



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**TESINA: METABOLÓMICA BASADA EN RMN COMO
HERRAMIENTA DE ESTUDIO DE ENFERMEDADES METABÓLICAS
CONGÉNITAS EN PACIENTES PEDIÁTRICOS**

PRESENTA

TANIA ISABEL MONTES ZARATE

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

ASESOR DEL TEMA

DRA. NURIA ESTURAU ESCOFET



CDMX

2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: PEÑA ALVAREZ ARACELI PATRICIA

VOCAL: Profesor: ESTURAU ESCOFET NURIA

SECRETARIO: Profesor: IBARRA GONZALEZ ISABEL

1er. SUPLENTE: Profesor: FRANCO Y BOURLAND REBECCA ELIZABETH

2° SUPLENTE: Profesor: GARCIA VELAZQUEZ LIZBETH ESMERALDA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO DE QUÍMICA

ASESOR DEL TEMA:

DR. NURIA ESTURAU ESCOFET

SUSTENTANTE:

TANIA ISABEL MONTES ZARATE

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Química por mi formación académica en ciencias y al Instituto de Química por las facilidades prestadas para la realización de esta tesis.

A mi tutora la Dra. Nuria Esturau Escofet por las horas en videollamada durante la pandemia, por sus enseñanzas, la paciencia, la comprensión y el apoyo brindado en el ámbito profesional. En lo personal agradezco el apoyo para poder seguir en el desarrollo de este proyecto.

A los miembros del jurado:

- A la Dra. Araceli Peña por sus valiosos comentarios y observaciones para el enriquecimiento de mi tesina.
- A la M. en C. Isabel Cristina Ibarra Gonzalez, de la unidad de Genética de la Nutrición del Instituto de Investigaciones Biológicas UNAM-INP, por el apoyo prestado para la realización de esta tesina.
- A la Dra. Rebecca Franco por sus observaciones en el documento escrito y para la presentación de la tesina. Su forma de ser tan accesible y su interés me aportó mucho a nivel personal.
- A la Dra. Lizbeth Garcia por su tiempo y accesibilidad.

A mis padres, hermano y psiquiatra por su apoyo incondicional.

Contenido

1	Introducción.....	1
2	Objetivos	2
2.1	Objetivo general	2
2.2	Objetivos particulares.....	2
3	Metodología	3
4	Generalidades.....	4
4.1	Metabolitos.....	4
4.2	Metaboloma	4
4.3	Metabolómica.....	4
4.3.1	Metabolómica no dirigida	4
4.3.2	Metabolómica dirigida.....	5
4.4	Plataformas empleadas para los estudios de metabolómica	5
4.4.1	Fundamento de la espectroscopia de RMN.....	6
4.4.2	RMN. Ventajas y desventajas en estudios de metabolómica	8
4.4.3	Quimiometría	8
4.5	Espectroscopia de RMN en estudios de metabolómica	9
4.6	Enfermedades metabólicas congénitas (EMC)	9
4.6.1	Errores Innatos del Metabolismo (EIM)	10
4.7	Fluidos biológicos.....	10
4.8	Tamizaje.....	11
4.8.1	Tamizaje neonatal	11
4.8.2	Papel filtro.....	12
5	Resultados	13
5.1	Metabolómica por ¹ H-RMN en recién nacido y paciente pediátrico.....	13
5.1.1	Estudios en orina	13

5.1.2	Estudios en sangre (plasma y suero)	14
5.1.3	Estudios en manchas de sangre de seca	15
5.2	Metodologías en función del fluido biológico.....	16
5.2.1	Consideraciones generales para el tratamiento de muestras.....	16
5.2.2	Metodología de análisis de muestras de orina	17
5.2.3	Metodología de análisis de muestras de suero	18
5.2.4	Metodología de análisis de muestras de plasma	19
5.2.5	Metodología de análisis en manchas de sangre seca	20
6	Discusión.....	21
7	Conclusiones.....	22
	Bibliografía	23

Tabla de abreviaturas	
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
¹ H-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de protón
EMC	Enfermedades metabólicas congénitas
EIM	Errores Innatos del Metabolismo
DBS	Manchas de sangre seca o <i>blood spots</i>
Rf	Radiofrecuencia
FID	Decaimiento por inducción libre
TF	Transformada de Fourier
ΔE	Diferencia de energía
B_0	Campo magnético externo
J	Constante de acoplamiento
ω_0	Frecuencia de Larmor
Δ	Desplazamiento químico
Phe	Fenilalanina
ppm	Partes por millón
¹ H	Núcleo de protón
CPMG	Secuencia de pulsos de eco espín Carr-Purcel-Meinboom-Gill
C	Carbono
IS	Patrón interno
TMS	Tetrametilsilano
D ₂ O	Agua deuterada
MeOD	Metanol deuterado
γ	Razón geomagnética
PKU	Fenilcetonuria
DBP	Displasia bronco pulmonar
MSUD	Enfermedad de la orina de jarabe de arce
OMS	Organización Mundial de la Salud

1 Introducción

En las últimas décadas han aparecido las llamadas ciencias ómicas, sufijo utilizado para describir el estudio de la totalidad o el conjunto de algo. Por ejemplo, el estudio a gran escala de muchos genes, proteínas y metabolitos, que permitieron respectivamente el desarrollo de la genómica, proteómica y metabolómica. Hoy en día las “ómicas” se han aplicado en diversas áreas, entre las que está el área clínica donde han permitido la investigación de nuevos mecanismos, biomarcadores y dianas terapéuticas.

Dentro de las ciencias “ómicas” la metabolómica surgió en los años 90, y tiene como objetivo detectar, cuantificar y elucidar el conjunto de metabolitos (moléculas de bajo peso molecular presentes en un sistema biológico como son azúcares, aminoácidos, lípidos, etc.). En la actualidad se han realizado infinidad de estudios en biofluidos como orina, sangre, fluido cerebroespinal, saliva, tejidos o cultivos celulares.

La espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una técnica analítica muy robusta, reproducible, versátil, rápida y no destructiva, que desde hace muchos años se usa para la determinación estructural de las moléculas orgánicas. Sin embargo, gracias a los avances instrumentales en los últimos años, su aplicación a los estudios de metabolómica ha abierto nuevas perspectivas, permitiendo cambiar e incrementar los objetivos en los estudios. Entre las aplicaciones del uso de la metabolómica, están las que se enfocan a estudios de pacientes pediátricos en el área clínica.

En la presente tesis se realizará la revisión bibliográfica de las metodologías empleadas para los estudios de metabolómica por RMN para la detección de las Enfermedades Metabólicas Congénitas (EMC) y en específico de los Errores Innatos del Metabolismo (EIM). Buscando con especial énfasis los estudios existentes en muestras de las manchas de sangre seca o *blood spots* (DBS, por sus siglas en inglés). El objetivo principal es conocer los pro y contra de cada metodología en el área clínica pediátrica.

2 Objetivos

2.1 Objetivo general

Realizar la búsqueda bibliográfica de las metodologías existentes para los estudios de metabolómica por RMN de EMC en población pediátrica.

2.2 Objetivos particulares

- Conocer la técnica de espectroscopia de RMN para el análisis de metabolómica en el área clínica, con especial énfasis en la información que se obtiene, presentando las ventajas y desventajas.
- Revisar las metodologías descritas en la bibliografía enfocadas a estudios de metabolómica por RMN en población pediátrica.
- Conocer los principales fluidos biológicos que se estudian con el objetivo de conocer el metaboloma de pacientes neonatos y pediátricos.
- Investigar las ventajas del análisis de las manchas de sangre secas (*blood spots*, (DBS, por sus siglas en inglés)) por RMN para la detección temprana de EMC.

3 Metodología

Se realizó la búsqueda de información en revistas indexadas a nivel nacional e internacional de artículos relacionados a los estudios de metabolómica basada en la técnica de RMN, orientada a pacientes neonatos y pediátricos, con especial enfoque a los que realizan estudios en muestras de manchas de sangre seca (*blood spots*) obtenidas del tamiz neonatal.

