



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN**

**DETECCIÓN DE ACIDURIAS ORGÁNICAS EN MUESTRAS DE  
ORINA DEPOSITADA EN PAPEL FILTRO. IMPLEMENTACIÓN  
DE UNA METODOLOGÍA SIMPLE**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**RODOLFO GONZÁLEZ VALERIO**

**ASESORES:**

**ASESOR INTERNO: Q.F.B. ROSALBA BONILLA SÁNCHEZ  
ASESOR EXTERNO: Q.F.B. CYNTHIA FERNÁNDEZ LAÍNEZ**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO**

**2013**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO  
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**



**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ  
Jefa del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán**

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **TESIS**

**Detección de acidurias orgánicas en muestras de orina depositadas en papel filtro.  
Implementación de una metodología simple.**

Que presenta el pasante: **Rodolfo González Valerio**  
Con número de cuenta: **09913995-1** para obtener el Título de: **Químico Farmacéutico Biólogo**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”**  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 23 de Octubre de 2012.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	<b>NOMBRE</b>	<b>FIRMA</b>
<b>PRESIDENTE</b>	QFB. Rosalba Bonilla Sánchez	
<b>VOCAL</b>	QFB. René Damián Santos	
<b>SECRETARIO</b>	QFB. Ma. De Lourdes Galván Ruiz	
<b>1er SUPLENTE</b>	QFB. Sara Hernández Matilde	
<b>2do SUPLENTE</b>	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).  
HHA/pm

## **Agradecimientos**

En el desarrollo de un trabajo de investigación como una tesis de licenciatura, participa mucha gente y desde diferentes ópticas. Es decir, algunas lo hacen directamente y otras indirectamente, pero para llegar al final del proceso, uno si es honesto debe mostrar agradecimientos a todos aquellos que de una u otra forma han participado a nivel profesional, académico y no menos despreciable, el personal.

Agradezco de forma principal:

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, la Máxima Casa de Estudios, y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por haber puesto a mi disposición sus instalaciones y todos los recursos humanos que me han permitido tener una formación profesional.

Al **Laboratorio de Errores del Metabolismo y Tamiz del Instituto Nacional de Pediatría** por abrirme las puertas para realizar este proyecto. Por su acogida y el apoyo recibido durante los largos y fructíferos periodos que he desarrollado en el mi labor investigadora.

**Agradezco el apoyo técnico y asesoría en la elaboración de esta tesis a la M. en C. Isabel Ibarra González de la Unidad de Genética de la Nutrición Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM – Instituto Nacional de Pediatría SS.**

En especial Agradezco a:

- **QFB. Cynthia Fernández Laínez**, titular del proyecto, por su valiosa ayuda y paciencia. Su apoyo y confianza en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas ha sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación profesional.
- **Dra. Marcela Vela Amieba** titular del laboratorio, por sus valiosas aportaciones, no cabe duda que su participación ha enriquecido el trabajo realizado.

A los honorables miembros del jurado. A los Profesores de la **Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo Uno**, por sus correcciones y sugerencias.

- **QFB. Rosalba Bonilla Sánchez**
- **QFB. René Damián Santos**
- **QFB. Ma. de Lourdes Galván Ruiz**
- **QFB. Sara Hernández Matilde**
- **M. en C. Maritere Domínguez Rojas**

## Agradecimientos especiales

### A Dios

Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

### A mi madre, Carmen

Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor y consejos.

### A mi padre, Marcelo

Por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su comprensión.

### A mis hermanos, Miguel, Adriana y Olga

Por ser el ejemplo de los hermano mayores y de los cuales aprendí aciertos y de momentos difíciles, por estar conmigo y apoyarme siempre, los quiero mucho.

### A mis amigos

Sin omitir a nadie pero en especial a Nora, Gaby, Aquiles, Toño, Berny, Nanche, Juan, Joel, a los Kaleb's, a los Jhony's, a los goloso's; ya que nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional.

A aquellos que han estado desde que somos adolescentes, en especial a Adriana, Jesica, Pedro, Beto, tío Manuel, Aarón, Juan, Hermes, Isaac, Ángel, a ustedes por compartir los buenos y malos momentos, gracias porque hasta ahora, seguimos siendo amigos.

Todos aquellos familiares y amigos que no recordé al momento de escribir esto. Ustedes saben quiénes son.

A aquellos que participaron directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis.

¡Gracias a ustedes!

<b>ÍNDICE</b>	<b>Página</b>
<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>3</b>
<b>Símbolos</b>	<b>5</b>
<b>Marco teórico</b>	<b>6</b>
<b>Errores Innatos del Metabolismo</b>	<b>6</b>
<b>Clasificación de los EIM</b>	<b>6</b>
<b>Presentación clínica de los EIM</b>	<b>7</b>
<b>Acidurias orgánicas</b>	<b>8</b>
<b>Ácidos orgánicos</b>	<b>8</b>
<b>Acidurias orgánicas de cadena ramificada</b>	<b>9</b>
<b>Metabolismo de los aminoácidos ramificados</b>	<b>9</b>
<b>Enfermedad con olor a jarabe de Maple (EOJM)</b>	<b>9</b>
<b>Aciduria isovalérica (AIV)</b>	<b>10</b>
<b>Deficiencia de 3-metilcrotonil carnitina (3-MCC)</b>	<b>10</b>
<b>Defectos en el metabolismo del propionato</b>	<b>10</b>
<b>Aciduria glutárica tipo I (AG I)</b>	<b>12</b>
<b>Tirosinemias</b>	<b>12</b>
<b>Diagnóstico de las AO</b>	<b>14</b>
<b>Cromatografía de gases ensamblada a espectrometría de masas (CGEM)</b>	<b>16</b>
<b>El punto crítico del estudio de AO's mediante CGEM</b>	<b>17</b>
<b>AO's expresados en unidades de mmol/mol de creatinina</b>	<b>18</b>
<b>Uso de la OPF</b>	<b>18</b>
<b>Justificación</b>	<b>20</b>
<b>Objetivos</b>	<b>21</b>
<b>Materiales y métodos</b>	<b>22</b>
<b>Clasificación de la investigación</b>	<b>22</b>
<b>Reactivos</b>	<b>22</b>

<b>Matriz biológica</b>	<b>23</b>
<b>Procesamiento de la muestra</b>	<b>23</b>
<b>Cuantificación de creatinina urinaria</b>	<b>23</b>
<b>Extracción de los AO's de muestras de OL</b>	<b>23</b>
<b>Análisis de AO's mediante CGEM</b>	<b>24</b>
<b>Equipo</b>	<b>24</b>
<b>Condiciones cromatográficas</b>	<b>24</b>
<b>Análisis mediante EM</b>	<b>24</b>
<b>Procedimiento de extracción de la OPF</b>	<b>25</b>
<b>Estrategia experimental</b>	<b>26</b>
<b>Determinación de la interferencia del PF utilizado en el análisis por CGEM</b>	<b>26</b>
<b>Determinación de la correlación de creatinina de OL y OPF</b>	<b>26</b>
<b>Preparación de la orina de trabajo</b>	<b>26</b>
<b>Recuperación de los AO's del PF</b>	<b>27</b>
<b>Estabilidad de los AO's en el PF</b>	<b>27</b>
<b>Evaluación de la técnica implementada como herramienta de evaluación</b>	
<b>bioquímica a distancia</b>	<b>27</b>
<b>Resultados</b>	<b>28</b>
<b>Discusión</b>	<b>38</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>41</b>
<b>Referencias bibliográficas</b>	<b>42</b>

<b>Índice de figuras</b>	<b>Página</b>
<b>1. Ruta bioquímica del propionato</b>	<b>11</b>
<b>2. Ruta metabólica del triptófano, lisina e hidroxilisina</b>	<b>12</b>
<b>3. Metabolismo de la tirosina</b>	<b>13</b>
<b>4. Cromatografo de gases acoplado a espectrómetro de masas</b>	<b>16</b>
<b>5. Reacción de oximación</b>	<b>17</b>
<b>6. Cromatograma con el perfil de AO's urinarios obtenido mediante CGEM</b>	<b>18</b>
<b>7. Papel de Guthrie</b>	<b>19</b>
<b>8. Extracción de AO's para su procesamiento por CGEM</b>	<b>23</b>
<b>9. Cromatografo de gases marca Agilent modelo 6890N</b>	<b>24</b>
<b>10. Impregnado y reconstitución de la OPF</b>	<b>26</b>
<b>12. Cromatograma de agua extraída de PF</b>	<b>28</b>
<b>13. Correlación de creatinina de OL vs creatinina obtenida de OPF</b>	<b>28</b>
<b>14. Porcentaje de recuperación y reproducibilidad de la extracción de AO's en OPF para la concentración 2 mmol AO's/mol de creatinina</b>	<b>29</b>
<b>15. Porcentaje de recuperación y reproducibilidad de la extracción de AO's en OPF para la concentración 39 mmol AO's/mol de creatinina</b>	<b>30</b>
<b>16. Porcentaje de recuperación y reproducibilidad de la extracción de AO's en OPF para la concentración 79 mmol AO's/mol de creatinina</b>	<b>30</b>
<b>17. Estabilidad de la OPF a través del tiempo para la concentración 2 mmol AO's/mol de creatinina</b>	<b>31</b>
<b>18. Estabilidad de la OPF a través del tiempo para la concentración 39 mmol AO's/mol de creatinina</b>	<b>32</b>
<b>19. Estabilidad de la OPF a través del tiempo para la concentración 79 mmol AO's/mol de creatinina</b>	<b>32</b>
<b>20. Cromatograma de deficiencia de 2-metil-3-OH-butiril-CoA deshidrogenasa.</b>	<b>35</b>

<b>21. Cromatograma característico de enfermedad con olor a jarabe de maple (EOJM).</b>	<b>35</b>
<b>22. Cromatograma característico de aciduria isovalérica (AIV)</b>	<b>36</b>
<b>23. Cromatograma característico de aciduria propiónica (AP)</b>	<b>36</b>
<b>24. Deficiencia de 3-metil-crotonil-CoA carboxilasa (3-MCC)</b>	<b>37</b>

<b>Índice de tablas</b>	<b>Página</b>
<b>1. Manifestaciones clínicas comunes de los EIM</b>	<b>7</b>
<b>2. AO's excretados en orina de pacientes con EIM frecuentes</b>	<b>14</b>
<b>3. Estándares de AO's utilizados en el proyecto y sus respectivos iones de cuantificación e identificación</b>	<b>25</b>
<b>4: CV de las áreas de los AO's en las diferentes concentraciones de trabajo para los tiempos estudiados</b>	<b>31</b>
<b>5. Resultados de las 38 muestras de OPF recibidas en el INP</b>	<b>33</b>

## RESUMEN

Las Acidurias Orgánicas (AO) son un grupo de errores innatos del metabolismo (EIM) que alteran el equilibrio ácido-base y trastornan las vías metabólicas intracelulares. Los pacientes que las presentan pueden presentar síntomas agudos, tales como letargo, hipotonía, taquipnea o convulsiones desde el periodo neonatal que podrían ser fatales si no son detectados y tratados oportunamente. Los sobrevivientes pueden presentar secuelas neurológicas irreversibles como retraso en el desarrollo psicomotor.

El análisis de ácidos orgánicos (AO's) urinarios mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CGEM) es fundamental para el diagnóstico y seguimiento de las AO. El estudio se realiza en muestras de orina líquida (OL) de reciente emisión o en su defecto en orina que ha sido congelada para su transporte cuando proviene del interior de la república, para evitar el cambio de composición de sus metabolitos. El Instituto Nacional de Pediatría (INP) es el centro de referencia de estos padecimientos, y es la institución que en nuestro país cuenta con mayor experiencia en el diagnóstico de dichas enfermedades, y realiza este tipo de estudios a niños, tanto del área metropolitana como del resto del país. Hemos observado que en la práctica cotidiana, el envío de dichas muestras congeladas implica graves obstáculos y problemas de índole variada, que van desde la renuencia de las compañías de mensajería a manejar redes frías, hasta la mezcla de las orinas con los hielos que utilizan para preservarlas, además del alto costo que implica enviar paquetes voluminosos. Se sabe que el papel filtro es un excelente medio de transporte de fluidos biológicos, por lo tanto las muestras de orina en papel filtro (OPF) son mucho más fáciles de manejar y transportar.

El objetivo del presente trabajo fue implementar y evaluar una metodología que permita la extracción eficiente de los AO's a partir de muestras de orina colectadas en papel filtro (PF), para su análisis por CGEM. Para lo anterior, se preparó una mezcla de orina adicionada con cantidades conocidas de diferentes estándares de AO's. De esta orina de trabajo se tomaron alícuotas de 2mL para impregnar piezas de PF que posteriormente se analizaron de manera simultánea con OL por medio de CGEM y se determinó el porcentaje de recuperación en relación con la OL; también se determinó la estabilidad de la orina colectada en PF y almacenada a diferentes tiempos (días cero, 7, 14, 21 y 28); todo lo anterior a 3 concentraciones diferentes. Con la finalidad de comprobar la utilidad de este tipo de muestras para evaluación bioquímica a distancia, se procesaron 38 muestras de OPF de pacientes con sospecha de AO provenientes de diferentes estados de la República Mexicana.

En promedio los AO se recuperaron de la OPF en un 100% (96-103), la reproducibilidad del método fue aceptable, con un coeficiente de variación menor al 20% en las tres concentraciones de trabajo; para todos los AO's se encontró un coeficiente de correlación mayor de 0.9, indicando una correlación lineal entre la OL y la OPF

Entre la concentración de creatinina de OL y la de OPF, se encontró una correlación de 0.99 en el intervalo de concentraciones estudiado.

Los porcentajes de estabilidad de los AO's fueron en promedio 102% para las tres concentraciones de trabajo, con coeficientes de variación menores a 20% en todos los casos.

De los 38 pacientes 23 fueron positivos: 14 con deficiencia de 3-metilcrotonil carboxilasa (3-MCC), 3 con aciduria isovalérica (AIV) y sólo 1 caso de enfermedad con olor a jarabe de maple (EOJM), aciduria glutárica I (AG I), aciduria propiónica (AP), aciduria 3-OH-3-metil glutárica (HL), aciduria láctica (AL) y deficiencia de 3-metil-3OH-butiril-CoA deshidrogenasa.

Este método demostró ser útil para la evaluación bioquímica a distancia de pacientes con sospecha de AO. Así mismo, permite el fácil transporte de las muestras de orina evitando su descomposición, con un tiempo transcurrido entre envío y recepción de muestra de 2 días.

La difusión y aplicación del método implementado en el presente trabajo en todas las instituciones de salud de nuestro país, podría resolver algunos de los muchos obstáculos que enfrentan los pacientes foráneos con EIM y contribuir a la agilización del diagnóstico y seguimiento de estos pacientes, lo cual permitiría instaurar el tratamiento lo más oportunamente posible y aminorar las secuelas neurológicas irreversibles que causan las AO.

