



7  
005622y

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**ESTUDIO DE LA EXCRECIÓN URINARIA DE ÁCIDOS  
ORGÁNICOS EN NIÑOS CON DESNUTRICIÓN  
ENERGÉTICO-PROTEÍNICAS**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS  
( B I O Q U Í M I C A )  
P R E S E N T A  
Q.F.B. ISABEL CRISTINA IBARRA GONZÁLEZ



MÉXICO, D.F.

1998

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

250801



## **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 está 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:**

<b>Presidente:</b>	<b>Dra. Rosario A. Muñoz Clares</b>
<b>Primer Vocal:</b>	<b>Dr. Guillermo Ruiz Palacios</b>
<b>Secretario:</b>	<b>M en C. Santiago Capella Vizcaino</b>
<b>Primer Suplente:</b>	<b>Dr. Armando Tovar Palacios</b>
<b>Segundo suplente:</b>	<b>Dra. Herminia Loza Tavera</b>

**Sustentante: Q. F. B. Isabel Cristina Ibarra González**

**Tutor: Dr. Antonio Velázquez Arellano**

**Este trabajo fue subvencionado por el donativo 0599 PM de CONACYT.**

**El presente trabajo se realizó en la Unidad de Genética de la Nutrición. Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM - Instituto Nacional de Pediatría SS.**

## DEDICATORIAS

He querido dedicar este trabajo en primer lugar a mi familia:

A mis padres Gloria y Raúl

A mis hermanos Martha, Patricia, Gerardo, Javier, Sonia y a Estela

A mis sobrinos Ely y Julio Eduardo

Como una pequeña retribución por el tiempo que les tomé y dejé de disfrutar de su compañía y sobre todo para agradecer el amor, apoyo y confianza que me han brindado en todo momento.

A Jesús:

Por tu amor y apoyo, por todos los momentos que hemos vivido juntos y por los que nos faltan por vivir.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios.

Al mi maestro, Dr. Antonio Velázquez, por los conocimientos, estímulos y apoyo constante que generosamente me ha brindado.

A la Dra. Antonia Rives, Irene Barau y a toda la gente del Instituto de Bioquímica Clínica de Barcelona por su hospitalidad y por compartir conmigo desinteresadamente sus conocimientos.

A la Dra. Rebeca Franco y al M. en C. Santiago Capella, miembros del comité tutorial, por su apoyo y sugerencias durante las evaluaciones.

A los miembros del Jurado por la revisión crítica del trabajo.

A la Médico Pediatra Margarita Terán García por su valiosa colaboración en este proyecto.

A todos mis compañeros y amigos de la Unidad de Genética de la Nutrición.

A mis queridísimas amigas Clau, Naty y Mony.

# ÍNDICE

1. RESUMEN .....	1
2. ANTECEDENTES	
2.1 Ácidos orgánicos en el contexto del metabolismo intermedio .....	3
2.2 Estudio de ácidos orgánicos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CGEM) .....	3
2.3 Desnutrición energético-proteínica (DEP) .....	5
2.3.1 Clasificación de la desnutrición .....	6
2.4 Vitaminas y ácidos orgánicos .....	7
2.4.1 $\beta$ -oxidación (carnitina, riboflavina y niacina) .....	8
2.4.2 Metabolismo del propionato (vitamina B12 y biotina) .....	11
3. HIPÓTESIS .....	15
4. OBJETIVOS .....	15
5. JUSTIFICACIÓN .....	16
6. MATERIAL Y MÉTODOS	
6.1 Selección de pacientes .....	17
6.2 Diseño experimental .....	17
6.3 Estudio de ácidos orgánicos por CGEM	
6.3.1 Extracción en fase sólida .....	18
6.3.2 Procedimiento de silanización .....	19
6.3.3 Análisis de los derivados por CGEM .....	19
7. RESULTADOS .....	20
8. DISCUSIÓN .....	32
9. BIBLIOGRAFÍA .....	35
10. APÉNDICE (Concentraciones individuales de todos los ácidos orgánicos evaluados en las diferentes muestras de cada paciente) .....	43