Para obtener dicha información se siguieron los siguientes pasos:

- Se realizó una búsqueda de manera electrónica de 2004 a la fecha, utilizando las bases de datos Elsevier, PubMed, Bidi UNAM, Springer, Scopus, Nature. Utilizando palabras claves como: *NMR metabolomics*, metabolómica RMN, arrojando una cantidad de 17,478 artículos Se realizó una filtración de la información con ayuda de las palabras claves: blood spots RMN, RMN biological samples, tamiz neonatal, RMN inborn errors of metabolism con límites de idioma en español e inglés. El número final de artículos estudiados son 9, los cuales cumplían con las palabras claves deseadas para la realización de este trabajo.
- Se analizaron las metodologías de RMN reportadas en función de los diferentes fluidos biológicos.
- Se revisaron las aplicaciones que tiene la técnica de RMN para la detección de EMC y EIM en el área clínica.

4 Generalidades

4.1 Metabolitos

Los metabolitos se refieren a todas las pequeñas moléculas orgánicas, involucrados en vías metabólicas bioquímicas, con un peso molecular <1,800 – 1,500 Dalton¹.

4.2 Metaboloma

El metaboloma es el conjunto completo de las pequeñas moléculas denominadas metabolitos (tales como intermediarios metabólicos, hormonas y otras moléculas de señalización, y metabolitos secundarios) que se pueden encontrar en una muestra biológica. El metaboloma representa la huella digital molecular de un biofluido o un tejido, y es altamente dinámico. Los cambios en la composición, concentración e interacciones de los metabolitos dependen de la interacción compleja con diferentes órganos, el medio ambiente y la microbiota intestinal.²

4.3 Metabolómica

La palabra metabolómica proviene de la unión de metabo, que hace referencia a metabolismo o metabolitos, y “omica”, sufijo de origen griego (oma, ωμα) que significa “conjunto de”, aplicado para aquellas disciplinas que involucran el análisis de un gran volumen de datos.³ Por lo tanto, la metabolómica es el estudio, identificación y cuantificación de los metabolitos de un sistema biológico, denominado metaboloma. La metabolómica permite identificar cambios en los perfiles metabólicos durante diferentes estados patológicos y/o fisiológicos,⁴ y medir el impacto ambiental, la alimentación, el ejercicio o el estrés que sufre un organismo.²

4.3.1 Metabolómica no dirigida

La metabolómica no dirigida tiene como objetivo el análisis simultáneo de los metabolitos medibles en una muestra, incluidos los analitos químicamente desconocidos. En un estudio de metabolómica no dirigida, se busca cuantificar la

diferencia en los niveles de concentración de los diversos metabolitos entre dos condiciones distintas y no se requiere una hipótesis preestablecida ⁵.

La metabolómica no dirigida permite no solo caracterizar los cambios en el perfil metabólico general, sino también detectar metabolitos previamente desconocidos. Al combinar estas técnicas analíticas con técnicas quimiométricas, como el análisis multivariado, es posible definir biomarcadores o monitorizar los cambios fisiológicos inducidos por ciertas condiciones, por ejemplo los tratamientos.⁵

4.3.2 Metabolómica dirigida

La metabolómica dirigida tiene como principal objetivo la detección y cuantificación de un conjunto predeterminado de metabolitos de interés químicamente conocidos, y el análisis se puede llevar a cabo de manera cuantitativa o semicuantitativa.

Este enfoque se puede usar para validar rutas biológicas concretas o confirmar metabolitos seleccionados en un estudio no dirigido.⁵

4.4 Plataformas empleadas para los estudios de metabolómica

Entre las principales plataformas empleadas para estudios de la metabolómica se encuentra, la espectrometría de masas (EM), la cual proporciona una combinación de análisis cualitativos y cuantitativos, sensibles y selectivos. Por lo general, esta técnica se acopla a técnicas cromatográficas de gases o líquidos, para las cuales el análisis de los metabolitos se puede realizar a bajas concentraciones de muestras. Con esta técnica se debe de realizar una elección del método de separación adecuado, para poder conseguir una gran selectividad de los metabolitos deseados. Como todas las técnicas y plataformas presenta ciertas limitaciones, como lo son; la estandarización de los métodos y el tratamiento de la muestra, debido a que son complicados y tediosos, por dichas limitaciones, el método es poco reproducible.^{2,4}

Otra plataforma es, la RMN, una herramienta versátil y muy robusta, que permite encontrar el metaboloma de muestras complejas. Es un análisis no destructivo, y en pocas ocasiones las muestras requieren un tratamiento, el cual es mínimo y la mayoría de las muestras se analizan directamente.²

4.4.1 Fundamento de la espectroscopia de RMN

La espectroscopia de ^1H -RMN es una técnica que aprovecha las propiedades magnéticas de los protones para así obtener información sobre la estructura de una o más moléculas. Los núcleos que se pueden estudiar por la técnica de RMN son núcleos magnéticamente activos, lo que indica que presentan un momento angular de espín y momento magnético, lo que hace que se comporten como pequeños imanes. Los espines nucleares en ausencia de un campo magnético externo (B_0) intenso se orientan al azar. Por lo contrario, cuando los espines nucleares se encuentran en presencia de un B_0 intenso, se orientan en la misma dirección del campo, en un estado de menor energía, llamado estado de espín alfa (α), mientras que los núcleos con espín negativo se orientan en dirección contraria a B_0 , en un estado de mayor energía, llamado estado de espín beta (β), como se observa en Figura 1. La diferencia de energía (ΔE) entre los estados de espín es proporcional a la intensidad del campo magnético.

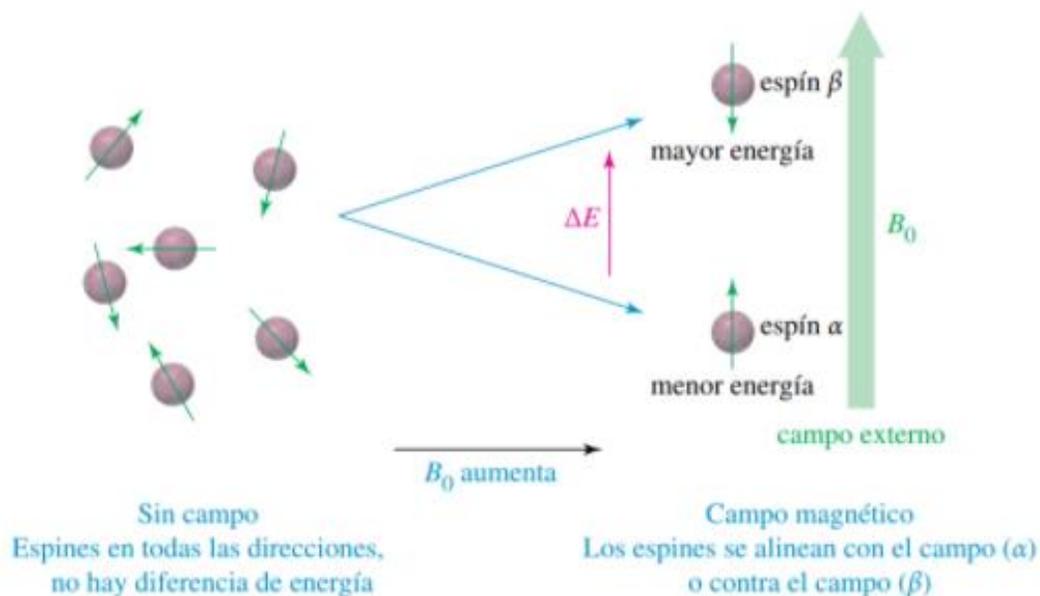


Figura 1. Comportamiento de los espines nucleares en presencia y ausencia de un campo magnético externo (B_0) intenso.⁶

Cuando los núcleos magnéticamente activos se encuentran alineados a B_0 precesan con frecuencia proporcional al campo aplicado, esta frecuencia es llamada frecuencia de Larmor. La cual se obtiene mediante la siguiente ecuación:

$$\omega_0 = \gamma \cdot \beta_0$$

donde:

- ω_0 : Frecuencia de Larmor o de precesión
- γ : Razón giro magnética
- β_0 : Intensidad del campo magnético externo aplicado

La razón giro magnética (γ) es una constante que depende del momento magnético del núcleo que está en estudio.

