatorquevirus), confirmed by Bayesian phylogeny based on ORF1. **Conclusion:** This study quantitatively links the plasma virome and adiposity. A higher prevalence of Anelloviridae was found in the high-fat group (10/14, 71.4%) vs. the control group (1/6, 16.7%; $p=0.0498$), which extended to a greater viral richness ($p=0.033$). The exclusively DNA virome (e.g., Torque teno virus) suggests a specific viral dysbiosis linked to altered metabolic states, positioning these viruses as promising biomarkers.



Dra. C. Ana María Guadalupe Rivas Estilla
Directora de tesis

INTRODUCCIÓN

El viroma humano se define como el conjunto de todos los virus o elementos virales presentes en y sobre el cuerpo humano, incluyendo tanto los virus que infectan células humanas como aquellos que infectan a nuestros microorganismos comensales, como los bacteriófagos (Liang & Bushman, 2021). Este ecosistema viral constituye una comunidad compleja y dinámica, en constante evolución mediante mutaciones, recombinación y transferencia genética entre especies. Está formado por virus eucariotas, elementos virales endógenos y fagos bacterianos (Virgin et al., 2014; Jankauskaitė et al., 2018), tal como se ilustra en la Figura 1, donde se representa al viroma como un ecosistema influenciado por interacciones entre reinos y la variabilidad genética del huésped.

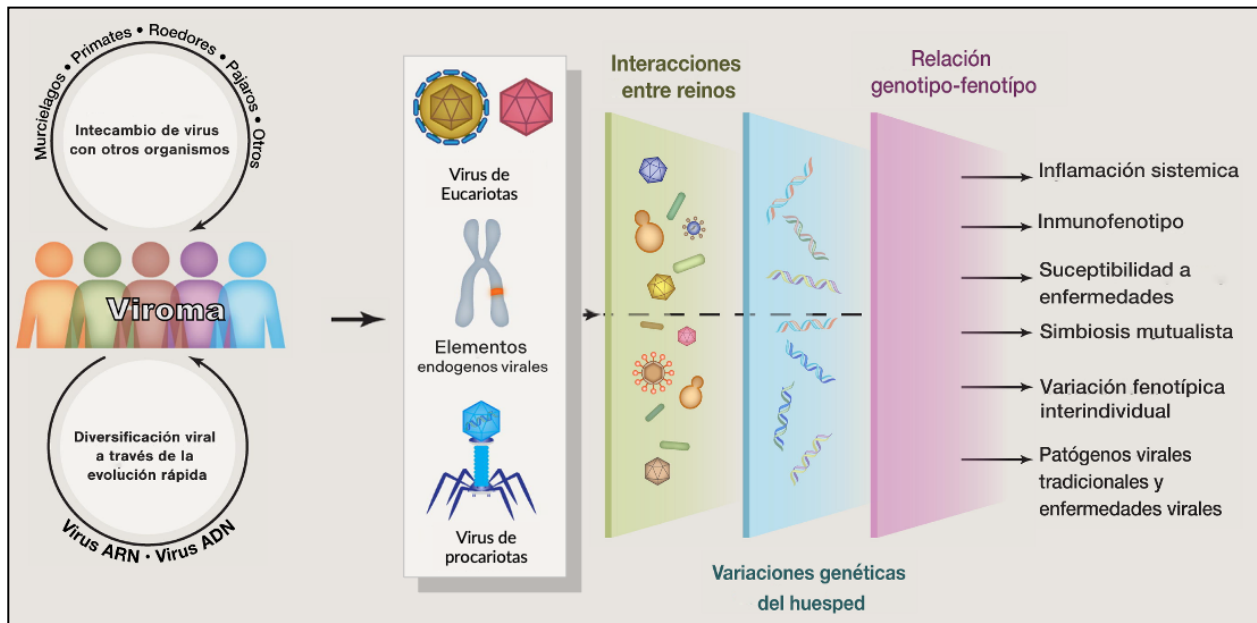


Figura 1 Representación del viroma humano como un ecosistema dinámico.

La figura ilustra el viroma humano como un componente dinámico del microbioma, destacando sus interacciones multifactoriales. Esquema adaptado de Virgin, Herbert W, et al. “The Virome in Mammalian Physiology and Disease.” Cell 157 (2014).

Se estima que un individuo sano alberga alrededor de 10^{13} partículas virales, con una notable variabilidad entre individuos según factores como edad, dieta, ambiente y genética (Liang & Bushman, 2021). En las últimas décadas, se ha reconocido al viroma como un componente

funcional del microbioma humano, implicado en procesos inmunológicos, metabólicos y de homeostasis del huésped (Cadwell, 2015).

Las interacciones entre el viroma y el organismo humano abarcan desde efectos inmunoestimuladores hasta la modulación de la microbiota bacteriana. Los virus eucariotas pueden inducir inmunidad innata o causar infecciones crónicas, mientras que los fagos influyen sobre la diversidad bacteriana, transfieren ADN y activan vías inmunológicas como la señalización TLR (Liang et al., 2021), como se muestra en la Figura 2. A nivel molecular, sensores intracelulares como TLR, RIG-I o cGAS detectan productos virales y desencadenan la activación de programas transcripcionales específicos, que contribuyen a la regulación inmune (Virgin et al., 2014; Figura 3).

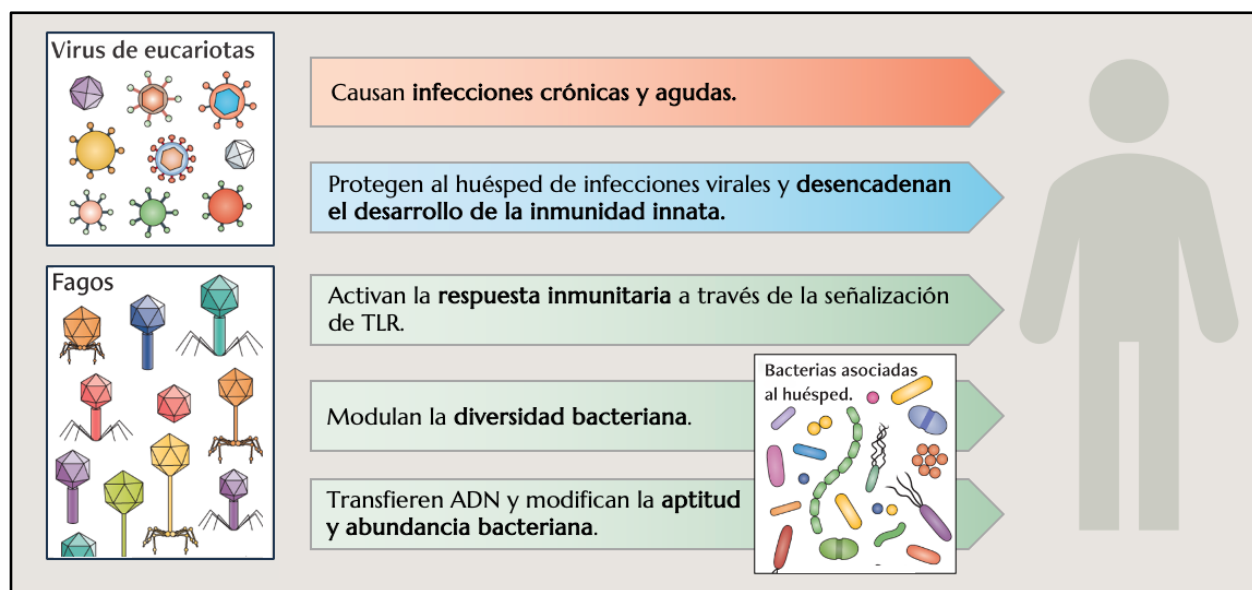


Figura 2 Interacciones del viroma humano con el huésped y el microbioma

Relación entre los virus de eucariotas y los fagos con el huésped humano. Los virus de eucariotas pueden causar infecciones crónicas y agudas, además de proteger al huésped al desencadenar la inmunidad innata. Los fagos influyen en la diversidad bacteriana, modulan la aptitud y abundancia de las bacterias asociadas al huésped, transfieren ADN y activan la respuesta inmunitaria a través de la señalización de TLR. Esquema adaptado de Liang, et al. "The human virome: assembly, composition and host interactions." *Nat. Rev. Microbiol.* (2021).

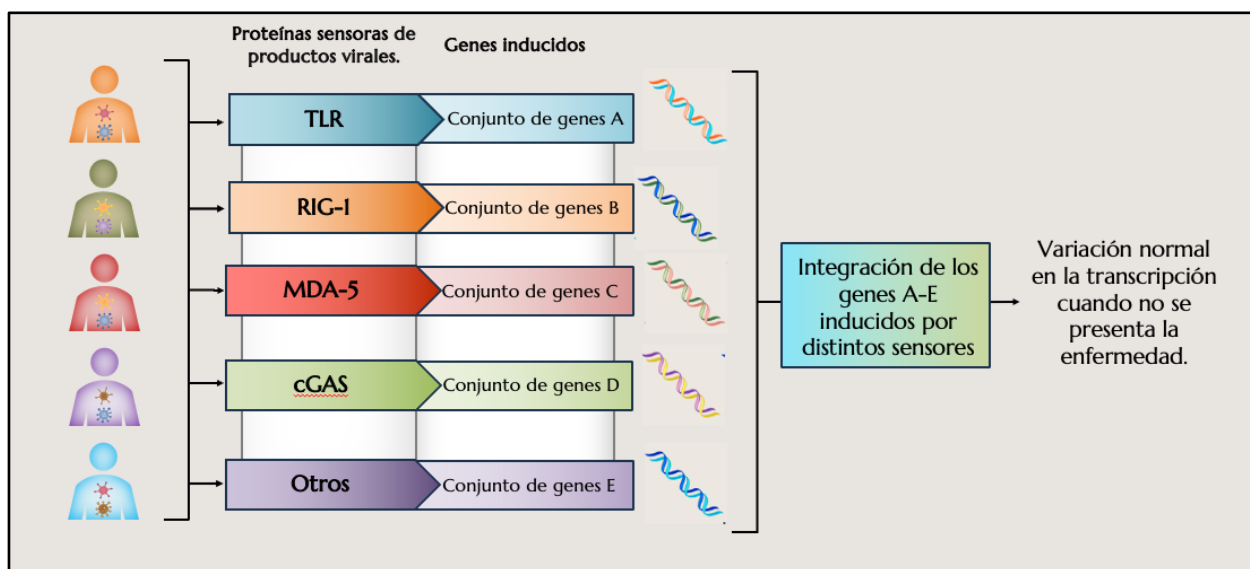


Figura 3 Ilustración de las proteínas sensoras de productos virales y su integración para la transcripción génica.

El esquema muestra el mecanismo mediante el cual el sistema inmune innato detecta la presencia de componentes virales y coordina una respuesta a nivel genético. Proteínas sensoras especializadas (receptores de reconocimiento de patrones) como TLR, RIG-I, MDA-5 y cGAS, reconocen distintas estructuras moleculares virales. Al activarse, cada una desencadena vías de señalización que inducen la transcripción de conjuntos específicos de genes (representados como A-E). El concepto central es la integración de estas múltiples señales, lo que permite una respuesta transcripcional robusta y finamente regulada. Este sistema de vigilancia no solo actúa durante una infección, sino que también contribuye a la "variación normal en la transcripción" en estado de salud, ayudando a mantener la homeostasis fisiológica del organismo. Esquema adaptado de Virgin, Herbert W, et al. "The Virome in Mammalian Physiology and Disease." Cell 157 (2014).

En este contexto, ha surgido una creciente hipótesis sobre la participación del viroma en enfermedades metabólicas como la obesidad. Esta es una enfermedad crónica, heterogénea y progresiva, caracterizada por la acumulación excesiva o disfuncional de tejido adiposo, que deteriora la salud general, la calidad de vida y aumenta la mortalidad (Lingvay et al., 2024). La Organización Mundial de la Salud define la obesidad clínicamente como un índice de masa corporal (IMC) $\geq 30 \text{ kg/m}^2$, aunque este parámetro presenta limitaciones al no reflejar distribución

ni funcionalidad del tejido adiposo. Su diagnóstico se complementa idealmente con mediciones antropométricas adicionales y la evaluación del impacto metabólico individual.

La obesidad afecta a más de 890 millones de adultos en todo el mundo y su prevalencia ha casi triplicado desde 1975, con una proyección superior a los mil millones para 2030 (Lingvay et al., 2024). Esta condición se asocia a una amplia gama de consecuencias metabólicas, anatómicas y psicosociales, incluyendo diabetes tipo 2, hipertensión, enfermedades cardiovasculares, apnea del sueño, ciertos tipos de cáncer, y deterioro de la salud mental. La etiología de la obesidad es multifactorial e involucra la interacción entre factores genéticos, biológicos y ambientales. El entorno obesogénico, caracterizado por alta disponibilidad de alimentos ultraprocesados, baja actividad física y exposición a disruptores endocrinos, ha sido señalado como principal impulsor del aumento global en su prevalencia.

A nivel fisiopatológico, la expansión del tejido adiposo se acompaña de inflamación crónica de bajo grado, disfunción del sistema inmune y alteraciones hormonales que promueven resistencia a la insulina, estrés oxidativo y disfunción endotelial (Lingvay et al., 2024). Dada esta complejidad biológica, se ha propuesto que otros componentes del microbioma, incluido el viroma, podrían contribuir al desarrollo o mantenimiento de la obesidad.

Estudios recientes han reportado disbiosis viral intestinal en personas con obesidad, particularmente con menor diversidad de virus comensales y alteraciones en la abundancia de anellovirus y crAssphage (Yang et al., 2021; Cervantes-Echeverría et al., 2023). Estas modificaciones podrían relacionarse con cambios en la microbiota bacteriana, alteraciones inmunológicas sutiles y aumento de la inflamación sistémica, aspectos relevantes en la fisiopatología de la obesidad.

Sin embargo, la mayoría de la investigación se ha enfocado en el viroma intestinal (a partir de muestras fecales) o en modelos animales, mientras que el viroma circulante en sangre humana ha sido escasamente explorado. La sangre, lejos de ser estéril, contiene una diversidad de secuencias virales, principalmente anellovirus, incluso en individuos sanos (Moustafa et al., 2017;

Cebriá-Mendoza et al., 2021), pero se desconoce si esta comunidad viral plasmática difiere entre personas con obesidad y aquellas con peso saludable.

Considerando lo anterior, el presente estudio se propuso caracterizar el viroma plasmático humano y explorar su asociación con la composición corporal y parámetros clínicos metabólicos. En particular, nuestro objetivo general fue perfilar, mediante secuenciación metagenómica, los virus circulantes en plasma de individuos con y sin obesidad, para determinar si el repertorio viral (diversidad, abundancia de familias virales como Anelloviridae, presencia de fagos intestinales, etc.) difiere según el estado corporal. Asimismo, se buscó examinar posibles correlaciones entre las características del viroma y marcadores clínicos relevantes (como indicadores antropométricos, perfiles inflamatorios o metabólicos), con la hipótesis de que ciertas firmas virales se asocien al fenotipo obesidad.

Comprender la composición y función del viroma plasmático en la obesidad podría tener implicaciones importantes para el desarrollo de estrategias de medicina de precisión, incluyendo el uso de firmas virales como biomarcadores diagnósticos o terapéuticos en enfermedades metabólicas.

Además, el viroma regula la expresión génica mediante sensores virales, como TLR, RIG-I, MDA-5 y cGAS, que detectan la presencia viral y activan conjuntos de genes específicos esenciales para la defensa inmunológica (Figura 3). Si bien estos mecanismos son vitales para mantener la homeostasis, las interrupciones provocadas por infecciones virales o respuestas inmunológicas desreguladas pueden llevar a la activación aberrante de genes y al desarrollo de enfermedades. Esta delicada interacción subraya el papel del viroma como un contribuyente tanto a la salud como a la patología (Virgin, 2014).

La investigación ha demostrado que, incluso en ausencia de condiciones patológicas, el viroma desempeña un papel crucial en la fisiología humana. Un estudio que analizó a más de 8,000 individuos sanos reveló que el torrente sanguíneo humano contiene una notable diversidad de secuencias virales, incluidos herpesvirus y anellovirus (Moustafa et al., 2017). Estos virus, presentes de manera ubicua en distintas poblaciones, no están asociados con enfermedades específicas, pero podrían contribuir al mantenimiento de la homeostasis inmunitaria. Este hallazgo

destaca la exposición constante del cuerpo humano a elementos virales y su posible impacto en el equilibrio biológico.

La detección de estos virus en individuos sanos sugiere que la exposición continua a elementos virales es una característica normal de la biología humana, con potencial para regular el sistema inmunológico y mantener un equilibrio esencial para la salud general (Jankauskaitė et al., 2018; Scarpellini et al., 2015; Garmaeva et al., 2019; Abeles & Pride, 2014). Por ejemplo, algunos virus pueden influir en la maduración y función de las células inmunitarias, lo que es fundamental para una respuesta adecuada frente a patógenos (White et al., 2014).

Además, el estudio de la diversidad viral en personas sanas plantea preguntas clave sobre la relación entre el viroma y la salud. La identificación de virus que no causan enfermedades, pero que forman parte del organismo, sugiere que estos elementos virales podrían desempeñar funciones aún desconocidas, abriendo nuevas perspectivas para la investigación en microbiología y virología (Hassan, 2022).

ANTECEDENTES

El viroma humano en la salud: inmunidad, homeostasis y microbioma

El viroma humano se refiere al conjunto completo de virus que habitan en el cuerpo humano, incluyendo tanto los virus que infectan células humanas como los virus que infectan a nuestras bacterias comensales (bacteriófagos). La diversidad y magnitud del viroma es asombrosa: se estima que un individuo sano alberga onzas del orden de 10^{13} partículas virales, un número comparable al de sus células corporales (Cadwell, 2015). Una fracción predominante de estos virus son bacteriófagos que conviven con el microbioma bacteriano, mientras que una minoría son virus que infectan directamente células humanas (como herpesvirus, adenovirus, poliomavirus, entre otros). Muchos de estos virus están presentes de forma crónica sin causar enfermedad aparente, por ejemplo, los Anellovirus (familia Anelloviridae) se detectan de manera ubicua en humanos sin asociarse a patología conocida. Cada persona tiene un viroma único y dinámico, pero estudios longitudinales sugieren que, en condiciones saludables, la composición viral individual puede permanecer relativamente estable en el tiempo (Cadwell, 2015; Virgin et al., 2014).

Lejos de ser meros agentes patógenos, los virus comensales desempeñan un papel importante en la homeostasis inmunológica y microbiana del huésped. El viroma se considera ahora un componente integral del microbioma y un modulador clave del sistema inmunitario. Por un lado, los bacteriófagos regulan las poblaciones bacterianas mediante ciclos de infección lítica o lisogénica, influyendo en la composición y metabolismo de la microbiota intestinal. Este "control" viral puede afectar procesos del huésped como la producción de ácidos grasos de cadena corta y el metabolismo de ácidos biliares, contribuyendo indirectamente al equilibrio metabólico y nutricional (Cao et al., 2022). Por otro lado, existe evidencia de que los virus presentes en mucosas y otros tejidos interactúan directamente con el sistema inmune. Por ejemplo, en el intestino los fagos pueden adherirse a la capa mucosa y actuar como una barrera antimicrobiana frente a bacterias patógenas, reduciendo su adherencia y colonización. Además, se ha observado que partículas virales atraviesan el epitelio intestinal hacia la circulación sistémica (traslocación), donde son detectadas por células inmunitarias innatas, desencadenando la liberación de citocinas (p. ej. interferón gamma) y mejorando la opsonización y reconocimiento de bacterias. Se estima que alrededor de 3×10^{10} (30 mil millones) de fagos atraviesan diariamente el epitelio gastrointestinal hacia la sangre humana, interactuando con leucocitos y modulando su actividad.

Estas interacciones bidireccionales dan forma a una relación simbiótica: los virus moldean el desarrollo y función del sistema inmunitario, y recíprocamente la inmunidad del huésped y el microbioma bacteriano influyen en la composición del viroma.

La inmunomodulación viral puede tener consecuencias tanto perjudiciales como beneficiosas para el huésped. Por una parte, se ha implicado la infección viral crónica en ciertas enfermedades inflamatorias y autoinmunes, por ejemplo, la infección latente por Epstein-Barr se ha asociado con mayor riesgo de enfermedades autoinmunes en individuos genéticamente predispuestos (Cadwell, 2015; Ken Cadwell, Immunity). Las infecciones persistentes pueden alterar los equilibrios de citocinas y poblaciones linfocitarias a largo plazo, contribuyendo a estados de inflamación subclínica. Por otra parte, los virus comensales también pueden conferir efectos benéficos inesperados. Estudios en modelos murinos han demostrado que ciertas infecciones virales no patógenas "entrenan" al sistema inmune, aumentando la resistencia frente a infecciones posteriores por patógenos bacterianos u otros virus (Cadwell, 2015). Por ejemplo, la colonización del intestino de ratones libres de gérmenes con un consorcio de fagos de *Escherichia coli* estimuló respuestas protectoras que protegieron a los animales de una infección por *Citrobacter rodentium* y promovieron la regeneración del epitelio intestinal. De forma similar, la administración experimental de un astrovirus murino atenuado a ratones inmunocomprometidos los protegió de infecciones entéricas letales, mediado por la inducción de interferones y otras citoquinas protectoras. Estos hallazgos ilustran que el viroma contribuye a la homeostasis del huésped, participando en un delicado balance entre tolerancia inmune y defensa. En suma, el viroma humano, en estrecha interdependencia con el resto del microbioma, es ahora reconocido como un factor importante en la fisiología normal, modulando la inmunidad, la inflamación y la susceptibilidad a enfermedades (Cadwell, 2015; Popescu et al., 2021).

Implicación del viroma en la obesidad: evidencia en modelos animales y humanos

La posibilidad de que los virus contribuyan al desarrollo de la obesidad surgió a partir de observaciones inusuales en modelos animales hace varias décadas. Un hallazgo pionero fue reportado por Dhurandhar et al. (2000), quienes demostraron que la infección experimental con un adenovirus humano, el adenovirus serotipo 36 (Ad-36), inducía un aumento significativo de tejido adiposo en animales de laboratorio. En ese estudio, pollos inoculados con Ad-36 desarrollaron

adiposidad visceral marcadamente mayor (hasta más del doble) que los controles no infectados (Dhurandhar et al., 2000). Subsecuentemente, otros investigadores reprodujeron estos hallazgos en diferentes especies: Ad-36 provocó ganancia de grasa corporal en roedores y primates no humanos, acompañada de alteraciones metabólicas como mayor acumulación de triglicéridos en el hígado y ligera reducción del colesterol sérico (Atkinson, 2007; Dhurandhar, 2011). Estos estudios introdujeron el concepto de "infectoobesidad", postulando que ciertos virus podrían desencadenar obesidad en el huésped susceptible (Pasarica & Dhurandhar, 2007). Los mecanismos propuestos incluyen la capacidad del Ad-36 de promover la diferenciación de preadipocitos a adipocitos maduros y de alterar la expresión de genes metabólicos en tejidos del huésped (Rogers et al., 2008). Cabe destacar que Ad-36 es un virus relativamente común en humanos y generalmente causa infecciones respiratorias leves; sin embargo, su tropismo por tejido adiposo y sus efectos adipogénicos en modelos animales sugirieron una posible relevancia en la obesidad humana.

Paralelamente a la evidencia en animales, numerosos estudios clínicos investigaron la asociación entre infección por Ad-36 y obesidad en humanos. En 1997, un trabajo en población de EE.UU. reportó por primera vez que individuos obesos presentaban con mayor frecuencia anticuerpos contra Ad-36 en suero, en comparación con individuos delgados equivalentes (Atkinson, 2007). Desde entonces, al menos 10 estudios independientes en diversos países han confirmado esta observación: entre un 20-30% de las personas con obesidad exhiben seropositividad a Ad-36, frente a apenas ~5-15% de los individuos no obesos (Atkinson, 2007; Wang et al., 2020). Por ejemplo, Atkinson et al. informaron que aproximadamente 30% de adultos obesos en EE.UU. tenían anticuerpos neutralizantes contra Ad-36, comparado con menos del 10% en controles delgados. De manera consistente, en niños se ha observado una tendencia similar: en un estudio, niños seropositivos para Ad-36 pesaban en promedio 23.5 kg más que aquellos seronegativos de la misma edad (Dharmani et al., 2011). Un meta-análisis actualizado de 2015, que integró datos de >5,000 sujetos, concluyó que la infección por Ad-36 se asocia significativamente con mayor riesgo de obesidad ($OR \approx 1.6$) y con un índice de masa corporal más elevado en promedio en los seropositivos (Xu et al., 2015). Si bien estas asociaciones no demuestran causalidad directa, fortalecen la hipótesis de que Ad-36 (u otros agentes virales relacionados) podrían contribuir a la etiología multifactorial de la obesidad en una fracción de la población.

Con el fin de explorar de forma más amplia la posible participación del viroma en la obesidad, investigaciones recientes han ampliado el foco más allá de Ad-36, examinando la exposición del individuo a multitud de virus. Un estudio destacado es el de Hasan et al. (2021), el cual aplicó un enfoque de serología de amplio espectro (tecnología VirScan) para evaluar anticuerpos contra todo el viroma humano conocido en sujetos obesos vs. delgados. Este estudio, realizado en Qatar con 457 adultos (273 obesos, 184 controles), reveló una asociación específica entre obesidad y ciertos herpesvirus. En particular, la seroprevalencia de Herpes simplex tipo 1 (HSV-1) fue significativamente mayor en los adultos obesos (81.3%) respecto a los delgados (57.1%), traducándose en una odds ratio ajustada de ~3.3 a favor de obesidad en individuos con anticuerpos anti-HSV-1. Esta asociación se mantuvo incluso tras controlar por edad y sexo (Hasan et al., 2021). Además, los obesos mostraron títulos más elevados de anticuerpos dirigidos contra múltiples péptidos virales de HSV-1/2, lo que sugiere una exposición viral más intensa o recurrente. Ningún otro grupo viral mostró una diferencia tan marcada, ya que en la población pediátrica del mismo estudio no se observaron asociaciones virus-obesidad significativas. Los autores postulan que las infecciones crónicas por herpesvirus, en especial HSV-1, un virus ubicuo capaz de latencia y reactivaciones, podrían contribuir a la obesidad mediante mecanismos indirectos, por ejemplo, induciendo respuestas inflamatorias pro-adipogénicas o alterando el metabolismo del huésped (Hasan et al., 2021). Estos hallazgos amplían la perspectiva de la infectoobesidad, implicando que no solo Ad-36 sino también otros virus comunes (p. ej. herpesvirus) pueden tener un rol modulador en el peso corporal o el metabolismo.