## 1 RESUMEN

El análisis de ácidos orgánicos urinarios por cromatografía de gases- espectrometría de masas (CGEM), permite el estudio de un gran número de intermediarios metabólicos con lo cual se pueden determinar trastornos metabólicos en orina, una muestra no invasiva. Esto ha permitido descubrir un amplio espectro de anomalías metabólicas en acidurias orgánicas de origen genético. Usamos esta técnica en el estudio de 39 niños con desnutrición energético-proteínica (DEP) (9 Kwashiorkor, 10 Marasmos, 10 Kwashiorkor-Marasmáticos y 19 Sugar Babies), en los que la detección de anomalías metabólicas es muy difícil por la escasez de muestras de sangre. Los pacientes fueron estudiados a diferentes tiempos: al ingreso, entre los días 5 y 20 y al egreso del hospital, cuando ya se habían recuperado nutrimentalmente. Treinta y siete (94.8%) de 39 pacientes estudiados tuvieron una excreción urinaria anormal de ácidos orgánicos, definida como aquellos valores que se encuentran por arriba del más alto observado al momento del egreso, cuando los pacientes estaban nutrimentalmente recuperados. Se pudo observar una gran heterogeneidad en cuanto a las anomalías presentes en cada paciente; sin embargo, no existe un patrón de excreción relacionado con un tipo particular de DEP. Cerca de la mitad de los niños desnutridos tuvieron evidencia de bloqueos en el metabolismo del propionato (15.4% con incremento de metilmalonato y 25.6% de 2-metilcitrato) o en la vía de la  $\beta$ -oxidación (30.8% con incremento de ácidos dicarboxílicos con 3-hidroxi-butírico normal o bajo), y 12.8% en ambas vías. Estas anomalías pudieron ser causadas por deficiencias de cofactores (vitaminas): adenosil cobalamina, para metil-malonilCoA mutasa, biotina para propionilCoA carboxilasa, riboflavina, niacina o carnitina, para varias de las enzimas de la  $\beta$ -oxidación mitocondrial y, por tanto, pueden representar fenocopias nutricionales de algunos errores innatos del metabolismo. Los ácidos dicarboxílicos fueron excretados en grandes cantidades desde el ingreso, mientras que el incremento de 2-metilcitrato y metilmalonato, indicativo de intermediarios acilCoA tóxicos, se observó hasta que el paciente había iniciado la alimentación oral. Esto probablemente contribuye al bien conocido pero pobremente entendido agravamiento de los niños desnutridos, si estos ingieren abundantes proteínas. El incremento de otros ácidos orgánicos urinarios es menos específico: 3-hidroxi-butirato (cetosis), ácido láctico (acidosis láctica), 4-hidroxi-fenil-lactato (daño hepático inespecífico), fumarato y succinato (disfunciones del ciclo de Krebs), y 4-hidroxi-fenil-acetato y benzoato (probables productos del metabolismo bacteriano). Nuestro estudio muestra que la

mayoría de los niños con desnutrición energético-proteínica severa tienen acidurias orgánicas. Estos resultados pueden tener implicaciones diagnósticas y terapéuticas, no únicamente en desnutrición primaria sino también en desnutrición secundaria a enfermedades tales como mala absorción intestinal. Adicionalmente, el análisis de ácidos orgánicos urinarios por CGEM demostró ser una herramienta novedosa, eficiente y no invasiva, en el estudio de las deficiencias vitamínicas en la DEP.

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 Ácidos orgánicos en el contexto del metabolismo intermedio

Los ácidos orgánicos comprenden un amplio grupo de compuestos cuya bioquímica abarca varias áreas del metabolismo intermedio. Se definen como ácidos carboxílicos no aminados e incluyen muchos compuestos del metabolismo de carbohidratos (i.e. ácido láctico), lípidos (ácidos grasos) y aminoácidos (muchos de sus intermediarios catabólicos). Pueden tener además diferentes grupos funcionales tales como hidroxiácidos, cetoácidos, ácidos aromáticos, compuestos heterocíclicos, amidas y lactonas (1). Se producen bajo condiciones fisiológicas normales, y se acumulan en forma importante cuando la actividad enzimática encargada de su metabolismo es deficiente o presenta algún bloqueo (2).

Las acidemias orgánicas son un grupo de enfermedades del metabolismo intermedio que resultan en la acumulación de ácidos orgánicos en fluidos biológicos, alteran el equilibrio ácido-base y trastornan las vías metabólicas intracelulares (2-4). Están asociadas con la excreción urinaria de una gran cantidad de ácidos orgánicos normales, sin embargo, algunas otras se caracterizan por un incremento moderado (o incluso leve) de ácidos orgánicos que habitualmente no están presentes (5). Pueden ser de índole genético o ser secundarias a efectos nutricionales, como en la aciduria metilmalónica debida a la deficiencia de vitamina B12 (6-12); tóxicos, como en el caso de la toxina hipoglicina, responsable de la enfermedad de vómito Jamaíquino (13,14), o estar relacionados a otras enfermedades adquiridas, como la aciduria 4-hidroxifenilacética asociada a síndromes de sobrecrecimiento bacteriano (15). Asimismo se han observado alteraciones con algunos fármacos como el ácido valproico y los salicilatos (16). Como resultado de lo anterior se originan cambios variables en la excreción urinaria de ácidos orgánicos, en su naturaleza y en su número.

### 2.2 Estudio de ácidos orgánicos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CGEM)

La combinación de la cromatografía de gases con la espectrometría de masas (CGEM), tiene una gran aplicación analítica en un número muy amplio de áreas, entre las que se puede mencionar la geología, la química ambiental, la farmacología, la

bioquímica, la toxicología, etc. Su aplicación en la investigación biomédica es cada vez más importante; un ejemplo de ello es el estudio de los errores innatos del metabolismo (17-22)

Es bien conocido que la identificación de las enfermedades está estrechamente ligado a los avances tecnológicos. Si nos enfocamos al metabolismo intermedio observaremos que casi la totalidad de las aminoacidopatías fueron descritas en las décadas de los 60 y 70 coincidiendo con el refinamiento de las técnicas de cromatografía de aminoácidos por resinas de intercambio iónico (23).