## Anexo 1. Abreviaturas

<b>3-MCC</b>	<b>Deficiencia de 3-metil-crotonil carboxilasa</b>
<b>ADN</b>	<b>Ácido desoxirribonucleico</b>
<b>AF</b>	<b>Aciduria fumárica</b>
<b>AG</b>	<b>Aciduria glutárica</b>
<b>AIV</b>	<b>Aciduria isovalérica</b>
<b>AMM</b>	<b>Aciduria metilmalónica</b>
<b>AO</b>	<b>Acidurias orgánicas</b>
<b>AO's</b>	<b>Ácidos orgánicos</b>
<b>AP</b>	<b>Aciduria propiónica</b>
<b>AS</b>	<b>Aciduria succínica</b>
<b>BCAA</b>	<b>Aminoácidos de cadena ramificada (<i>branched-chain amino acids</i>)</b>
<b>BCKA</b>	<b><math>\alpha</math>-cetoácidos de cadena ramificada (<i>branched-chain <math>\alpha</math>-keto acids</i>)</b>
<b>BCKD</b>	<b>complejo enzimático deshidrogenasa de <math>\alpha</math>-cetoácidos de cadena ramificada (<i>branched-chain <math>\alpha</math>-ketoacids complex</i>)</b>
<b>BSFTA</b>	<b>Bis-(trimetisilil) trifluoroacetamida</b>
<b>C3</b>	<b>Propionilcarnitina</b>
<b>C5</b>	<b>Isovalerilcarnitina</b>
<b>C5OH</b>	<b>3-metil-crotonilglicina</b>
<b>C5:1</b>	<b>Tigililcarnitina</b>
<b>C6DC</b>	<b>Adipilcarnitina</b>
<b>Cbl</b>	<b>Cobalamina</b>
<b>CG</b>	<b>Cromatografo de gases</b>
<b>CGEM</b>	<b>Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas</b>
<b>CV</b>	<b>Coefficiente de variación</b>
<b>EIM</b>	<b>Errores innatos del metabolismo</b>
<b>EM</b>	<b>Espectrometría de masas</b>
<b>EOJM</b>	<b>Enfermedad con olor a jarabe de maple</b>
<b>HL</b>	<b>Aciduria 3-OH-3-metil glutárica</b>
<b>HMG</b>	<b>3-OH-3-metilglutaril</b>
<b>HPLC</b>	<b>Cromatografía de líquidos de alta resolución (<i>high performance liquid chromatography</i>)</b>
<b>INP</b>	<b>Instituto Nacional de Pediatría</b>

<b>LLOQ</b>	<b>Límite inferior de cuantificación (<i>low limit of quantification</i>)</b>
<b>LEIMyT</b>	<b>Laboratorio de errores innatos del metabolismo y tamiz</b>
<b>MCC</b>	<b>3-metil-crotonil-CoA carboxilasa</b>
<b>MeCbl</b>	<b>Metilcobalamina</b>
<b>ND</b>	<b>No detectable</b>
<b>NAD</b>	<b>Nicotinamida adenina dinucleótido</b>
<b>NADH</b>	<b>Nicotinamida adenina dinucleótido reducida</b>
<b>OL</b>	<b>Orina líquida</b>
<b>OPF</b>	<b>Orina depositada en papel filtro</b>
<b>PCR</b>	<b>Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)</b>
<b>PF</b>	<b>Papel filtro</b>
<b>TC II</b>	<b>Transcobalamina</b>
<b>TMS</b>	<b>Trimetilclorosilano</b>
<b>TN</b>	<b>Tamiz neonatal</b>
<b>TNA</b>	<b>Tamiz neonatal ampliado</b>

## Símbolos

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
%	Tanto por ciento
°C	Grado centígrado
®	Marca registrada
&	y (conjunción)
cm	Centímetro
CoA	Coenzima A
dL	Decilitro
M	Molaridad
m	Metro
mg	Miligramo
min	Minuto
mmol o mM	milimolaridad
mL	Mililitro
$\mu$ L	Microlitro
mm	Milímetro
m/z	Relación masa/carga
N	Normalidad
n	Número de elementos estadísticos, muestras o individuos
nm	Nanómetro
$r^2$	Coefficiente de correlación
rpm	Revoluciones por minuto

## MARCO TEÓRICO

### Errores Innatos del Metabolismo

En los organismos vivos las reacciones químicas están integradas en las diferentes vías metabólicas, dichas reacciones son catalizadas por enzimas. Cualquier mutación genética que cause un defecto en la actividad de una enzima o de alguna proteína de transporte tendrá como resultado un bloqueo en el flujo de metabolitos por esa vía, estos defectos son conocidos como Errores Innatos del Metabolismo (EIM) (Vela 2005).

El bloqueo en la vía metabólica puede causar acumulación de sustratos y formación insuficiente de productos, en ocasiones se activan vías alternas que aumentan su flujo en forma considerable, al quedarle cerrado el paso al sustrato por la vía principal, produciendo cantidades excesivas de metabolitos secundarios tóxicos para el organismo. Los síntomas y signos clínicos que presentan los pacientes con EIM pueden ser explicados por estos mecanismos (Ibarra 1999).

La incidencia de los EIM es baja de manera individual, con una frecuencia menor o igual de 5 casos por cada 10,000 habitantes, sin embargo, su importancia colectiva es tal, que son de considerable significancia a nivel de salud pública (Lepage 2006).

Más del 95% de los EIM son heredados de forma autosómica recesiva, es decir, ambos progenitores son portadores del gen mutado, por lo que tienen en cada embarazo el 25% de probabilidad de tener un hijo afectado, el 50% de probabilidad de procrear un hijo portador y el 25% de probabilidad de tener un hijo con ambos alelos silvestres (Jiménez-Sánchez 2001).

Estos trastornos han adquirido importancia creciente debido a que conducen a una elevada morbi-mortalidad en los primeros días de vida en las formas más severas y grave discapacidad física e intelectual en los sobrevivientes (Vela 2009).

### Clasificación de los EIM

En la actualidad existen más de 500 EIM descritos, para su estudio, se clasifican de diferentes formas. Saudubray lo hace en tres grupos, en función de su patofisiología y para su abordaje diagnóstico (Saudubray 2006).

- **Grupo 1** incluye a los desórdenes del metabolismo intermedio que dan origen a intoxicación por acumulación de compuestos próximos al bloqueo metabólico, en él se encuentran las acidurias orgánicas (AO), aminoacidopatías, defectos del ciclo de la urea

e intolerancia a los azúcares. Este grupo de EIM puede dar lugar a una intoxicación aguda o crónica que puede surgir desde el periodo neonatal.

- **Grupo 2** comprende las enfermedades del metabolismo intermedio debidas a defectos que afectan los procesos energéticos tanto mitocondriales como citoplasmáticos, se presentan principalmente con hipoglucemia e involucran rutas bioquímicas como la glucólisis, gluconeogénesis, glucogenólisis, hiperinsulinismos, desórdenes de la oxidación de ácidos grasos y las acidurias lácticas congénitas.
- **Grupo 3** involucra los desórdenes que afectan la síntesis o catabolismo de moléculas complejas en organelos celulares e incluye los padecimientos por atesoramiento lisosomal, peroxisomal, defectos de la glicosilación y síntesis de colesterol (Saudubray 2006).

### Presentación clínica de los EIM

Los EIM pueden presentar en el recién nacido en una variedad de formas. Por lo general un EIM se sospecha como resultado de una sugerente combinación de síntomas clínicos agudos o síntomas no específicos como muerte neonatal inexplicable, o presencia de un niño afectado previamente (Chakrapani 2001; Satwani 2009).

La edad de inicio de la enfermedad depende de la severidad de la mutación y puede ir desde las primeras horas de vida con curso agudo hasta la infancia, adolescencia e incluso la vida adulta, caracterizándose por una larga historia de síntomas crónicos que se presentan en episodios de estrés metabólico como las infecciones, cirugías, etc. Las manifestaciones clínicas son poco específicas, en la tabla 1 se enlistan las más frecuentes.

**Tabla 1. Manifestaciones clínicas comunes de los EIM**

Respiratorias	Neurológicas	Gastrointestinales	Organomegalia
Apnea	Hipo/hipertonia	Vómito	Hígado
Dificultad respiratoria	Irritabilidad	Rechazo de alimentos	Bazo
Taquicardia, hipernea	Succión débil	Diarrea	Corazón
	Letargo que puede progresar hasta estado de coma	Ictericia	
	Crisis convulsivas	Colestasis	

Fuente: Chakrapani 2001.

El presente trabajo está enfocado a aquellos EIM que pueden ser diagnosticados por el estudio de ácidos orgánicos (AO's) urinarios los cuales son marcadores de enfermedades denominadas genéricamente como acidurias orgánicas (AO).

## **Acidurias Orgánicas**

### **Ácidos orgánicos**

Los ácidos orgánicos (AO's) son productos finales o intermediarios clave en el metabolismo de muchos compuestos orgánicos producidos en la célula, como son los aminoácidos, sacáridos, lípidos, ácidos nucleicos, esteroides y muchas otras sustancias exógenas (Kuhara 1999; Tuma 2011), y se definen como ácidos carboxílicos no aminados, contienen uno o varios grupos carboxílicos y pueden tener diferentes grupos funcionales tales como un grupo hidroxilo, cetona, hidroxiácidos, cetoácidos, ácidos aromáticos, compuestos heterocíclicos, amidas y lactonas en su cadena lateral (Ibarra 1999; Tuma 2011).

Generalmente estos compuestos son difíciles de detectar bajo condiciones fisiológicas normales, sin embargo, al ser solubles en agua, se acumulan en los fluidos biológicos de forma importante cuando la actividad enzimática encargada de su metabolismo es deficiente o presenta algún bloqueo. Estos bloqueos generalmente son de índole genética, como en el caso de los EIM, pero en ocasiones son debidos a inhibición enzimática por factores ambientales o por deficiencias nutricionales (Kumps 2002; Seashore 2009).

Las AO son un grupo muy heterogéneo de EIM caracterizados por la excreción anormal de AO's en la orina, considerando como anormal el exceso de uno o varios AO's, o bien la presencia de algún ácido orgánico inusual, que en condiciones fisiológicas no suele estar presente en una muestra de orina (Lehotay 1995).

Estas enfermedades alteran el equilibrio ácido-base y trastornan las vías metabólicas intracelulares. Debido a esto, los pacientes que las presentan pueden presentar síntomas agudos, tales como letargo, hipotonía, taquipnea o convulsiones desde el periodo neonatal, en la infancia temprana, la niñez e incluso en la vida adulta que podrían ser fatales si no son detectados y tratados oportunamente (Sweetman 1991; Fu 2000).

Los EIM de los AO's son numerosos y variados en cuanto a su bioquímica, manifestaciones y severidad. Por esta razón a continuación se describen brevemente algunos de ellos.

## **AO de cadena ramificada**

Son un grupo de desórdenes que resultan de la actividad anormal de las enzimas involucradas en el catabolismo de los aminoácidos ramificados, se conocen 10 desórdenes metabólicos, entre los más frecuentes se encuentran:

- Enfermedad de orina con olor a jarabe de maple (EOJM)
- Aciduria isovalérica (AIV)
- Aciduria metilmalónica (AMM)
- Deficiencia de 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa (3MCC)
- Aciduria 3-OH-3-metil glutárica (HL).

## **Metabolismo de los aminoácidos ramificados**

El destino de los esqueletos de carbono de los aminoácidos de cadena ramificada (BCAA del inglés *branched-chain amino acids*) incluye incorporación a proteínas y degradación oxidativa en la mitocondria. Los BCAA se metabolizan en el músculo esquelético como fuente de energía alternativa, también son oxidados en riñones, corazón, tejido adiposo, y cerebro. En hígado los  $\alpha$ -cetoácidos de cadena ramificada (BCKA del inglés *branched-chain  $\alpha$ -ketoacids*) derivados de los BCAA se catabolizan para producir cuerpos cetónicos y succinil-CoA. El tejido adiposo y el músculo utilizan el Acetil-CoA producido de la leucina para la síntesis de ácidos grasos de cadena larga y colesterol. La leucina también parece tener un importante papel en la promoción de la síntesis de proteínas, inhibiendo su degradación y estimulando la secreción de insulina (Chang 2006).

## **Enfermedad con olor a jarabe de maple (EOJM)**

Esta enfermedad es causada por la actividad deficiente del complejo enzimático deshidrogenasa de  $\alpha$ -cetoácidos de cadena ramificada (BCKD del inglés *branched chain  $\alpha$ -ketoacids dehydrogenase*) que cataliza la descarboxilación oxidativa de los BCKA, derivados de la transaminación de los BCAA (Chuang 2001).

El bloqueo metabólico a nivel del BCKD resulta en la incapacidad para degradar los BCAA y sus BCKA lo que provoca que éstos se acumulen en diversos fluidos biológicos como la orina y la sangre. Los niveles elevados de BCAA y sus correspondientes BCKA producen severas consecuencias clínicas incluyendo cetoacidosis fetal, retraso mental, y daño neurológico progresivo (Heldt 2005).

La EOJM es una enfermedad genética que produce crisis de cetoacidosis y deterioro neurológico progresivo que llevan al coma fatal. El inicio del tratamiento temprano es determinante en el pronóstico.

### **Aciduria isovalérica (AIV)**

Esta enfermedad es causada por la una deficiencia de isovaleril-CoA deshidrogenasa la cual es una flavoproteína mitocondrial que transfiere electrones a la cadena respiratoria vía flavoproteína trasferidora de electrones.

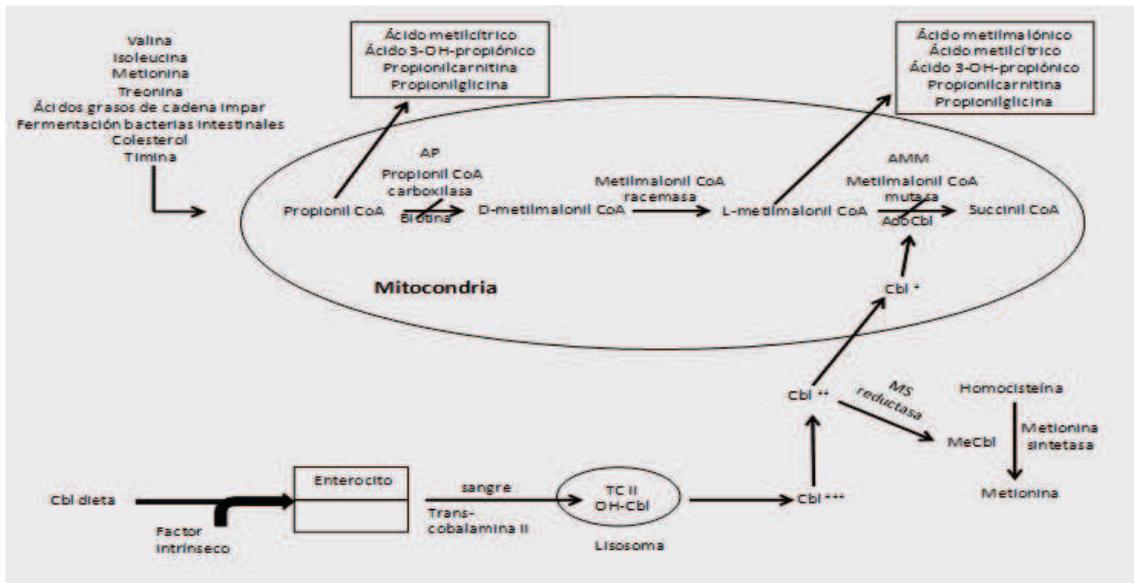
El defecto enzimático deriva en la acumulación de derivados de isovaleril-CoA, incluyendo el ácido isovalérico libre, que se incrementa usualmente en plasma y en orina, así como ácido 3-OH-isovalérico e isovalerilglicina. Esta glicina conjugada es el mayor derivado de la isovaleril-CoA, debido a la alta afinidad que tiene a la glicina N-acilasa. La conjugación con carnitina (catalizada por carnitina N-acilasa) resulta en la formación de isovalerilcarnitina. Estos dos compuestos permiten la transformación de ácido isovalérico altamente tóxico en subproductos no tóxicos que son rápidamente excretados en la orina (Ogier de Baulny 2002).