Más recientemente, el advenimiento de la metagenómica ha permitido investigar si la composición viral intestinal (el viroma del tubo digestivo) difiere entre individuos obesos y delgados, de forma análoga a como se ha descrito para la microbiota bacteriana. Varios estudios de secuenciación metagenómica de muestras fecales sugieren que efectivamente el viroma intestinal está alterado en la obesidad. Por ejemplo, Yang et al. (2021) caracterizaron el viroma fecal en una cohorte de adultos con obesidad mórbida y/o diabetes tipo 2, comparándolos con controles magros; encontraron una disminución de la diversidad viral total en los individuos obesos, junto con cambios taxonómicos específicos. En particular, identificaron enriquecimiento de ciertos bacteriófagos de DNA bicatenario en el intestino de sujetos obesos, por ejemplo, fagos de géneros asociados a *Escherichia*, *Geobacillus* y *Lactobacillus*, en comparación con los controles delgados. A la par, notaron que las robustas correlaciones ecológicas normalmente

presentes entre virus y bacterias (p. ej., co-variaciones entre la abundancia de fagos específicos y sus huéspedes bacterianos) estaban marcadamente debilitadas en la obesidad. Esto sugiere un estado de disbiosis viral, en el cual el ecosistema de virus y bacterias pierde integración en el contexto de obesidad y diabetes (Yang et al., 2021). Interesantemente, el estudio también observó que tras una intervención de pérdida de peso (dieta hipocalórica y cirugía bariátrica), la diversidad del viroma intestinal de los pacientes aumentó y su composición se desplazó hacia un perfil más similar al de individuos no obesos, lo que apunta a la plasticidad del viroma ante cambios metabólicos. Otros trabajos apoyan la existencia de diferencias en el viroma intestinal asociadas a la obesidad, aunque los hallazgos no siempre son uniformes. En niños con obesidad, se ha reportado un aumento en la riqueza de fagos del orden Caudovirales concomitante con síndrome metabólico (Shan et al., 2021), mientras que en adultos con obesidad severa predominan patrones opuestos (disminución de diversidad viral). No obstante, en conjunto estas evidencias respaldan que el viroma (especialmente el compuesto por fagos intestinales) juega un rol en la fisiopatología de la obesidad o al menos refleja las alteraciones metabólicas de esta condición. Esto abre la puerta a considerar al viroma como un elemento más del "eje microbioma-intestino-metabolismo", con posibles implicaciones diagnósticas y terapéuticas futuras (Cao et al., 2022).

Secuenciación metagenómica del viroma humano: técnicas, hallazgos y limitaciones

La gran mayoría de los virus que componen el viroma humano no son cultivables mediante métodos de laboratorio convencionales, debido a que muchos no causan efectos citopáticos notorios o requieren condiciones específicas de crecimiento. Ante esta limitación, el campo virológico ha sido revolucionado por las técnicas de secuenciación metagenómica, las cuales permiten identificar genomas virales directamente a partir de muestras clínicas o ambientales, sin necesidad de aislar o cultivar los virus previamente (Delwart, 2007). La denominada secuenciación de nueva generación (Next-Generation Sequencing, NGS), combinada con protocolos de preparación de muestras específicos para virus, ha posibilitado la detección de cientos de virus nuevos en el cuerpo humano en las últimas dos décadas. En esencia, el enfoque consiste en purificar las partículas virales de una muestra (por filtración, centrifugación y tratamientos con nucleasas para remover ácidos nucleicos libres o bacterianos), extraer el ADN/ARN viral, y luego

amplificarlo de forma aleatoria o independiente de secuencia antes de secuenciarlo masivamente. Entre las técnicas de amplificación no específica más utilizadas destacan:

- **SISPA** (Sequence-Independent Single-Primer Amplification): un método de PCR aleatoria donde se sintetiza ADNc (en caso de ARN viral) y posteriormente se amplifica usando un único primer con región degenerada, permitiendo copiar fragmentos de cualquier genoma presente.
- **MDA** (Multiple Displacement Amplification): una técnica de amplificación isotérmica que emplea la polimerasa phi29 y cebadores aleatorios para amplificar preferencialmente ADN circular o genómico, generando grandes cantidades de ADN a partir de cantidades ínfimas de material viral.

El uso combinado de NGS con SISPA, MDA u otros protocolos (p. ej., RT-PCR aleatoria para ARN virus) ha demostrado ser sumamente potente para descubrir virus nuevos o crípticos. Gracias a estos enfoques, por ejemplo, se identificaron por primera vez virus hasta entonces desconocidos en muestras humanas comunes, como Torque teno virus (anellovirus), Redondovirus, ciertos picobirnavirus y multitud de fagos del tracto gastrointestinal (Delwart, 2012; Krishnamurthy & Wang, 2017). Un caso emblemático es el estudio de Moustafa et al. (2017), quienes aplicaron secuenciación de genomas completos humanos para extraer las secuencias virales "ocultas" en más de 8,000 personas: con este abordaje, lograron mapear 94 virus diferentes en la sangre humana, incluyendo 19 virus que infectan al humano (herpesvirus, papilomavirus, polyomavirus, adenovirus, hepatitis B, etc.), cuyos genomas fueron detectados en alrededor del 42% de los individuos analizados. Importante es que muchos de estos virus detectados no habían sido reconocidos por métodos tradicionales debido a su baja abundancia o latencia, demostrando la sensibilidad de la metagenómica para revelar el "viroma oscuro" que pasa desapercibido.

La secuenciación metagenómica viral ofrece varias fortalezas. Primero, es un método no sesgado por hipótesis, no requiere sondas ni cebadores específicos para virus conocidos, de modo que permite detectar agentes virales novedosos o altamente divergentes que escaparían a la PCR o serología convencional. Segundo, es multiplex, es decir, simultáneamente se pueden identificar todos los virus presentes en una muestra en un solo experimento, proporcionando una visión holística de la comunidad viral. Tercero, permite obtener información genómica valiosa (secuencias completas o parciales del genoma viral) que no solo confirma la identidad del virus

sino que también puede dar pistas sobre su función (p. ej., presencia de genes virales de virulencia, resistencia, etc.). Esta aproximación ha impulsado la creación de catálogos exhaustivos del viroma humano: por ejemplo, Tisza y Buck (2021) re-analizaron miles de metagenomas públicos humanos y ensamblaron más de 45,000 secuencias virales no redundantes, descubriendo multitud de nuevas especies virales e incluso asociaciones significativas entre ciertos virus y enfermedades crónicas humanas (incluyendo obesidad). Todo ello evidencia que la viroma-metagenómica es una herramienta transformadora para entender la diversidad viral humana y sus vínculos con la salud.

Pese a sus grandes avances, las aproximaciones metagenómicas conllevan desafíos técnicos e interpretativos que deben considerarse. Un aspecto crítico son los sesgos de amplificación introducidos por métodos como SISPA y MDA. Diversos estudios han demostrado que estas técnicas no amplifican uniformemente todos los genomas virales presentes, sino que tienden a sobre-representar ciertos tipos de virus. En particular, la MDA muestra un sesgo fuerte a favor de los virus de ADN circular de pequeño tamaño, como los anellovirus y circovirus, amplificándolos exponencialmente más que a grandes genomas lineales. Como consecuencia, las bibliotecas metagenómicas resultantes pueden estar dominadas artificialmente por estos virus pequeños, dando la impresión de una abundancia extraordinaria que quizá no refleja la realidad cuantitativa en la muestra original (Kim et al., 2011). De hecho, se ha recomendado no emplear MDA o SISPA cuando el objetivo es cuantificar o comparar abundancias virales entre muestras, pues los datos resultantes pueden no ser cuantitativamente fiables. En lugar de ello, se sugieren enfoques sin amplificación o con corrección bioinformática de sesgos para estudios ecológicos cuantitativos del viroma (Nooij et al., 2018). Otra limitación importante es la presencia de contaminación de fondo: las técnicas metagenómicas son tan sensibles que con frecuencia detectan secuencias virales provenientes del ambiente o de los reactivos de laboratorio (ADN "de fondo"). Por ejemplo, en el análisis de Moustafa et al. (2017), los autores reportaron que más de 75 "virus" detectados inicialmente eran en realidad artefactos por contaminación de reactivos comerciales y del ambiente, y no verdaderas infecciones humanas. Este hallazgo puso de manifiesto que la contaminación técnica representa un desafío mayor en viromas de bajo título viral, pudiendo conducir a falsas detecciones si no se implementan controles rigurosos (Kellam, 2019). Adicionalmente, la interpretación funcional de los datos metagenómicos enfrenta la cuestión de la "materia oscura" genética: a menudo se obtienen secuencias virales desconocidas (sin homología con virus catalogados), lo que dificulta evaluar su relevancia biológica. Finalmente, el análisis

bioinformático de metagenomas virales es complejo, requiere filtrado exhaustivo de secuencias del huésped (ya que >90% de las lecturas suelen ser humanas o bacterianas), montaje de genomas virales frecuentemente fragmentados, y asignación taxonómica con bases de datos en constante actualización. Pese a estas dificultades, la metagenómica viral continúa refinándose (con nuevas técnicas como capturas dirigidas, secuenciación de molécula única, etc.) y se mantiene como herramienta indispensable para caracterizar el viroma, especialmente para virus que no podemos cultivar y para exploraciones de asociación virus-enfermedad en la era post-genómica (Delwart, 2016; Bravo et al., 2021).

Brecha de conocimiento: viroma circulante en sangre y su relación con la obesidad

A pesar de los avances mencionados, existe una importante brecha en la literatura actual en torno al viroma humano y la obesidad: hasta la fecha, muy pocos estudios han investigado el viroma circulante en la sangre de individuos con obesidad. La mayoría de las investigaciones sobre viroma y obesidad se han centrado en el ambiente intestinal (viroma fecal) o en evidencia serológica de exposición viral sistémica, mientras que el compartimento sanguíneo, que podría albergar virus latentes, fragmentos virales circulantes o fagos traslocados, ha sido relativamente ignorado. Sabemos por estudios en poblaciones generales que la sangre humana no es estéril en cuanto a genomas virales: por ejemplo, el análisis masivo de Moustafa et al. detectó ADN de herpesvirus (EBV, VZV, CMV, HHV-7, etc.), poliomavirus (MCV), parvovirus B19, papilomavirus y otros en una proporción sustancial de individuos sanos. Asimismo, casi todos los adultos presentan viremia crónica de bajo nivel por anellovirus (TTV y relacionados) a lo largo de la vida, virus que persisten de forma asintomática y cuyo título refleja en cierto modo el estado inmunitario del huésped (Desiro et al., 2015). Sin embargo, no está esclarecido si la obesidad conlleva alteraciones en este viroma sanguíneo. Dado que la obesidad se asocia a inflamación crónica de bajo grado y a disfunciones inmunometabólicas, es plausible hipotetizar que las personas obesas pudieran mostrar diferencias en la carga o repertorio de virus circulantes: por ejemplo, podría haber mayor frecuencia de reactivación viral (como de herpesvirus latentes) o niveles diferentes de ciertos virus comensales asociados a la respuesta inmune (p. ej., anellovirus). De hecho, el estudio de Hasan et al. sugirió indirectamente que los obesos tenían más evidencias serológicas de infección activa por HSV-1, lo que podría reflejar una mayor reactivación de este

herpesvirus en contextos de obesidad. No obstante, hasta el momento faltan estudios directos que caractericen el viroma presente en la circulación sanguínea de individuos con obesidad.

En la literatura revisada, encontramos una escasez de datos empíricos sobre este tema. Ni los grandes estudios metagenómicos en obesidad han examinado muestras de plasma/suero para viroma (en su lugar se enfocaron en heces), ni los estudios de viroma sanguíneo en cohortes generales han analizado la variable de obesidad. Por consiguiente, se desconoce si existen firmas virales en sangre distintivas de la obesidad. Abordar esta brecha de conocimiento es importante, ya que podría revelar biomarcadores virales circulantes asociados a complicaciones metabólicas o aportar evidencia sobre vías etiológicas infecciosas en la obesidad. Por ejemplo, si se hallara una carga elevada de cierto virus en sangre de obesos (más allá de lo esperado en sanos), ello podría implicar un papel activo de ese virus en la fisiopatología o ser consecuencia de la misma (p. ej., inmunosupresión relativa facilitando viremias). De igual manera, la ausencia de diferencias también sería informativa, sugiriendo que el impacto del viroma en obesidad se confina principalmente al entorno intestinal u otros compartimentos.

En síntesis, la relación entre el viroma circulante y la obesidad constituye un vacío en la investigación actual. Este vacío resalta la necesidad de estudios dedicados a caracterizar el viroma sanguíneo en poblaciones con obesidad, idealmente comparando con controles no obesos, y evaluando correlaciones con parámetros clínicos (IMC, perfil metabólico, inflamación sistémica, etc.). La realización de tales estudios, facilitados por las herramientas de metagenómica viral de nueva generación, permitirá determinar si la obesidad conlleva una "firma" viral sistémica particular o la reactivación de ciertos virus latentes, aportando una pieza faltante al rompecabezas multifactorial de la obesidad. En el contexto de una tesis de posgrado, llenar esta brecha con evidencia empírica no solo ampliaría el conocimiento básico sobre el viroma humano, sino que podría tener implicaciones para entender mejor la etiología de la obesidad e incluso abrir caminos hacia intervenciones novedosas (por ejemplo, terapias antivirales o moduladores del viroma como coadyuvantes en el manejo de la obesidad), si es que se comprueba una conexión causal relevante.

JUSTIFICACIÓN

La interacción entre el viroma, el hospedero y el resto del microbioma desempeña un papel crucial en el desarrollo de enfermedades crónicas basadas en la adiposidad. Estas interacciones, aunque fundamentales, aún no se comprenden completamente, lo que representa una importante brecha en el conocimiento sobre los mecanismos que subyacen a estas patologías. Los estudios recientes sugieren que el viroma podría ser un regulador clave en el equilibrio metabólico e inmunológico, influyendo tanto en la microbiota como en los procesos inflamatorios que contribuyen al desarrollo de estas enfermedades.

La obesidad y el sobrepeso son problemas de salud pública de gran relevancia debido a su impacto asociado con enfermedades crónicas degenerativas, como diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer. Estas condiciones no solo reducen la esperanza de vida, sino que también afectan significativamente la calidad de vida de los individuos que las padecen. Además, estas patologías tienen un impacto económico y social considerable, lo que las convierte en una prioridad en términos de investigación y desarrollo de intervenciones efectivas.

Dada la magnitud de estos problemas y las lagunas en nuestra comprensión del papel del viroma humano, es fundamental llevar a cabo estudios de metagenómica para identificar y caracterizar los perfiles virómicos relacionados con estas condiciones. La metagenómica permite explorar de manera exhaustiva las comunidades virales presentes en el organismo, lo que puede proporcionar información valiosa sobre cómo estos virus interactúan con el huésped y el microbioma, y cómo estas interacciones podrían estar relacionadas con la adiposidad y las enfermedades metabólicas. Estos estudios no solo profundizarán nuestro conocimiento, sino que también podrían abrir nuevas vías para el desarrollo de estrategias de prevención y tratamiento basadas en un enfoque integral que incluya al viroma como un actor clave en la salud y la enfermedad.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el **perfil del viroma plasmático humano** en individuos con y sin obesidad?

OBJETIVOS

Objetivo principal

Identificar mediante secuenciación metagenómica las variaciones del viroma humano en plasma de sujetos con y sin obesidad.

Objetivos específicos

1. Identificar y caracterizar clínicamente a sujetos con y sin obesidad.
2. Identificar y caracterizar los virus de ARN en el plasma de sujetos con y sin obesidad mediante secuenciación metagenómica.
3. Identificar y caracterizar los virus de ADN en el plasma de sujetos con y sin obesidad mediante secuenciación metagenómica.
4. Identificar patrones en la composición del viroma plasmático y las características clínicas y/o demográficas de los individuos con y sin obesidad.

METODOLOGÍA

Para investigar la influencia del viroma plasmático en enfermedades crónicas basadas en la adiposidad, el estudio incluyó tanto a pacientes con esta condición como a controles sanos, emparejados cuidadosamente por edad y sexo para minimizar factores de confusión. De cada participante se obtuvieron muestras de plasma y un registro detallado de datos clínicos y demográficos, lo que permitió un análisis exhaustivo de las relaciones entre el viroma plasmático y las características asociadas a estas enfermedades.

La identificación de virus de ARN en las muestras plasmáticas se realizó mediante la técnica SISPA (Amplificación de Secuencias Independientes de Cebadores Específicos), que permitió detectar una amplia gama de virus sin necesidad de un conocimiento previo de su secuencia. Este proceso implicó la extracción de ARN plasmático, la transcripción inversa para generar ADNc y su posterior amplificación.

Para la detección de virus de ADN, se empleó la técnica MDA (Amplificación Isotérmica de Desplazamiento Múltiple), particularmente efectiva para amplificar secuencias de ADN de baja concentración. A partir de las muestras plasmáticas, el ADN fue extraído y amplificado para permitir su identificación y caracterización.

Las muestras se analizaron mediante secuenciación de nueva generación, una tecnología de alto rendimiento que permitió la identificación precisa y la clasificación de los virus presentes, además de evaluar la diversidad viral en las muestras. Los datos generados se procesaron utilizando herramientas bioinformáticas, y los resultados fueron sometidos a análisis estadísticos para identificar asociaciones entre las variaciones del viroma plasmático y las características clínicas de los pacientes.

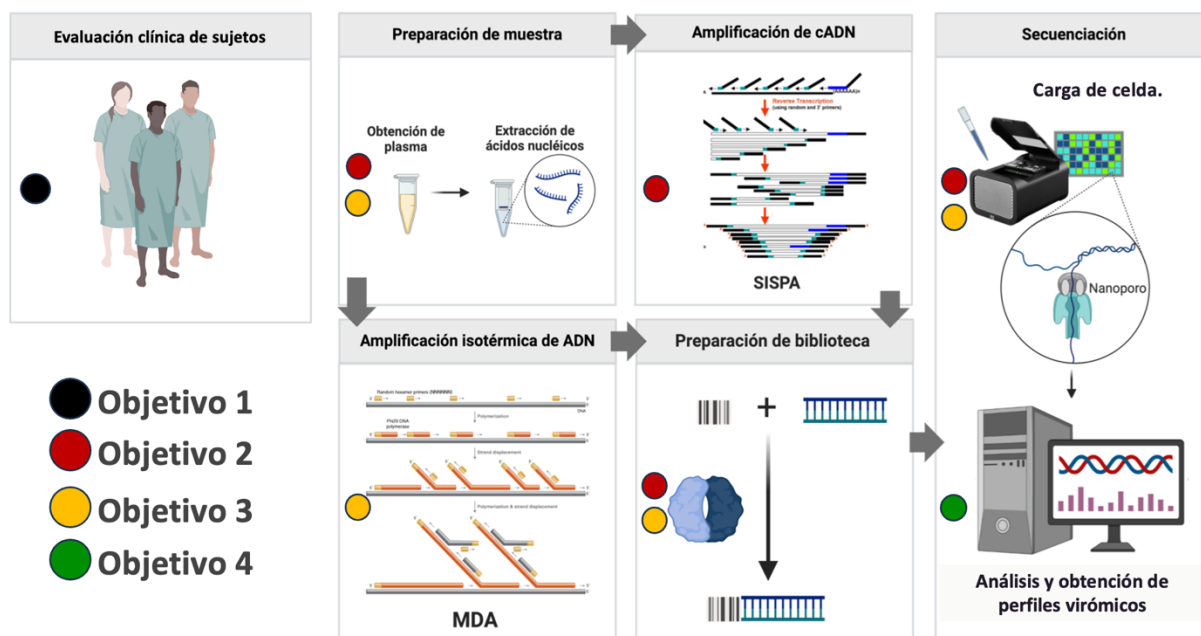


Figura 4 Esquema de estrategia experimental general.

Reclutamiento de sujetos de investigación y obtención de plasma

El estudio se realizó siguiendo los lineamientos éticos de la investigación en seres humanos, bajo los acuerdos y clasificaciones de la declaración de Helsinki, el código de Nuremberg, el informe Belmont y las Normas CIOMS, las buenas prácticas clínicas para las Américas y la "Ley General de Salud" de México con su "Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud". Con base en este último, en su Título 2o, Capítulo 1o, Artículo 17, Fracción I, este estudio fue considerado como "investigación sin riesgo". Para su ejecución se contempló la Norma Oficial Mexicana NOM 012-SS3-2012, y el proyecto contó con la aprobación del Comité de Ética en Investigación del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González", bajo el número de registro BI24-00002.

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar a personas adultas con obesidad y controles sanos, utilizando los criterios diagnósticos establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) basados en el Índice de Masa Corporal (IMC), complementados con la estimación del porcentaje de grasa corporal. Para la clasificación de adiposidad elevada, se consideraron los siguientes umbrales: mayor al 24 % en hombres y al 31 % en mujeres.

La muestra se obtuvo mediante un muestreo por conveniencia. Los controles sanos fueron seleccionados emparejados por edad y sexo con los individuos con obesidad. La selección de los

participantes se realizó con base en criterios de inclusión y exclusión específicos, los cuales se resumen en la Tabla 1. Asimismo, se aplicaron criterios de eliminación en caso de retiro del consentimiento o incumplimiento en la recolección de datos o muestras requeridas.

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
1. Participantes mayores de 18 años con un Índice de Masa Corporal (IMC) igual o superior a 18.5 kg/m². 2. Historial de peso estable en los últimos seis meses. 3. Consentimiento informado firmado de manera expresa. 4. Pertenencia a la población general.	1. Antecedentes de procedimientos quirúrgicos relacionados con el peso corporal, como liposucción o cirugía bariátrica. 2. Embarazo o lactancia. 3. Cirugías no ambulatorias realizadas en los últimos seis meses. 4. Tratamiento reciente con biológicos o inmunomoduladores: • Rituximab: Administrado en los últimos 12 meses debido a su efecto prolongado en el sistema inmunológico. • Infliximab, Adalimumab, Certolizumab, Ustekinumab, Golimumab: Administrados en los últimos seis meses.
Criterios de eliminación	
1. Falta de datos antropométricos, clínicos o demográficos necesarios para el análisis. 2. Consumo reciente de medicamentos en un periodo equivalente a 11 vidas medias del fármaco, incluyendo: 3. Medicamentos antiinflamatorios no esteroides (AINEs). 4. Corticosteroides sistémicos. 5. Inmunomoduladores. 6. Antecedentes de enfermedades o condiciones médicas específicas: 7. Enfermedades inflamatorias crónicas no infecciosas caracterizadas por inflamación persistente en tejidos u órganos sin agentes infecciosos. 8. Infecciones agudas en los últimos seis meses. 9. Obesidad secundaria a condiciones médicas conocidas como endocrinopatías o síndromes genéticos/cromosómicos. 10. Neoplasias. 11. Consumo de medicamentos o sustancias en las últimas cuatro semanas, como: ○ Antibióticos. ○ Antivirales.	

12. Presencia de alteraciones clínicas que sugieran obesidad secundaria a causas médicas conocidas, incluyendo:
- Distribución central de la grasa con características específicas, como "cara de luna llena" o "giba de búfalo".
 - Estrías purpúreas, hipertensión resistente al tratamiento, irregularidades menstruales significativas o infertilidad inexplicada.
 - Disminución notable de la libido, debilidad muscular proximal, intolerancia marcada al frío, o hiperpigmentación de la piel (excluyendo acantosis nigricans).
 - Crecimiento retardado en adolescentes o cualquier otra característica clínica que indique trastornos endocrinos, genéticos o cromosómicos, según la evaluación médica.
13. Uso de sustancias o suplementos que afecten el peso corporal en los últimos tres meses, incluyendo:
- Antipsicóticos atípicos.
 - Anticonvulsivantes.
 - Agentes hormonales.
 - Psicoestimulantes (si se prescriben para el tratamiento de obesidad).
 - Agonistas GLP-1.
 - Orlistat.
- Nota: Los sujetos que utilicen alguno de estos medicamentos para tratar diabetes secundaria a adiposidad no serán eliminados.
14. Retiro voluntario del consentimiento informado.

Tabla 1. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación del estudio.

Número de registro BI24-00002.

La recopilación de datos clínicos y demográficos incluyó información como edad, sexo, IMC, historial médico, hábitos alimenticios y nivel de actividad física, obtenida mediante entrevistas estructuradas y revisión de expedientes clínicos electrónicos.

Las muestras biológicas fueron recolectadas por venopunción en tubos con anticoagulante EDTA y fueron transportadas inmediatamente al laboratorio en contenedores refrigerados a 4 °C para preservar su integridad. Posteriormente, las muestras de sangre fueron centrifugadas a 1500 × g durante 10 minutos a 4 °C para separar el plasma de los componentes celulares. El plasma

obtenido se transfirió a tubos estériles de almacenamiento, asegurando la ausencia de contaminación con otras capas celulares, y se almacenó a -80°C hasta su análisis.

Las mediciones antropométricas se realizaron por triplicado siguiendo los métodos estandarizados por la Sociedad Internacional para el Avance de la Cineantropometría (Stewart et al., 2011). Las variables generales incluyeron masa corporal, talla, talla sentado y envergadura de brazos, utilizadas como base para evaluar proporciones y dimensiones corporales. Los espesores de grasa subcutánea fueron medidos en sitios anatómicos específicos como tríceps, subescapular, bíceps, cresta ilíaca, supraespinal, abdominal, muslo y pierna, lo que permitió estimar la cantidad y distribución de la grasa corporal. También se obtuvieron circunferencias corporales en segmentos específicos como brazo relajado, brazo corregido, brazo flexionado y contraído, cintura, caderas, muslo medio, pierna y pierna corregida, lo cual permitió analizar la composición y distribución de los tejidos. Los diámetros corporales se midieron en puntos clave como el húmero, el biestiloideo y el fémur, facilitando la estimación de la estructura ósea y la complexión corporal.