Antes del arribo de la CGEM, los ácidos orgánicos se estudiaron por técnicas cromatográficas simples, siendo el ácido cítrico el primero en ser descubierto en la orina en 1917 (24). También se buscó la relación entre la excreción de ácidos orgánicos urinarios y variables como la dieta y el estado ácido-base (25). La identificación de la acidemia isovalérica por Tanaka en 1966 usando CGEM cimentó el camino para la aplicación de esta técnica al estudio de acidurias orgánicas (26).

El uso más generalizado de esta técnica en los laboratorios de bioquímica clínica ha permitido el incremento en el diagnóstico bioquímico de numerosos errores innatos del metabolismo, a través de la identificación de ácidos orgánicos excretados anormalmente, que constituyen marcadores de bloqueos metabólicos en el organismo. En este sentido, se sabe que al acumularse un metabolito característico en la sangre, él mismo y otros intermediarios aparecen en la orina, en donde es más frecuente realizar este estudio. Actualmente se han individualizado más de 50 acidurias orgánicas y se han abierto capítulos importantes en el estudio de enfermedades metabólicas como en la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, lo que permite comprender mejor el metabolismo intermedio (2,4,27).

El enfoque analítico de los ácidos orgánicos es muy complejo y hasta hace poco tiempo, por razones de costo del equipo, por la alta especialización requerida para su manejo y la interpretación de los resultados, estos estudios se realizaban en pocos lugares del mundo, todos ellos en países altamente industrializados, y su empleo se restringía a detecciones toxicológicas y al diagnóstico de acidurias orgánicas (22,28-30).

La composición de los ácidos orgánicos, más que cualquier otra sustancia endógena en fluidos fisiológicos, representa una mezcla muy compleja de compuestos con un amplio intervalo de concentraciones, grupos funcionales y propiedades físicas; en particular, su carácter hidrofóbico varía considerablemente. El conocimiento de estas propiedades es importante para elegir el método de aislamiento del material biológico. (5,31-34). Los pasos principales para la realización de un perfil de ácidos orgánicos consisten en a) extraer los ácidos orgánicos del fluido biológico que se va a estudiar, b) formar derivados volátiles y c) analizarlos mediante un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas. Si el fluido es orina, los resultados son expresados en términos de la concentración de creatinina (27).

El punto crítico del análisis consiste en lograr un aislamiento real y efectivo de los ácidos orgánicos, para lo cual se han implementado una variedad de enfoques para su extracción, a través de los años. El método más común con disolventes tiene serias limitaciones, como la baja reproducibilidad, la pobre recuperación de los ácidos más polares como el metilcítrico y la extracción de grandes cantidades de compuestos neutros, particularmente la urea. Con el uso de cromatografía de intercambio iónico se obtiene una mayor recuperación de los ácidos más polares, sin embargo, la desventaja es que se extraen sulfatos y fosfatos inorgánicos, los cuales pueden enmascarar compuestos de interés en el cromatograma (35). Recuperaciones altas y uniformes se obtienen empleando cromatografía de partición en sílice hidratada con ácido sulfúrico, siendo éste un método rápido, reproducible y sin interferencia por urea, fosfatos o sulfatos (27,35-38).

Por último, la CGEM permite la cuantificación de compuestos a través de las áreas de los picos de los cromatogramas de extracción iónica de iones únicos (o casi únicos) para cada compuesto, lo que incrementa la resolución cromatográfica de los picos sobrepuestos en el cromatograma iónico total (35).

### **2.3 Desnutrición energético-proteínica (DEP)**

La DEP es un estado patológico, inespecífico, sistémico y potencialmente reversible que se origina por la deficiente utilización o aporte de los nutrimentos esenciales a las células del organismo (39).

La DEP es uno de los padecimientos más frecuentes en la infancia particularmente en países en vías de desarrollo. Además de su importancia como problema de salud pública, representa un rompimiento en la homeostasis del organismo y constituye un modelo útil para comprender los mecanismos de regulación metabólica.

Este padecimiento es un trastorno heterogéneo, tanto clínica como bioquímicamente (39). Aún se desconocen muchos de sus aspectos en razón a la complejidad de los cambios que ocurren y a las limitaciones para estudiar invasivamente a los afectados. En particular, las deficiencias vitamínicas son muy frecuentes, sin embargo, su efecto en las diferentes vías metabólicas y en el curso clínico de los desnutridos no ha sido tan bien dilucidado como el de la carencia de energía y proteínas (40).

