

**ESTUDIO CUALITATIVO DE ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO  
USANDO RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR PROTÓNICA EN UN  
CENTRO DE REFERENCIA DE BOGOTÁ D.C.**

**NINNA FERNANDA PULIDO OCHOA**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
INSTITUTO DE ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO,  
DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE ERRORES INNATOS DEL  
METABOLISMO  
FACULTAD DE CIENCIAS**



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**  
Bogotá, enero 26 de 2018

**ESTUDIO CUALITATIVO DE ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO  
USANDO RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR PROTÓNICA EN UN  
CENTRO DE REFERENCIA DE BOGOTÁ D.C.**

**NINNA FERNANDA PULIDO OCHOA**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de  
MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Director: OLGA YANETH ECHEVERRI PEÑA**

Doctora en Ciencias Biológicas

[oyecheve@javeriana.edu.co](mailto:oyecheve@javeriana.edu.co)

**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
INSTITUTO DE ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO,  
DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE ERRORES INNATOS DEL  
METABOLISMO  
FACULTAD DE CIENCIAS  
PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
Bogotá, enero 26 de 2018**

**ESTUDIO CUALITATIVO DE ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO  
USANDO RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR PROTÓNICA EN UN  
CENTRO DE REFERENCIA DE BOGOTÁ D.C.**

Ninna Fernanda Pulido Ochoa

*Olga Yaneth Echeverri P.*

---

Olga Yaneth Echeverri Ph.D.  
Directora

*Júlien Wist*

---

Júlien Wist, Ph.D.  
Jurado

*Yolanda Cifuentes*

---

Yolanda Cifuentes Cifuentes, Neonatóloga  
Jurado

*Martha Viviana Zuluaga Z R*

---

Martha Viviana Zuluaga, Ph.D.  
Jurado

## Dedicatoria

Dedico este trabajo a mi Familia en especial a mi hijo Santiago,  
pues ellos fueron la fuente de motivación  
para llevar a cabo este proyecto.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a Dios y mi madre, porque sin ellos no hubiera llegado hasta donde estoy en este momento.

A Los doctores del Hospital Universitario San Ignacio: Julio Cesar Castellanos, Iván Solarte, María Margarita Manrique y Claudia Cecilia Cardozo por brindarme la oportunidad de realizar esta Maestría;

Al Doctor Luis Alejandro Barrera Avellaneda y a mi directora de Tesis Olga Yaneth Echeverri Peña, por creer en mí.

A todos mis compañeros del Hospital Universitario San Ignacio y del Instituto de Errores Innatos del Metabolismo por las palabras de apoyo en momentos cruciales de este trabajo.

A los profesores del departamento de Química Julieth Prieto y Jhon Edwar Díaz por la enseñanza en los primeros pasos de  $^1\text{H-NMR}$  Al Ingeniero Álvaro Pulido por ayudarme a entender MATLAB.

Al Doctor Fernando Suarez por ayudarme en los primeros pasos de estadística.

Y un agradecimiento especial a la Doctora RuAngelie Edrada-Ebel, Senior Lecturer Head, The Natural Products Metabolomics Group Strathclyde Institute of Pharmacy and Biomedical Sciences University of Strathclyde por el apoyo para la realización de las gráficas del análisis multivariado PCA y OPLS-DA en el programa SIMCA – P versión 14.

## TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
3 INTRODUCCION .....	14
4 PROBLEMA Y JUSTIFICACION .....	15
OBJETIVOS .....	16
5.1 Objetivo general .....	16
5.2 Objetivos específicos .....	16
6. GENERALIDADES DE LOS ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO .....	17
6.1 ACIDEMIAS ORGANICAS .....	18
6.1.1 Acidemia Propiónica.....	19
6.1.1.1 Biomarcadores urinarios en PA. ....	20
6.1.1.2 Tratamiento.....	20
6.1.2 Acidemia Isovalérica. ....	21
6.1.2.1 Biomarcadores urinarios en IVA. . ....	22
6.1.2.2 Tratamiento. ....	23
6.1.3 Acidemia Glutárica Tipo I. ....	23
6.1.3.1 Biomarcadores urinarios en Acidemia Glutárica tipo I. ....	23
6.1.3.2 Síntomas Neurológicos.....	23
6.1.3.3 Tratamiento.....	24
6.1.4 Acidemia 3-Metilglutacónica .....	26
6.1.5 Deficiencia de Acil-Coenzima A Deshidrogenasa de Cadena Media.....	26
6.1.5.1 Tratamiento.....	27
6.1.6 Deficiencia de Holocarboxilasa Sintetasa. ....	28
6.1.6.1 Diagnóstico de Deficiencia de Holocarboxilasa Sintetasa.....	29
6.2 AMINOACIDOPATÍAS .....	29
6.2.1.1 Defectos en el Metabolismo de Fenilalanina.....	29
6.2.1.2 Diagnóstico de Hiperfenilalaninemias.....	30
6.2.1.3 Tratamiento .....	31
6.2.2 Enfermedad de Orina con Olor a a Jarabe de Arce . ....	31
6.2.2.1 Biomarcadores urinarios en Enfermedad de Orina con Olor a Jarabe de Arce.....	33

6.2.2.2 Tratamiento.....	34
6.3 OTRAS CONDICIONES.....	34
6.3.1 Acidosis Láctica.....	34
6.4 APLICACIÓN DE LA METABOLÓMICA A LOS ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO.....	36
6.4.1 Tipos de estudios metabolómicos.....	36
6.4.2 Técnicas empleadas en Metabolómica.....	37
6.4.2.1 Espectrometría de Masas en Tandem (MS/MS).....	38
6.4.2.2 Cromatografía de Gases (GC).....	39
6.4.2.2.1 Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS).....	40
6.4.3 Espectroscopia por Resonancia Magnética Nuclear Protónica ( <sup>1</sup> H-NMR)....	41
6.4.3.1 Adquisición de los Espectros.....	41
6.4.3.1.1 Asignación de las Señales del Espectro.....	44
6.4.4 Pre-Procesado de los Datos. ....	45
6.4.5 Análisis Estadístico de Espectros por <sup>1</sup> H-NMR.. ....	47
6.4.5.1 Análisis de Componentes Principales.....	47
6.4.5.2 Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados con Corrección Ortogonal (PLS-DA) y su modificación con corrección ortogonal (OPLS-DA).....	48
6.5 CONDICIONES PARA LA TOMA Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS DE ORINA PARA PROCESOS METABOLÓMICOS .....	48
7 MATERIALES Y METODOS.....	49
7.1 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	49
7.1.1 Muestras Individuos Sanos. ....	49
7.1.1.1 Criterios de Inclusión. ....	50
7.1.1.2 Exclusión de Muestras.....	50
7.2 Recolección de las Muestras de Orina.....	50
7.2.1 Almacenamiento de las Muestras.....	50
7.3 Procesamiento de Muestras por GC-MS.....	51
7.3.1 Extracción de Ácidos orgánicos por GC-MS.....	51
7.3.2 Separación de Ácidos Orgánicos.....	51

7.3.3	Identificación de Ácidos Orgánicos.....	51
7.4	Preparación de Muestras de Orina para Análisis de Resonancia Magnética Nuclear ( $^1\text{H-NMR}$ ).....	53
7.4.1	Obtención de los Espectros por $^1\text{H-NMR}$ :.....	53
7.4.2	Pre-procesamiento de Espectros.....	53
7.4.3	Alineamiento.....	53
7.5	Identificación Cualitativa de Compuestos.....	54
8	RESULTADOS.....	55
8.1	CROMATOGRAMAS OBTENIDOS POR GC-MS.....	55
8.1.1	Acidemias Orgánicas .....	56
8.1.1.1	Acidemia Propiónica. ....	56
8.1.1.2	Acidemia Isovalérica. ....	56
8.1.1.2.1	Acidemia Isovalérica en Estado Agudo.....	57
8.1.1.2.2	Acidemia Isovalérica en Tratamiento.....	57
8.1.1.3	Acidemia 3-Metilglutacónica. ....	58
8.1.1.4	Acidemia Glutárica Tipo I. ....	58
8.1.1.5	Deficiencia de Acil-Coenzima A Deshidrogenasa de Cadena Media....	59
8.1.1.6	Deficiencia de Holocarboxilasa Sintetasa. ....	59
8.1.2	Aminoacidopatías.....	60
8.1.2.1	Desorden en el Metabolismo de Fenilalanina. ....	60
8.1.2.2	Enfermedad de Orina con Olor a Jarabe de Arce. ....	60
8.1.3	Otras Condiciones.....	62
8.1.3.1	Acidosis Láctica. ....	62
8.2	ESPECTROS OBTENIDOS POR $^1\text{H-NMR}$ .....	62
8.2.1	Alineamiento.....	62
8.2.2	Análisis Cualitativo de Espectros $^1\text{H-NMR}$ Obtenidos en Muestras de Orina .....	63
4		
8.2.2.1	Espectro $^1\text{H-NMR}$ Promedio Obteniendo de Orinas de Individuos Sanos.....	64
4		
8.2.2.2	Espectro Promedio Obtenido de Muestras con Diagnóstico Bioquímico Presuntivo de EIM.....	69

8.2.3	Acidemias Orgánicas: .....	70
8.2.3.1	Academia Propiónica: .....	70
8.2.3.2	Academia Isovalérica .....	71
8.2.3.3	Academia 3-Metilglutacónica .....	73
8.2.3.4	Academia Glutárica Tipo I .....	74
8.2.3.5	Deficiencia de Acil-Coenzima A Deshidrogenasa de Cadena Media ....	75
8.2.3.6	Deficiencia de Holocarboxilasa Sintetasa .....	76
8.2.4	Aminoacidopatías.....	77
8.2.4.1	Desorden en el Metabolismo de Fenilalanina .....	78
8.2.4.2	Enfermedad de Orina con Olor a Jarabe de Arce .....	78
8.2.5	Otras Condiciones:.....	79
8.2.5.1	Acidosis Láctica .....	79
8.3	ANÁLISIS DE DATOS.....	80
9	DISCUSION .....	82
10	CONCLUSIONES.....	89
11	RECOMENDACIONES Y TRABAJOS FUTUROS.....	89
12	BIBLIOGRAFIA .....	90
13	ANEXOS .....	96

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Ventajas y Limitaciones de las Técnicas Empleadas en Metabolómica.....	37
Tabla 2. Parámetros a tener en cuenta en el momento de Adquisición de Espectros.....	44
Tabla 3. Parámetros del Experimento.....	45
Tabla 4. Desplazamiento químico de los metabolitos observados en orina de individuos sanos procesados a 400MHz.....	64
Tabla 5. Entidades y Número de Muestras Analizadas.....	69
Tabla 6. Varianza Total Explicada para el Conjunto de Datos.....	80

## TABLA DE FIGURAS

Figura 1. Metabolismo del Propionil CoA ante bloqueo de la enzima Propionil Carboxilasa.....	21
Figura 2. Catabolismo de Leucina hasta 3-Metilcrotonil-CoA.....	22
Figura 3. Vía Catabólica de Lisina, Hidroxilisina y Triptófano.....	25
Figura 4. Resonancia cerebral de pacientes con Acidemia Glutárica tipo I.....	25
Figura 5. Catabolismo de Leucina.....	26
Figura 6. Catabolismo de los Ácidos Grasos de Cadena Corta y Media en Mitocondria.....	28
Figura 7. Rutas Metabólicas donde se encuentran implicadas las Carboxilasas Dependientes de Biotina.....	28
Figura 8. Metabolismo de Fenilalanina.....	30
Figura 9. Primer Paso del Catabolismo de Leucina, Isoleucina, Valina.....	32
Figura 10. Componentes de un Espectrómetro de Masas.....	39
Figura 11. Componente de un Cromatógrafo de Gases.....	40
Figura 12. Esquema de Adquisición de un Espectro.....	42
Figura 13. Secuencia de Pulso ZGCPPR.....	43
Figura 14. Espectro de Masas del Ácido Glutárico comparado contra librería.....	52
Figura 15. Cromatograma que Muestra un Perfil Urinario Normal.....	55
Figura 16. Cromatograma con Diagnóstico Bioquímico Presuntivo de Acidemia Propiónica.....	56
Figura 17. Cromatograma con Diagnóstico Bioquímico Presuntivo de Acidemia Isovalérica.....	56
Figura 18. Cromatograma con Diagnóstico Bioquímico Presuntivo de Acidemia Isovalérica.....	57
Figura 19. Cromatograma con Diagnóstico Bioquímico Presuntivo de Acidemia Isovalérica.....	57

Figura 20. Cromatograma con Diagnóstico Bioquímico Presuntivo de Acidemia 3-Metilglutacónica.....	58
Figura 21. Cromatograma con Diagnóstico Bioquímico Presuntivo de Acidemia Glutárica Tipo I.....	58
Figura 22. Cromatograma con Diagnóstico Bioquímico Presuntivo de Deficiencia Acil-Coenzima A Deshidrogenasa de Cadena Media.....	59
Figura 23. Cromatograma con Diagnóstico Bioquímico Presuntivo de Deficiencia de Holocarboxilasa Sintetasa.....	59
Figura 24. Cromatograma con Diagnóstico Bioquímico Presuntivo de Desorden en el Metabolismo de Fenilalanina.....	60
Figura 25. Cromatograma con Diagnóstico bioquímico Presuntivo de Enfermedad de la Orina con Olor a Jarabe de Arce.....	61
Figura 26. Cromatograma con Diagnóstico Bioquímico Presuntivo de Enfermedad de la Orina con Olor a Jarabe de Arce.....	61
Figura 27. Cromatograma con Diagnóstico Bioquímico Presuntivo de Acidosis Láctica.....	62
Figura 28. Alineamiento de Espectros Usando los Intervalos Definidos por el Usuario.....	63
Figura 29. Espectros después del Alineamiento.....	64
Figura 30. Espectro Promedio Obtenido de Individuos Sanos Procesados a 400MHz.....	65
Figura 31. Espectros Promedio Obtenidos de Individuos Sanos Menores a 1 Mes de Edad.....	65
Figura 32. Espectros Promedio Obtenidos de Individuos Sanos entre 2 y 3 Meses de Edad.....	66
Figura 33. Espectros Promedio Obtenidos de Individuos Sanos Mayores a 3 Meses y Hasta 5 Meses de Edad.....	66
Figura 34. Espectros Promedio Obtenidos de Individuos Sanos con Edades entre los 6 y 12 Meses de Edad.....	67
Figura 35. Espectros Promedio Obtenidos de Individuos Sanos Mayores a 13 Meses de Edad.....	67

Figura 36. Espectros Promedio Obtenido de Individuos Sanos que recibían Leche Materna.....	68
Figura 37. Espectros Promedio Obtenido de Individuos Sanos que recibían Leche de Fórmula.....	68
Figura 38. Espectro $^1\text{H-NMR}$ en muestra de orina con diagnóstico bioquímico presuntivo de Acidemia Propiónica.....	70
Figura 39. Espectro $^1\text{H-NMR}$ en Muestra de orina con Diagnóstico Bioquímico Presuntivo de Acidemia Isovalérica.....	71
Figura 40. Espectro $^1\text{H-NMR}$ en Muestra de orina con Diagnóstico Bioquímico Presuntivo de Acidemia Isovalérica.....	71
Figura 41. Espectro $^1\text{H-NMR}$ en Muestra de Orina con Diagnóstico Bioquímico Presuntivo de Acidemia Isovalérica.....	72
Figura 42. Espectros $^1\text{H-NMR}$ en Muestra de Orina con Diagnóstico Bioquímico Presuntivo de Acidemia 3-Metilglutacónica.....	73
Figura 43. Espectros $^1\text{H-NMR}$ en Muestra de Orina con Diagnóstico Bioquímico Presuntivo de Acidemia 3-Metilglutacónica.....	73
Figura 44. Espectro $^1\text{H-NMR}$ en Muestra de Orina con Diagnóstico Bioquímico Presuntivo de Acidemia Glutárica Tipo I.....	74
Figura 45. Espectro $^1\text{H-NMR}$ en muestra de orina con diagnóstico bioquímico presuntivo de Acidemia Acil-Coenzima A Deshidrogenasa de Cadena Media....	75
Figura 46. Espectro $^1\text{H-NMR}$ en Muestra de Orina con Diagnóstico Bioquímico Presuntivo para Deficiencia de Holocarboxilasa Sintetasa.....	76
Figura 47. Espectro $^1\text{H-NMR}$ en Muestra de Orina con Diagnóstico Bioquímico Presuntivo de Desorden en el Metabolismo de Fenilalanina.....	77
Figura 48. Espectro $^1\text{H-NMR}$ en Muestra de orina con Diagnóstico Bioquímico Presuntivo de Enfermedad de Orina con Olor a Jarabe de Arce.....	78
Figura 49. Espectro $^1\text{H-NMR}$ en Muestra de orina con Diagnóstico Bioquímico Presuntivo de Enfermedad de Orina con Olor a Jarabe de Arce.....	78
Figura 50. Espectro $^1\text{H-NMR}$ en muestra de orina con diagnóstico bioquímico presuntivo de Acidosis Láctica.....	79
Figura 51. Análisis de Componentes Principales entre los individuos sanos y con diagnósticos bioquímicos presuntivos de EIM.....	80
Figura 52. Análisis de Componentes Principales.....	81
Figura 53. Score Plot Correspondiente al Modelo OPLS-DA.....	82

### 3 INTRODUCCION

Los Errores Innatos del Metabolismo (EIM) son enfermedades monogénicas, caracterizadas por trastornos del metabolismo [1]. Individualmente, los EIM son raros, pero como grupo son relativamente comunes, lo que hace necesaria su detección [2], para llegar a un diagnóstico temprano y por ende a un tratamiento y seguimiento oportunos.

El diagnóstico se basa en la detección de los metabolitos de interés que usualmente se realiza mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (por sus siglas en inglés, HPLC) para las Aminoacidopatías y Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de Masas (por sus siglas en inglés GC-MS) para Ácidos Orgánicos [3]. Sin embargo, con el desarrollo y los avances que ha tenido la Resonancia Magnética Nuclear Protónica (por sus siglas en inglés  $^1\text{H-NMR}$ ), se ha podido realizar un análisis más global de los metabolitos involucrados en estas entidades.

Cabe anotar que a pesar de que en nuestro medio se utiliza ampliamente GC-MS y HPLC para el diagnóstico bioquímico de los EIM de molécula pequeña, estas técnicas presentan limitaciones importantes como la necesidad de ser trabajadas por separado y el hecho de que la muestra empleada sufre modificaciones para la detección de metabolitos de interés, por lo que no puede ser empleada nuevamente en busca de metabolitos pertenecientes a otras vías metabólicas distintas a la evaluada inicialmente.

En este trabajo se busca evaluar EIM de molécula pequeña mediante la observación de perfiles por  $^1\text{H-NMR}$  [4], esta metodología permite detectar en una misma muestra y manera simultánea metabolitos de diferentes vías metabólicas [5] que incluyen ácidos orgánicos y aminoácidos; sin que la muestra sufra modificaciones en el proceso, permitiendo su empleo para análisis posteriores de otras opciones diagnósticas o confirmación de la sospecha establecida por el perfil de  $^1\text{H-NMR}$ .

En este estudio se analizaron los perfiles de resonancia magnética para sujetos normales e individuos afectados por acidemias orgánicas y aminocidopatías, permitiendo no sólo diferenciar individuos sanos en quienes se observó una excreción característica de metabolitos de acuerdo a la edad y dieta consumida, de enfermos en quienes fue posible identificar diferentes estados de enfermedad, así como el seguimiento de la misma. Además, se estableció una aproximación inicial para la Deficiencia de Holocarboxilasa Sintetasa, entidad para la cual no se reportan perfiles completos en la literatura.

Por lo anterior, se hace evidente que  $^1\text{H-NMR}$  ofrece no sólo información complementaria a la obtenida por HPLC y GC-MS, sino que abre la posibilidad de mejorar el abordaje bioquímico de los EIM en nuestro entorno y por ende la respuesta al diagnóstico para los pacientes en quienes se sospechan estas entidades.

## 4 PROBLEMA Y JUSTIFICACION

La metabolómica es una herramienta valiosa que permite identificar, monitorizar y descubrir metabolitos en diferentes tipos de muestras humanas (plasma, orina, líquido cefalorraquídeo, tejido, etc) según la condición fisiológica o patológica en la que se encuentren. Esta ciencia puede trabajarse gracias a técnicas como MS y  $^1\text{H-NMR}$ , pues en una misma muestra se pueden observar cientos de compuestos, que pueden orientar hacia diferentes errores innatos del metabolismo a través de la observación de perfiles.

Los Errores Innatos del Metabolismo (EIM) son una clase de enfermedades genéticas que se caracterizan por trastornos del metabolismo de diversas moléculas. En el caso de los desórdenes, denominados de molécula pequeña, el diagnóstico se basa en la detección de los metabolitos, que usualmente se realiza con la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), donde la muestra de orina pasa por un proceso de derivatización para poder obtener los ácidos orgánicos de interés, así como por la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) donde la muestra sufre un proceso de desproteínización para obtener los aminoácidos de importancia. Con base en esto, surge la necesidad de estudiar de manera más global el metabolismo, utilizando estrategias como la Resonancia Magnética Nuclear Protónica ( $^1\text{H-NMR}$ ), la cual brinda la posibilidad de analizar diferentes fluidos biológicos y tiene la capacidad de detección simultánea de cientos de metabolitos en la misma muestra sin que sufra ningún proceso de transformación, ofreciendo no sólo información complementaria a la obtenida por GC-MS, sino incluso abriendo la posibilidad de ayudar a descubrir nuevas entidades.

Por tal razón, este trabajo pretende conocer si a través de la identificación cualitativa de perfiles espectrales obtenidos por  $^1\text{H-NMR}$  se puede brindar una aproximación diagnóstica útil para la detección de estas entidades y de esta manera contribuir a tratamientos oportunos, que permitan prevenir el desarrollo de síntomas graves y minimizar la probabilidad de muerte prematura.

## **5 OBJETIVOS**

### **5.1 OBJETIVO GENERAL**

Analizar cualitativamente perfiles espectrales en muestra de orina con diagnósticos bioquímicos presuntivos para Acidemias Orgánicas y Aminoacidopatías a través de Resonancia Magnética Nuclear Protónica.

### **5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Establecer perfiles metabólicos por Resonancia Magnética Nuclear Protónica para muestras de orina de individuos sanos analizados previamente por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.

Describir los perfiles metabólicos por Resonancia Magnética Nuclear Protónica para muestras de orina con diagnóstico bioquímico de Errores Innatos del Metabolismo.

Comparar cualitativamente los perfiles metabólicos obtenidos por Resonancia Magnética Nuclear Protónica con los perfiles identificados por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas en muestras de orina con diagnóstico bioquímico de Errores Innatos del Metabolismo.

Establecer las diferencias entre los perfiles metabólicos en personas sanas y personas enfermas, mediante técnicas de reconocimiento de patrones con el fin de establecer un modelo diagnóstico.

## 6. GENERALIDADES DE LOS ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO

Los Errores Innatos del Metabolismo (EIM) son cerca de mil enfermedades monogénicas que pueden afectar al neonato, al infante y al adulto en donde la presentación clínica puede ser atenuada o incluso diferente a la misma enfermedad de presentación neonatal [6].

Estas entidades son trastornos poco frecuentes causados por mutaciones en un gen que codifica para una enzima que participa en uno o varios caminos metabólicos, o en proteínas con diferente función (estructural, de transporte, receptores, anticuerpos, hormonas) [7]. Las mutaciones pueden afectar en diferente grado la estructura y función de la enzima/proteína, lo que se traduce en alteraciones severas a atenuadas donde, en esta última no se tendrán efectos clínicos aparentes [6].

El impacto del defecto en la proteína dependerá del sitio de la molécula donde se localiza la mutación y de la importancia que tiene para el metabolismo; por ejemplo, si la enzima o proteína defectuosa afecta solamente a un órgano o tejido, el daño es localizado, por el contrario, si la enzima/proteína se encuentra presente en todas las células, el daño será generalizado [6].

Los EIM pueden clasificarse en tres grupos, dependiendo de los síntomas y metabolitos acumulados así [6]:

- 1- Intoxicación aguda y progresiva por atesoramiento de compuestos próximos o alternos al bloqueo del camino metabólico: aminoacidopatías, acidemias orgánicas, defectos del ciclo de la urea e intolerancia a los azúcares [8].
- 2- Deficiencia en producción y utilización de energía: enfermedades mitocondriales, glucogenosis, acidemia L congénita, trastorno en la oxidación de ácidos grasos [8].
- 3- Dificultad en el catabolismo de moléculas complejas: enfermedades de depósito lisosomal y peroxisomal [8].

En estas enfermedades se pueden encontrar bloqueos que impiden que se formen normalmente los productos del camino metabólico en los que participa la enzima/proteína defectuosa y por lo tanto se generan compuestos intermediarios alternos que pueden ser tóxicos para el organismo [7] y que por su elevada producción pueden ser excretados por orina, bilis o exudados [6].

Las manifestaciones de esta toxicidad pueden ser rechazo al alimento, vómito, diarrea o *sepsis like*. También se observa hipoglicemia, hiperamonemia, hiperlactacidemia, cetosis, olor particular en las secreciones del individuo, entre otros, que llevan a confundir el diagnóstico con entidades más frecuentes y diferentes a los EIM [9].

Estas manifestaciones pueden presentarse en las primeras 48 horas de vida; y deterioran rápidamente al paciente si no se instaura un manejo adecuado y oportuno. En infantes o niños, los EIM, pueden ser desencadenados por un cambio en la dieta, vómito, diarrea, fiebre, aplicación de vacunas o circunstancias que producen sobrecarga metabólica [6].

En estas patologías el diagnóstico se apoya en el laboratorio, el cual desempeña un papel decisivo en su definición y seguimiento [6].

## **6.1 ACIDEMIAS ORGANICAS**

Son trastornos hereditarios del metabolismo intermediario que resultan de la deficiencia de una enzima o de una proteína de transporte requerida en una de las diversas vías metabólicas celulares implicadas en el catabolismo de aminoácidos, carbohidratos o lípidos [10].

Los metabolitos generados se denominan ácidos orgánicos que son ácidos carboxílicos y algunos compuestos que contienen nitrógeno tales como piroglutamato o amino conjugados como hipurato (benzoilglicina) y otros derivados de la glicina; estos ácidos orgánicos, tienen la propiedad de aportar iones  $H^+$  al medio que se encuentren, razón por la cual su acumulación en fluidos biológicos tiene como consecuencia la alteración en el pH [6, 11]. La acumulación de ácidos orgánicos en los fluidos biológicos altera el equilibrio ácido-base y las vías bioquímicas intracelulares. [11]. Estos metabolitos en exceso se excretan en la orina; por consiguiente, en estos pacientes la obtención de los ácidos orgánicos urinarios revela una excreción elevada de patrones definidos de estos compuestos que se consideran biomarcadores para esta clase de enfermedades metabólicas [11].

Se han descrito más de 65 acidemias orgánicas con una incidencia que varía de 1 de 10.000 a 1 de cada 1.000.000 nacidos vivos. Aunque la mayoría de ellas son trastornos autosómicos recesivos, algunos están ligados al cromosoma X [11].

Las acidemias orgánicas más comunes incluyen Acidemia Propiónica (AP), Acidemia Metilmalónica (MMA) y Acidemia Isovalérica (IVA); otras acidemias menos comunes, son la Acidemia Glutárica tipo I y Deficiencia Múltiple de Carboxilasas [11].

Estos trastornos se caracterizan por una gran variedad de síntomas, tales como letargia, coma, hipotonía, convulsiones, ataxia, vómitos, falta de crecimiento, retraso del desarrollo, enfermedad hepática, neutropenia, trombocitopenia, osteomalacia y osteoporosis. La severidad de la presentación es muy variable, siendo el periodo neonatal el más severo [11].

Los análisis de laboratorio especializados para estas entidades tienen como principal objetivo evidenciar elevaciones en las concentraciones de ácidos orgánicos o la presencia de sus derivados en fluidos biológicos [10].

El análisis de ácidos orgánicos urinarios permite hacer la caracterización metabólica de las acidemias orgánicas, así como de otras entidades de molécula pequeña. Más de 100 ácidos orgánicos diferentes se excretan en la orina en cantidades anormales en estas enfermedades [11].

6.1.1 Acidemia Propiónica (por sus siglas en inglés PA- OMIM 606054). Enfermedad hereditaria autosómica recesiva causada por la deficiencia de Propionil-CoA Carboxilasa (PCC; E.C. 6.4.1.3), una carboxilasa mitocondrial dependiente de biotina que cataliza la conversión de Propionil-CoA, derivada del catabolismo de Isoleucina, Valina, Metionina, Treonina y Ácidos Grasos de Cadena Impar, a Metilmalonil-CoA que luego entra en el ciclo de Krebs vía Succinil-CoA.

Hay varias formas de inicio de la enfermedad: la forma más común es la de inicio neonatal que se presenta con pobre succión, vómitos en los primeros días de vida, seguido de letargia y convulsiones. Los pacientes generalmente muestran acidosis metabólica relacionada con la acumulación de ácido propiónico en la sangre. La forma de inicio tardío presenta una regresión evolutiva, vómitos crónicos, intolerancia a las proteínas, insuficiencia de crecimiento, hipotonía y cardiomiopatía, mientras que la insuficiencia renal crónica es muy rara. La cardiomiopatía, también puede ser aislada, sin acidosis metabólica o ninguna evidencia de deterioro neurológico. Los niños afectados también pueden tener fases agudas similares a la presentación neonatal. Las complicaciones neurológicas incluyen convulsiones, anomalías en los ganglios basales, síntomas extrapiramidales y atrofia cerebral; Las complicaciones crónicas a largo plazo incluyen discapacidad intelectual, tetraplejía espástica y atetosis [11] [12].

6.1.1.1 Biomarcadores urinarios en PA. Un perfil clásico mediante la prueba de ácidos orgánicos en orina por GC-MS, muestra excreción de ácido 3-Hidroxipropiónico, 2-Metilcítico, Tigililglicina y Propionilglicina. (Figura 1) El ácido 3-Hidroxipropiónico y la Propionilglicina se originan directamente por la acumulación de Propionil-CoA. [13].

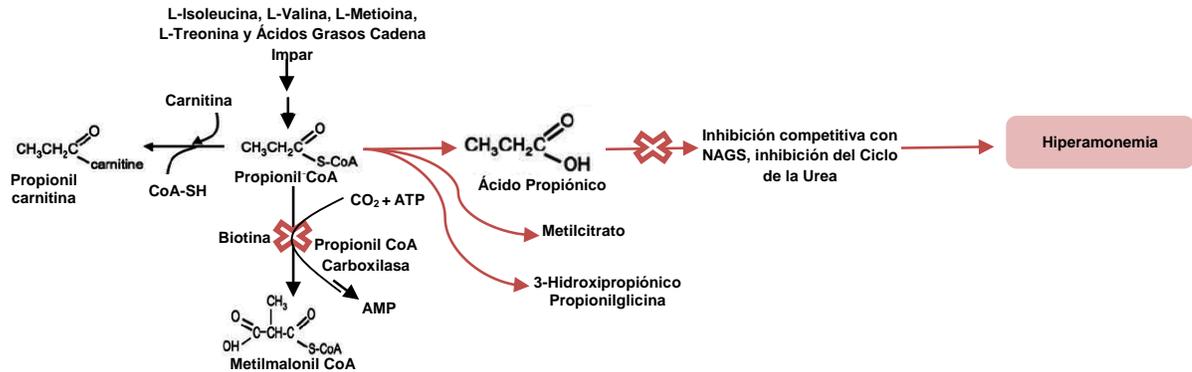
El efecto tóxico de los compuestos que se acumulan en PA, incluye interrupción de la homeostasis mitocondrial a través del agotamiento de las reservas de energía celular, de la transferencia de electrones en la cadena respiratoria y la inhibición de las enzimas del ciclo de Krebs [13].

El bloqueo del metabolismo intermediario debido a la deficiencia de PCC, da como resultado el deterioro de vías bioquímicas importantes, como los ciclos de ácido cítrico y urea, lo que a su vez conduce a alteraciones del metabolismo de los aminoácidos, probablemente debido a la alteración de la anaplerosis [11].

6.1.1.2 Tratamiento. El objetivo principal del tratamiento es reducir el ácido propiónico y evitar la intoxicación, por lo tanto, se debe restringir la ingesta de Isoleucina, Valina, Treonina o Metionina (aminoácidos que se metabolizan a través de Propionil CoA), suplementar con Carnitina 100mg/kg/día y Biotina 10mg/día y simultáneamente favorecer el anabolismo mediante aporte calórico en forma de soluciones glucosadas y lípidos, a fin de controlar la hiperglicemia e hiperosmolaridad [6]. Adicionalmente, suministrar metronidazol oral para reducir la producción de propionato por las bacterias intestinales [14].

**Figura 1. Metabolismo del Propionil CoA ante bloqueo de la enzima Propionil Carboxilasa.** El exceso de propionil-CoA se desvía por rutas alternativas hacia la formación de metilcitrato y 3-OH-propionato en orina. El acúmulo de propionil-CoA intracelular da lugar a la inhibición del enzima N-acetilglutamato sintetasa y del sistema de transporte mitocondrial de la glicina, que explicaría la hiperamonemia y la hiperglicinemia que presentan estos pacientes. Además, el propionil-CoA se puede conjugar con carnitina dando lugar a un aumento de propionilcarnitina y a una deficiencia secundaria de carnitina en plasma. Por otra parte, el propionil-CoA

puede actuar como cebador en lugar del acetil-CoA en la síntesis de ácidos grasos, dando lugar a un aumento relativo de los ácidos grasos de cadena impar (por sus siglas en inglés OLCFA) [13].

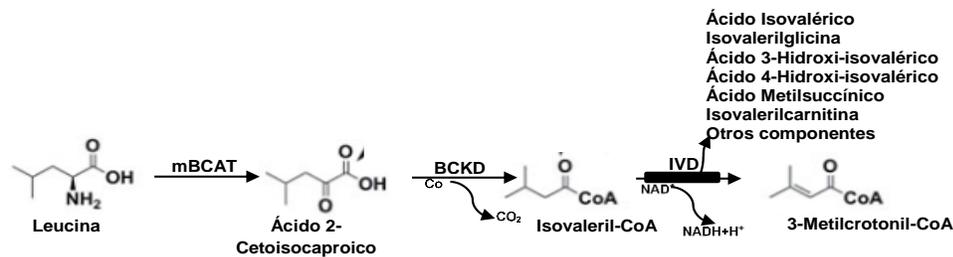


Fuente: Tomado y modificado de [11, 13, 15]

6.1.2 Acidemia Isovalérica (por sus siglas en inglés IVA, OMIM 243500). Primera acidemia orgánica descrita en humanos; es un error congénito autosómico recesivo del catabolismo de leucina causado por una deficiencia de la enzima mitocondrial Isovaleril-CoA Deshidrogenasa (IVD, EC 1.3.99.10), que cataliza la deshidrogenación de isovaleril-CoA a 3-metilcrotonil-CoA. (tercera etapa del catabolismo de la leucina). Por lo tanto, la deficiencia de esta enzima da lugar a la oxidación de isovaleril-CoA a 3-metilcrotonil-CoA y a la acumulación de isovaleril-CoA y sus derivados, (Figura 2). Isovaleril-CoA, a su vez, es un inhibidor de la N-acetil-glutamato sintetasa, lo que conduce a una reducción de la síntesis de N-acetilglutamato, y por ende conlleva a una alteración del ciclo de la urea que se traduce en hiperamonemia [11].

La IVA se reconoce actualmente como un trastorno con fenotipo heterogéneo, que va desde la acidosis metabólica neonatal aguda (a menudo fatal) hasta una enfermedad leve y crónica [16]. Los síntomas neonatales incluyen rechazo al alimento, vómitos y convulsiones. La presencia de un olor peculiar a pies sudados se puede apreciar sólo en las fases agudas, debido a la acumulación del ácido isovalérico no conjugado. La acidosis con anion gap elevado, es un rasgo característico [6, 12].

**Figura 2. Catabolismo de Leucina hasta 3-Metilcrotonil-CoA.** mBCAT: Aminotransferasa de Cadena Ramificada Mitocondrial, BCKD: Cetoácido Deshidrogenasa de Cadena Ramificada, IVD: Isovaleril-CoA Deshidrogenasa [6].



Fuente: Tomado y Modificado de [16].