A partir de estas mediciones se derivaron parámetros como la complexión, utilizando el método del somatotipo (Carter & Heath, 1990), el peso teórico en función de la talla y la complexión, el IMC y el porcentaje de grasa corporal estimado mediante métodos como los propuestos por Siri (1961), Brožek et al. (1963), Slaughter et al. (1988) y Faulkner (1968). También se calcularon índices como la relación cintura/cadera, un indicador de riesgo para la salud (World Health Organization, 2011), y se analizó la distribución de la grasa corporal, identificando patrones como la distribución ginecoide, concepto fundamental para entender el riesgo metabólico (Vague, 1956). Además, se evaluaron variables como la masa libre de grasa, el área muscular media del brazo, la masa muscular total y la masa ósea, cuyos métodos de cálculo son procedimientos estandarizados en la evaluación nutricional y de composición corporal (Frisancho, 1990; Lohman et al., 1988), y que se resumen en la Tabla 3.

Categoría	Variable	Unidad
Mediciones Generales	Masa corporal	kg
	Talla	cm
	Talla sentado	cm
	Envergadura de brazos	cm
Pliegues Cutáneos	Tríceps	mm

	Subescapular	mm
	Bíceps	mm
	Cresta Iliaca	mm
	Supraespinal	mm
	Abdominal	mm
	Muslo	mm
	Pierna	mm
Perímetros Corporales	Brazo relajado	cm
	Brazo corregido	cm
	Brazo flexionado y contraído	cm
	Cintura	cm
	Caderas	cm
	Muslo medio	cm
	Pierna	cm
	Pierna corregido	cm
Diámetros Corporales	Húmero	cm
	Biestiloideo	cm
	Fémur	cm
Evaluaciones Derivadas	Complejión	-
	Peso teórico (según complejión y talla)	kg
	Índice de Masa Corporal (IMC)	kg/m ²
	Porcentaje de grasa corporal (Siri, Brozek, Σ 4 pliegues, Slaughter, Faulkner, Carter)	%
	Ratio Cintura/Cadera	-
	Distribución de grasa	-
	Masa libre de grasa	kg
	Área muscular media del brazo	cm ²
	Masa muscular total	kg
	Masa ósea	kg

Somatotipo	Endomorfia	-
	Mesomorfia	-
	Ectomorfia	-
	Clasificación general (e.g., Endo-mesomorfo)	-
Agua Corporal Total	Agua corporal total	L

Tabla 2. Variables antropométricas recolectadas.

El somatotipo fue analizado utilizando el método Heath-Carter, clasificando la composición corporal en términos de endomorfia, mesomorfia y ectomorfia, lo que permitió definir el tipo corporal general, como, por ejemplo, un somatotipo endo-mesomorfo. También se midió el agua corporal total en litros para obtener una evaluación integral de la hidratación y la composición corporal. La información fue recopilada de manera sistemática para garantizar precisión y consistencia en los resultados.

Además de las mediciones antropométricas, se realizaron evaluaciones complementarias para obtener un análisis integral. En el ámbito mental, se aplicaron cuestionarios como el IWQOL (Weight-related Quality of Life) y el DASS-21, que evaluaron la calidad de vida relacionada con el peso y los niveles de estrés, ansiedad y depresión, respectivamente. En el ámbito físico, se realizó una historia clínica detallada y se analizaron parámetros bioquímicos relevantes. Finalmente, en el ámbito funcional, se aplicó nuevamente el cuestionario IWQOL para evaluar la funcionalidad relacionada con el peso corporal.

Toda la información recopilada fue utilizada para clasificar a los participantes de acuerdo con la Edmonton Obesity Staging Scale (EOSS), que estratificó la obesidad considerando parámetros físicos, funcionales y psicológicos. Esta escala permitió evaluar el impacto de la adiposidad en la salud general y facilitó la personalización de las intervenciones clínicas en función de las necesidades específicas.

Aislamiento de ácidos nucleicos

La extracción de ácidos nucleicos a partir de muestras de plasma humano se realizó mediante protocolos diferenciados para ARN y ADN.

Para la obtención de ARN viral, se procesaron 140 μ L de plasma utilizando el kit QIAamp Viral RNA Mini (QIAGEN), siguiendo el protocolo del fabricante. Se añadieron 560 μ L de Buffer AVL con ARN transportador a un tubo de 1.5 mL, seguido de la incorporación del plasma. La mezcla se homogeneizó mediante vortex durante 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente, se agregaron 560 μ L de etanol absoluto y la mezcla se aplicó en dos fracciones sobre una columna QIAamp Mini, con centrifugación a $6000 \times g$ (8000 rpm) durante 1 minuto en cada aplicación. Las columnas fueron lavadas con 500 μ L de Buffer AW1 y 500 μ L de Buffer AW2, seguidos de una centrifugación adicional a $20,000 \times g$ durante 3 minutos. El ARN fue eluido con 60 μ L de Buffer AVE tras una incubación de 1 minuto a temperatura ambiente y una centrifugación final.

El ARN recuperado fue tratado con DNasa I (Zymo Research) para eliminar ADN residual. Se preparó una mezcla compuesta por 40 μ L de muestra, 5 μ L de DNasa I (1 U/ μ L) y 5 μ L de DNA Digestion Buffer, que se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego, el ARN fue purificado y concentrado utilizando el kit RNA Clean & Concentrator-5 (Zymo Research). Se añadieron dos volúmenes de RNA Binding Buffer a la muestra tratada, seguidos de una cantidad igual de etanol absoluto, y la mezcla se aplicó sobre una columna Zymo-Spin IC. Se realizaron lavados con 400 μ L de RNA Prep Buffer, seguido de 700 μ L y 400 μ L de RNA Wash Buffer. El ARN fue eluido con 6 μ L de agua libre de nucleasas.

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de 200 μ L de plasma utilizando el kit QIAamp DNA Mini (QIAGEN), conforme a las instrucciones del fabricante. Se añadieron 20 μ L de proteasa QIAGEN al fondo de un tubo de 1.5 mL, seguidos de 200 μ L de muestra y 200 μ L de Buffer AL. La mezcla se homogeneizó por vortex durante 15 segundos y se incubó a 56 °C durante 10 minutos. A continuación, se agregaron 200 μ L de etanol absoluto y se mezcló nuevamente por vortex. La solución se aplicó sobre una columna QIAamp Mini, con centrifugación a $6000 \times g$ durante 1 minuto. La columna fue lavada con 500 μ L de Buffer AW1 y 500 μ L de Buffer AW2, con centrifugaciones a $6000 \times g$ y $20,000 \times g$, respectivamente. El ADN fue eluido con 200 μ L de Buffer AE tras una incubación de 1 minuto a temperatura ambiente.

Finalmente, las muestras de ARN y ADN fueron almacenadas a -80°C hasta su análisis.

Amplificación de ARN por medios de SISPA

La amplificación de ácidos nucleicos se realizó mediante la técnica SISPA (Sequence-Independent Single-Primer Amplification), en dos rondas denominadas Ronda A y Ronda B. En la Ronda A, el ARN previamente purificado fue sometido a transcripción inversa utilizando la enzima Induro Reverse Transcriptase (New England Biolabs) y el oligonucleótido PrimerA (5'-GTTTCCCCTGGAGGATA-N9-3'). Para ello, se mezclaron 4 μ L de ARN con 2 μ L de PrimerA (para una concentración final de 200 μ M), 1 μ L de mezcla de dNTPs (10 mM) y agua libre de nucleasas (libre de DNasa y RNasa) hasta completar un volumen de 10 μ L. Esta mezcla se desnaturalizó a 65 °C durante 5 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente, se añadieron 4 μ L de tampón 5X Induro RT Reaction Buffer, 1 μ L de RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Thermo, 40 U/ μ L), 1 μ L de Induro Reverse Transcriptase (200 U/ μ L) y 4 μ L de agua libre de nucleasas, alcanzando un volumen final de 20 μ L. La reacción se incubó a 55 °C durante 30 minutos, seguida de una inactivación enzimática a 95 °C durante 1 minuto.

Finalizada la síntesis de la primera cadena, se añadió 1 μ L de E. coli RNase H (Thermo Fisher Scientific) al volumen total de ADNc, incubando a 37 °C durante 20 minutos con el fin de eliminar el ARN residual. El ADNc obtenido se utilizó inmediatamente en la síntesis de la segunda cadena.

La síntesis de la segunda cadena de ADN se realizó utilizando la ADN polimerasa Sequenase Versión 2.0 (Applied Biosystems). Se añadieron 5 μ L de una primera mezcla compuesta por 1 μ L de Buffer Sequenase, 3.85 μ L de agua libre de nucleasas y 0.15 μ L de la enzima Sequenase Versión 2.0, incubando a 37 °C durante 8 minutos. Posteriormente, se añadió una segunda mezcla compuesta por 0.45 μ L de Buffer de dilución Sequenase y 0.15 μ L adicionales de la polimerasa Sequenase Versión 2.0, con una segunda incubación a 37 °C durante otros 8 minutos.

El producto de doble cadena fue purificado utilizando perlas magnéticas AMPure XP (Beckman Coulter). La purificación se realizó en tubos Eppendorf de 1.5 mL tipo LoBind. Los tubos se colocaron sobre un soporte magnético hasta separar las perlas del sobrenadante. Se realizaron dos lavados con 200 μ L de etanol al 70 %, dejando reposar 30 segundos a temperatura ambiente en cada uno, y eliminando el etanol cuidadosamente. Luego, se añadieron 40 μ L de

buffer de elución, se homogeneizó mediante pipeteo 10 veces y se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente. El eluato fue transferido a un nuevo tubo LoBind para su almacenamiento o procesamiento posterior.

En la Ronda B, se amplificó el ADNc purificado mediante una reacción de PCR en un volumen final de 50 μ L. La mezcla de reacción incluyó 5 μ L del ADNc obtenido en la Ronda A, 25 μ L de LongAmp® Taq 2X Master Mix (New England Biolabs) y 100 pmol del oligonucleótido Sol-PrimerB (5'-GTTTCCCACTGGAGGATA-3'). La composición detallada de esta mezcla se presenta en la Tabla 3. Mezcla para amplificación en la Ronda B del SISPA.

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, alineamiento a 50 °C durante 45 segundos y extensión a 65 °C durante 1 minuto, con una extensión final a 65 °C durante 10 minutos. El programa detallado del termociclador se encuentra descrito en la Tabla 4. Programa del termociclador para amplificación en Ronda B del SISPA. El producto amplificado fue empleado en los análisis posteriores.

Componente	Volumen (μ L)	Concentración final
<i>LongAmp Taq 2X Master Mix</i>	25	1X
<i>Primer B [100 μM]</i>	1	2 μ M
<i>Templado</i>	10	Variable
<i>Agua libre de nucleasas</i>	14	-
<i>Total</i>	50	-

Tabla 3. Mezcla para amplificación en la ronda B del SISPA.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
<i>Desnaturalización inicial</i>	94	2 minutos
<i>Desnaturalización</i>	35 ciclos	94
<i>Hibridación</i>		50
<i>Extensión</i>		72
<i>Extensión final</i>	72	5 minutos

Tabla 4. Programa del termociclaador para amplificación en ronda B del SISPA.

Para verificar la presencia del producto generado en la reacción de amplificación, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % preparada en tampón TAE 1X. Para la detección del ADN, se utilizó el agente intercalante SYBR™ Safe DNA Gel Stain 10,000X (Thermo Fisher Scientific), añadido directamente a la solución de agarosa fundida en una proporción de 1 µL por cada 10 mL, con una concentración final de 1X. La corrida electroforética se efectuó aplicando una corriente constante de 7 V/cm. Se empleó como referencia el marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (Promega). La visualización del ADN se llevó a cabo mediante luz ultravioleta utilizando el sistema de documentación ChemiDoc™ XRS+ Gel Imaging System (Bio-Rad).

Amplificación de ADN por medio de MDA

La amplificación del ADN se realizó mediante desplazamiento de hebra por amplificación isotérmica (Multiple Displacement Amplification, MDA), utilizando la enzima EquiPhi29™ ADN Polimerasa (Thermo Fisher Scientific), bajo condiciones específicas. La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 18 µL y estuvo compuesta por los siguientes reactivos: 0.2 µL de ditionitrotol (DTT, 0.1 M), 2 µL de cebador aleatorio exo-resistente (500 µM), 2 µL de mezcla de desoxirribonucleótidos (dNTPs, 10 mM cada uno), una cantidad variable de ADN plantilla lineal, y agua libre de nucleasas (libre de DNasa y RNasa) hasta completar el volumen. Finalmente, se añadieron 2 µL de tampón de reacción EquiPhi29™ (10X). La mezcla fue homogeneizada y centrifugada brevemente, luego incubada a 95 °C durante 3 minutos para la desnaturalización del ADN, seguida de un enfriamiento inmediato en hielo para estabilizar los componentes.

Tras esta etapa, se incorporaron 1 µL de EquiPhi29™ ADN Polimerasa (10 U/µL) y 1 µL de pirofosfatasa inorgánica (0.1 U/µL) para iniciar la amplificación isotérmica. La reacción se incubó a una temperatura constante entre 42 y 45 °C durante 2 horas, seguida por una etapa de inactivación enzimática a 65 °C durante 10 minutos. El producto resultante fue sometido a un tratamiento enzimático adicional con nucleasa S1 con el objetivo de eliminar ramificaciones generadas durante la amplificación.

Para el tratamiento con nucleasa S1, se preparó una mezcla de 30 µL que incluyó: 6 µL de tampón de reacción 5X para nucleasa S1, 10 U de nucleasa S1 (Thermo Fisher Scientific), el producto previamente purificado y agua libre de nucleasas hasta completar el volumen. La incubación se realizó a temperatura ambiente durante 10 minutos. La inactivación de la nucleasa

se efectuó mediante la adición de 2 μ L de EDTA (0.5 M) y una incubación posterior a 70 °C durante 10 minutos.

La calidad del producto amplificado se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % en tampón TAE 1X, utilizando SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific) a una concentración final de 1X como agente intercalante. La separación se llevó a cabo a una velocidad de 7 V/cm y el gel fue visualizado bajo luz ultravioleta utilizando el sistema ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad). Como referencia de tamaño, se empleó el marcador 1 kb DNA Ladder (Promega).

Finalmente, el producto fue purificado utilizando el reactivo AMPure XP Bead-Based Reagent (Beckman Coulter) en tubos Eppendorf de 1.5 mL tipo LoBind, conforme al procedimiento previamente descrito.

Secuenciación de ácidos nucleicos

La preparación de la biblioteca de secuenciación, cuyo flujo de trabajo se esquematiza en la Figura 1, se realizó utilizando el kit Rapid Barcoding SQK-RBK114.96 de Oxford Nanopore Technologies, siguiendo el protocolo del fabricante con modificaciones en la cantidad de ADN de entrada y volumen de código de barras utilizado. El procedimiento incluyó tres etapas: ligación de códigos de barras, purificación del ADN y ligación del adaptador de secuenciación.

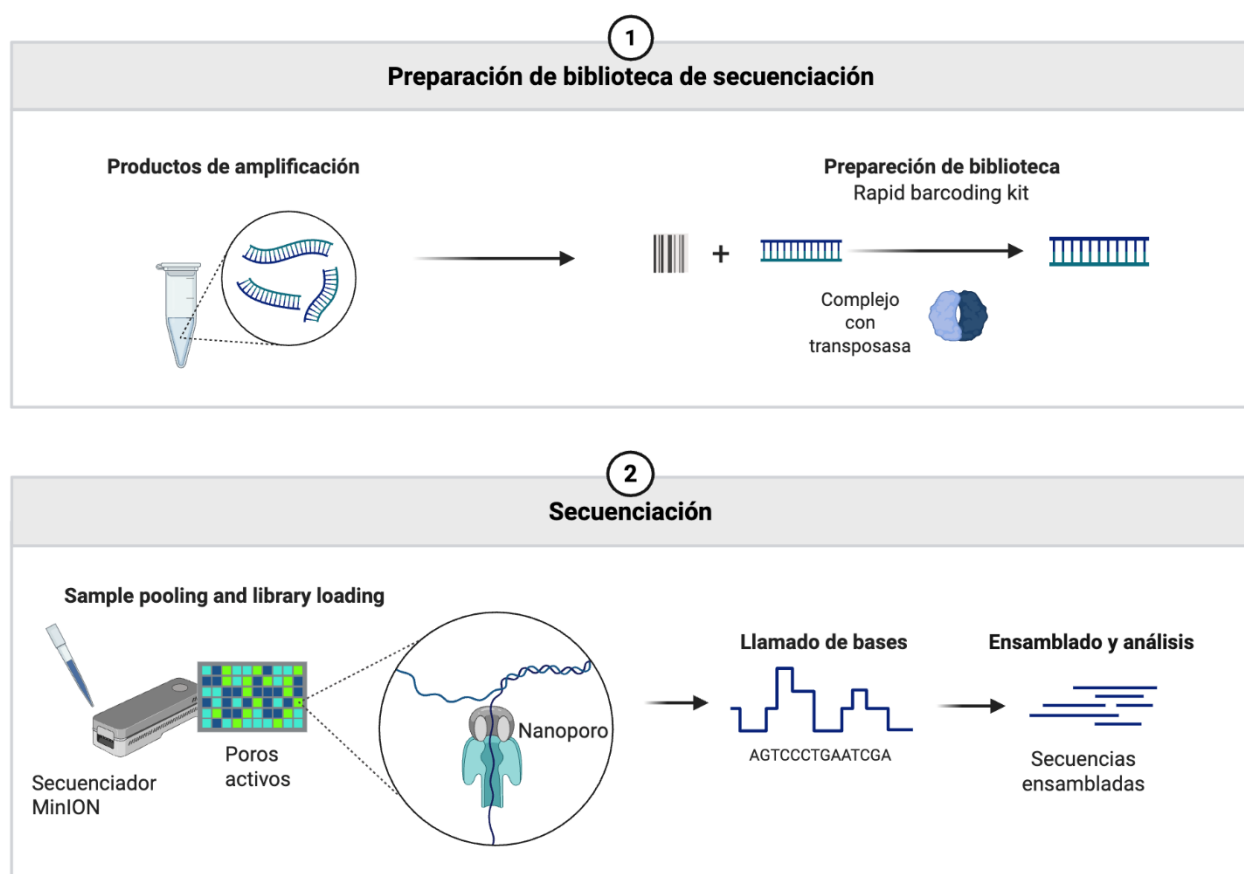


Figura 5. Esquema del flujo de trabajo para la secuenciación con tecnología Nanopore.

La preparación de la biblioteca de secuenciación se realizó a partir de productos de amplificación utilizando el kit Rapid Barcoding SQK-RBK114.96 de Oxford Nanopore Technologies, siguiendo el protocolo del fabricante. Este kit emplea un complejo con transposasa que fragmenta el ADN y liga los códigos de barras de forma simultánea. (2) Una vez preparadas, las bibliotecas se agrupan y se cargan en un secuenciador MinION.

La cantidad de ADN genómico de entrada fue determinada utilizando el fluorómetro Qubit 3 (Thermo Fisher Scientific) con el kit Qubit dsDNA High Sensitivity Assay, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para cada muestra se utilizaron 400 nanogramos de ADN genómico, preparados en agua libre de nucleasas y ajustados a un volumen final de 10 microlitros. A esta mezcla se le añadieron 3 microlitros del código de barras correspondiente. Las reacciones se realizaron en tubos de 0.2 mililitros de pared delgada o en placas de 96 pozos con tratamiento LoBind. Las mezclas fueron homogeneizadas por pipeteo, centrifugadas brevemente e incubadas en un termociclador a 30 grados Celsius durante 2 minutos, seguidos de 80 grados Celsius durante 2 minutos para efectuar la reacción en la cual se añaden los códigos de barras, representada esquemáticamente en la Figura 6. Una vez finalizada la incubación, las muestras se enfriaron en hielo, centrifugaron nuevamente y fueron agrupadas para su procesamiento posterior.

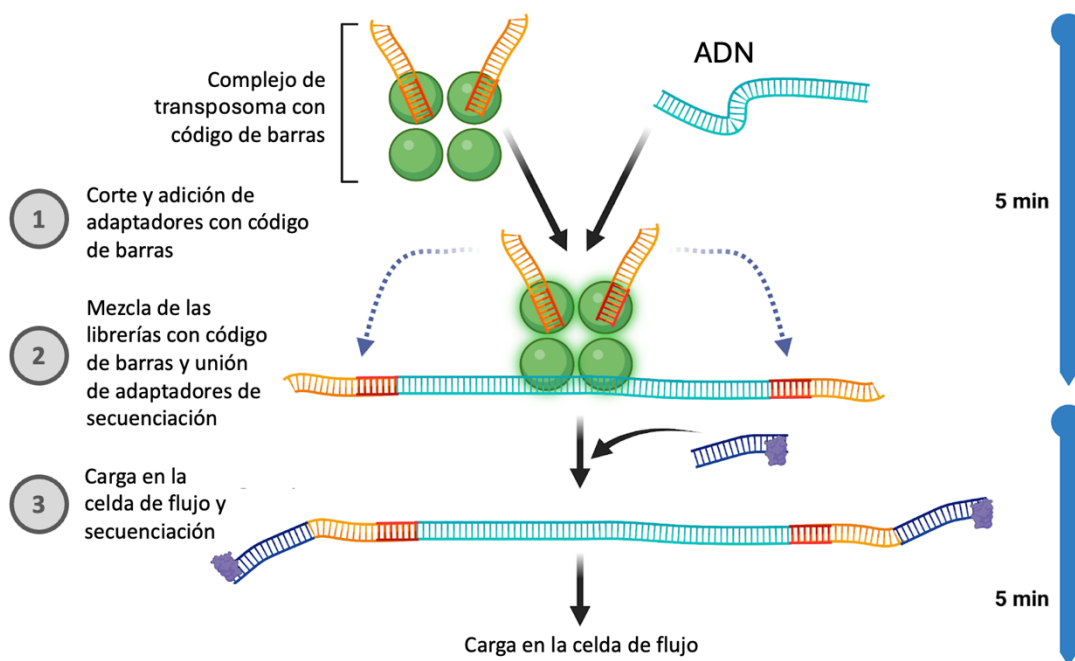


Figura 6. Preparación rápida de la biblioteca de secuenciación con códigos de barras.

El proceso se inicia con (1) el corte y adición de adaptadores con códigos de barras al ADN mediante un complejo de transposoma. Seguidamente, (2) se realiza una mezcla de las librerías con código de barras y la unión de adaptadores de secuenciación. Finalmente, (3) la biblioteca resultante está lista para la carga en la celda de flujo y secuenciación, representando un proceso rápido que puede completarse en aproximadamente 10 minutos.

Las muestras codificadas se agruparon en un tubo de 2 mililitros con tratamiento LoBind. El volumen total agrupado no superó los 1000 microlitros. Para la purificación, se añadió un volumen equivalente de perlas magnéticas AMPure XP previamente resuspendidas. La mezcla se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente en un mezclador rotativo. La separación magnética se realizó con dos lavados en etanol al 80 por ciento, seguido de una elución en 15 microlitros de solución de elución por cada 24 códigos de barras utilizados, tras una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente.

Para la ligación del adaptador, se diluyeron 1.5 microlitros del adaptador rápido en 3.5 microlitros de tampón de adaptador. Se añadieron 11 microlitros de ADN barcódico y 1 microlitro de la mezcla de adaptador, incubando durante 5 minutos a temperatura ambiente.

La biblioteca resultante se mantuvo en hielo hasta su carga en una celda de flujo R10.4.1 (FLO-MIN114). El cebado de la celda se realizó con una mezcla de 1170 microlitros de solución de lavado, 30 microlitros de conector de flujo y 5 microlitros de albúmina sérica bovina a 50 miligramos por mililitro, alcanzando una concentración final de 0.2 miligramos por mililitro. Tras una incubación de 5 minutos, se cargaron 75 microlitros de biblioteca preparada (37.5 microlitros de solución de secuenciación, 25.5 microlitros de perlas de biblioteca resuspendidas y 12 microlitros de ADN) en el puerto SpotON, gota a gota, completando el procedimiento de preparación para la corrida de secuenciación en el dispositivo MinION.

Análisis de datos

El flujo de análisis comenzó con el procesamiento inicial de las señales crudas generadas por la plataforma de secuenciación Oxford Nanopore. Las señales de los archivos POD5 fueron convertidas en secuencias de bases utilizando Dorado v0.9, aplicando el modelo de llamado de bases DNA r10.4.1 e8.2 400 bps SUP v5.0.0, optimizado para lecturas largas y de alta precisión. Durante este proceso se eliminaron adaptadores y se asignaron las lecturas a sus respectivas muestras mediante separación por códigos de barras. Una vez generadas las secuencias, se aplicó un control de calidad utilizando FASTQC, que permitió evaluar métricas como la calidad.

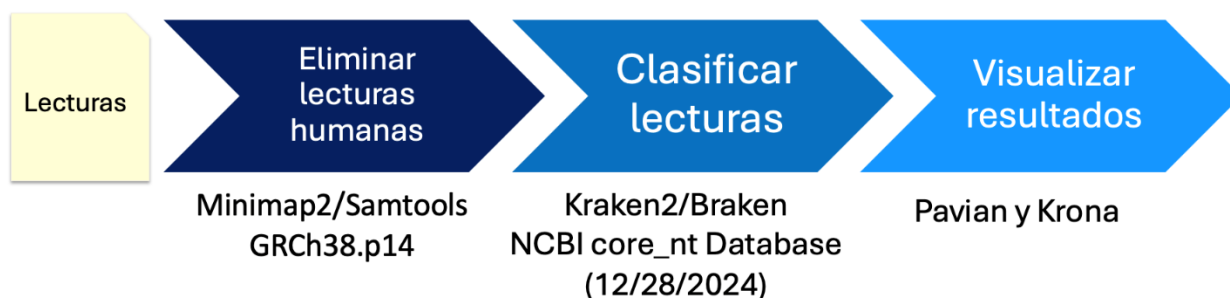


Figura 7. Flujo de trabajo bioinformático para el análisis metagenómico.