### 2.3.1 Clasificación de la desnutrición

Existen varios criterios para clasificar a la desnutrición:

- a) por su intensidad
- b) por su tiempo de evolución
- c) por sus manifestaciones clínicas.

a) La propuesta por el Dr. Federico Gómez (41), considera tres grados según su intensidad, en función al porcentaje de déficit de peso en un individuo de determinada edad en relación a un valor "ideal" o de referencia:

Grado	Porcentaje de déficit peso para la edad
I.- Leve	10-24%
II.- Moderada	25-39%
III.- Grave	mayor de 40%

b) El déficit de talla para la edad en relación a un valor "ideal" o de referencia evalúa el grado de atrofia por desnutrición y refleja la cronicidad del padecimiento (42):

Grado	Porcentaje de talla para la edad
I.- Leve	95-90%
II.- Moderada	89-85%
III.- Grave	menor del 85%

c) De acuerdo a las manifestaciones clínicas, se pueden describir las siguientes formas: (42,43,44,45).

**KWASHIORKOR.**- Paciente con desnutrición grave que presenta panículo adiposo en cantidad variable, edema como signo característico y lesiones cutáneas descamativas; presenta también alteración en mucosas y cabello de diversa intensidad, e irritabilidad.

**MARASMO.**- Como característica principal, carece de panículo adiposo, tiene fascies senil, sin edema, con lesiones en mucosas de poca intensidad, y déficit de peso para la edad mayor al 40%.

**KWASHIORKOR- MARASMÁTICO.**- Paciente con edema de origen nutricional en las extremidades, acompañado en ocasiones de lesiones cutáneas similares a las descritas en el kwashiorkor clásico, presentan además datos de panículo adiposo como el marasmo y su déficit de peso para la edad se encuentra entre el 40 y 20%.

**"SUGAR BABY".**- Término acuñado por Platt para definir al paciente desnutrido de tercer grado con un peso corporal de 60 al 80% del normal para su edad, con panículo adiposo en cantidad variable, con o sin edema y/o hepatomegalia, además de cambios mínimos en piel y cabello; cuadro clínico producido por una dieta baja en proteínas y alta en carbohidratos.

## **2.4 Vitaminas y ácidos orgánicos**

La integridad de muchas de las reacciones químicas que ocurren en un organismo dependen en forma significativa de la presencia en concentraciones adecuadas de cofactores derivados de las vitaminas provenientes de la dieta. En algunos errores innatos del metabolismo, denominados dependencias vitamínicas hereditarias (46), el bloqueo se manifiesta a ingestas normales de alguna vitamina, pero desaparece con la administración de dosis farmacológicas. Ejemplo de ello es la deficiencia múltiple de carboxilasas dependiente de biotina (47). Bloqueos similares causados por deficiencias vitamínicas dietarias pueden ser vistos como fenocopias nutricionales de estos defectos genéticos (48). Estos bloqueos resultan en la acumulación y excreción anormal de metabolitos -muchos de los cuales son ácidos orgánicos- potencialmente detectables por CGEM. Aunque la forma más común para evaluar el estado nutricional

por vitaminas consiste en medir las enzimas de las cuales son cofactores, las concentraciones de ácidos orgánicos también pueden ser marcadores útiles de deficiencias vitamínicas. Tal es el caso de la elevación del ácido metilmalónico en sangre y orina como indicador de deficiencia de vitamina B12 (6-12).

Apoenzima es la proporción proteica de la enzima, cuando se asocian con su cofactor y son enzimáticamente activas se denominan holoenzimas. Si la concentración del cofactor en la célula es anómalamente baja, una proporción significativa de la enzima se encuentra como apoenzima y frecuentemente la velocidad de degradación de ésta es más rápida que la de la holoenzima.

El procesamiento de la vitamina en cofactor frecuentemente consta de una serie de pasos metabólicos y mecanismos de transporte para obtener la concentración requerida en el sitio donde se llevan a cabo las reacciones en las cuales se encuentra involucrado. La actividad de la holoenzima es por tanto dependiente de mecanismos de transporte, metabolismo, procesamiento y unión del cofactor requerido; por lo tanto, en estos procesos existen muchas posibilidades de defectos genéticos, los cuales resultarían en una deficiencia de la actividad de la holoenzima (49).

El descubrimiento de que algunas enfermedades metabólicas pueden ser tratadas con altas dosis del cofactor o la vitamina precursora ha sido empírico. Cuando se ha demostrado que una enfermedad se debe a la deficiencia de la actividad de la holoenzima, se administran grandes dosis de la vitamina o el cofactor, lo que puede resultar en un incremento de la actividad de la holoenzima, y algunas veces, en una dramática mejoría en el status clínico del paciente. Ejemplo de lo anterior es la biotina en el caso de la deficiencia múltiple de carboxilasas y la vitamina B12 en la acidemia metilmalónica, observándose una rápida y fuerte disminución en la concentración de los ácidos orgánicos en sangre y en orina, así como un incremento en la capacidad para tolerar los precursores que precipitan episodios agudos en los pacientes (49).