### **Deficiencia de 3-metil-crotonil carnitina (3-MCC)**

Es un error innato del catabolismo de leucina debido a la deficiencia de 3-metil-crotonil-CoA carboxilasa (MCC). Esta enzima es una de las carboxilasas dependientes de biotina y las formas variantes de la 3-MCC. La MCC cataliza la cuarta etapa de la ruta catabólica de la leucina por carboxilación de 3-metil-crotonil-CoA en el carbono 4 para formar 3-Metilglutaconil-CoA, la cual se acumula en la deficiencia de MCC y se convierte en 3-MCC y ácido 3-OH-isovalérico, los compuestos característicos elevados en la deficiencia de 3-MCC (Baumgartner 2005).

### **Defectos en el metabolismo del propionato**

Dentro de los errores innatos del metabolismo del propionato se encuentran la acidurias propiónica (AP), y la ya mencionada AMM, las cuales son causadas por una actividad nula o deficiente de las enzimas propionil CoA carboxilasa y metilmalonil CoA mutasa respectivamente. La AMM también puede deberse a un defecto en cualquiera de las enzimas que intervienen en la captación, transporte o síntesis de su cofactor, la 5-deoxiadenosil-cobalamina (Fig. 1).



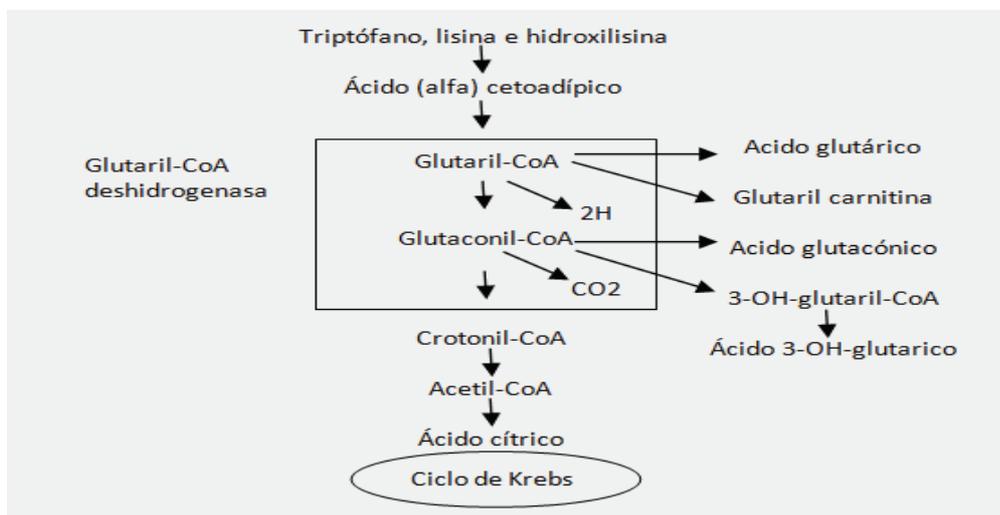
**Figura 1. Ruta bioquímica del propionato.** A partir de los BCAA, de ácidos grasos de cadena impar, colesterol, timina y la fermentación de bacterias intestinales se llega a la formación de propionil-CoA, y una vez dentro de la mitocondria sufre varias reacciones hasta formar Succinil-CoA. Los defectos enzimáticos dentro de esta ruta se esquematizan como  $\rightarrow$ . Estos bloqueos causan las AMM, AP y AIV. Por otro lado, también puede deberse a un defecto en cualquiera de las enzimas que intervienen en la captación, transporte o síntesis de su cofactor, la 5-deoxiadenosil-cobalamina. (Modificado de: Tanpaiboon 2005). Abreviaturas: Cbl: cobalamina, MeCbl: metilcobalamina, TC II: Transcobalamina II, AP: Aciduria propiónica, AMM: Aciduria metilmalónica.

Se caracterizan bioquímicamente por la acumulación de los ácidos propiónico, 3-hidroxipropiónico, metilcátrico, propionilcarnitina, propionilglicina y glicina en los fluidos biológicos, además de ácido metilmalónico en la AMM. Causan intoxicación por acumulación de los metabolitos, principalmente a nivel neurológico, llevando a diferentes grados de discapacidad física e intelectual (Saudabray 2006).

Los pacientes con AP y AMM presentan un cuadro clínico y bioquímico similar, que se caracteriza por crisis de cetoadicidosis, secundaria a la acumulación de los metabolitos tóxicos en los fluidos biológicos, la cual puede ser fatal en las formas más severas; los sobrevivientes presentan secuelas neurológicas, principalmente retraso en el desarrollo psicomotor. El abordaje terapéutico está basado en la restricción dietética de los precursores de propionil-CoA, por lo que estos pacientes llevan dietas muy restrictivas, principalmente en productos de origen animal. El grado de retraso psicomotor se relaciona con la severidad de la mutación, la actividad enzimática residual y la edad de inicio del tratamiento. En términos generales, mientras más temprano se detecta la enfermedad y se instala el tratamiento, mejor es la evolución neurológica (Tanpaiboon 2005).

## Aciduria glutárica tipo I (AG I)

El ácido glutárico es un producto intermediario del catabolismo de lisina, hidroxilisina y triptófano, la acumulación de este metabolito ocurre cuando se presenta deficiencia de la enzima glutaril-CoA deshidrogenasa (Fig. 2), que causa elevada excreción de los ácidos glutárico y 3-hidroxi-glutarico, por lo tanto se consideran marcadores de la enfermedad (Zhang 2000). Eventos estresantes como las enfermedades infecciosas y la deshidratación, así como el retraso en el inicio del tratamiento son factores de riesgo de desarrollar lesiones cerebrales graves. Los pacientes con AG-I son propensos a una grave crisis neurológica caracterizada por hipotonía, encefalopatía, convulsiones febriles, además de hepatomegalia. Las contracciones musculares pueden evolucionar gradualmente a rigidez, distonía, retraso mental de severidad variable, coma y muerte durante la descompensación metabólica aguda (Testai 2010).



**Figura 2. Ruta metabólica del triptófano, lisina e hidroxilisina.** En el recuadro se muestra el sitio del bloqueo metabólico cuando existe aciduria glutárica I y como consecuencia la acumulación de metabolitos tóxicos secundarios (Modificado de: Barreiro 2004).

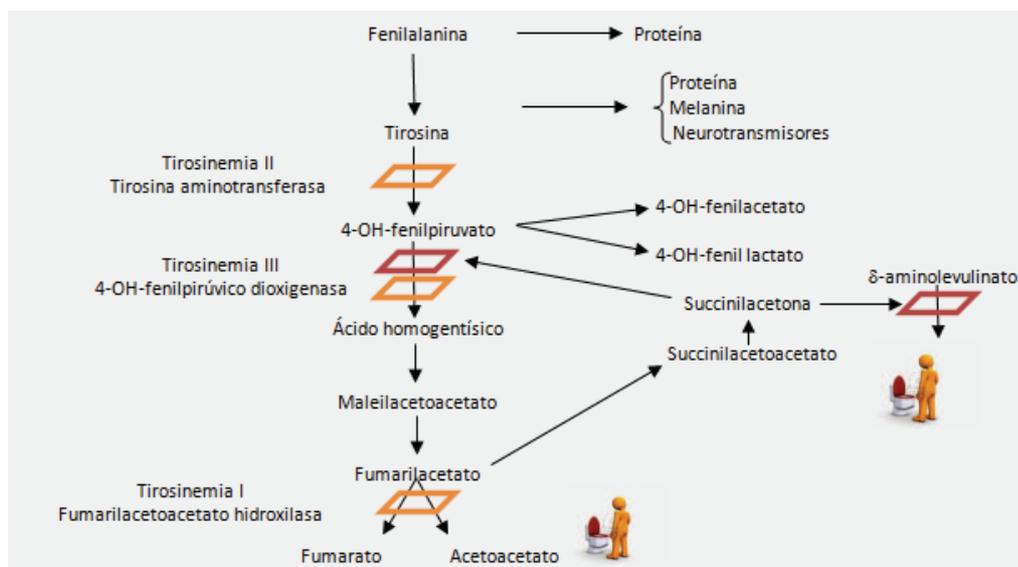
## Tirosinemias

Se conocen 5 defectos genéticos que afectan la ruta bioquímica de la tirosina (Fig. 3):

1. Deficiencia de fumaril acetoacetato deshidrogenasa, se le conoce como tirosinemia tipo I o tirosinemia hepato-renal. Se caracteriza por ser una enfermedad hepática progresiva y disfunción tubular renal, la cual es fatal en la mayoría de los casos no detectados tempranamente. La severidad de este desorden genético se basa en la acumulación de succinilacetona, metabolito patognomónico de la enfermedad que es generado por

activación de una vía metabólica alterna, este metabolito es sumamente tóxico para el hígado y el riñón (Mitchell 2001).

2. Deficiencia de tirosina amino transferasa, también conocida como tirosinemia tipo II o síndrome de Richner-Hanhart. Los pacientes que la padecen presentan hiperqueratosis palmoplantar, erosiones corneales y retraso mental variable, sin embargo, la función renal y hepática se mantienen intactas (Huhn 1998).
3. Tirosinemia tipo III, la cual puede ser asintomática o causar retraso mental, dependiendo de la severidad de la mutación que herede el paciente (Lynn 2004).
4. Hawkinsinuria. Condición cuyo modo de herencia es autosómico dominante. Los pacientes con esta enfermedad pueden cursar asintomáticos o con falla para crecer y periodos de acidosis metabólica en la infancia. La presencia en orina del aminoácido azufrado hawkinsina (ácido (2-L-cisteína-S-il-1,4-dihidroxiciclohex-5-en-1-il)-acético) es diagnóstica de la enfermedad.
5. Deficiencia de oxidasa de ácido homogentísico, mejor conocida como alcaptonuria. Es una enfermedad en la que el ácido homogentísico no puede ser metabolizado, lo que causa su acumulación en las articulaciones y como consecuencia se desarrolla osteoartritis, ocronosis y la excreción del ácido en la orina (Mitchell 2001).



**Figura 3. Metabolismo de la tirosina.** Se esquematizan los bloqueos enzimáticos en cada una de las diferentes tirosinemias, así como los productos generados por estos defectos (Modificado de: Scott 2006).

## Diagnóstico de las AO

La orina humana contiene numerosos compuestos producto del metabolismo intermedio en diferentes concentraciones que pueden proporcionar evidencia contundente para el diagnóstico químico de algunas AO (Kuhara 2007; Prieto 2007).

La tabla 2 muestra algunos metabolitos excretados en orina en diferentes AO.

**Tabla 2. AO excretados en orina de pacientes con EIM frecuentes**

<b>AO's excretados en orina</b>	<b>Error innato del metabolismo relacionado</b>
<b>Ácido metilmalónico</b>	AMM, deficiencia de transcobalamina II, aciduria malónica.
<b>Ácido láctico o ácido pirúvico</b>	Acidosis láctica primaria, deficiencia del complejo piruvato deshidrogenasa (E1, E2 y E3), defectos en la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa, defecto en los ácidos del Ciclo de Krebs, AG I, deficiencia múltiple de carboxilasa, AIV, AP, AMM, citrulinemia, deficiencia de glicerol cinasa, aciduria etilmalónica.
<b>Ácido 3-hidroxibutírico</b>	Defectos en la gluconeogénesis, deficiencia del complejo piruvato deshidrogenasa, deficiencias en la cadena respiratoria, AIV, AP, AMM, deficiencia múltiple de carboxilasa, deficiencia de 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa, EOJM, AG.
<b>Ácido sebásico o ácido subérico</b>	Defectos de $\beta$ -oxidación, HL, deficiencia sistémica de Carnitina, aciduria succínica (AS), desórdenes en el depósito de glucógeno tipo I y II, aciduria láctica (AL), intolerancia a la fructosa.
<b>Ácido succínico</b>	AS, Aciduria malónica, aciduria fumárica (AF), deficiencia en la cadena respiratoria, deficiencia de piruvato carboxilasa, deficiencia del complejo piruvato deshidrogenasa (E1, E3).
<b>Ácido fumárico</b>	AF, deficiencias en la cadena respiratoria, deficiencia de piruvato carboxilasa, deficiencia del complejo piruvato deshidrogenasa (E1, E3).
<b>Ácido glutárico</b>	AG tipo I y II.

**Tabla 2 (continuación)**

<b>Ácido 4-hidroxifenilacético</b>	Tirosinemia, fenilcetonuria, hawkinsinuria.
<b>Ácido 4-hidroxifenil-láctico</b>	Tirosinemia, fenilcetonuria, hawkinsinuria, AL
<b>N-acetiltirosina</b>	Tirosinemia
<b>Ácido 4-hidroxifenilpirúvico</b>	Tirosinemia, Hawkinsinuria
<b>Ácido N-acetilaspártico</b>	Enfermedad de Canavan

Fuente: Kumps 2002

## **Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CGEM)**

El primer estudio de metabolitos urinarios data de 1917 cuando se descubrió la presencia del ácido cítrico en esta matriz biológica; dicho estudio se realizó con técnicas de cromatografía simple. En el año 1966 Tanaka y colaboradores introdujeron la técnica de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CGEM) (Fig. 4) para el diagnóstico de AIV. Dicha técnica consiste en una combinación de procedimientos cromatográficos y de espectrometría de masas (EM). La parte cromatográfica del procedimiento lleva a cabo la separación de los compuestos, y la de EM sirve para identificarlos en función de sus espectros de masas (Tanaka 1966).

Desde entonces, la CGEM ha sido la tecnología analítica por excelencia para el análisis de AO's en orina para el diagnóstico químico de las AO ya que asegura alta precisión y sensibilidad, también proporciona información sobre múltiples compuestos simultáneamente (Zhang 2000).

Esta técnica analítica se empleó para el diagnóstico de otras AO como la AMM (Oberholzer *et al.* 1967; Stokke *et al.* 1967), la AP (Hommes *et al.* 1971), la aciduria piroglutámica (Jellum *et al.* 1970) y la  $\alpha$ -metilcrotonilglicinuria (Eldjarn *et al.* 1970; Gomperts *et al.* 1971) (Kuhara 2005).

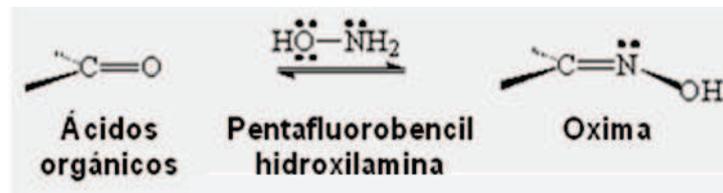


**Figura 4. Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas.** Se compone de inyector, gas acarreador, columna con horno a temperatura controlada y espectrómetro de masas de tipo cuadrúpolo con ionización por impacto electrónico (Imagen proporcionada por el Laboratorio de errores innatos del metabolismo y tamiz (LEIMyT) del Instituto Nacional de Pediatría (INP).