El proceso inicia con las lecturas de secuenciación crudas. Primero, se realiza un filtrado para eliminar las lecturas humanas mediante su alineación contra el genoma de referencia (GRCh38.p14) con Minimap2/Samtools. Posteriormente, las lecturas no humanas son clasificadas taxonómicamente utilizando Kraken2, con una estimación de abundancia mediante Bracken, contra la base de datos core_nt del NCBI. Finalmente, los resultados se visualizan de forma interactiva utilizando las herramientas Pavian y Krona.

Para reducir la presencia de secuencias de origen humano, las lecturas fueron alineadas contra el genoma de referencia humano GRCh38.p14 utilizando Minimap2 v2.28-r1209. Las lecturas que se alinearon fueron descartadas mediante Samtools v1.21, utilizando el comando *samtools view -b -f 4*, el cual permite conservar únicamente aquellas lecturas que no presentan alineamiento. Este paso garantizó que solo se mantuvieran lecturas correspondientes a posibles organismos distintos al hospedero humano.

Las lecturas no humanas fueron clasificadas taxonómicamente con Kraken 2 v2.1.4, utilizando la base de datos nt core del NCBI, actualizada el 28 de diciembre de 2024. Para ajustar

la estimación de abundancias, se empleó Bracken v3.1, que recalcula las distribuciones por nivel taxonómico a partir de los resultados iniciales obtenidos con Kraken 2.

Los resultados fueron visualizados mediante Pavian v1.0 y Krona v2.7.1, herramientas que generan representaciones jerárquicas de los perfiles taxonómicos, organizadas por niveles (reino, filo, clase, orden, familia, género y especie).

Las lecturas clasificadas como virales fueron utilizadas para el ensamblado de novo empleando Flye v2.9.1-b1780. Los contigs generados fueron comparados con secuencias de referencia de la base de datos *nucore* del NCBI mediante BLAST.

Para la determinación de las especies anellovirales, se construyeron árboles filogenéticos a partir de las secuencias del gen ORF1, junto con todos los genomas disponibles de Alphatorquevirus y Betatorquevirus. Las secuencias fueron alineadas mediante alineamientos codónicos utilizando MAFFT v7.526. El modelo de sustitución más adecuado fue seleccionado mediante el criterio bayesiano de información (BIC) empleando ModelFinder, y los árboles de máxima verosimilitud fueron inferidos con IQ-TREE 2 v2.4.

Asimismo, se realizaron análisis filogenéticos bayesianos para obtener árboles de máxima credibilidad clados (MCC), utilizando BEAST v1.10.4. El análisis se ejecutó bajo un esquema MCMC de 10 millones de generaciones, con un descarte inicial del 10 % (burn-in), y se consideró adecuado un valor efectivo de muestreo (ESS) superior a 200. Se empleó un modelo evolutivo TVM+F+I+Γ4, un reloj molecular estricto, un modelo coalescente con población constante, árbol inicial construido mediante UPGMA y distribuciones previas especificadas para tasas de sustitución, frecuencias de nucleótidos, tamaño poblacional y alturas nodales. La visualización y edición de los árboles filogenéticos se realizó en R v4.4.2 mediante la biblioteca ggtree.

El análisis estadístico fue realizado en el entorno R (v4.4.2), utilizando bibliotecas especializadas como tidyverse, ggpubr, gtsummary, ComplexHeatmap, DescTools, ggtext, circlize, FactoMineR, factoextra y psych, entre otras. Este se ilustra en la figura 8.

Se llevó a cabo una descripción general de variables como edad, sexo, índice de masa corporal (IMC), porcentaje de grasa corporal y antecedentes médicos, tanto en formato tabular como gráfico. Las variables categóricas se codificaron como factores y las continuas se evaluaron

mediante histogramas, gráficos de caja y correlaciones bivariadas (Spearman), utilizando funciones de resumen de las bibliotecas *skimr*, *psych* y *GGally*.

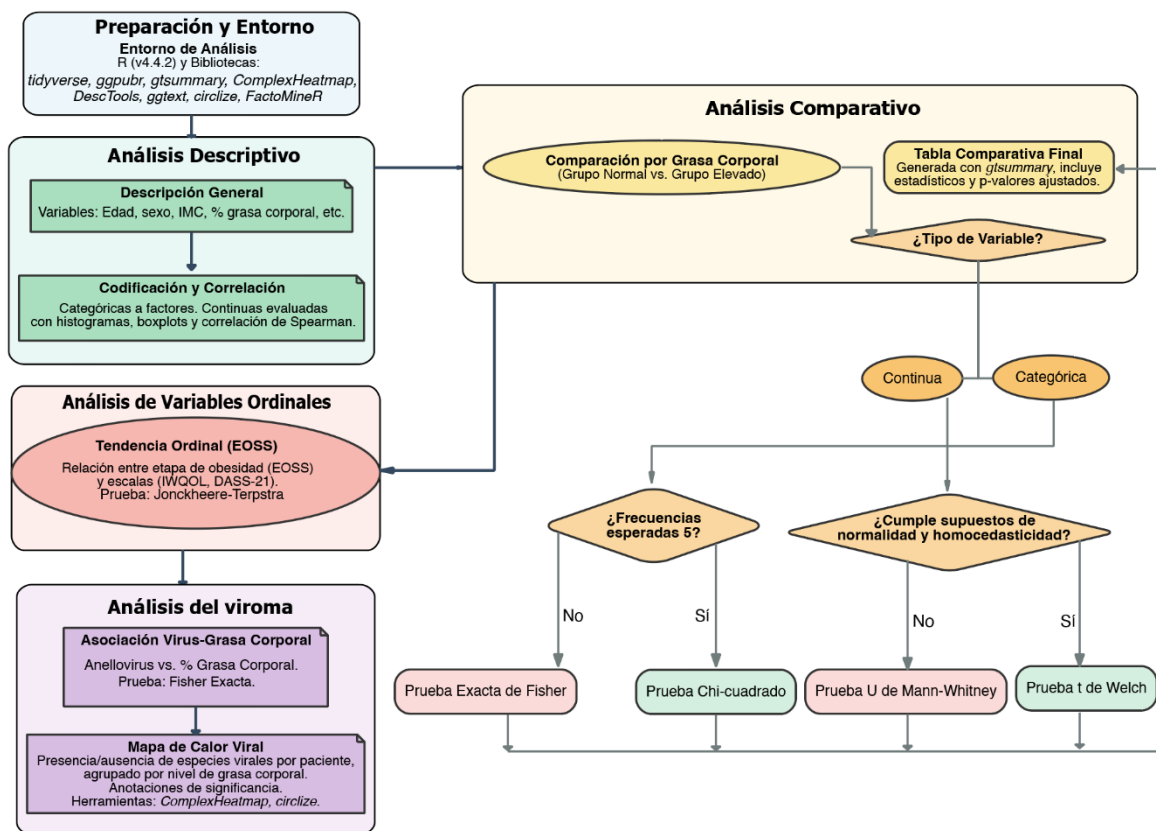


Figura 8. Esquema del Flujo de Trabajo para el Análisis Estadístico.

El diagrama ilustra el proceso de análisis de datos realizado en el entorno R. La primera rama corresponde al análisis de datos clínicos y conductuales, que inicia con un análisis descriptivo y exploratorio. De este se derivan dos sub-análisis: (i) una comparación de características entre grupos de grasa corporal para generar una tabla de resultados (con herramientas como *gtsummary*) y (ii) un análisis de variables ordinales y su relación con escalas de sintomatología, visualizado mediante gráficos de caja. La segunda rama se enfoca en el análisis virológico, donde se evalúa la asociación entre la presencia de virus y el estado de grasa corporal y, en paralelo, se visualizan los patrones generales de presencia viral entre pacientes mediante un mapa de calor.

Para comparar características clínicas y conductuales según el nivel de grasa corporal (normal vs. elevada), se emplearon pruebas estadísticas seleccionadas en función de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Estas incluyeron pruebas t (de Welch), pruebas de Wilcoxon, chi-cuadrado y pruebas exactas de Fisher, automatizadas a través de funciones

personalizadas y la biblioteca gtsummary. Los resultados se integraron en una tabla comparativa con valores de p.

Se construyeron además visualizaciones orientadas a variables ordinales, como la etapa clínica de obesidad (clasificación EOSS), y su relación con escalas de calidad de vida (IWQOL) y sintomatología emocional (DASS-21), evaluadas mediante la prueba de Jonckheere-Terpstra (DescTools) y representadas con diagramas de caja y líneas de tendencia por medianas.

En cuanto al componente virológico, se exploraron asociaciones entre la presencia de virus específicos (en particular, anellovirus) y el estado de grasa corporal. Se utilizó la prueba exacta de Fisher para evaluar la asociación entre detección viral (presente/ausente) y grupo de grasa corporal, representando los resultados mediante gráficos de barras apiladas con proporciones relativas y valores de p. Se aplicó una codificación por color y etiquetas porcentuales, utilizando las bibliotecas ggtext y glue.

Adicionalmente, se construyeron mapas de calor basados en matrices de presencia viral (ausente, parcial o completo), organizados por paciente y agrupados por nivel de grasa corporal. Estos mapas incorporaron anotaciones superiores para facilitar la interpretación por grupo y fueron generados con las bibliotecas ComplexHeatmap y circlize.

RESULTADOS

Objetivo 1. Caracterización clínica y antropométrica de los participantes

El estudio incluyó un total de 20 sujetos adultos, distribuidos de manera equitativa por género con 10 hombres y 10 mujeres. La edad media de los participantes fue de 31 años con una desviación estándar de 9 años. Dentro de esta muestra, el 70% de los participantes ($n = 14$) presentó niveles de grasa corporal elevados, en contraste con el 30% restante ($n = 6$), que mantuvo un porcentaje de grasa corporal dentro de los rangos establecidos como normales.

La distribución de los participantes por sexo se mantuvo equilibrada entre el grupo con grasa corporal normal y el grupo con grasa corporal elevada. No se identificaron diferencias estadísticamente significativas en la prevalencia de grasa corporal elevada al comparar entre hombres y mujeres ($p > 0.9$, según la prueba exacta de Fisher). De igual manera, no se detectaron diferencias significativas en la edad media entre los dos grupos ($p = 0.535$, según la prueba t de Welch).

Por otro lado, se registraron diferencias estadísticamente significativas en el índice de masa corporal (IMC), con valores de 26.3 ± 4.0 en el grupo con grasa corporal elevada versus 23.1 ± 2.4 en el grupo normal ($p = 0.041$).

Asimismo, se observaron diferencias significativas en el porcentaje de grasa corporal, con valores de 32 ± 6 en el grupo elevado versus 22 ± 9 en el grupo normal ($p = 0.042$). Todos estos datos se detallan en la Tabla 6.

Se evaluó la relación entre el índice de masa corporal (IMC) y el porcentaje de grasa corporal en la muestra total, así como de forma diferenciada por sexo, mediante análisis de correlación (Figura 9). En la muestra total, se identificó una correlación positiva con un coeficiente de correlación de Pearson de $R = 0.52$ y un valor $p = 0.13$. En el subgrupo de hombres, representados por puntos rosados, se observó una correlación positiva con $R = 0.52$ y $p = 0.13$. En el subgrupo de mujeres, representados por puntos cyan, se observó una correlación positiva con $R = 0.58$ y $p = 0.08$. Ninguna de estas correlaciones alcanzó significancia estadística.

Variable		Total N = 20	Grasa corporal normal	Grasa corporal elevada	Valor p ²
			N = 6	N = 14	
Edad		31 ± 9	33 ± 13	29 ± 7	0.535
Sexo	M	10 (50%)	3 (50%)	7 (50%)	>0.9
	F	10 (50%)	3 (50%)	7 (50%)	
IMC		25.3 ± 3.8	23.1 ± 2.4	26.3 ± 4.0	0.041*
Porcentaje de grasa corporal		29 ± 8	22 ± 9	32 ± 6	0.042*
Ejercicio	Sí	15 (75%)	6 (100%)	9 (64%)	0.3
	No	5 (25%)	0 (0%)	5 (36%)	
Consumo de alcohol	Sí	15 (75%)	5 (83%)	10 (71%)	>0.9
	No	5 (25%)	1 (17%)	4 (29%)	
Tabaquismo	Sí	2 (10%)	1 (17%)	1 (7.1%)	0.5
	No	18 (90%)	5 (83%)	13 (93%)	
Antecedente familiar de obesidad	Sí	16 (80%)	4 (67%)	12 (86%)	0.5
	No	4 (20%)	2 (33%)	2 (14%)	
Antecedente familiar de Hipertensión Arterial	Sí	16 (80%)	4 (67%)	12 (86%)	0.5
	No	4 (20%)	2 (33%)	2 (14%)	
Antecedente familiar de Diabetes Mellitus	Sí	16 (80%)	5 (83%)	11 (79%)	0.5
	No	4 (20%)	1 (17%)	3 (21%)	
Consumo de drogas	Sí	1 (5.0%)	1 (17%)	0 (0%)	0.3
	No	19 (95%)	5 (83%)	14 (100%)	
Transfusiones	Sí	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	>0.9
	No	20 (100%)	6 (100%)	14 (100%)	

1 Media ± DE.

2 Prueba t de Welch; Fisher's exact test. p < 0.05,

Tabla 5. Características clínicas de los sujetos según la presencia de grasa corporal elevada.

La Figura 9 presenta un gráfico de dispersión con los valores individuales diferenciados por sexo, junto con líneas de regresión lineal simple para cada grupo y para el total de la muestra, incluyendo las ecuaciones de tendencia y los valores de R y p correspondientes.

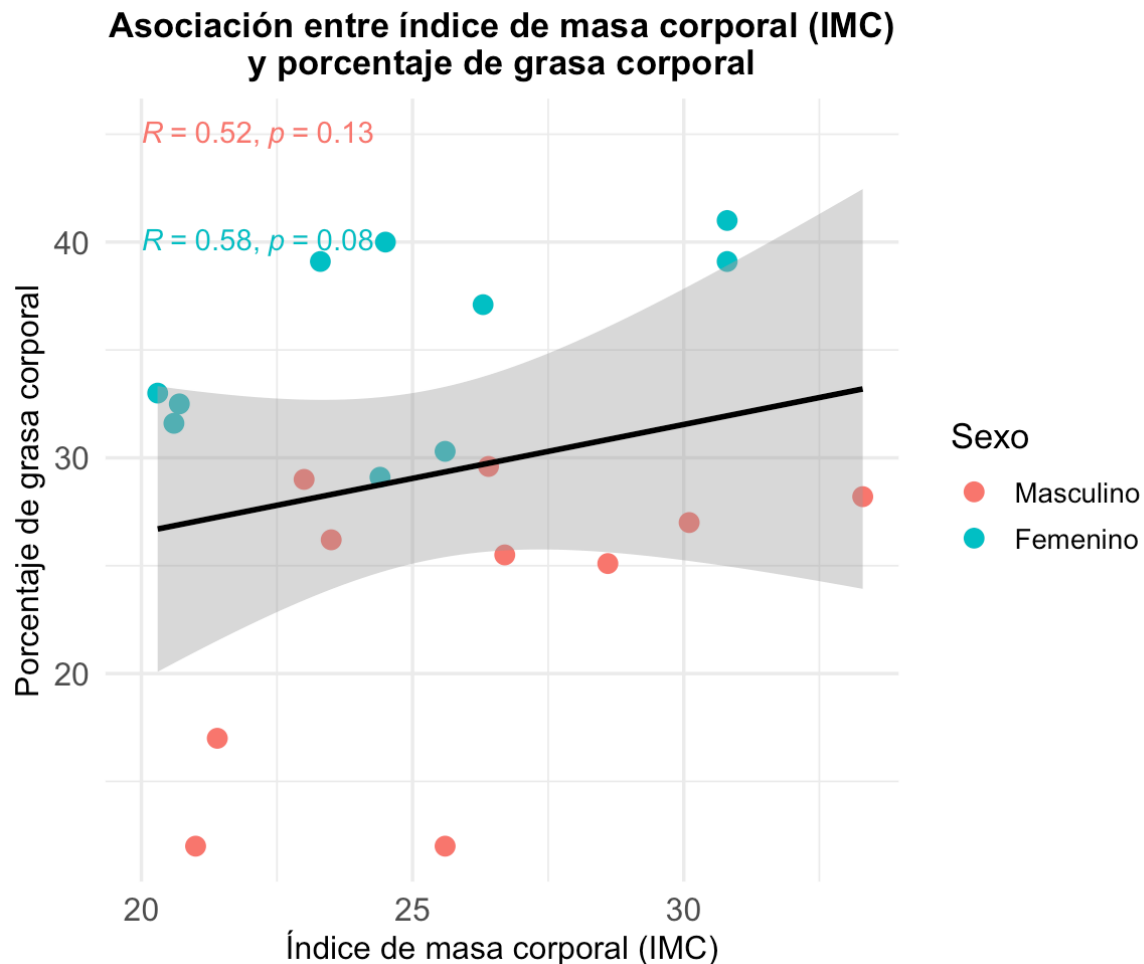


Figura 9. Asociación entre IMC y porcentaje de de grasa corporal.

Correlación entre el índice de masa corporal y el porcentaje de grasa corporal, diferenciada por sexo. Se utilizó una regresión lineal simple para cada grupo y para el total de la muestra.

Distribución clínica de obesidad y hábitos de vida

Los participantes con obesidad se distribuyeron en etapas del sistema EOSS. Nueve participantes se ubicaron en etapa 1. Un participante se ubicó en etapa 0. Cuatro participantes se ubicaron en etapa 2. La distribución se muestra en la Figura 10 mediante gráfico de barras con frecuencia absoluta por etapa.

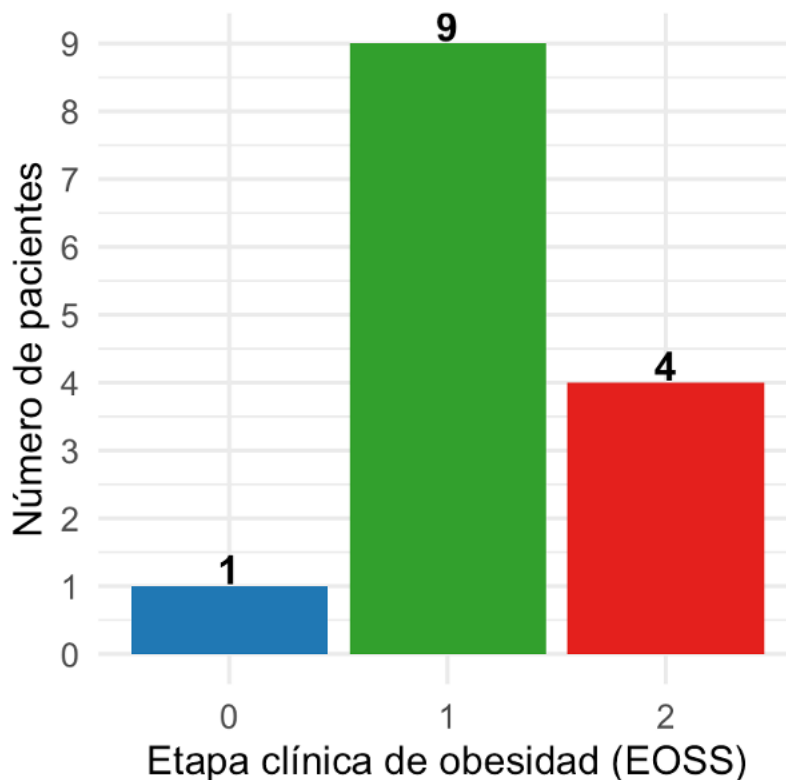


Figura 10. Distribución de pacientes según etapa clínica de obesidad (EOSS).

Gráfico de barras que muestra la frecuencia absoluta de pacientes clasificados en cada etapa clínica del sistema Edmonton de clasificación de obesidad (EOSS). Se observa una mayor concentración de participantes en la etapa 1 ($n=9$), seguida por la etapa 2 ($n=4$), y un menor número en la etapa 0 ($n=1$).

El consumo de alcohol fue reportado por el 75% de los participantes ($n = 15$). El tabaquismo fue reportado por el 10% de los participantes ($n = 2$). La práctica de ejercicio físico fue reportada por el 75% de los participantes ($n = 15$). El uso de drogas fue reportado por el 5% de los participantes ($n = 1$). La Figura 11A muestra las frecuencias en barras con respuestas "Sí"

en verde y "No" en naranja. La comparación del porcentaje de grasa corporal entre quienes practicaban ejercicio y quienes no mostró $p = 0.32$ (prueba de Wilcoxon, Figura 11B).

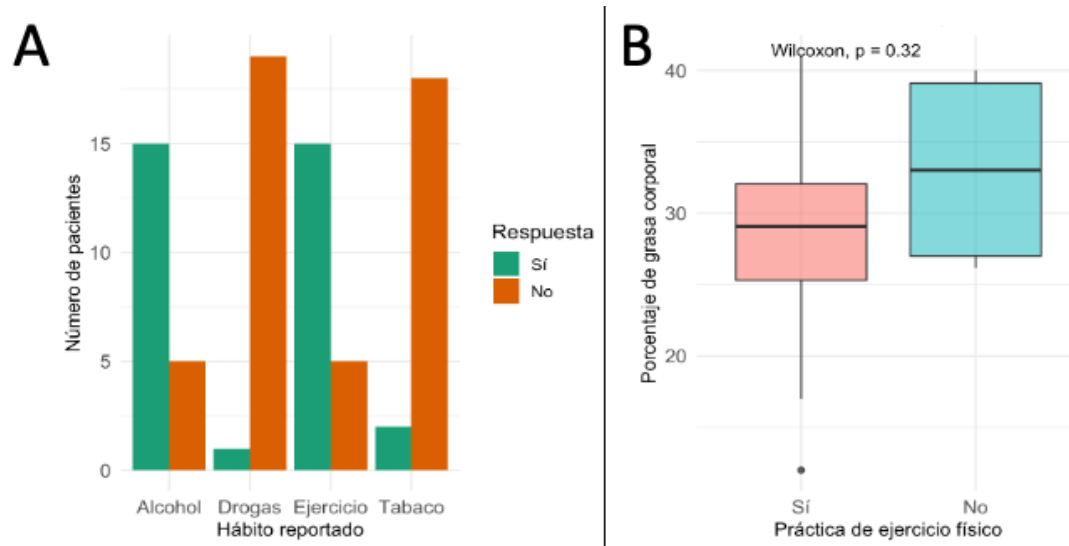


Figura 11. Hábitos relacionados con el estilo de vida.

(A) Frecuencia de reporte de cuatro hábitos relacionados con el estilo de vida en los sujetos incluidos en el estudio: consumo de alcohol, uso de drogas, realización de ejercicio y consumo de tabaco. Las respuestas se agrupan en “Sí” (verde) y “No” (naranja). (B) Comparación del porcentaje de grasa corporal entre individuos que reportaron practicar ejercicio físico regularmente versus aquellos que no lo hacen. La comparación se realizó mediante prueba de Wilcoxon ($p = 0.32$).

Calidad de vida y síntomas psicológicos

Los participantes con grasa corporal elevada presentaron puntajes significativamente menores en la escala IWQOL, lo que indica una peor percepción de calidad de vida relacionada con el peso (84 ± 9 vs. 92 ± 4 ; $p = 0.013$). Aunque se observó una tendencia a mayores síntomas psicológicos en el grupo con grasa elevada, medida por el cuestionario DASS-21, esta diferencia no alcanzó significancia estadística (13 ± 12 vs. 4 ± 6 ; $p = 0.075$) (Tabla 7).

Variable	Total N = 20	Grasa corporal normal ¹ N = 6	Grasa corporal elevada ¹ N = 14	Valor p ²
Puntaje DASS-21	10 ± 11	4 ± 6	13 ± 12	0.075
Puntaje IWQOL	86 ± 9	92 ± 4	84 ± 9	0.013*

1 media ± DE.

2 Prueba t de Welch. * p < 0.05

Tabla 6. Comparación de síntomas psicológicos y calidad de vida según porcentaje de grasa corporal.

Adicionalmente, se exploró la relación entre la calidad de vida y la etapa clínica de obesidad evaluada mediante la Edmonton Obesity Staging System (EOSS). Como se muestra en la figura 12, se identificó una tendencia descendente significativa en los puntajes de IWQOL

conforme aumentaba la etapa EOSS (prueba de Jonckheere-Terpstra, $p = 0.0466$), lo que sugiere una asociación entre el deterioro clínico y la percepción de calidad de vida.

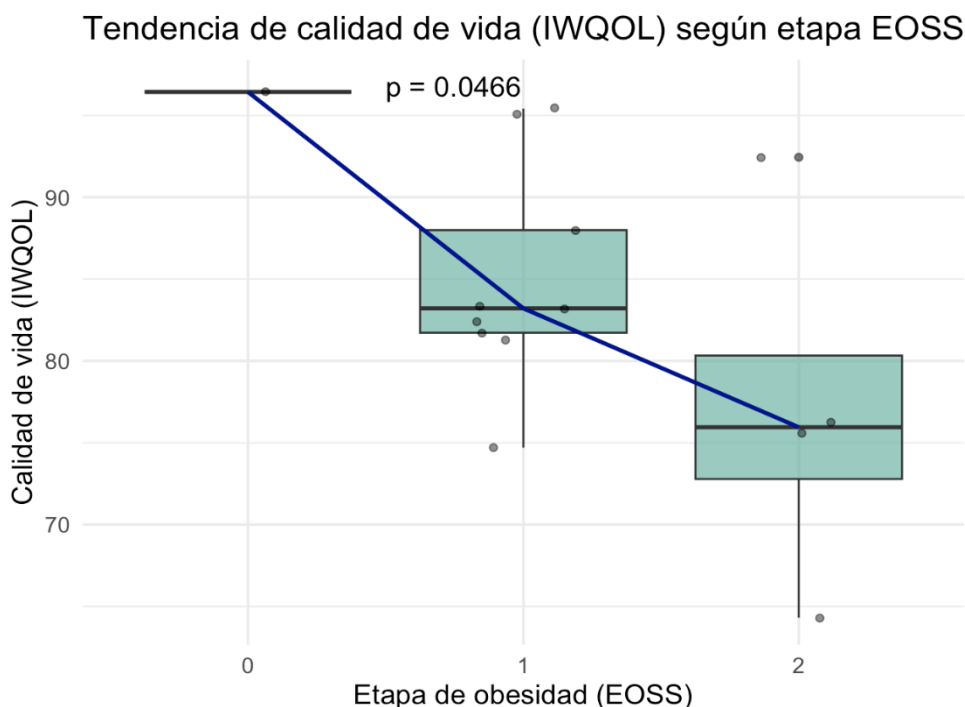


Figura 12. Tendencia de puntajes de calidad de vida (IWQOL) según etapa de obesidad. Distribución de los puntajes del cuestionario IWQOL en función de la etapa de obesidad (EOSS) en los sujetos del estudio. Las cajas representan los rangos intercuartílicos y la línea horizontal indica la mediana. Los puntos grises representan los valores individuales. La línea azul muestra la tendencia lineal entre categorías. Se utilizó la prueba de Jonckheere-Terpstra para evaluar tendencia ordenada, obteniendo un valor de $p = 0.0466$.