#### **2.4.1 $\beta$ -oxidación (carnitina, riboflavina y niacina)**

La carnitina actúa en el transporte de los ácidos grasos de cadena larga, del citosol a la matriz mitocondrial, para ser oxidados como fuente de energía. El proceso de transporte consiste en dos transesterificaciones que involucran a los acil ésteres de CoA y carnitina y la acción de tres enzimas mitocondriales, carnitina aciltransferasa I y

II y carnitina translocasa. El resultado de la acción de estas tres enzimas es que los ácidos grasos de cadena larga (AGCL) son conducidos al interior de la mitocondria, para servir como sustrato de la  $\beta$ -oxidación. Por ello, la carnitina es indispensable para la oxidación de los AGCL (50,51).

Las necesidades de carnitina han sido demostradas en mamíferos en circunstancias en las cuales su biosíntesis está limitada por deficiencia de los precursores lisina o metionina. Se han encontrado niveles anormalmente bajos en humanos con desnutrición proteínica grave (52).

La riboflavina funciona metabólicamente como un componente esencial de las coenzimas flavin mononucleótido (FMN) y flavin adenina dinucleótido (FAD), las cuales actúan como intermediarios en la transferencia de electrones en reacciones biológicas de oxidorreducción, entre las que se encuentran las acil-CoA deshidrogenasas que participan en la  $\beta$ -oxidación (52).

La niacina sirve como precursor en la síntesis de nucleótidos de piridina NADH y NADPH, que participan como co-sustratos de muchas deshidrogenasas del metabolismo de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos. Su deficiencia en humanos resulta en cambios en la piel, el tracto gastrointestinal y el sistema nervioso (52).

Cuando la capacidad de la  $\beta$ -oxidación mitocondrial es excedida, ya sea por un incremento en el flujo de esta vía para la producción de energía, como ocurre en la cetoacidosis diabética o durante un tiempo prolongado de ayuno, o en la deficiencia de alguna enzima involucrada, la  $\Omega$ -oxidación de ácidos grasos (peroxisomal y microsomal) se incrementa resultando en la acumulación de ácidos dicarboxílicos de cadena media (adípico, subérico y sebácico) (2) (Figura 1).

Durante el ayuno o en períodos de descompensación en pacientes con errores innatos del metabolismo de la  $\beta$ -oxidación, se ha descrito un perfil de ácidos orgánicos caracterizado por una "inapropiada" aciduria dicarboxílica, es decir, ácidos dicarboxílicos elevados sin aumento concomitante de cuerpos cetónicos (53).