La forma intermitente crónica, se presenta en la infancia y causa retardo en el crecimiento y/o retraso mental. También se han descrito pancreatitis aguda, síndrome mieloproliferativo, síndrome de Fanconi y arritmias cardíacas. Cabe señalar, sin embargo, que este trastorno muestra una gran variabilidad de los fenotipos clínicos, con formas que pueden permanecer sin diagnosticar hasta la edad adulta. Por ejemplo, los sujetos que albergan la mutación missense p. A282V en el gen IVD resultan asintomáticos, con un aumento muy leve en metabolitos relacionados con isovaleril-CoA en plasma y orina [6]

6.1.2.1 Biomarcadores urinarios en IVA. Se han encontrado varios metabolitos derivados de isovaleril-CoA en sangre y orina de pacientes con IVA, siendo los más comunes los conjugados del ácido isovalérico, (N-isovaleril-glicina, ácido N-isovaleril-glutámico, N-isovaleril-leucina y N-isovaleril-serina) proveniente de múltiples aminoácidos. El principal derivado de isovaleril-CoA es la isovalerilglicina producida por la conjugación con el grupo amino de glicina, reacción que es catalizada por la enzima glicina-N-acilasa. Cuando el paciente está en crisis cetoacidótica, se puede observar también una gran excreción de varios metabolitos adicionales: 4-Hidroxi-valérico (marcador de estados de crisis), ácido láctico, ácido 3-hidroxibutírico, ácido acetoacético, ácido 3-hidroxi-isovalérico y ácido isovalerilglutámico [11].

El conjugado N-isovalerilglutamato es el producto de la N-acetilglutamato sintasa (NAGS, EC 2.3.1.1), que cataliza la reacción entre isovaleril-CoA y glutamato. El N-acetilglutamato, que también se origina en el glutamato, activa la carbamoil fosfato sintetasa requerida para la etapa inicial del ciclo de la urea y puede verse comprometida, dando como resultado una hiperamonemia secundaria en IVA. Sumando al diagnóstico bioquímico de la enfermedad, se encuentra el análisis genético-molecular, que permite confirmar el diagnóstico de IVA [11, 16].

6.1.2.2 Tratamiento. El tratamiento en esta enfermedad es una restricción dietaria principalmente de Leucina y suplementación de carnitina y glicina porque apoya el proceso de detoxificación a través de la formación de N-isovalerilglicina a expensas del ácido N-isovalerilglutámico. Se recomienda suministrar un aporte adecuado de energía para limitar la producción de ácido isovalérico y suministrar un aporte de vitaminas y minerales cuando sea requerido [6, 16] .

6.1.3 Acidemia Glutárica Tipo I (GA-I, OMIM 231670). Es un trastorno metabólico autosómico recesivo, con una incidencia mundial estimada de 1:110.000. Se considera principalmente un trastorno neurológico causado por la deficiencia de la enzima glutaril-CoA deshidrogenasa (GCDH, E.C. 1.3.8.6) [17].

El gen GCDH se localiza en 19p13.2 y codifica una proteína de matriz mitocondrial dependiente de flavina adenina dinucleótido (FAD), que participa en la degradación de la L-lisina, la L-hidroxilisina y el L-triptófano, mediante la transferencia de electrones a la ubiquinona y cataliza la deshidrogenación de glutaril CoA y glutaconil CoA a crotonil CoA [17].

6.1.3.1 Biomarcadores urinarios en Acidemia Glutárica tipo I. Bioquímicamente, GA-I se caracteriza por la acumulación del Ácido Glutárico (por sus siglas en inglés AG) Ácido 3-Hidroxisglutárico (por sus siglas en inglés 3-OH-GA), Ácido Glutacónico y Glutarilcarnitina (por sus siglas en inglés C5DC), que pueden detectarse en fluidos corporales mediante GC/MS o por tándem masas (por sus siglas en inglés MS/MS) (Figura 3) [17].

6.1.3.2 Síntomas Neurológicos. La Aciduria Glutárica tipo 1 tiene una presentación variable, que en algunos casos se puede parecer a una encefalitis viral o encefalomiелitis diseminada aguda. Típicamente, los neonatos afectados son asintomáticos en los primeros meses de vida, aparte de desarrollar macrocefalia; tienden a presentar una encefalopatía aguda tras una infección concurrente o un estado catabólico agudo, por ejemplo, trastornos gastrointestinales. Un subconjunto de pacientes presenta un inicio insidioso sin episodios de deterioro agudo, mientras que otros pueden llegar a la edad adulta con manifestaciones leves o ser asintomáticos [18].

En neonatos y lactantes, los síntomas neurológicos inespecíficos como la hipotonía muscular y el desarrollo motor tardío se producen en aproximadamente la mitad de todos los individuos con GA-I, mientras que otros son asintomáticos. La macrocefalia es un hallazgo frecuente (75%) pero no específico y está presente en el nacimiento o poco después de éste. Sin tratamiento, el 80-90% de los lactantes

desarrollará una enfermedad neurológica durante un período vulnerable del desarrollo cerebral (principalmente entre los 3 y los 36 meses de edad) [18].

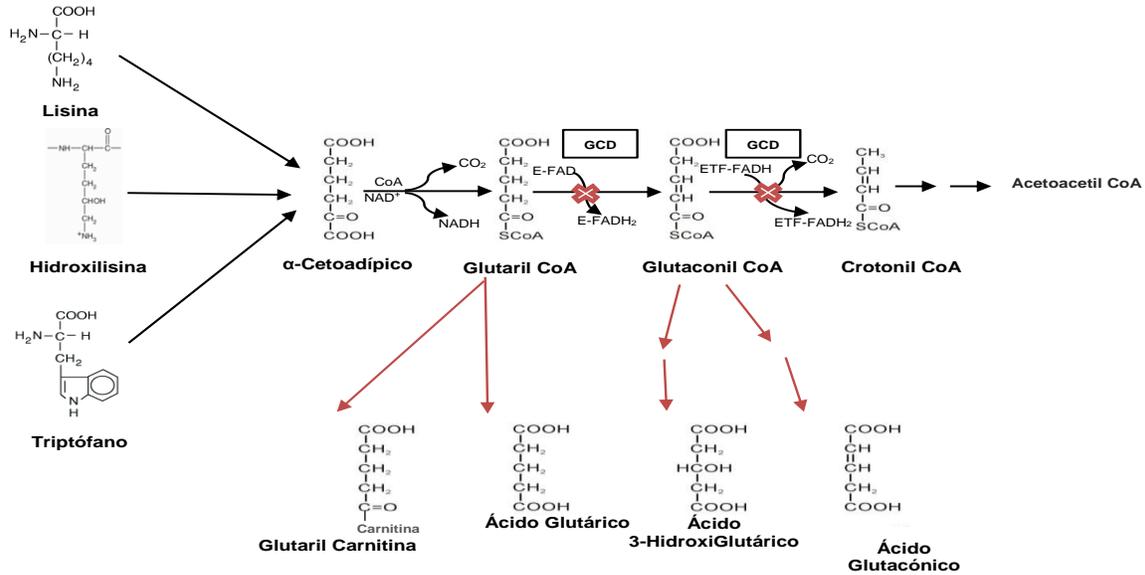
El compromiso del Sistema Nervioso Central (SNC), se caracteriza por lesiones bilaterales del estriado, (núcleo caudado y putamen), estructuras vulnerables y que resultan afectadas desde el primer evento agudo de crisis encefalopática (Figura 4). Los metabolitos acumulados como consecuencia del déficit enzimático, principalmente el Ácido Glutámico y el 3-Hidroxi-glutámico, son neurotóxicos y explican el daño neuronal. El 90% de los pacientes desarrolla enfermedad neurológica irreversible en los primeros 6 años de edad [19].

El cuadro clínico típico es evidente luego de una crisis de encefalopatía aguda, que conlleva a la regresión de las habilidades alcanzadas por el paciente en su neuro-desarrollo, con hipotonía generalizada y movimientos distónicos erráticos de difícil control. En estos pacientes puede encontrarse macrocráneo y algunos cursan con leve retraso del desarrollo psicomotor. 10 a 20% de los pacientes pueden presentar retraso en alcanzar los hitos del neuro-desarrollo y con el paso del tiempo evolucionan hacia una parálisis cerebral discinética. El compromiso neurológico puede estar presente aún sin una crisis de descompensación metabólica, puesto que el daño de los ganglios basales y de la sustancia blanca están presentes. Este fenotipo clínico puede ser insidioso, crónico o de inicio tardío [19].

Los individuos con forma tardía pueden presentar síntomas neurológicos inespecíficos como dolores de cabeza, vértigo, marcha atáxica transitoria, disminución de las habilidades motoras finas o desmayos después del ejercicio, pero no desarrollan lesión estriatal. Los cambios periventriculares de la sustancia blanca son el hallazgo prominente en la resonancia magnética cerebral. La frecuencia de la epilepsia aumenta en los pacientes con GA-I, y las convulsiones podrían ser la presentación clínica inicial, aunque se han reportado casos con insuficiencia renal crónica [19].

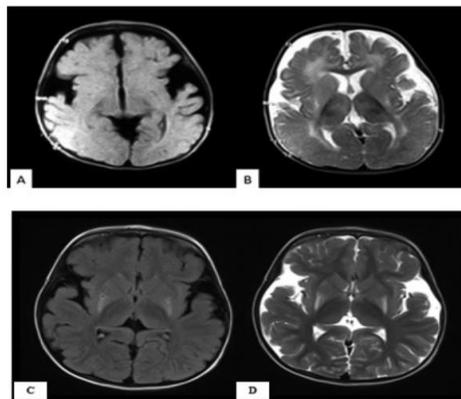
6.1.3.3 Tratamiento. La finalidad del mismo es evitar la recurrencia de la crisis metabólica y la progresión clínica e imagenológica de la enfermedad; aunque cabe aclarar que este no mejora las secuelas. Se deben instaurar dietas libres de lisina, bajas en triptófano y que contenga micronutrientes y mantener un balance energético adecuado acorde con la edad del paciente; suplementar con L-carnitina. Si la afectación motora es importante y la discinesia compromete la deglución, se debe valorar la necesidad de gastrostomía temprana [6].

**Figura 3. Vía Catabólica de Lisina, Hidroxilisina y Triptófano.** GCDH: Glutaril-CoA deshidrogenasa: media la descarboxilación oxidativa de Glutaril-CoA a Crotonil-CoA en dos etapas. En la deficiencia de GCDH, el glutaril-CoA se descompone en glutarilcarnitina y ácido glutárico, mientras que el Glutaconil-CoA se convierte en ácido 3-hidroxiglutarico y Ácido Glutacónico por mecanismos aún desconocidos.



Fuente: Tomado y modificado de [20].

**Figura 4. Resonancia cerebral de pacientes con Acidemia Glutárica tipo I.** corte axial FLAIR. (A): Hipoplasia lóbulos Temporales y aspecto cuadrado de la cisura de silvio. (B) ganglios basales hiperintensos en imágenes T2; compromiso de sustancia blanca. (C) plano axial, secuencia FLAIR y (D) plano axial, secuencia T2. C y D muestran aumento simétrico y bilateral en la amplitud de las cisuras silvianas con atrofia temporal, hiperintensidad difusa que involucra ganglios basales (lenticular).

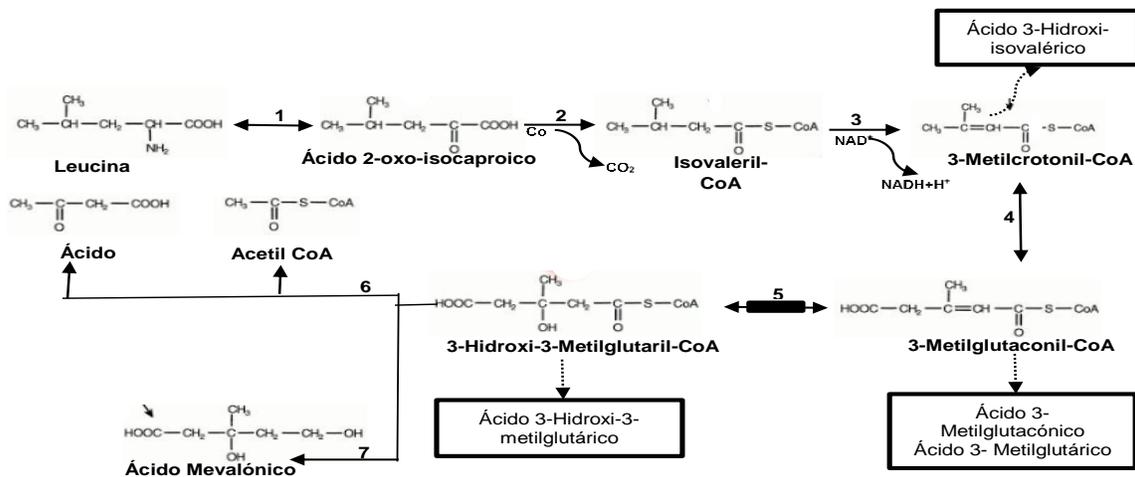


Fuente: Tomado de [19].

6.1.4 Acidemia 3-Metilglutacónica (OMIM 250950). Grupo de enfermedades que afectan el catabolismo mitocondrial de la Leucina, donde se encuentran elevaciones del Ácido 3-Metilglutárico y Ácido 3-Metilglutacónico (Mayor a 40µmol/mmol Creat). Se han descritos cerca de cinco tipos según la enzima afectada (Figura 5) [21].

Los signos y síntomas pueden aparecer en la infancia asociados con retraso psicomotor, y en la edad adulta se pueden manifestar con trastorno neurodegenerativo progresivo caracterizado por ataxia, espasticidad y a veces demencia; estos pacientes desarrollan lesiones de la sustancia blanca cerebral. El diagnóstico bioquímico se hace al detectar la excreción de los Ácidos 3-Metilglutacónico (3-MGA), 3-Metilglutárico (3-MG) y 3-hidroxiisovalérico (3-HIVA) en muestras biológicas.

**Figura 5. Catabolismo de Leucina.** (1) Transaminasa, (2) Deshidrogenasa de Cadena Ramificada, (3) Isovaleril-CoA Deshidrogenasa, (4) 3-Metilcrotonil-CoA Carboxilasa, (5) 3-Metilglutaconil-CoA Hidratasa, (6) 3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA liasa, (7) 3- Hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa.



Fuente: Tomado y modificado de [21, 22].

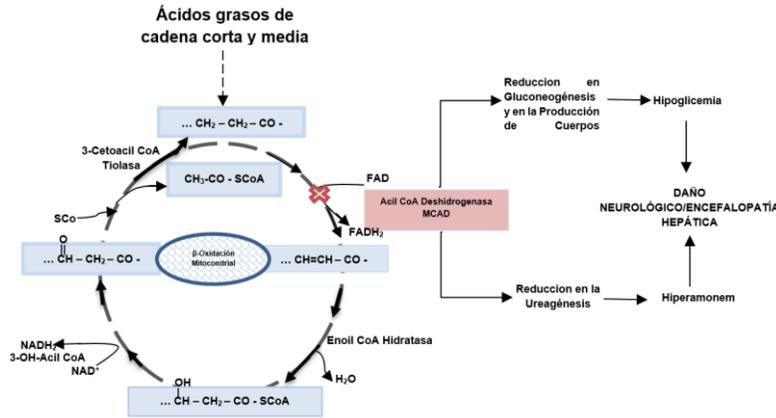
6.1.5 Deficiencia de Acil-Coenzima A Deshidrogenasa de Cadena Media ((por sus siglas en inglés MCADD) – OMIM 201450). Es el error congénito más frecuente de oxidación de ácidos grasos, afecta a aproximadamente 1: 20.000 a 1: 8.000 recién nacidos. Esta enfermedad es producida por la deficiencia de la enzima Acil CoA deshidrogenasa de cadena media (por sus siglas en inglés MCAD; E.C. 1.3.8.7), involucrada en la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos de cadena media (C6-C12) en la matriz mitocondrial., que fomenta la cetogénesis hepática, una fuente importante de energía una vez agotadas las reservas hepáticas de glucógeno durante el ayuno prolongado y períodos de mayor demanda de energía (Figura 6). [23].

Las manifestaciones clínicas de esta deficiencia son hipoglicemia hipocetótica, vómito y letargia (síntomas que se confunden con una enfermedad común); en algunos casos pueden presentarse convulsiones e hiperamonemia; esta última, debida a la acumulación de ácidos grasos con efectos tóxicos como por ejemplo C8 (octanoato) que altera el ciclo de la urea. La hepatomegalia y la enfermedad hepática suelen manifestarse durante un episodio agudo, que puede progresar rápidamente hasta el coma y la muerte [24].

El diagnóstico de deficiencia de MCADD requiere la interpretación integrada de múltiples análisis, incluyendo la consideración del estado clínico del individuo afectado (es decir, sintomático agudo vs asintomático) en el momento de la toma de la muestra. Las pruebas iniciales deben incluir análisis de acilcarnitinas en plasma, ácidos orgánicos de orina y análisis de acilglicina en la orina y su interpretación apropiada. Otras pruebas confirmatorias pueden ser mediante la identificación de variantes patogénicas bialélicas en el gen ACADM o pruebas genéticas bioquímicas adicionales (es decir, determinación del flujo de  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos en fibroblastos o medición de la actividad enzimática MCAD en leucocitos, fibroblastos u otros tejidos) [25]. La carnitina C8 en sangre es un marcador bastante específico, puede estar moderadamente elevada en fenotipos leves, mientras que en orina la hexanoilglicina (marcador de esta entidad), usualmente no se encuentra en estos fenotipos. [26].

6.1.5.1 Tratamiento. El pilar del tratamiento para MCADD es evitar el ayuno. Se ha informado que el tiempo máximo de ayuno seguro en pacientes sanos de MCADD es de hasta 8 horas en lactantes, entre las edades de 6 y 12 meses; Hasta 10 horas durante el segundo año de vida, y hasta 12 horas después de la edad de 2 años. Después de 1 año de edad, se recomienda usualmente 2 g/kg de almidón de maíz sin cocer como fuente de carbohidratos complejos a la hora de acostarse, ya que proporciona una liberación lenta de glucosa. Los pacientes no necesitan ninguna restricción de grasa en su dieta, y la lactancia materna debe ser permitida. Los pacientes con MCADD nunca deben recibir solución intravenosa de lípidos cuando están enfermos y necesitan nutrición parenteral total [24].

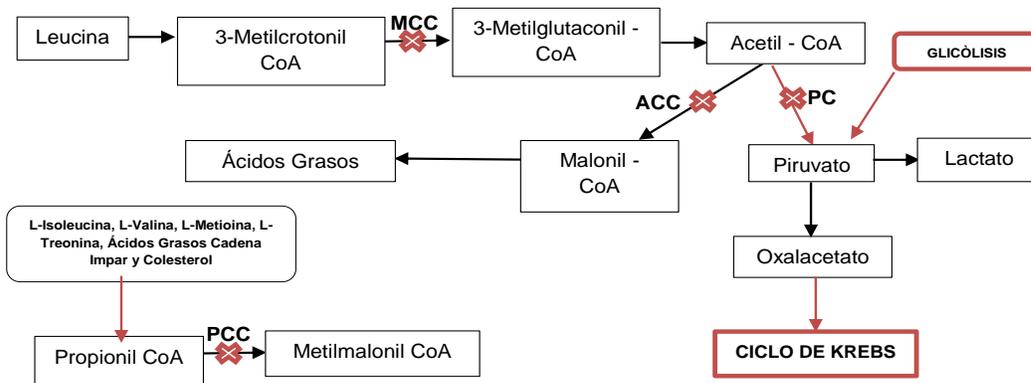
**Figura 6. Catabolismo de los Ácidos Grasos de Cadena Corta y Media en Mitocondria.** Los Acil-CoAs de cadena media generados por enzimas específicas de cadena larga en la membrana mitocondrial interna sufren una serie de pasos enzimáticos en la matriz para generar Acetil-CoA y acyl-CoA una vez acortada la cadena de ácidos grasos. En la deficiencia de MCAD, esta parte de la vía está bloqueada, lo que conduce a la acumulación de especies de acil-CoA de cadena media, de donde se derivan acilcarnitinas y acilglicinas.



Fuente: Tomado y modificado de [24]

6.1.6 Deficiencia de Holocarboxilasa Sintetasa (HLCS - OMIM 253270): Enfermedad autosómica recesiva con una incidencia de 1:200.00 nacidos vivos, que conlleva a un déficit múltiple de carboxilasas, debido a que la enzima Holocarboxilasa Sintetasa (EC 6.3.4.10), no puede catalizar la unión covalente de biotina a las dos isoformas de la Acetil-CoA Carboxilasa Citosólica (ACC1 Y ACC2 - implicadas en la biosíntesis de ácidos grasos) y a las tres carboxilasas mitocondriales: Piruvato carboxilasa (PC -clave en gluconeogénesis), Propionil-CoA Carboxilasa (PCC) y Metilcrotonil-CoA Carboxilasa (MCC), enzimas implicadas en el catabolismo de aminoácidos (Figura 7) [27].

**Figura 7. Rutas Metabólicas donde se encuentran implicadas las Carboxilasas dependientes de Biotina.** Acetil-CoA Carboxilasa (ACC), Piruvato carboxilasa (PC), Propionil-CoA Carboxilasa (PCC).



Fuente: Tomado y modificado de [27].

Esta entidad se puede presentar en el período neonatal o en lactancia y se caracteriza por rechazo al alimento, acidosis metabólica, hiperamonemia, exantema, alopecia, hipotonía, convulsiones, letargia y/o coma. La presentación en el niño mayor es excepcional, con episodios de vómitos y acidosis metabólica [27].

No existe un tratamiento definitivo para esta entidad; el tratamiento actualmente consiste en un buen manejo dietético con una modesta restricción de leucina y suplemento con L-carnitina [21].

6.1.6.1 Diagnóstico de Deficiencia de Holocarboxilasa Sintetasa: A través de las mediciones de Acilcarnitinas se puede encontrar aumento de: Hidroxipentanoil carnitina (C5-OH) y en la determinación de ácidos orgánicos en orina se pueden observar elevaciones de Ácido Láctico, Ácido 3-Hidroxi-isovalérico, Ácido 3-Hidroxi-propiónico, 3-Metilcrotonilglicina, Ácido Metilcítrico, y Tiglilglicina [27].

## 6.2 AMINOACIDOPATÍAS

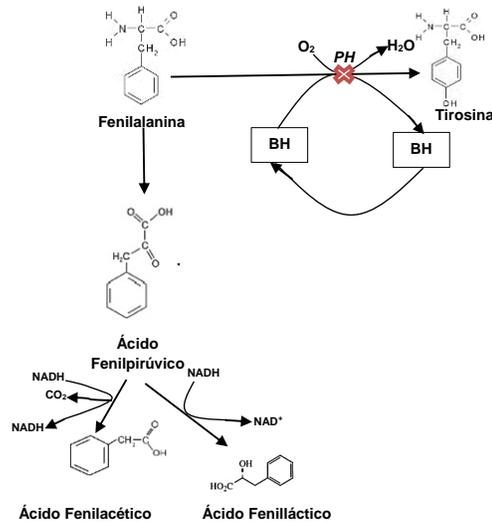
Los errores congénitos del metabolismo de los aminoácidos o aminoacidopatías son un grupo de enfermedades que afecta a aproximadamente 7.6 por cada 100.000 nacidos vivos [28]. Son el resultado de la incapacidad de un individuo para metabolizar ciertos aminoácidos en proteínas y/o desintoxicar los subproductos resultantes de ese metabolismo de los aminoácidos. Debido a que los aminoácidos son los bloques de construcción clave de muchos neurotransmisores, son cruciales para la correcta regulación y desarrollo de funciones cognitivas, sociales y emocionales del cerebro [28].

Los fenotipos clínicos van desde asintomáticos hasta descompensaciones metabólicas que pueden llevar a un deterioro en las capacidades mentales adquiridas e incluso a la muerte; por lo que se hace necesario restringir la ingesta dietética de uno o más aminoácidos que pueden ser tóxicos o ser precursores de metabolitos tóxicos, limitando así la ingesta de proteínas de los alimentos y proporcionando dietas y fórmulas especiales que proporcionan a los pacientes otros aminoácidos esenciales [29, 30].

6.2.1.1 Defectos en el Metabolismo de Fenilalanina. La enzima Fenilalanina Hidroxilasa (PAH - EC 1.14.16.1), cataliza la hidroxilación de Fenilalanina (aminoácido esencial) a Tirosina. Para que esta reacción se lleve a cabo, la PAH necesita el cofactor Tetrahidrobiopterina (BH4) (Figura 8). Cuando hay mutación en el gen que codifica para PAH o en el gen que codifica para BH4, se producen las

Hiperfenilalaninemias, que se clasifican según las concentraciones plasmáticas de Fenilalanina en: Fenilcetonuria (forma severa), Fenilcetonuria moderada e Hiperfenilalaninemia; todas ellas autosómicas recesivas [6].

**Figura 8. Metabolismo de Fenilalanina.** Fenilalanina es metabolizada a Tirosina mediante la enzima Fenilalanina Hidroxilasa (PHA), la cual necesita como cofactor a la Tetrahydrobiopterina, que a su vez es metabolizado a Dihydrobiopterina. (BH2). Ante una deficiencia de PAH, la fenilalanina toma un camino metabólico alternativo en el cual se produce cetoácido fenilpirúvico que puede ser reducido y/o oxidado según lo observado en la figura.



Fuente: Tomado y modificado de [6].

El cuadro clínico se caracteriza por olor a moho (producido por el acúmulo de Ácido Fenilacético), presencia de eccemas entre el 20 - 40% de los pacientes, hipopigmentación (causada por la ausencia de tirosina) y retardo en el neurodesarrollo, conllevando a que en estos pacientes se obtengan coeficientes intelectuales menores de 50. Este retardo es consecuencia de la alteración en el transporte de aminoácidos a través de la barrera hematoencefálica, lo que genera disminución en la mielinización y arborización dendrítica, además del deterioro de la sinaptogénesis [6].

6.2.1.2 Diagnóstico de Hiperfenilalaninemias: Según las concentraciones de Fenilalanina en sangre, se pueden clasificar como Fenilcetonuria (mayores a  $1200\mu\text{mol/L}$ ), Fenilcetonuria moderada ( $600 - 1200\mu\text{mol/L}$ ) e Hiperfenilalaninemias ( $120 - 600\mu\text{mol/L}$ ); adicionalmente se deben tener en cuenta que los niveles de Tirosina pueden estar disminuidos o normales. Se puede encontrar excreción del cetoácido fenil-piruvato, que puede ser reducido hasta fenilactato y oxidado a fenilacetato, los cuales son excretados en orina. Si el defecto es en el cofactor  $BH_4$ ,

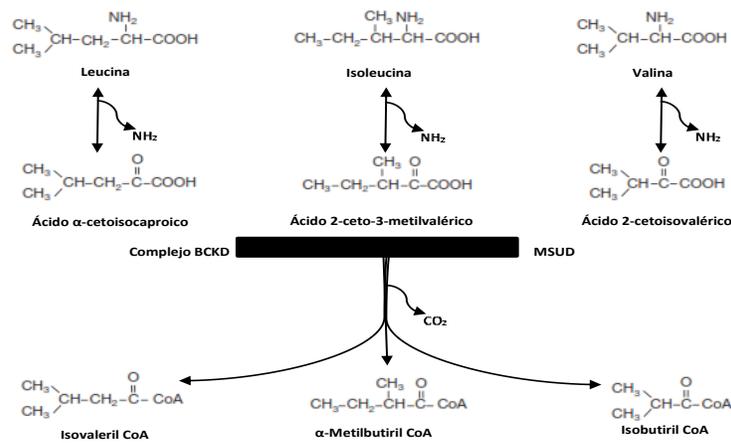
se deben determinar los niveles de pterinas urinarias y determinación enzimática de dihidrobiopterina reductasa [25].

6.2.1.3 Tratamiento: Teniendo en cuenta que la Fenilalanina es un aminoácido esencial, su restricción dependerá de la edad y tolerancia del paciente, manteniendo un nivel adecuado en sangre y líquidos corporales. Es importante disminuir el aporte exógeno de Fenilalanina a fin de disminuir la concentración plasmática; y una vez ésta se encuentre dentro de los rangos normales, se debe reintroducir su ingesta teniendo en cuenta el valor encontrado en el momento del diagnóstico [6].

6.2.2 Enfermedad de Orina con Olor a Jarabe de Arce (MSUD, OMIM 248600). También denominada *Cetoaciduria de Cadena Ramificada*, es una aminoacidopatía hereditaria autosómica recesiva causada por mutaciones en el complejo de la Cetoácido Deshidrogenasa de Cadena Ramificada (BCKD) (E.C.1.2.4.4). Este complejo enzimático cataliza una descarboxilación oxidativa irreversible de  $\alpha$ -cetoácidos de cadena ramificada (BCKA)  $\alpha$ -cetoisocaproico (KIC), 2-ceto-3-metilvalérico (KMV) y 2-cetoisovalérico (KIV), en el segundo paso de la vía degradativa de los aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) leucina (Leu), isoleucina (Ileu) y valina (Val) (Figura 9) [31].

BCKD es un complejo compuesto de tres componentes catalíticos: una descarboxilasa dependiente de pirofosfato de tiamina (E1), que es un heterotetrámero de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , una dihidrolipoil transacetilasa (E2), y una lipoamida deshidrogenasa (E3), que es un homodímero compartido con los complejos piruvato y  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasas. Además, el complejo BCKD contiene dos enzimas reguladoras, una quinasa y una fosfatasa, que controlan la actividad del complejo. Los tres componentes catalíticos están codificados por cuatro genes no enlazados: BCKDA, que codifica la subunidad  $\alpha$  de E1, BCKDB, que codifica la subunidad beta de E1, DBT, codificando E2 y DLD, codificando E3; mutaciones en cualquiera de estos cuatro genes reducen o eliminan la función del complejo de proteínas que resulta en MSUD tipo 1A, MSUD tipo 1B, MSUD tipo 2 y MSUD tipo 3, respectivamente [32].

**Figura 9. Primer Paso del Catabolismo de Leucina, Isoleucina, Valina.** BCKD: complejo enzimático Cetoácido Deshidrogenasa de Cadena Ramificada; MSUD: del Inglés Maple Syrup Urine Disease.



Tomado y modificado de Ref. [11].

Clínicamente, los fenotipos de MSUD suelen clasificarse en cinco subtipos. Aunque las actividades de la enzima BCKD se superponen hasta cierto punto en estos subtipos, generalmente la actividad enzimática más baja se asocia con un trastorno más grave. Los pacientes afectados por la forma clásica neonatal severa (actividad enzimática residual <2%), que es la forma más común del trastorno, parecen normales al nacer, con síntomas que se desarrollan entre los 4 y 7 días de edad: letargia, irritabilidad, pérdida de peso y encefalopatía grave. El cerumen y la orina presentan un olor característico similar al jarabe de arce desde las 12 horas después del nacimiento; La intoxicación lumínica aguda (leucinosis) puede surgir en cualquier edad y conducir a edema cerebral y signos neurológicos que eventualmente resultan en coma e insuficiencia respiratoria central que puede ocurrir entre los 7 a 10 días de edad, antes de que los resultados de detección de recién nacidos estén disponibles [11].

Los pacientes con MSUD intermitente (actividad enzimática entre 5-20%) tienen crecimiento normal y desarrollo intelectual a lo largo de la infancia. Bajo condiciones de estrés fisiológico (infecciones), pueden presentar las características clínicas del MSUD clásico. Los individuos con MSUD intermedio (actividad residual de BCKD entre 3-30%) pueden parecer saludables durante el período neonatal, pero tienen problemas neurológicos graduales, que eventualmente resultan en retraso mental. La cetonuria y BCKA pueden aparecer en la orina sólo durante la descompensación. Los pacientes con MSUD sensible a la tiamina tienen una actividad enzimática de BCKAD residual de hasta un 40% de normalidad y un curso clínico similar al de MSUD intermedio. En estos pacientes, las concentraciones de BCAA y BCKA

disminuyen con la terapia de tiamina. El MSUD deficiente en E3 es una afección muy poco frecuente clínicamente similar al MSUD intermedio, pero con Acidosis Láctica grave; Los pacientes afectados por esta variante de MSUD tienen una deficiencia combinada de BCKDA junto con los complejos piruvato y  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasas, lo que lleva a un fenotipo más complejo [32].

MSUD es considerado como uno de los trastornos genéticos más importantes y graves del metabolismo de aminoácidos, ya que los niveles deficientes del complejo BCKD causan acumulación tóxica de BCAA y sus metabolitos relacionados en fluidos biológicos, dando como resultado efectos numerosos y graves. Las principales características clínicas presentadas por los pacientes del MSUD incluyen convulsiones, cetoacidosis, apnea, hipoglucemia, coma, ataxia, retraso psicomotor y retraso mental, así como hipomielinización/desmielinización. La enfermedad afecta aproximadamente a uno de cada 185.000 recién nacidos en todo el mundo [31].

Leucina y/o el ácido  $\alpha$ -cetoisocaproico son los principales metabolitos neurotóxicos en MSUD; las altas concentraciones de estos, están asociadas con la aparición de síntomas neurológicos, así como deterioro del metabolismo energético al inhibir la cadena de transporte de electrones comprometiendo el ciclo Krebs y la creatina quinasa. El acumulo de  $\alpha$ -cetoácidos también produce apoptosis neuronal, deterioro de la síntesis y función de neurotransmisores, alteración de la mielina y reducción de la absorción de aminoácidos esenciales a nivel cerebral. El estrés oxidativo también se ha relacionado con la fisiopatología de MSUD. Sin embargo, los mecanismos subyacentes a la disfunción neurológica en MSUD todavía son poco conocidos [11].

*6.2.2.1 Biomarcadores urinarios en MSUD:* El análisis cuantitativo de aminoácidos plasmáticos es la herramienta diagnóstica más informativa y revela, en pacientes con MSUD, elevadas concentraciones de leucina, isoleucina y valina; y como hallazgo patognomónico, alloisoleucina. A veces, las concentraciones plasmáticas de isoleucina o valina pueden ser bajas o normales, pero la concentración plasmática de leucina es invariablemente elevada, acompañada de concentraciones disminuidas de otros aminoácidos esenciales y no esenciales, diferenciándose así de algunas otras condiciones patológicas que también muestran mayores niveles de estos aminoácidos en plasma. En la cetoacidosis diabética, por ejemplo, la concentración plasmática de ácido glutámico, ácido aspártico, leucina, isoleucina y, en particular, valina se incrementa significativamente; Estos pacientes también muestran niveles aumentados de excreción urinaria de aminoácidos de cadena ramificada, histidina, serina y treonina, mientras que los niveles de ácido glutámico, glutamina, glicina y taurina se reducen. La excreción urinaria de  $\alpha$ -cetoácidos de

cadena ramificada y los hidroxiacidos se producen en pacientes MSUD después de 48-72 horas de nacido [11].

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) corrobora el diagnóstico de MSUD revelando y cuantificando ácido 2-cetoisocaproico, ácido 2-cetoisovalérico, ácido 2-ceto-3-metilvalérico ácido 2-hidroxi-isocaproico, ácido 2-hidroxi-isovalérico y ácido 2-hidroxi – 3 – metilvalérico. En todos los subtipos clínicos se pueden observar BCKAs elevados, y en particular ácido 2-cetoisovalérico, que es el pico diagnóstico más importante, aunque el perfil bioquímico puede ser menos grave tanto en la forma intermedia como en el subtipo con respuesta a tiamina, y puede ser normal en el subtipo intermitente en ausencia de signos clínicos. Dado que la subunidad E3 de BCKAD se comparte con los complejos de piruvato y alfa-cetoglutarato deshidrogenasas, MSUD tipo 3 se caracteriza por una excreción urinaria incrementada de BCKA y  $\alpha$ -cetoglutarato asociada con concentraciones plasmáticas aumentadas de lactato, piruvato y alanina. El diagnóstico de MSUD tiene que ser confirmado por pruebas genéticas moleculares.[32].

*6.2.2.2 Tratamiento:* La terapia para MSUD se basa en una dieta natural restringida a proteínas con bajo contenido de BCAA, suplementada con una mezcla de aminoácidos sin BCAA enriquecida con oligoelementos, vitaminas y minerales, así como la intervención agresiva durante la descompensación metabólica aguda. Aunque los beneficios del tratamiento dietético para MSUD son innegables, la restricción natural de proteínas puede aumentar el riesgo de deficiencias nutricionales. Algunas de las deficiencias nutricionales pueden resultar en un bajo nivel de antioxidante total que puede predisponer y / o contribuir al estrés oxidativo [31].

## **6.3 OTRAS CONDICIONES**

**6.3.1 Acidosis Láctica:** Es definida cuando los niveles de lactato (también denominado ácido láctico) en sangre se encuentran  $\geq 5$  mEq/L, pH sanguíneo  $\leq 7.35$  y concentración sérica de bicarbonato  $\leq 20$  mEq/L. Los niveles de Lactato plasmático dependen del equilibrio entre la producción citoplasmática de la glucólisis y su consumo por diferentes tejidos. La acumulación anormal de ácido láctico puede producir acidosis láctica y ésta es una causa frecuente de acidosis metabólica patológica. En la mayoría de los casos, es causada por la hipoxia tisular que resulta de un suministro de oxígeno inadecuado o mala circulación. El lactato

sanguíneo se acumula en colapso circulatorio, lesión hipóxica y otras afecciones que implican la falla de la respiración celular. Estas condiciones deben descartarse antes de investigar un EIM del Piruvato y/o Lactato. La cetosis está ausente en la mayoría de las hiperlactacidemias secundarias a la hipoxia tisular, mientras que es un hallazgo casi constante en la mayoría de los trastornos metabólicos hereditarios, excepto la deficiencia de piruvato deshidrogenasa, trastorno de almacenamiento de glucógeno tipo I y defectos de oxidación de ácidos grasos [33].