Escala	Total N = 14	EOSS 0 N = 1	EOSS 1 N = 9	EOSS 2 N = 4	Valor p^1
DASS-21	12 (4, 17)	4 (4, 4)	12 (7, 17)	6 (0, 30)	0.896
IWQOL	83 (76, 92)	96 (96, 96)	83 (82, 88)	76 (70, 84)	0.047*

¹Prueba de Jonckheere-Terpstra. Mediada (Q1, Q3)

Tabla 7. Comparación de puntajes de DASS-21 y IWQOL según la etapa del sistema EOSS.

Por otro lado, se analizó la posible relación entre la progresión clínica de la obesidad (EOSS) y la presencia de síntomas emocionales. Como se observa en la figura 13, no se encontró una tendencia estadísticamente significativa en los puntajes del DASS-21 a lo largo de las etapas EOSS ($p = 0.896$; prueba de Jonckheere-Terpstra).

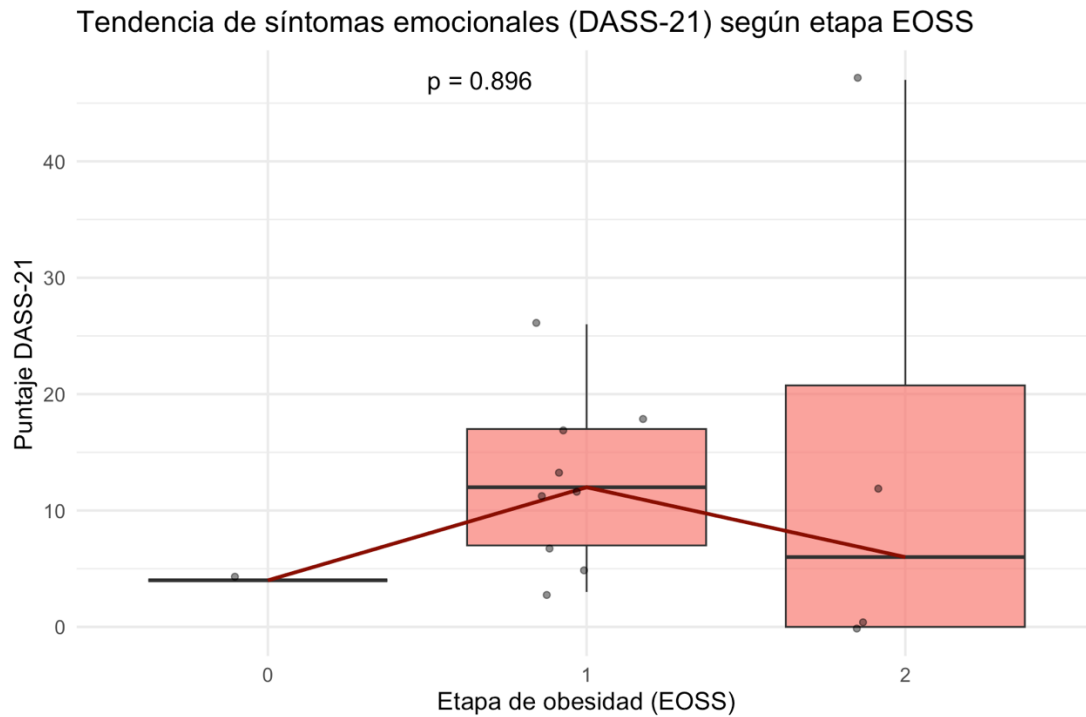


Figura 13. Distribución de puntajes DASS-21 según etapa de obesidad.

Distribución de puntajes totales del instrumento DASS-21 en función de la etapa de obesidad (EOSS) en los sujetos del estudio. Las cajas representan los valores intercuartílicos, con la línea horizontal indicando la mediana, y los puntos individuales corresponden a valores observados por sujeto. La línea roja muestra la tendencia lineal entre grupos. Se utilizó la prueba de Jonckheere-Terpstra para evaluar tendencia entre categorías ordenadas, con un valor de $p = 0.896$.

Objetivo 2 y 3. Secuenciación metagenómica de virus circulantes

Estandarización del método SISPA

La estandarización de la técnica SISPA se realizó utilizando muestras de ARN provenientes de aislados del virus del dengue previamente caracterizados, específicamente los serotipos DENV1 y DENV3. Este proceso incluyó la transcripción inversa (RT) y la síntesis de la segunda cadena de ADN complementario (ADNdc). La eficiencia del protocolo fue evaluada mediante mediciones fluorométricas utilizando el kit Qubit dsDNA High Sensitivity y el equipo Qubit 3.0 Fluorometer, comparando las concentraciones de ADNdc antes y después de la síntesis de la segunda cadena.

En el caso de DENV1, la concentración inicial de ADNdc fue de 12.2 ng/μL, aumentando a 22.1 ng/μL tras la síntesis de doble cadena, lo que reflejó un incremento significativo. Para DENV3B, la concentración inicial fue de 16.3 ng/μL, alcanzando 30.1 ng/μL tras la síntesis. Estos incrementos cuantitativos validaron la robustez del protocolo SISPA para amplificar ADNdc a partir de muestras de ARN, confirmando su eficacia en condiciones controladas y estandarizadas.

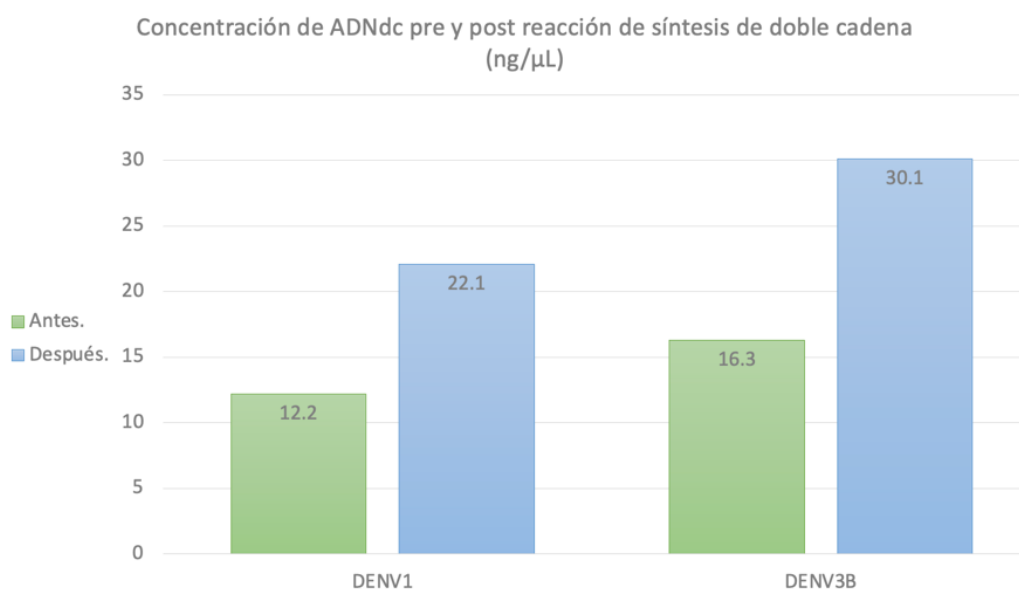


Figura 14 Concentración de ADNdc pre y post reacción de síntesis de doble cadena

Se llevaron a cabo amplificaciones utilizando dos enzimas distintas: LongAmp Taq DNA Polymerase y Q5 High-Fidelity DNA Polymerase, con el objetivo de evaluar su desempeño bajo condiciones estándar. En algunas reacciones se incluyó la adición de DMSO para determinar su

impacto en la eficiencia de amplificación. Las mezclas de reacción fueron preparadas cuidadosamente según las especificaciones de cada enzima.

Para la enzima LongAmp Taq, la mezcla consistió en 25 μL de LongAmp Taq 2X Master Mix, 1 μL de primer (100 μM), 10 μL de ADN molde, y agua libre de nucleasas hasta alcanzar un volumen final de 50 μL . En las condiciones con DMSO, se añadió 1 μL de este compuesto. Para la enzima Q5 High-Fidelity DNA Polymerase, la mezcla incluyó 10 μL de Q5 Reaction Buffer (5X), 1 μL de mezcla de dNTPs (10 mM cada uno), 0.5 μL de Q5 DNA Polymerase (2 U/ μL), 1 μL de primer (100 μM), 10 μL de ADN molde, y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen final de 50 μL . Ambas mezclas fueron sometidas a ciclos térmicos óptimos, ajustados según las recomendaciones del fabricante.

Los productos generados fueron evaluados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.1 % en buffer TBE, corrido a 80 V durante 1.5 horas. Se utilizó un marcador molecular de 1 kb para estimar el tamaño de los productos amplificados. En el carril correspondiente al control negativo no se observaron bandas, lo que confirmó la ausencia de contaminación. Los carriles con la enzima LongAmp Taq mostraron bandas nítidas y definidas, tanto en presencia como en ausencia de DMSO, indicando que esta enzima fue eficaz para la amplificación, y que el DMSO no tuvo un impacto relevante en su rendimiento. (Figura 15)

Por el contrario, en los carriles correspondientes a la enzima Q5 High-Fidelity DNA Polymerase no se detectaron productos de amplificación en ninguna de las condiciones probadas. Esta falta de amplificación podría atribuirse a incompatibilidades con las condiciones del protocolo, tales como la necesidad de optimizar las concentraciones de Mg^{2+} , cofactores, o las temperaturas de ciclo.

Estos hallazgos resaltaron la importancia de ajustar las condiciones experimentales a las características específicas de cada enzima para maximizar su desempeño. En conjunto, los

resultados respaldaron la elección de LongAmp Taq DNA Polymerase como la opción más adecuada para la etapa de amplificación en el protocolo SISPA bajo las condiciones evaluadas.

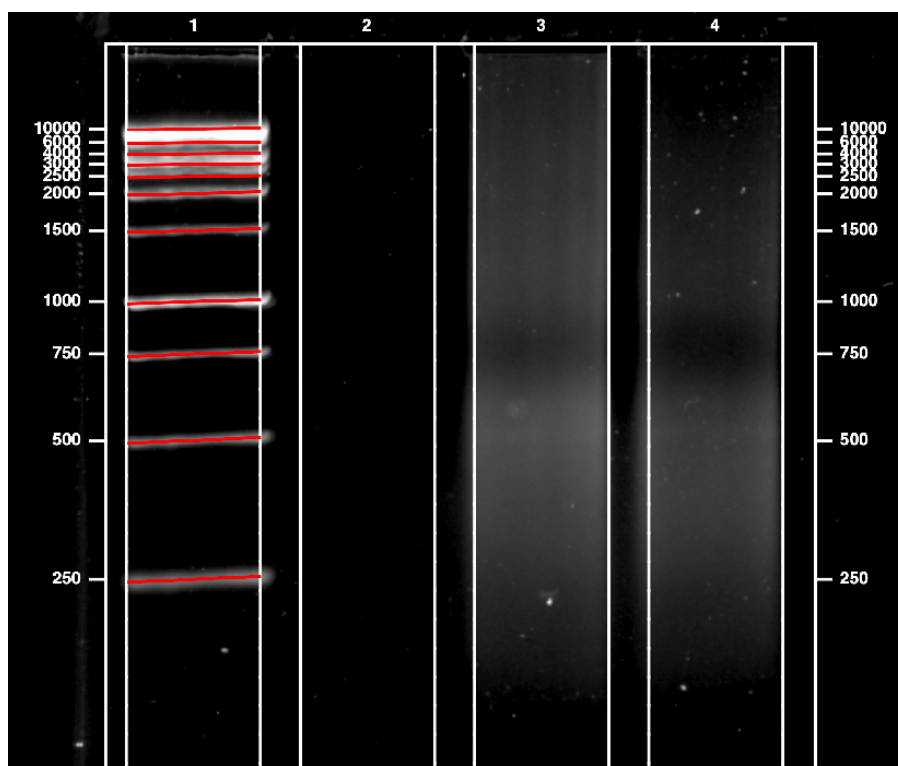


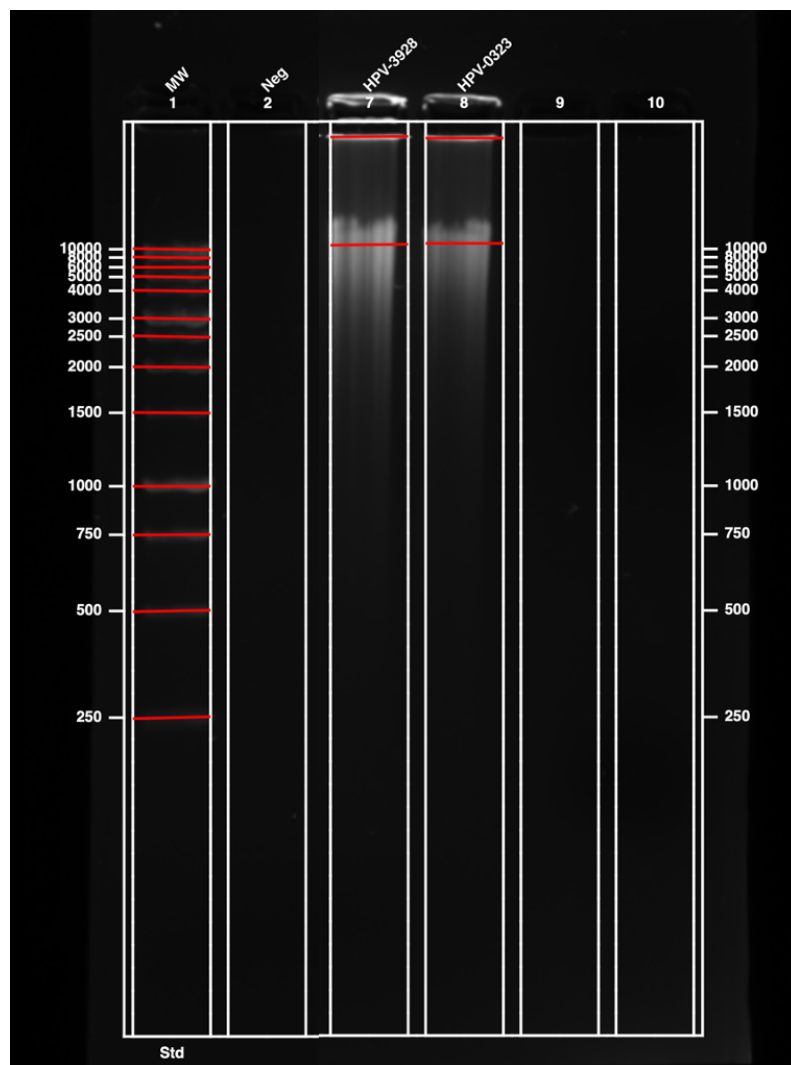
Figura 15 Gel agarosa de productos de SISPA.

Gel agarosa 1.1% corrido en TBE por 1.5 h a 80V. Marcador Promega 1kb ladder, carril 1 Control negativo, carril 2 SISPA con enzima LongAmp, carril 3 SISPA con enzima LongAmp más DMSO. carril 4 SISPA con enzima Q5.

Estandarización del método MDA

La amplificación isotérmica mediante la técnica Multiple Displacement Amplification (MDA) se llevó a cabo siguiendo el protocolo previamente establecido en los métodos, utilizando muestras de ADN positivas para el virus del papiloma humano (VPH). Las muestras utilizadas correspondieron a los identificadores VPH-3928 y VPH-0323. Los productos amplificados fueron evaluados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, preparado con buffer TBE, y corrido durante 1 hora y 30 minutos a un voltaje constante.

En el gel (Figura 16), el carril correspondiente al marcador molecular (MW) mostró estándares de tamaño que iban desde 250 bp hasta 10,000 bp. El control negativo no presentó



bandas, lo que confirmó la ausencia de contaminación. Por el contrario, los carriles que contenían las muestras positivas VPH-3928 y VPH-0323 mostraron bandas intensas, con tamaños superiores a los 10,000 bp, lo cual es característico de una amplificación eficiente y de alta fidelidad. Estos resultados demostraron la robustez del protocolo MDA para amplificar ADN a partir de muestras iniciales limitadas, respaldando su idoneidad para análisis posteriores.

Figura 16 Gel de agarosa del producto del MDA.

Gel agarosa 1.1% corrido en TBE por 2 h a 80V. Carril 1 NT, carril 7 VPH-3928 y carril 8 VPH-0323.

Obtención de perfiles virómicos

A partir del plasma obtenido de los 20 sujetos del estudio, se realizó la extracción y amplificación de ácidos nucleicos, de acuerdo con los procedimientos detallados en la sección de metodología. El material genético resultante fue empleado en los análisis posteriores de secuenciación, clasificación taxonómica y reconstrucción de genomas virales.

Secuenciación

Se realizaron un total de cuatro corridas independientes de secuenciación utilizando tecnología de Nanoporos. Cada corrida tuvo una duración promedio de 12 horas, y generó en promedio 2,997,225 lecturas, con una longitud media de 1,519 bases y una longitud máxima promedio de 1,393,103 bases. La calidad de las lecturas fue evaluada mediante el puntaje Phred (Q score), con una mediana de 20 consistente en todas las corridas. La gráfica de distribución de calidad presentada en la Figura 17 corresponde a una corrida representativa y refleja el comportamiento observado en las demás repeticiones.

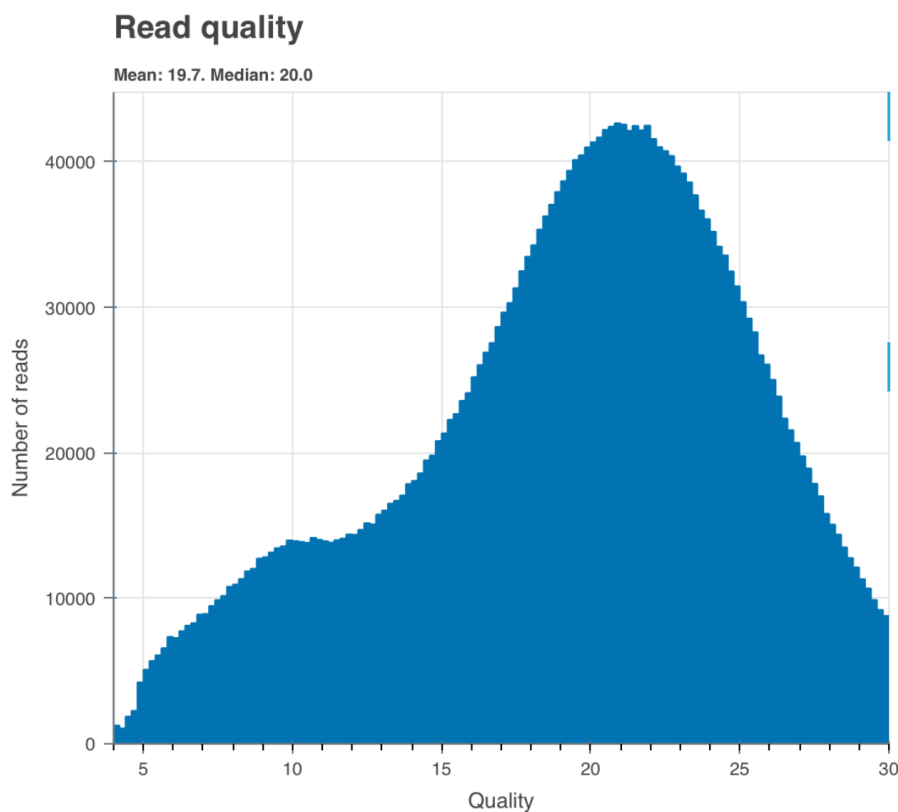


Figura 17. Distribución de calidad de lecturas de secuenciación (Q score).

Distribución de calidad de lecturas obtenidas mediante secuenciación por Nanoporos. El gráfico muestra el número de lecturas en función del puntaje de calidad Phred (Q score). La distribución fue unimodal, con un pico principal entre Q18 y Q22. La mediana fue de Q20 y la media de Q19.7. Esta figura corresponde a una corrida representativa y refleja el patrón observado en las cuatro corridas realizadas.

La distribución de Q scores fue unimodal, con un pico principal centrado entre los valores Q18 y Q22, y una concentración alta de lecturas con valores superiores a Q15. Este patrón se mantuvo en las cuatro corridas, sin desviaciones notables entre sesiones de secuenciación.

Perfil taxonómico global de las muestras

Se realizó una clasificación taxonómica inicial de las lecturas mediante un enfoque basado en k-mers. En promedio, el 87% de las lecturas fue clasificado como de origen humano, abarcando secuencias del genoma nuclear, mitocondrial y retrovirus endógenos como el K113. El 13% restante correspondió a secuencias no humanas, incluyendo bacterias, virus y eucariotas diversos (Figura 18). Estas proporciones se mantuvieron estables entre las cuatro corridas.

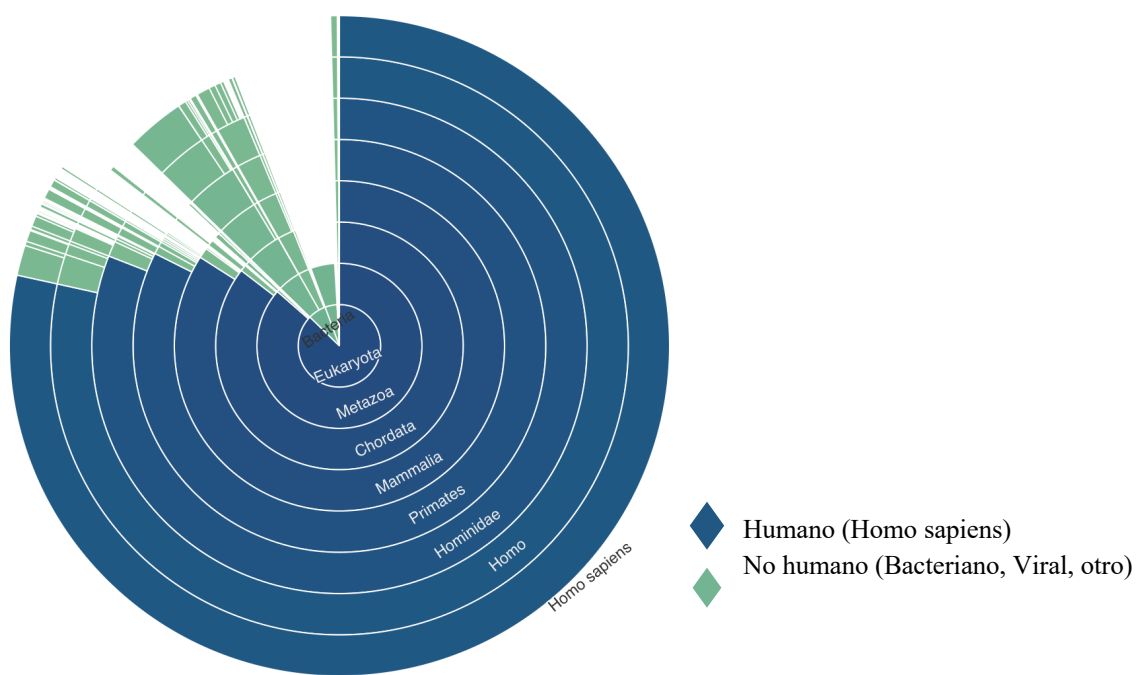


Figura 18. Clasificación taxonómica por K-mers de lecturas secuenciadas en plasma.

Distribución taxonómica de las lecturas secuenciadas en muestras de plasma, clasificadas mediante el enfoque de K-mers. El gráfico circular representa jerárquicamente las asignaciones taxonómicas, destacando que el 87% de las lecturas se clasificaron como de origen humano (color azul), incluyendo genomas mitocondriales completos y retrovirus endógenos como K113. El 13% restante (color verde) corresponde a secuencias no humanas, incluyendo lecturas bacterianas, virales y no clasificadas.

Clasificación taxonómica de lecturas no humanas

Tras el filtrado de las secuencias de origen humano, las lecturas no clasificadas como *Homo sapiens* fueron sometidas a análisis taxonómico utilizando un enfoque basado en k-mers (Kraken2 + Bracken). La figura 19 presenta las proporciones de lecturas clasificadas por sujeto. Se observó una tasa de clasificación general que osciló entre 60.9% y 77.7% por individuo. Dentro de las lecturas clasificadas, la fracción de origen microbiano (bacterias y virus) mostró alta variabilidad, con un rango de 28.7% a 61.2% para lecturas microbianas totales. En particular, las fracciones correspondientes a lecturas virales oscilaron entre 0.24% y 12.5%.