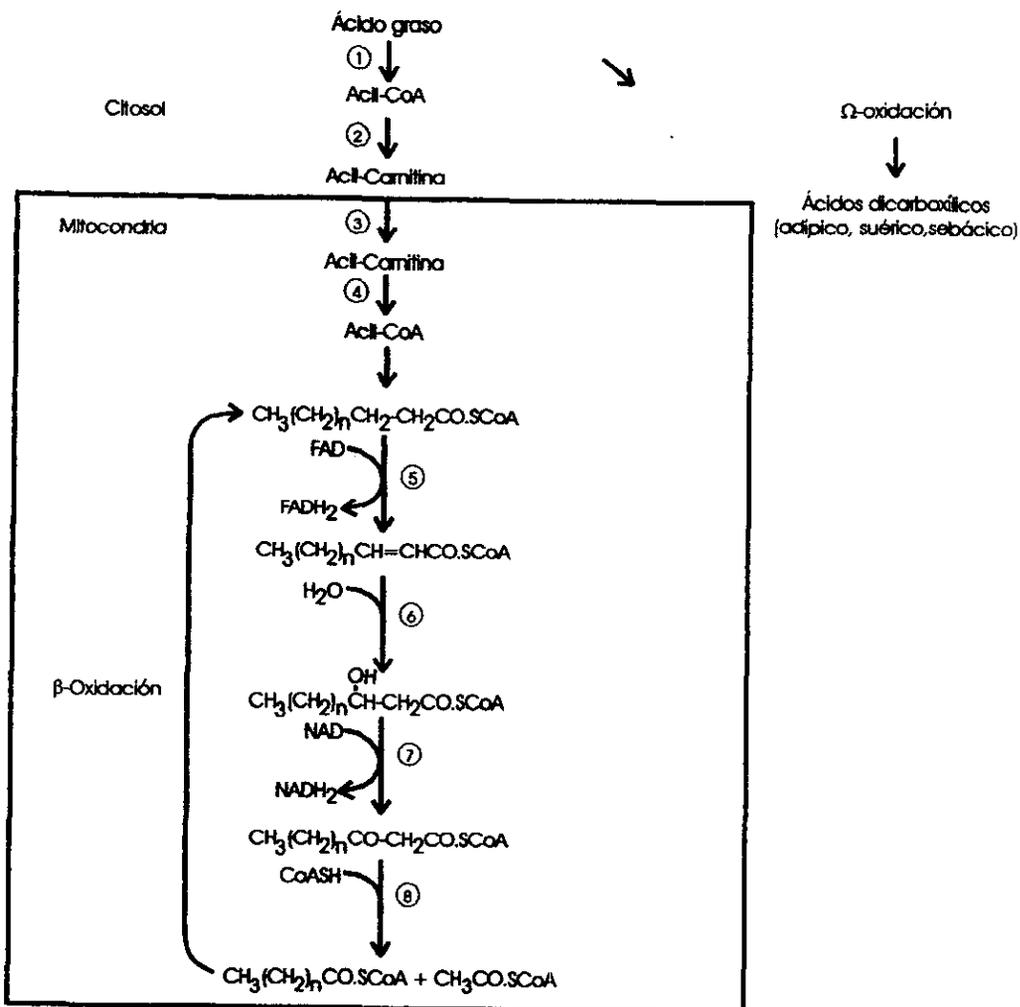


Figura 1. Metabolismo de Ácidos grasos. Ver detalles en el texto.

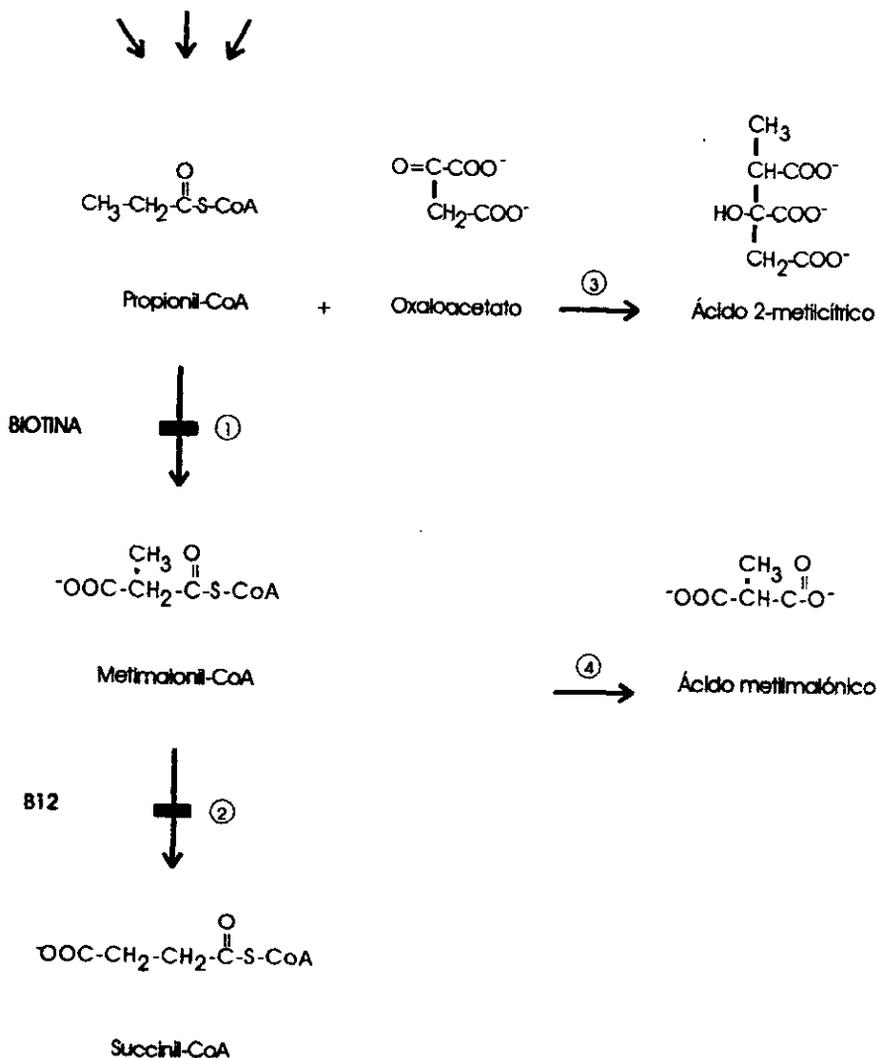
1. Acil-CoA sintetasa, 2. Carnitina aciltransferasa I, 3. Carnitina/acil-carnitina translocasa, 4. Carnitina aciltransferasa II, 5. Acil-CoA deshidrogenasa, 6. Enoil-CoA hidratasa, 7. 3-Hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, 8. Acetil-CoA acetiltransferasa.

#### 2.4.2 Metabolismo del propionato (vitamina B12 y biotina)

La propionil-CoA es carboxilada en forma reversible a D-metilmalonil-CoA por una enzima mitocondrial dependiente de biotina, la propionil-CoA carboxilasa. La deficiencia genética de esta enzima produce acidemia propiónica (AP) (54). La D-metilmalonil-CoA se convierte por la metilmalonil-CoA racemasa en el L-isómero, el cual es convertido en succinil-CoA por la metilmalonil-CoA mutasa, enzima dependiente de vitamina B12 (55) (Figura 2).