Las causas metabólicas heredadas de la Acidosis Láctica se pueden dividir en [33]:

1. Defectos del metabolismo del piruvato
  - Deficiencia de Piruvato Deshidrogenasa
  - Deficiencia de Piruvato Carboxilasa
2. Defectos de la oxidación de NADH
  - Defectos de la cadena de transferencia de electrones mitocondriales
3. Trastornos de la gluconeogénesis / trastornos de almacenamiento de glucógeno
  - Deficiencia de Glucosa 6-Fosfatasa (GSD I)
  - Deficiencia de Fructosa 1,6-Bisfosfatasa
  - Deficiencia de Fosfoenolpiruvato Carboxiquinasa
  - Deficiencia de la Enzima Desramificante
  - Deficiencia de Glucógeno Sintasa (GSD 0)
4. Defectos de oxidación de ácidos grasos
5. Defectos del metabolismo de la biotina
  - Deficiencia de Biotinidasa
  - Deficiencia de Holocarboxilasa Sintasa
  -
6. Defectos del metabolismo de los ácidos orgánicos
  - Acidemia Propiónica
  - Acidemia Metilmalónica
7. Otros
  - Intolerancia a la Fructosa Hereditaria

Ante los niveles elevados de lactato que generan una acidemia severa (pH sanguíneo ~7.2) que puede afectar la función cardiovascular y el flujo sanguíneo, es necesario administrar bases que aumenten el pH intracelular y el pH intersticial, junto con el pH sanguíneo. Dentro de estas bases se encuentran:

- Bicarbonato de sodio: ha sido la base más utilizada (solución hipertónica o preferiblemente isotónica). Sin embargo, en la mayoría de los estudios, no mejora la función cardíaca ni reduce la mortalidad.

- THAM (tris-hidroximetilaminometano): Los efectos adversos no son bien conocidos; se debe usar con precaución en pacientes con disminución de la función renal.
- Lactato de Ringer, entre otros [34].

## **6.4 APLICACIÓN DE LA METABOLÓMICA A LOS ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO**

Las ciencias “ómicas” (genómica, proteómica, transcriptómica y metabolómica) se han desarrollado a partir del desciframiento del genoma humano; son tecnologías de alto rendimiento con capacidad para generar y analizar datos a gran escala con elevada precisión y resolución. La más reciente de estas ciencias es la “metabolómica”, la cual se dedica al estudio global del “metaboloma” [35].

El metaboloma es la colección de todos los metabolitos en un organismo biológico, y los metabolitos son los productos finales de la expresión génica y la síntesis de proteínas, así como la respuesta de la célula a factores de estrés ambiental; el metaboloma se encuentra en constante cambio gracias a procesos fisiológicos reguladores y puede ser determinado en células, tejidos y fluidos biológicos bajo condiciones dadas [36].

La metabolómica complementa la información proporcionada por la bioquímica clásica, la biología molecular y la fisiología, y es empleada tanto para la identificación de biomarcadores como para intentar entender la etiología molecular de las enfermedades. Los datos derivados de un estudio metabolómico pueden ser analizados de diferentes maneras en función del objetivo del estudio. Desde el punto de vista clínico, la metabolómica es una herramienta muy eficaz y práctica, porque tiene el potencial para revelar los marcadores o condiciones fisiológicas humanas que son responsables de ciertas enfermedades, debido a que los estados de enfermedad pueden ser detectados por cambios en las concentraciones de metabolitos específicos de la misma, ya sean de tipo endógeno (se sintetizan y se consumen dentro de un sistema biológico) o exógenos, (se importan fuera del sistema biológico en la célula, tales como fármacos y nutrientes) [36, 37].

6.4.1 Tipos de estudios metabolómicos. Se han desarrollado dos tipos de estudios según sea el objetivo: el primero es el análisis dirigido, el cual se realiza con base en el conocimiento previo de los metabolitos de interés y el segundo es el análisis no dirigido (también llamado análisis del perfil metabolómico) que se emplea cuando

no se parte de una hipótesis sobre los metabolitos alterados o mecanismos implicados en un determinado sistema biológico; en este análisis como su nombre lo indica se pretenda analizar simultáneamente tantos metabolitos como sea posible para tener una visión global de interés. En estos estudios, aunque se pueden obtener valores de concentración absolutos, generalmente, se calculan las concentraciones relativas de los metabolitos analizados y se analizan sus variaciones entre dos o más condiciones [35].

6.4.2 Técnicas empleadas en Metabolómica. Dentro de las técnicas más empleadas desde los años 70's para el estudio de la metabólica se encuentran la Espectrometría de masas (MS) y la Resonancia Magnética Nuclear ( $^1\text{H-NMR}$ ). Para identificar los metabolitos eficientemente, MS requiere una etapa de separación adicional mediante cromatografía de gases o cromatografía líquida. Aunque MS es más sensible que  $^1\text{H-NMR}$ , ésta última tiene las ventajas de ser relativamente robusta a través de muchas muestras (la muestra no se contamina durante el proceso), es relativamente rápida (con espectros adquiridos dentro de unos pocos minutos), además de ser un proceso no destructivo. (Tabla 1) [36].

**Tabla 1: Ventajas y Limitaciones de las Técnicas Empleadas en Metabolómica**

	<b>NMR</b>	<b>MS</b>
<b>Sensibilidad</b>	Baja, pero se puede mejorar con un mayor campo de fuerza, crio, microsondas y Polarización Nuclear Dinámica.	Alta, pero pueden sufrir de supresión de iones en mezclas complejas y saladas.
<b>Medición de la Muestra</b>	Toda la muestra analizada en una medición.	Por lo general, necesitan diferentes técnicas de cromatografía para diferentes clases de metabolitos.
<b>Recuperación de Muestra</b>	No destructiva; La muestra puede ser recuperada y almacenada durante mucho tiempo, varios análisis pueden llevarse a cabo en la misma muestra.	Técnica destructiva, pero necesita una pequeña cantidad de muestra que es empleada en su totalidad.
<b>Reproducibilidad</b>	Muy Alta	Moderada
<b>Preparación de la Muestra</b>	Preparación mínima de la muestra.	Más demandante; las necesidades de diferentes columnas de según el tipo de cromatografía empleada para separar las muestras previamente y optimización de las condiciones de ionización.
<b>Tiempo Experimental</b>	5 min para $^1\text{H-NMR}$ de 1D.	A menos de 3 minutos para infusión directa, pero más de 10 minutos para el análisis más simple por GC-MS o LC-MS.

<b>Muestra: Tejidos</b>	Sí, utilizando HRMAS $^1\text{H-NMR}$ , las muestras de tejido pueden ser analizadas directamente.	- No, requiere extracción a partir de tejido. - MS se puede utilizar para identificar metabolitos en los tejidos utilizando MALDI-MS.
<b>Número de Metabolitos detectados en Orina</b>	40 -100 según el espectro de resolución	500 0 más
<b>Objetivo del Análisis</b>	Inferior para análisis específicos.	Superior para análisis específicos.
<b>Estudio <i>In Vivo</i></b>	Sí, ampliamente utilizado para Difusión Dinámica y Molecular $^1\text{H}$ espectroscopia de resonancia magnética (y en menor grado $^{31}\text{P}$ y $^{13}\text{C}$ ).	No; sin embargo, DESI-MS puede ser una forma útil para muestrear tejidos mínimamente invasiva durante cirugía.
<b>Difusión Dinámica y Molecular</b>	NMR se puede usar para sondear la difusión molecular y dinámica.	No

Fuente: Tomado y modificado de [36]

En general, estas técnicas son empleadas como herramientas analíticas complementarias porque ofrecen numerosas posibilidades para el estudio de las condiciones fisiopatológicas, ya que son métodos rápidos, rentables y de bajo costo por muestra (si se compara con otras “ómicas”) [36, 37].

#### 6.4.2.1 Espectrometría de Masas en Tandem (MS/MS)

La MS (por sus siglas en inglés) permite la identificación de moléculas, basada en su relación masa/carga ( $m/z$ ) [38]. Las moléculas de interés forman parte generalmente de una mezcla heterogénea que no requiere necesariamente una separación previa, y se someten en primer lugar a una fuente de ionización donde se ionizan, adquiriendo carga negativa o positiva. Los iones atraviesan el analizador de masas hasta que alcanzan diferentes partes del detector de acuerdo con su relación  $m/z$ . Una vez en contacto con el detector, se generan señales que son registradas en el sistema informático y representadas en un espectro de masas que muestra la abundancia relativa de las señales en función de su relación  $m/z$  [39].

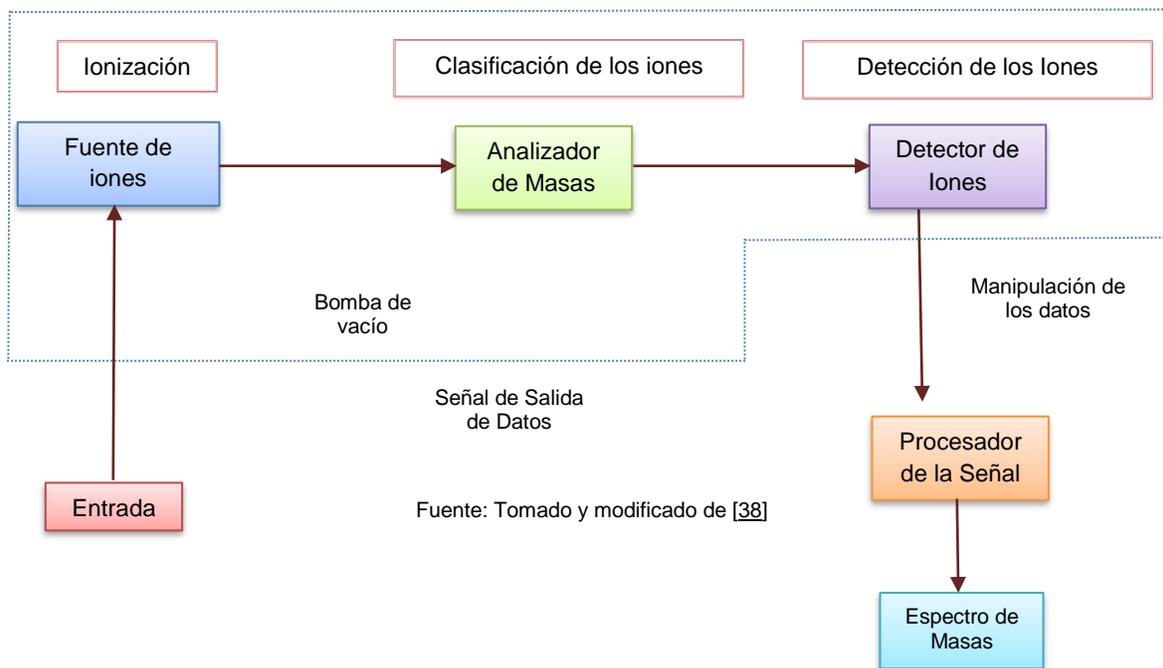
Así pues, el análisis de muestras por MS se produce gracias a 3 procesos: Ionización de la muestra (la cual se puede llevar a cabo de diferentes formas, según la naturaleza propia de la muestra), Análisis de la muestra ionizada y Detección de los compuestos. El instrumento que lleva a cabo los procesos nombrados anteriormente es el espectrómetro de masas (Figura 10) [38, 39].

El analizador más empleado en laboratorio es el analizador de masas cuadrupolar, el cual puede estar acoplado a cromatografía de gases o cromatografía líquida para componer un sistema de cribado de alto rendimiento. Pero los cuadrupolos pueden

configurarse en tándem para realizar estudios de fragmentación. El mas usado es el triple cuadrupolo [39].

La espectrometría de masas en tándem es una herramienta poderosa y versátil para el diagnóstico neonatal de los EIM. Aunque presenta como principales inconvenientes cierta complejidad de manejo e interpretación, la introducción de una etapa de ionización mediante electronebulización como método de enlace entre la cromatografía líquida y la espectrometría de masas, ha facilitado enormemente la incorporación de esta tecnología al laboratorio clínico. La espectrometría MS/MS permite expandir el campo del tamizaje neonatal de una forma extraordinariamente amplia, incluyendo, aminoacidopatías, trastornos de la degradación de ácidos orgánicos y de la oxidación de ácidos grasos. En una única muestra de sangre se pueden detectar hasta 40 trastornos, lo que significa un cambio fundamental en el manejo del diagnóstico neonatal [39].

Figura 10. Componentes de un Espectrómetro de Masas.



6.4.2.2 Cromatografía de Gases (GC). Técnica para separar o analizar compuestos volátiles por “cromatografía”. GC se utiliza frecuentemente como método análisis; los componentes pueden ser identificados por el tiempo que tardan en pasar a través de la columna. [40].

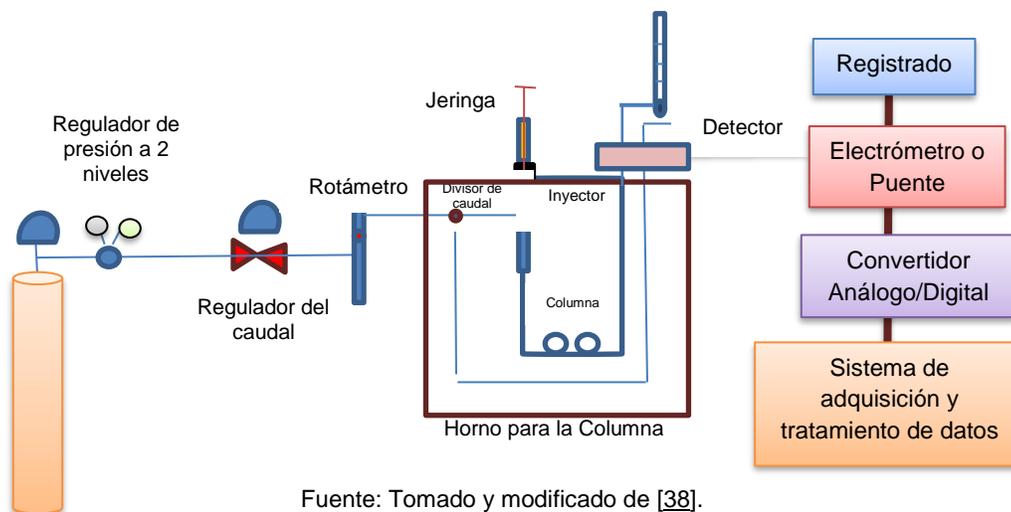
El sistema de detección debe cumplir con ciertas características para obtener buenos resultados: tener una buena sensibilidad ( $10^{-15}$  a  $10^{-8}$  g de soluto/s), buena

estabilidad y reproducibilidad, respuesta lineal para los solutos que se extienden a varios órdenes de magnitud, intervalos de temperatura que va desde la temperatura ambiente hasta los 400°C, tiempo de respuesta corto, alta fiabilidad y manejo sencillo [38].

6.4.2.2.1 Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS): es un enfoque de primera elección para la medición de pequeñas moléculas de metabolitos y en particular, de los metabolitos primarios, tales como ácidos orgánicos y aminoácidos en entornos clínicos [38].

En esta técnica, la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de un gas inerte; dicha fase no interactúa con las moléculas del analito, sólo lo transporta a través de la columna (Figura 11). [38].

Figura 11. Componente de un Cromatógrafo de Gases



Fuente: Tomado y modificado de [38].

La eficacia de la columna capilar requiere que la muestra sea de un tamaño adecuado y que sea introducida de tal manera que se forme un “tapón” de vapor; para esto se emplea una micro-jeringa para inyectar la muestra líquida a través de una septa de goma de silicona, en una cámara de vaporización instantánea situada en la cabeza de la columna. Es importante que la columna se encuentre bajo una temperatura controlada. La temperatura óptima va a depender del punto de ebullición de la muestra y del grado de separación requerido [38]. Esta preferencia se debe a las importantes ventajas que ofrece la GC-MS, tales como la existencia de bibliotecas espectrales comerciales, el potencial para la comparación directa y el intercambio de los resultados entre laboratorios, y la experiencia acumulada en el

campo. Sin embargo, un problema en este tipo de cromatografía, es la necesidad de derivatización para numerosos analitos que incluyen ácidos orgánicos [38].

6.4.3 Espectroscopia por Resonancia Magnética Nuclear Protónica ( $^1\text{H-NMR}$ ): Puede ser considerada como un método rápido y reproducible en la investigación metabolómica. Esta técnica se basa en la medida de la absorción de la radiación electromagnética en la región de las radiofrecuencias aproximadamente de 4 a 900 MHz. En el proceso de absorción están implicados los núcleos de los átomos en lugar de los electrones exteriores. Además, es necesario colocar el analito en un campo magnético intenso, con el fin de que aparezcan los estados de energía de los núcleos que hagan posible la absorción (Figura 12). Estos conceptos fueron posibles gracias a los trabajos desarrollados por Bloch en Stanford y Purcell en Harvard en 1946 [18, 20].

Debido a la abundancia del hidrógeno ( $^1\text{H}$ ) en las moléculas de importancia biológica, la mayoría de las técnicas y equipos están diseñados para utilizar su núcleo. Este perfil es caracterizado por tres parámetros importantes para el análisis de fluidos biológicos [38]:

(i) *Desplazamiento químico (posición de resonancia)*: Es específico para cada molécula y permite su identificación aun en presencia de moléculas con estructuras químicas similares. Dicho desplazamiento varía en función del entorno químico en que se encuentra cada  $^1\text{H}$ , de manera que la posición en el espectro no es aleatoria [38].

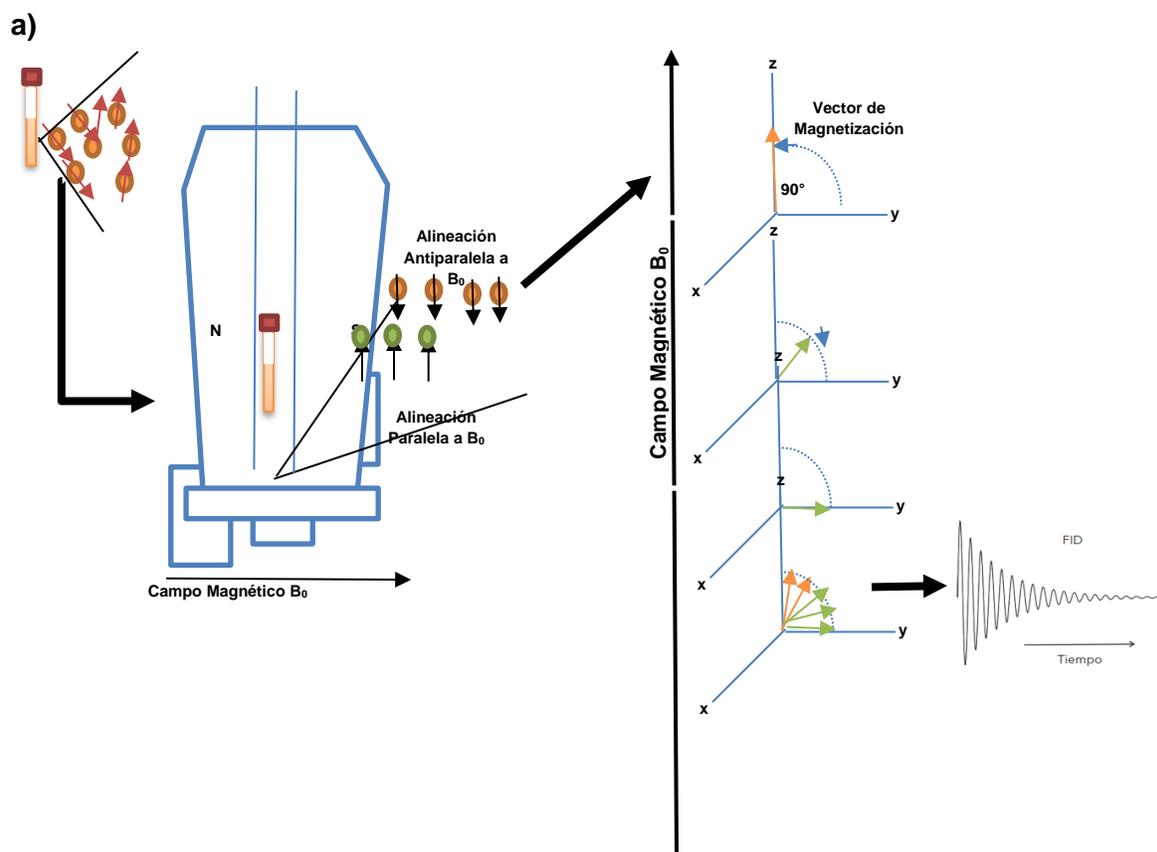
(ii) *Acoplamiento spin-spin*: el cual produce que las señales de uno o más protones equivalentes sean divididos en uno o más componentes (dobles, tripletes, etc.) [38].

(iii) *Intensidad de la señal*: El área de cada pico en el espectro es proporcional al número de protones que está contribuyendo a esa señal, por lo que los valores de la intensidad de las señales pueden emplearse con fines cuantitativos [38]. Es importante resaltar que las unidades de desplazamiento químico (expresadas en partes por millón  $-ppm-$ ), equivalen a  $10^6$  veces la relación entre la separación de las señales y la frecuencia del campo magnético externo, expresadas en Hz [41].

$$\delta(ppm) = \frac{\text{Desplazamiento en Hz}}{\text{Frecuencia de Resonancia en MHz}}$$

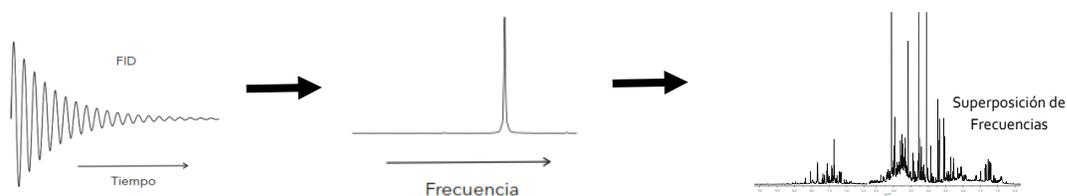
6.4.3.1 Adquisición de los Espectros. La aplicación de la  $^1\text{H}$ -NMR está condicionada por el hecho que en todos los experimentos basados en la detección del protón  $^1\text{H}$  realizados sobre biofluidos, se intenta caracterizar moléculas que se encuentran a bajas concentraciones (micromolar) sobre un fondo de protones de la molécula de agua que se encuentran a una concentración de 110M. Por otro lado, los espectros de  $^1\text{H}$ -NMR de muestras biológicas suelen presentar señales anchas correspondientes a moléculas de mayor peso molecular, fundamentalmente lipoproteínas y proteínas, que se solapan con señales de otros metabolitos de menor peso molecular, dificultando así su detección y cuantificación. En general, las secuencias de pulsos generalmente empleadas en los experimentos de metabolómica van encaminadas a superar estos dos aspectos [36, 41].

**Figura 12. Esquema de Adquisición de un Espectro. (a).** Al irradiar la muestra con un pulso de radiofrecuencia ( $\text{RF}=90^\circ$ ), el protón (H) que se encuentra en el estado de energía más bajo sufre una transición y pasa al estado de energía más alto absorbiendo un fotón cuya energía es precisamente la diferencia de energía entre los dos estados ( $\Delta E$ ). Cuando RF cesa, la vuelta al equilibrio (relajación) se produce a través de la emisión del exceso de energía en forma de onda de RF llamada FID (*Free Induction Decay*).



**Continuación Figura 12. (b)** FID posteriormente es procesada matemáticamente y transformada en una función de frecuencias, mediante la Transformada de Fourier (TF), adquiriendo el aspecto de un espectro de  $^1\text{H-NMR}$ . Por tanto, un espectro de  $^1\text{H-NMR}$  está constituido por la superposición de las frecuencias de todos los  $^1\text{H}$  presentes en la muestra.

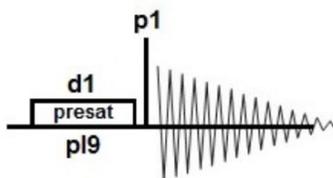
**b)**



Fuente: Tomado y modificado de [35].

Las dos secuencias de pulso que se emplean con frecuencia en estos experimentos son GCPPR y NOESYPR1D, (denominación Bruker). Estas secuencias suprimen la señal del agua por la aplicación de un pulso de baja potencia en la frecuencia de los hidrógenos del agua durante el tiempo de espera ( $d1$ ). Después del tiempo de espera dos pulsos cortos de  $90^\circ$  ( $\sim 10 \mu\text{s}$ ) conectados en serie se aplican en la frecuencia de resonancia de los hidrógenos, transfiriendo la magnetización inicial del eje  $z$  positivo al eje  $z$  negativo. Para reducir las interferencias de la señal del solvente, la pre-saturación en la frecuencia de resonancia del agua se realiza durante todo el tiempo de mezcla ( $d8$ ). Un pulso final de  $90^\circ$  se aplica para que la magnetización sea transferida al plano  $xy$  y la señal sea medida. La secuencia de pulso ZGCPPR difiere de la secuencia de pulso ZGPR (Figura 13), en que en lugar de un sólo pulso, presenta una serie de pulsos de  $90^\circ$ , todos con la misma duración, pero aplicada a con fases diferentes [42].

**Figura 13. Secuencia de Pulso ZGPR**



Fuente: Tomado y modificado de [42].

Esto resulta en el mismo ángulo de rotación, pero con mayor tolerancia a errores causados por falta de homogeneidad del campo magnético generado por el pulso de radiofrecuencia o precisión en la frecuencia de resonancia. Al final, una señal residual de agua bastante fina permanecerá y las sustancias con desplazamientos químicos en sus vecindades pueden ser observarse mejor [42].

La secuencia de pulsos NOESY (*Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*); detecta compuestos de alto y bajo peso molecular, dando lugar a espectros, generalmente complejos y proporciona una buena supresión del disolvente, además de una línea base correcta, obteniéndose espectros de alta calidad [35].

Normalmente, para cada muestra incluida en el estudio, se adquiere un conjunto de experimentos de  $^1\text{H-NMR}$  en una dimensión (previa optimización de los parámetros de adquisición del espectro y parámetros del experimento. Tablas 2 y 3), los cuales son empleados especialmente en el diagnóstico de enfermedades [41].

**Tabla 2. Parámetros a tener en cuenta en el momento de Adquisición de Espectros**

Sintonía de la Sonda (Wobb)	Se ajustan los circuitos de la sonda con el fin de detectar la frecuencia a la que ésta es más sensible.
Temperatura	Depende del tipo de muestra
Fijación o Estabilidad del Campo Magnético (Lock)	Se irradia continuamente un núcleo de referencia ( $\text{D}_2$ ) y se sigue su respuesta a una frecuencia que corresponde a su máximo de resonancia a la intensidad del campo aplicada del imán; esto, con el fin de mantener constante el campo magnético durante todo el experimento.
Compensación (Shimming)	Se realiza en las bobinas de compensación del instrumento; a través de ella pasa cuidadosamente corriente controlada que produce pequeños campos magnéticos que compensa la heterogeneidad del campo magnético principal. Se debe realizar cada vez que se introduce una muestra con el fin de conseguir una mejor resolución espectral.
Sistema de recepción de la señal	Se ajusta la ganancia del receptor (RG) en función del tipo de muestra para optimizar la amplificación de la señal recibida.

Fuente: Tomado y modificado de [35, 38].

La pequeña anchura espectral de la espectroscopia de  $^1\text{H-NMR}$  de protón significa que la mayoría de las resonancias de los metabolitos detectados se encuentran hacinados dentro de un estrecho rango de desplazamiento químico y son por lo general de superposición, lo que lleva a la incertidumbre en asignaciones de señales de  $^1\text{H-NMR}$  para diferentes metabolito [36, 41].

6.4.3.1.1 Asignación de las Señales del Espectro. La identificación de las señales de  $^1\text{H-NMR}$  es una de las partes más complicadas de estos estudios. La asignación de los picos del espectro se fundamenta, generalmente, en la posición de las señales, su multiplicidad e intensidad relativa. La dificultad en la identificación de los

compuestos deriva del solapamiento de las señales como consecuencia de la proximidad entre los desplazamientos químicos de las múltiples moléculas presentes en los espectros [35].

**Tabla 3. Parámetros del Experimento.** Son específicos de cada tipo de experimento y se adecúan en función del tipo de muestra y la información que se quiera obtener.

Time Domain (TD)	Nº de puntos digitalizados para la adquisición de la FID. Normalmente: 16, 32 o 64K. A mayor TD, aumenta la resolución de la FID, pero a expensas del tiempo de adquisición.
Número de Scans (NS)	Nº de acumulaciones. A mayor número de adquisiciones mejora la relación señal/ruido.
Numero de Dummy Scans (DS)	Tiempo necesario para que la muestra alcance el equilibrio. No se adquieren datos.
Anchura Espectral (SW)	Normalmente 20 ppm son suficientes para capturar cualquier señal del <sup>1</sup> H.
Pulso 1	Pulso de excitación de 90°. Su valor va a depender de la concentración de sales de la muestra. Pulsos demasiado largos pueden causar el calentamiento de la sonda.

Fuente: Tomado y modificado de [35, 38].

La asignación de los metabolitos puede ser confirmada utilizando varias estrategias. Una de las más utilizadas es la comparación con patrones de compuestos seleccionados cuyos espectros han sido adquiridos en las mismas condiciones experimentales (pH, temperatura, etc.) [35].

6.4.4 Pre-Procesado de los Datos. Una vez adquiridos los experimentos de <sup>1</sup>H-NMR, se realiza un pre-procesado de los datos que permita obtener una representación interpretable de los datos [38]. Este procesado incluye:

- i) La transformada de *Fourier*,
- ii) La corrección de la fase y la línea base del espectro,
- iii) La calibración de los valores de desplazamiento químico respecto a una señal de referencia para conseguir un alineamiento adecuado de los espectros de las distintas muestras, corrigiendo así posibles variaciones debidas a ligeras modificaciones del pH, fuerza iónica, etc., entre muestras [38].

En la actualidad, es posible realizar todas estas transformaciones de forma semi-automática. El objetivo final de esta etapa es transformar los datos obtenidos mediante la adquisición de los espectros de <sup>1</sup>H-NMR en información interpretable estadísticamente. Este proceso facilitará el análisis posterior y hará que éste sea más fiable [41].

El pre-procesado de los datos continúa con la exclusión de regiones espectrales con información que no es reproducible entre muestras o que no corresponde a

señales de metabolitos. La región espectral que se incluye normalmente en los estudios de  $^1\text{H-NMR}$ , es la que abarca desde 0.15 a 10 ppm. Dentro de esta ventana espectral, se excluye la región correspondiente a la señal del agua (4.6 - 4.9 ppm, aproximadamente) con el fin de poder observar los metabolitos que están presentes en bajas concentraciones [43] o, en el caso de extractos orgánicos, cualquier otro disolvente que se haya utilizado en la preparación de la muestra. Otra señal que suele eliminarse es la correspondiente a la urea (entre 5.4 – 6.0 ppm, aproximadamente), muy aparente en los espectros de orina, ya que se trata de una señal que no puede ser cuantificada con exactitud al encontrarse sus protones en continuo intercambio con el agua, por lo que su inclusión en el análisis estadístico podría introducir cierta variabilidad, no necesariamente significativa, entre muestras [41].

La normalización de datos es un paso crítico en cualquier análisis estadístico para permitir comparaciones objetivas de muestras dentro del conjunto de datos. Al normalizar los espectros, se pueden eliminar errores sistemáticos introducidos por dichos efectos. La forma más común de la normalización es establecer la intensidad integral total de cada espectro con el mismo valor (por lo general la superficie total de espectros). Sin embargo, se ha demostrado que la integral de normalización para todos los picos podría tener inconvenientes que pueden influir en el análisis de datos multivariante, especialmente en muestras que contienen grandes cantidades de una sola sustancia o concentraciones particularmente altas de metabolitos de drogas. La escala de la mayoría de los metabolitos abundantes supera la escala de todos los otros metabolitos de tal manera que las contribuciones de los metabolitos de baja intensidad que podrían ser de importancia biológica se tienen en cuenta [36].

Una vez terminado el pre-procesado de los espectros, se procede a la asignación de las señales más representativas identificadas en los espectros de  $^1\text{H-NMR}$ . Para ello, partiendo de los desplazamientos químicos obtenidos en los experimentos 1D y 2D, se emplean bases de datos de acceso público con datos disponibles para miles de metabolitos identificados, o potencialmente identificables, en muestras biológicas. Las bases de datos más utilizadas en metabolómica son la *Human Metabolome Database* (HMDB) y *Biological Magnetic Resonance Data Bank* (BMRB) [41, 44, 45].

6.4.5 Análisis Estadístico de Espectros por  $^1\text{H-NMR}$ . Dada la naturaleza multifactorial de los espectros de RMN, es importante llevar a cabo el análisis estadístico en los conjuntos de datos metabólicos. Para garantizar la solidez del conjunto de datos, se debe reducir el efecto de las variaciones mediante la realización del Análisis de Componentes Principales (PCA) [41].

6.4.5.1 Análisis de Componentes Principales: El análisis de los PCA es un método no supervisado, es decir, no requiere conocimiento previo de las muestras, lo que resulta de gran utilidad para la identificación de patrones y/o tendencias dentro de los grupos de muestras. Consiste en la reducción de la dimensionalidad de los datos de manera que las múltiples variaciones quedan agrupadas en distintos componentes (primero, segundo, etc.), de acuerdo a su importancia en la interpretación de la variable observada. Como resultado de este análisis, los datos extraídos de una matriz ( $X$ ) con  $k$ -dimensiones, donde  $k$  corresponde al número de variables, son reducidos a un espacio definido por unos pocos componentes principales (PCs), capaces de explicar la mayor variabilidad entre las muestras ( $n$ ) [41].

Una particularidad de este método es que los PCs son ortogonales entre ellos, de manera que la representación gráfica de los datos en el espacio bidimensional definido por los dos primeros PCs ( $t_1$  y  $t_2$ ) proporciona una proyección de los datos multidimensionales conocido como gráfico de puntuaciones de las muestras en función de los componentes principales (*score plot*), en el que pueden apreciarse las agrupaciones y tendencias entre las muestras ( $n$ ). De manera análoga, en el gráfico de las puntuaciones de las variables en función de los componentes principales (*loading plot*),  $p_1$  y  $p_2$  definen la relación entre las  $k$  variables que integran la matriz de datos original ( $X$ ) con las mismas direcciones que las del *score plot*, lo que permite identificar fácilmente, de forma gráfica, cuáles son las variables responsables de las tendencias observadas entre las distintas muestras [41].

El PCA es el método de elección para obtener una visión global de la variabilidad entre muestras, y su correspondiente *score plot* es el gráfico generalmente utilizado para la identificación de posibles tendencias o agrupaciones que se den dentro de los grupos de muestras y que sean debidas a otras variables, distintas de la variable de estudio (p. ej., edad, sexo, estilo de vida, etc.). Este tipo de análisis es también de gran utilidad para la identificación de *outliers*, muestras que se desvían significativamente del perfil que muestran, de forma global, el resto de muestras incluidas dentro de los grupos del estudio [41], debido a que la matriz proyectada refleja la varianza y la covarianza de los datos.

6.4.5.2 Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados con Corrección Ortogonal (PLS-DA) y su modificación con corrección ortogonal (OPLS-DA): utilizan el conocimiento previo que se tiene de las muestras para construir modelos estadísticos robustos que permitan, posteriormente, predecir la clase a la que pertenece una muestra sin necesidad de estar previamente clasificada. Se trata de métodos de regresión iterativa que modelan la relación existente entre un grupo de variables independientes y una variable dependiente. En estos modelos, se maximiza la covarianza entre dos grupos de muestras, buscando explicar la separación entre ellos a través de un número definido de variables latentes. La representación gráfica de estos modelos, de manera similar al PCA, revela el grado de discriminación entre los grupos [41].

## **6.5 CONDICIONES PARA LA TOMA Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS DE ORINA PARA PROCESOS METABOLÓMICOS**

Las concentraciones de metabolitos se ven afectadas por una variedad de factores incluyendo la dieta, la administración de fármacos, la actividad física, el estado emocional, los factores de estrés ambiental y el estado de salud. Por lo tanto, hay muchas causas que influyen en las concentraciones metabólicas. Para evitar falsas conclusiones, los estudios de metabolómica deben llevarse a cabo bajo condiciones bien controladas con el fin de evitar los efectos de las interacciones no deseadas con el entorno circundante. A diferencia de las condiciones experimentales bien controladas en animales, líneas celulares, plantas o estudios basados en bacterias, los estudios en humanos son rutinariamente afectados por una amplia variedad de estímulos externos que son difíciles de controlar. Por lo tanto, es importante establecer condiciones para la obtención de una buena muestra [36].