Por ello, la frecuencia con la que precesan los espines nucleares depende de la intensidad del campo magnético aplicado (a mayor campo, mayor velocidad de giro), dependiendo del núcleo en particular que este en estudio.

Cuando el núcleo se somete a la combinación correcta de campo magnético y radiación electromagnética para hacer girar su espín, se dice que está en "resonancia".

Los núcleos absorben la energía de radiofrecuencia (rf) en función de su entorno químico, y a medida que los protones vuelven a su estado de equilibrio, la energía se registra como una señal electromagnética oscilante, denominada como decaimiento por inducción libre (FID por sus siglas en ingles de *free induction decae*). Para poder obtener el espectro, se hace uso de la Transformada de Fourier (FT-RMN) que es una función matemática, que convierte los datos en una gráfica de intensidad de señal en función de frecuencia. Esta gráfica, es la que se conoce como espectro de RMN. Los datos se representan en un espectro de señales con el desplazamiento químico (δ), en partes por millón (ppm), a lo largo del *eje x* y la intensidad en el *eje y*. El desplazamiento químico es la frecuencia de resonancia del núcleo en comparación con el núcleo de un patrón interno (IS), por sus siglas en inglés, normalmente es el tetrametilsilano (TMS).

Cada núcleo de protón (^1H) en un espectro de RMN presenta una señal a un desplazamiento químico único. Estas señales se pueden observar de forma singular (singlete) o compleja (multiplete), los multipletes aparecen en el espectro cuando los núcleos magnéticamente activos en carbonos vecinos interactúan con dicho protón. A este efecto se le conoce como acoplamiento spin-spin.

El valor de la constante de acoplamiento (J), es la distancia en Hertz (Hz) entre los picos de un multiplete y, (J) mide la cantidad de interacción que hay entre los dos conjuntos de núcleo de protón (^1H), los cuales generan el multiplete.

La ^1H -RMN cuantitativa (qNMR) se logra mediante la comparación de la intensidad del pico de un compuesto de referencia (compuesto añadido a la muestra con una concentración conocida), después de tener en cuenta el número de protones que contribuyen a las señales.^{7,6,8}

4.4.2 RMN. Ventajas y desventajas en estudios de metabolómica

Los puntos fuertes de la espectroscopia de RMN en los estudios de metabolómica incluyen: la gran variedad de compuestos que pueden detectarse simultáneamente, la capacidad de medir las concentraciones de metabolitos individuales, la flexibilidad para manejar varios tipos de muestras, y que permite realizar análisis dirigido y no dirigido.⁹

La principal desventaja que presenta es la baja sensibilidad y resolución espectral. Ambas limitaciones pueden mejorarse en el proceso de análisis. El problema de la sensibilidad se puede abordar mediante la concentración de la muestra, la utilización de equipos de mayor intensidad de campo y/o el uso de sondas criogénicas. El problema de la resolución se puede abordar mediante el uso de experimentos bidimensionales, la utilización de equipos de mayor intensidad de campo.⁹

4.4.3 Quimiometría

La quimiometría se define como la disciplina que usa matemáticas, estadística y otros métodos para proveer el máximo de información relevante del análisis de datos químicos. Haciendo uso de la misma para el análisis de mezclas complejas.¹⁰

Esto incluye métodos eficientes y robustos para el modelado y el análisis de datos complicados que produzcan modelos interpretables y fiables. Estos métodos de análisis pueden ser:¹¹.

- Métodos de análisis supervisados: Usan la clasificación de las muestras para maximizar la separación entre grupos, proporcionando una visión general de todos los datos para generar tendencias, patrones o agrupaciones.
- Métodos de análisis no supervisados: Permiten evaluar la variabilidad de los datos, sin tener en cuenta su clasificación dentro de ningún grupo. Clasificando las muestras en categorías o clases.

4.5 Espectroscopia de RMN en estudios de metabolómica

Como ya se mencionó la RMN es una técnica que puede medir una gran cantidad de metabolitos presentes en muestras complejas de manera simultánea. Esto permite la identificación y cuantificación de los metabolitos involucrados en las complejas matrices biológicas como son, orina, manchas de sangre secas, plasma, suero, etc.

En el caso de los fluidos biológicos, debido a la complejidad de las muestras las resonancias de los metabolitos se superponen en el espectro de RMN. Por ejemplo, en el espectro obtenido de las manchas de sangre secas de un recién nacido sano se observan entre 0 – 8.6 ppm los siguientes metabolitos: leucina, valina, isoleucina, lactato, alanina, acetatos, glutamina, lisina, creatinina, β -hidroxibutirato, colina, glicina, β -glucosa, α -glucosa, tirosina, triptófano, fenilalanina, histidina, N-óxido trimetilamina.¹²

4.6 Enfermedades metabólicas congénitas (EMC)

Las EMC o errores congénitos del metabolismo son alteraciones bioquímicas de origen genético procesos que se caracterizan por alteraciones bioquímicas de origen genética, y son causadas por un defecto en específico en la estructura y función de una proteína.^{13,14,15}

4.6.1 Errores Innatos del Metabolismo (EIM)

Los EIM son procesos hereditarios que en su mayoría (95%) son de herencia autosómica recesiva, por ello se espera que el 25% de la descendencia resulte afectada.¹⁶ Se caracterizan por alteraciones bioquímicas de origen genético, que causa un defecto específico en la estructura y función de una proteína y da como resultado la deficiencia de una enzima dentro de una vía específica del metabolismo intermedio, y generan una producción inadecuada de productos y/o acumulación indebida de sustratos.^{12,17,18,19,20} La mayoría de los EIM tienen un impacto bioquímico en personas afectadas, y eso conlleva a una consecuencia clínica, como por ejemplo retraso del desarrollo e incluso la muerte.²⁰

Su prevalencia individual es baja, sin embargo, si se consideran de forma global, su incidencia es significativa y asciende aproximadamente a 1:600 recién nacidos vivos, se sabe que afectan casi al 3% de la población mundial.²¹ El 60% de los EIM se pueden diagnosticar en una etapa neonatal, y antes del final de la adolescencia se pueden reconocer hasta el 90%.^{17,13,14,15}

En el caso de México los EIM han sido muy poco estudiados y en general se desconoce su frecuencia, y hasta la actualidad se sigue utilizando como referencia la estadística de las poblaciones de otras partes del mundo.^{22,23,24}

4.7 Fluidos biológicos

Los fluidos biológicos son aquellas sustancias que se producen en el interior de los seres vivos, como la sangre, la orina, el líquido cefalorraquídeo, la lágrima, el sudor, etc.

La sangre se compone de un componente celular que consta de glóbulos rojos, blancos y plaquetas, y un vehículo líquido, llamado plasma.²⁵

El plasma se obtiene de una muestra de sangre a la que se le agrega un anticoagulante, se centrifuga, y se decanta o extrae la porción flotante (no celular).²⁵

El plasma contiene alrededor de un 45% de células, contiene inmunoglobulinas y algunas proteínas como lo son: albúmina, globulina y fibrinógeno.²⁶

El suero se obtiene de una muestra de sangre sin anticoagulantes en donde se permite que la sangre coagule, por ello carece de fibrinógeno, protombina y otras proteínas de coagulación, pero contiene de 6-8% proteínas de la sangre.²⁵

La orina consta de urea y otras sustancias químicas orgánicas e inorgánicas disueltas en agua. Suele contener 95% de agua y 5% de solutos.²⁷ La urea representa casi la mitad del total de los componentes sólidos disueltos en orina, otras sustancias orgánicas incluyen en su mayoría a la creatinina y ácido úrico.²⁷

4.8 Tamizaje

El tamizaje lo define la Organización Mundial de la Salud (OMS) como “el uso de una prueba sencilla en una población saludable, para identificar a aquellos individuos que tienen alguna patología, pero que todavía no presentan síntomas”.