Los principales precursores de propionil-CoA son los aminoácidos isoleucina y valina. Otros aminoácidos precursores son la treonina y la metionina, que son metabolizados a este intermediario vía 2-oxobutiril-CoA. La  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos de cadena impar produce también propionil-CoA. El colesterol es un precursor menor de propionato a través de la  $\beta$ -oxidación peroxisomal de la cadena lateral. Finalmente la síntesis de propionato por las bacterias gastrointestinales es un factor importante en las enfermedades del metabolismo del propionato (56).

La vitamina B12 es sintetizada exclusivamente por microorganismos, pero la mayoría de los animales superiores son capaces de convertir la vitamina en dos formas de coenzimas, adenosilcobalamina (AdoCbl) y metilcobalamina (MeCbl). Únicamente se conocen dos enzimas en células de mamíferos que dependen de las coenzimas cobalamina: metilmalonil-CoA mutasa, que utiliza AdoCbl, y  $N^5$ -metiltetrahidrofolato-homocisteína metiltransferasa, que requiere MeCbl. Existen dos anomalías en la síntesis de AdoCbl que causan una deficiente actividad de la metilmalonil-CoA mutasa, lo que origina una acidemia metilmalónica (AMM). En la mayoría de los pacientes con este defecto, la administración de suplementos farmacológicos de Cbl disminuyen la acumulación del ácido metilmalónico (56).



**Figura 2.** Metabolismo de propionil-CoA. Los principales precursores son los aminoácidos isoleucina y valina. Dos coenzimas participan en esta secuencia de reacciones: biotina en la carboxilación de propionil-CoA, y adenosilcobalamina (B12), en la isomerización de metilmalonil-CoA. 1. Propionil-CoA carboxilasa. 2. Metilmalonil-CoA mutasa, 3. Citrato sintasa, 4. Metilmalonil-CoA hidrolasa

La deficiencia en la ingesta de vitamina B12 produce un modelo de las alteraciones bioquímicas características del error innato del metabolismo en el cual las actividades de metilmalonil-CoA mutasa y N5-metiltetrahidrofolato-homocisteína metiltransferasa son deficientes (6-12).

La biotina es una de las vitaminas hidrosolubles pertenecientes al complejo B. Actúa como grupo prostético de cuatro carboxilasas en el humano: piruvato carboxilasa, propionil-CoA carboxilasa,  $\beta$ -metilcrotonil-CoA carboxilasa y acetil-CoA carboxilasa. Un adecuado aporte de biotina es vital ya que estas enzimas participan en gluconeogénesis, síntesis de ácidos grasos y en el metabolismo de aminoácidos. La biotina proviene de la dieta y posiblemente también de la actividad sintética de la flora gastrointestinal (52). Existen dos defectos en el ciclo de la utilización de biotina en humanos. Ambas enfermedades resultan en una deficiencia múltiple de carboxilasas produciendo bloqueos en la gluconeogénesis, anaplerosis del ciclo de Krebs, la síntesis y elongación de ácidos grasos, y el catabolismo de varios aminoácidos y lípidos. La deficiencia de holocarboxilasa sintetasa, también conocida como "de inicio temprano", es un trastorno en la biotinilación y la deficiencia de biotinidasa, (de inicio tardío), es un trastorno en el reciclaje de la biotina. Los pacientes afectados presentan manifestaciones clínicas graves, entre ellas acidosis metabólica y un patrón de excreción de ácidos orgánicos característico: elevación en la concentración de  $\beta$ -hidroxiisovalérico,  $\beta$ -metilcrotonilglicina, 3-hidroxiisovalérico, 2-metilcitrónico y láctico (57).

La deficiencia espontánea de biotina en humanos es muy rara. Una de las circunstancias en la que se presenta es cuando hay un consumo excesivo de clara de huevo que contiene una proteína, la avidina, que al unirse a la biotina produce su deficiencia (58,59). También ocurría en pacientes que recibían alimentación parenteral total por tiempo prolongado antes de que se incluyera biotina en las disoluciones para esta forma de alimentación (60). Asimismo el uso continuo de fármacos anticonvulsivantes puede provocar esta deficiencia, probablemente por inhibición del transporte intestinal de la vitamina (55).

La D-metilmalonil-CoA hidrolasa es una activa deacilasa presente en hígado, que probablemente es responsable de la liberación de grandes cantidades de ácido metilmalónico de la mitocondria en la aciduria metilmalónica, para después excretarse por la orina; esta enzima es casi inactiva con propionil-CoA. Dicha reacción

seguramente es una "válvula de escape" que limita la acumulación intramitocondrial de los ésteres acil-CoA tóxicos en los pacientes con AMM. Debido a que metilmalonil-CoA no participa en procesos anabólicos, el organismo trata de eliminar inmediatamente el exceso desacoplando la forma CoA: el metilmalonato puede entonces cruzar la membrana celular fácilmente y ser excretado en la orina.