Name	Classified reads	Chordate reads	Unclassified reads	Microbial reads	Bacterial reads	Viral reads	Fungal reads
03	68.3%%	21.8%%	31.7%%	35.5%%	31.6%%	1.07%%	0.04%%
04	72%%	18.7%%	28%%	41.5%%	38.5%%	0.862%%	0.0914%%
05	73.8%%	8.71%%	26.2%%	61.2%%	55.7%%	3.39%%	0.072%%
06	62.8%%	11.6%%	37.2%%	46.2%%	34.7%%	2.06%%	5.54%%
07	69.9%%	11.1%%	30.1%%	53.8%%	49.1%%	1.02%%	0.283%%
08	74.9%%	19.7%%	25.1%%	46%%	29.6%%	7.94%%	0.119%%
09	68.7%%	23.8%%	31.3%%	33.7%%	28.4%%	1.26%%	0.214%%
10	77.7%%	14%%	22.3%%	57%%	48.3%%	6.08%%	0.0783%%
11	63.5%%	6.33%%	36.5%%	53.6%%	26.8%%	12.5%%	0.129%%
12	67.6%%	16.6%%	32.4%%	40.6%%	30.1%%	0.92%%	0.323%%
13	70.5%%	10.7%%	29.5%%	50.6%%	32.1%%	2.73%%	2.47%%
14	62.7%%	10%%	37.3%%	46%%	40.6%%	0.722%%	0.569%%
15	62%%	8.81%%	38%%	46.7%%	38.4%%	1.04%%	1.53%%
16	64.2%%	10.1%%	35.8%%	48.2%%	27.3%%	2.26%%	0.743%%
17	68.3%%	15.7%%	31.7%%	36.9%%	30.3%%	2.1%%	0.467%%
18	64.8%	11%	35.2%	46.1%	32.5%	0.459%	0.522%
19	60.9%	16%	39.1%	28.7%	20%	0.576%	1.44%
20	61.8%	13.8%	38.2%	36.1%	29.5%	0.242%	0.506%
21	66.8%	15.8%	33.2%	42.1%	36%	0.477%	1.36%
22	66.5%	19.7%	33.5%	29.9%	21.7%	2.2%	0.272%

Figura 19. Clasificación taxonómica de lecturas por individuo.

Clasificación taxonómica de lecturas realizadas a las muestras de sujetos (N=20). Se muestran los porcentajes de lecturas clasificadas, correspondientes a cordados, no clasificadas, y microbianas. Estas últimas se dividen en lecturas bacterianas, virales y fúngicas. La variación entre sujetos refleja diferencias en la proporción relativa de componentes del viroma y microbioma plasmático tras el filtrado de secuencias humanas.

La figura 20 muestra la distribución relativa de clases taxonómicas microbianas en los 20 sujetos incluidos. Las barras apiladas representan la abundancia relativa de cada clase por individuo. Los sujetos con porcentaje elevado de grasa corporal están indicados con un recuadro negro. En términos generales, estos individuos presentaron una mayor diversidad de clases taxonómicas, con representación frecuente de Actinomycetes, Gammaproteobacteria y Betaproteobacteria. En contraste, los sujetos con grasa corporal normal mostraron perfiles donde predominan Actinomycetes, Bacilli y también Betaproteobacteria.

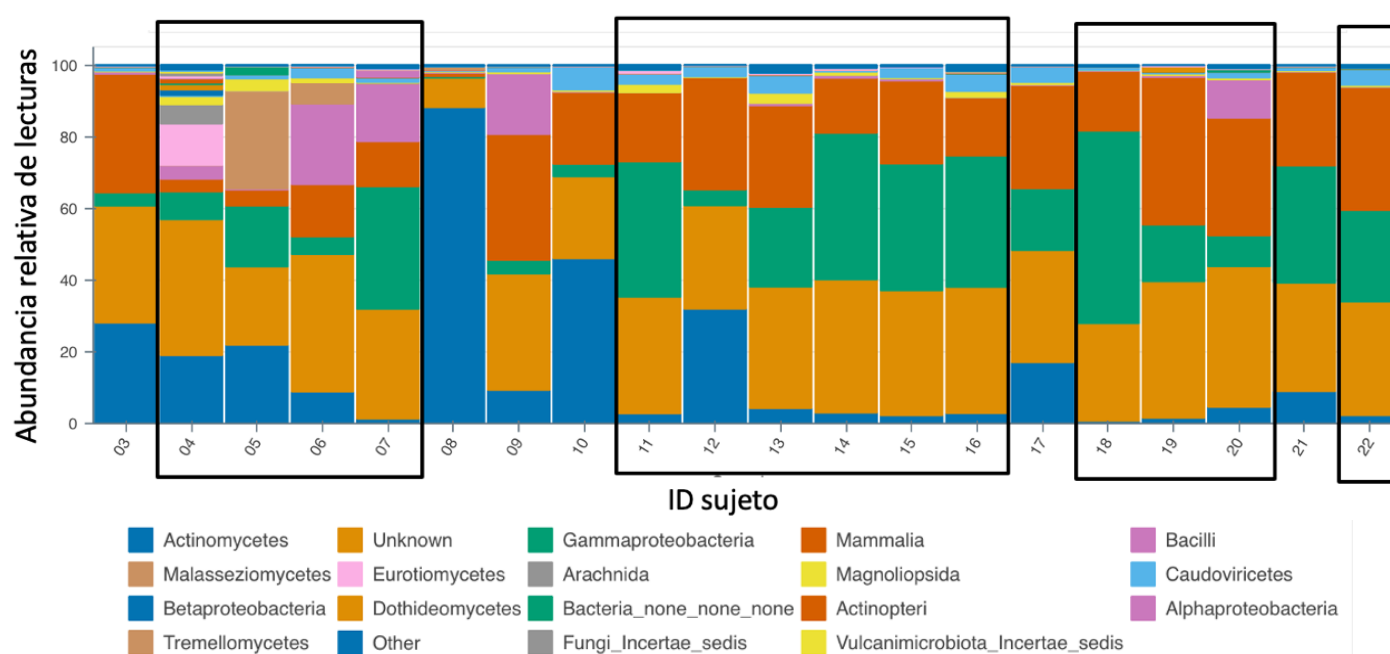


Figura 20. Clasificación taxonómica de lecturas no humanas por clase.

Clasificación taxonómica de lecturas no humanas por clase taxonómica (N=20). Se muestran proporciones relativas de clases microbianas detectadas tras el filtrado de secuencias humanas, agrupadas por individuo. Las barras apiladas representan la abundancia relativa de cada clase. Los sujetos con porcentaje elevado de grasa corporal están indicados con un recuadro negro. Se observan diferencias en la composición y diversidad taxonómica entre los grupos, con representación frecuente de clases bacterianas como Actinomycetes, Gammaproteobacteria y Betaproteobacteria.

Además, se incorporaron ejemplos representativos de dos individuos, uno con grasa corporal elevada y otro con grasa corporal normal, para ilustrar de forma más detallada la composición taxonómica microbiana y viral (Figuras 21 y 22). En el sujeto con grasa corporal elevada (Figura 21A), se identificaron lecturas jerárquicamente clasificadas dentro de los grupos Pseudomonadati y Enterobacteriaceae, incluyendo géneros como *Escherichia*, *Photobacterium* y *Kwinella*. En el mismo individuo, el análisis viómico reveló una distribución viral diversa, dominada por el orden Caudoviricetes (66%) y múltiples detecciones dentro de la familia Anelloviridae, incluyendo Torque teno virus, TT virus sle2552, Anelloviridae sp. y Anellovirus D-HFT-66 (Figura 19A).

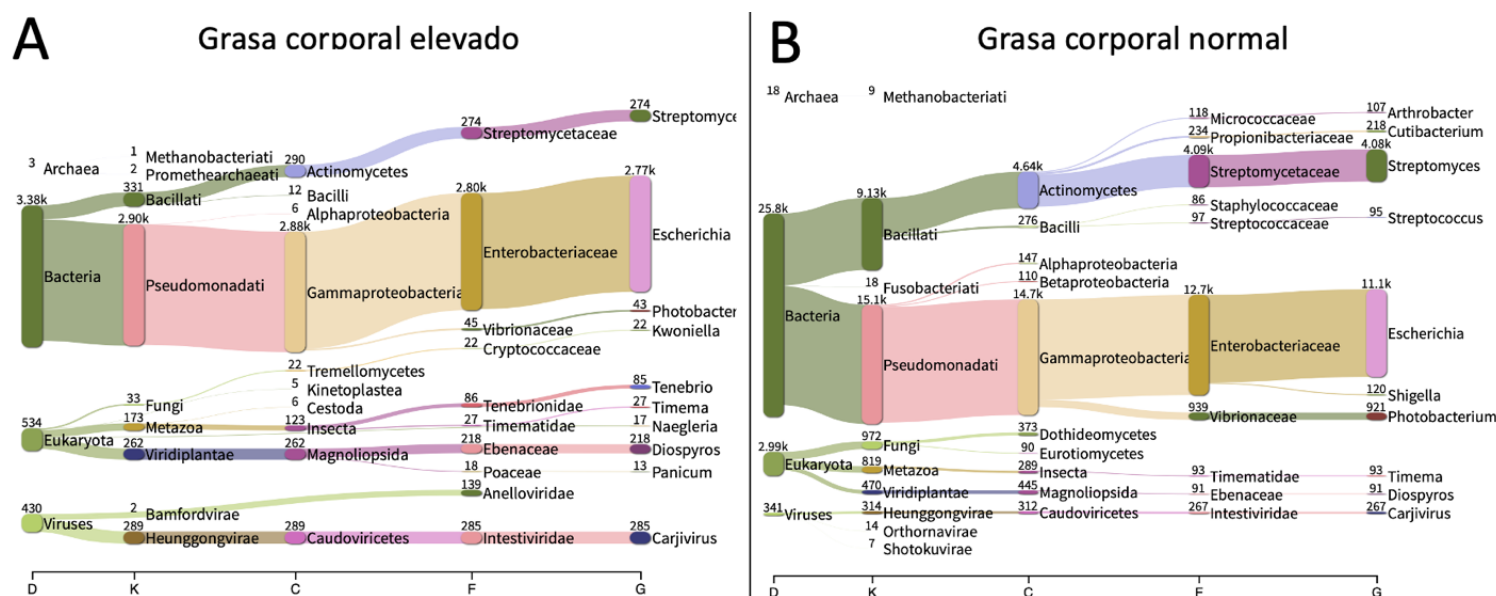


Figura 21. Perfil taxonómico del plasma en individuos con diferente porcentaje de grasa corporal. Perfil jerárquico de clasificación taxonómica en dos sujetos representativos, uno con grasa corporal elevada (A) y otro con grasa corporal normal (B). El análisis se realizó mediante clasificación por k-mers (Kraken2) y visualización con Pavian. Se observan diferencias en las rutas de asignación y abundancia relativa de varios grupos bacterianos. En el panel A, correspondiente al sujeto con grasa elevada, se identifican rutas que incluyen Pseudomonadati, Gammaproteobacteria y Enterobacteriaceae. En el panel B, correspondiente al sujeto con grasa normal, destacan rutas como Actinomycetes y Streptomycetaceae.

Por su parte, el sujeto representativo con grasa corporal normal presentó un perfil bacteriano caracterizado por familias como Streptomycetaceae, Streptococcaceae y Micrococcaceae, así como géneros tales como *Streptomyces*, *Staphylococcus* y *Cutibacterium*

(Figura 21B). En este mismo individuo, el perfil viromico mostró una baja diversidad viral, con predominio marcado de una sola entidad del orden Caudoviricetes, el crAssphage SB294 (85%), y sin detección destacada de Anelloviridae (Figura 22B).

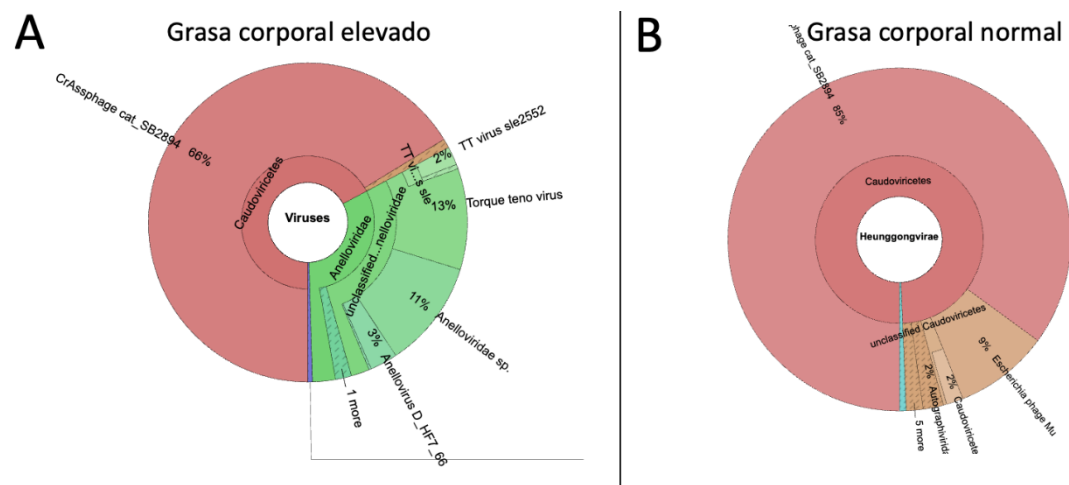


Figura 22. Perfil viromico en plasma según el nivel de grasa corporal.

Distribución jerárquica del contenido viral plasmático en dos individuos representativos, uno con grasa corporal elevada (A) y otro con grasa corporal normal (B), determinada mediante clasificación taxonómica de secuencias virales. En ambos casos, se observa predominancia de miembros del orden Caudoviricetes. El sujeto con grasa elevada presenta además múltiples miembros de la familia Anelloviridae, incluyendo distintos Torque teno virus. En el sujeto con grasa normal, la señal viral se encuentra más concentrada en crAssphage cat_SB2894.

Estos dos perfiles combinados permiten ilustrar de manera clara las diferencias en la composición microbiana y viral del plasma entre sujetos con y sin exceso de grasa corporal, utilizando los mismos individuos representativos para ambos tipos de análisis.

Perfil Virómico detectados en plasma

Para profundizar en la caracterización del viroma plasmático, se realizó una clasificación específica de secuencias virales utilizando Kraken2 junto con una base de datos personalizada compuesta por 18,665 genomas virales de RefSeq, esto se realizó para cada una de las muestras incluidas en el estudio. La figura 23 presenta un mapa de calor que muestra la abundancia relativa de las especies virales detectadas en los 20 sujetos, normalizada mediante puntuación Z (Z-score).

Los individuos están agrupados por su clasificación en función del porcentaje de grasa corporal (elevado vs. normal).

Las filas corresponden a distintos taxones virales, mientras que las columnas representan a cada sujeto. Entre los virus más frecuentes se encuentran miembros de la familia Anelloviridae, incluyendo Anellovirus D_HF7_66, Alphatorquevirus homin13 y homin21, cuya detección fue mayor en individuos con grasa corporal elevada. El sujeto 5, particularmente, mostró alta abundancia de múltiples anellovirus.

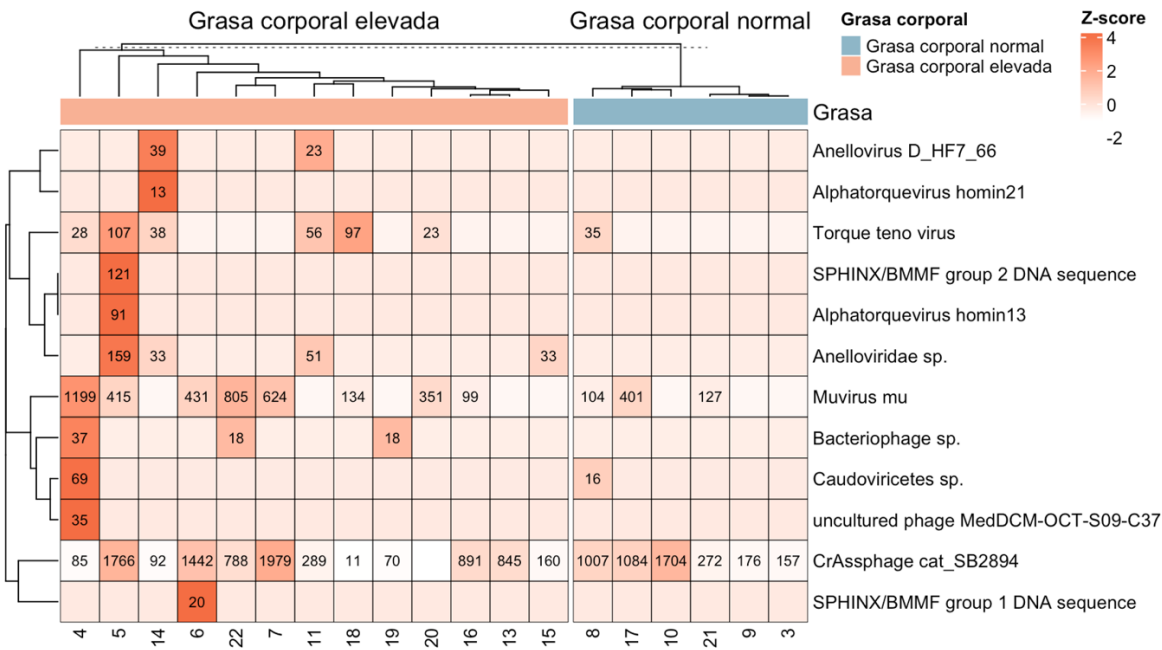


Figura 23. Clasificación de secuencias virales.

Mapa de calor que muestra la abundancia relativa de secuencias virales clasificadas en las muestras plasmáticas de 20 individuos, utilizando Kraken2 con una base de datos curada de 18,665 genomas virales de RefSeq. Los sujetos están agrupados según el nivel de grasa corporal. Las celdas muestran el número de lecturas asociadas a cada taxón viral y están codificadas por color según su Z-score. Se observan diferentes patrones de detección entre los grupos, destacando la familia Anelloviridae en sujetos con grasa elevada y crAssphage cat_SB2894 en ambos grupos.

Por otro lado, el CrAssphage cat_SB2894 (orden Caudoviricetes) fue detectado en la mayoría de los individuos, con mayor intensidad en aquellos con grasa corporal normal. Estos

patrones reafirman los resultados obtenidos previamente en los perfiles globales del viroma plasmático.

Ensamblado de genomas virales mediante ensamblaje de novo

Posterior a la clasificación taxonómica, se realizó un ensamblaje de novo de contigs virales para identificar genomas completos o parciales presentes en las muestras. La figura 24 resume la detección de 16 virus diferentes a lo largo de los 20 individuos, incluyendo especies de Anelloviridae, fágos tipo CrAss-like, y secuencias clasificadas como SPHINX/BMMF.

El estado de detección del genoma se codificó por colores: blanco para ausencia, naranja claro para detección parcial, y naranja oscuro para genomas completos. Los sujetos fueron nuevamente agrupados por nivel de grasa corporal. En general, los individuos con grasa elevada mostraron una mayor presencia de virus, incluyendo múltiples variantes completas o parciales de Torque teno virus. Los sujetos 5, 11, 12, 14 y 20 destacaron por la presencia simultánea de varias especies y genomas completos de anellovirus.

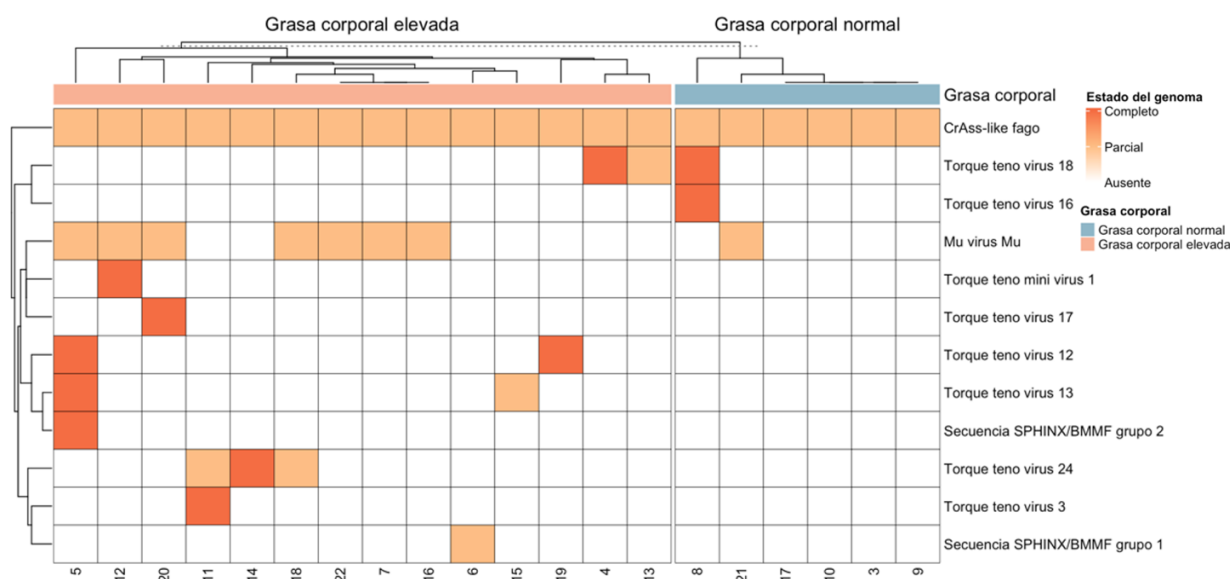


Figura 24. Estado de ensamblaje de genomas virales por individuo y grupo de grasa corporal.

Mapa de calor que representa el estado de detección de 16 genomas virales en las muestras plasmáticas de 20 sujetos, agrupados según el nivel de grasa corporal (elevado o normal). Cada celda indica el estado del genoma viral identificado: blanco (ausente), naranja claro (detección

parcial) y naranja oscuro (ensamblaje completo). Los datos muestran diferencias en el número y estado de los virus detectados entre grupos.

En cambio, en sujetos con grasa corporal normal, la detección se concentró mayormente en el CrAss-like fago y en una o dos especies de Torque teno virus, generalmente en forma parcial. La detección de SPHINX/BMMF se restringió a algunos individuos del grupo con grasa elevada (por ejemplo, los sujetos 5 y 6).

Cobertura de un genoma representativo

Para ilustrar la calidad del ensamblaje y la cobertura de detección, se presenta en la figura 25 el perfil de cobertura de lectura de un genoma completo de Alphatorquevirus homin13 ensamblado a partir de las lecturas del sujeto 5. El genoma de referencia (3,894 pb) fue cubierto completamente con una profundidad media de 116x, y con recuperación del 100% del genoma con una profundidad $\geq 5x$, lo que respalda la solidez del ensamblado obtenido.

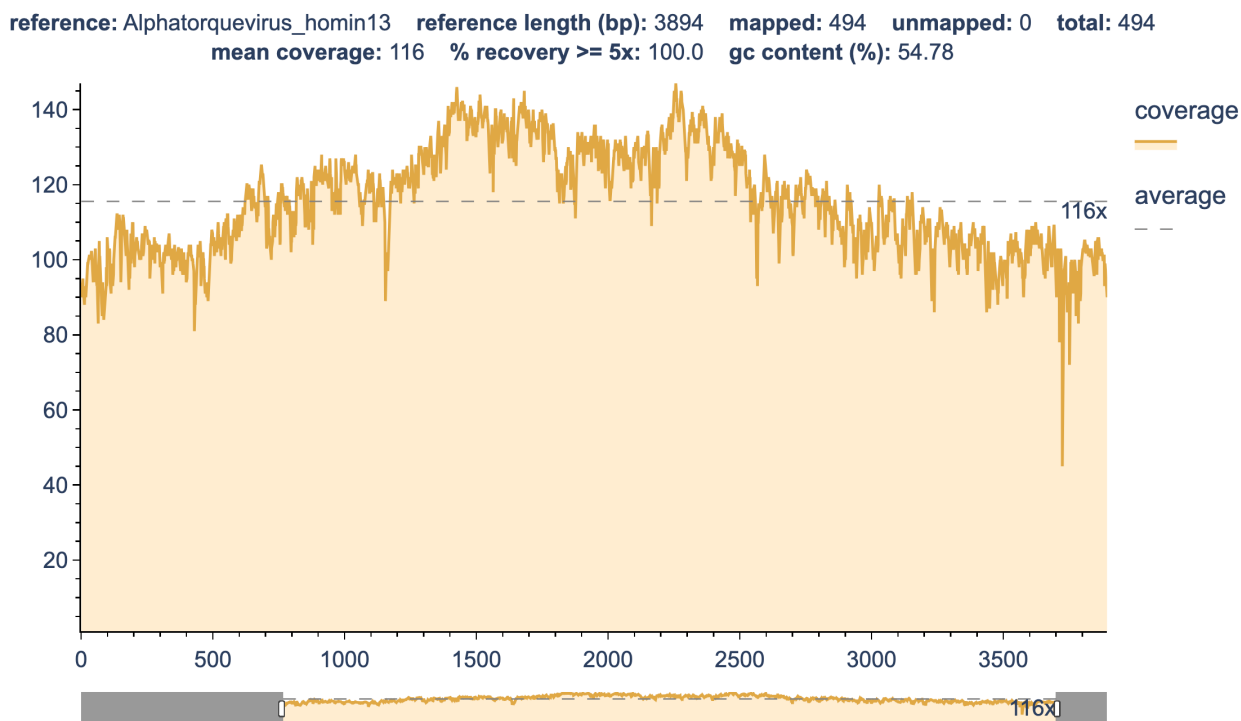


Figura 25. Cobertura de lectura de un genoma viral ensamblado.

Gráfico de cobertura de lectura para el genoma de Alphatorquevirus homini ensamblado a partir de las muestras del sujeto 5. El gráfico muestra la profundidad de lectura a lo largo de la longitud del genoma de referencia (3,894 pb). Se obtuvo una cobertura media de 116x y recuperación del

100% del genoma con al menos 5x de profundidad. Esta visualización respalda la completitud y uniformidad del ensamblaje.

Identificación específica de anellovirus mediante filogenia

Para complementar los análisis de abundancia y ensamblaje viral, se construyeron árboles filogenéticos bayesianos con el objetivo de examinar las relaciones evolutivas entre los genomas anellovirales ensamblados a partir de las muestras plasmáticas. Las secuencias obtenidas del viroma (representadas en azul) fueron analizadas junto con secuencias de referencia disponibles en bases de datos públicas como RefSeq (en rojo), lo que permitió su comparación directa en un contexto filogenético.

Los árboles de máxima credibilidad clados (MCC) fueron generados mediante BEAST v1.10.4, siguiendo el procedimiento descrito en la sección de metodología.