En medicina tamiz significa “colar” o “filtrar” en una población con el objetivo de separar o distinguir a los individuos que presentan alguna característica distinta a los demás.²⁸

4.8.1 Tamizaje neonatal

La prueba del tamiz neonatal se realiza colocando de tres a cinco gotas de sangre capilar del talón del recién nacido sobre un papel filtro (tarjeta de Guthrie), como se observa en la Figura 2. Posteriormente, se realiza el estudio de gotas de sangre neonatal recolectadas en papel filtro, por diversas técnicas analíticas.¹⁶

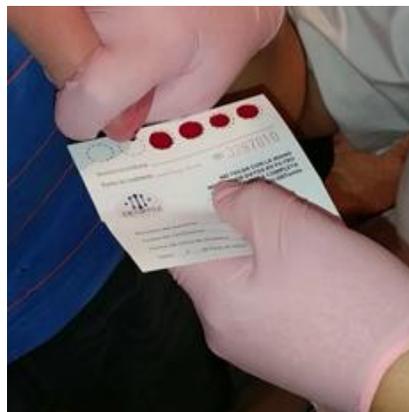


Figura 2. Toma de muestra de sangre capilar del talón de recién nacido en Tarjeta Guthrie

4.8.2 Papel filtro

El papel filtro se ha utilizado por más de 50 años para la recolección de muestras, seleccionado en casi todos los países como el mejor medio para depositar la sangre del talón del recién nacido.²⁹

La composición del papel filtro es 100% de algodón, logrando así ser un medio de transporte inerte, el cual permite una recolección de gotas de sangre uniformes y la conservación de estas, para así lograr una elucidación correcta de los metabolitos presentes en las gotas de sangre durante su análisis en laboratorio.²⁹

5 Resultados

5.1 Metabolómica por ¹H-RMN en recién nacido y paciente pediátrico

La espectroscopia de ¹H-RMN es una herramienta poderosa para explorar alteraciones en los perfiles de metabolitos presentes en muestras biológicas y puede proporcionar información diagnóstica y comprensión de los procesos bioquímicos patológicos. En el presente capítulo se describen los estudios encontrados en los diferentes fluidos biológicos por ¹H-RMN.

5.1.1 Estudios en orina

Del análisis de diversos artículos que realizan los estudios en orina, se seleccionaron 6 que son de relevancia, debido al abordaje del tema en EMC en pacientes pediátricos. En la Tabla 1 se muestran los estudios, que están enfocados en el área de pediatría, con la ventaja de que el procedimiento de recolección de la muestra de orina es simple y no invasivo.

Tabla 1: Estudios de metabolómica por ¹H-RMN en muestras en orina de pacientes recién nacidos y pediátricos.

Año	Aplicación	Ref
1999	Diagnóstico de EIM de purinas y pirimidinas en recién nacidos.	30
2005	Detección y diagnóstico de EIM de pacientes pediátricos en muestras de sujetos sanos, con Fenilcetonuria (PKU), y con Enfermedad de la orina de jarabe de arce (MSUD).	31
2007	Estudio de perfiles metabolómicos y análisis de multicomponentes. Proporcionan protocolos detallados para recolección de muestras de biofluidos. Realizan la monitorización de los metabolitos.	32
2017	Seguimiento del tratamiento de enfermedades neonatales para prevenir enfermedades crónicas en la edad adulta, mediante un análisis por ¹ H-RMN no dirigido.	33
2018	Comprensión, diagnóstico y tratamiento de la Displasia bronco pulmonar (DBP) analizando el estrés oxidativo.	34
2019	Diagnóstico de EMC para evaluar la existencia de EIM en recién nacidos, con un análisis único, automatizado y estandarizado.	35
2021	Diagnóstico de los EIM mediante la identificación de metabolitos de interés y determinación de su concentración.	21

Se puede concluir que la RMN ha sido utilizada exitosamente para el análisis del metaboloma en muestras de orina de recién nacidos vivos, sanos y con EMC.

Un factor importante por considerar en el análisis de las muestras de orina es la presencia de la creatinina, ya que su concentración es proporcional a la masa muscular, la cual se produce y se excreta de manera constante, por ello, la utilizan como biomarcador urinario para la normalización en muchas técnicas, incluidas los análisis de ¹H-RMN. Dicha normalización de creatinina explica directamente los efectos de dilución en las muestras debido al estado de hidratación entre sujetos.²¹

5.1.2 Estudios en sangre (plasma y suero)

Se analizaron diversos artículos que utilizan la sangre entera como fluido biológico, de los cuales 4 son de relevancia, debido al abordaje del tema EMC en pacientes pediátricos, haciendo un análisis específicamente del plasma y el suero. Dichos artículos se enlistan en la Tabla 2.

Para el análisis de suero y plasma, se requiere el uso de un tampón u buffer de manera rutinaria, para así minimizar los cambios de pH que pueden experimentar las muestras de estudio.

En los estudios en plasma y suero es un gran desafío la superposición de las señales de las proteínas con los metabolitos, por ello, existen diversas técnicas para la obtención de espectros con una mejor calidad (mejor resolución y mayor cantidad de metabolitos) mediante la supresión de las señales de las proteínas. Estas técnicas son:

- La precipitación de proteínas con un disolvente orgánico, como el metanol, acetonitrilo, acetona, ácido perclórico o ácido tetrocloroacético.^{36,37}
- La ultrafiltración con filtros de corte de bajo peso molecular.^{36,37}
- El uso de diferentes secuencias de pulso para la optimización del análisis de moléculas grandes o pequeñas, mejorando o atenuando diferentes señales. Por ejemplo la secuencia de pulsos de eco de espín Carr-Purcell-Meinboom-Gill (CPMG) que se utiliza para identificar moléculas pequeñas en presencia de proteínas y lipoproteínas que son atenuadas.^{7,36,38}

Tabla 2. Estudios de metabolómica por $^1\text{H-RMN}$ en muestras de plasma y suero de pacientes pediátricos.

Año	Muestra	Aplicación	Ref.
1993	Plasma	Aplicación de la espectroscopía $^1\text{H-RMN}$ a 750 MHz. Demuestran las ventajas que tiene sobre 600 MHz.	38
2007	Plasma y Suero	Estudio de perfiles metabolómicos y análisis de multicomponentes. Proporcionan protocolos detallados para recolección de muestras de biofluidos. Realizan la monitorización de los metabolitos.	32
2011	Suero	Generación de perfiles metabólicos cuantitativos integrales para generar referencias combinando métodos de $^1\text{H-RMN}$, GC-MS y LC-MS dirigidos y no dirigidos, con bases de datos.	25
2019	Plasma y Suero	Implementación de un método mejorado para la eliminación de proteínas mediante la precipitación, para producir espectros de $^1\text{H-RMN}$ de alta calidad.	36
2021	Sangre	Diagnóstico de los EIM mediante la identificación de metabolitos de interés y determinación de su concentración.	21

5.1.3 Estudios en manchas de sangre de seca

Las muestras preparadas y almacenadas como manchas de sangre seca en papel filtro estandarizadas pueden ser una alternativa atractiva al almacenamiento, envío y análisis de muestras de sangre venosa líquida convencional para muchos estudios.³⁹ Los beneficios de las manchas de sangre seca son de particular interés para los estudios comparativos de metabolómica llevados a cabo en ubicaciones remotas y para que aquellos que tienen grandes cohortes. En los últimos años, las manchas de sangre seca también se han utilizado cada vez más en varios campos, como el monitoreo de fármacos terapéuticos y de sustancias abusadas, farmacocinética, proteómica, lipidómica y metabolómica.³⁹

Es interesante el potencial uso de la metabolómica basada en $^1\text{H-RMN}$ para poder generar perfiles de metabolitos en gotas de sangre seca. Al día de hoy hay una publicación con este objetivo que se lista en la Tabla 3.¹² Se trata de un artículo de 2004 en el que recolectan la muestra de manchas de sangre de una tarjeta de Guthrie y la analizan por metabolómica basada en RMN. El principal objetivo de dicho estudio es la evaluación de la potencialidad del uso de la metodología para una caracterización mucho más específica de enfermedades metabólicas. En el artículo realizan los espectros en dos disolventes, D_2O y $\text{MeOD-}d_4$, discuten las ventajas y desventajas de ambos, y muestran el espectro de $^1\text{H-RMN}$ de un individuo sano y de uno con fenilcetonuria (PKU). En el espectro de $^1\text{H-RMN}$ del

individuo con fenilcetonuria se puede observar, en el rango de 7.0 – 7.5 ppm, un aumento en la intensidad de la señal de fenilalanina (Phe). El uso de manchas de sangre sobre papel filtro es una muestra con gran potencial, debido al volumen de sangre que poseen los recién nacidos.