## El punto crítico del estudio de AO's mediante CGEM

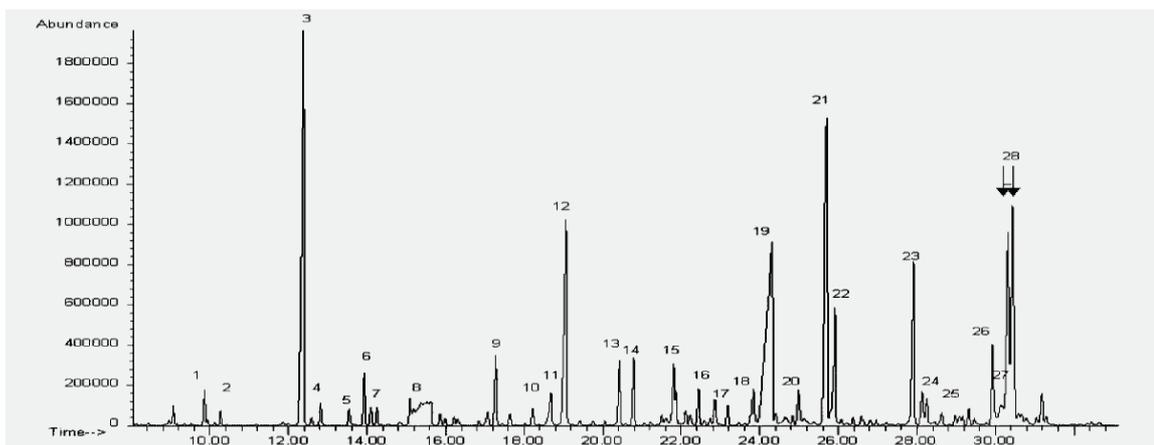
El punto crítico consiste en lograr el aislamiento de los AO's para su posterior procesamiento mediante CGEM, evitando que otros compuestos que comúnmente se encuentran en la orina interfieran con el análisis de los resultados (por ejemplo la urea, los fosfatos, y sulfatos) (Duez 1996). Asimismo, es importante evitar la pérdida de compuestos volátiles que son determinantes en el diagnóstico de algunas AO como la EOJM. Kuhara y colaboradores en 2001 describieron la técnica para extracción y purificación de AO's mediante 3 pasos principales:

1. Formación de los derivados oximados de los AO's por una reacción con hidroxilamina (Fig. 5) con el objetivo de evitar la pérdida de los ácidos volátiles formando complejos de alto peso molecular.
2. Extracción de los AO's utilizando el método de extracción por disolventes, generalmente con acetato de etilo en medio ácido.
3. Formación de los derivados volátiles de los AO's por una reacción de bis-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) con trimetilsilano (TMS), reacción mejor conocida como silanización (Kuhara 2001; Nakagawa 2010).



**Figura 5. Reacción de oximación.** La parte carboxílica de la molécula de los AO's reacciona con pentafluorobencil hidroxilamina y produce un compuesto oximado (Fernández 2008).

La interpretación del análisis de AO's depende de metabolitos "clave", así como del patrón característico de anomalías (Fig. 6).



**Figura 6. Cromatograma con el perfil de AO's urinarios obtenido mediante CGEM.** Es la interpretación grafica de las moléculas analizadas mediante CGEM, (Imagen proporcionada por el LEIMyT del INP).

Para el análisis de los AO's es preferible recolectar las muestras durante la crisis metabólica. Es importante señalar que el tratamiento, la dieta y la hora de toma de muestra también pueden modificar el perfil urinario de AO's por lo que la interpretación final requiere información detallada del cuadro clínico y bioquímico del paciente y en ocasiones de repetidos estudios de análisis de AO's, incluso con pruebas de reto (Vela 2002).

### **AO's expresados en unidades de mmol/mol de creatinina**

Por convención internacional los valores de concentración de AO's urinarios se reportan en unidades de mmol/mol de creatinina con el objetivo de contar con un valor de referencia de la cantidad de solutos disueltos en la orina.

La creatinina se utiliza como compuesto de referencia debido a que es un producto del metabolismo de las proteínas que se excreta en niveles constantes en la orina porque su reabsorción es prácticamente nula (Sweetman 1991).

### **Uso de la OPF**

El depósito de muestras biológicas en papel filtro (PF) (fig. 7) fue una innovación propuesta por el Dr. Robert Guthrie en 1963 (Guthrie 1963), sin embargo su uso prácticamente se ha limitado al depósito de sangre completa para la realización del tamiz neonatal (TN) para la detección de diversos EIM. El uso de dicho PF para otras muestras biológicas está poco difundido. En algunos países como Canadá y Japón se realizaron estudios en donde se encontró el PF puede ser útil para el depósito y transporte de muestras biológicas como la orina (Fu 2000, Tuchman 1991).



**Figura 7. Tarjeta de Guthrie.** Tarjeta de papel filtro de la marca S&S 903 impregnada con orina.

## JUSTIFICACIÓN

El INP es el centro nacional de referencia para el diagnóstico y seguimiento de pacientes con EIM. El envío al LEIMyT de las muestras de orina de estos pacientes, representa un grave problema logístico: ya que deben ser congeladas para evitar la proliferación de bacterias, cuyo metabolismo puede alterar la composición de los AO's presentes en la orina; las muestras deben ser transportadas congeladas y acompañadas de hielo, lo cual implica paquetes voluminosos y pesados que aumentan el costo del transporte al requerir mensajería por red fría.

En la práctica cotidiana, hemos observado que un alto porcentaje de muestras llegan en malas condiciones y tienen que ser desechadas, con la solicitud de un nuevo envío, lo cual retrasa de manera importante la realización del estudio y la posibilidad de llegar a un diagnóstico oportuno, además de significar una pérdida económica importante (por ejemplo un envío del Hospital Infantil de Tamaulipas al INP, con una muestra de 20 mL de orina congelada, acompañada de 3 kg de hielo, cuesta aproximadamente \$601.00, en cambio el envío de un sobre cuesta \$221.00 por mensajería y a través del servicio de Correos de México \$16.00.

En México, la tarjeta de Guthrie se utiliza de manera rutinaria para la realización del tamiz neonatal en sangre, y prácticamente todas las unidades médicas lo tienen disponible, de tal manera que modificar la logística del envío y reemplazar la orina líquida (OL) congelada por orina en papel filtro (OPF) significaría un ahorro monetario cercano al 63%, además de tener la certeza de que la muestra llega en buenas condiciones para ser procesada, con el correspondiente ahorro de tiempo, que es el factor más valioso para el paciente con sospecha de una enfermedad metabólica.

Por lo anterior decidimos implementar una metodología para la extracción de AO's en muestras de OPF, para su posterior análisis por CGEM.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Implementar una metodología que permita la elución los AO's de muestras de OPF para su posterior determinación mediante CGEM.

### **Objetivos particulares**

- Analizar el porcentaje de recuperación de diferentes AO's y creatinina extraídos de la OPF por medio de la respuesta obtenida por medio de CGEM.
- Conocer la estabilidad de los AO's presentes en muestras de OPF, a diferentes tiempos mediante CGEM.
- Evaluar la utilidad del análisis de AO's de muestras de OPF de pacientes con sospecha de AO como herramienta para evaluación bioquímica a distancia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Clasificación de la investigación

Estudio longitudinal, experimental, prospectivo.

### Reactivos

- > Acetato de etilo, grado HPLC (cromatografía líquida de alta resolución del inglés *high performance liquid chromatography*)
- > Ácido dodecanedioico 2mM (98% de pureza) en metanol grado HPLC (estándar interno)
- > Hidrocloruro de o-(2, 3, 4, 5, 6- pentafluorobencil) – hidroxilamina, grado reactivo
- > Solución de hidróxido de sodio 3N, grado reactivo
- > Ácido clorhídrico concentrado (37%), grado reactivo
- > Solución sobresaturada de cloruro de sodio, grado reactivo
- > Solución de hidróxido de sodio 0.05 M en metanol, grado HPLC
- > Bis-(trimetilsilil) trifluoroacetamida + 1% trimetilclorosilano (BSTFA + TMS), (grado reactivo).
- > Ácido pícrico, grado reactivo
- > Creatinina, grado reactivo
  
- > Estándares de AO's:
  - Ácido láctico
  - Ácido 3-hidroxibutírico
  - Ácido metilmalónico
  - Ácido succínico
  - Ácido fumárico
  - Ácido glutárico
  - Ácido pirúvico
  - Ácido 4-hidroxifenilacético
  - N-acetilaspártico
  - Ácido subérico
  - Ácido 4-hidroxifenilacético
  - Ácido sebásico
  - Ácido dedecanedioico
  - Ácido N-acetil tirosina
  - Ácido 4-hidroxifenilpirúvico

Tarjetas de PF de 10cm x 5cm x 0.5mm, 100% de algodón, marca Schliecher & Schuell®, grado 903.

Todos los reactivos fueron adquiridos de Sigma (St. Luis, MO, USA), excepto por el ácido clorhídrico (J.T.Baker, Edo. Méx. Méx.), acetato de etilo (Caledon, Ont. Canadá) y BSTFA + TMS (Regis, IL, USA).

## Matriz biológica

- Orinas de voluntarios sanos.
- Muestras de orina de pacientes con sospecha de AO.

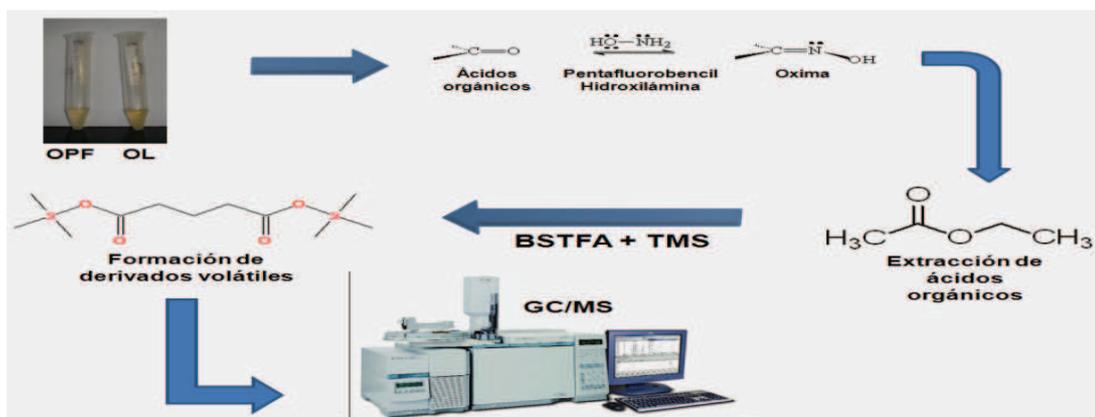
### Procesamiento de la muestra

#### Cuantificación de creatinina urinaria

La determinación de creatinina se realizó mediante el método de Jaffé (O'Brien 1968). La orina se hace reaccionar con picrato de sodio para obtener un compuesto que da coloración amarilla, cuya absorbancia se lee a 520 nm en un espectrofotómetro. Para obtener la concentración de creatinina urinaria, se relaciona la absorbancia de una dilución de creatinina de concentración conocida, con la absorbancia de la orina.

#### Extracción de AO's de muestras de OL.

Se tomó el volumen necesario de orina que contenga una concentración de creatinina de 0.06 mg/mL. A la orina se le adicionaron 20 µL de solución de estándar interno 2 mM más 5 mg de hidrocloreuro de o-(2, 3, 4, 5, 6- pentafluorobencil)-hidroxilamina para obtener un compuesto derivado oximado de los AO's, posteriormente estos derivados se extrajeron por en dos ocasiones por medio del uso de acetato de etilo. El disolvente se eliminó por evaporación en una campana de extracción por 12 horas. Se llevó a cabo la reacción de formación de los derivados volátiles de los AO's mediante la adición de 100 µL de BSTFA + TMS a las muestras secas perfectamente secas por evaporación. Se realizó una dilución 1:4, y se inyectó 1 µL en el cromatógrafo de gases (CG) para su análisis (Figura 8).



**Figura 8.** Extracción de AO's para su procesamiento por CGEM. A partir de la OL se llevan a cabo reacciones de oximación con el fin de extraer los AO's presentes en la muestra, los cuales se hacen reaccionar posteriormente con trimetilclorosilano (TMS) para formar derivados volátiles, que pueden ser procesados finalmente por CGEM. (Fernández 2011).

## **Análisis de AO's mediante CGEM**

Para obtener el perfil de AO's se inyectó 1 µl de cada muestra al equipo CGEM, el cual se operó bajo las siguientes condiciones:

### **Equipo**

- Cromatógrafo de gases marca Agilent, modelo 6890N.
- Espectrómetro de masas marca Agilent, modelo 5973.
- Fase estacionaria: Columna capilar J & W, modelo 1225532 DB-5MS, de (5% fenil)-metilpolisiloxano de 30m x 0.250mm de diámetro x 0.25 mm de espesor de película.
- Fase móvil: Gas Helio de ultra alta pureza.



**Figura 9. Cromatógrafo de gases marca Agilent, modelo 6890N. El LEIMyT del INP cuenta con este equipo, Útil para la detección de AO.**

### **Condiciones cromatográficas**

Programa de temperatura:

La temperatura inicial de la columna es de 40°C por 5 min, temperatura final de 280°C por 2 min., velocidad de calentamiento 10°C por min.

Temperatura del inyector:	250°C
Temperatura de la línea de transferencia:	280°C
Temperatura de la fuente de ionización:	150°C
Tipo de inyección:	Total (Splitless)

### **Análisis mediante EM.**

Se realizó un monitoreo total de iones (“Total Ion Scan”) en el intervalo masa/carga (m/z) de 45 a 650. La identificación de los compuestos de interés se llevó a cabo mediante la extracción de los iones de identidad (Tabla 3) (Sweetman 1991).

**Tabla 3. Estándares de AO's utilizados en el proyecto y sus respectivos iones de cuantificación e identificación.**

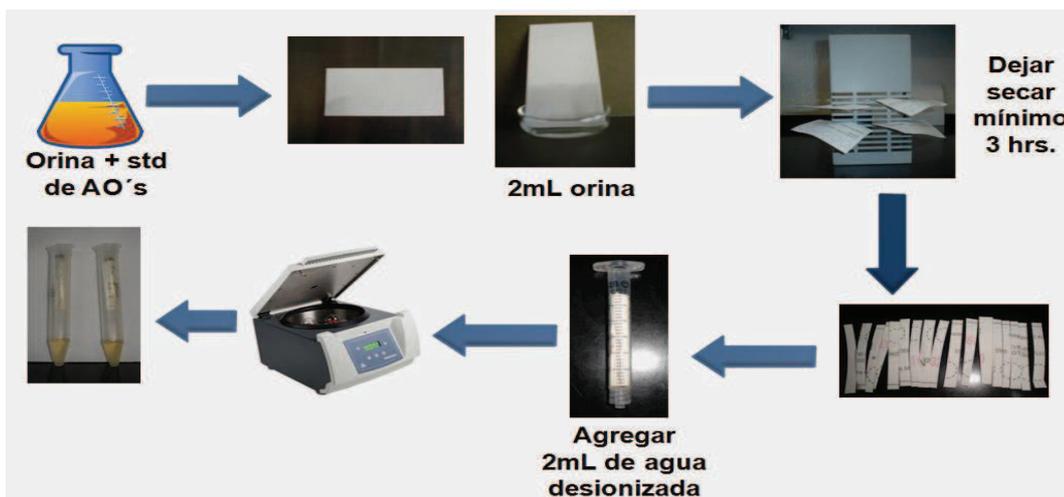
Ácidos orgánicos	Tiempo de retención (min)	Ion de cuantificación (m/z)	Ion de identidad (m/z)
Ácido láctico	12.1	219	190
Ácido 3-hidroxiбутírico	13.2	191	117
Ácido metilmalónico	14.1	218	247
Ácido succínico	15.3	247	172
Ácido fumárico	15.8	245	147
Ácido glutárico	16.6	261	158
Ácido pirúvico	18.1	181	340
Ácido 4-hidroxiifenilacético	19.5	252	179
N-acetilaspártico	20.0	158	202
Ácido subérico	20.1	303	169
Ácido 4-hidroxiifenilláctico	22.3	308	179
Ácido sebásico	22.4	331	117
Ácido dedecanedioico *	24.6	359	117
Ácido N-acetil tirosina	24.7	308	352
Ácido 4-hidroxiifenilpirúvico	25.9	277	190

\*Estándar interno

Fuente: Sweetman 1991.