Se debe establecer un grupo control que comparta con los pacientes a estudiar, un estilo de vida, dieta, condiciones geográficas y ambientales similares, para limitar el efecto de la variación de los factores de confusión [36].

Para las muestras de orina se deben almacenar por debajo de  $-25^{\circ}\text{C}$ , si se van a almacenar por un tiempo máximo de 26 semanas, si las muestras se guardan por un tiempo mayor a este, la temperatura ideal para su almacenamiento es  $-80^{\circ}\text{C}$ , con el fin de evitar cambios espectrales. Cuando las muestras almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , se van a procesar, deben ser descongeladas a temperatura ambiente gradualmente en hielo o en un baño de agua fría para reducir los efectos de la degradación de la muestra. No es recomendable almacenar las muestras a  $4^{\circ}\text{C}$  sin la adición de ningún conservante pues se puede formar acetato por contaminación microbiana.

Como medida de precaución adicional, se recomienda el uso de filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  para separar las bacterias de la orina inmediatamente después de la recogida de la muestra o la adición de azida de sodio (0,01 a 0,1%) como conservante. También es importante que se utilice tipos idénticos de tubos colectores, así como el mismo tipo de contenedor para el almacenamiento de las muestras [36].

Debido a que el desplazamiento químico de algunas sustancias por RMN es altamente dependientes de pH, es importante fijar el pH de todas las muestras antes de las mediciones por RMN. Se ha encontrado que la liofilización de la orina seguida por disolución de la muestra en  $\text{D}_2\text{O}$  a pH 7,4 conduce a la desaparición de la señal de creatinina  $-\text{CH}_2-$  a 4,06 ppm debido al intercambio de deuteración [36].

El tampón fosfato se usa comúnmente para el análisis de RMN para mantener un pH fijo; para las muestras de orina, un buffer de 0,3M es adecuado para las concentraciones normales, aunque puede ser necesario concentraciones de 1M para las muestras de orina muy concentradas. Sin embargo, este tampón puede causar problemas en el análisis posterior por otras técnicas, por ejemplo, derivatización con MSTFA utilizada comúnmente con GC-MS. Para evitar diferencias de desplazamiento químico instrumentales entre los diferentes espectros de RMN, es crucial añadir una sustancia de referencia como un estándar de calibración. La más usada en disolventes orgánicos tales como cloroformo, es tetrametilsilano (TMS), mientras que el ácido 4,4-dimetil-4-silapentano-1-sulfónico (DSS) o su sal de sodio y el ácido 3-trimetilsilil propiónico (TSP) se utilizan con mayor frecuencia para los metabolitos solubles en agua [36].

## 7 MATERIALES Y METODOS

### 7.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

7.1.1 Muestras Individuos Sanos: Se recolectaron muestras de individuos sanos entre los 0 meses y 3 años de Edad. Dentro de este grupo de muestras hubo dos subgrupos de muestras que fueron empleadas para realizar dos trabajos previos titulados: “Análisis del Perfil de Excreción de Ácidos Orgánicos de Cadena Corta y Media en Neonatos que Reciben Formulas Infantiles” y “Análisis de las Variaciones en el Perfil de Excreción de Ácidos Orgánicos de Cadena Corta y Media en Población Lactante Menor” [46, 47]. Los grupos fueron clasificados según las edades de la siguiente manera: el primero comprendía edades entre los 0 a 4 meses y el segundo comprendía edades entre los 5 a 12 meses.

7.1.1.1 Criterios de Inclusión: Se incluyeron muestras de orina de niños sanos nacidos prematuramente o a término, que tuvieran alimentación a base de leche materna, leche de fórmula y alimentación complementaria a base de alimentos sólidos y semisólidos, cuyos padres o acudiente hayan aceptado la participación en el estudio del menor, mediante consentimiento informado.

7.1.1.2 Exclusión de Muestras: No se tuvieron en cuenta muestras que tuvieran: patología o diagnóstico sintomático, tratamiento con medicamentos, historia familiar de muertes en el periodo neonatal, madres con historia de abortos anteriores e historia familiar de acidemias orgánicas y/o Muestras que no contaran con autorización y aceptación escrita para participar en el estudio (Anexo1 y 2).

A todos los padres y/o acudientes de los individuos sanos menores de edad, se les realizó una entrevista previa a la toma de muestra, para la recolección de datos sobre la dieta que recibían.

## 7.2 Recolección de las Muestras de Orina

Para este estudio se trabajó un total de 56 muestras, sin embargo, no fue posible obtener espectros con señales definidas para 3 muestras con diagnóstico bioquímico presuntivo de EIM, por lo que se analizaron finalmente 53 espectros que incluían 36 muestras control y 17 con diagnóstico bioquímico presuntivo de EIM, las muestras fueron procesadas en un resonador de 400MHz.

Todas las muestras de individuos sanos, contaban con registro del consentimiento informado, aprobación escrita de recolección voluntaria de muestras y encuesta nutricional con el fin de conocer el tipo de alimento recibido (anexos 1, 2 y 3); Las edades de los controles estaban entre 0 y 3 años.

Las muestras con diagnóstico bioquímico presuntivo de EIM fueron obtenidas del banco de muestras del Instituto de Errores Innatos del Metabolismo y correspondían a muestras de pacientes diagnosticados y en seguimiento.

7.2.1 Almacenamiento de las Muestras: Las muestras con diagnóstico bioquímico presuntivo de EIM se encontraban almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , sin preservantes con tiempo mayor a 1 año. las muestras empleadas como controles fueron almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 6 meses. Adicionalmente se realizó medición de creatinuria a todas las muestras. Cada una de las muestras fue caracterizada con un código de identificación con sus respectivos datos (Anexo 4).

### 7.3 Procesamiento de Muestras por GC-MS:

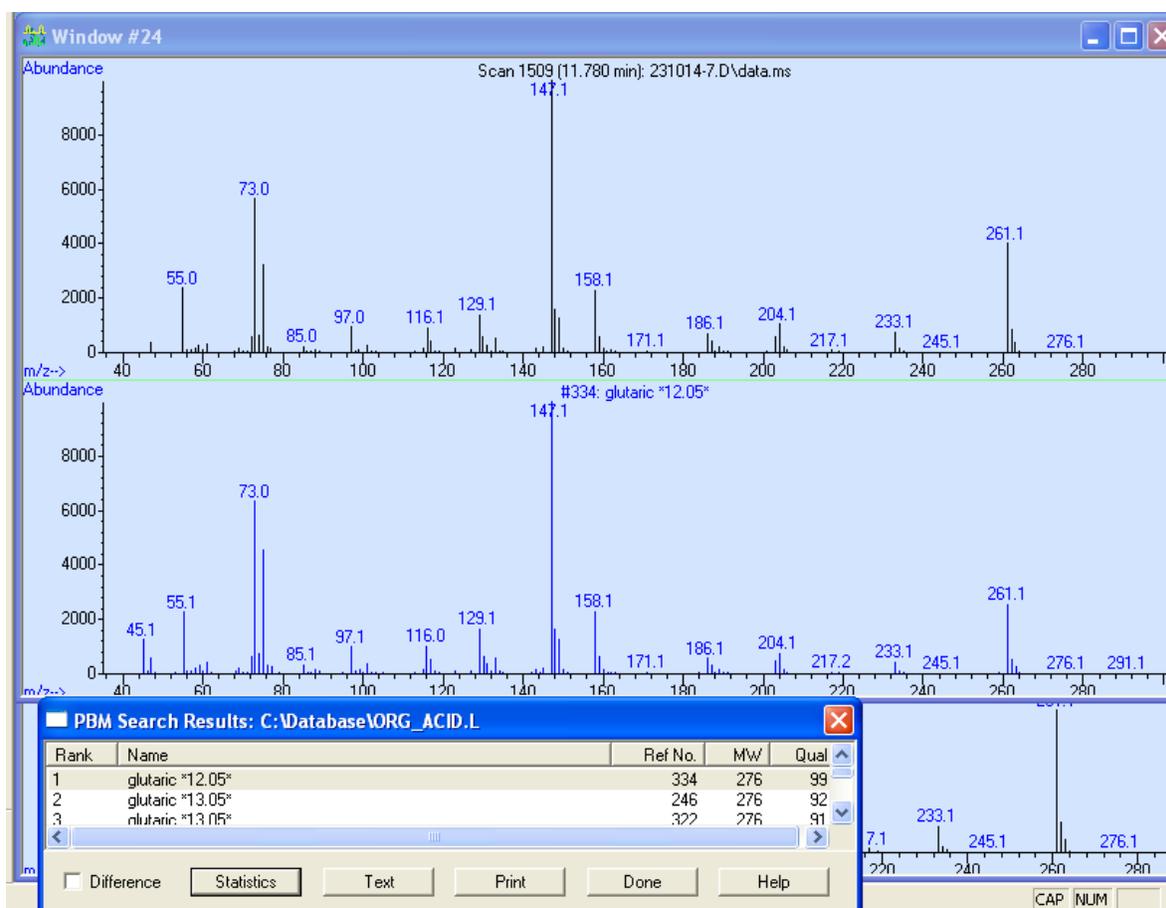
7.3.1 Extracción de Ácidos orgánicos por GC-MS. Se tomaron 2mL de orina de cada una de las muestras y se depositaron en un tubo cónico de 15mL (tubo 1), al que previamente se adicionaron 4g de cloruro de sodio, 100µL de ácido clorhídrico 6N y 100µL de estándar interno (2-Fenilbutírico). Posteriormente se adicionaron 2mL de acetato de etilo y se mezclaron en vortex por 3 minutos; luego se centrifugaron a 3500rpm durante 3 minutos. Pasado este tiempo se pasó la primera fase que contenía los ácidos orgánicos de cadena corta y se colocaron en un tubo cónico de 15mL que contenía 4g de sulfato de sodio (tubo 2). Al tubo 1 se le adicionaron 2ml de éter etílico; y se mezcló en vortex por 3 minutos, se llevó a centrifugar a 3500rpm durante 3 minutos. Pasado este tiempo se pasó la fase que contiene los ácidos orgánicos de cadena media y se depositó en el tubo 2. Una vez extraídas las dos fases en el tubo 2, se mezcló en vortex 1 minuto, y se centrifugó a 3500rpm durante 3 minutos. El sobrenadante obtenido se pasó a un tubo cónico de 15 mL (tubo 3) y se llevó a secar en baño seco a 37°C con ayuda de gas nitrógeno. Una vez evaporados los solventes orgánicos, se adicionaron 60µL del derivatizante bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) al tubo 3 y éste fue llevado a baño serológico a 80°C durante 20 minutos [48, 49].

7.3.2 Separación de Ácidos Orgánicos: Una vez se acondicionó el cromatógrafo de gases Hewlett Packard (Agilent) modelo 6890 Plus a una temperatura de 80°C, se realizó una inyección manual, tomando 0.6µL de muestra con aguja de inyección y colocándolos en el puerto de inyección, una vez colocada la muestra, ésta migró a través de la fase estacionaria compuesta de Polimetilxiloxano, que se encontraba fijada en una columna capilar HP-5 de sílice fundida (30 m, 0,25 mm de diámetro interior, 0,25 µm de espesor del líquido interno en la columna ) , donde se utilizó una rampa de temperatura que inició en 80°C y terminó en 280°C cada 5 minutos. Para que los metabolitos pasaran por la fase estacionaria, se empleó Helio como fase móvil. Una vez las moléculas atravesaron la fase estacionaria, éstas fueron separadas dentro del espectrómetro de masas Hewlett Packard (Agilent), modelo 5973 donde se ionizaron, por medio de impacto electrónico (este tipo de ionización se encarga de cargar las moléculas específicamente). Una vez cargadas, las moléculas fueron atraídas por un campo magnético formado por un cuádruplo que estaba cargado con 150 Mes. Esta atracción se da en función de la masa y la carga de la molécula. Todo el proceso de CG-MS, duró aproximadamente 35 minutos. Este proceso se repitió para cada una de las muestras [49].

7.3.3 Identificación de Ácidos Orgánicos: Se obtuvo un cromatograma para cada una de las muestras; cada cromatograma contenía determinadas señales, que correspondían a determinados metabolitos. Cada señal fue comparada contra las

diferentes librerías (Biblioteca de espectros de masas del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología para metabolitos químicos (NIST98), ORGACIDS.L y ORGA\_CIDS.L), que contenía el software del equipo (ChemStation GC / MSD), teniendo en cuenta el tiempo de retención y la abundancia relativa de cada metabolito. En señales demasiado anchas, como el caso del Ácido Láctico, Ácido Glutámico, Isovalerilglicina, Ácido 3-Hidroxi-butírico, Ácido 4-Hidroxi-fenil-láctico se realizó además de la lectura contra librería (Figura 14), la comparación del espectro de masas descrito en el libro “Organic Acid in Man”[48], con el fin de evitar la coelución con otros compuestos.

Figura 14. Espectro de masas del Ácido Glutámico comparado contra librería.



Todos los picos de artefactos conocidos, como los picos debido a la sangría de la columna y los picos del artefacto de BSTFA, no fueron considerados en la lectura cualitativa.

Estas librerías están diseñadas para comparar el espectro de masas del metabolito de interés con el espectro de masas específico puro de cada uno de los metabolitos

que se pueden encontrar en la muestra de orina[46]. En el análisis cualitativo del perfil se tiene en cuenta tanto la presencia como la abundancia de los metabolitos excretados, dado que estos dos parámetros pueden ser indicativo de alguna patología [50].

7.4 Preparación de Muestras de Orina para Análisis de Resonancia Magnética Nuclear ( $^1\text{H-NMR}$ ): De cada una de las muestras de orina total se tomó un volumen de 1000  $\mu\text{L}$  que fue centrifugado por 10 minutos a 12.000 rpm para eliminar sedimento, una vez centrifugada la muestra se tomaron 540  $\mu\text{L}$ , los cuales fueron mezclados con 180  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato de potasio 1,5M a pH 7.0 [51, 52] (ajustado con KOH 15M). El estándar de referencia usado fue trimetilsililpropionato deuterado (TSP- $d_4$ ) 0.5Mm (el cual fue agregado al buffer fosfato). La mezcla se depositó en un tubo para  $^1\text{H-NMR}$  de 5mm de diámetro externo.

7.4.1 Obtención de los Espectros por  $^1\text{H-NMR}$ : 53 espectros fueron registrados en un equipo de  $^1\text{H-NMR}$  Bruker Avance operado a 400MHz (con una sonda de detección  $^1\text{H}$ : Sonda normal 5 mm BBO BB -1H/D Z-GRD Z8248/0031), perteneciente al Laboratorio de Resonancia Magnética de la Universidad Nacional de Colombia Los espectros fueron adquiridos a 296°K[53] utilizando una secuencia de pulso de presaturación NOESYPR1D para suprimir la señal de agua. Se realizaron 64 escaneos (NS), el tiempo de espera entre cada adquisición fue de 4 segundos (DS), el tiempo de adquisición fue de 3.41 segundos (AQ), la atenuación de pulso de presaturación fue de 52.18 dB (PL9) y el pulso de 12.30.

7.4.2 Pre-procesamiento de Espectros. Una vez obtenidos los espectros para cada una de las muestras, se realizó corrección manual de fase y línea base en el programa (Mestrelab Research SL) MESTRENOVA<sup>6</sup>® [54], se normalizaron los espectros por el estándar TSP y luego se excluyeron las señales de agua (para eliminar las imperfecciones que produce ésta sobre la línea base) y urea (no es fácilmente medible porque está en constante intercambio de protones con el agua) [55]. Estas señales se encontraban entre 4.4 ppm y 5.56 ppm. Se excluyeron las señales entre -0.1 ppm a 0.7 ppm y 9.0 ppm a 10.0 ppm porque estas zonas fueron consideradas ruido.

7.4.3 Alineamiento: Los conjuntos de datos espectrales de  $^1\text{H-NMR}$  fueron pre-procesados utilizando el algoritmo de alineación de señales iCOshift toolbox 3.1.1 (Desplazamiento de correlación de intervalos, que deriva su nombre del algoritmo coshift básico) [56] implementado para el software MATLAB® versión R2016b [57].

Este algoritmo alinea independientemente cada señal de  $^1\text{H-NMR}$  a un objetivo (que puede ser opcionalmente una señal real o sintética como la media o la mediana) al maximizar la correlación cruzada entre los intervalos definidos por el usuario [58].

7.5 Identificación Cualitativa de Compuestos: La identificación de cada uno de los metabolitos encontrados en los espectros normales así como los compuestos de las muestras con diagnóstico bioquímico presuntivo de EIM se realizaron comparando los desplazamientos químicos y la forma de señales, con las reportadas en las bases de datos HMDB [45], BMRB [59], y en la herramienta Resurrecting and Processing NMR Spectra On-line (NMRDB) [60], además de la información disponible en literatura [42, 52, 61-67].

Para los perfiles de Acidemia Orgánica y Aminoacidopatía, además de las herramientas antes mencionadas se utilizó el libro *“Handbook of  $^1\text{H-NMR}$  Spectroscopy in Inborn Errors of Metabolism”* de Udo Engelke [4]. Análisis Estadístico: Una vez alineados los espectros, se aplicó un pre-tratamiento consistente en Escalado de Pareto que utiliza la raíz cuadrada de la desviación estándar como el factor de escala con el fin de reducir la importancia relativa de los grandes valores, pero mantiene la estructura de datos parcialmente intacta y posteriormente se realizó una transformación logarítmica para corregir los datos cuando la varianza no es constante a lo largo de las observaciones; posteriormente se aplicó PCA en el programa PASW Statistics para Windows, versión 18.0. Chicago: SPSS Inc [68].

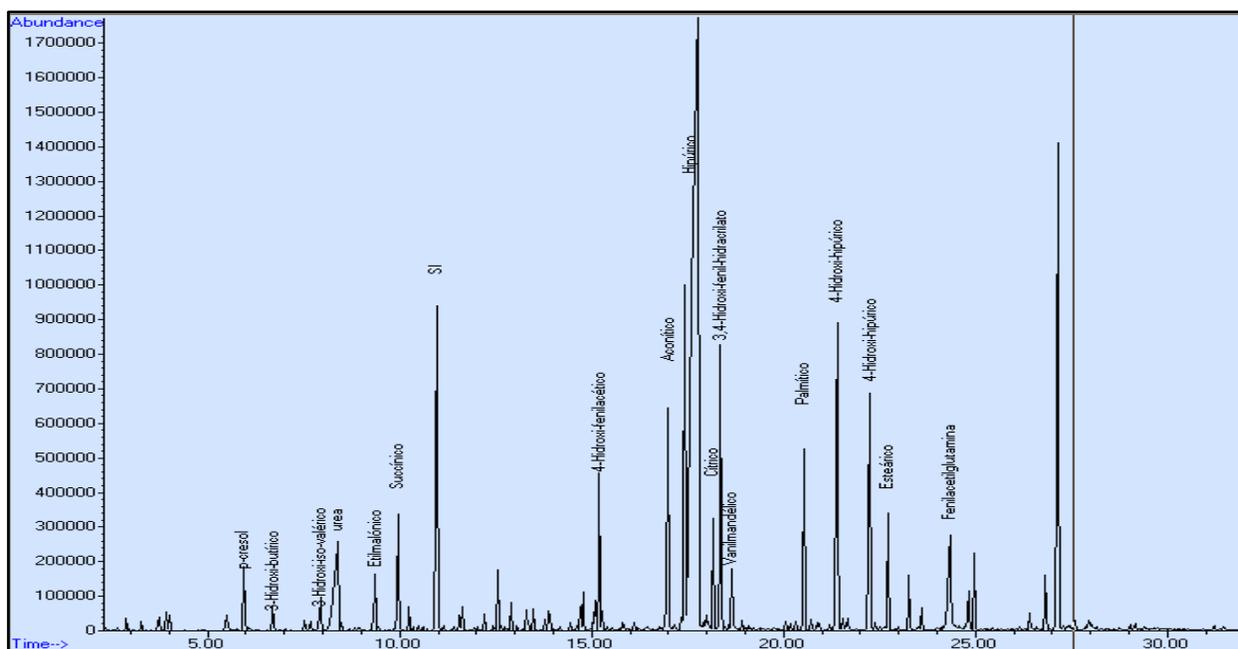
Posteriormente estos mismos espectros se analizaron en el software de Mnova (Mestrelab Research SL) MESTRENOVA<sup>10</sup>®[54], donde el número de puntos de datos espectrales se redujo segmentando los espectros en regiones consecutivas no superpuestas (bins) con intervalos regulares de 0,04 ppm de ancho. Las regiones obtenidas, se importaron posteriormente paquete de software SIMCA-P (Versión 14, Umetrics, Umea, Suecia) [69], para realizar PCA y OPLS-DA.

## 8 RESULTADOS

### 8.1 CROMATOGRAMAS OBTENIDOS POR GC-MS

A continuación, se relacionan los cromatogramas más representativos obtenidos de las muestras de orina con diagnóstico bioquímico presuntivo para EIM con sus respectivos metabolitos; también se presenta un cromatograma que representa el perfil de excreción normal de los controles con presencia de señales: p-Cresol, Ácido 3-Hidroxi-butírico, Ácido 3-Hidroxi-isovalérico, Urea, Ácido Succínico, Estándar Interno (SI), Ácido 4-Hidroxi-fenilacético, Ácido Aconítico, Ácido Hipúrico, Ácido 3,4-Hidroxi-fenilhidracrilato, Ácido Palmítico, Ácido 4-Hidroxi-hipúrico, Ácido Estearico y Fenilacetilglutamina. (Figura 15).

Figura 15. Cromatograma que Muestra un Perfil Urinario Normal. Edad: 36 Meses.

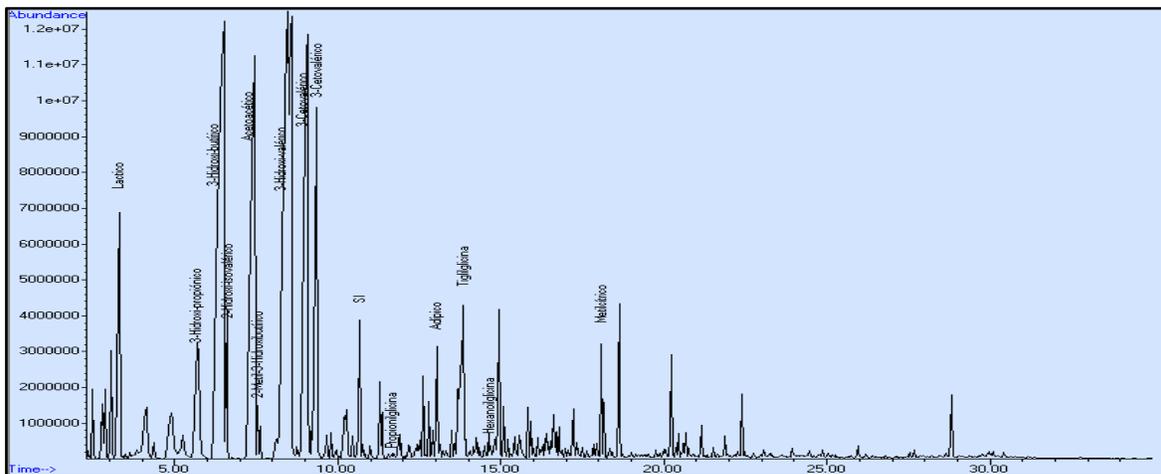


La sigla SI en las figuras, hace referencia al estándar interno utilizado.

## 8.1.1 Acidemias Orgánicas:

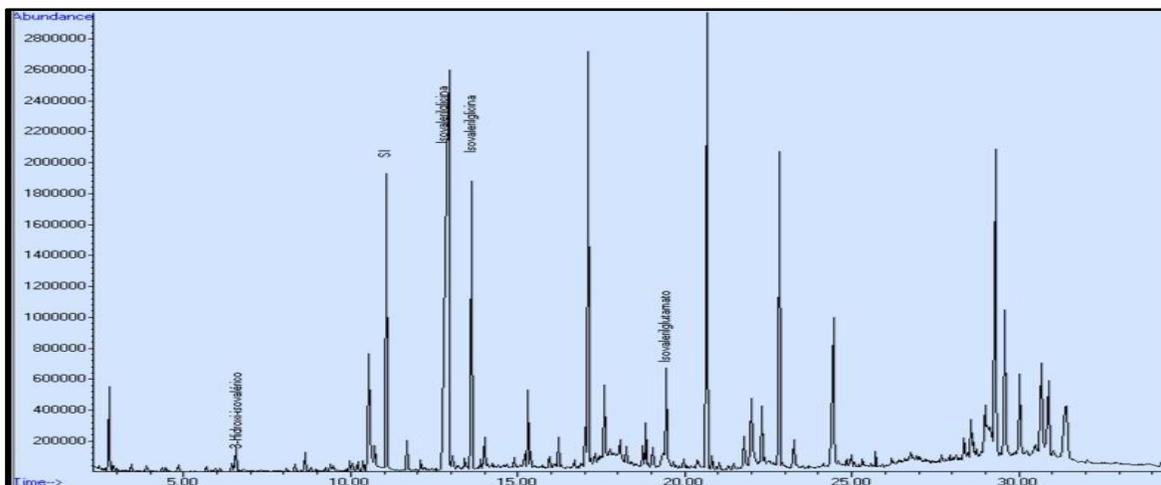
8.1.1.1 Acidemia Propiónica: Muy elevada excreción de Ácido Láctico, Ácido 3-Hidroxi-butírico, Ácido Acetoacético, Ácido 3-Cetovalérico, elevada excreción de Ácido 3-Hidroxi-propiónico, Ácido 2-Hidroxi-isovalérico, Ácido 2-Metil-3-Hidroxi-butírico, Ácido 3-Hidroxi-isovalérico, Tiglilglicina, Ácido Adípico, Hexanoilglicina y Ácido Metilcítrico (Figura 16).

Figura 16. Cromatograma con Diagnóstico Bioquímico Presuntivo de Acidemia Propiónica. Edad: 16 Días.



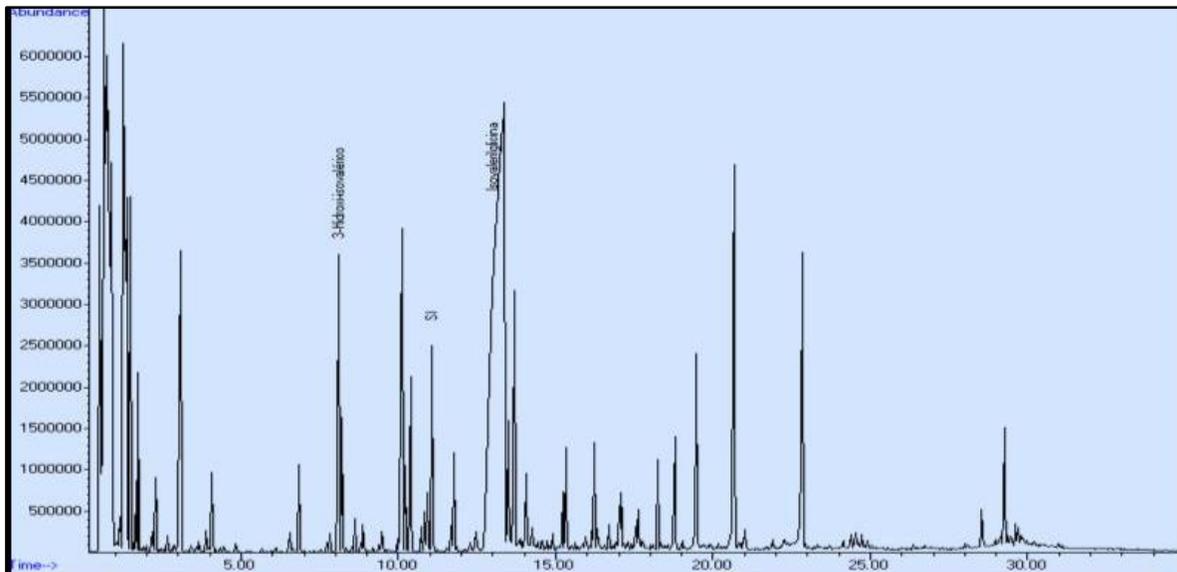
8.1.1.2 Acidemia Isovalérica: Elevada excreción de Isovalerilglicina y Ácido Isovalerilglutamato (Figura 17).

Figura 17. Cromatograma con Diagnóstico Bioquímico Presuntivo de Acidemia Isovalérica. Edad: 1 Mes.



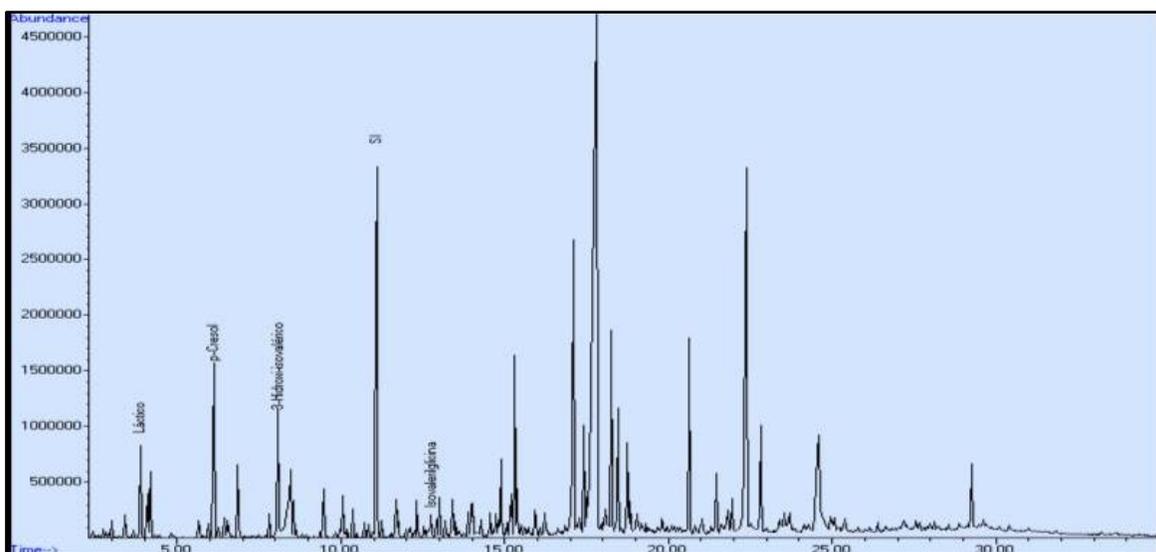
8.1.1.2.1 Acidemia Isovalérica en Estado Agudo: Elevada excreción de Isovalerilglicina y Ácido 3-Hidroxi-Isovalérico (Figura 18).

Figura 18. Cromatograma con Diagnóstico Bioquímico Presuntivo de Acidemia Isovalérica. Edad: 1 Mes.



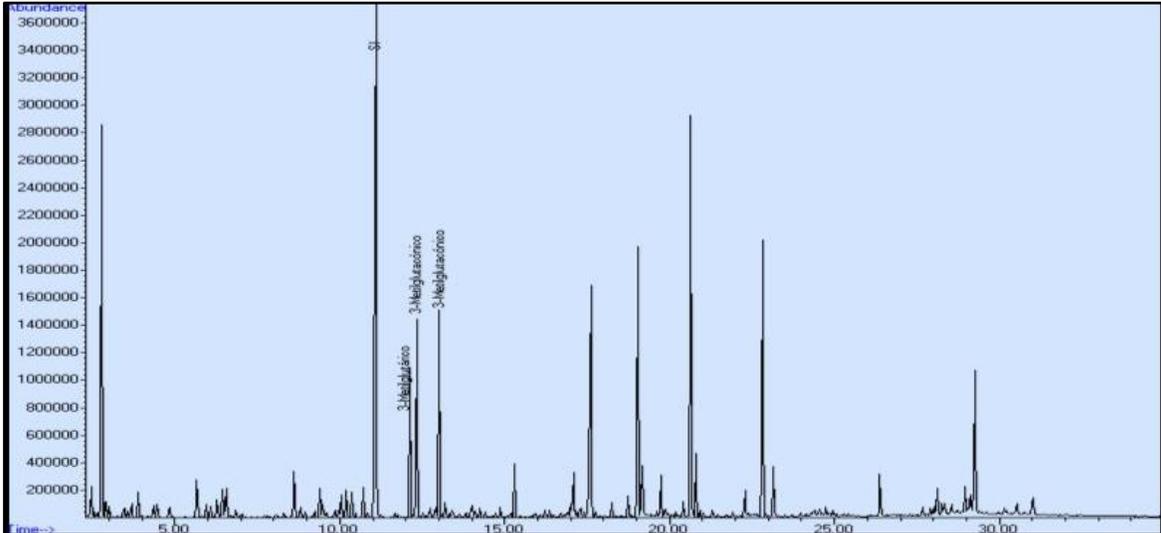
8.1.1.2.2 Acidemia Isovalérica en Tratamiento: Excreción de Ácido Láctico, Isovalerilglicina y Ácido 3-Hidroxi-Isovalérico (Figura 19).

Figura 19. Cromatograma con Diagnóstico Bioquímico Presuntivo de Acidemia Isovalérica. Edad: 168 Meses.



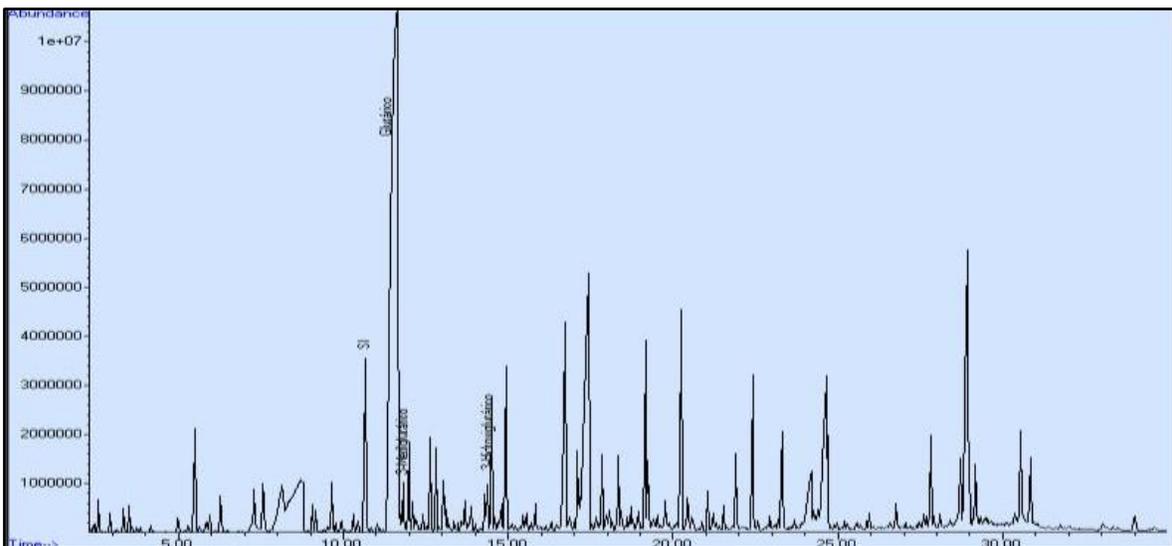
8.1.1.3 Acidemia 3-Metilglutacónica: Elevada excreción de Ácido 3-Metilglutacónico y Ácido 3-Metilglutárico (Figura 20).

Figura 20. Cromatograma con Diagnóstico Bioquímico Presuntivo de Acidemia 3-Metilglutacónica. Edad: 24 Días.



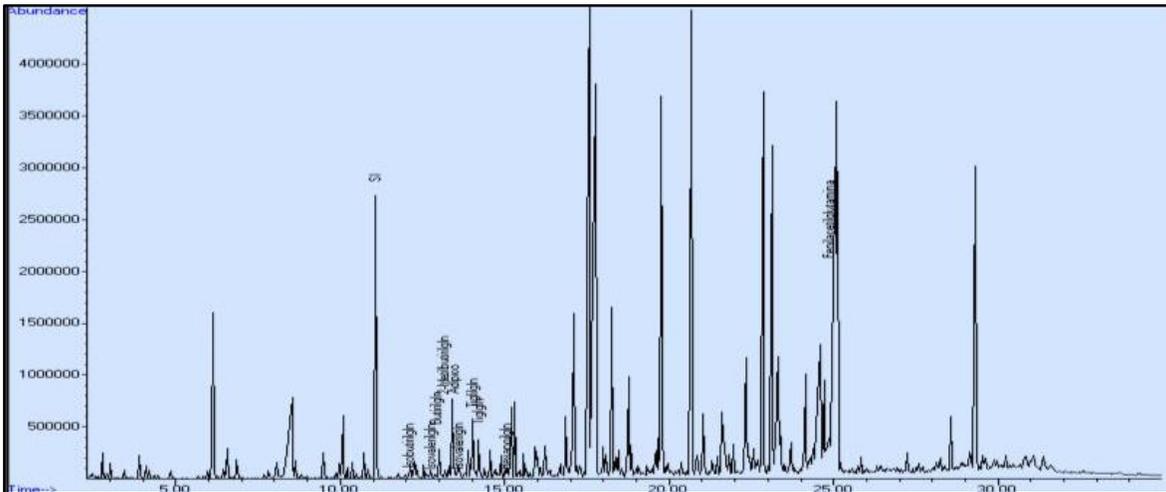
8.1.1.4 Acidemia Glutárica Tipo I: Elevada excreción de Ácido Glutámico, Ácido 3-Hidroxi-glutámico, Ácido 3-Metilglutámico, Ácido 3-Hidroxi-3-Metilglutámico (Figura 21).