Tabla 3. Estudios de metabolómica por ^1H -RMN en muestras de sangre seca de pacientes pediátricos.

Año	Aplicación	Ref
2004	Desarrollo de un nuevo método de detección masiva, haciendo uso de las muestras de sangre sobre papel filtro, para el diagnóstico de EIM,	12

5.2 Metodologías en función del fluido biológico

En este apartado se describirán, para diversos fluidos biológicos, las metodologías de manejo de muestras, la parte preanalítica y analítica para estudios de metabolómica por RMN. Se indicarán paso a paso: el tratamiento que se da a la muestra, el tiempo de análisis, el material y reactivos utilizados, el equipo y la forma de obtención del espectro ^1H -RMN.

5.2.1 Consideraciones generales para el tratamiento de muestras.

Las muestras para metabolómica de RMN deben ser centrifugadas y congeladas inmediatamente después de la recolección de muestra (debe completarse dentro de las 2 horas posteriores a la recolección de la muestra) y el almacenamiento a largo plazo debe realizarse a temperaturas ultra bajas de -70°C o -80°C . Algo importante que se debe realizar es el registro del tiempo de muestreo, centrifugación y los ciclos de congelación-descongelación.⁴⁰

Las muestras se mezclan de forma rutinaria con un tampón (buffer) para minimizar los cambios debido al pH. El tampón suele ser inorgánico y se le puede añadir, por ejemplo, imidazol como indicador de pH, azida como biocida y un compuesto como estándar de cuantificación.⁴⁰

5.2.2 Metodología de análisis de muestras de orina

La metodología general que comparten los artículos revisados en muestras de orina se muestra en el Diagrama 1.

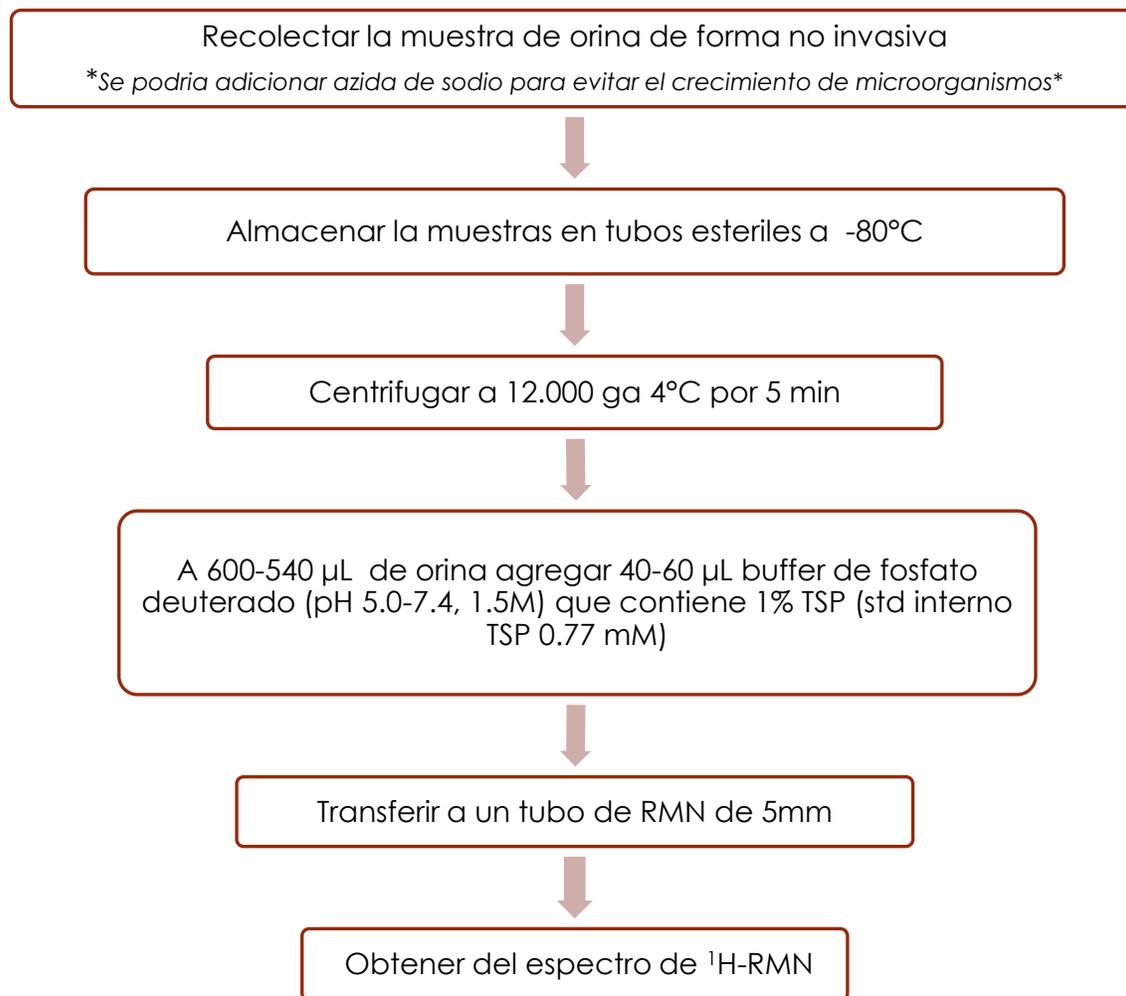


Diagrama 1. Metodología del analisis por ¹H-RMN de muestras de orina^{21,30,31,32,33,34,35}

5.2.3 Metodología de análisis de muestras de suero

La metodología general que comparten los artículos revisados en muestras de suero se muestra en el Diagrama 2.