### **Procedimiento de extracción de OPF.**

A una pieza de PF se le adicionaron 2 mL de orina por capilaridad, se dejó secar por 3 horas y posteriormente se recortó en tiras, de tal manera que se pudiera colocar en una jeringa convencional de 3 mL, misma que a su vez se colocó dentro de un tubo de centrifuga. Posteriormente las tiras de PF se reconstituyeron con 2 mL de agua desionizada y se centrifugaron a 500 rpm durante 10 min (Fig. 10). En este reconstituido se determinaron las concentraciones de creatinina y AO's.



**Figura 10. Impregnado y reconstitución de la OPF.** Se observa el proceso completo desde la preparación de orina estándar para impregnar el PF, hasta su reconstitución para su procesamiento habitual.

### **Estrategia experimental**

Para establecer la utilidad de la OPF como herramienta diagnóstica de las AO, se realizó la siguiente metodología experimental.

#### **Determinación de la interferencia del PF en el análisis de AO's (blanco)**

Se impregnaron 10 piezas de PF con 2mL de agua grado HPLC, se dejaron secar a temperatura ambiente por 3 horas, posteriormente se realizó el proceso de extracción adicionando 2 mL de agua grado HPLC. El agua obtenida se procesó para su análisis por CGEM.

#### **Determinación de la correlación de creatinina de OL y la OPF**

Para establecer la correlación de creatinina entre la OL y la OPF, se procesaron por triplicado 10 muestras de orina provenientes del banco de muestras del LEIMyT, cuya concentración de creatinina se encontraba en un intervalo de 0.1-1.6mg/dL. De cada muestra se impregnaron 2 mL en una tarjeta de Guthrie y se trabajó a la par con la OL. Posteriormente se realizó la gráfica para establecer la correlación entre la creatinina de ambos tipos de muestra.

#### **Preparación de la orina de trabajo**

Con orinas de voluntarios se formó un pool, al cual se le determinaron los AO's presentes y posteriormente se le adicionaron cantidades conocidas de estándares de AO's (tabla 3) con el

objetivo de contar con orinas que tuvieran concentraciones de AO's tanto fisiológicas como patológicas. Las concentraciones de trabajo fueron 2, 39 y 79 mmol/mol de creatinina.

### **Recuperación de los AO's del PF**

Por cada concentración de trabajo se impregnaron 5 piezas de PF con 2 mL de orina, se dejaron secar a temperatura ambiente por 3 horas en una superficie no absorbente. Una vez seco el PF, se realizó el procedimiento de extracción descrito (Fig. 8). Al extracto obtenido se le determinaron AO's.

Se realizó una comparación entre el área de los AO's de la OPF y el área de la OL, tomando esta última como el 100% de recuperación. La reproducibilidad del método se evaluó calculando el coeficiente de variación (CV) de 5 mediciones independientes de cada uno de los AO's estudiados. También se calculó el coeficiente de correlación entre ambos tipos de muestra utilizados.

### **Estabilidad de los AO's en el PF**

Con el objetivo de evaluar la estabilidad de los analitos estudiados se impregnaron 5 piezas de PF para cada una de las 3 concentraciones de trabajo y se almacenaron a temperatura ambiente. Los AO's se evaluaron el mismo día del impregnado (tiempo cero) y en los días 7, 14, 21 y 28. La estabilidad se definió como el porcentaje de las áreas obtenidas a los diferentes tiempos tomando como 100% la concentración del tiempo cero. La reproducibilidad del método se evaluó calculando el CV de 5 mediciones independientes de cada uno de los AO's estudiados a los diferentes tiempos.

### **Evaluación de la técnica implementada como herramienta de evaluación bioquímica a distancia.**

Dado que el envío de muestras de orina implica una cantidad de variables que no pueden ser controladas, se decidió probar el método con 38 muestras de pacientes tanto líquidas como impregnadas en PF, las cuales fueron enviadas a nuestro centro de referencia y se les dio el mismo tratamiento para extracción de la orina previamente explicado (Figura 8).

## RESULTADOS

### Interferencia del PF en el análisis de AO's.

El agua extraída del PF se procesó como una muestra de rutina para su análisis por CGEM. Sólo se observó la presencia del reactivo derivatizante BSTFA para la reacción de oximación, (Figura 12).



Figura 12. Cromatograma de agua extraída de PF. Únicamente se observó el reactivo derivatizante (BSFTA).

### Correlación de creatinina de OL y OPF.

Se encontró que existe una correlación lineal de los valores de la OPF con respecto a la OL con un coeficiente de correlación de 0.9922 en el intervalo de concentración de 0.1-0.6mg/dL (Figura 13).

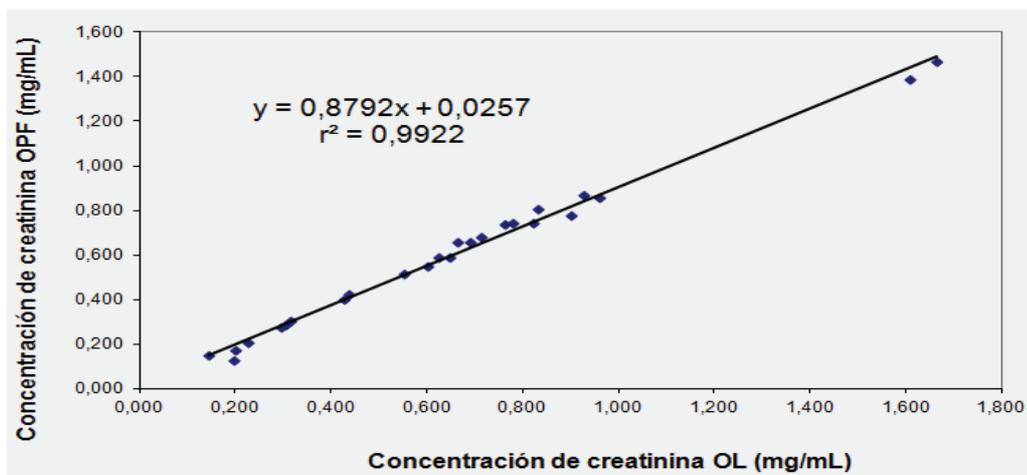


Figura 13. Correlación de creatinina de OL vs creatinina obtenida de OPF. La variable independiente fue la creatinina de OL y la variable dependiente fue la creatinina obtenida de OPF

## Porcentaje de recuperación de los AO's

El promedio de los porcentajes de recuperación obtenidos, así como el intervalo se muestran en las figuras 14 a 16 para las tres concentraciones de trabajo.

En cuanto al análisis de reproducibilidad de la recuperación, se encontró que ninguno de los AO's estudiados en las tres concentraciones de trabajo presentó un CV mayor de 20 % (Figuras 14-16). Para todos los AO's en las tres concentraciones de trabajo, se encontró un coeficiente de correlación mayor de 0.9, indicando una correlación lineal entre la OL y la OPF.

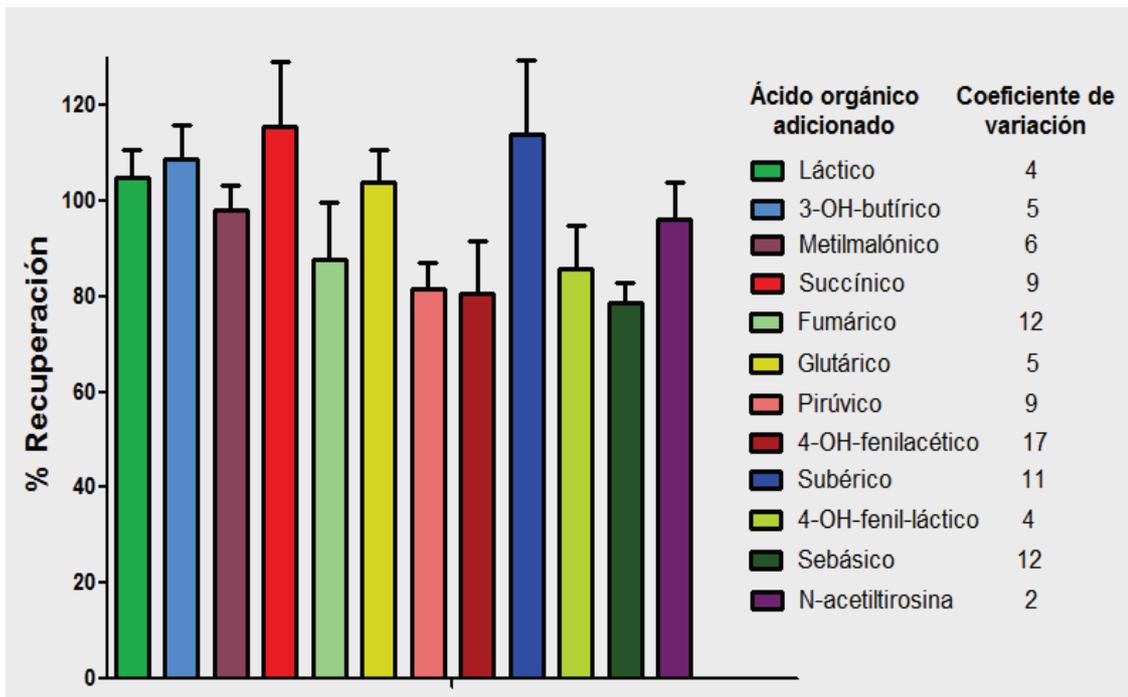


Figura 14. Porcentaje de recuperación y reproducibilidad de la extracción de AO's en OPF para la concentración 2 mmol AO's/mol de creatinina. El área obtenida para cada AO en la OL corresponde al 100%; el promedio del porcentaje de recuperación fue de 96%, en un intervalo de 83-116%.

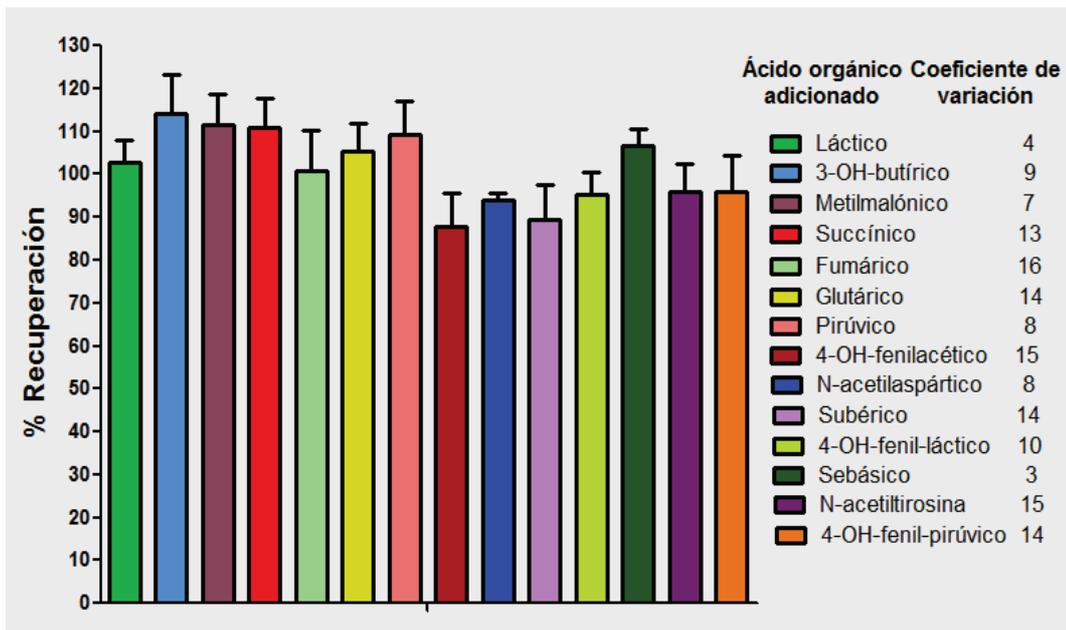


Figura 15. Porcentaje de recuperación y reproducibilidad de la extracción de AO's en OPF para la concentración 39 mmol AO's/mol de creatinina. El área obtenida para cada AO en la OL corresponde al 100%; el promedio del porcentaje de recuperación fue de 101%, en un intervalo de 87-112%.

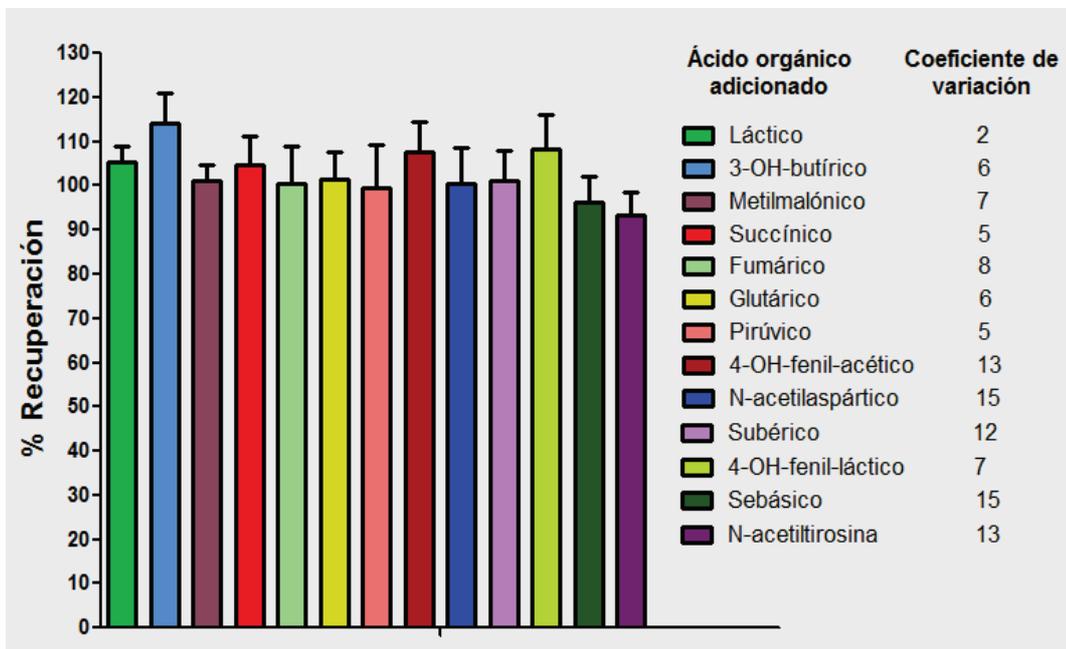


Figura 16. Porcentaje de recuperación y reproducibilidad de la extracción de AO's en OPF para la concentración 79 mmol AO's/mol de creatinina. El área obtenida para cada AO en la OL corresponde al 100%; el promedio del porcentaje de recuperación fue de 103%, en un intervalo de 93-112%.