Figura 21. Cromatograma con Diagnóstico Bioquímico Presuntivo de Acidemia Glutárica Tipo I. Edad: 36 Meses.



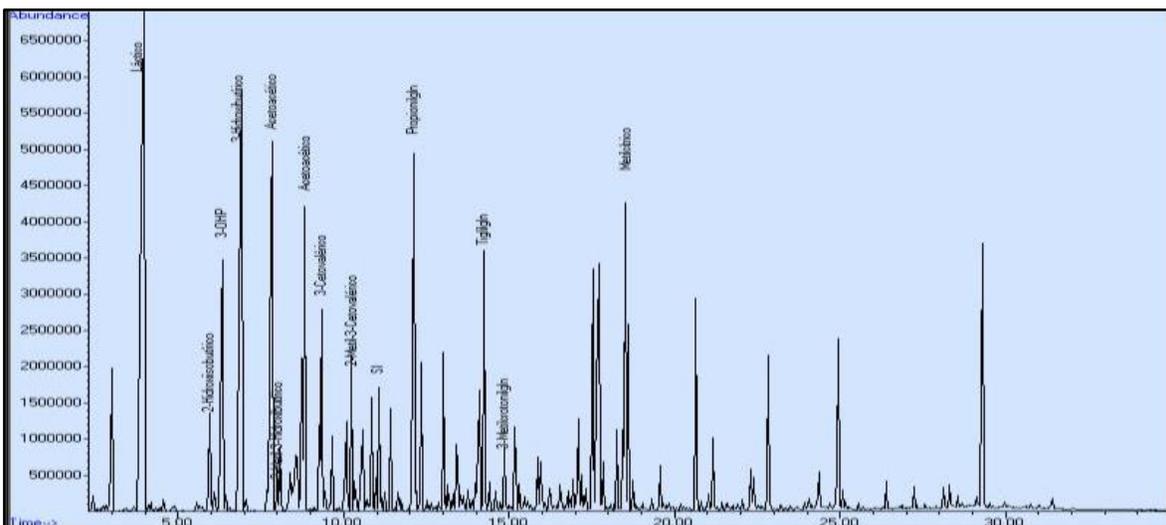
8.1.1.5 Deficiencia de Acil-Coenzima A Deshidrogenasa de Cadena Media: Se observó excreción de Isobutirilglicina, Isovalerilglicina, Butirilglicina, 2-Metilbutirilglicina, Tiglilglicina, Hexanoilglicina, Ácido Adípico y Fenilacetilglutamina (Figura 22).

**Figura 22. Cromatograma con Diagnóstico Bioquímico Presuntivo de Deficiencia Acil-Coenzima A Deshidrogenasa de Cadena Media. Edad: 36 Meses.**



8.1.1.6 Deficiencia de Holocarboxilasa Sintetasa: Muy elevada excreción de Ácido Láctico, Ácido 3-Hidroxi propiónico, Propionilglicina, Ácido Metilcátrico, elevada excreción de Ácido 2-Metil-3-Hidroxibutírico, Ácido Acetoacético, Ácido 3-Cetovalérico, 2-Metil-3-Cetovalérico, 3-Metilcrotonilglicina y Tiglilglicina (Figura 23).

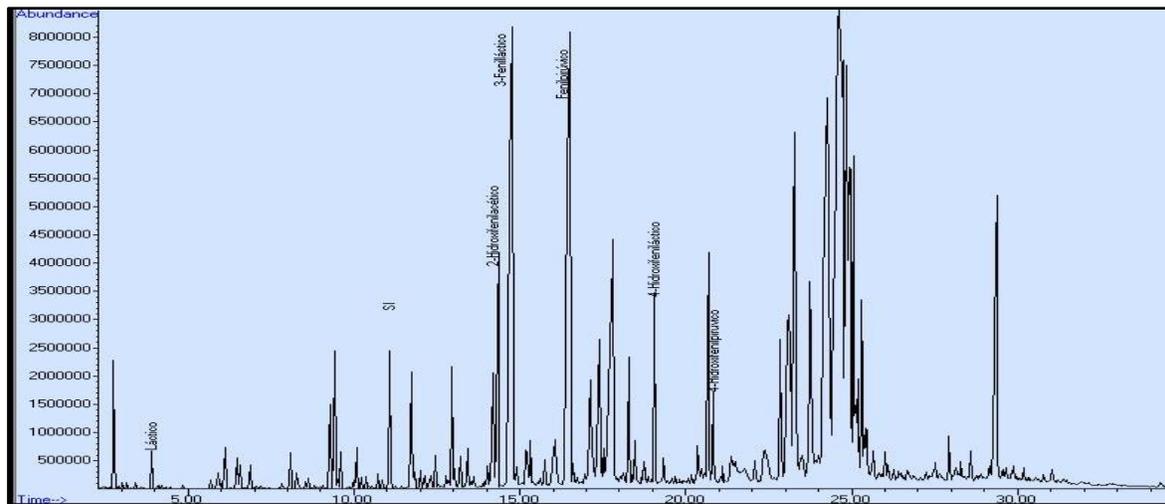
**Figura 23. Cromatograma con Diagnóstico Bioquímico Presuntivo de Deficiencia de Holocarboxilasa Sintetasa. Edad: 22 Días.**



### 8.1.2 Aminoacidopatías:

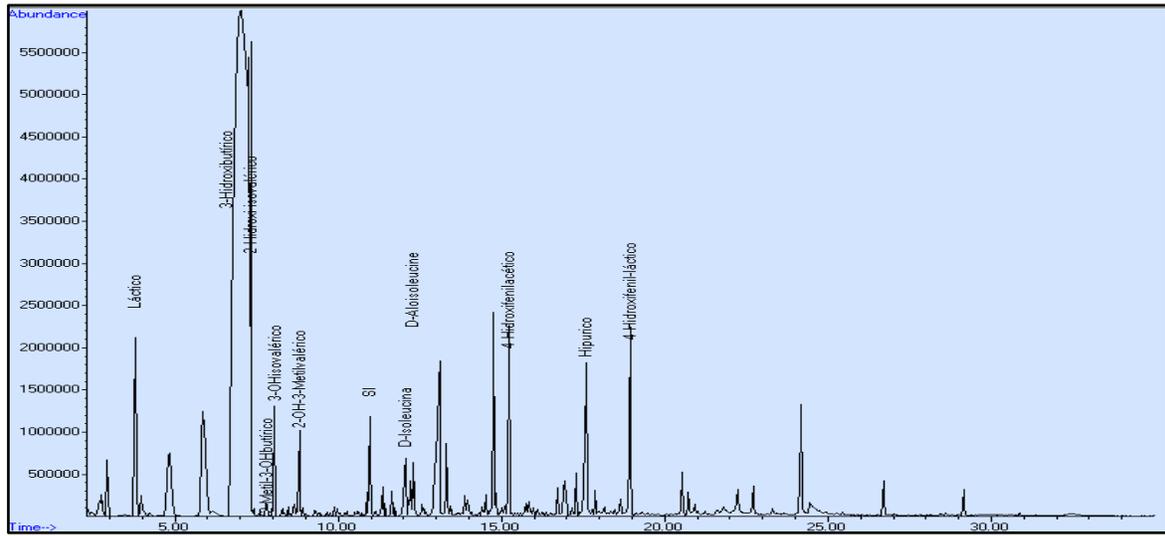
8.1.2.1 Desorden en el Metabolismo de Fenilalanina: Fue procesada una muestra, que mostró muy elevada excreción de Ácido 2-Hidroxifenilacético, Ácido 3-Fenil láctico, Ácido Fenilpirúvico, elevada excreción de Ácido 4-Hidroxifenil láctico y Ácido 4 -Hidroxifenilpirúvico (Figura 24).

**Figura 24. Cromatograma con Diagnóstico Bioquímico Presuntivo de Desorden en el Metabolismo de Fenilalanina. Edad: 144 Meses.**



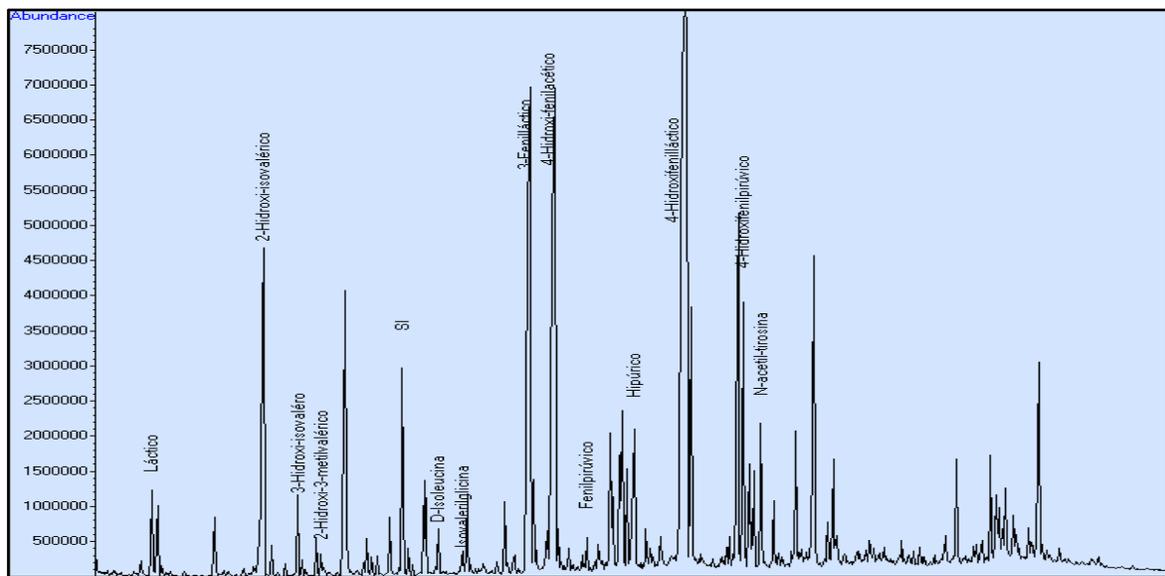
8.1.2.2 Enfermedad de Orina con Olor a Jarabe de Arce: Fueron procesadas dos muestras. En la primera se observaron elevaciones de Ácido Láctico, Ácido 2-Metil-3-Hidroxi-butírico, Ácido 3-Hidroxi-isovalérico, Ácido 2-Hidroxi-3-Metilvalérico, D-Isoleucina y D-Aloisoleucina, acompañadas de una muy elevada excreción de Ácido 3-Hidroxi-butírico y Ácido 2-Hidroxi-isovalérico (Figura 25).

**Figura 25. Cromatograma con Diagnóstico bioquímico Presuntivo de Enfermedad de la Orina con Olor a Jarabe de Arce. Edad: 24 Meses.**



En la Figuras 26 se observa un aumento en la señal de Ácido 2-Hidroxi-isovalérico y D-Isoleucina, acompañadas de elevada excreción de metabolitos indicativos de compromiso hepático: Ácido 3- Fenil-láctico y Ácido 4-Hidroxi-fenilacético, Ácido 4-Hidroxi-fenilpirúvico y N-acetil-tirosina.

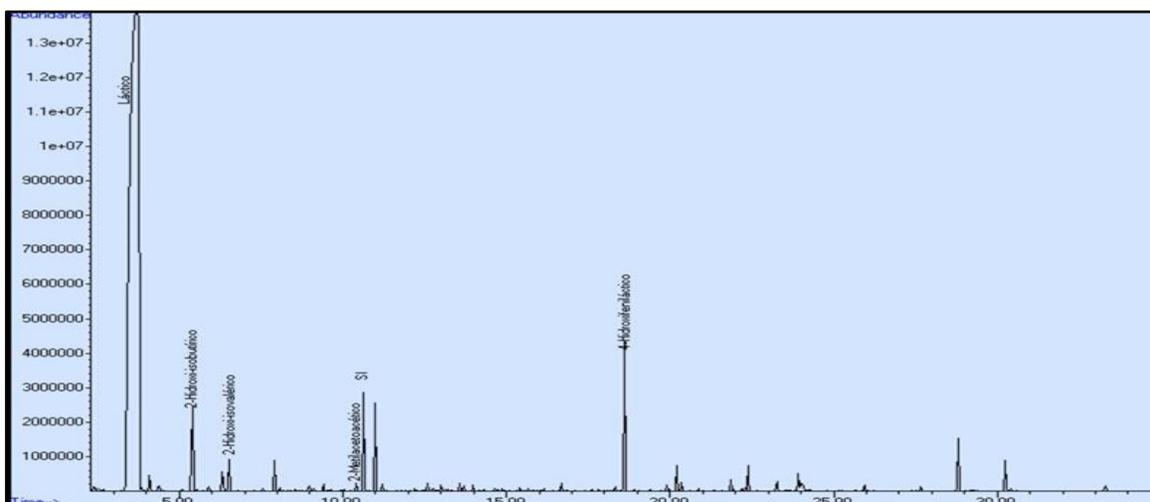
**Figura 26. Cromatograma con Diagnóstico Bioquímico Presuntivo de Enfermedad de la Orina con Olor a Jarabe de Arce. Edad: No Registra.**



### 8.1.3 Otras Condiciones:

8.1.3.1 Acidosis Láctica: Fue procesada una muestra que mostró muy elevada excreción de Ácido Láctico, elevada excreción de Ácido 2-Hidroxiisobutírico, Ácido 4-Hidroxifenil láctico, ligera elevación de Ácido 2-Hidroxiisovalérico y presencia de Ácido 2-Metilacetoacético (Figura 27).

Figura 27. Cromatograma con Diagnóstico Bioquímico Presuntivo de Acidosis Láctica. Edad: 7 Días.



## 8.2 ESPECTROS OBTENIDOS POR <sup>1</sup>H-NMR

A continuación, se describe el alineamiento que se realizó para el conjunto de espectros adquiridos a 400 MHz, al igual que la descripción de los perfiles de individuos sanos y con Diagnóstico Bioquímico Presuntivo para EIM.

8.2.1 Alineamiento: Una vez adquiridos todos los espectros, se exportaron en formato ASCII para ser alineados por el algoritmo iCOshift (desplazamiento de correlación de intervalos, que deriva su nombre del algoritmo coshift básico) [56, 58], el cual se basa en una eficiente transformada rápida de Fourier que permite la alineación de grandes conjuntos de datos en pocos segundos. Los espectros fueron alineados según los intervalos escogidos por el usuario (Figura 28 y Figura 29).

Figura 28. Alineamiento de Espectros Usando los Intervalos Definidos por el Usuario. a) Espectros antes del alineamiento, b) Aplicación de intervalos definidos por el usuario.

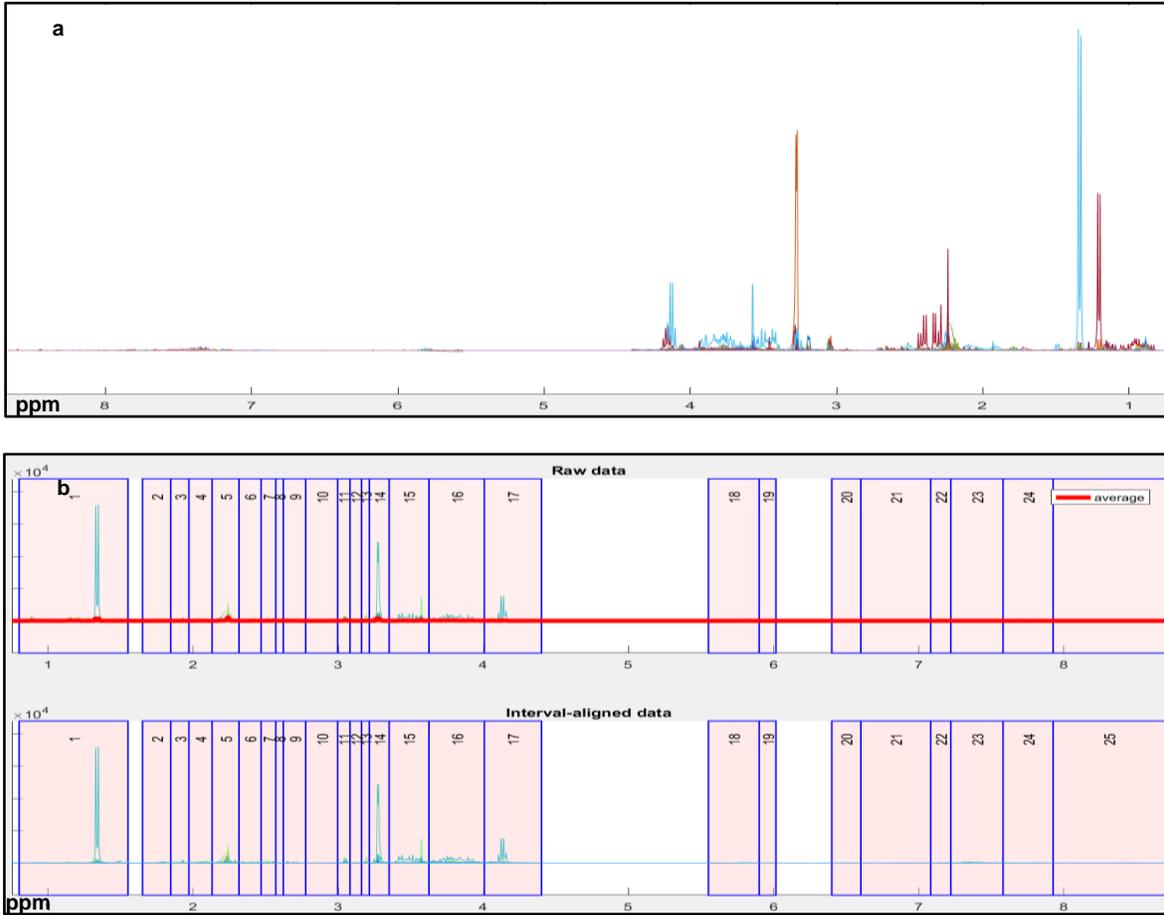
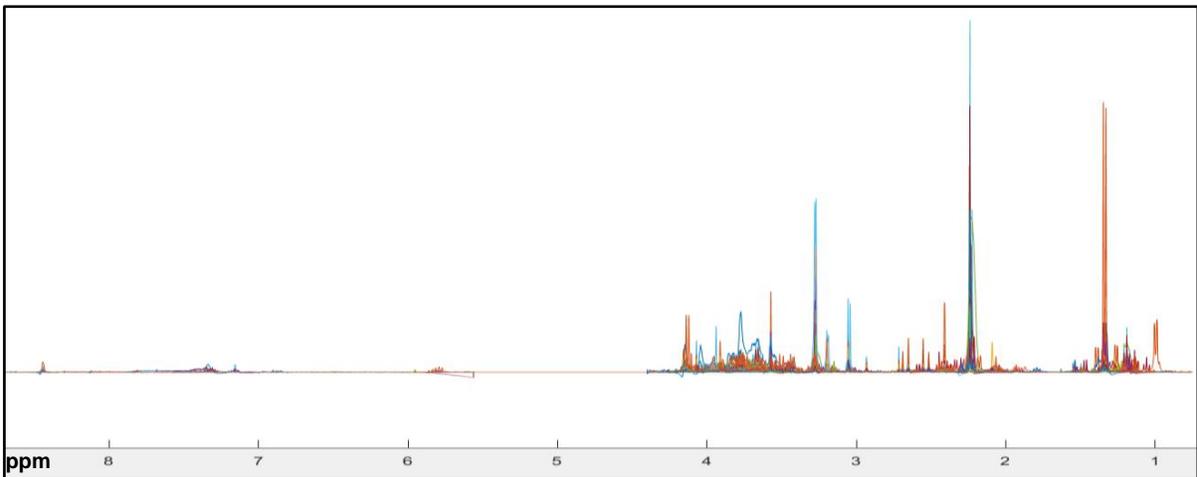


Figura 29. Espectros después del Alineamiento.



### 8.2.2 Analisis Cualitativo de Espectros $^1\text{H}$ -NMR Obtenidos en Muestras de Orina

8.2.2.1 Espectro  $^1\text{H-NMR}$  Promedio Obteniendo de Orinas de Individuos Sanos: El espectro promedio generado a partir de las muestras de orina obtenida de individuos sanos procesados a 400MHz, con sus respectivos desplazamientos a pH 7.0 (Tabla 4. Figura 30,) ilustró con detalle las señales correspondientes a los metabolitos de bajo peso molecular, que incluyen la presencia de metabolitos endógenos en la orina con diferentes intensidades (Creatina, Creatinina, Ácido Láctico, Ácido Cítrico, Ácido Succínico y Ácido Fórmico como ácidos orgánicos), compuestos de Metilamina (derivados de metabolismo bacteriano), tales como los metabolitos derivados de Dimetilamina (DMA) y Trimetilamina (TMA), metabolitos aromáticos (Ácido Hipúrico), y aminoácidos (L-Alanina, L-Glicina, L-Histidina), además de Betaína – Oxido de Trimetilamina (TMAO).

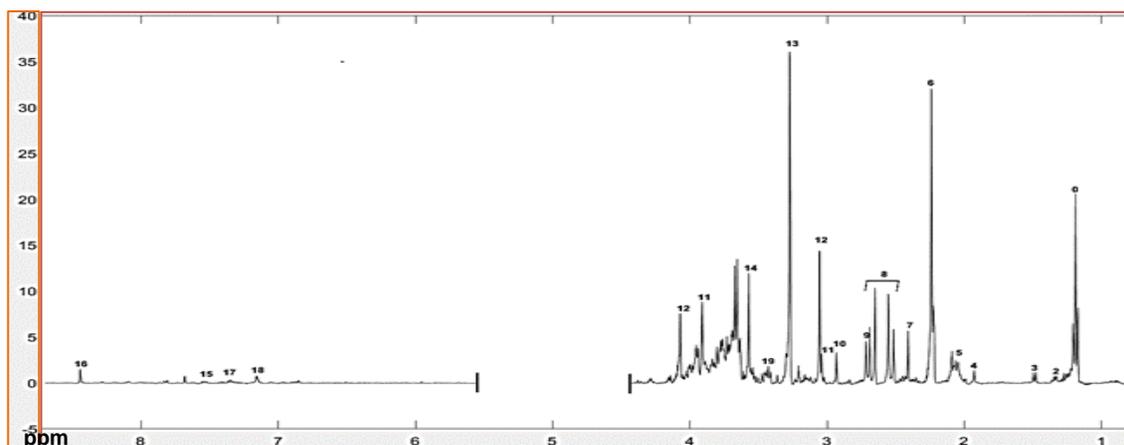
**Tabla 4. Desplazamiento químico de los metabolitos observados en orina de individuos sanos procesados a 400MHz.**

NÚMERO	COMPUESTO	$\delta^1\text{H}$ (pH=7.1)
0	No Identificado (se encuentra en la zona correspondiente a lípidos.	1.170 (t)
1	Ácido 3-Aminoisobutírico	1.187-1.212 (d)
2	Ácido Láctico	1.33-1.347 (d)
3	Alanina	1.475-1.499 (d)
4	Ácido Acético	1.93 (s)
5	Región N-Acetil	1.991-2.027-2.044-2.066-2.09*
6	Acetona	2.24 (s)
7	Ácido Succínico	2.412 (s)
8	Ácido Cítrico	2.509-2.56-2.651-2.70 (d,d)
9	DMA	2.717 (s)
10	TMA	2.931 (s)
11	Creatina	3.03-3.939 (s,s)
12	Creatinina	3.05-4.071 (s,s)
13	Betaína** - TMAO	3.27 (s) – 3.91 (s**)
14	Glicina	3.57 (s)
15	Ácido Hipúrico	3.96-7.52-7.61-7.82(d,t,t,d)
16	Ácido Fórmico	8.44 (s)
17	Alfa-N-Fenilacetil-L-glutamina	7.328-7.391 (t)
18	L-Histidina	7.156 (s)
19	L-Taurina	3.426 (t)

$\delta^1\text{H}$  : Desplazamiento Químico (ppm), Singlete (s), Doblete (d), Triplete (t).

\* En la región N-acetil, los tres protones N-acetilo equivalentes resuenan como un singlete en una pequeña parte del espectro  $^1\text{H-NMR}$  (1.9 hasta 2.2 ppm). El hallazgo de señales singletas en un espectro de  $^1\text{H-NMR}$  puede utilizarse, por lo tanto, como una indicación de la presencia de un metabolito N-acetilado. Se sabe que el Ácido Neuramínico, el Ácido N- Acetilaspártico y los grupos N-acetilo de las glicoproteínas en la orina procedentes de controles sanos contribuyen a las resonancias en esta área. Además, se sabe que algunos metabolitos sin un grupo N-acetilo tienen una resonancia entre 1,9 y 2,2 ppm. Estos incluyen L-Glutamina (multiplete a 2,15 ppm), L-Prolina (multiplete a 2,02 ppm), L-Metionina (singlete a 2,13 ppm) [70]. \*\* La resonancia del grupo N-CH<sub>3</sub> de la TMAO a 3.27 se ve sobrepuesta por el singlete de Betaína a pH neutro, sin embargo, se observa otro singlete a 3.91 perteneciente a este mismo compuesto [71].

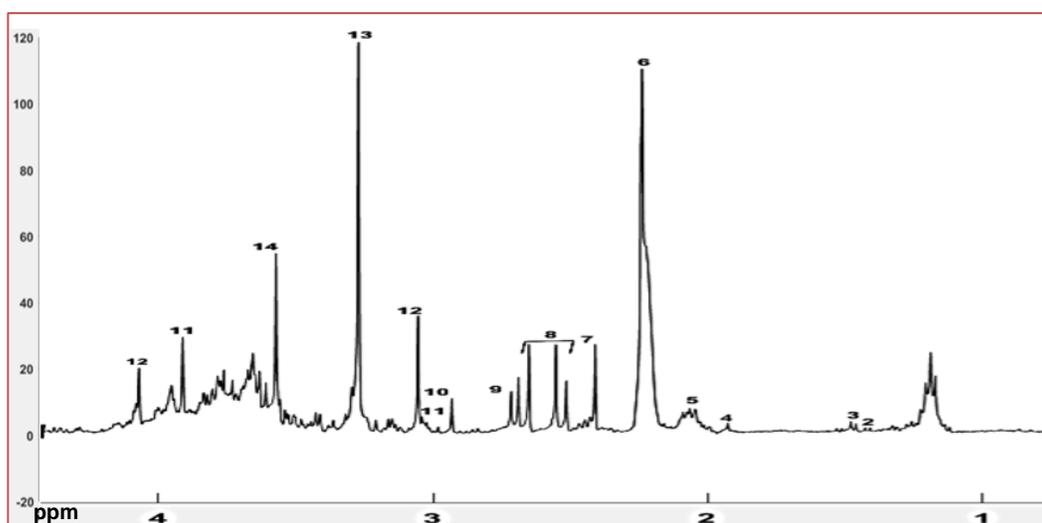
**Figura 30. Espectro Promedio Obtenido de Individuos Sanos Procesados a 400MHz.**



En la Figura 30 se identifican los siguientes compuestos: 0. Triplete no identificado. 1. Ácido 3-Aminoisobutírico. 2. Ácido Láctico, 3. L-Alanina, 4. Ácido Acético, \*5. Región N-acetil, 6. Acetona, 7. Ácido Succínico, 8. Ácido Cítrico, 9. DMA, 10. TMA, 11. Creatina, 12. Creatinina, 13. Betaína - TMAO, 14. L-Glicina, 15. Ácido Hipúrico, 16. Ácido Fórmico, 17. Alfa-N-Fenilacetil-L-glutamina, 18. L-Histidina, 19 L-Taurina.

A continuación, en las Figuras 31, 32, 33 y 34 y 35 se representan los espectros promedio obtenidos por grupo de edades e ingesta de leche materna (Figura 36, este grupo no superó los tres meses de edad) y de fórmula (Figura 37, este grupo no superó los cuatro meses de edad), para los respectivos compuestos descritos en la Tabla 4.

**Figura 31. Espectros Promedio Obtenidos de Individuos Sanos Menores a 1 Mes de Edad.**



**Figura 32. Espectros Promedio Obtenidos de Individuos Sanos entre 2 y 3 Meses de Edad.**

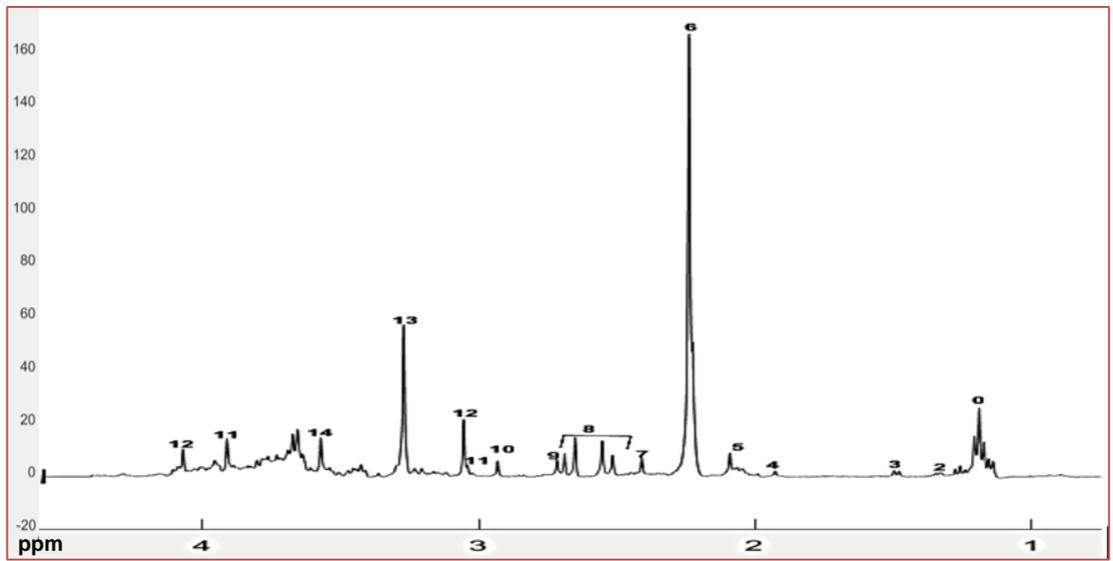


Figura 33. Espectros Promedio Obtenidos de Individuos Sanos Mayores a 3 Meses y Hasta 5 Meses de Edad.

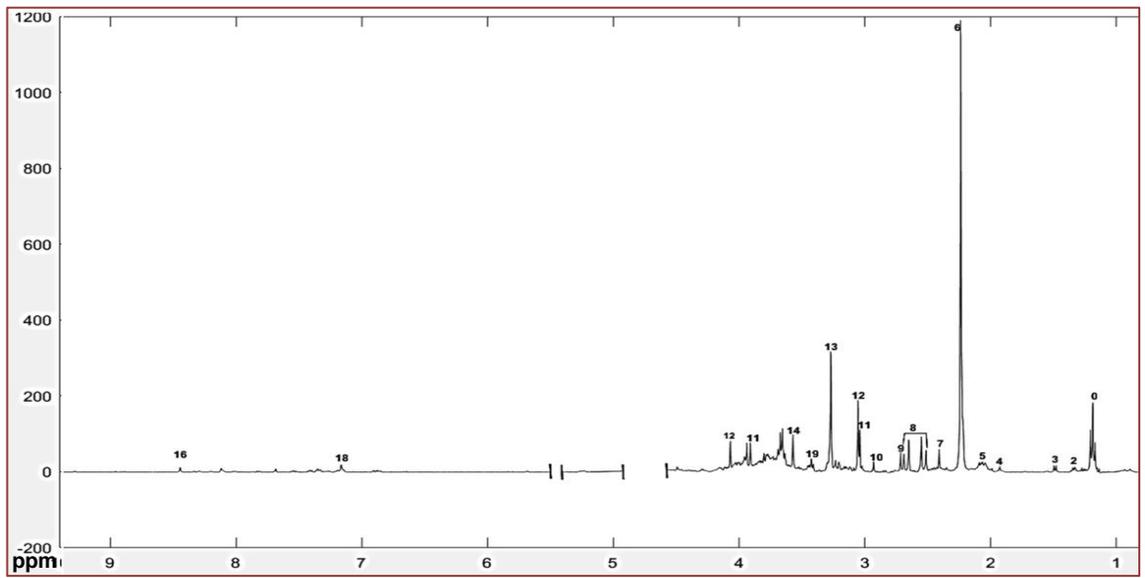
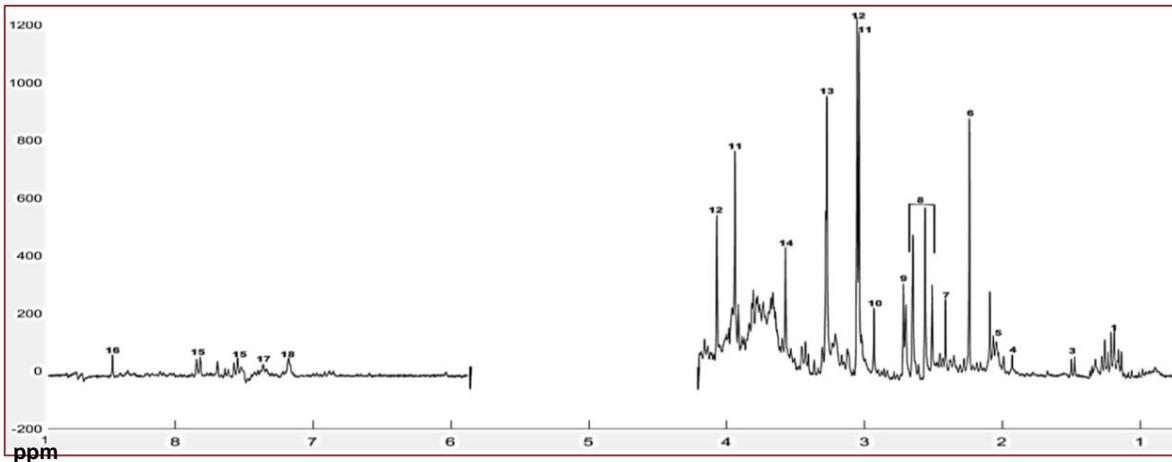
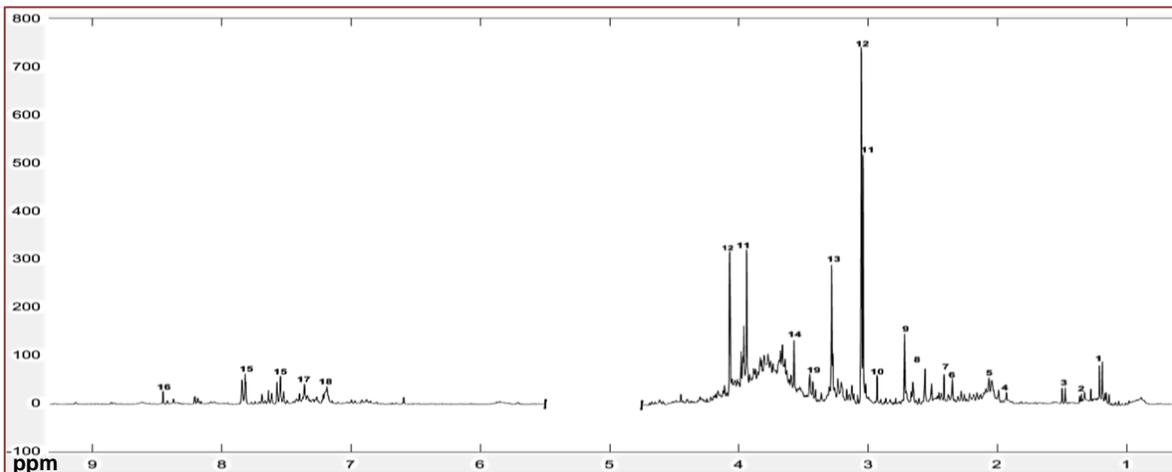


Figura 34. Espectros Promedio Obtenidos de Individuos Sanos con Edades entre los 6 y 12 Meses de Edad.