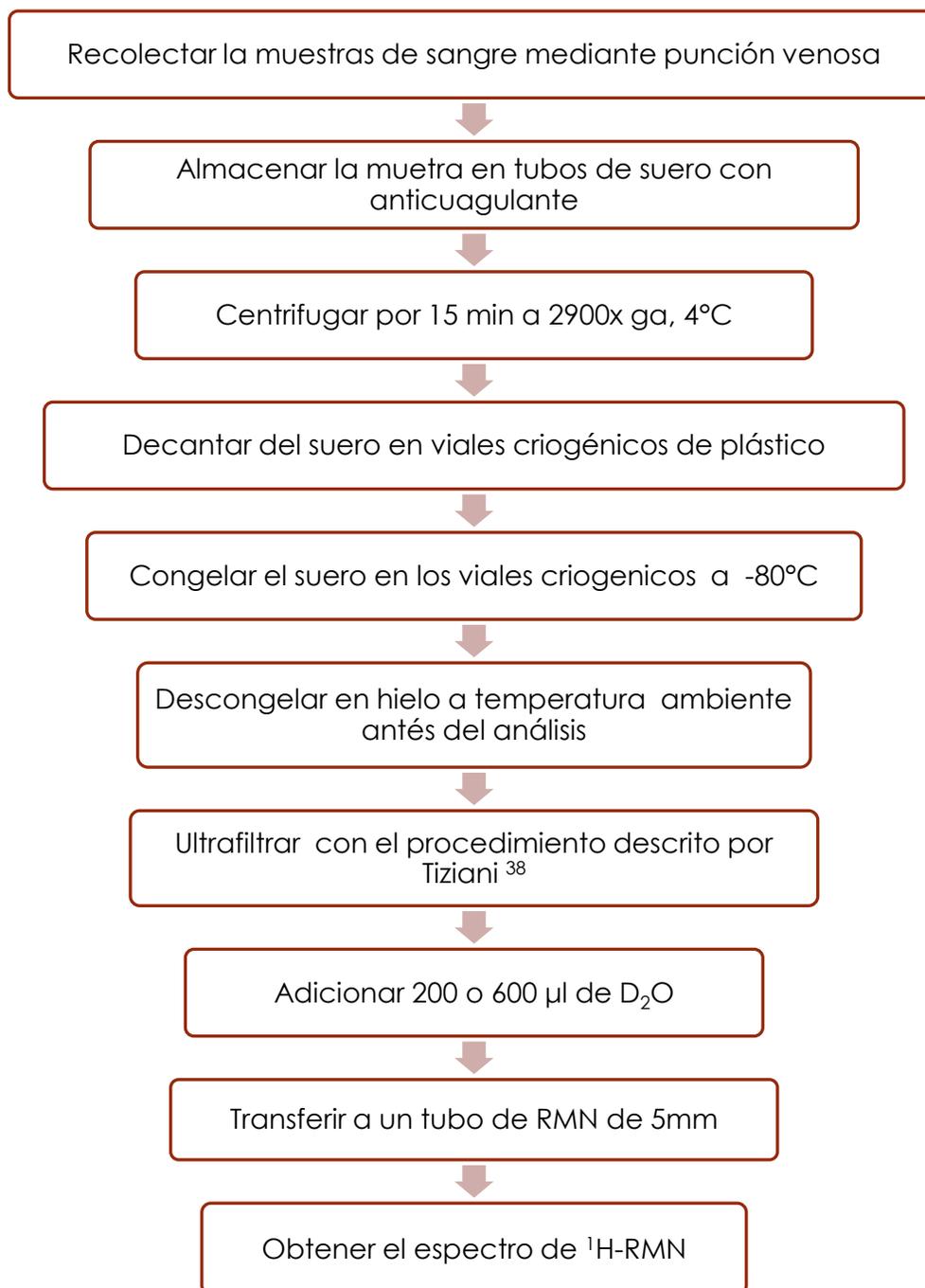


Diagrama 2. Metodología del análisis por ^1H -RMN de muestras de suero ^{21,32,25,36}

5.2.4 Metodología de análisis de muestras de plasma

La metodología general que comparten los artículos revisados en muestras de plasma se muestra en el Diagrama 3.

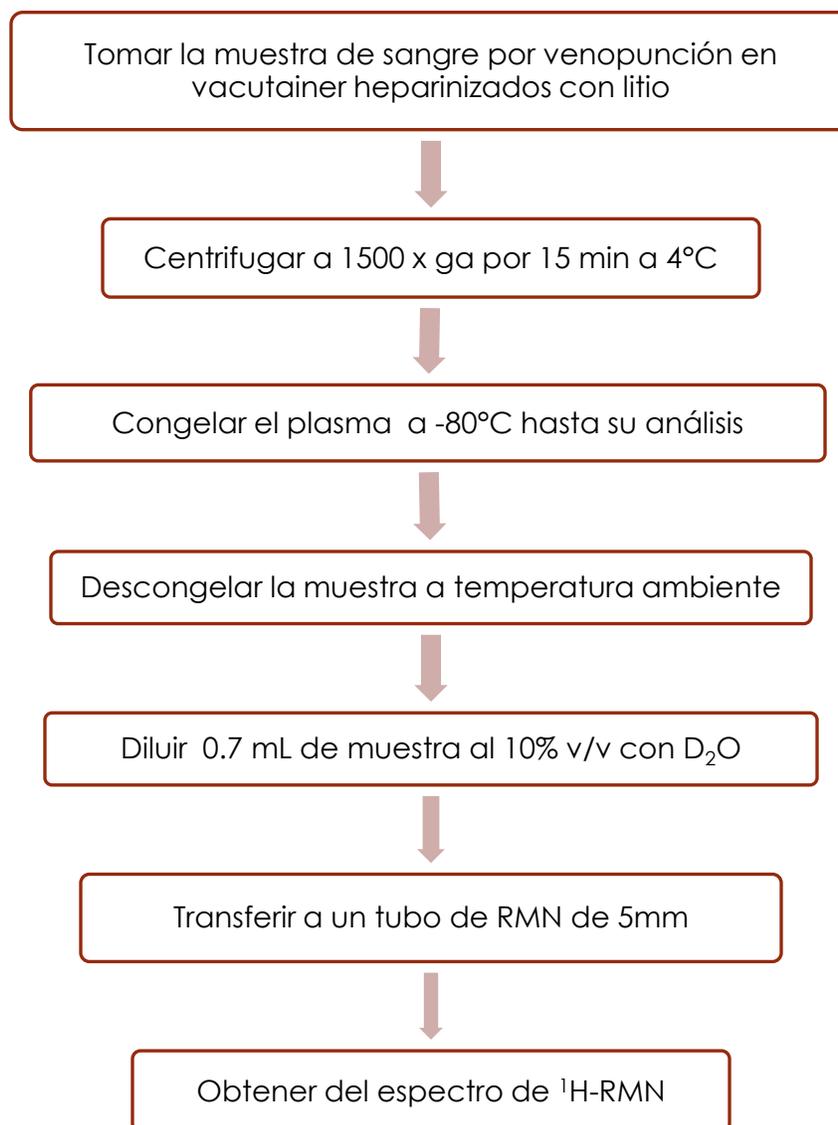


Diagrama 3. Metodología del análisis por ^1H -RMN de muestras de plasma^{21,32, 36, 38}

5.2.5 Metodología de análisis en manchas de sangre seca

La metodología para el estudio de muestras de manchas de sangre seca desde que se tiene la Tarjeta de Guthrie hasta que se obtiene el espectro de ^1H -RMN se describe en el Diagrama 4.¹²