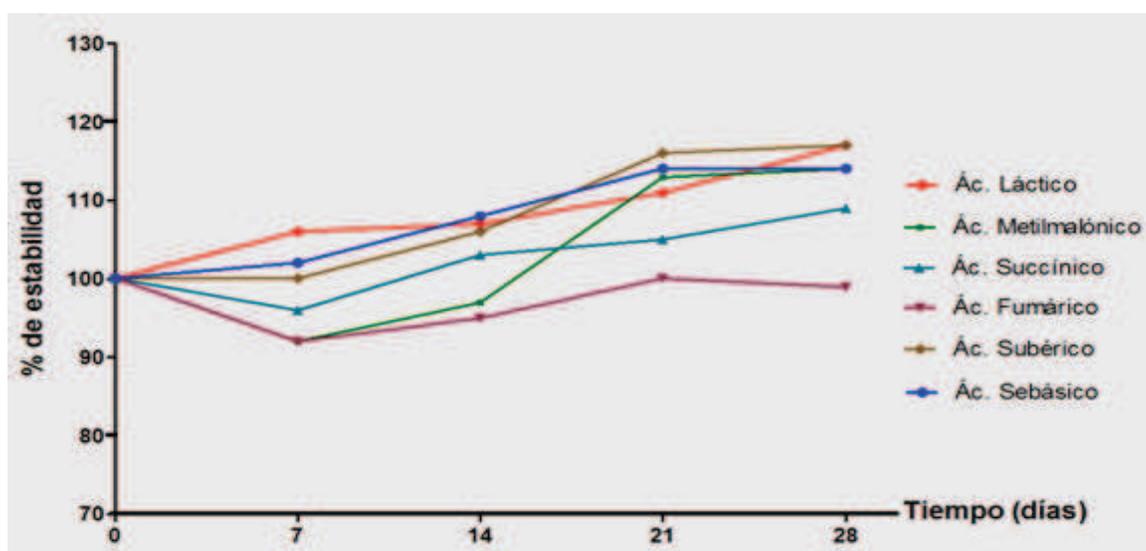
## Estabilidad de los AO's

Al realizar las mediciones a los días 0, 7, 14, 21 y 28 en la orina extraída del PF, se calcularon los porcentajes de Estabilidad que se muestran en las figuras 17 a 19 para las tres concentraciones de trabajo. Ninguno de los AO's estudiados en las tres concentraciones de trabajo presentó un CV mayor de 20 % (Tabla 4).

**Tabla 4. CV de las áreas de los AO's en las diferentes concentraciones de trabajo para los tiempos estudiados.**

Ácido orgánico	Día cero			Día 7			Día 14			Día 21			Día 28		
	C2	C39	C79	C2	C39	C79	C2	C39	C79	C2	C39	C79	C2	C39	C79
Láctico	6	6	5	7	2	8	9	5	5	7	1	5	3	10	4
3-OH-butírico	7	3	7	14	4	5	12	11	4	6	7	5	3	5	1
Metilmalónico	15	4	4	12	6	6	16	9	9	9	13	8	9	5	5
Succínico	14	3	8	10	7	9	15	2	12	6	7	5	10	8	7
Fumárico	9	8	8	9	3	8	5	4	6	8	10	7	6	6	7
Glutárico	11	8	7	9	6	3	4	6	8	15	5	7	7	6	5
Pirúvico	18	4	13	6	3	15	16	1	15	3	4	4	12	5	9
4-OH-fenil-acético	6	5	8	9	6	5	13	10	7	3	2	10	6	8	14
N-acetilaspártico	ND	8	12	ND	5	10	ND	4	10	ND	9	3	ND	3	9
Subérico	15	6	6	14	10	7	10	9	12	9	6	5	9	4	15
4-OH-fenil-láctico	11	3	3	7	2	13	13	8	7	4	4	3	6	4	7
N-acetilaspártico	8	2	2	4	6	9	9	4	8	12	5	5	12	6	10
Sebásico	6	1	8	7	3	10	2	5	4	6	3	3	7	3	3
N-acetil tirosina	3	9	6	11	3	2	10	6	11	10	8	9	8	8	9
4-OH-fenil-pirúvico	ND	14	26	ND	25	14	ND	7	88	ND	3	6	ND	14	11

Abreviaturas: C: Concentración; ND: No determinable.



**Figura 17. Estabilidad de la OPF a través del tiempo para la concentración 2 mmol AO's/mol de creatinina. El promedio fue de 106 %, en un intervalo 92 – 116%.**

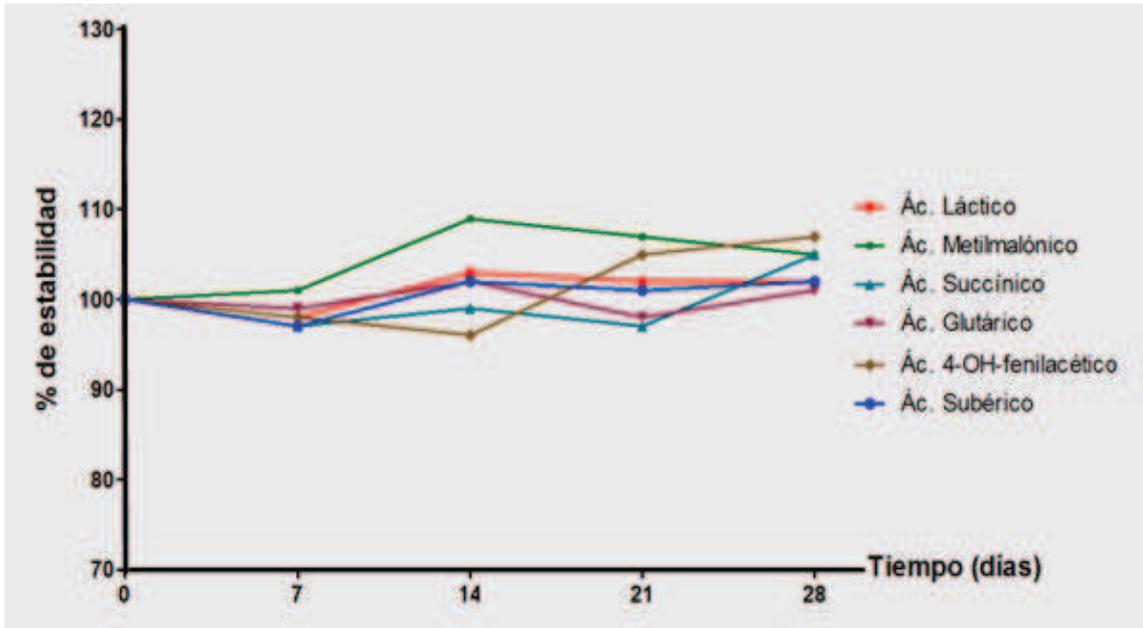


Figura 18. Estabilidad de la OPF a través del tiempo para la concentración 39 mmol AO's/mol de creatinina. El promedio fue de 100 %, en un intervalo 92 – 111%.

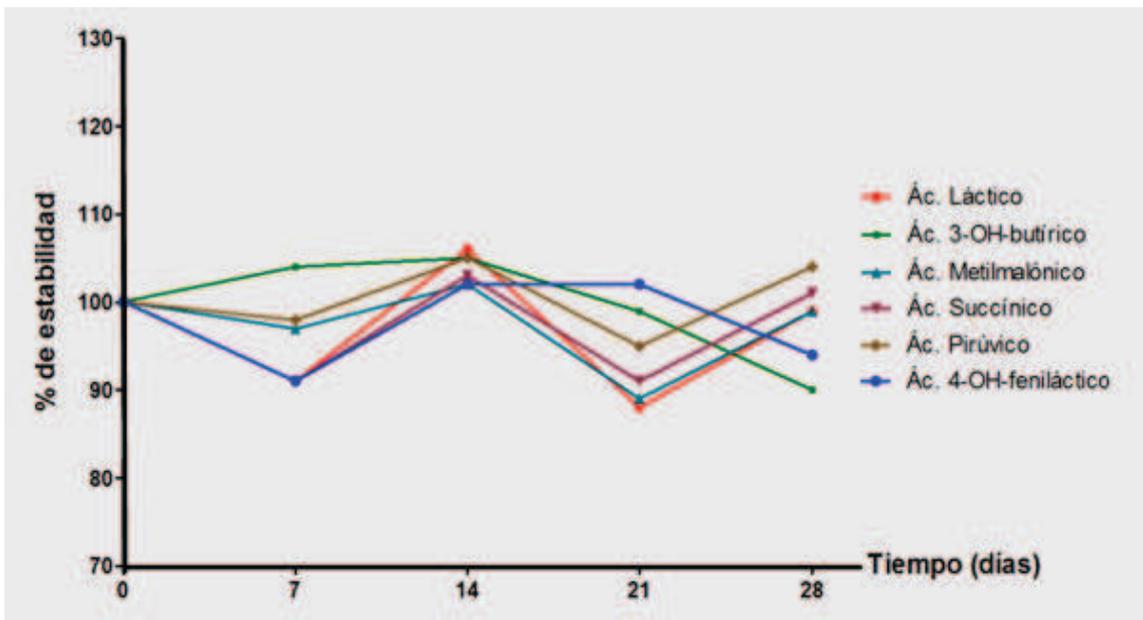


Figura 19. Estabilidad de la OPF a través del tiempo para la concentración 79 mmol AO's/mol de creatinina. El promedio fue de 100 %, en un intervalo 87 – 106%.

**Evaluación de la técnica implementada como herramienta de evaluación bioquímica a distancia.**

Las 38 muestras recibidas provenían de los estados de Chihuahua, Aguascalientes, Querétaro, Yucatán, Sinaloa, Sonora, Hidalgo, Veracruz, México, Guanajuato, Oaxaca, Zacatecas, Tabasco y Guadalajara. Del total de muestras estudiadas, 23 fueron positivas para alguna AO (Tabla 5). En las 15 muestras restantes no se encontró ningún metabolito que evidenciara algún defecto metabólico específico. Los perfiles de AO's característicos de algunas de las AO encontradas se muestran en las figuras 20 a 24.

**Tabla 5. Resultados de las 38 muestras de OPF recibidas en el INP**

Número de muestra	Lugar de origen	Metabolitos encontrados	Conclusión
1	Chiapas	Importante elevación de los ácidos cetoisocapróico, 2-OH-isovalérico y 2-ceto-3-metilvalérico	Perfil de AO's compatible con EOJM
2	Tabasco	Ligera elevación de ác. 3-OH-3-metilglutárico y 3-metilcrotonilglicina	Perfil de AO's compatible con deficiencia de HL
3	Tamaulipas	Moderada elevación de ác. 3-hidroxi-isovalérico e importante elevación de isovalerilglicina	Perfil de AO's compatible con AIV
4	Yucatán	Importante elevación de ác. glutárico y ác. 2-hidroxi-glutárico	Perfil de AO's compatible con AG I
5	Tabasco	Importante elevación de ác. 3-hidroxi-isovalérico y trazas de 3-metilcrotonilglicina	Perfil de AO's compatible con deficiencia de 3MCC
6	Tabasco	Excreción muy aumentada de ác. 3-hidroxi-isovalérico y 3-metilcrotonilglicina	Perfil de AO's compatible con deficiencia de 3MCC
7	Tabasco	Excreción muy aumentada de ác. 3-hidroxi-isovalérico y 3-metilcrotonilglicina	Perfil de AO's compatible con deficiencia de 3MCC
8	Tabasco	Moderada elevación de ác. 3-hidroxi-isovalérico e importante elevación de 3-metilcrotonilglicina	Perfil de AO's compatible con deficiencia de 3MCC
9	Tabasco	Moderada elevación de ác. 3-hidroxi-isovalérico y trazas de 3-metilcrotonilglicina	Perfil de AO's compatible con deficiencia de 3MCC
10	Tabasco	Moderada elevación de ác. 3-hidroxi-isovalérico y trazas de 3-metilcrotonilglicina	Perfil de AO's compatible con deficiencia de 3MCC

Tabla 5. Continuación.

<b>Número de muestra</b>	<b>Lugar de origen</b>	<b>Metabolitos encontrados</b>	<b>Conclusión</b>
11	Tabasco	Moderada elevación de ác. 3-hidroxi-isovalérico e importante elevación de isovalerilglicina	AIV
12	Tabasco	Importante elevación de ác. 3-OH-isovalérico y ligera elevación de 3-metilcrotonilglicina	Perfil de AO's compatible con deficiencia de 3MCC
13	Tabasco	Importante elevación de ác. 3-OH-isovalérico y moderada elevación de 3-metilcrotonilglicina	Perfil de AO's compatible con deficiencia de 3MCC
14	Tabasco	Importante elevación de ác. 3-hidroxi-isovalérico y trazas de 3-metilcrotonilglicina	Perfil de AO's compatible con deficiencia de 3MCC
15	Sonora	Importante elevación de ác. láctico y pirúvico	Perfil de AO's compatible con AL
16	Tabasco	Importante elevación de ác. 3-hidroxi-isovalérico y 3-metilcrotonilglicina	Perfil de AO's compatible con deficiencia de 3MCC
17	Tabasco	Importante elevación de ác. 3-hidroxi-isovalérico y trazas de 3-metilcrotonilglicina	Perfil de AO's compatible con deficiencia de 3MCC
18	Tabasco	Importante elevación de ác. 3-hidroxi-isovalérico y trazas de 3-metilcrotonilglicina	Perfil de AO's compatible con deficiencia de 3MCC
19	Yucatán	Importante elevación de ác. 3-hidroxi-isovalérico y 3-metilcrotonilglicina	Perfil de AO's compatible con deficiencia de 3MCC
20	Veracruz	Importante elevación de ác. 3-OH-propiónico, metilcátrico, propionilglicina y tigililglicina	AP
21	Veracruz	Importante elevación de ác. 2-metil-3-oh-butírico y tigililglicina	2-metil-3-OH-butiril CoA deshidrogenasa
22	Chiapas	Importante elevación de ác. 3-OH-isovalérico y moderada elevación de 3-metilcrotonilglicina	Perfil de AO's compatible con deficiencia de 3MCC
23	Tamaulipas	Importante elevación de ác. 3-hidroxi-isovalérico y 3-metilcrotonilglicina	Perfil de AO's compatible con AIV

A continuación se describen los casos clínicos de algunas de las muestras recibidas que resultaron positivas para alguna AO:

### Ejemplo A: Deficiencia de 2-metil-3-OH-butiril-CoA deshidrogenasa.

Muestra proveniente del estado de Veracruz, el cual se encuentra a 400 km de la Ciudad de México. Paciente de 1 mes de edad, sintomático, con tamiz neonatal ampliado (TNA) sospechoso de deficiencia de 2-metil-3-OH-butiril-CoA deshidrogenasa por presentar elevación de adipilcarnitina (C6DC) y tiglilcarnitina (C5:1).