**Figura 35. Espectros Promedio Obtenidos de Individuos Sanos Mayores a 13 Meses de Edad.**



Al realizar una inspección visual de los espectros, es notoria la intensidad de la Acetona en los grupos de edad entre 0 meses hasta 5 meses de edad y mayor su disminución desde los 6 meses en adelante. Esta señal es común en los individuos sanos que recibieron leche de fórmula, en los diferentes grupos de edad. Otras señales que se encuentran aumentadas después de los 7 meses de edad son las de Creatinina, Ácido 3-Aminoisobutírico, así como la región donde se localizan los carbohidratos (entre 3.0 ppm y 4.0 ppm) y la región aromática que contiene Ácido Hipúrico y Fenilacetilglutamina.

**Figura 36. Espectros Promedio Obtenido de Individuos Sanos que recibían Leche Materna.** Se destaca en asterisco (\*\*) la región correspondiente a carbohidratos y oligosacáridos.

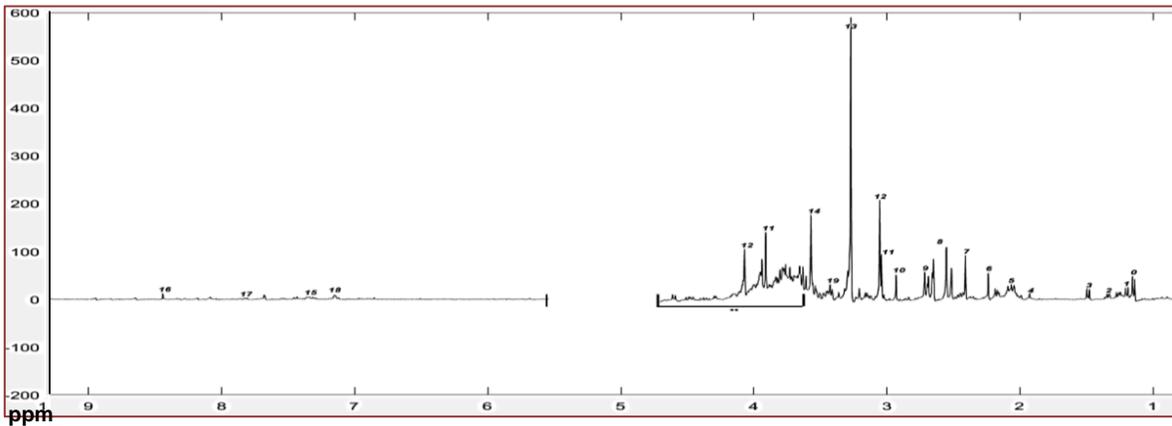
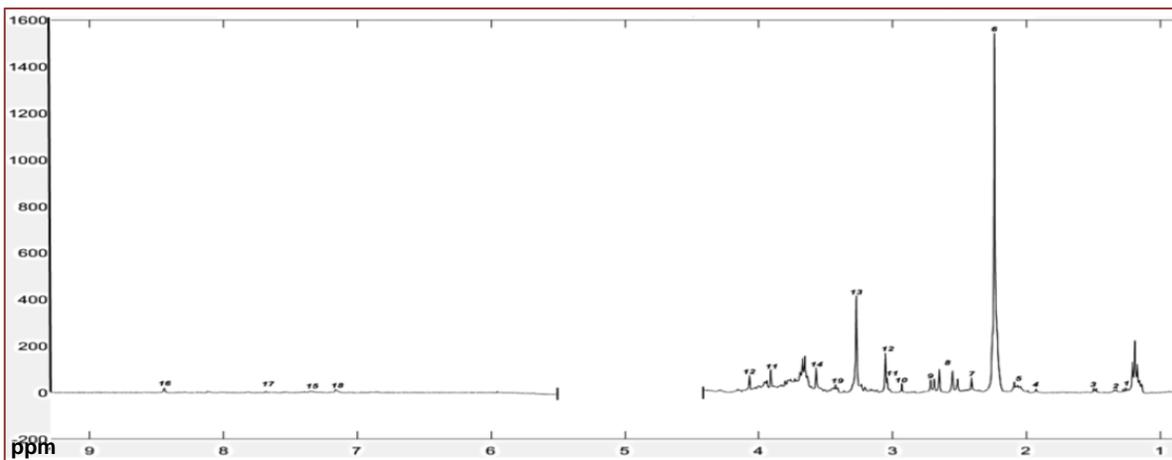


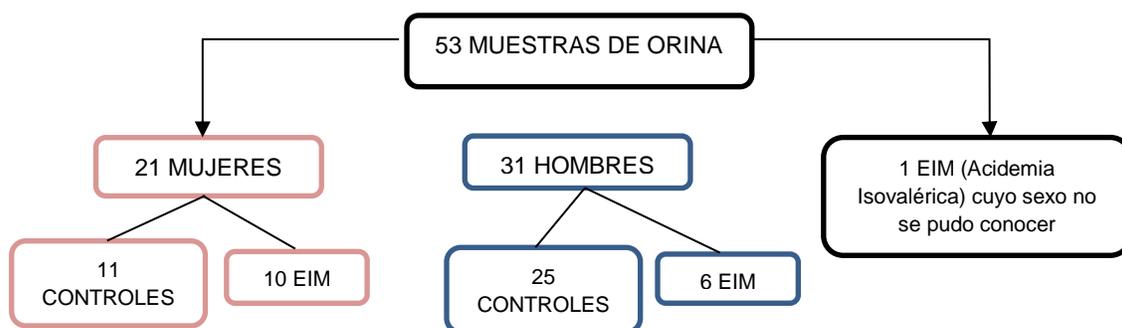
Figura 37. Espectros Promedio Obtenido de Individuos Sanos que recibían Leche de Fórmula.



Al hacer una inspección visual de los espectros de las Figura 35 y 36, se observa una mayor intensidad de la señal de Betaína – TMAO en los individuos sanos que consumen leche materna, y al revisar la edad para este grupo, se observó que la mayoría de los individuos no superaban el mes de edad. En los individuos sanos que recibieron leche de fórmula, donde las edades se encontraban entre los dos y cuatro meses, la señal de Betaína – TMAO tuvo una disminución notoria, comparada con el grupo antes mencionado.

#### 8.2.2.2 Espectro Promedio Obtenido de Muestras con Diagnóstico Bioquímico Presuntivo de EIM

Se analizaron 53 muestras de orina distribuidas de la siguiente manera:



La edad promedio de las muestras procesadas fue de 26.31 meses. Para las mujeres, la edad promedio fue de 29.25 meses con un rango de 0 a 180 meses. Para los hombres, la edad promedio fue de 13.15 meses, con un rango de 0-72 meses de edad. (Tabla 5).

**Tabla 5. Entidades y Número de Muestras Analizadas.**

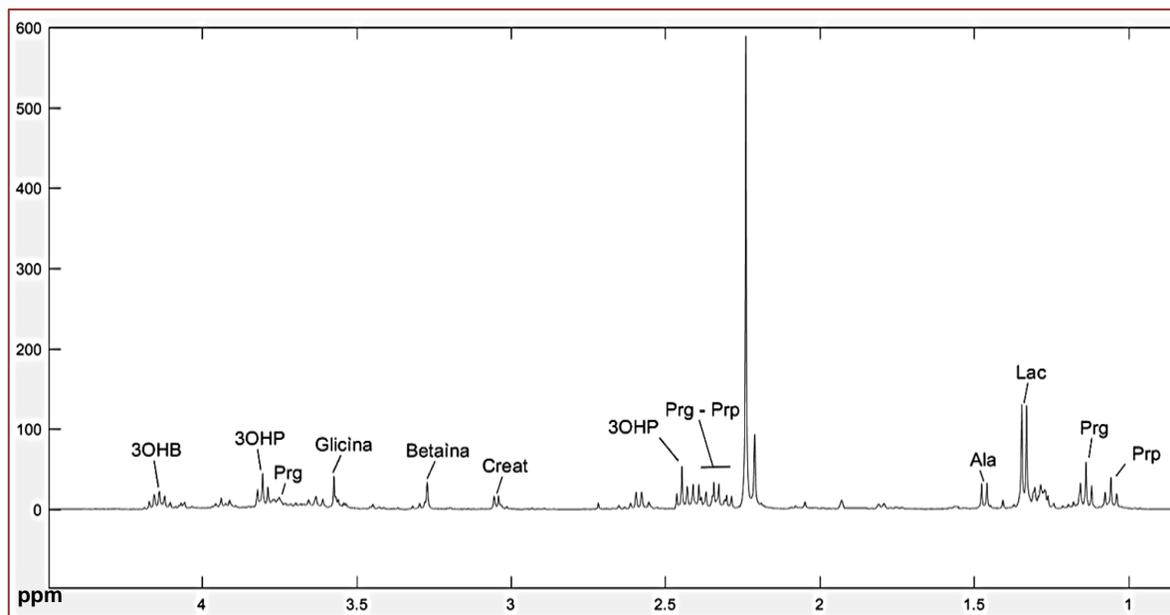
DIAGNÓSTICO BIOQUÍMICO PRESUNTIVO DE EIM (No. Muestras procesadas)	IDENTIFICADOR	EDAD (meses)	CONDICIÓN
Acidemia Propiónica (2)	56PA	9	Seguimiento
	57PA	0.2	Diagnóstico
Acidemia Isovalérica (3)	58IVA	1	Diagnóstico
	59IVA	1	Diagnóstico
	60IVA	168	Seguimiento
Deficiencia de Acil-Coenzima A Deshidrogenasa de Cadena Media (1)	61MCAD	36	Seguimiento
Acidemia 3-Metilglutacónica (2)	64MGA	2	Diagnóstico
	65MGA	0.8	Diagnóstico
Deficiencia de Holocarboxilasa Sintetasa (1)	67DHOLO	0.73	Diagnóstico
Acidemia Glutárica tipo I (4)	68GATI	36	Seguimiento
	69GATI	48	Seguimiento
	70GATI	72	Seguimiento
	72GATI	72	Seguimiento
Desórdenes del Metabolismo de Fenilalanina (1)	74DPHE	144	Seguimiento
Acidosis Láctica (1)	77PDHKb	0.23	Diagnóstico
Enfermedad de Orina con Olor a Jarabe de Arce (2)	62 MSUD	24	Seguimiento
	71MSUD	No Registra	Seguimiento
	Otros Identificadores	Rango 0 - 36 (años)	25M; 11F
Controles (36)			

A continuación, se describen los espectros más representativos de las entidades mencionadas en la Tabla 5.

### 8.2.3 Acidemias Orgánicas:

8.2.3.1 Acidemia Propiónica: Cuando fueron procesadas por  $^1\text{H-NMR}$ , los espectros registrados mostraron los compuestos descritos en la Figura 38.

Figura 38. Espectro  $^1\text{H-NMR}$  en muestra de orina con diagnóstico bioquímico presuntivo de Acidemia Propiónica.



Los desplazamientos químicos para los compuestos encontrados en la Figura 38 son:

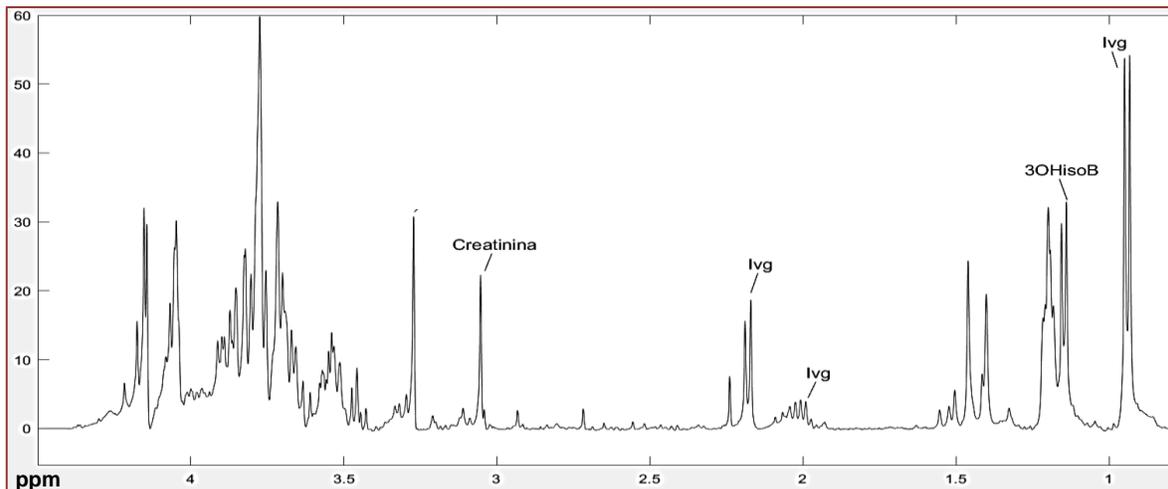
Prp: Ácido Propiónico 1.038 ppm (t), 2.286 (q), Prg: Propionilglicina: 1.119 ppm (t), 2.301 ppm (cuarteto: (q)) – 3.75 ppm (d), 3OHP: Ácido 3-Hidroxipropiónico: 2.429 ppm (t) - 3.787 ppm (t); 3-OHB, Ácido 3-Hidroxibutírico 4.103 ppm (m).

En esta Acidemia Propiónica se observa Propionilglicina, Ácido 3-Hidroxipropiónico y Glicina. [72, 73].

Los cromatogramas obtenidos por GC/MS, así como el espectro obtenido por  $^1\text{H-NMR}$ , muestran un perfil sugestivo de Acidemia Propiónica que se acompaña de cetosis.

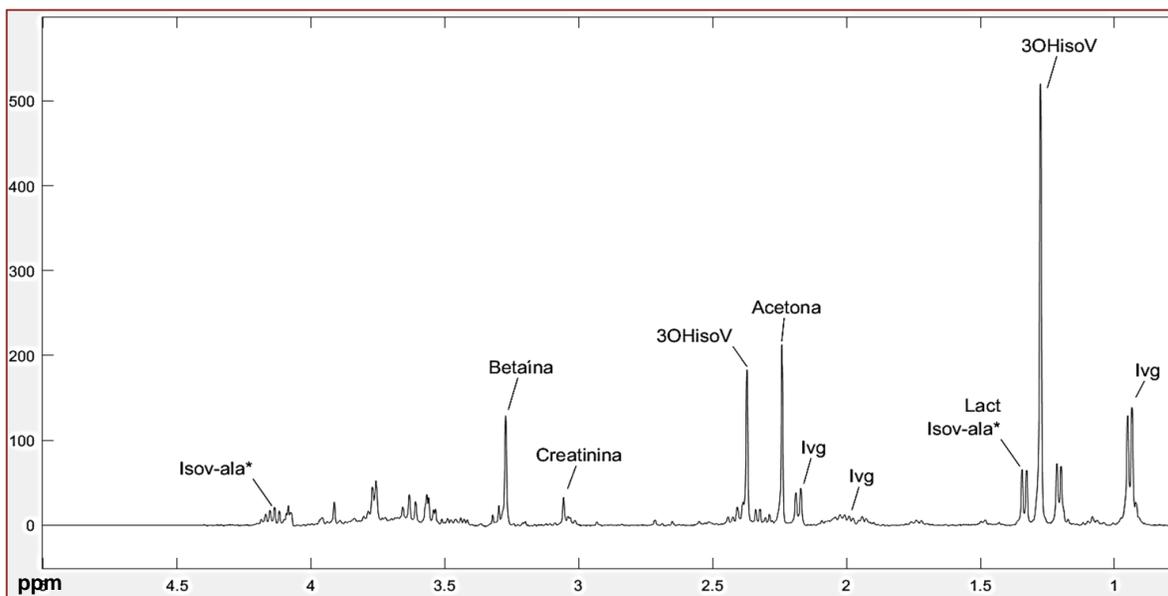
8.2.3.2 Acidemia Isovalérica

Figura 39. Espectro  $^1\text{H-NMR}$  en Muestra de orina con Diagnóstico Bioquímico Presuntivo de Acidemia Isovalérica.



Los desplazamientos químicos para los compuestos encontrados en la Figura 39 son: Ivig: Isovalerilglicina: 0.9332 ppm (d) 1.975 ppm (Multiplete: (m)) – 2.372 ppm (d), 3-OHisoB, Ácido 3-Hidroxi-iso-butílico 1.140 ppm (d).

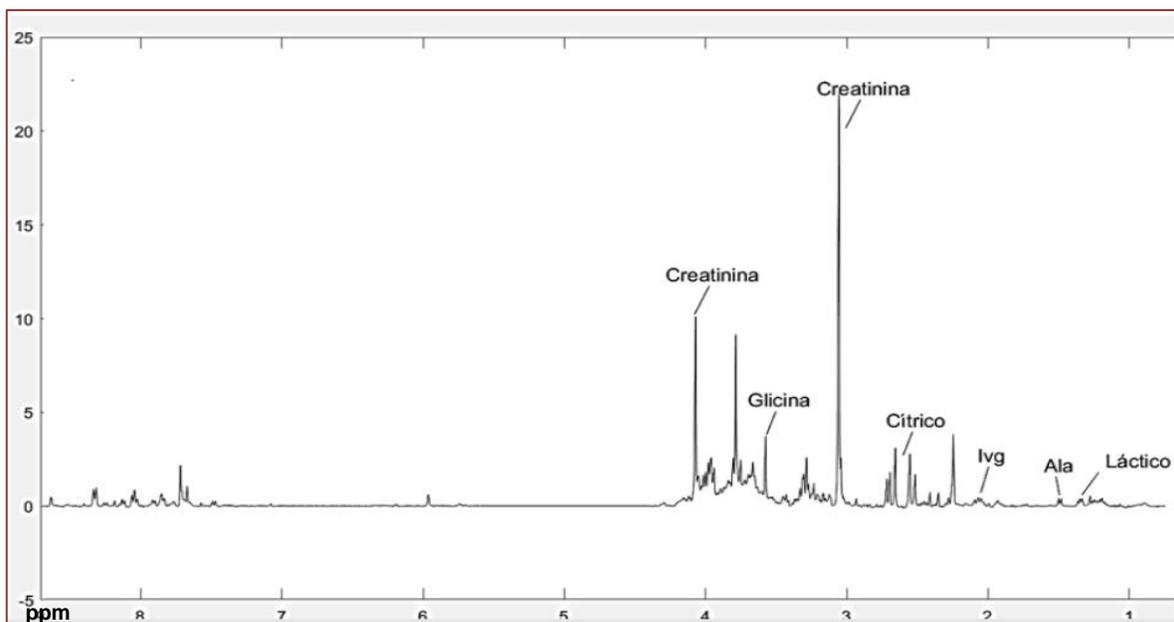
Figura 40. Espectro  $^1\text{H-NMR}$  en Muestra de orina con Diagnóstico Bioquímico Presuntivo de Acidemia Isovalérica.



En la Figura 40 se puede observar que además de Isovalerilglicina, se observa la señal de 3-Hidroxi-iso-valérico. Los desplazamientos químicos para los

compuestos encontrados en esta figura son: Ivg: Isovalerilglicina: 0.9332 ppm (d) 1.199 ppm (m) – 2.170 ppm (d), 3-OHisoV: Ácido 3-Hidroxi-isovalérico 1.275 ppm (s) – 2.35 ppm (s). Se observan un doblete en 1.33 ppm que corresponde al ácido láctico; sin embargo, hay un multiplete en 4.120 ppm que junto con este doblete pueden corresponder a un conjugado del Isovaleril-CoA con alanina, (Isovalerilalanina – Isov-ala\*) que se observa en episodios agudos de la enfermedad [74].

**Figura 41. Espectro  $^1\text{H-NMR}$  en Muestra de Orina con Diagnóstico Bioquímico Presuntivo de Acidemia Isovalérica.**



En la Figura 41 se puede apreciar una señal disminuida de Isovalerilglicina y una señal de Glicina.

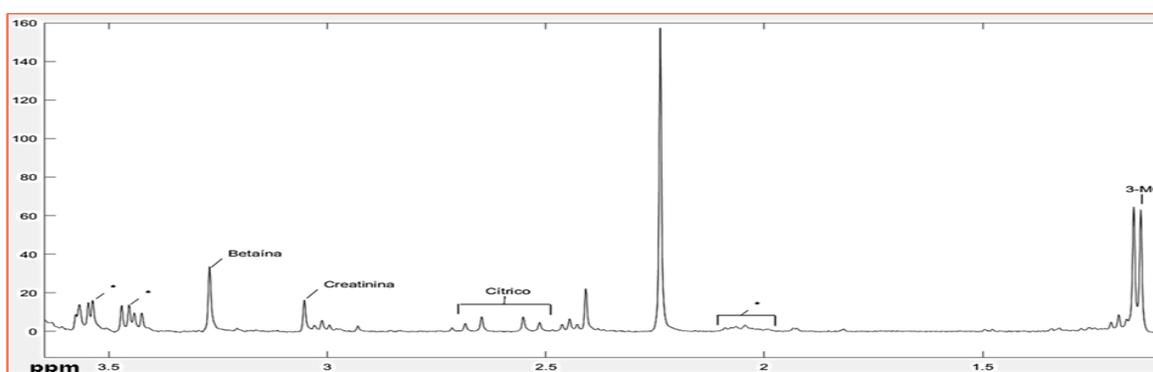
En las tres muestras con diagnóstico bioquímico presuntivo de Acidemia Isovalérica, se observa Isovalerilglicina. El espectro que se observa en la figura 40, es el único que contiene los metabolitos patognomónicos de la enfermedad (Isovalerilglicina y Ácido 3-Hidroxi-isovalérico), además de un doblete y multiplete sugestivo de isovalerilalanina, que permiten construir un perfil por  $^1\text{H-NMR}$ , en episodio agudo [75].

La sola presencia de isovalerilglicina por  $^1\text{H-NMR}$  como se observa en la figura 40, puede presentarse en pacientes durante periodos de remisión [76]. El espectro de

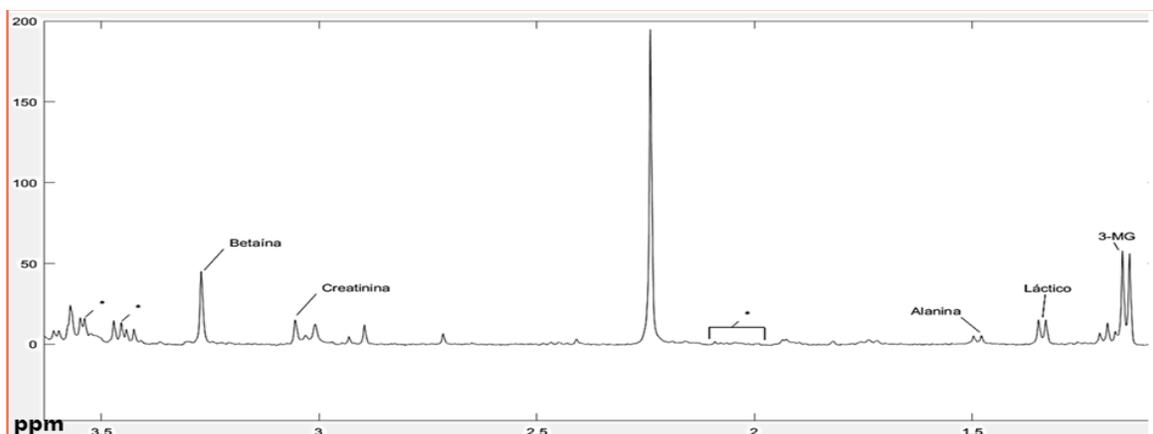
la Figura 41 que mostró menos señales para los compuestos antes mencionados, presenta una señal de glicina, posiblemente por la suplementación de este aminoácido, como tratamiento para esta entidad; la edad del paciente del cual se obtuvo esta muestra fue de 168 meses, por lo que se puede inferir que para ese momento ya se había instaurado un manejo de la patología.

### 8.2.3.3 Acidemia 3-Metilglutacónica:

**Figura 42. Espectros  $^1\text{H-NMR}$  en Muestra de Orina con Diagnóstico Bioquímico Presuntivo de Acidemia 3-Metilglutacónica.**



**Figura 43. Espectros  $^1\text{H-NMR}$  en Muestra de Orina con Diagnóstico Bioquímico Presuntivo de Acidemia 3-Metilglutacónica.**



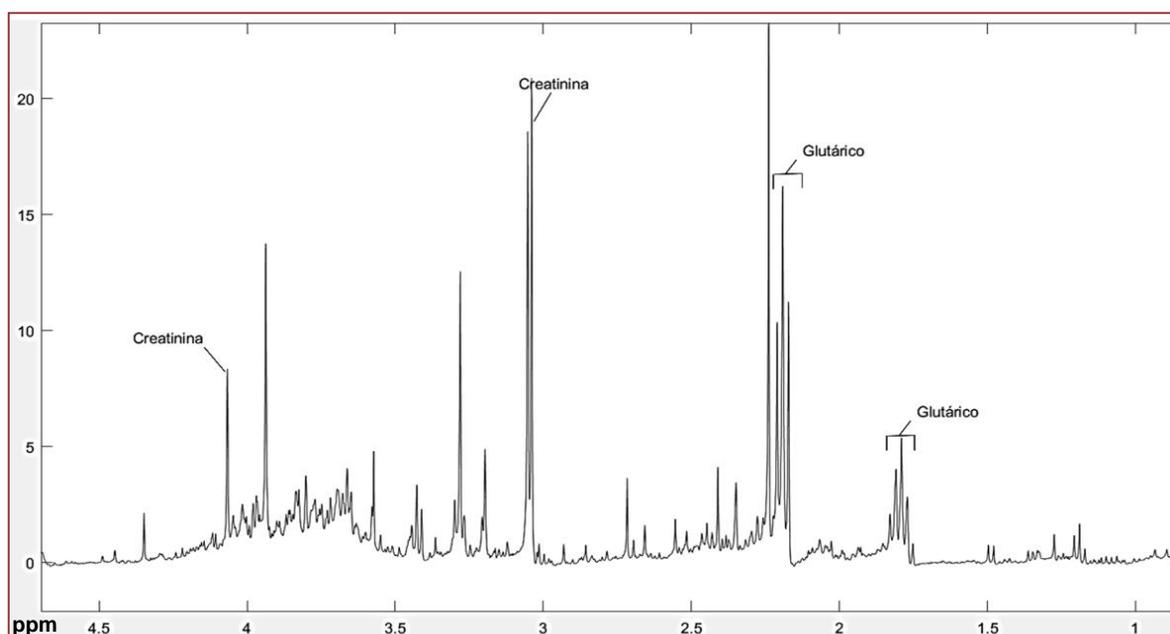
Los desplazamientos reportados por Engelke [77], muestran un doblete para el Ácido 3-Metilglutárico (3MG) en 1.01 ppm y multiplete en 2.35 ppm. En los dos especros procesados por  $^1\text{H-NMR}$  sólo se observó 3MG con doblete en 1.139 ppm.

El Ácido 3-Metilglutacónico presenta dos isómeros con señales reportadas por Engelke [77] en 1.99 ppm (d), 3.65 ppm (d) , 5.96 ppm (m) para la posición *cis* y 2.14 ppm (d), 3.28 ppm (d) , 5.85 ppm (m) para la posición *trans*.

En las muestras procesadas con diagnóstico presuntivo para Acidemia 3-Metilglutacónica (Figuras 42 y 43), se observaron señales muy débiles entre 1.97 ppm y 2.09 ppm sin forma definida, y dobletes en 3.455 ppm y 3.538 ppm respectivamente. Estas señales podrían corresponder a los protones metilados del 3-Metilglutacónico.

#### 8.2.3.4 Acidemia Glutárica Tipo I:

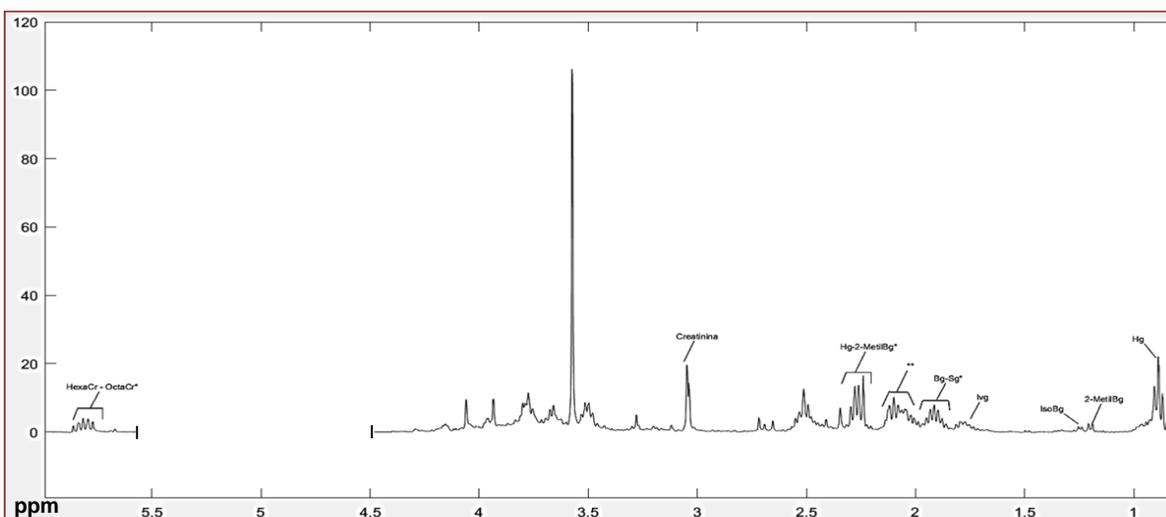
**Figura 44. Espectro  $^1\text{H-NMR}$  en Muestra de Orina con Diagnóstico Bioquímico Presuntivo de Acidemia Glutárica Tipo I.**



En el espectro por  $^1\text{H-NMR}$  para esta entidad (Figura 44), se observaron señales pertenecientes al Ácido Glutárico: 1.752 ppm (m) y 2.172 ppm (t).

#### 8.2.3.5 Deficiencia de Acil-Coenzima A Deshidrogenasa de Cadena Media

**Figura 45. Espectro  $^1\text{H-NMR}$  en muestra de orina con diagnóstico bioquímico presuntivo de Acidemia Acil-Coenzima A Deshidrogenasa de Cadena Media.**



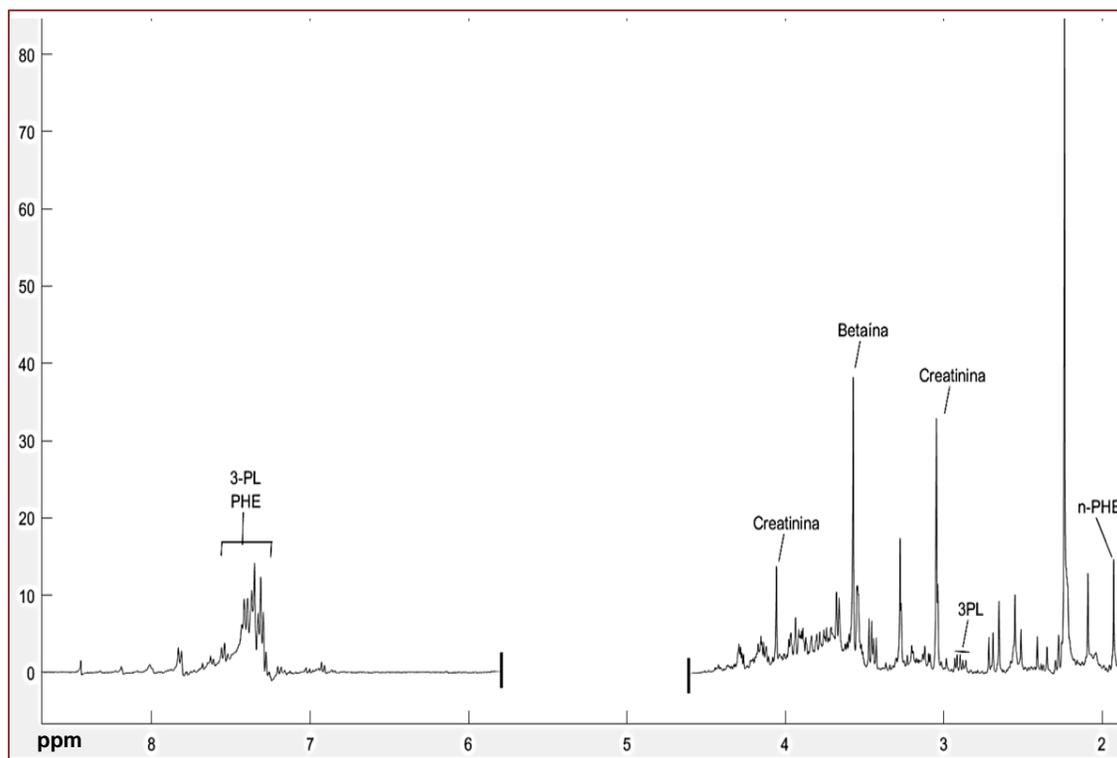
Los desplazamientos químicos para los compuestos encontrados en la Figura 45 son: Hg: Hexanoilglicina 0.8689 ppm (t), 2-MetilBg: 2-Metilbutirilglicina 1.190 ppm (d), IsoBg: Isobutilglicina 1.239 ppm (d), IvG: 1.199 ppm (m),

- Bg – Sg\*: Convergen señales para Butirilglicina y Suberilglicina (ambas multiplete), con un desplazamiento químico entre 1.860 - 1.983 ppm.
- Hg - 2-MetilBg\*: convergen señales de Hexanoilglicina y 2-Metilbutirilglicina (ambas multiplete), con un desplazamiento químico entre 1.983 ppm y 2.119 ppm.
- Hg - 2-MetilBg - Bg\*: convergen señales de Hexanoilglicina 2.24 ppm (m), 2-Metilbutirilglicina 2.26 ppm (t) y Butirilglicina 2.27 ppm (t) respectivamente.
- HexaCr – OctaCr\*: Zona donde convergen señales de Hexanoil-carnitina y Octanoil-carnitina con un desplazamiento químico entre 5.77 ppm y 5.85 ppm (m).

No se observaron ácidos dicarboxílicos en el espectro  $^1\text{H-NMR}$ , como si se notó en el cromatograma (Ácido Adípico). Sin embargo, aunque la  $^1\text{H-NMR}$  no es la técnica adecuada para discriminar entre los diferentes ésteres de carnitina [4], la presencia de las señales de Hexanoil-carnitina y Octanoil-carnitina ayudan a orientar hacia una MCAD ya que estos se encuentran elevados en esta entidad [78, 79].



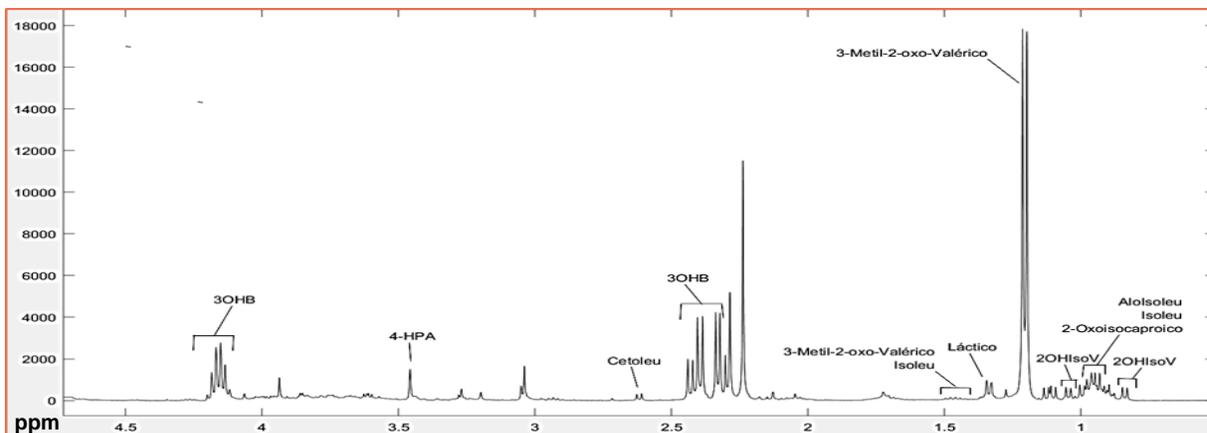
**Figura 47. Espectro  $^1\text{H-NMR}$  en Muestra de Orina con Diagnóstico Bioquímico Presuntivo de Desorden en el Metabolismo de Fenilalanina.**



En este espectro (Figura 47) se puede apreciar un aumento de señales en la región comprendida entre los 7.20 ppm y 7.42 ppm, correspondiente a señales de compuestos aromáticos, en esta zona comparten desplazamiento los siguientes compuestos: Ácido 3-Fenil láctico (3PL; 7.33 ppm (m)), y N-acetil Fenilalanina (n-PHE; 7.32 (m)). Para estos compuestos se tomaron los desplazamientos de referencia de la base de datos HMDB [45]. Se puede apreciar también otra señal para n-PHE en 1.928 ppm (s) y para 3PL se observa un doble doblete en 2.86 ppm.