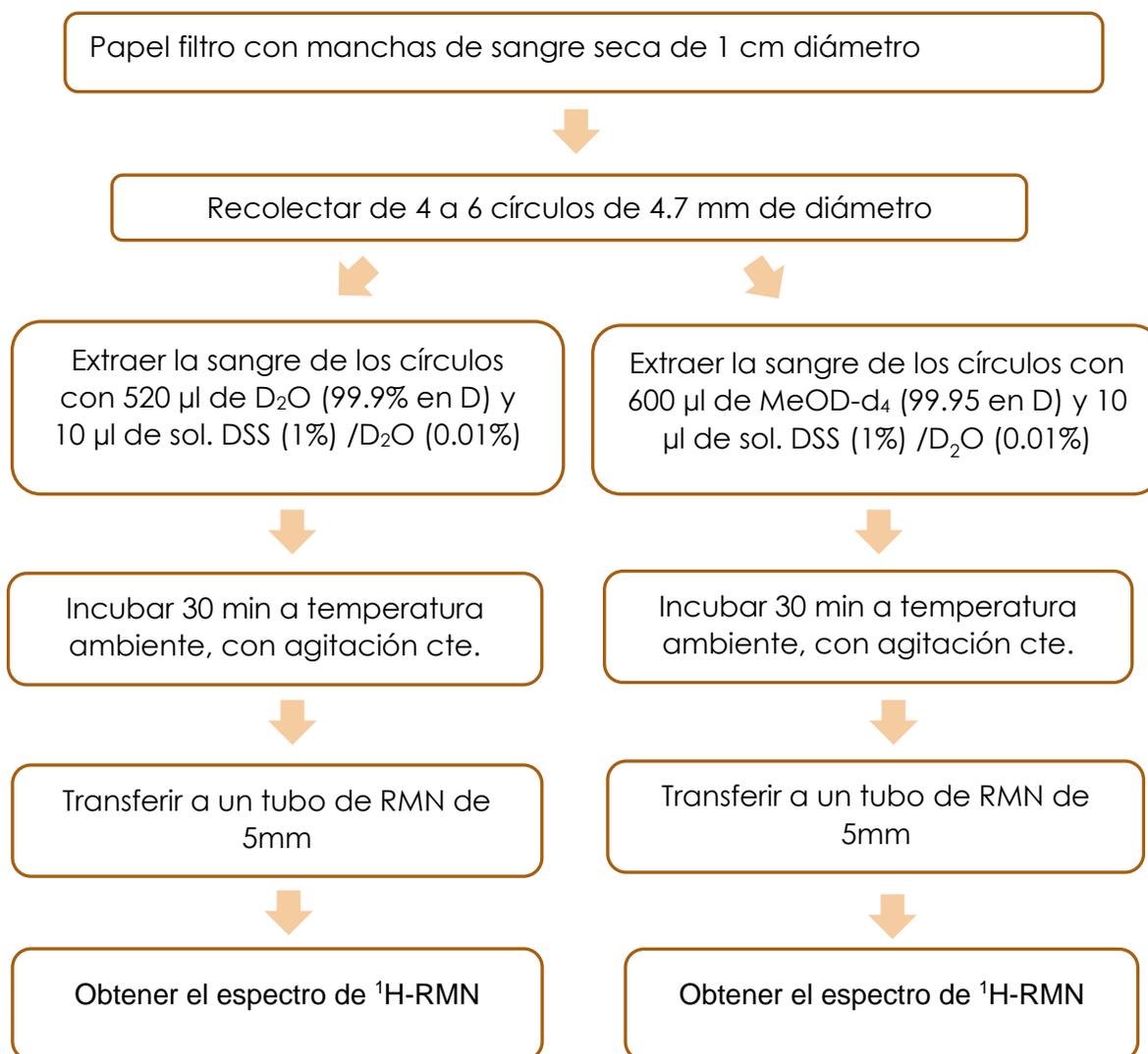


Diagrama 4. Metodología del análisis por ^1H -RMN de muestras de sangre seca¹²

6 Discusión

Con base a la bibliografía analizada, se sabe que la técnica de RMN tiene la capacidad de analizar muestras complejas como: orina, plasma, suero y muestras de manchas de sangre seca. Los análisis permiten obtener el metaboloma correspondiente. Normalmente se comparan espectros de ^1H -RMN de muestras de individuos sanos y enfermos, para observar sus diferencias, llegando en algunos casos a identificar la presencia de uno o más metabolitos fuera del intervalo normal de concentración y/o identificar la presencia de nuevos metabolitos en las muestras.

El D_2O es el disolvente más utilizado en la técnica de ^1H -RMN para estudios de metabolómica.

Los artículos de la sección 5.1.2 que analizan los derivados de la sangre entera, suero y plasma indican que la recolección y preparación de muestras representa una gran fuente de variabilidad analítica, que se debe a la presencia de proteínas en la muestra, y lo consideran un problema, por lo que utilizan secuencias de pulsos especiales para eliminar las señales de proteínas, o la filtración, o la precipitación con un disolvente orgánico.

Como se vio en la sección 5.1.1, la orina, es el fluido biológico muy utilizado, debido a la fácil recolección y la facilidad para trabajarse. En este fluido se debe tomar en cuenta que su composición se ve directamente afectada por factores, como: el aporte dietético, el metabolismo corporal, las funciones endocrinas e incluso la composición corporal.

Como se mencionó en la sección 5.1.3, para el análisis de metabolómica por RMN las manchas de sangre impregnadas en papel filtro presentan una ventaja en cuanto a la nula presencia de proteínas. Dicha ventaja se debe principalmente a la composición del papel filtro (algodón 100%) que favorece la impregnación de las proteínas. Otra ventaja es el bajo volumen de muestra que se requiere, ya que el recién nacido solo cuenta con 250 mL. Además, las muestras del tamiz neonatal normalmente se recolectan y transportan desde muchos lugares, lo que permite hacer estudios de grandes cohortes.

7 Conclusiones

En el presente trabajo se analizó la bibliografía de las metodologías existentes que usan la técnica de RMN para estudios de diferentes muestras biológicas de pacientes neonatos o pediátricos. Las principales conclusiones son:

- El análisis del metaboloma en los fluidos biológicos permite la detección de los EIM que afectan a la población pediátrica.
- La técnica de RMN es muy usada hoy en día para los estudios de metabolómica, tiene ventajas sobre otras técnicas analíticas como son: las muestras requieren de un tratamiento mínimo, es una técnica robusta, no es destructiva, permite la detección simultánea de los metabolitos, es rápida, es cuantitativa y altamente reproducible.
- El utilizar muestras de sangre en papel filtro para la obtención del metaboloma por RMN de pacientes neonatos o pediátricos es una técnica muy atractiva para ampliar la información metabólica y conocer la fisiopatología de las EMC.
- Desde el 2004 solo existe referencia de un estudio desarrollado en pacientes pediátricos que analiza manchas de sangre seca sobre papel filtro por RMN. Esta es una línea de investigación muy atractiva para desarrollarse.

Como perspectiva se espera que el uso de la técnica de RMN conduzca en el futuro cercano, a la realización de tratamientos personalizados.

Bibliografía

1. Markley, J. L., Brüschweiler, R., Edison, A. S., Eghbalnia, H. R., Powers, R., Raftery, D., & Wishart, D. S. (2017). The future of NMR-based metabolomics. *Current opinion in biotechnology*, 43, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.08.001>
2. Dunn WB, Ellis DI. (2005). *Metabolomics: Current Analytical Platforms and Methodologies*. Vol 24(4). Manchester.TrAC - Trends in Analytical Chemistry. doi:10.1016/j.trac.2004.11.021
3. Frigolet, Maria E. y Gutiérrez-Aguilar, Ruth (2017). “Ciencias “ómicas”, ¿cómo ayudan a las ciencias de la salud?”, en *Revista Digital Universitaria (RDU)*, vol. 18, núm. 7, septiembre-octubre. DOI: <http://doi.org/10.22201/codeic.16076079e.2017.v18n7.a3>
4. Dunn WB, Bailey NJC, Johnson HE. (2005) Measuring the metabolome: current analytical technologies. *R Soc Chem*.Vol. 130(5):606-625. doi:10.1039/b418288j
5. Roberts, LD, Souza, AL, Gerszten, RE y Clish, CB (2012), *Metabolómica dirigida*. *Protocolos Actuales en Biología Molecular*, 98: 30.2.1-30.2.24. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb3002s98>
6. Wade L. (2011). *Química Orgánica*. Vol 1. Séptima Ed. Pearson. Páginas 744 doi:10.1080/00856401.2017.1295571
7. Günther H. (2013). *NMR Spectroscopy Basic Principles, Concepts and Applications in Chemistry*. 3ra ed. Editorial:Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA. Weinheim, German. páginas 736. <http://library1.nida.ac.th/termpaper6/sd/2554/19755.pdf>
8. de Graaf RA. (2019). *In Vivo NMR Spectroscopy: Principles and Techniques*. 3ra ed. John Wiley & Sons, Ltd. doi:10.1002/978111938246. ISBN: 9781119382461
9. Eghbalnia HR, Romero PR, Westler WM, Baskaran K, Ulrich EL, Markley JL. (2017). Increasing rigor in NMR-based metabolomics through validated and