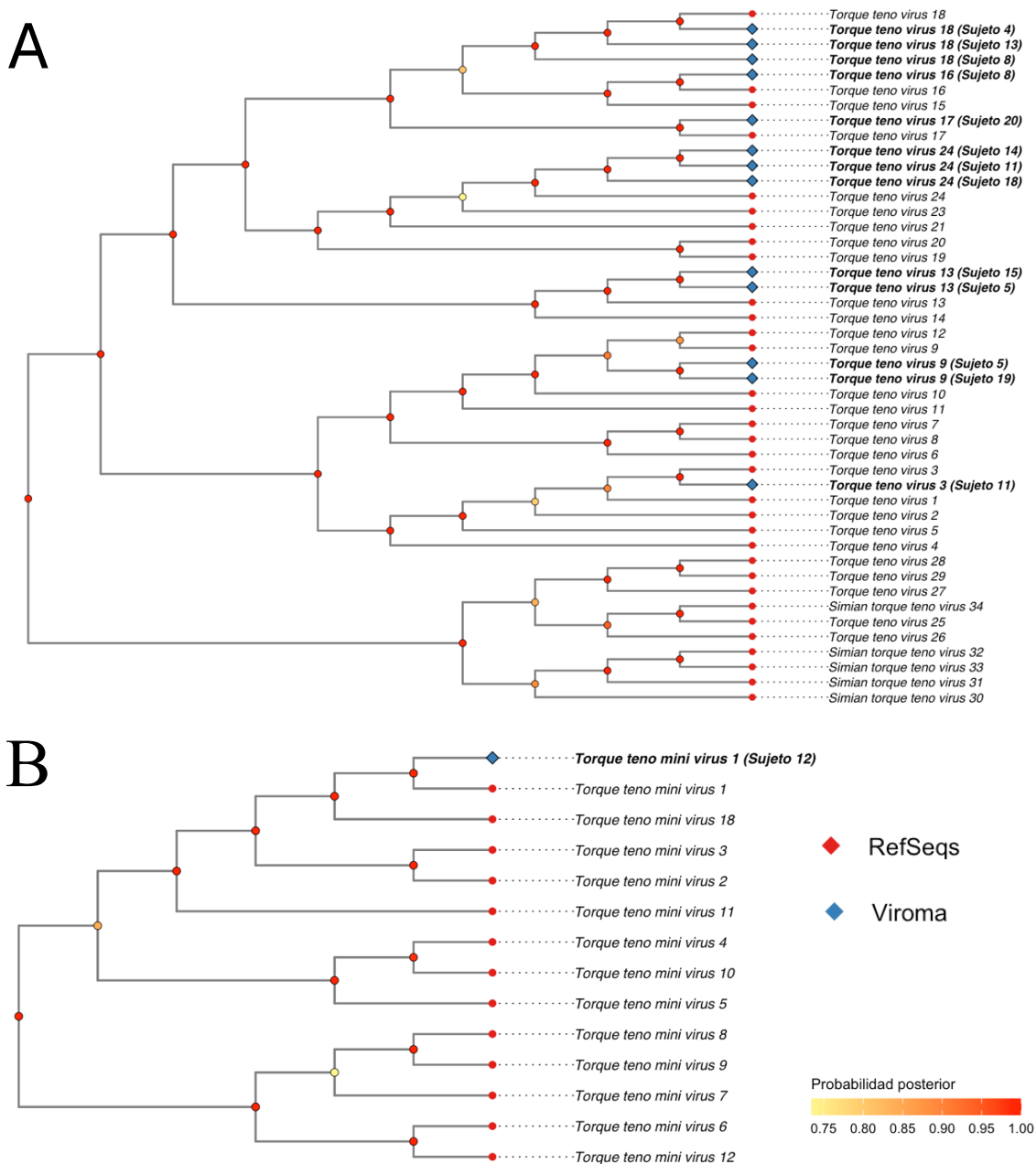


Figura 26. Relación filogenética de anellovirus detectados en plasma mediante análisis bayesiano. Árboles de máxima credibilidad clados (MCC) construidos con BEAST v1.10.4 a partir de la región ORF1 de los genomas virales ensamblados. (A) Torque teno virus (TTV). (B) Torque teno mini virus (TTMV). Los análisis se realizaron con un enfoque MCMC de 10^7 generaciones, descartando el 10 % inicial como burn-in. Se utilizó un modelo evolutivo TVM+F+I+ Γ 4 (seleccionado por BIC mediante ModelFinder), un reloj molecular estricto y un modelo coalescente con población constante. El árbol inicial se generó mediante UPGMA, con distribuciones previas especificadas para tasas de sustitución, frecuencias nucleotídicas, tamaño

poblacional y alturas nodales. Diamantes azules indican secuencias obtenidas del viroma plasmático, y diamantes rojos corresponden a secuencias de referencia (RefSeq). La escala de color en los nodos representa la probabilidad posterior del clado correspondiente.

La figura 26 presenta el árbol filogenético resultante. Se observa que las secuencias derivadas del viroma plasmático se agrupan consistentemente con referencias de especies conocidas, lo que permitió asignar con mayor confianza taxonómica a los virus detectados. Por ejemplo, los ensamblajes virales de los sujetos 5, 13 y 14 se ubicaron con alta probabilidad posterior dentro de clados correspondientes a Torque teno virus 13 y Torque teno virus 24, mientras que la secuencia del sujeto 12 se alineó estrechamente con Torque teno mini virus 1. Estas asignaciones son consistentes con los resultados obtenidos mediante clasificación taxonómica y ensamblaje de novo, y aportan evidencia independiente que refuerza la precisión de la identificación específica.

Anellovirus secuenciados

La tabla 8 muestra las detecciones específicas de especies virales de anellovirus en los distintos sujetos del estudio, organizadas por tipo viral, sujeto y porcentaje de grasa corporal. Se destacan detecciones repetidas de Torque teno virus 13, TTV-24, TTV-18, y TTV-9 en múltiples individuos con grasa corporal elevada.

Especie viral	Sujeto	Porcentaje grasa corporal
Torque teno virus 18	4	Elevado
Torque teno virus 13	5	Elevado
Torque teno virus 9	5	Elevado
Torque teno virus 16	8	Normal
Torque teno virus 18	8	Normal
Torque teno virus 24	11	Elevado
Torque teno virus 3	11	Elevado
Torque teno mini virus 1	12	Elevado
Torque teno virus 18	13	Elevado
Torque teno virus 24	14	Elevado
Torque teno virus 13	15	Elevado
Torque teno virus 24	18	Elevado
Torque teno virus 9	19	Elevado
Torque teno virus 17	20	Elevado

Tabla 8. Especies anellovirales detectadas por sujeto.

Relación de especies anellovirales detectadas en las muestras plasmáticas de los sujetos del estudio, con indicación del número de sujeto y su correspondiente categoría de porcentaje de grasa corporal. Se reportan detecciones de diferentes especies del grupo Torque teno virus, incluyendo variantes como TTV-13, TTV-18, TTV-24, y Torque teno mini virus 1.

Detección de virus ARN

En los análisis realizados, no se identificaron secuencias correspondientes a virus con genoma ARN. Todas las secuencias virales clasificadas, ensambladas y analizadas en este estudio pertenecen a virus con genoma ADN. Esta observación fue consistente en todas las etapas del análisis, incluyendo la clasificación taxonómica con Kraken2 y el ensamblaje de contigs virales.

Objetivo 4. Perfiles virómicos y obesidad

Con el fin de explorar posibles asociaciones entre la composición del viroma plasmático y las características clínicas y demográficas de los participantes, se llevaron a cabo análisis de distribución de especies virales y su relación con el porcentaje de grasa corporal. La figura 27 presenta un gráfico de dispersión que resume la distribución de especies virales según el porcentaje de grasa corporal. Cada punto representa la detección de una especie viral en un individuo, codificada por color (especie) y forma (sexo). Las especies virales están ordenadas verticalmente por el promedio de grasa corporal de los sujetos en los que se detectaron. Se observa que la mayoría de las especies anellovirales se agruparon en el rango de mayor grasa corporal, mientras que varios individuos con menor porcentaje de grasa corporal no presentaron detección de estas especies.

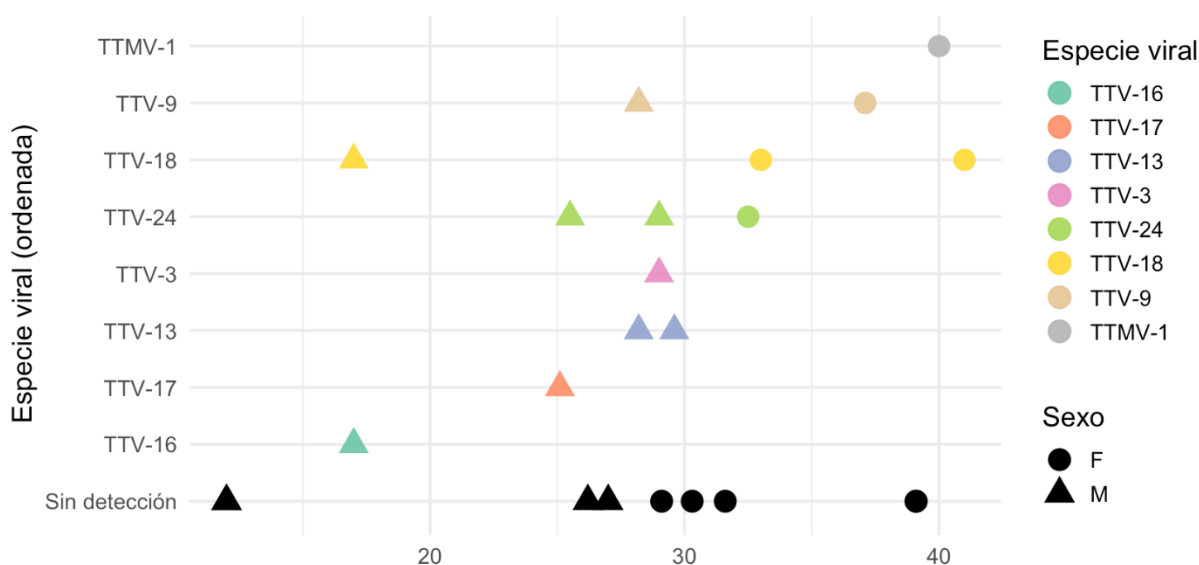


Figura 27. Distribución de especies anellovirales según el porcentaje de grasa corporal.

Distribución de detecciones de especies virales del grupo Anelloviridae en función del porcentaje de grasa corporal de los sujetos del estudio. Cada punto representa una detección individual, codificada por especie viral (color) y sexo (círculo: femenino; triángulo: masculino). Las especies están ordenadas verticalmente de acuerdo con el promedio de grasa corporal de los individuos en los que fueron identificadas. Los sujetos sin detección se indican con símbolos vacíos de contorno negro.

Asociación entre el viroma plasmático y obesidad

Se realizaron análisis comparativos para describir la distribución de características del viroma plasmático en relación con el porcentaje de grasa corporal y otras variables individuales, considerando la presencia de virus específicos, el número total de virus ensamblados por paciente y la relación entre estas detecciones y medidas antropométricas.

Presencia de Anellovirus según nivel de grasa corporal

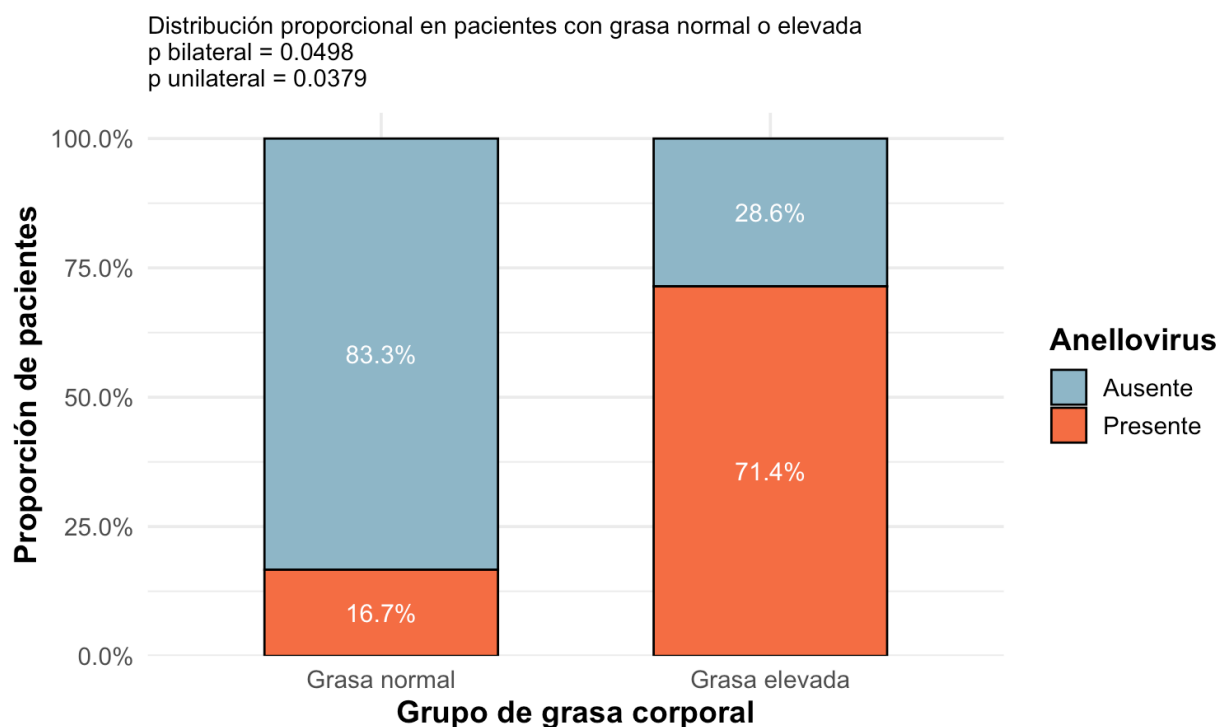


Figura 28. Presencia de Anellovirus según el nivel de grasa corporal.

Proporción de individuos con detección de virus de la familia Anelloviridae en los grupos definidos por porcentaje de grasa corporal (normal vs. elevado). Las barras muestran la distribución relativa de pacientes con detección positiva (color naranja) y sin detección (color azul claro). Se indica el valor p de la prueba exacta de Fisher (bilateral y unilateral) empleada para comparar proporciones entre grupos.

En la figura 28 se presenta una comparación proporcional entre los grupos definidos por porcentaje de grasa corporal (normal vs. elevado), mostrando la presencia o ausencia de anellovirus en cada caso. En el grupo con grasa corporal normal (n=6), 1 de los 6 sujetos (16.7%)

presentó detección de algún miembro de la familia Anelloviridae, mientras que en el grupo con grasa corporal elevada (n=14), se detectaron anellovirus en 10 de los 14 sujetos (71.4%).

Las proporciones fueron comparadas mediante la prueba exacta de Fisher, arrojando valores de p bilateral = 0.0498 y p unilateral = 0.0379, según se muestra en la gráfica. El gráfico utiliza codificación de color para representar la proporción de individuos con detección positiva (color naranja) y sin detección (color azul claro).

Número total de virus ensamblados por paciente

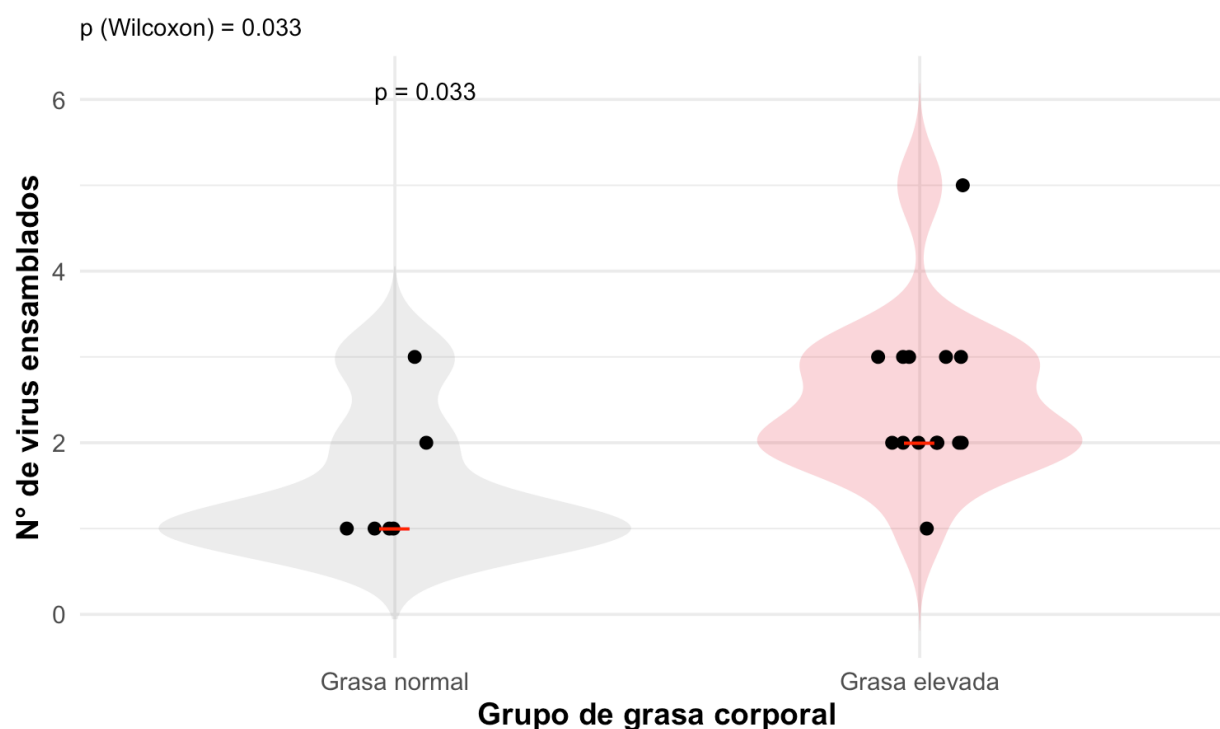


Figura 29. Número total de virus ensamblados por paciente según el grupo de grasa corporal.

Distribución del número de virus ensamblados por individuo en los grupos con grasa corporal normal y elevada. Cada punto representa el total de virus ensamblados en una muestra. Las áreas sombreadas muestran la densidad de distribución y la línea roja indica la media de cada grupo. El valor p corresponde a la prueba de Wilcoxon para comparación entre grupos.

La figura 29 muestra la cantidad total de virus ensamblados por sujeto, con los datos estratificados por grupo de grasa corporal. Cada punto representa un sujeto individual, y las distribuciones están representadas mediante violines que muestran la densidad de valores en cada grupo.

En el grupo con grasa corporal normal, el número de virus ensamblados por sujeto varió entre 0 y 3. En el grupo con grasa corporal elevada, se ensamblaron entre 1 y 6 virus por sujeto. Las medianas de cada grupo están indicadas con una línea horizontal roja. La comparación entre grupos se realizó mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon, obteniendo un valor de $p = 0.033$.

Distribución del rango de grasa corporal en relación con anellovirus

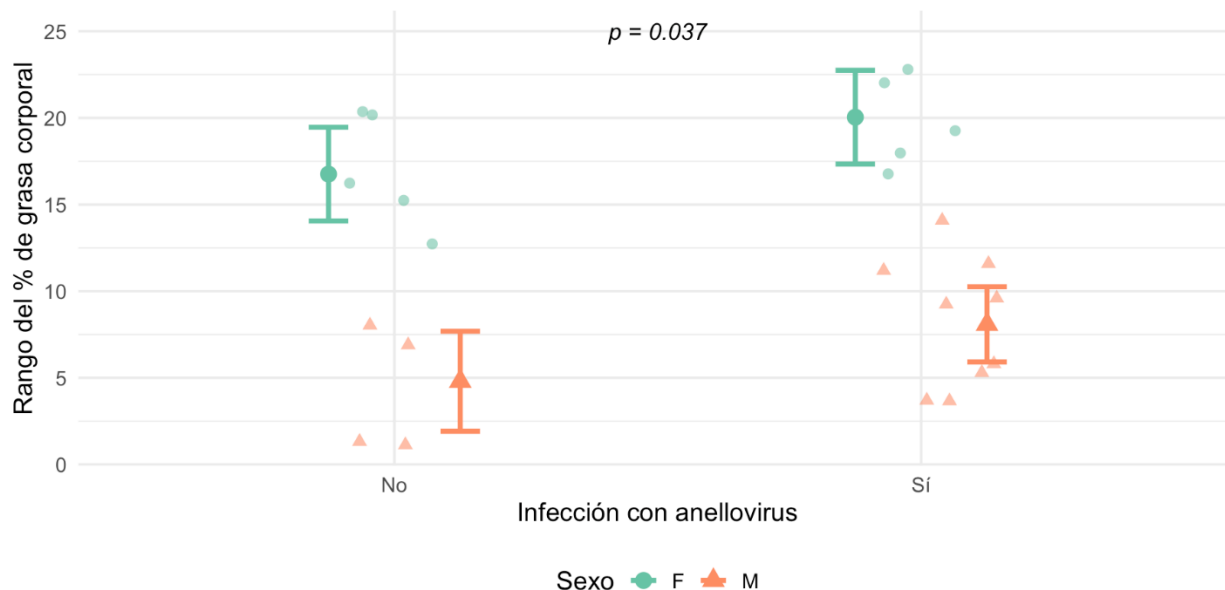


Figura 30. Efecto ajustado de la infección por anellovirus en el rango de grasa corporal.

Modelo lineal ajustado que muestra el rango del porcentaje de grasa corporal según la presencia o ausencia de anellovirus, estratificado por sexo. Las barras representan los efectos estimados con intervalos de confianza al 95 %. Los puntos individuales indican los valores observados del rango. El valor p reportado corresponde al efecto estimado de la infección ajustado por sexo.

En la figura 30 se presenta un modelo lineal ajustado por sexo, basado en los rangos del porcentaje de grasa corporal, con respecto a la detección o no de anellovirus. Los datos se agrupan según presencia o ausencia de anellovirus.

Los puntos individuales representan a cada sujeto y están codificados por sexo: círculos para mujeres y triángulos para hombres. Las barras verticales indican los intervalos de confianza al 95% de los efectos estimados en cada subgrupo. El análisis mostró una diferencia de rangos entre los grupos con y sin anellovirus, con un valor de $p = 0.037$. Este valor fue calculado en un modelo que considera la variación atribuible al sexo en el cálculo del rango de grasa corporal.

DISCUSIÓN

Caracterización de sujetos de estudio

Los resultados obtenidos en esta tesis permiten reflexionar sobre distintos aspectos metodológicos y clínicos relacionados con el estudio de la composición corporal, calidad de vida y salud psicológica en adultos. En este contexto, uno de los principales aciertos metodológicos fue el uso del porcentaje de grasa corporal como variable de clasificación primaria, en lugar del índice de masa corporal (IMC). Esta decisión se sustenta en evidencia científica reciente que ha mostrado limitaciones importantes del IMC como estimador directo de adiposidad, especialmente en contextos clínicos individualizados (Jeong et al., 2023; Ranasinghe et al., 2013). En la presente muestra, aunque se observó una correlación positiva entre IMC y grasa corporal, esta no alcanzó significación estadística ($R = 0.52$ en hombres, $R = 0.58$ en mujeres), reafirmando que el IMC, si bien útil a nivel poblacional, puede ser un predictor impreciso de la composición corporal individual, como ya lo han destacado otros autores (Jeong et al., 2023).

Desde el punto de vista clínico, los resultados muestran que el 70% de los participantes presentó un porcentaje de grasa corporal elevado. A pesar de esta alta prevalencia, la mayoría de los sujetos se encontraba en la etapa 1 del Edmonton Obesity Staging System (EOSS), lo que indica un perfil clínico relativamente estable. Esto se alinea con lo descrito por Kodsí et al. (2022) y Kakon et al. (2019), quienes han documentado la utilidad del EOSS como sistema de clasificación más comprehensivo que el IMC, al incorporar factores funcionales, psicológicos y comórbidos. En nuestro estudio, el EOSS permitió diferenciar a los individuos más allá del peso corporal, reflejándose en la tendencia significativa a una menor calidad de vida (IWQOL) conforme aumentaba la etapa clínica ($p = 0.0466$).

El hallazgo de una peor calidad de vida en personas con mayor grasa corporal ($p = 0.013$) también concuerda con estudios previos que muestran que la obesidad está asociada con deterioro del bienestar físico y emocional (Mejaddam et al., 2022). Este hallazgo valida la elección del IWQOL como instrumento de evaluación, al captar dimensiones específicas relacionadas con el impacto del peso en la vida diaria. Por otro lado, aunque se identificó una tendencia a mayores síntomas psicológicos en el grupo con grasa elevada, la diferencia no fue significativa ($p = 0.075$). Esta falta de significancia podría explicarse por el tamaño reducido de la muestra o por una carga

psicológica aún limitada en la mayoría de los participantes, lo cual también ha sido observado en estudios con obesidad leve a moderada (Jokela & Laakasuo, 2023; Luppino et al., 2010).

Respecto a los hábitos de vida, el alto porcentaje de sujetos que reportó realizar ejercicio físico regularmente (75%) no se tradujo en diferencias significativas en el porcentaje de grasa corporal entre los grupos ($p = 0.32$). Esto contrasta parcialmente con la literatura que establece una relación inversa entre actividad física y adiposidad (Ramírez-Díaz et al., 2022), pero puede explicarse por la ausencia de control sobre la intensidad, frecuencia y tipo de ejercicio en nuestra medición. Estudios como el de Molina et al. (2016) han mostrado que sólo intervenciones de alta intensidad logran reducciones notables en grasa corporal. Así, aunque el autorreporte de ejercicio es un dato valioso, su uso como variable aislada tiene limitaciones, lo que representa una debilidad metodológica.

Perfiles virómicos

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que el viroma plasmático humano, tal como se ha observado en investigaciones previas (Cebriá-Mendoza et al., 2021), está fuertemente dominado por virus de ADN, en particular por miembros de la familia Anelloviridae. A través de secuenciación con tecnología Nanopore y clasificación taxonómica mediante Kraken2 y Bracken, se identificó una notable prevalencia de virus de este grupo, destacando especies como Torque teno virus (TTV), TT virus sle2552 y Anellovirus D-HFT-66, con una representación significativamente más alta en sujetos con grasa corporal elevada.