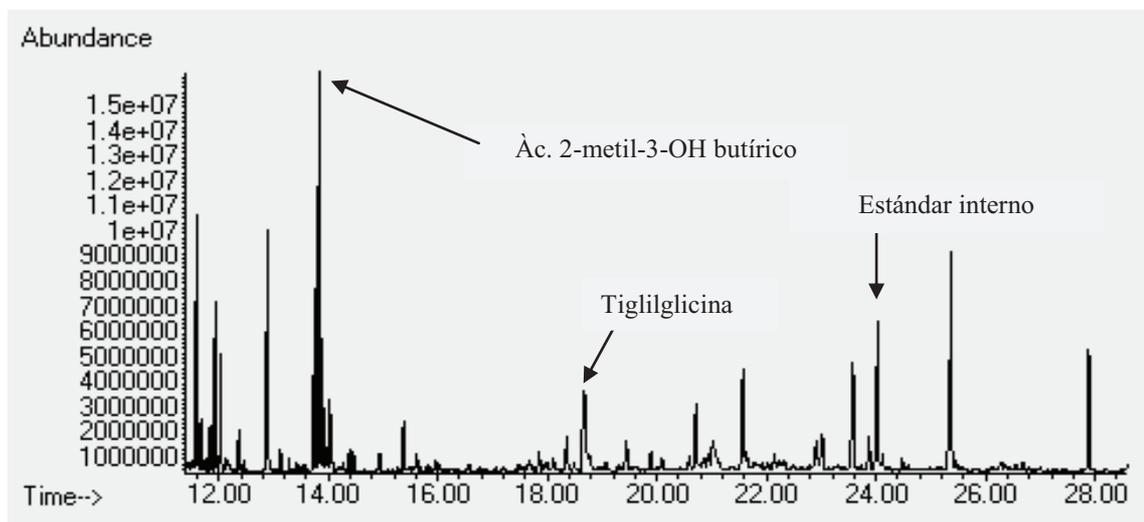


Figura 20. Cromatograma característico de deficiencia de 2-metil-3-OH-butiril CoA deshidrogenasa. En el cromatograma se observa elevación de Àc. 2-metil-3-OH butírico y tiglilglicina.

### Ejemplo B: Enfermedad con olor a jarabe de maple (EOJM).

Paciente de 22 días de edad, sintomático, hospitalizado en Tuxtla Gutiérrez, en el Estado de Chiapas (980 km de distancia del DF), por presentar crisis convulsivas de difícil control, deterioro neurológico y cetoacidosis severa.

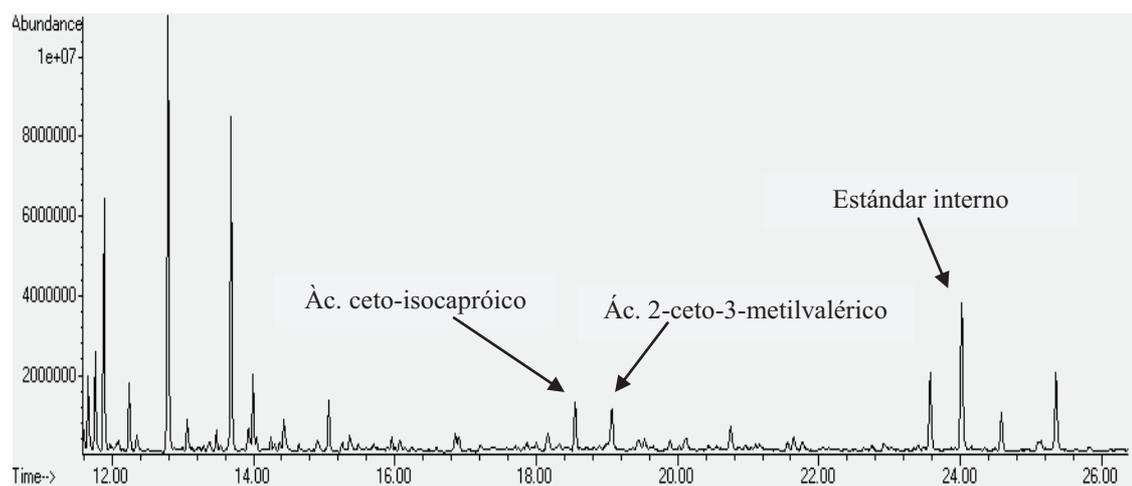


Figura 21. Cromatograma característico de enfermedad con olor a jarabe de maple (EOJM). Se observa elevación de los cetoácidos de cadena ramificada (ácido ceto-isocaprónico y ácido 2-ceto-3-metilvalérico).

### Ejemplo C. Aciduria isovalérica (AIV)

Paciente de 4 años de edad proveniente del Estado de Tabasco (750 km de distancia con la Cd. de México) con antecedente de un hermano mayor fallecido, rechazo a los productos de origen animal, TNA con elevación de isovalerilcarnitina (C5).

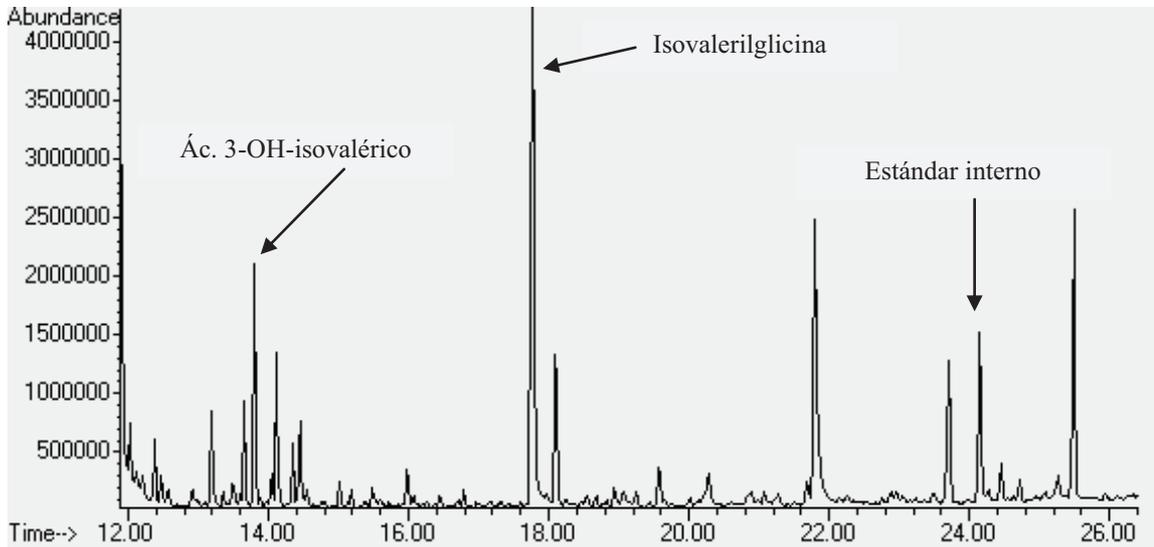


Figura 22. Cromatograma característico de aciduria isovalérica. Se observa la elevación del ácido 3-OH-isovalérico e isovalerilglicina

### Ejemplo D. Acidemia propiónica (AP).

Muestra de paciente proveniente de Veracruz (distancia aproximada de 400 km de la ciudad de México), asintomático, con TNA sospechoso por elevación de AO's inusuales.

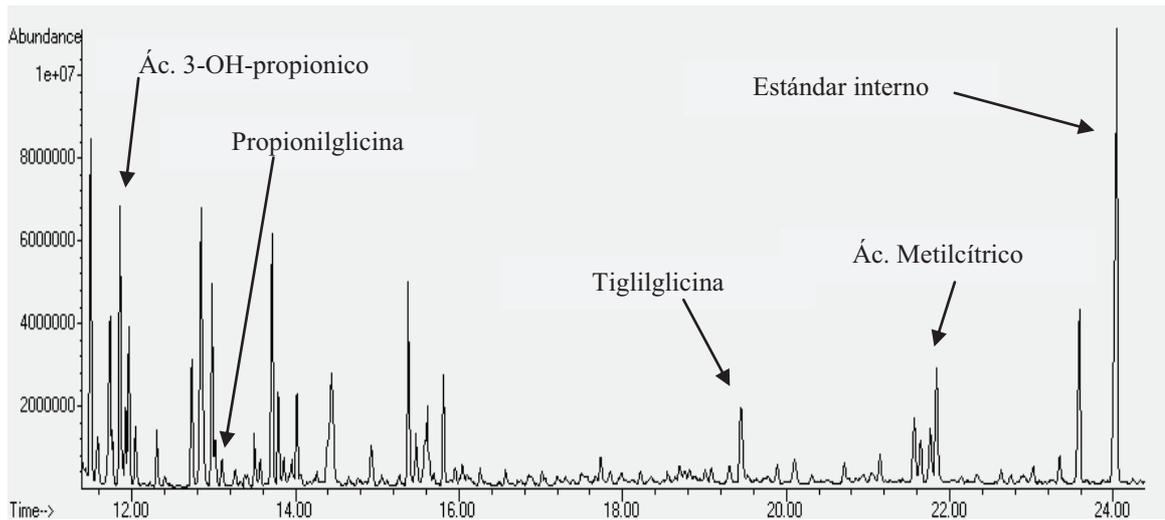


Figura 23. Cromatograma característico de acidemia propiónica. Se observa elevación de propionil carnitina (C3). Ácido 3-OH-propionico y el ácido metilcátrico, así como de propionilglicina y tigilglicina.

### Ejemplo E. Deficiencia de 3-metil-crotonil-CoA carboxilasa (3-MCC)

Paciente proveniente del estado de Chiapas, con TNA sospechoso. Se observa en el cromatograma considerable elevación del ácido 3-OH-isovalérico, así como de 3-metil-crotonilglicina (C5OH) que confirma la enfermedad.

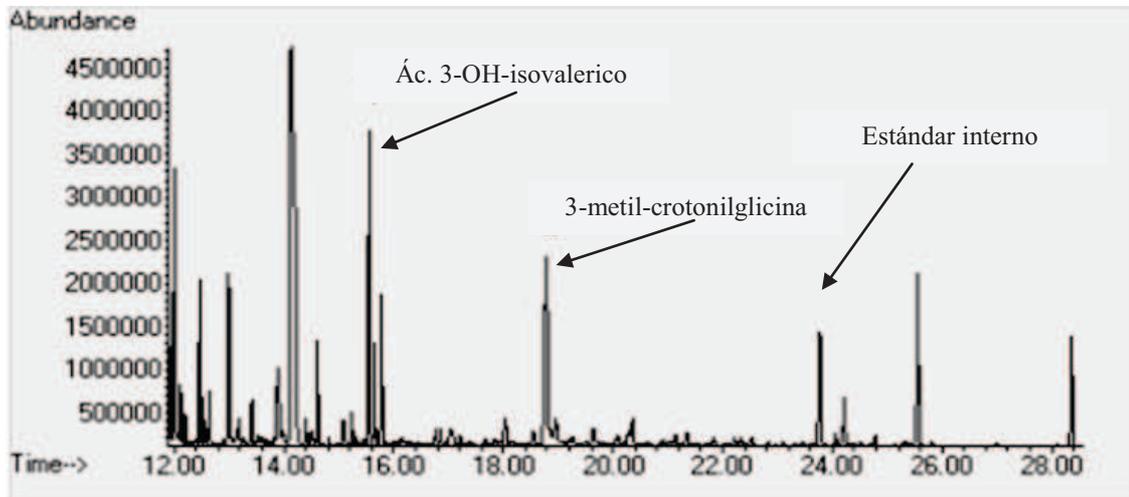


Figura 24. Deficiencia de 3-metil-crotonil-CoA carboxilasa (3-MCC). Se observa considerable elevación del ácido 3-OH-isovalérico, así como de 3-metil-crotonilglicina.

## DISCUSIÓN

Las AO causan complicaciones graves tales como la discapacidad intelectual irreversible y la muerte, las cuales pueden ser prevenibles al realizar un diagnóstico temprano y ofrecer un tratamiento oportuno y adecuado a los pacientes que las padecen. En nuestro país existen diferentes factores que causan retraso en el diagnóstico, uno de ellos es la dificultad logística que representa el envío de la muestra de OL desde el hospital de origen hasta el centro de referencia que se encuentra en el DF, esta distancia puede ser tan lejana como 1600 km, si se trata de una muestra que proviene del estado de Sonora. Con el objetivo de agilizar la llegada de las muestras al INP y mejorar la calidad de las mismas, se decidió implementar la técnica de análisis de AO's extraídos de OPF.

Para ello se determinó si el PF disponible en México era apropiado para implementar la técnica; se investigaron en la literatura los trabajos previos que reportaron el uso de PF para depósito de orina y encontramos que por lo menos 5 laboratorios utilizaron el mismo PF que se utilizó en el presente trabajo, por lo que se decidió implementar la técnica con dicho material (Tuchman 1987, Chamberlin 1987, McCann 1995, McCann 1996).

Posteriormente se determinó si existía alguna interferencia del PF con el análisis de AO's. El cromatograma de la inyección del agua extraída del PF solo mostró la presencia del estándar interno y del reactivo derivatizante (Fig. 12). Estos resultados muestran que el PF utilizado no interfiere con el análisis de los AO's y por lo tanto puede utilizarse para el depósito de la orina, como la han documentado los grupos de Tuchman y Chamberlin (Tuchman 1987, Chamberlin 1987). Una vez que se comprobó la utilidad del PF, se determinó que la alícuota de 2 mL de orina fue la más apropiada debido a que se absorbe por completo sin salirse y sin dejar escurrimientos. Esto representa una gran ventaja, sobre todo cuando se cuenta con pequeñas cantidades de orina, como en el caso de los neonatos. El PF impregnado se dejó secar durante mínimo tres horas de acuerdo a lo reportado en la literatura (Chamberlin 1987; Al-Dirbashi 2011).

Previo a la determinación de los AO's es necesario que las muestras de orina tengan una concentración de metabolitos homogénea, para ello se tomó como metabolito de referencia a la creatinina (Sweetman 1991). Recuperar la creatinina de OPF fue un punto clave para la implementación de ésta técnica. Para determinar la recuperación de creatinina de OPF se comparó su concentración con la obtenida de la OL. El coeficiente de correlación obtenido mostró que la concentración de creatina de la OL y de la OPF sigue una tendencia lineal (Fig.

13), lo que significa que la creatinina de OPF es comparable con la creatinina de OL. Estos resultados coinciden con lo reportado por Fu y colaboradores (Fu 2000).

El siguiente paso en la implementación de la técnica, consistió en determinar el porcentaje de recuperación de los AO's de las muestras de OPF. En promedio los AO's se recuperaron de la OPF en un 96%, 101% y 103% para las concentraciones 2, 39 y 79 mmol AO's/mol creatinina respectivamente, el criterio de aceptación para este parámetro, de acuerdo a las recomendaciones de la oficina de administración de alimentos y fármacos de Estados Unidos (FDA) para los métodos bioanalíticos es que las concentraciones obtenidas de la OPF fueran de por lo menos 60% con respecto a la concentración de la OL, por lo que la recuperación de los AO's de la orina depositada en PF obtenida en el presente trabajo se considera aceptable. Por otro lado, de acuerdo a la misma organización, la reproducibilidad para un método bioanalítico se considera como aceptable cuando los coeficientes de variación no son mayores a 20%; los resultados obtenidos en este experimento cumplen con lo recomendado (Figuras 14-16), por lo que se puede aseverar que el método es reproducible.