- open source tools. *Curr Opin Biotechnol*. Vol 43. pp:56-61. Ed. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.copbio.2016.08.005
10. Tortosa Muñoz G. (2011). Manual práctico de Quimiometría. paginas:1-142. <http://www.compostandociencia.comdiponibleen>
 11. Trygg J, Holmes E, Lundstedt T. (2007). Chemometrics in Metabonomics. *Journal of reviewa Proteome Research*. Vol. 6:479. No. 2. doi:10.1021/pr060594q
 12. Constantinou MA, Papakonstantinou E, Benaki D, et al. (2004). Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy combined with principal component analysis in detecting inborn errors of metabolism using blood spots: A metabonomic approach. *Anal Chim Acta*. Vol. 511(2):303-312. doi:10.1016/j.aca.2004.02.012
 13. Shi S, Kong N, Feng C, et al. (2019). Drug Delivery Strategies for the Treatment of Metabolic Diseases. *Adv Healthc Mater*. Vol.8(12):24. Massachusetts, USA. doi:10.1002/adhm.201801655
 14. Molina Gutiérrez MA, López López R, Morais López A, et al. (2015). Enfermedades metabólicas congénitas en un servicio de urgencias pediátricas. *Anales Pediatría*. Vol.82(6):404-411. España. doi:10.1016/j.anpedi.2014.09.013
 15. Sistema Nacional de Salud. (2010). 50 Enfermedades Metabólicas Congénitas. pp: 1-14.España.
 16. Barba JR. (2004). Tamiz neonatal : Una estrategia en la medicina preventiva. *Revista Mexicana de Patología Clínica*. Vol.51(3):16. Yucatan, México. file:///C:/Users/Fernando/Documents/INVESTIGACION 2016/documentos para temas/tamiz neonatal/tamiz neonatal.pdf
 17. García-Morales E, Ferráez-Pech MA, López-Hernández RD, et al. (2017). Frecuencia de errores innatos del metabolismo en pacientes pediátricos atendidos en el Hospital Civil de Guadalajara Fray Antonio Alcalde. *Revista Médica MD*. Vol.8(4):146-153.México. Accessed September 5, 2020.

www.revistamedicamd.com,

18. A JFC, Giugliani R. Errores Innatos del Metabolismo. (2015). *Rev Médica Clínica Las Condes*. Vol.26(4):483-486. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2015.06.022>
19. Rodríguez K, Treviño M, Villanueva K, et al. (2019). Metabolómica como nueva herramienta para el diagnóstico oportuno en enfermedades no transmisibles. *Revista Salud Ambiental* Vol.19(2):109-115. San Luis Potosi, México. <http://ojs.diffundit.com/index.php/rsa/article/view/942>
20. Jacob M, Malkawi A, Albast N, et al. (2018). A targeted metabolomics approach for clinical diagnosis of inborn errors of metabolism. *Anal Chim Acta*. Vol.1025:141-153. doi:10.1016/j.aca.2018.03.058
21. Speyer, C. B., & Baleja, J. D. (2021). Use of nuclear magnetic resonance spectroscopy in diagnosis of inborn errors of metabolism. *Emerging topics in life sciences*, 5(1), 39–48. <https://doi.org/10.1042/ETLS20200259>
22. Reijngoud D. J. (2018). Flux analysis of inborn errors of metabolism. *Journal of inherited metabolic disease*, 41(3), 309–328. <https://doi.org/10.1007/s10545-017-0124-5>
23. Por Elsevier Connect. 25 09, 2018. La prueba del talón: enfermedades objeto de cribado y técnica. Accessed March 30, 2020. <https://www.elsevier.com/es-es/connect/enfermeria/la-prueba-del-talon-enfermedades-objeto-de-cribado-y-tecnica>
24. Zubieta-ruiz B, Castillo-cruz RA. (2009). Enfermedades genéticas y defectos al nacimiento. Impacto en la morbilidad y mortalidad pediátrica. *Acta Pediátrica de México*. Vol.30(4):220-225.México. ISSN: 0186-2391
25. Psychogios N, Hau DD, Peng J, et al. (2011) The human serum metabolome. *PLoS One*. Vol.6(2):e16957. doi:10.1371/journal.pone.0016957
26. Michael H. Ross WP. (2007). *Histología: Texto Y Atlas Con Biología Celular y Molecular*. 5ta Edición. pp: 577 Editorial Panamericana. EE.UU. <https://books.google.com.mx/books?id=NxYmIRZQi2oC&pg=PA269&dq=hist>

ologia+sangre&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwiHja7LpcTrAhXJB80KHarkAZU
Q6wEwAHoECAEQAQ#v=onepage&q=histologia sangre&f=false

27. Strasinger SK, Lorenzo MS Di. (2010). *Análisis de Orina y de Los Líquidos Corporales*. 5ta ed. pp:299. Editorial medica Panamericana. Buenos Aires. <https://books.google.com.mx/books?id=uJmKmvilUdoC&pg=PA40&dq=qué+es+la+orina&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwiFkYaAtbrsAhXul60KHb8VCU4Q6AEwAHoECAEQAg#v=onepage&q&f=false>
28. Secretaria de Salud. (2010) Tamiz neonatal detección, diagnóstico, tratamiento y seguimiento de los errores innatos del metabolismo. Lineamiento Técnico. Vol.3:30.México.
29. Marcela Vela-Amieva D, En M, Ibarra-González I, Cynthia Fernández-Lainez QFB, Leticia Belmont-Martínez D. (2012). *Fundamentos Teórico-Prácticos Para La Toma Correcta de La Muestra de Sangre Del Talón Para El Tamiz Neonatal*. Acta Pediatrica México. Vol 33(6):273-278. México. www.nietoeditore.com.mx
30. Wevers RA, Engelke UFH, Moolenaar SH, et al. (1999). 1H-NMR spectroscopy of body fluids: Inborn errors of purine and pyrimidine metabolism. *Clin Chem*. Vol.45(4):539-548. doi:10.1093/clinchem/45.4.539
31. Constantinou MA, Papakonstantinou E, Spraul M, et al. (2005). H NMR-based metabolomics for the diagnosis of inborn errors of metabolism in urine. Vol.542:169-177. doi:10.1016/j.aca.2005.03.059
32. Beckonert O, Keun HC, Ebbels TMD, et al. (2007). Metabolic profiling, metabolomic and metabolomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat Protoc*. Vol.2(11):2692-2703. doi:10.1038/nprot.2007.376
33. Scalabre A, Jobard E, Demède D, et al. (2017). Evolution of newborns' urinary metabolomic profiles according to age and growth. *J Proteome Res*. Vol.16(10):3732-3740. doi:10.1021/acs.jproteome.7b00421
34. Pintus MC, Lussu M, Dessì A, et al. (2018). Urinary 1H-NMR Metabolomics in

- the First Week of Life Can Anticipate BPD Diagnosis. *Oxid Med Cell Longev*. Vol.2018:7620671. doi:10.1155/2018/7620671
35. Embade N, Cannet C, Diercks T, et al. (2019). NMR-based newborn urine screening for optimized detection of inherited errors of metabolism. *Scientific reports*, 9(1), 13067. doi:10.1038/s41598-019-49685-x
 36. Nagana Gowda GA, & Raftery D. (2019). Analysis of Plasma, Serum, and Whole Blood Metabolites Using ¹H NMR Spectroscopy. In: *Methods in Molecular Biology*. (Clifton, N.J.), Vol. 2037, 17–34. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9690-2_2
 37. Tiziani S, Emwas AH, Lodi A, et al. (2008). Optimized metabolite extraction from blood serum for ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Analytical Biochemistry*. Vol.377(1):16-23. doi:10.1016/j.ab.2008.01.037
 38. Foxall, P. J., Spraul, M., Farrant, R. D., Lindon, L. C., Neild, G. H., & Nicholson, J. K. (1993). 750 MHz ¹H-NMR spectroscopy of human blood plasma. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, Vol.11(4-5), 267–276. [https://doi.org/10.1016/0731-7085\(93\)80017-u](https://doi.org/10.1016/0731-7085(93)80017-u)
 39. Li K, Naviaux JC, Monk JM, Wang L, Naviaux RK. (2020). Improved dried blood spot-based metabolomics: A targeted, broad-spectrum, single-injection method. *Metabolites*. Vol.10(3),82. doi:10.3390/metabo10030082
 40. Rankin, N. J., Preiss, D., Welsh, P., Burgess, K. E., Nelson, S. M., Lawlor, D. A., & Sattar, N. (2014). The emergence of proton nuclear magnetic resonance metabolomics in the cardiovascular arena as viewed from a clinical perspective. *Atherosclerosis*, Vol.237(1), 287–300. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.09.024>