La elevada frecuencia y diversidad de anellovirus detectados en plasma es consistente con estudios anteriores, que han documentado su presencia casi universal en individuos adultos sanos, así como su extraordinaria variabilidad genética (Cebriá-Mendoza et al., 2021; Taylor et al., 2022). Esto refuerza la noción de que los anellovirus forman parte del viroma sanguíneo "de fondo" o persistente del ser humano, con una notable capacidad de establecer infecciones crónicas asintomáticas (Kyathanahalli, Snedden, & Hirsch, 2021).

Sin embargo, un hallazgo particularmente relevante de este estudio fue la asociación observada entre la abundancia de anellovirus y un mayor porcentaje de grasa corporal. Los sujetos con obesidad presentaron no solo una mayor diversidad de especies virales, sino también una carga

viral más elevada, incluyendo múltiples detecciones completas de genomas de Alphatorquevirus homin13, TTV-13, TTV-24, entre otros. Esta tendencia coincide con lo reportado por Herz et al. (2022), quienes encontraron una mayor carga plasmática de TTV en adultos obesos en comparación con personas delgadas, lo que sugiere que los anellovirus podrían actuar como marcadores indirectos de inmunocompetencia en contextos metabólicos alterados.

La hipótesis de que los anellovirus reflejan el estado funcional del sistema inmunológico ha cobrado fuerza en años recientes. Diversos autores han propuesto que su carga en plasma podría ser útil como biomarcador indirecto de inmunosupresión, dado que su replicación parece ser más activa en individuos con menor control inmunológico (Dal Lago et al., 2024; Taylor et al., 2022). En el contexto de la obesidad, condición caracterizada por una inflamación crónica de bajo grado y disfunción inmune, este incremento en la presencia de anellovirus puede representar una consecuencia de un control inmunitario reducido, más que una causa directa de alteraciones metabólicas (Herz et al., 2022).

Por otra parte, se observó que en sujetos con grasa corporal normal predominaban perfiles virales con baja diversidad y una alta proporción relativa del bacteriófago crAssphage cat_SB2894 (orden Caudoviricetes), hallazgo congruente con lo descrito por otros autores en relación con la presencia ubicua de este fago en muestras humanas intestinales y plasmáticas (Cook et al., 2024). Su mayor representación en sujetos metabólicamente sanos podría indicar una relación indirecta con un microbioma más estable o con menor permeabilidad intestinal.

Desde el punto de vista técnico, la aplicación de tecnología Nanopore permitió generar un volumen de datos robusto, con una media de más de 2.9 millones de lecturas por corrida, y una longitud media de 1,519 bases, lo que facilitó el ensamblaje de genomas virales completos como el de Alphatorquevirus homin13 con una cobertura superior a 100x. Esta capacidad de recuperación de genomas completos en lecturas largas es una de las principales ventajas de esta plataforma frente a tecnologías de lectura corta como Illumina (Cook et al., 2024). No obstante, también debe reconocerse que la precisión base a base de Nanopore es relativamente menor, por lo que la confirmación de ensamblajes y asignaciones filogenéticas requiere enfoques complementarios de validación, como se realizó mediante análisis bayesiano en este estudio.

En cuanto a la clasificación taxonómica, el uso de Kraken2 y Bracken resultó efectivo para la identificación rápida y relativamente precisa de virus presentes en las muestras, como ha sido respaldado por estudios comparativos que destacan la alta sensibilidad de estos métodos en metagenómica viral (Wood & Salzberg, 2019; Lu et al., 2017). Sin embargo, es importante señalar que la precisión de estas herramientas depende en gran medida de la cobertura y actualización de las bases de datos utilizadas, por lo que variantes altamente divergentes o no representadas podrían haber pasado desapercibidas o clasificadas erróneamente (Delwart et al., 2013).

Un aspecto destacable fue la ausencia de detección de virus con genoma ARN en todas las etapas del análisis. Este resultado, si bien pudiera atribuirse a limitaciones metodológicas, también es coherente con la literatura actual que señala que en condiciones normales, el plasma humano sano contiene predominantemente virus de ADN, mientras que los virus ARN son escasamente detectables en ausencia de infección activa o inmunosupresión severa (Nakamura et al., 2020; Feng et al., 2023).

Asociaciones en composición del viroma plasmático y obesidad

Los hallazgos presentados en esta sección aportan nueva evidencia sobre la posible asociación entre la composición del viroma plasmático humano y la adiposidad corporal, destacando en particular la relación entre la detección de virus de la familia Anelloviridae y el porcentaje de grasa corporal. En primer lugar, se observó una marcada diferencia en la prevalencia de anellovirus entre individuos con grasa corporal elevada y aquellos con valores normales: mientras que solo el 16.7% (1 de 6) de los sujetos con grasa corporal normal presentó detección de anellovirus, esta proporción se elevó al 71.4% (10 de 14) en el grupo con grasa corporal elevada. Esta diferencia resultó estadísticamente significativa (p bilateral = 0.0498; p unilateral = 0.0379), sugiriendo una asociación no aleatoria entre mayor adiposidad y presencia de estos virus (Figura 28).

Este resultado se alinea con hallazgos previos que indican una mayor carga de anellovirus, particularmente Torque teno virus (TTV), en personas con obesidad. Herz et al. (2022) encontraron que individuos obesos presentaban cargas plasmáticas significativamente más altas de TTV en comparación con personas delgadas, incluso tras ajustar por variables como edad y sexo. Además, dicha carga se correlacionó positivamente con medidas de adiposidad central, como la

circunferencia cintura-cadera, aunque no se observó una correlación significativa con el porcentaje de grasa corporal medido directamente (Herz et al., 2022). Sin embargo, los resultados del presente estudio, que muestran una diferencia significativa en la prevalencia de anellovirus en relación con el porcentaje de grasa corporal, podrían sugerir que cuando se utiliza una medición directa y precisa de la composición corporal, más allá del IMC, la asociación entre adiposidad y presencia de anellovirus se vuelve más evidente.

El segundo hallazgo relevante fue el mayor número de virus ensamblados por paciente en el grupo con grasa corporal elevada. Mientras que los sujetos con grasa corporal normal presentaron entre 0 y 3 virus ensamblados, aquellos con grasa corporal elevada mostraron entre 1 y 6 virus detectados, con una diferencia significativa en la distribución ($p = 0.033$, prueba de Wilcoxon; Figura 29). Este resultado sugiere que, además de la mayor prevalencia de anellovirus, los individuos con mayor grasa corporal albergan una mayor diversidad viral plasmática, lo cual podría reflejar una menor eficacia del sistema inmunitario para suprimir la replicación o la persistencia de virus comensales. Esto concuerda con lo reportado por Cebriá-Mendoza et al. (2023), quienes describen que la diversidad de anellovirus en humanos aumenta con la edad y se ve influida por factores como el sexo, con mayor diversidad y carga en hombres. En este sentido, la obesidad, caracterizada por una inflamación crónica de bajo grado y alteraciones inmunológicas funcionales, podría ser un entorno fisiológico propicio para la persistencia y replicación de múltiples variantes virales (Cebriá-Mendoza et al., 2023).

El tercer análisis refuerza esta hipótesis desde una perspectiva multivariable: el modelo lineal ajustado por sexo mostró que la presencia de anellovirus se asoció significativamente con un mayor rango de porcentaje de grasa corporal ($p = 0.037$; Figura 30). Esto indica que, incluso controlando la variación atribuible al sexo, variable que, como se ha documentado, modula la carga y diversidad del viroma (Cebriá-Mendoza et al., 2023), la detección de anellovirus se mantiene como un factor predictivo de mayor adiposidad. Estos datos consolidan la hipótesis de que los anellovirus podrían actuar como biomarcadores del estado inmunometabólico del huésped, más que como meros pasajeros virales inocuos.

Cabe señalar que la literatura científica ha mostrado resultados mixtos respecto a la relación entre anellovirus y obesidad. Aunque estudios como el de Cimponeriu et al. (2013) encontraron una mayor frecuencia de infección por TTV en mujeres obesas en comparación con controles

delgados, otras investigaciones más amplias no observaron diferencias significativas en la prevalencia de estos virus entre grupos con y sin obesidad (Toma et al., 2018). Estas discrepancias pueden explicarse por diferencias en el diseño metodológico, como el uso de PCR convencional vs. técnicas metagenómicas más sensibles, así como por la manera en que se define la obesidad (IMC vs. porcentaje de grasa corporal). En este estudio, la utilización del porcentaje de grasa corporal como criterio de clasificación permitió detectar asociaciones que podrían haber pasado desapercibidas en estudios que utilizan solo el IMC como indicador de adiposidad.

Además, aunque algunos trabajos no han mostrado una asociación directa entre la obesidad y la presencia de anellovirus, sí han identificado vínculos entre estos virus y otras enfermedades metabólicas relacionadas, como la diabetes tipo 2 y la hipertensión arterial (Toma et al., 2018). Esto sugiere que el viroma plasmático, dominado por anellovirus en individuos sanos (Cebriá-Mendoza et al., 2023), podría estar influenciado por el estado metabólico general del huésped, más allá del componente aislado de la obesidad.

Por tanto, los resultados presentados aquí no solo son consistentes con la evidencia que vincula una mayor carga de anellovirus con estados inmunometabólicos alterados, sino que también aportan una visión novedosa al demostrar una asociación clara entre la presencia de anellovirus y el porcentaje de grasa corporal medido directamente, así como una mayor diversidad viral en individuos con mayor adiposidad. Este hallazgo tiene implicaciones relevantes para futuras investigaciones, ya que sugiere que los anellovirus podrían utilizarse como biomarcadores no invasivos del estado inmunológico en el contexto de obesidad y comorbilidades relacionadas.

Desde un punto de vista clínico, el monitoreo de anellovirus podría convertirse en una herramienta útil para identificar individuos con obesidad que presentan una mayor alteración inmunitaria, lo cual tendría importancia pronóstica en situaciones como el riesgo de infecciones graves o la respuesta a intervenciones metabólicas. No obstante, es necesario realizar estudios longitudinales con tamaños muestrales más amplios y técnicas metagenómicas estandarizadas para validar estos resultados y esclarecer la direccionalidad de la asociación observada.

CONCLUSIÓN

El viroma plasmático humano en la población del estudio se caracterizó por una alta frecuencia de Anellovirus en individuos con porcentaje de grasa corporal elevado (71.4 %), en contraste con una menor presencia viral en quienes tenían niveles normales de grasa (16.7%).

Los hallazgos de este estudio permiten plantear diversas consideraciones relevantes tanto en el ámbito metodológico como clínico, en relación con la caracterización del viroma plasmático en adultos con y sin obesidad. En primer lugar, se destaca el valor de utilizar el porcentaje de grasa corporal como variable principal para la clasificación del estado adiposo, en lugar del índice de masa corporal (IMC). Esta elección metodológica permitió una discriminación más precisa de la composición corporal individual y facilitó la identificación de asociaciones que podrían haber pasado desapercibidas con el uso exclusivo del IMC. En esta línea, la aplicación del Edmonton Obesity Staging System (EOSS) y del cuestionario IWQOL permitió una evaluación más comprensiva de la salud física, funcional y psicológica de los participantes.

En cuanto al análisis virómico, los resultados confirman que el viroma plasmático humano en adultos está dominado por virus de ADN, especialmente Anelloviridae, cuya detección fue considerablemente mayor en individuos con un porcentaje elevado de grasa corporal. Esta asociación, respaldada por diferencias significativas en la prevalencia, diversidad y carga viral entre grupos, sugiere que los anellovirus podrían reflejar alteraciones inmunometabólicas vinculadas con la obesidad. La hipótesis de que estos virus actúan como biomarcadores del estado inmunológico del huésped cobra fuerza, especialmente en un contexto de disfunción inmune crónica como el que caracteriza a esta condición.

La plataforma de secuenciación Nanopore demostró ser una herramienta efectiva para el análisis del viroma, permitiendo no solo una detección sensible de virus presentes en plasma, sino también el ensamblaje de genomas completos. No obstante, se reconocen limitaciones inherentes a esta tecnología, como su menor precisión a nivel de base, que deben ser abordadas con validaciones complementarias. Asimismo, la ausencia de detección de virus con genoma ARN, aunque congruente con lo descrito en individuos sanos, plantea interrogantes sobre la sensibilidad de la metodología empleada y refuerza la necesidad de aplicar enfoques metagenómicos más integradores en futuras investigaciones.

Finalmente, los resultados de este estudio abren nuevas líneas de investigación sobre el papel del viroma en la fisiopatología de la obesidad. La identificación de una mayor diversidad viral en individuos con mayor adiposidad plantea preguntas relevantes sobre la influencia del sistema inmunitario en la modulación del viroma plasmático y su posible implicancia clínica. La utilización de anellovirus como biomarcadores no invasivos del estado inmunometabólico representa una propuesta prometedora, aunque preliminar. Será fundamental realizar investigaciones longitudinales con muestras más amplias, control riguroso de variables confusoras y metodologías estandarizadas para validar esta asociación y explorar su utilidad diagnóstica o pronóstica en la práctica clínica.

En conjunto, esta tesis proporciona evidencia inicial pero significativa sobre la relación entre composición corporal, salud integral y viroma plasmático en adultos, sentando las bases para futuras investigaciones en el campo de la metagenómica viral y su aplicación en contextos clínicos relacionados con la obesidad.

REFERENCIAS

- Aggarwala, V., Liang, G., & Bushman, F. D. (2017). Viral communities of the human gut: metagenomic analysis of composition and dynamics. *Mobile DNA*, 8, 12. <https://doi.org/10.1186/s13100-017-0095-y>
- Atkinson, R. L. (2007). Viruses as an etiology of obesity. *Mayo Clinic Proceedings*, 82(10), 1192-1198. <https://doi.org/10.4065/82.10.1192>
- Breitbart, M., Haynes, M., Kelley, S., Angly, F., Edwards, R. A., Felts, B., et al. (2008). Viral diversity and dynamics in an infant gut. *Research in Microbiology*, 159(5), 367-373. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2008.04.006>
- Cadwell, K. (2015). The virome in host health and disease. *Immunity*, 42(6), 805-813. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.05.003>
- Cao, Z., Sugimura, N., Burgermeister, E., Ebert, M. P., Zuo, T., & Lan, P. (2022). The gut virome: A new microbiome component in health and disease. *EBioMedicine*, 81, 104113. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104113>
- Carter, J. E. L., & Heath, B. H. (1990). *Somatotyping: Development and applications*. Cambridge University Press.
- Cebriá-Mendoza, M., Beamud, B., Andreu-Moreno, I., Arbona, C., Larrea, L., Díaz, W., ... & Cuevas, J. M. (2023). Human Anelloviruses: Influence of Demographic Factors, Recombination, and Worldwide Diversity. *Microbiology Spectrum*, 11(3), e04928–22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.04928-22>
- Cimponeriu, D., Serafinceanu, C., Apostol, P., Toma, M., Stavarachi, M., Radu, I., ... & Ion, D. A. (2013). Potential association of obesity with IL6 G-174C polymorphism and TTV infections. *Central European Journal of Biology*, 8(7), 625–632. <https://doi.org/10.2478/s11535-013-0178-1>
- Conceição-Neto, N., Zeller, M., Lefrère, H., De Bruyn, P., Beller, L., Deboutte, W., et al. (2015). Modular approach to customise sample preparation procedures for viral metagenomics: a

- reproducible protocol for virome analysis. *Scientific Reports*, 5, 16532. <https://doi.org/10.1038/srep16532>
- Cook, R., et al. (2024). Nanopore and Illumina sequencing reveal different viral populations from human gut samples. *Microbial Genomics*, 10(4), 001236.
- Delwart, E., et al. (2013). AIDS alters the commensal plasma virome. *Journal of Virology*, 87(19), 10912-10915.
- Dhurandhar, N. V., Israel, B. A., Kolesar, J. M., Mayhew, G. F., Cook, M. E., & Atkinson, R. L. (2000). Increased adiposity in animals due to a human virus. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, 24(8), 989-996. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801319>
- Duerkop, B. A., & Hooper, L. V. (2013). Resident viruses and their interactions with the immune system. *Nature Immunology*, 14(7), 654-659. <https://doi.org/10.1038/ni.2613>
- Dutilh, B. E., Cassman, N., McNair, K., Sanchez, S. E., Silva, G. G., Boling, L., et al. (2014). A highly abundant bacteriophage discovered in the unknown sequences of human faecal metagenomes. *Nature Communications*, 5, 4498. <https://doi.org/10.1038/ncomms5498>
- Faulkner, J. A. (1968). Physiology of swimming and diving. In H. B. Falls (Ed.), *Exercise physiology* (pp. 415–446). Academic Press.
- Feng, Y., et al. (2023). An atlas of the blood virome in healthy individuals. *Virus Research*, 323, 199004.
- Frisancho, A. R. (1990). *Anthropometric standards for the assessment of growth and nutritional status*. University of Michigan Press.
- Górski, A., Weber-Dąbrowska, B., Jończyk-Matysiak, E., Wojciechowska, R., & Łusiak-Szelachowska, M. (2017). Bacteriophages in the gastrointestinal tract and their implications. *Gut Pathogens*, 9(1), 44. <https://doi.org/10.1186/s13099-017-0199-1>

- Handley, S. A., Thackray, L. B., Zhao, G., Presti, R., Miller, A. D., Droit, L., et al. (2012). Pathogenic simian immunodeficiency virus infection is associated with expansion of the enteric virome. *Cell*, 151(2), 253-266. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.08.049>
- Hannigan, G. D., Duhaime, M. B., Koutra, D., & Schloss, P. D. (2018). Biogeography and environmental conditions shape bacteriophage-bacteria networks across the human microbiome. *PLoS Computational Biology*, 14(4), e1006099. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006099>
- Hasan, M. R., Rahman, M., Khan, T., Saeed, A., Sundararaju, S., Flores, A., et al. (2021). Virome-wide serological profiling reveals association of herpesviruses with obesity. *Scientific Reports*, 11(1), 2562. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81894-2>
- Herz, C. T., Kulterer, O. C., Kulifaj, D., Gelas, F., Franzke, B., Haupenthal, F., ... & Bond, G. (2022). Obesity is associated with a higher Torque Teno viral load compared to leanness. *Frontiers in Endocrinology*, 13, 962090. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.962090>
- Jeong, S. M., Lee, D. H., Rezende, L. F. M., & Giovannucci, E. L. (2023). Different correlation of body mass index with body fatness and obesity-related biomarker according to age, sex and race-ethnicity. *Scientific Reports*, 13, 30527. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-30527-w>
- Jokela, M., & Laakasuo, M. (2023). Obesity as a causal risk factor for depression: Systematic review and meta-analysis of Mendelian randomization studies. *Journal of Psychiatric Research*, 163, 86–92. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2023.05.034>
- Kakon, G. A., Hadjiyannakis, S., Sigal, R. J., et al. (2019). Edmonton Obesity Staging System for Pediatrics, quality of life and fitness in adolescents with obesity. *Obesity Science & Practice*, 5(5), 449–458. <https://doi.org/10.1002/osp4.358>
- Kim, M. S., Park, E. J., Roh, S. W., & Bae, J. W. (2011). Diversity and abundance of single-stranded DNA viruses in human feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(3), 806-809. <https://doi.org/10.1128/AEM.01325-10>

- Kodsi, R., Chimoriya, R., Medveczky, D., et al. (2022). Clinical Use of the Edmonton Obesity Staging System for the Assessment of Weight Management Outcomes in People with Class 3 Obesity. *Nutrients*, 14(5), 967. <https://doi.org/10.3390/nu14050967>
- Kyathanahalli, C., Snedden, M., Singh, L., Regalia, C., Keenan-Devlin, L., Borders, A. E., & Hirsch, E. (2023). Maternal plasma and salivary anelloviruses in pregnancy and preterm birth. *Frontiers in Medicine*, 10, 1191938. <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1191938>
- Liang, G., & Bushman, F. D. (2021). The human virome: assembly, composition and host interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 19(8), 514-527. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00536-2>
- Lim, E. S., Wang, D., & Holtz, L. R. (2016). The bacterial microbiome and virome milestones of infant development. *Trends in Microbiology*, 24(10), 801-810. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.06.004>
- Lobstein, T., Jackson-Leach, R., Powis, J., Brinsden, H., & Gray, M. (2023). World Obesity Atlas 2023. Retrieved from <https://www.worldobesity.org/>
- Lohman, T. G., Roche, A. F., & Martorell, R. (Eds.). (1988). Anthropometric standardization reference manual. Human Kinetics Books.
- Lu, J., et al. (2017). Bracken: estimating species abundance in metagenomics data. *PeerJ Computer Science*, 3, e104.
- Luppino, F. S., de Wit, L. M., Bouvy, P. F., et al. (2010). Overweight, obesity, and depression: A systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Archives of General Psychiatry*, 67(3), 220–229. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2010.2>
- Mejaddam, A., Krantz, E., Rasmussen, F., et al. (2022). Comorbidity and quality of life in obesity – A comparative study with the general population in Gothenburg, Sweden. *PLOS ONE*, 17(10), e0273553. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0273553>
- Molina, C., Cifuentes, G., Martínez, C., Mancilla, R., & Díaz, E. (2016). Disminución de la grasa corporal mediante ejercicio físico intermitente de alta intensidad y consejería nutricional

- en sujetos con sobrepeso u obesidad. *Revista Médica de Chile*, 144(10), 1296–1305.
<https://doi.org/10.4067/S0034-98872016001000003>
- Monaco, C. L., Gootenberg, D. B., Zhao, G., Handley, S. A., Ghebremichael, M. S., Lim, E. S., et al. (2016). Altered virome and bacterial microbiome in human immunodeficiency virus-associated acquired immunodeficiency syndrome. *Cell*
- Moustafa, A., Xie, C., Kirkness, E., Biggs, W., Wong, E., Turpaz, Y., ... & Venter, J. C. (2017). The blood DNA virome in 8,000 humans. *PLoS Pathogens*, 13(3), e1006292.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006292>
- Nakamura, G., et al. (2020). A tissue level atlas of the healthy human virome. *BMC Biology*, 18, 55.
- Norman, J. M., Handley, S. A., Baldridge, M. T., Droit, L., Liu, C. Y., Keller, B. C., et al. (2015). Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease. *Cell*, 160(3), 447-460. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.002>
- Pecman, A., et al. (2022). Systematic comparison of nanopore and Illumina sequencing for the detection of plant viruses and viroids. *Frontiers in Microbiology*, 13, 883921.
- Ramírez-Díaz, M. P., Luna-Hernández, J. F., Ruíz-Vázquez, D. L., et al. (2022). Asociación entre la actividad física y el porcentaje de grasa en estudiantes universitarios de México. *Revista Española de Nutrición Comunitaria*, 28(4), e202204.
<https://doi.org/10.14642/RENC.2022.28.4.1012>
- Ranasinghe, C., Gamage, P., Katulanda, P., & Sheriff, M. H. R. (2013). Relationship between body mass index (BMI) and body fat percentage, estimated by bioelectrical impedance, in a group of Sri Lankan adults: A cross-sectional study. *BMC Public Health*, 13, 797.
<https://doi.org/10.1186/1471-2458-13-797>
- Reyes, A., Blanton, L. V., Cao, S., Zhao, G., Manary, M., Trehan, I., et al. (2015). Gut DNA viromes of Malawian twins discordant for severe acute malnutrition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(38), 11941-11946.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1514285112>

- Siri, W. E. (1961). Body composition from fluid spaces and density: Analysis of methods. In J. Brožek & A. Henschel (Eds.), *Techniques for measuring body composition* (pp. 223–244). National Academy of Sciences.
- Slaughter, M. H., Lohman, T. G., Boileau, R. A., Horswill, C. A., Stillman, R. J., Van Loan, M. D., & Bembien, D. A. (1988). Skinfold equations for estimation of body fatness in children and youth. *Human Biology*, 60(5), 709–723.
- Stewart, A., Marfell-Jones, M., Olds, T., & de Ridder, H. (2011). International standards for anthropometric assessment. International Society for the Advancement of Kinanthropometry.
- Taylor, L. J., Keeler, E. L., Bushman, F. D., & Collman, R. G. (2022). The enigmatic roles of Anelloviridae and Redondoviridae in humans. *Current Opinion in Virology*, 55, 101248.
- Tisza, M. J., & Buck, C. B. (2021). A catalog of tens of thousands of viruses from human metagenomes reveals hidden associations with chronic diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(23), e2023202118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2023202118>
- Toma, M., Alexiu, O. A., Iorga, C. S., Berca, L. M., Nica, R., & et al. (2018). Prevalence of human anelloviruses in Romanian healthy subjects and patients with common pathologies. *BMC Infectious Diseases*, 18, 334. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3248-9>
- Vague, J. (1956). The degree of masculine differentiation of obesities: A factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout, and uric calculous disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 4(1), 20–34. <https://doi.org/10.1093/ajcn/4.1.20>
- Virgin, H. W. (2014). The virome in mammalian physiology and disease. *Cell*, 157(1), 142-150. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.020>
- Wood, D. E., & Salzberg, S. L. (2019). Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biology*, 20(1), 257.

- World Health Organization. (2011). Waist circumference and waist-hip ratio: Report of a WHO expert consultation, Geneva, 8-11 December 2008. WHO Press.
- Wylie, K. M., Weinstock, G. M., & Storch, G. A. (2012). Emerging view of the human virome. *Translational Research*, 160(4), 283-290. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2012.03.006>
- Xu, M. Y., Cao, B., Wang, D. F., & Chen, J. H. (2015). Human adenovirus 36 infection increased the risk of obesity: a meta-analysis update. *Medicine*, 94(51), e2357. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002357>
- Yamada, T., Hara, K., & Kadowaki, T. (2012). Association of Adenovirus 36 Infection with Obesity and Metabolic Markers in Humans: A Meta-Analysis of Observational Studies. *PLoS ONE*, 7(7), e42021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042021>
- Yang, K., Niu, J., Zuo, T., Sun, Y., Xu, Z., Tang, W., & Ng, S. C. (2021). Alterations in the gut virome in obesity and type 2 diabetes mellitus. *Gastroenterology*, 161(4), 1257-1269.e13. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.06.056>