Lo anterior es comparable con lo obtenido por un grupo de trabajo Español, quien reportó un porcentaje de recuperación de  $86\% \pm 15\%$  para 19 AO's estudiados con 12 repeticiones (Barbas 2002).

Posteriormente se determinó la estabilidad de los metabolitos en la orina impregnada en el PF a temperatura ambiente. En el periodo de tiempo estudiado, se observó que la concentración de los analitos no disminuyó más de 10% tomando como 100% la concentración de los metabolitos en el día cero, excepto para el ácido 4-OH-fenilpirúvico, el cual no fue detectable a concentración de 2 mmol/mol de creatinina, sin embargo en las otras dos concentraciones de trabajo si fue detectable, aunque no de manera reproducible, lo cual confirma su inestabilidad en el PF a lo largo del tiempo. Este hallazgo fue reportado anteriormente por Barbas y colaboradores. Dicho metabolito no es patognomónico para ninguna AO, es decir, su ausencia no representa la pérdida de un diagnóstico (Barbas 2002).

Por otro lado, en algunos metabolitos se obtuvo más del 100% tanto de recuperación como en estabilidad (figuras 17-19). Esto puede deberse a que probablemente los AO's se están conservando mejor en el PF. Este importante hallazgo ha sido reportado en la literatura con anterioridad (Chamberlin 1987; Tuchman 1991; Fu 2000).

Con el objetivo de evaluar la utilidad de la técnica como una herramienta diagnóstica, se solicitó el envío de muestras de orina colectada en PF a las instituciones hospitalarias que nos refieren

muestras con mayor frecuencia. Dichos hospitales nos enviaron muestras de OPF de pacientes con sospecha de padecer alguna AO. En promedio, las muestras tardaron en llegar al INP 2 días, los PF venían en perfecto estado de conservación y al momento de tratarlos para extraer la orina, no se presentó ningún obstáculo, en general se obtuvo un volumen de recuperación similar al obtenido con la orina de trabajo.

En 23 de las 38 muestras recibidas se encontró una importante elevación de los biomarcadores característicos de alguna AO (Tabla 5). Otros grupos de trabajo reportaron resultados similares (Tuchman 1991, Kuhara 2002, Kuhara 2004, Shinka 2005).

En la figuras 20 a 24 se muestran ejemplos de los perfiles de AO's obtenidos en las muestras de OPF de pacientes con sospecha de AO recibidas de diferentes Estados de la República. En dichos perfiles de AO's se observan los metabolitos en sus tiempos de retención característicos, sin que haya evidencia de alteración en el patrón de elución de los mismos y con una abundancia importante que permitió llegar al diagnóstico de los pacientes.

Éste método demostró ser útil para la evaluación bioquímica a distancia de pacientes con sospecha de AO. Así mismo, permite el fácil transporte de las muestras de orina evitando su descomposición, con un tiempo transcurrido entre envío y recepción demuestra de 2 días.

La centralización de los recursos diagnósticos de alta especialidad y el aislamiento geográfico, son dos de los muchos obstáculos que enfrentan en nuestro país los pacientes foráneos que presentan alto riesgo de padecer alguna AO y aquellos que han sido previamente diagnosticados y que requieren del análisis de AO's urinarios para su control médico de manera periódica. La difusión y aplicación del método implementado en el presente trabajo en todas las instituciones de salud de nuestro país, podría resolver dichos obstáculos y contribuir a la agilización del diagnóstico y seguimiento de estos pacientes, lo cual permitiría instaurar el tratamiento lo más oportunamente posible y aminorar las secuelas neurológicas irreversibles que causan las AO.

## CONCLUSIONES

- Se implementó una metodología analítica que permitió extraer los AO's urinarios de muestras de OPF para su posterior determinación mediante CGEM.
- El porcentaje de recuperación de diferentes estándares de AO's y creatinina extraídos de la OPF fue de 96%, 101% y 103% para las concentraciones 2, 39 y 79 mmol de AO's/mol de creatinina respectivamente.
- La estabilidad de los analitos estudiados a través del tiempo fue mayor del 90%.
- Se realizó el diagnóstico de 21 pacientes con AO mediante el análisis de los AO's de muestras de OPF.
- La metodología implementada demostró su utilidad como herramienta para evaluación bioquímica a distancia.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vela-Amieva M, Ibarra-González I, Velázquez A. Guía para el diagnóstico de errores innatos del metabolismo. En: Programa de actualización en pediatría. Academia Mexicana de Pediatría (Ed). Intersistemas, edición actualizada, Ciudad de México, México. 2005, pp 1087-1179.
2. Ibarra I 1999. Estudio de la excreción urinaria de ácidos orgánicos en niños con desnutrición energético-proteínica. Tesis de Maestría, UNAM.
3. Lepage N, Li D, Kavsak PA, Bamforth F, Callahan J, Dooley K, Potter M. 2006. Incomplete pediatric reference intervals for the management of patients with inborn errors of metabolism. *Clin Biochem.* **39**: 595-599.
4. Jiménez- Sánchez. 2001. The effect of Mendelian disease on human health. En: The metabolic and molecular basis of inherited disease. *Scriber CR*, Beaudet AL, Valle D (Eds.) McGraw-Hill Inc., 8a Edition, New York EUA. 167-174.
5. Vela-Amieva M, Belmont-Martínez L, Fernández-Lainez C, Ramírez-Farías C, Ibarra-González I. Frecuencia de enfermedades metabólicas susceptibles de ser identificadas por el tamiz neonatal. *Acta Ped Mex* 2009; **30**(3): 156-62.
6. Saudubray JM, Sedel F, Walter JH. 2006. Clinical Approach to treatable inborn metabolic diseases: An introduction. *J Inherit Metab Dis.* **29**, 261-274
7. Chakrapani, A. 2001. Detection of inborn errors of metabolism in the newborn. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition.* **84**(3), 205-210.
8. Satwani, H., Raza, J., Hanai, J., & Nomachi, S. 2009. Prevalence of selected disorders of inborn errors of metabolism in suspected cases at a Tertiary Care Hospital in Karachi. *J Pak Med Assoc.* **59**(12):815-819.

9. Kuhara T, Shinka T, Inoue Y, Ohse M, Zhen-wei X, Yoshida I, Inokuchi T, Yamaguchi S, Takayanagi M, Matsumoto I. 1999. Pilot study of gas chromatographic – mass spectrometric screening of newborn urine for inborn errors of metabolism after treatment with urease. *Journal of Chromatography B*, **731**, 141-147.
10. Tůma, P., Samcová, E., & Stulík, K. 2011. Determination of the spectrum of low molecular mass organic acids in urine by capillary electrophoresis with contactless conductivity and ultraviolet photometric detection--an efficient tool for monitoring of inborn metabolic disorders. *Analytica chimica acta*, **685**(1), 84-90.
11. Kumps A, Duez P, Mardens Yves. 2002. Metabolic, nutritional, iatrogenic, and artifactual sources of urinary organic acids: A comprehensive table. *Clinical Chem.* **48**:5 708-717
12. Seashore M. 2009. The Organic Acidemias: An Overview. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, Adam MP, editors. *Gene Reviews [internet]*
13. Lehotay DC, Clarke JT. 1995. Organic acidurias and Related Abnormalities. *Crit Rev Clin Lab Sci.* **32**(4): 377-429
14. Sweetman L. 1991. Organic acid analysis. En: Techniques in diagnostic human biochemical genetics: A laboratory manual. Hommers A. Ed. Wiley-Liss, New York, EUA, 143-176
15. Fu X, Iga M, Kimura M, Yamaguchi S. 2000. Simplified screening for organic acidemia using GC/MS and dried urine filter paper: a study on neonatal mass screening. *Early Hum Dev.* **58**(1):41-55
16. Chuang DT, Chuang JL, Wynn RM. 2006. Lessons from genetic disorders of branched-chain amino acid metabolism. *J Nutr* ; **136** (1 Suppl):243S-249S.
17. Chuang DT, Shih VE. 2001. Maple syrup urine disease (Branched-Chain Ketoaciduria). En: The metabolic and molecular basis of inherited disease. Scriver CR,

Beaudet AL, Valle D (Eds.) McGraw-Hill Inc., 8a Edición, New York, EUA, pp 1991-1995.

18. Heldt K, Schwahn B, Marquardt I, Grotzke M, Wendel U. 2005. Diagnosis of MSUD by newborn screening allows early intervention without extraneous detoxification. *Mol Genet Metab* ; **84**: 313-316.

19. Ogier de Baulny H, Saudubray JM.2002. Branched-chain organic acidurias. *Semin Neonatol.* **7**(1):65-74.

20. Baumgartner C, Baumgartner D. 2005. Biomarker discovery, disease classification, and similarity query processing on high-throughput MS/MS data of inborn errors of metabolism. *J Biomol Screen.* **11**(1):90-9.

21. Tanpaiboon P. 2005. IEM digest, *Mol Genet Metab*; **85**: 2-6.

22. Zhang, C., Xu, K., Dave, U. P., Wang, Y., & Matsumoto, I. 2000. Inborn errors of metabolism discovered in Asian department of pediatrics and mental retardation research center. *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications*, **746**(1), 41-49.

23. Testai FD, Gorelick PB. 2010. Inherited metabolic disorders and stroke part 2: homocystinuria, organic acidurias, and urea cycle disorders. *Arch Neurol.* **67**(2):148-153.

24. Barreiro, A., Rey, A., González, G., Lemes, A., Galiana, A., Peluffo, L. 2004. Aciduria glutárica tipo I: Descripción del primer caso clínico nacional, *Rev. Méd. Urug.* **20**(3), 221-227.

25. Mitchell GA, Russo P, et. al. Tyrosinemia. En: Suchy FJ (Ed), *Liver disease in children*, 2ª Edición, EUA, 2001, pp 667-686.

26. Hühn R, Stoermer H, Klingele B, Bausch E, Fois A, Farnetani M, Di Rocco M, Boué J, Kirk JM, Coleman R, Scherer G. 1998. Novel and recurrent tyrosine aminotransferase gene mutations in tyrosinemia type II. *Hum Genet*; **102**(3):305-313
27. Lynn BJ. 2004. *Genética Médica*, 3ª Edición, Elsevier, España, 136-144
28. Scott, C. R. (2006). The Genetic Tyrosinemias, **126**, 121-126.
29. Kuhara T. 2007. Noninvasive human metabolome analysis for differential diagnosis of inborn errors of metabolism. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. **855**(1) 42-50
30. Prieto, J. A., Andrade, F., & Sanjurjo, P. 2007. Análisis de ácidos orgánicos en orina mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas. *Selecta*, **26**(2), 66-72.
31. Tanaka K, Budd MA, Efron ML, Isselbacher KJ. 1966. isovaleric acidemia: a new genetic defect of leucine metabolism, *Proc Natl Acad Sci U S A*. **56**(1):236-242.
32. Kuhara, T. 2005. Gas chromatographic-mass spectrometric urinary metabolome analysis to study mutations of inborn errors of metabolism. *Mass spectrometry reviews*, **24**(6), 814-827.
33. Duez P, Kumps A, Mardens Yves. 1996. GC-MS profiling of urinary organic acids evaluated as a quantitative method. *Clinical Chem* **42**:10 1609-1615.
34. Kuhara T. 2001. Diagnosis of inborn errors of metabolism using filter paper urine, urease treatment, isotope dilution and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. **5**;758(1):3-25
35. Nakagawa, K., Kawana, S., Hasegawa, Y., & Yamaguchi, S. 2010. Simplified method for the chemical diagnosis of organic aciduria using GC/MS. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, **878**(13-14), 942-948.

36. - Fernández C. 2008. Elevada mortalidad y discapacidad en niños mexicanos con enfermedad de orina con olor a jarabe de Arce (EOJA). Tesis de Licenciatura, Facultad de Química. UNAM.
37. Vela M, Cicerón I, Pérez M, Ortiz J, Ibarra I, Olivares Z, Morales R, González C, Gamboa S, Rivera J. 2002. Interpretación del tamiz metabólico. Análisis de ácidos orgánicos (III de IV partes) *Acta Pediatr Méx* **23**: 81-84.
38. Guthrie R, Susi A. 1963. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* **32**:338-343.
39. Tuchman N, McCann MT, Johnson PE, Lemieux B. 1991. Screening newborn for multiple organic acidurias in dried filter paper urine amples: method development. *Pediatric research*.**30**:4 315- 321
40. O'Brien D, Ibbott F, Rodgerson D. 1968. Laboratory manual of pediatric microbiological techniques. Hoeber Medical Division 4<sup>o</sup> edition, New York, EUA, 114-116.
41. Fernández-Lainez C, Ibarra-González I, González-Valerio R, Hernández-Montiel A, Guillén-López S, Monroy-Santoyo S, Belmont-Martínez L, Vela-Amieva M. 2011. Detección de acidemias orgánicas en muestras de orina depositadas en papel filtro. Implementación de una metodología simple. *Rev Gastroenterol Peru*. **31**, 23.
42. Tuchman M, Auray-Blais C, Ramnaraine ML, Neglia J, Krivit W, Lemieux B. 1987. Determination of urinary homovanilic and vanillylmandelic acids from dried filter paper samples: assessment of potential methods for neuroblastoma screening. *Clin Biochem*. **20**(3): 173-177.
43. Chamberlin, BA., Sweeiey, CC. 1987. Metabolic Profiles of Urinary Organic Acids Recovered from Absorbent Filter Paper. *Simulation*, **33**(4), 572-576.

44. McCann MT, Thompson MM, Gueron IC, Tuchman M. 1995. Quantification of orotic acid in dried filter paper urine samples by stable isotope dilution. *Clin Chem.* **41**(5): 739-743.
45. McCann MT, Thompson MM, Gueron IC, Lemieux B, Giguere R, Tuchman M. 1996. Methylmalonic acid quantification by stable isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry from filter paper urine samples. *Clin Chem.* **42**(6 pt 1): 910-914.
46. Al-Dirbashi OY, Kölker S, Ng D, Fisher L, Rupal T, Lepage N, Rashed MS, Santa T, Goodman SI, Geraghty MT, Zschocke J, Christensen E, Hoffmann GF, Chakraborty P. 2011. Diagnosis of glutaric aciduria type 1 by measuring 3-hydroxyglutaric acid in dried urine spots by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of inherited metabolic disease*, **34**(1), 173-180.
47. Barbas C., Garcia, A., Miguel, L. D., Simó, C. 2002. Evaluation of filter paper collection of urine samples for detection and measurement of organic acidurias by capillary electrophoresis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **780**, 73-82.
48. Kuhara T. 2002. Diagnosis and monitoring of inborn errors of metabolism using urease-pretreatment of urine, isotope dilution, and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **781** (1-2); 497-517.
49. Kuhara, Tomiko. 2005. "Gas chromatographic-mass spectrometric urinary metabolome analysis to study mutations of inborn errors of metabolism." *Mass spectrometry review.s* **24**(6): 814-27.
50. Shinka T, Ohse, M., Inoue, Y., Kuhara, T. 2005. Stability of 5-aminolevulinic acid on dried urine filter paper for a diagnostic marker of tyrosinemia type I. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, **823**(1), 44-46.