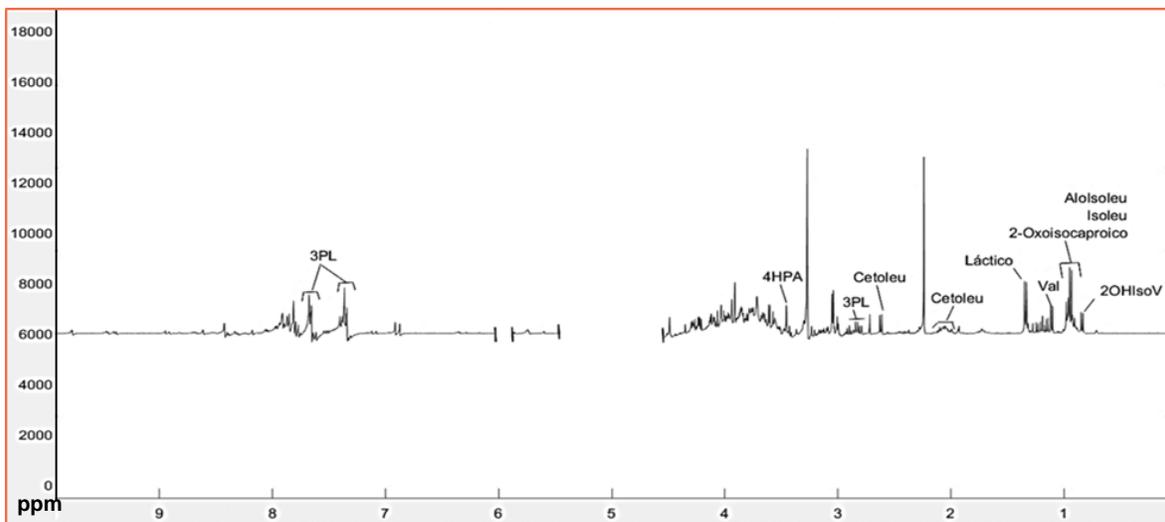
#### 8.2.4.2 Enfermedad de Orina con Olor a Jarabe de Arce:

**Figura 48. Espectro  $^1\text{H-NMR}$  en Muestra de orina con Diagnóstico Bioquímico Presuntivo de Enfermedad de Orina con Olor a Jarabe de Arce.**



En este espectro (Figura 48) se puede apreciar un aumento de señales para el Ácido 3-Hidroxibutírico (3-OHB) con multipletes en 2.30 ppm y 4.103 ppm respectivamente, un doblete en 1.20 ppm y multiplete en 1.42 ppm 3-Metil-2-Oxo-valérico, dos dobletes para el ácido 2-Hidroxi-iso-valérico (2OHisoV) y un multiplete entre 0.92 y 0.98 ppm, donde convergen señales para Aloisoleucina (multiplete 0.94 ppm), Isoleucina (triplete 0.926 ppm) y Ácido 2-Oxisocaproico (doblete 0.92). Adicionalmente, se observa un multiplete en 1.42 ppm correspondiente a Isoleucina. Se ha tomado como referencia los desplazamientos de HMDB [45].

**Figura 49. Espectro <sup>1</sup>H-NMR en Muestra de orina con Diagnóstico Bioquímico Presuntivo de Enfermedad de Orina con Olor a Jarabe de Arce.**

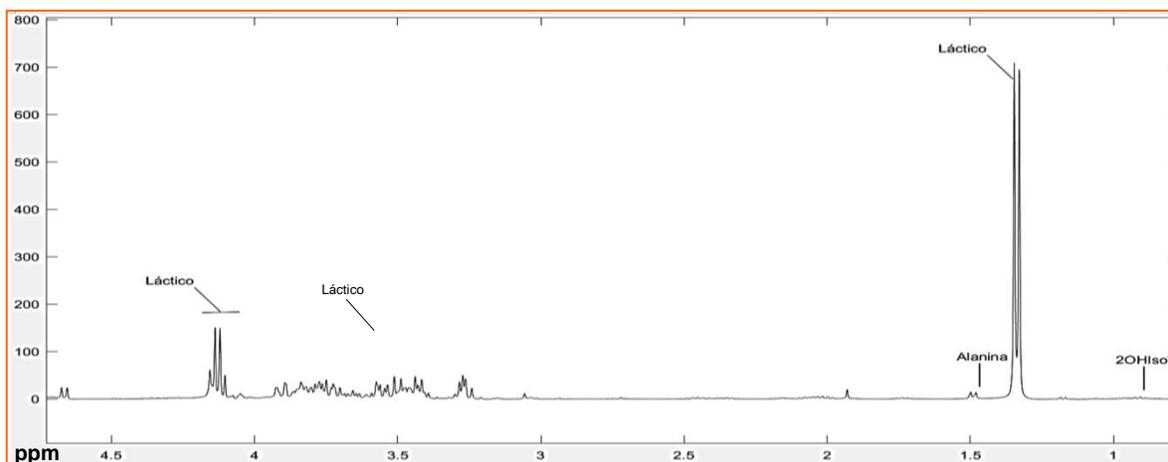


Por otra parte, en el espectro descrito en la Figura 49 se puede apreciar señales adicionales que se encuentran en la Enfermedad de Orina con Olor a Jarabe de Arce como lo es la Cetoleucina con multiplete en 1.99 ppm y doblete en 2.60 ppm. Adicionalmente se observan señales de Ácido 4-Hidroxifenilacético (singlete, 3.45 ppm) y Ácido 3-Fenilláctico (doble doblete 2.86 y multiplete 7.36 ppm).

## 8.2.5 Otras Condiciones:

### 8.2.5.1 Acidosis Láctica:

**Figura 50. Espectro  $^1\text{H-NMR}$  en muestra de orina con diagnóstico bioquímico presuntivo de Acidemia Láctica.**



En este espectro (Figura 50) se observa un señal muy aumentada de Ácido Láctico (doblete 1.33 ppm y cuarteto en 4.102 ppm), una señal muy débil de Ácido 2-Hidroxiisovalérico 0,958 ppm (d), una señal de Ácido Acético en 1.93 ppm (s) y una multiplicidad de señales para glucosa con los siguientes desplazamientos: 3.241 ppm (dd), 3.396 ppm (m), 3.458 ppm (m), 3.536 ppm (dd), 3.61 ppm (m), 3.702 ppm (m), 3.895 (d), 4.655 ppm (d) y 5.24 (d).

## 8.3 ANÁLISIS DE DATOS

A partir de los datos alineados por iCOshift se aplicó Escalado de Pareto y Transformación Logarítmica para realizar posteriormente un PCA en el programa PASW Statistics para Windows, versión 18.0. Chicago: SPSS Inc., encontrándose que con el primer componente se explica cerca del 68% de la variabilidad total y con

los primeros 3 componentes se explica cerca del 77% de la variabilidad total (Tabla 6), de modo que son suficientes para expresar la matriz original de datos multidimensionales en una representación bidimensional.

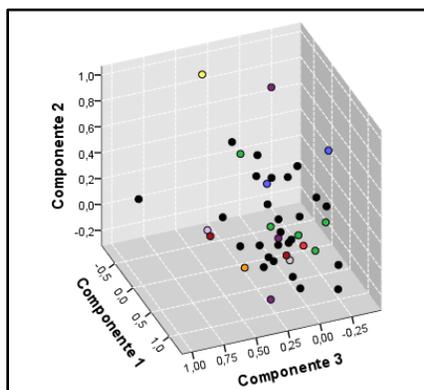
**Tabla 6. Varianza Total Explicada para el Conjunto de Datos**

Varianza Total Explicada							
Componente	Autovalores iniciales			Sumas de las saturaciones al cuadrado de la extracción			Suma de las saturaciones al cuadrado de la rotación <sup>a</sup>
	Total	% de la varianza	% acumulado	Total	% de la varianza	% acumulado	Total
Dimensiones	1	29,630	68,907	68,907	29,630	68,907	28,064
	2	2,372	5,516	74,423	2,372	5,516	20,743
	3	1,170	2,720	77,143	1,170	2,720	18,503

Método de extracción: Análisis de Componentes principales.

a. Cuando los componentes están correlacionados, las sumas de los cuadrados de las saturaciones no se pueden añadir para obtener una varianza total.

**Figura 51. Análisis de Componentes Principales entre los individuos sanos y con diagnósticos bioquímicos presuntivos de EIM.**



Análisis de Componentes Principales para las muestras procesadas a 400 MHz: Deficiencia de Holocarboxilasa Sintetasa (●), Acidemia Isovalérica (●), Acidemia Glutárica Tipo I (●), Acidemia 3-Metilglutacónica (●), Desorden en el metabolismo de Fenilalanina (●), Acidemia Propiónica (●), Acil-Coenzima A Deshidrogenasa de Cadena Media (●), Acidosis Láctica (●), Controles (●).

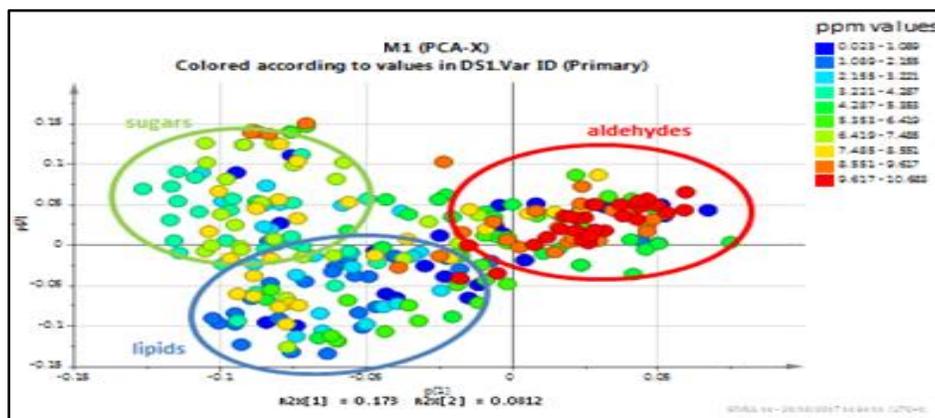
Entre las muestras consideradas patológicas, la Deficiencia de Holocarboxilasa Sintetasa, así como el Desorden en el metabolismo de Fenilalanina y la Acidosis Láctica muestran una separación mayor con respecto a los controles y a las otras entidades con diagnóstico bioquímico de EIM. (Figura 51).

Al realizar el PCA a través de SIMCA-P versión 14, para el conjunto de datos procesados a 400 MHz, no hubo una buena distribución entre individuos sanos y

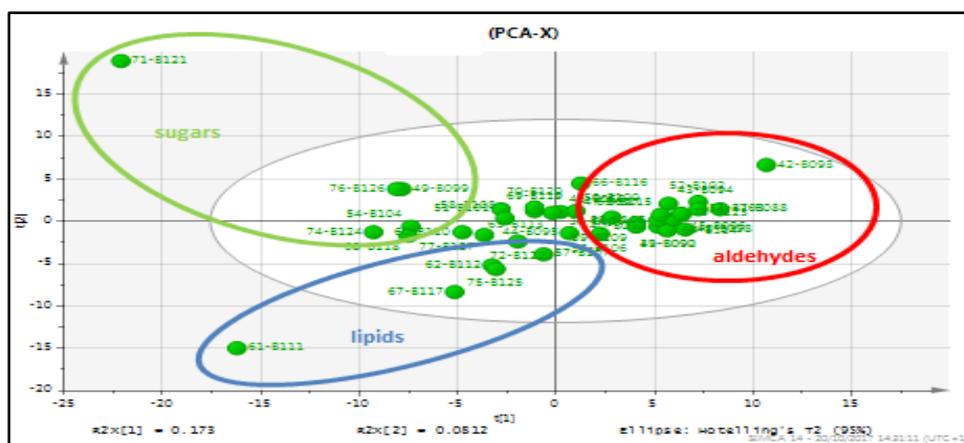
diagnostico bioquímico presuntivo de EIM. Sin embargo, se observó que las muestras se agruparon por compuestos químicos en aldehídos, lípidos y carbohidratos (Figura 52).

Figura 52. Análisis de Componentes Principales.

a)

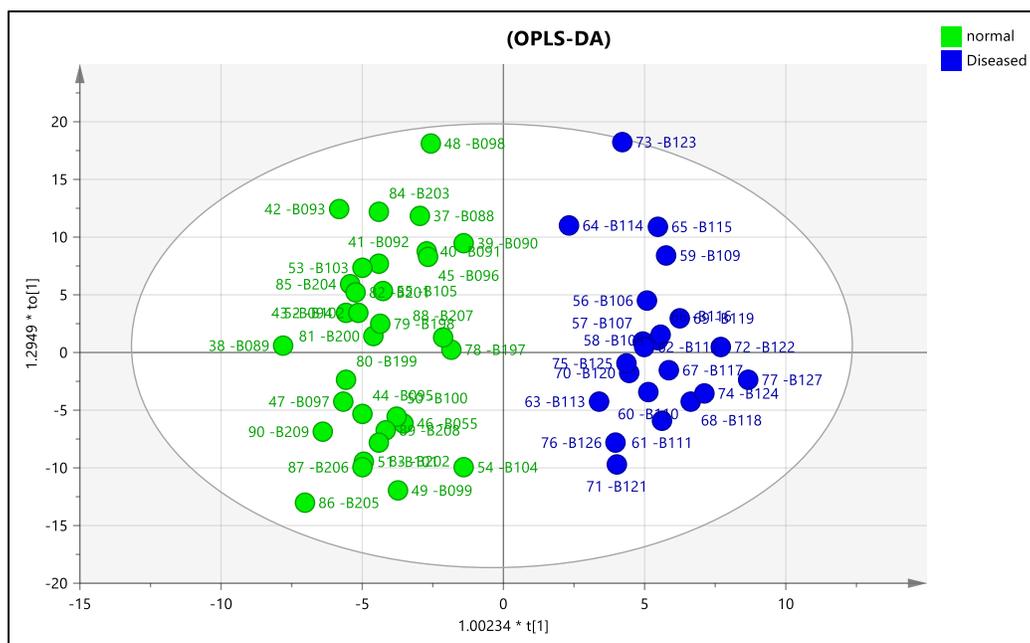


b)



En el Análisis discriminante de mínimos cuadrados con corrección ortogonal (OPLS-DA) obtenido para las muestras de individuos sanos y muestras con diagnostico bioquímico de EIM, representado en la Figura 53, se obtuvo una buena separación entre los dos grupos de muestras R2 (0,905) y Q2 (0,831). Para realizar este procesamiento, previamente se definió la clase de cada una de las muestras y se obtuvieron los coeficientes. (Anexo 5 y Anexo 6).

**Figura 53. Score Plot Correspondiente al Modelo OPLS-DA.** Comparación entre los Perfiles Metabólicos de los Espectros de Individuos Sanos y Muestras con Diagnostico Bioquímico de EIM.



## 9 DISCUSION

La  $^1\text{H-NMR}$  es una eficaz herramienta que permite explorar las alteraciones en los patrones de metabolitos de bajo peso molecular presentes en los fluidos biológicos y además de proporcionar información diagnóstica, muestra una visión mecanicista de la bioquímica de los procesos de la enfermedad.[80]. Tiene la ventaja inherente de proporcionar acceso simultáneo a información tanto cualitativa como cuantitativa. Este último se define por la regla de la relación primaria: donde la intensidad de la señal es directamente proporcional al número de núcleos que dan lugar a una resonancia específica[81].

Las muestras biológicas tienen composiciones bioquímicas únicas y distintivas, que cambian en respuesta a estímulos fisiológicos o fisiopatológicos; por lo tanto, la "instantánea del metaboloma" proporciona una "huella dactilar", útil para investigar las respuestas metabólicas de los sistemas vivos a la enfermedad y los estímulos externos[82].

La espectroscopía de  $^1\text{H-NMR}$  tiene la capacidad de captar el perfil metabólico detectando tanto metabolitos conocidos como desconocidos de forma no selectiva, y su principal limitación es la baja sensibilidad inherente del método, que va a depender de la intensidad del campo, la tecnología de la sonda, la equivalencia química del protón y la superposición de señal. En este trabajo se pudo demostrar que se pueden obtener perfiles específicos de acidemias orgánicas, aminoacidopatías, trastornos de oxidación de ácidos grasos y acidosis láctica a una frecuencia de observación de 400 MHz realizando el paso de los datos numéricos del espectro en MATLAB® versión R2016b [57], constituyéndose en una herramienta adecuada para realizar una aproximación diagnóstica oportuna de estas entidades en nuestro medio, haciéndola una técnica complementaria a GC-MS, que es el gold standard en estas entidades; el uso de ambas técnicas puede mejorar la identificación de los metabolitos de interés[83].

El resultado de un espectro de orina puede ser complejo debido a una serie de variables que incluyen edad, sexo, dieta, etc., es evidente por inspección visual que la intensidad de diferentes metabolitos analizados, cambiaron con la edad; dentro de estos se encuentran la Creatina – Creatinina, la región de carbohidratos, la Acetona (que predominó en los individuos que recibían leche de fórmula), al igual que la señal de Betaína/TMAO; esto es similar con lo encontrado por Gu y colaboradores[84], quienes observaron que hay cambios significativos en las concentraciones de creatinina, creatina, glicina, Betaína / TMAO, citrato, succinato y acetona según la edad; sin embargo, aún no se han establecido los roles biológicos definitivos que relacionan estos metabolitos con la edad. [84].

Al realizar una inspección de los espectros de individuos según el tipo de leche que recibían, se observó que en la región de los carbohidratos fue notable el incremento de señales en quienes consumieron leche materna con respecto a aquellos que consumieron leche de fórmula, esto puede deberse a que la leche materna tiene un alto contenido de lactosa y oligosacáridos (1g/dL), lo que asegura una ingesta nutricional adecuada de carbohidratos. La lactosa se considera el componente más importante de la leche humana, con una concentración de 7 g/100 mL en promedio (6.7-7.6 g/100 mL) en leche madura y es una fuente indirecta de galactosa, útil para la síntesis de galactolípidos que contribuyen al desarrollo del sistema nervioso. Los oligosacáridos por su parte, son agentes "prebióticos" que estimulan selectivamente el crecimiento de organismos benéficos (probióticos) y junto con sus conjugados de proteínas se reconocen como inhibidores de unión a patógenos que tienen afinidad por unirse a receptores de oligosacáridos expresados en la superficie intestinal del bebé [85, 86].

También se observó una intensidad aumentada para la Betaína /TMAO en los individuos sanos que recibieron leche materna, que disminuyó a medida que la edad

aumentó. Estos datos son consistentes con el estudio de Marincola [87] donde observan una disminución de Betaína después de los 2 meses de edad. Con base en el resultado de este trabajo y teniendo en cuenta el estudio de Davenport y colaboradores [88], que describen que el aumento en la ingesta de colina, aumenta por ende la Betaína ya que es un producto de oxidación de la primera y actúa como un donador de osmolitos, siempre y cuando se encuentre en mayor concentración en tejido que en plasma, o ser donador de grupos metilo a la homocisteína para formar metionina y S-adenosilmetionina; [89] se puede inferir que la dieta de la madre es un factor importante a la hora de observar el perfil metabólico para los individuos con edades menores a un mes que son alimentados con leche materna.

Se observó también en todos los grupos descritos una señal más alta de Creatinina con respecto a Creatina y que a su vez la intensidad de la señal de Creatinina aumentó con la edad. Para el grupo de individuos que consumieron leche de fórmula se encontró una disminución en la intensidad de las señales Creatina – Creatinina comparado con los individuos que consumieron leche materna. Esta observación se correlaciona con lo estudiado por Zhao y colaboradores quienes encontraron que las proporciones de Creatina y Creatinina son notablemente más bajas en las leches de fórmula posiblemente por el tratamiento térmico durante la esterilización de la leche, que causa una disminución de Creatina y un aumento del contenido de Creatinina [90].

De igual manera se observó que la señal de Glicina fue más intensa en los individuos sanos menores a un mes de edad comparada con las edades entre dos y tres meses. Se conoce que la Glicina, así como otros aminoácidos glucogénicos (treonina, hidroxiprolina y tirosina) aumentan junto con metabolitos del ciclo del ácido tricarbóxico (2-oxoglutarato, citrato, fumarato y succinato) este aumento que se produce entre la primera y tercera semana de vida puede ser debido al cambio abrupto del suministro placentario de nutrientes a un suministro cíclico de nutrientes a través de la leche materna [91].

De acuerdo a la edad se detectó, además, un cambio en la intensidad de las señales ubicadas en la región aromática (Fenilacetilglutamina y Ácido Hipúrico), siendo mayores las señales en los individuos sanos con edad superior a 7 meses. Esto es similar a lo encontrado por Parra J.[47] quien reportó que la excreción de Fenilacetilglutamina en orina, fue mayor en el grupo entre 9 y 12 meses de edad. La Fenilacetilglutamina es un constitutivo normal de la orina, que se produce a partir del metabolismo de la flora intestinal bacteriana anaeróbica, la cual aumenta proporcionalmente con la edad a medida que el lactante forma su propia flora bacteriana [45]. Por otra parte el aumento en la intensidad de Ácido Hipúrico que es generado a partir del Benzoato, (aditivo de diversos alimentos para proporcionar un

sabor salado y cumplir además la función de conservante) o por metabolismo bacteriano intestinal derivado de muchas fuentes de polifenoles dietéticos, como té, café, vino, frutas y verduras e indirectamente también se ha asociado con una dieta alta en fibra [92] puede aumentarse, debido a la ingesta de alimentos complementarios que reciben los infantes para cubrir las necesidades básicas de nutrición [47].

Por otra parte, se observó una señal muy intensa en los espectros de individuos sanos entre el mes de edad y hasta los cinco meses, que recibían leche de fórmula; dicha señal presentó un desplazamiento químico correspondiente a 2.24 ppm (Acetona). Se ha reportado que las leches de fórmula son preparadas a base de leche de vaca y que tanto la leche de vaca como las leches de fórmula pueden contener acetona; adicionalmente, se ha reportado que, en la leche de vaca, los cuerpos cetónicos pueden ser biomarcadores de las condiciones cetósicas subclínicas de las vacas durante la lactancia temprana. Con base en lo anterior y aunque el objetivo de este trabajo no estuvo enfocado hacia las leches que consumían los individuos sanos, se hace necesario realizar futuros ensayos que permitan observar y cuantificar los niveles de acetona y estudiar más a fondo, qué tanto se tiene en cuenta el metabolismo energético de los animales a partir de los cuales se obtiene la leche que es empleada para los preparados de fórmula infantiles [90, 93, 94].

Utilizando  $^1\text{H-NMR}$  en EIM para evaluar diferentes enfermedades se encontró que en la Acidemia Propiónica, se observaron las señales para Propionilglicina y Ácido Propiónico, sugestivos de esta acidemia. Por otra parte, en la Acidemia Isovalérica, se evidenciaron tres perfiles distintos, sugiriendo que la  $^1\text{H-NMR}$  puede servir como herramienta para la identificación de diferentes estados de enfermedad; adicional a esto, se logró observar Isovaleril-alanina, metabolito que se presenta únicamente en estados agudos de la patología, lo que haría de esta prueba una herramienta útil para la detección del estado crítico de la enfermedad, permitiendo una intervención temprana. [74].

Con respecto a la Acidemia 3-Metilglutacónica, en este trabajo se observó que la detección cualitativa de estas entidades fue mejor por GC/MS, ya que permitió observar aumento del Ácido 3-Metilglutacónico y 3-Metilglutárico, mientras que por  $^1\text{H-NMR}$  sólo se observó el Ácido 3-Metilglutacónico. Reportes de literatura con equipos de mayor resolución, además de ajustes en el pH de la muestra a 2.5 y combinaciones de espectros (1D  $^1\text{H}$ , 2D  $^1\text{H-}^1\text{H}$  COSY y  $^1\text{H-}^{13}\text{C}$  HSQC) han permitido diferenciar las isoformas (*cis*, *trans*) las cuales pueden ayudar a distinguir entre las diferentes clases de esta acidemia [21].

Caso similar ocurre en la Acidemia Glutárica Tipo I, donde por  $^1\text{H-NMR}$  sólo se observó Ácido Glutárico; según Engelke y colaboradores la presencia del ácido 3-Hidroxi-glutárico (metabolito específico de esta entidad), también se observa mejor a pH 2.5 empleando las combinaciones antes mencionadas. [4, 21, 77].

De igual manera, el Ácido Metilcátrico que se excreta en Acidemia Propiónica y Deficiencia de Holocarboxilasa Sintetasa, sólo fue posible observarlo en GC-MS; los reportes en literatura indican que este ácido presenta dos estereoisómeros en orina que se sólo pueden observarse a pH 2.5 o 12.5 mediante  $^1\text{H-NMR}$  [73] o previa liofilización de la muestra [72]. Ninguna de estas condiciones se utilizó en este ensayo.

La Deficiencia de Holocarboxilasa Sintetasa es un trastorno autosómico recesivo del metabolismo de la biotina que da como resultado una Deficiencia Múltiple de Carboxilasas. Si no se trata, los bebés progresarán a una acidosis metabólica severa, edema cerebral, coma y muerte. La deficiencia de esta enzima se analiza mediante la detección por espectroscopía de masas en tándem de hidroxipentanoil-carnitina que se encuentra elevada (C5-OH). El perfil de ácidos orgánicos en la orina puede mostrar niveles elevados de Ácido láctico, Ácido 3-Hidroxiisovalérico, Ácido 3-Hidroxi-propiónico, 3-Metilcrotonilglicina, Ácido Metilcátrico, y Tigililglicina. En este trabajo se realizó una caracterización inicial del perfil para esta entidad a partir de los desplazamientos químicos reportados en HMDB y en el libro de Espectroscopia  $^1\text{H-NMR}$  en Errores Innatos del Metabolismo de Engelke [4]. De hecho este autor describe que, con la capacidad de instrumento que se tiene hoy día, todavía falta por identificar señales para diferentes compuestos involucrados en esta entidad [4, 45]. Es de resaltar, que en la literatura no se encontraron reportes que describieran el perfil por  $^1\text{H-NMR}$  característico de la enfermedad, por lo que el presentado en este trabajo, podría representar una aproximación inicial del perfil cualitativo de esta patología.

Recientemente se ha utilizado la  $^1\text{H-NMR}$  para el apoyo diagnóstico de las aminoacidopatías tales como Tirosinemia Tipo I, Defectos del Ciclo de la Urea [95], Fenilcetonuria, entre otras [4]. Este estudio incluyó muestras con diagnóstico bioquímico para Fenilcetonuria y Enfermedad de Orina con Olor a Jarabe de Arce; los perfiles obtenidos para estas entidades concuerdan con lo reportado en literatura. Cabe resaltar que el cromatograma obtenido para el diagnóstico bioquímico del desorden en el metabolismo de Fenilalanina, puede llevar a pensar también en daño hepático, sin embargo al observar el perfil por  $^1\text{H-NMR}$ , sólo se observan señales para el ácido 3PL y n-PHE, sin que se observen señales para el resto de metabolitos observados por GC-MS, haciendo que sea un perfil característico de esta entidad [4].

Por otra parte, para la Enfermedad de Orina con Olor a Jarabe de Arce se observó una señal identificada como Cetoleucina no visible por GC-MS, en uno de los perfiles obtenidos para esta entidad, este metabolito compromete el metabolismo energético del cerebro al bloquear la cadena respiratoria [45]; de igual manera, se observaron ligeras elevaciones de Ácido Láctico que según lo reportado por Sgaravatti y colaboradores en el modelo murino, pueden ser debidas al acúmulo de los  $\alpha$ -cetoácidos que reducen la actividad del ciclo de Krebs y aumentan la glucólisis anaeróbica, indicando una posible alteración del metabolismo energético a nivel cerebral [96].

La Deficiencia de Acil-Coenzima A Deshidrogenasa de Cadena Media es un trastorno del catabolismo de ácidos grasos; su diagnóstico se establece mediante la detección de las carnitinas C6, C8 y C10 en fluidos biológicos [97]. El perfil identificado en este estudio muestra señales convergentes para Hexanoilcarnitina (C6) y Octanoilcarnitina (C8), además de varias señales para diferentes glicinas lo que unido a la sospecha clínica de la entidad permitiría un primer abordaje diagnóstico que luego debe ser confirmado mediante análisis específicos del perfil de carnitinas.

Para la Acidosis Láctica se observó un aumento en la intensidad de las señales para ácido láctico. El ácido láctico es el punto final normal de la descomposición anaeróbica de la glucosa en los tejidos. Este compuesto sale de las células y se transporta al hígado, donde se oxida de nuevo a piruvato y finalmente se convierte en glucosa a través del Ciclo de Cori. Elevaciones de este metabolito pueden estar relacionadas con Acidosis Láctica secundaria a EIM, como defectos en la gluconeogénesis, en la enzima piruvato deshidrogenasa, ciclo del ácido tricarbóxico (TCA) o la cadena respiratoria. Estos trastornos generalmente reflejan situaciones en las que la eliminación de piruvato por rutas biosintéticas u oxidativas se ve afectada. El desarrollo de acidosis láctica depende de la magnitud de la hiperlactatemia, la capacidad de amortiguamiento del cuerpo y la coexistencia de otras afecciones que producen taquipnea y alcalosis [98].

En la fase final del estudio se realizó un OPLS DA que permitió la discriminación entre individuos sanos y con diagnóstico bioquímico de EIM, mostrando la validez del uso de herramientas estadísticas para el análisis de los datos obtenidos a partir de resonadores con baja resolución.

La otra herramienta estadística utilizada fue el Análisis de Componentes Principales, donde se observó un aumento en la zona para carbohidratos y lípidos en los individuos sanos, lo mismo que cambios a medida que aumenta la edad, en la región correspondiente a los lípidos, (0.8 ppm y 2.25 ppm).

El aumento de carbohidratos puede ser debido a que según la Encuesta Nacional de la Situación Nutricional en Colombia 2010 (ENSIN 2010) en general la población estudiada tiene un pobre aporte de proteína en comparación con el aporte carbohidratos, siendo los alimentos de mayor consumo cereales, líquidos no lácteos (agua, jugos, agua de panela, entre otros) [99].

Para los EIM, la presencia de carbohidratos puede deberse al manejo que se da en estas entidades, pues dentro del tratamiento de emergencia se suplementa con glucosa [100], con el fin de proporcionar la energía adecuada para satisfacer el aumento de las demandas metabólicas y prevenir el catabolismo proteico endógeno.

Bouatra y colaboradores refieren que el metaboloma de la orina humana es un subconjunto del metaboloma sérico humano, tanto en términos de composición como de diversidad química. La mayoría de los metabolitos urinarios son muy hidrofílicos, aunque hay claras cantidades de lípidos y ácidos grasos que contribuyen con un número significativo de sustancias químicas al metaboloma urinario (836 ácidos grasos y lípidos), probablemente porque los riñones concentran ciertos metabolitos de la sangre [67], lo que podría explicar el aumento de estos compuestos en las muestras de orina procesadas en este trabajo.

Aunque no fue posible discriminar por  $^1\text{H-NMR}$  que lípidos se encontraron en las muestras, Calvo y colaboradores, al igual que Parra J.; quienes trabajaron con las mismas muestras de este estudio, encontraron una excreción significativa de metabolitos derivados de la degradación de ácidos grasos en infantes que reciben leche de fórmula (Ácido Láurico) y en lactantes quienes obtiene nutrientes y energía a partir de la degradación de lípidos (Ácido Esteárico y Ácido Palmítico) y proteínas. Tanto el Ácido Esteárico como el Ácido Palmítico muestran los mayores niveles en la población con consumo de leche materna, los cuales disminuyen paulatinamente conforme aumenta la edad [46, 47].

La metabolómica ya se usa actualmente para lograr diagnósticos oportunos y monitorizar el manejo nutricional en muchos IEM. Se hace necesario que las técnicas trabajadas en metabolómica (RMN  $^{-1}\text{H}$ , GC-MS, HPLC y LC-MS) se complementen, con el fin de hacer una identificación y diagnóstico de variantes de estas enfermedades, en particular de aquellas en las que se excretan concentraciones relativamente bajas de metabolitos característicos [101, 102]. No obstante, en nuestro medio estamos empezando a aplicar RMN  $^{-1}\text{H}$  como un instrumento de aproximación diagnóstica para estas entidades. Vale la pena resaltar que esta técnica puede detectar compuestos en una misma muestra de orina (sin que sufra procesos de destrucción) y de manera simultánea para diferentes vías

metabólicas, lo que permite hacer un enfoque metabolómico incluso a partir de perfiles cualitativos.

## 10 CONCLUSIONES

La descripción cualitativa que se hace en este trabajo para cada una de las entidades, permitió observar perfiles específicos por RMN  $^{-1}\text{H}$  a una frecuencia de observación de 400 MHz a través del pre-tratamiento de los datos del espectro en MATLAB, para individuos sanos según edad y para individuos con diagnósticos presuntivos de EIM. Se hizo una caracterización inicial la Deficiencia de Holocarboxilasa Sintetasa a través del uso de RMN  $^{-1}\text{H}$ ; adicionalmente, se mostró que es posible hacer un seguimiento al estado de la enfermedad mediante la observación de perfiles como fue el caso de la Acidemia Isovalérica y finalmente, al aplicar OPLS-DA en las muestras procesadas a 400 MHz, se pudo hacer una discriminación entre individuos sanos y con diagnóstico bioquímico presuntivo de EIM.

## 11 RECOMENDACIONES Y TRABAJOS FUTUROS

Este estudio tiene fortalezas, pero también algunas limitaciones potenciales, por lo que se hace necesario para futuras investigaciones que aporten a este trabajo:

1. Estandarizar el proceso de cuantificación de metabolitos por RMN  $^{-1}\text{H}$  y GC-MS a través de estándares externos.
2. Mejorar el análisis estadístico multivariado haciendo duplicados de las muestras con el fin de obtener modelos precisos para la discriminación entre las entidades estudiadas.
3. Hacer un análisis estadístico multivariado para las Acidemias Orgánicas procesadas por GC/MS.
4. Procesar espectros en dos dimensiones (2D), para hacer una diferenciación de isómeros e identificación más amplia de metabolitos.

5. Realizar estudios clínicos prospectivos a gran escala en un futuro, con el propósito de implementar perfiles metabólicos por RMN –  $^1\text{H}$  como una herramienta diagnóstica no invasiva en las prácticas clínicas.

## 12 BIBLIOGRAFIA

1. Constantinou, M., et al., *Application of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Combined with Principal Component Analysis in Detecting Inborn Errors of Metabolism Using Blood Spots: A Metabonomic Approach*. *Analytica Chimica Acta*, 2004. **511**(2): p. 303-312.
2. Kostidis, S. and E. Mikros, *NMR Studies of Inborn Errors of Metabolism*. eMagRes, 2015.
3. Moolenaar, S., U. Engelke, and R. Wevers, *Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Body Fluids in the Field of Inborn Errors of Metabolism*. *Annals of Clinical Biochemistry*, 2003. **40**(1): p. 16-24.
4. Engelke, U., Kluijtmans, Leo., Huigen, Marleen., Goudswaard, Angelina., Van Der Graaf, Marinette., Heerschap, Arend., Morava-Kozicz, Eva., Wortmann-Hagemann, Saskia, and Wevers Ron, *Handbook of  $^1\text{H}$ -NMR Spectroscopy in Inborn Errors of Metabolism*. Third Edition ed. *Body Fluid NMR Spectroscopy and Brain MR Spectroscopy*. 2014: Bruker 168.
5. Kolokolova, T., O.Y. Savel'ev, and N. Sergeev, *Metabolic Analysis of Human Biological Fluids by  $^1\text{H}$ -NMR Spectroscopy*. *Journal of Analytical Chemistry*, 2008. **63**(2): p. 104-120.
6. Barrera, L.A., et al., *Errores Innatos del Metabolismo: Un abordaje Integral del Diagnóstico al Tratamiento*. 2014: Pontificia Universidad Javeriana.
7. Lanpher, B., N. Brunetti-Pierrri, and B. Lee, *Inborn Errors of Metabolism: the Flux from Mendelian to Complex Diseases*. *Nature reviews. Genetics*, 2006. **7**(6): p. 449.
8. Pizarro, O., *Enfermedades Metabólicas Congénitas en el Periodo Neonatal*. *Protocolos de Neonatología*. Asociación Española de Pediatría. Sociedad Española de Neonatología, 2008.
9. Raghuvver, T.S., U. Garg, and W.D. Graf, *Inborn Errors of Metabolism in Infancy and Early Childhood: An Update*. *Am Fam Physician*, 2006. **73**(11): p. 1981-90.
10. Wajner, M., et al., *Selective Screening for Organic Acidemias by Urine Organic Acid GC-MS Analysis in Brazil: Fifteen-year Experience*. *Clinica Chimica Acta*, 2009. **400**(1): p. 77-81.
11. Villani, G.R., et al., "*Classical Organic acidurias*": *Diagnosis and Pathogenesis*. *Clinical and Experimental Medicine*, 2016: p. 1-19.
12. Wendel, U. and H.O. de Baulny, *Branched-Chain Organic Acidurias/Acidemias*, in *Inborn Metabolic Diseases*. 2006, Springer. p. 245-262.
13. Campistol, J., Boveda, M. C., Couce, M. L., Lluch, M. D., & Merinero, B. , *Protocolo de Diagnóstico y Tratamiento de la Acidemia Propiónica, Metilmalónica e Isovalérica*. *An Esp Pediatr.*, 1997. **89**(1): p. 9-15.
14. Shchelochkov, O.A., N. Carrillo, and C. Venditti, *Propionic Acidemia*. 2016.
15. Camire. *Branched Chaid A.A./Propionyl CoA Carboxylase Deficiency*. 2005 [cited 2017; Available from:

- [https://www.peds.ufl.edu/divisions/genetics/programs/newborn\\_screening/Metabolic\\_diagram\\_page.html](https://www.peds.ufl.edu/divisions/genetics/programs/newborn_screening/Metabolic_diagram_page.html).
16. Dercksen, M., et al., *Organic acid Profile of Isovaleric Acidemia: A Comprehensive Metabolomics Approach*. *Metabolomics*, 2013. **9**(4): p. 765-777.
  17. Boy, N., et al., *Proposed Recommendations for Diagnosing and Managing Individuals with Glutaric Aciduria Type I: Second Revision*. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2017. **40**(1): p. 75-101.
  18. Kölker, S., et al., *The Phenotypic Spectrum of Organic Acidurias and Urea Cycle Disorders. Part 2: The Evolving Clinical Phenotype*. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2015. **38**(6): p. 1059-1074.
  19. Ortiz, Á., et al., *Aciduria Glutárica Tipo I*. *Acta Neurol. Colomb*, 2012. **28**(3): p. 157-165.
  20. Hamburg-Eppendorf, U.M.C. [06/04/2017]; Available from: [:https://www.uke.de/english/departmentsinstitutes/departments/pediatrics/research/section-biochemistry/projects/project-braulke-m%C3%BChlhausen.html](https://www.uke.de/english/departmentsinstitutes/departments/pediatrics/research/section-biochemistry/projects/project-braulke-m%C3%BChlhausen.html).
  21. Wortmann, S.B., et al., *The 3-Methylglutaconic Acidurias: What's New?* *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2012. **35**(1): p. 13-22.
  22. Van Karnebeek, C.D., et al., *The Treatable Intellectual Disability APP : A digital Tool To Enhance Diagnosis & Care for Rare Diseases*. *Orphanet journal of rare diseases*, 2012. **7**(1): p. 47.
  23. Gramer, G., et al., *Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency: Evaluation of Genotype-Phenotype Correlation in Patients Detected by Newborn Screening*, in *JIMD Reports, Volume 23*. 2015, Springer. p. 101-112.
  24. Soler-Alfonso, C., M.J. Bennett, and C. Ficicioglu, *Screening for medium-chain acyl CoA dehydrogenase deficiency: current perspectives*. *Research and Reports in Neonatology* 2016. **6**: p. 1-10.
  25. Fernandes, J., et al., *Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and Treatment*. 2006, Springer Science & Business Media.
  26. Spiekeroetter, U., *Mitochondrial Fatty Acid Oxidation Disorders: Clinical Presentation of Long-Chain Fatty Acid Oxidation Defects Before and After Newborn Screening*. *Journal of inherited metabolic disease*, 2010. **33**(5): p. 527-532.
  27. Vitoria, I., et al. *Deficiencia de Holocarboxilasa Sintetasa de Presentación Tardía con Actividad Piruvato Carboxilasa Normal*. in *Anales de Pediatría*. 2014. Elsevier.
  28. Gambello, M.J., *Genetics Diagnosis, Inborn Errors of Metabolism and Newborn Screening: An Update, An Issue of Clinics in Perinatology, E-Book*. Vol. 42. 2015: Elsevier Health Sciences.
  29. Aljammaz, S.A.I., *Nutritional Management of Aminoacidopathies in Saudi Arabia*. 2014, UCL (University College London).
  30. Van Vliet, D., et al., *Single Amino Acid Supplementation in Aminoacidopathies: A Systematic Review*. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 2014. **9**(1): p. 7.
  31. Sitta, A., et al., *Neurological Damage in MSUD: The Role of Oxidative Stress*. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2014. **34**(2): p. 157-165.
  32. Villani, G.R., et al., *"Classical organic acidurias": diagnosis and pathogenesis*. *Clinical and Experimental Medicine*, 2016: p. 1-19.
  33. Christopher, R. and B.P. Sankaran, *An Insight into the Biochemistry of Inborn Errors of Metabolism for a Clinical Neurologist*. *Annals of Indian Academy of Neurology*, 2008. **11**(2): p. 68-81.
  34. Kraut, J.A. and N.E. Madias, *Lactic Acidosis: Current Treatments and Future Directions*. *American Journal of Kidney Diseases*, 2016. **68**(3): p. 473-482.

35. Muñoz, S.V., *Identificación no Invasiva de Biomarcadores de Endometriosis Mediante Metabolómica por RMN*. 2015, Universitat de València, Facultat de Ciències Biològiques.
36. Emwas, A.-H.M., et al., *NMR-Based Metabolomics in Human Disease Diagnosis: Applications, Limitations, and Recommendations*. *Metabolomics*, 2013. **9**(5): p. 1048-1072.
37. Medina, S., et al., *Metabolomics and the Diagnosis of Human Diseases-A Guide to the Markers and Pathophysiological Pathways Affected*. *Current Medicinal Chemistry*, 2014. **21**(7): p. 823-848.
38. Skoog, D.A., F. Holler, and A.D.A. Timothy, *Principios de Análisis Instrumental*. 2001: McGraw-Hill Interamericana de España.
39. Cocho de Juan, J.Á., *Desarrollo de un Método por Espectrometría de Masas en Tándem para la Determinación de Acilcarnitinas y la Detección Neonatal de Alteraciones del Metabolismo de Ácidos Orgánicos y Ácidos Grasos*. Univ Santiago de Compostela.
40. Julián, I. and S. Martínez, *Diccionario de Química*. 2003: Editorial Complutense.
41. Puchades Carrasco, L., *Aplicaciones de la RMN a la Identificación de Nuevos Biomarcadores de Utilidad Clínica en Oncología*. 2014.
42. Eduardo, S.P.d.N., *Análisis Metabolómico Via RMN: Amostras de Orina e Látex*. 2011, Universidad Federal de San Carlos. p. 152.
43. Capati, A., O.B. Ijare, and T. Bezabeh, *Diagnostic Applications of Nuclear Magnetic Resonance-Based Urinary Metabolomics*. *Magnetic Resonance Insights*, 2017. **10**(10.1177\_1178623X17694346.xml): p. 1178623X17694346.
44. Markley, J.L., et al., *BioMagResBank (BMRB) as a Partner in the Worldwide Protein Data Bank (wwPDB): New Policies Affecting Biomolecular NMR Depositions*. *Journal of Biomolecular NMR*, 2008. **40**(3): p. 153-155.
45. Wishart, D.S., et al., *HMDB: The Human Metabolome Database*. *Nucleic Acids Research*, 2007. **35**(suppl\_1): p. D521-D526.
46. Calvo, A.C., Stefany, *Análisis del Perfil de Excreción de Ácidos Orgánicos de Cadena Corta y Media en Neonatos que reciben Fórmulas Infantiles*, in *Facultad de Ciencias*. 2016, Pontificia Universidad Javeriana. p. 109.
47. Parra, M.J., *Análisis de las Variaciones en el Perfil de Excreción de Ácidos Orgánicos de Cadena Corta y Media en Población Lactante Menor*, in *Facultad de Ciencias*. 2017, Pontificia Universidad Javeriana.
48. Chalmers, R., *Organic acids in man: analytical chemistry, biochemistry and diagnosis of the organic acidurias*. 2012: Springer Science & Business Media.
49. Prieto J. A., A.F., Aldámiz-Echevarría L., Sanjurjo P., *Análisis de Ácidos Orgánicos en Orina Mediante Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas*. *Química Clínica* 2007. **26**(2): p. 66-72.
50. Prieto, J., F. Andrade, and L. Aldámiz-Echevarría, *Análisis de Ácidos Orgánicos en Orina Mediante Cromatografía de Gases - Espectrometría de masas*. *Química Clín*, 2007. **26**: p. 66-72.
51. Aygen, S., et al., *NMR-Based Screening for Inborn Errors of Metabolism: Initial Results from a Study on Turkish Neonates*. *JIMD Reports*, 2014. **16**: p. 101-111.
52. Xiao, C., et al., *An Optimized Buffer System for NMR-Based Urinary Metabolomics with Effective pH Control, Chemical Shift Consistency and Dilution Minimization*. *Analyst*, 2009. **134**(5): p. 916-925.
53. Lauridsen, M., et al., *Human urine as Test Material in <sup>1</sup>H NMR-based Metabolomics: Recommendations for Sample Preparation and Storage*. *Analytical Chemistry*, 2007. **79**(3): p. 1181-1186.

54. Shoemaker, R., *MestReNova-Mestrelab Research*. 2008, ROYAL SOC CHEMISTRY THOMAS GRAHAM HOUSE, SCIENCE PARK, MILTON RD, CAMBRIDGE CB4 0WF, CAMBS, ENGLAND. p. 66-+.
55. Smolinska, A., et al., *NMR and Pattern Recognition Methods in Metabolomics: From Data Acquisition to Biomarker Discovery: A Review*. *Analytica Chimica Acta*, 2012. **750**: p. 82-97.
56. Savorani, F., G. Tomasi, and S.B. Engelsen, *icoshift: A Versatile Tool for the Rapid Alignment of 1D NMR Spectra*. *Journal of Magnetic Resonance*, 2010. **202**(2): p. 190-202.
57. Moler, C.B., *MATLAB an interactive matrix laboratory*. 1980: Department of Mathematics and Statistics, University of New Mexico.
58. Savorani, F., G. Tomasi, and S.B. Engelsen, *Alignment of 1D NMR Data Using the Icoshift Tool: A Tutorial*, in *Magnetic Resonance in Food Science, Food for Thought*, H.A. J. van Duynhoven, PS Belton and GA Webb, Royal Society of Chemistry, Cambridge, Editor. 2013. p. 14-24.
59. Sciences, N.I.o.G.M. [cited 2017; Available from: <http://www.bmrw.wisc.edu/>].
60. Banfi, D. and L. Patiny, *www. nmrdb. org: Resurrecting and Processing NMR Spectra On-line*. *CHIMIA International Journal for Chemistry*, 2008. **62**(4): p. 280-281.
61. Zuppi, C., et al., *1 H NMR Spectra of Normal Urines: Reference Ranges of the Major Metabolites*. *Clinica Chimica Acta*, 1997. **265**(1): p. 85-97.
62. Bales, J.R., et al., *Use of High-Resolution Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for Rapid Multi-Component Analysis of Urine*. *Clinical chemistry*, 1984. **30**(3): p. 426-432.
63. Kang, S.-M., et al., *1 H Nuclear Magnetic Resonance Based Metabolic Urinary Profiling of Patients with Ischemic Heart Failure*. *Clinical biochemistry*, 2011. **44**(4): p. 293-299.
64. Watanabe, M., et al., *Metabolic Profiling Comparison of Human Pancreatic Ductal Epithelial Cells and Three Pancreatic Cancer Cell Lines Using NMR Based Metabolomics*. *Journal of molecular biomarkers & diagnosis*, 2012. **3**(2).
65. Sachse, D., et al., *The Role of Plasma and Urine Metabolomics in Identifying New Biomarkers in Severe Newborn Asphyxia: A Study of Asphyxiated Newborn Pigs Following Cardiopulmonary Resuscitation*. *PloS one*, 2016. **11**(8): p. e0161123.
66. Nadal-Desbarats, L., et al., *Combined 1 H-NMR and 1 H-13 C HSQC-NMR to Improve Urinary Screening in Autism Spectrum Disorders*. *Analyst*, 2014. **139**(13): p. 3460-3468.
67. Bouatra, S., et al., *The Human Urine Metabolome*. *PloS one*, 2013. **8**(9): p. e73076.
68. Norusis, M.J., *PASW Statistics 18 Guide to Data Analysis*. 2010: Prentice Hall Press.
69. SIMCA-P, U., *14.0, info@ umetrics. com: www. umetrics. com, Umea*. 2002, Sweden.
70. Engelke, U.F., et al., *N-acetylated Metabolites in Urine: Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopic Study on Patients with Inborn Errors of Metabolism*. *Clinical chemistry*, 2004. **50**(1): p. 58-66.
71. Foxall, P.J., et al., *Analysis of Fetal and Neonatal Urine Using Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, 1995. **73**(3): p. F153-F157.
72. Iles, R., A. Hind, and R. Chalmers, *Use of Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Detection and Study of Organic Acidurias*. *Clinical Chemistry*, 1985. **31**(11): p. 1795-1801.
73. Krawczyk, H. and W. Gradowska, *1H NMR Spectra of Methylcitric Acid in Urine*. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2007. **30**(2): p. 263-263.

74. Vockley, J., et al., *Branched Chain Organic Acidurias*, in *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, A.L. Beaudet, et al., Editors. 2014, The McGraw-Hill Companies, Inc.: New York, NY.
75. Goodman, S., *An Introduction to Gas Chromatography-Mass Spectrometry and the Inherited Organic Acidemias*. American Journal of Human Genetics, 1980. **32**(6): p. 781.
76. Marriage, B., *Nutrition management of Patients with Inherited Disorders of Branched-Chain Amino Acid Metabolism*. Nutritional Management of Patients with Inherited Metabolic Disorders, 2010. **1st edn. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury**: p. 175-236.
77. Engelke, U.F.H., et al., *NMR Spectroscopic Studies on the Late Onset form of 3-Methylglutaconic Aciduria Type I and Other Defects in Leucine Metabolism*. NMR in Biomedicine, 2006. **19**(2): p. 271-278.
78. Ezgu, F., *Chapter Seven-Inborn Errors of Metabolism*. Advances in Clinical Chemistry, 2016. **73**: p. 195-250.
79. Rafter, J.E., R.A. Chalmers, and R.A. Iles, *Medium-chain acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency: a 1H-nmr spectroscopic study*. 1990, Portland Press Limited.
80. Nicholson, J.K.W., Ian D., *High Resolution Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of Biological Fluids*. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, 1989. **21**( 4-5): p. 449-501.
81. Simmler, C., et al., *Universal Quantitative NMR Analysis of Complex Natural Samples*. Current Opinion in Biotechnology, 2014. **25**(Supplement C): p. 51-59.
82. Marincola, F.C., et al., *1H NMR-Based Urine Metabolic Profile of IUGR, LGA, and AGA Newborns in the First Week of Life*. Clinica Chimica Acta, 2015. **451**(Part A): p. 28-34.
83. Pan, Z. and D. Raftery, *Comparing and Combining NMR Spectroscopy and Mass Spectrometry in Metabolomics*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007. **387**(2): p. 525-527.
84. Gu, H., et al., *(1)H NMR Metabolomics Study of Age Profiling in Children*. NMR in Biomedicine, 2009. **22**(8): p. 826-833.
85. Ballard, O. and A.L. Morrow, *Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors*. Pediatric clinics of North America, 2013. **60**(1): p. 49-74.
86. Longini, M., et al., *A Metabolomic Study of Preterm and Term Human and Formula Milk by Proton MRS Analysis: Preliminary Results*. The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine, 2014. **27**(sup2): p. 27-33.
87. Cesare Marincola, F., et al., *Impact of Early Postnatal Nutrition on the NMR Urinary Metabolic Profile of Infant*. Journal of Proteome Research, 2016. **15**(10): p. 3712-3723.
88. Davenport, C., et al., *Choline Intakes Exceeding Recommendations During Human Lactation Improve Breast Milk Choline Content by Increasing PEMT Pathway Metabolites*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2015. **26**(9): p. 903-911.
89. Lever, M. and S. Slow, *The Clinical Significance of Betaine, An Osmolyte With a Key Role in Methyl Group Metabolism*. Clinical Biochemistry, 2010. **43**(9): p. 732-744.
90. Zhao, Y., et al., *1H NMR-Based Compositional Identification of Different Powdered Infant Formulas*. Food Chemistry, 2017. **230**(Supplement C): p. 164-173.
91. Moltu, S.J., et al., *Urinary Metabolite Profiles in Premature Infants Show Early Postnatal Metabolic Adaptation and Maturation*. Nutrients, 2014. **6**(5): p. 1913-1930.
92. Van Duynhoven, J.P.M. and D.M. Jacobs, *Assessment of Dietary Exposure and Effect in Humans: The Role of NMR*. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, 2016. **96**(Supplement C): p. 58-72.

93. Klein, M.S., et al., *Nuclear Magnetic Resonance and Mass Spectrometry-based Milk Metabolomics in Dairy Cows During Early and Late Lactation*. Journal of Dairy Science, 2010. **93**(4): p. 1539-1550.
94. van Kneegsel, A.T.M., et al., *Short Communication: Ketone Body Concentration in Milk Determined by Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Value for the Detection of Hyperketonemia in Dairy Cows*. Journal of Dairy Science, 2010. **93**(7): p. 3065-3069.
95. Burns, S.P., et al., *Investigation of Urea Cycle Enzyme Disorders by 1H-NMR Spectroscopy*. Clinica Chimica Acta, 1992. **209**(1): p. 47-60.
96. Sgaravatti, A.M., et al., *Inhibition of Brain Energy Metabolism by the  $\alpha$ -Keto acids Accumulating in Maple Syrup Urine Disease*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 2003. **1639**(3): p. 232-238.
97. Van Hove, J.L., et al., *Medium-chain acyl-CoA Dehydrogenase (MCAD) Deficiency: Diagnosis by Acylcarnitine Analysis in Blood*. American Journal of Human Genetics, 1993. **52**(5): p. 958-966.
98. Gunnerson, K.J. *Lactic Acidosis*. 2017; Available from: <https://emedicine.medscape.com/article/167027-overview>.
99. De Lleras, C.D.I.F., *Encuesta Nacional de la Situación Nutricional en Colombia 2010*.
100. Hoffmann, G.F., J.T. Clarke, and J.V. Leonard, *Emergency Management of Metabolic Diseases*, in *Physician's Guide to the Treatment and Follow-Up of Metabolic Diseases*. 2006, Springer. p. 3-13.
101. Holmes, E., et al., *750 MHz 1H NMR Spectroscopy Characterisation of the Complex Metabolic Pattern of Urine from Patients with Inborn Errors of Metabolism: 2-Hydroxyglutaric Aciduria and Maple Syrup Urine Disease*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1997. **15**(11): p. 1647-1659.
102. Miller, M.J., et al., *Untargeted Metabolomic Analysis for the Clinical screening of Inborn Errors of Metabolism*. Journal of Inherited Metabolic Disease, 2015. **38**(6): p. 1029-1039.

## 13 ANEXOS

### Anexo 1. Consentimiento Informado.

## ANEXO 1.

### **Consentimiento informado, para el acceso a la información y toma de muestras para el estudio: "Caracterización del perfil de excreción de ácidos orgánicos urinarios en niños entre 13 y 36 meses de edad, empleando como herramientas diagnósticas e investigativas RMN y GC-MS"**

Este formulario de consentimiento informado es para padres o acudientes de niños o jóvenes que serán incluidos en el estudio titulado: "*Caracterización del perfil de excreción de ácidos orgánicos urinarios en niños entre 13 y 36 meses de edad, empleando como herramientas diagnósticas e investigativas RMN y GC-MS*"

Los investigadores a cargo son Johana M. Guevara M, Olga Y. Echeverri del Instituto de Errores Innatos del Metabolismo de la Pontificia Universidad Javeriana. El estudio tiene como objetivo Caracterizar el perfil de excreción de ácidos orgánicos urinarios en niños entre 13 y 36 meses de edad, empleando como herramientas diagnósticas e investigativas RMN y GC-MS.

#### **TENGA PRESENTE LO SIGUIENTE:**

Es posible que existan palabras que usted no comprenda durante la lectura de este documento, por favor indíquenoslas y con mucho gusto tomaremos el tiempo para responderlas. En caso de necesitar más información respecto a este estudio y sus resultados preliminares, puede contactar a cualquiera de las personas enunciadas a continuación, quienes se encargarán de responder cualquier pregunta y aclarar las dudas que puedan surgir respecto a este estudio.

Johana M. Guevara M. (Bogotá)      Tel: 3208320 Ext. 4086; scorpanime@gmail.com

Olga Yaneth Echeverri (Bogotá)      Tel: 3208320 Ext. 4086; oyecheve@javeriana.edu.co

Ninna F. Pulido Ochoa (Bogotá)      Tel: 5946161 Ext. 6939; nfpulido@husi.org.co

#### **INFORMACION GENERAL**

Las acidemias orgánicas son enfermedades que producen ciertos síntomas característicos en el paciente como adormecimiento, intolerancia al alimento, infecciones frecuentes, convulsiones, alteraciones del comportamiento, del crecimiento y malestar en general, entre otras. No todos los pacientes presentan los mismos síntomas y la severidad puede ser distinta según la enfermedad y las condiciones de cada paciente.

Estas enfermedades son hereditarias y hacen que el organismo no pueda procesar o producir algunas sustancias, según el caso. Estas enfermedades son consideradas raras.

Este estudio busca obtener información de la excreción urinaria de ácidos orgánicos (sustancias cuyos niveles se ven afectados en las acidemias orgánicas) en población

normal sana de niños menores a 1 año; el número total de muestras recolectadas será cerca de 150. Esta información será útil para ayudar a mejorar la detección de estas enfermedades en pacientes en los que se sospecha un diagnóstico de acidemia orgánica

El proyecto será realizado en su totalidad en el Instituto de Errores Innatos del Metabolismo de la Pontificia Universidad Javeriana.

### **PROCEDIMIENTO**

La información personal será obtenida mediante encuesta directa a los padres o tutor legal del niño(a).

Se necesitara el siguiente tipo de muestra:

### **MUESTRA DE ORINA**

Usted recibirá 1 frasco de orina y le solicitamos el favor de recolectar una muestra por micción espontanea niño, sin cambiar la nutrición acostumbrada previo a la toma de la muestra. Las muestras deberán ir marcadas con la fecha y la hora de recolección y el nombre del paciente. (Nosotros asignaremos un código alfa-numérico para todo propósito posterior).

### **RIESGOS DE LA TOMA DE LA MUESTRA**

El riesgo asociado a la recolección de orina en un frasco especial, es mínimo. Su procedimiento es muy usado en los análisis de laboratorio clínico.

### **BENEFICIOS**

Es posible que no existan beneficios directos e inmediatos para el niño(a) y/o su familia derivados de la participación en este estudio.

Entiendo que aunque la participación puede no beneficiar directamente al paciente, la información puede contribuir a mejorar el diagnóstico de las acidemias orgánicas en nuestro medio y a largo plazo resultar en diagnósticos más precisos y oportunos de lactantes afectados por estas enfermedades.

### **CONFIDENCIALIDAD**

La identidad de los participantes al igual que cualquier información obtenida con el estudio será confidencial y no será conocida sino por los investigadores que participan en el proyecto.

**Anexo 2.** Aprobación escrita de recolección voluntaria de muestras.

## **APROBACION ESCRITA RECOLECCIÓN VOLUNTARIA DE MUESTRAS**

Yo \_\_\_\_\_ identificado(a) con número de cédula de ciudadanía \_\_\_\_\_ declaro que:

1. Entiendo que las muestras serán utilizadas para este proyecto de investigación dentro del cual se persiguen fines de información para investigación, en todo caso serán manejadas bajo las normas éticas pertinentes.
2. Entiendo que la información referente al niño(a) será manejada de forma confidencial para proteger su identidad.
3. Entiendo que es posible que **NO** nos beneficiemos de manera directa de los resultados de este estudio pero que los resultados servirán para mejorar y acelerar el diagnóstico de estas enfermedades en nuestro país.
4. Entiendo que **NO** recibiremos ninguna compensación económica por la recolección de las muestras y por la participación en el estudio.
5. Entiendo que la recolección de las muestras de orina **NO representa ningún peligro ni riesgo a la salud del niño(a)**.
6. Entiendo que las pruebas que serán realizadas en este estudio **NO tienen ningún costo para mí**.
7. Respecto al almacenamiento y posible manejo de las muestras una vez terminado el presente estudio se me ha informado lo siguiente:

*La utilización de la muestra en estudios posteriores nos podría ayudar en el futuro a generar conocimiento de la excreción de ácidos orgánicos urinarios. Usted tiene el derecho a no permitir que las muestras del paciente sean guardados para estudios en el futuro. Los investigadores podrán guardar las muestras como parte del protocolo sin que estas sean incluidas en la investigación. Las muestras serán almacenadas respetando el anonimato y el sitio será el Laboratorio de Errores Innatos del Metabolismo de la Universidad Javeriana en Bogotá*

*Por lo tanto, a continuación expreso mi decisión con respecto al almacenamiento de la muestra y su utilización en estudios de investigación posteriores:*

1. Deseo que la muestra que fue obtenida del niño(a) sea **DESECHADA** una vez completado este estudio de investigación. Si \_\_\_ No \_\_\_

2. Autorizo conservar la muestra que fue extraída al niño(a) con la posibilidad de emplearla en las situaciones señaladas a continuación: Si \_\_\_ No \_\_\_

a. En estudios complementarios de diagnóstico para mí o algún miembro de mi familia: Si \_\_\_ No \_\_\_

b. *En estudios de investigación específicos para las acidemias orgánicas y aminoacidopatías, objeto de esta toma de muestra, siempre y cuando se conserve en anonimato los datos de identificación:*

*Si\_\_\_ No\_\_\_*

c. *En estudios de investigación colaborativos con otras instituciones nacionales y/o internacionales, siempre y cuando exista acuerdo interinstitucional previo, aprobación del comité de ética y se conserve en anonimato los datos de identificación:* Si\_\_\_ No\_\_\_

8. *Entiendo que tengo el derecho de **RETIRAR** del estudio al niño en cualquier momento sin necesidad de ninguna explicación.*

9. *Entiendo que las muestras del niño(a) pueden ser utilizadas en una o en varias ocasiones durante el desarrollo del proyecto por lo que la duración de la participación dependerá de los resultados que se vayan obteniendo en las diferentes etapas del estudio.*

10. *Entiendo que puedo o no dar autorización para que los resultados de esta investigación sean socializados en forma de publicaciones/presentaciones científicas o clínicas.*

*Autorizo Si\_\_\_ No\_\_\_*

11. *Declaro que me han informado en forma clara la naturaleza y el propósito de este análisis, los riesgos asociados, los posibles efectos secundarios.*

12. *He podido formular todas las preguntas que he creído convenientes las cuales han sido resueltas y con respuestas que considero suficientes y aceptables.*

Consiento voluntariamente que el niño(a) PARTICIPE en este estudio. El presente documento se firma en original y copia, de la cual yo recibiré una.

Este documento ha sido aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana, para su uso entre Noviembre de 2015 y junio de 2017:

**Nombre del Participante** \_\_\_\_\_

**Nombre del Padre/Madre o Apoderado** \_\_\_\_\_

**Representante legal**

Firmado: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Tipo y No. Identificación: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_



Dirección residencia:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Huella (Índice derecho)

En caso de estar inhabilitado

-

"He sido testigo de la lectura exacta del documento de asentimiento al participante potencial y el individuo ha tenido la oportunidad de hacer preguntas. Confirmando de que ha dado su consentimiento libremente".

**Testigo**

Firmado: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

Tipo y No. Identificación: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Relación con el participante: \_\_\_\_\_

Dirección residencia: \_\_\_\_\_

Huella (Índice derecho)

En caso de estar  
inhabilitado para firmar

**Testigo**

Firmado: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

Tipo y No. Identificación: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Relación con el participante: \_\_\_\_\_

Dirección residencia: \_\_\_\_\_

Huella (Índice derecho)

En caso de estar  
inhabilitado para firmar

**Certifico que he explicado la naturaleza y propósito de este estudio, así como los beneficios potenciales y los riesgos asociados con la participación a los padres o representantes legales del paciente, en la fecha indicada en este formulario de consentimiento. He respondido todas las preguntas y he presenciado la firma del presente documento. Se entregará una copia de este documento al tutor o representante legal del menor.**

### Anexo 3. Encuesta Nutricional.

Nombre del Padre:		Celular:		Observaciones Generales	
Nombre de la Madre:		Celular:			
Nombre del Paciente:		Dirección:			
Fecha de nacimiento:		Datos Antropométricos			
Edad en meses:		Peso (Kg):			
Fecha de toma de muestra:		Talla (cm):			
Entrevistante:		Perímetro cefálico (cm):			
<b>ENCUESTA NUTRICIONAL</b>					
<b>Niños 0 a 3 Meses</b>					
Lactancia materna exclusiva actual?		Lactancia materna exclusiva actual?		Lactancia materna exclusiva actual?	
Si	No	Si	No	Si	No
Frecuencia:		Frecuencia:		Frecuencia:	
Complementa con Leche de fórmula?		Complementa con Leche de fórmula?		Complementa con Leche de fórmula?	
Si	No	Si	No	Si	No
Cuales:		Cuales:		Cuales:	
Alimentos		Alimentos		Alimentos	
Cereales		Cereales		Cereales	
Frutas		Frutas		Frutas	
Verduras		Verduras		Verduras	
Carnes		Carnes		Carnes	
Huevo		Huevo		Huevo	
Legumbres		Legumbres		Legumbres	
Lacteos		Lacteos		Lacteos	
Jugos		Jugos		Jugos	
Compostas		Compostas		Compostas	
Coladas		Coladas		Coladas	
Otros		Otros		Otros	
Frecuencia:		Frecuencia:		Frecuencia:	
Consumo de algun otro tipo de alimento?		Consumo de algun otro tipo de alimento?		Consumo de algun otro tipo de alimento?	
Si	No	Si	No	Si	No
Cuales:		Cuales:		Cuales:	
Frecuencia:		Frecuencia:		Frecuencia:	
Observaciones:		Observaciones:		Observaciones:	

#### Anexo 4. Datos de las muestras analizadas en este estudio.

IDENTIFICACIÓN	GÉNERO	EDAD	CREATININA (mg/dL)	DENSIDAD	CONDICIÓN
2JAG9MM	Masculino	9 meses	39,4	1010,0	Individuo Sano
36JMG8MM	Masculino	11 meses	52,5	1015	Individuo Sano
37MA15M	Masculino	2 mese y medio	4,75	1000	Individuo Sano
38SRM11M	Masculino	3 meses	9,7	1005	Individuo Sano
39LCM1F	Femenino	16 días	6,1	1005	Individuo Sano
40TV4M	Masculino	1 mes y 5 días	5,05	1000	Individuo Sano
41ER20M	Masculino	4 meses	7,2	1005	Individuo Sano
42MTP11M	Femenino	11 meses	10	1005	Individuo Sano
43TDM10F	Femenino	1 mes y 3 días	5,6	1000	Individuo Sano
44PCB18F	Masculino	3 meses	4,25	1000	Individuo Sano
45KAB17M	Masculino	Prematuro 2 meses (edad corregida)	7,15	1000	Individuo Sano
46LDF13F	Femenino	1 mes y 10 días	13,8	1005	Individuo Sano
47EDA11M	Masculino	3 meses	9,75	1000	Individuo Sano
48SSG9F	Femenino	2 meses y medio	9,9	1000	Individuo Sano
49JPR3M	Masculino	3 meses	6	1005	Individuo Sano
50MH66M	Masculino	2 meses 8 días	9,9	1005	Individuo Sano
51EVM7F	Femenino	4 meses	18	1000	Individuo Sano
52SDB16M	Masculino	Prematuro 2 meses (edad corregida)	12,4	1005	Individuo Sano
53SR5M	Masculino	1 mes	7,5	1000	Individuo Sano
54SM2F	Femenino	3 meses 20 días	2	1000	Individuo Sano
55MTP4M	Masculino	4 meses	2,3	1000	Individuo Sano
56SV929436PA	Masculino	9 meses	15,66	1005	EIM
57PA	Masculino	16 días	9,65	1005	EIM
58IVA	Femenino	1 mes	14,31	1005	EIM
59IVA	Indeterminado	1 mes	1,91	1000	EIM
60IVA	Femenino	14 años	60,78	1005	EIM
61MCAD	Femenino	3 años	70,95	1010	EIM
62MSUD	Masculino	2 años	29,34	1010	EIM
63MMA	Femenino	4 meses	15,34	1005	EIM
64MGA	Femenino	2 meses	4,78	1005	EIM
65MGA	Femenino	24 días	3,35	1005	EIM
66ACCoATIO	Femenino	2 meses	3,65	1005	EIM
67HOLO	Femenino	22 días	7,85	1010	EIM
68GATI	Masculino	3 años	29,78	1005	EIM
69GATI	Femenino	4 años	11,82	1005	EIM
70GATI	Masculino	6 años	4,19	1005	EIM
71MSUD	Femenino	No Registra	10,20	1010	EIM
72GATI	Femenino	6 años	54,73	1010	EIM
73MSUDnd	Masculino	1 mes	15,2	1005	EIM
74PHE	Femenino	12 años	30,42	1005	EIM
75KNG911465	Femenino	15 años	37,51	1010	EIM
76OHGT	Masculino	12 Meses	51,38	1030	EIM
77PDHkb	Masculino	7 días	51,38	1025	EIM
78OA38DM	Masculino	1 mes 8 días	13,42	1005	Individuo Sano
79YG3MM	Masculino	3 meses	5,5	1005	Individuo Sano
80JRC58DM	Masculino	1 mes 28 días	4,92	1005	Individuo Sano
81DH22DM	Masculino	22 días	4,15	1005	Individuo Sano
82LSR3MM	Masculino	3 meses 20 días	10,7	1005	Individuo Sano
83MJAV24DF	Femenino	24 días	2,3	1000	Individuo Sano
84MA3MM	Masculino	3 meses	2,99	1000	Individuo Sano
85JP1MM	Masculino	1 mes	9,1	1000	Individuo Sano
86MM52DF	Femenino	1 mes 22 días	8,7	1005	Individuo Sano
87ASR26DF	Femenino	26 días	11,04	1005	Individuo Sano
88VV2MF	Femenino	2 meses	4,92	1005	Individuo Sano
89AC2MM	Masculino	2 meses	8,1	1005	Individuo Sano
90JR42DM	Masculino	42 días	5,8	1005	Individuo Sano

**Anexo 5.** Tabla con los valores predictivos y las variables más representativas obtenidas al aplicar OPLS-DA

1	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Primary ID	tP[S1]	tP[S2]	DModXPS-(2)(Norm). Weighted residuals	Class	Var.1	Var.2	Var.3	Var.4	Var.5	Var.6	Var.7	Var.8	Var.9
ppm	48,5845	51,5639	25,9607		0,023	0,063	0,103	0,143	0,183	0,223	0,263	0,343	0,383
83-B094	-6,19923	-2,11694	0,491791	1	0,00302665	0,00108531	-3,59968e-12	0,0037176	0	0,000620304	0,00166296	0	0,00321014
86-B055	-1,24491	-1,46904	0,627354	1	0,00184882	1,41682e-11	-3,59968e-12	6,43875e-12	0,00104113	0	0	0	0,00202383
87-B097	-4,25288	-2,95132	0,452984	1	0,00313461	1,41682e-11	-3,59968e-12	0,000710985	0	0,000801616	0,00250795	0	0,00368416
90-B100	-2,39998	-2,58924	0,578167	1	0,00429565	1,41682e-11	0,00135441	0,0011602	0	0	0	0	0,00433784
92-B102	-7,33215	-1,6657	0,395253	1	0,00591138	1,41682e-11	0,00529473	0,0033254	0	0	0,00921098	0	0
97-B107	4,05325	5,74573	0,844692	2	0,00225696	1,41682e-11	0,0013529	6,43875e-12	0,000903323	0	0,00202774	0	0,000497886
98-B110	4,43937	0,552792	1,49205	2	0,00225141	1,41682e-11	0,00545903	6,43875e-12	0,00107535	0,00251321	0,00129005	0,000169685	0
98-B114	-4,49035	2,20891	0,338663	2	0,00145556	1,41682e-11	0,000931372	6,43875e-12	0	0,00241599	0	0,00120927	0
95-B115	-3,4236	2,94734	0,514167	2	0,00291281	1,41682e-11	0,000281561	0,00140576	0,000580852	0	0	0,00312177	0
96-B116	2,0926	5,3292	1,10574	2	0,00399342	1,41682e-11	0,00549814	6,43875e-12	0	0,00615668	0	0	0
98-B118	7,36425	1,01788	1,29049	2	0,00304953	1,41682e-11	-3,59968e-12	6,43875e-12	0	0,00119914	0,000970521	0	0
99-B119	2,72578	3,63025	1,20311	2	0,00253044	0,000186263	-3,59968e-12	6,43875e-12	0	0,000615444	0,00150728	0	0
91-B121	14,0203	-8,56279	2,33589	2	0,00168274	1,41682e-11	0,000831955	6,43875e-12	0,000427378	0,0010663	0,000567541	0	0,00533448

**Anexo 6.** Esquema de los coeficientes obtenidos empleando OPLS-DA.