En contraste en pacientes con AP, la excreción de metabolitos urinarios parece tener un papel menos importante en disminuir los efectos potencialmente tóxicos del exceso intracelular de los ésteres acil-CoA. Dado que no existe un sistema de deacilación de propionil-CoA, éste se comporta como un análogo de acetil-CoA y sirve como sustrato de la citrato sintasa, uniéndose al oxaloacetato para formar 2-metilcitrato. El 2-metilcitrato se transporta al citoplasma donde puede ser excretado a través de la orina o servir como sustrato de la citrato liasa, regenerando oxaloacetato y propionil-CoA que serviría como molécula cebadora (primer) en la síntesis de ácidos grasos de cadena impar. Por otra parte el 3-hidroxi-propil-CoA, formado a partir de propionil-CoA en una vía menos activa, sirve como sustrato de la 3-hidroxi-isobutiril-CoA deacilasa, enzima involucrada en la oxidación de la valina, dando lugar al ácido 3-hidroxi-propiónico (61).

### 3 HIPÓTESIS

En la desnutrición energético-proteínica existen bloqueos metabólicos (por deficiencias de coenzimas derivadas de vitaminas), que se hacen evidentes por una excreción anormal de ácidos orgánicos (intermediarios de las vías metabólicas bloqueadas) en orina.

### 4 OBJETIVOS

- Conocer el espectro de bloqueos metabólicos que ocurren en la desnutrición energético-proteínica y que se manifiestan en la excreción anormal de ácidos orgánicos.
- Estudiar cuantitativamente la excreción de ácidos orgánicos urinarios en niños desnutridos con objeto de determinar qué vías metabólicas (y en qué parte de ellas) se encuentran bloqueos como consecuencia de posibles deficiencias vitamínicas que forman parte de la desnutrición.
- Comparar la excreción urinaria de metabolitos "marcadores de bloqueos metabólicos" en niños con DEP al ingreso, durante los días 5-20 (una vez que el paciente ingiere proteínas), con sus niveles cuando se recuperaron nutrimentalmente y son dados de alta.

## 5 JUSTIFICACIÓN

La DEP representa un rompimiento en la homeostásis del organismo y constituye un modelo útil para conocer mejor los mecanismos de regulación metabólica. En este padecimiento, tanto por razones metodológicas como por las serias limitaciones para obtener muestras de sangre en pacientes muy pequeños y graves, son limitados los estudios para conocer si existen vías metabólicas bloqueadas y cuáles son estas vías.

El estudio de los ácidos orgánicos es una herramienta poderosa, pues de existir bloqueos en la DEP similares a los que se presentan cuando hay enfermedades metabólicas hereditarias, al igual que en estas últimas, se excretarán metabolitos que normalmente son procesados. La excreción anormal de ácidos orgánicos constituye entonces un buen indicador de trastornos en las principales vías metabólicas de un individuo.

El estudio de ácidos orgánicos en orina para detectar bloqueos metabólicos por deficiencias vitamínicas en la DEP no se ha empleado previamente. Debido a que la DEP es un padecimiento multifactorial y heterogéneo, seguramente existen en él diversos pasos limitantes. Conviene, tanto por razones conceptuales como prácticas, determinar cuáles deficiencias vitamínicas dan origen a pasos limitantes en los diferentes pacientes desnutridos. El estudiar en ellos el perfil de ácidos orgánicos, permitirá descubrir una amplia gama de intermediarios metabólicos anormales indicativos de deficiencias vitamínicas. Además facilitará considerablemente el abordaje en el caso de niños desnutridos.

## **6 MATERIAL Y MÉTODO**

### **6.1 Selección de pacientes**

Se estudiaron a 39 niños que ingresaron al Servicio de Nutrición del Instituto Nacional de Pediatría con desnutrición energético-proteínica de tercer grado con variedad clínica marasmo (M) (n=10), kwashiorkor (K) (n=9), kwashiorkor-marasmático (KM) (n=10) en términos de la clasificación de Wellcome (44). Los otros diez pacientes fueron clasificados como "sugar baby" (SB), de acuerdo a los criterios de Platt (43). Los valores normales de referencia fueron los reportados por Ramos Galván para niños mexicanos (39).

Los controles normales fueron 70 pacientes con peso y talla dentro de los porcentuales 5 y 95 para su edad. Este protocolo de investigación fue aprobado por los comités de Investigación y Ética del Instituto Nacional de Pediatría. Se obtuvo conocimiento informado en todos los casos de los padres o tutores de los pacientes.

Los pacientes fueron excluidos (o eliminados) si se encontraban afectados con otra enfermedad además de la desnutrición, incluyendo daño hepático o renal o si habían sido tratados con cualquier vitamina, carnitina, ácido valproico, tetraciclina, o transfusión sanguínea. Fueron eliminados también si la infección no cedía al quinto día después de la admisión, o si no podían alimentarse oralmente.

### **6.2 Diseño experimental**

Los pacientes fueron estudiados en tres ocasiones:

- a) En las primeras 24-72 horas después de su admisión al hospital, una vez que la infección, deshidratación y acidosis metabólica había sido controlada, pero antes de que la ingesta proteica fuera iniciada (muestra inicial).
  - b) Entre el día 5 y 20, después de que la alimentación oral había sido iniciada (muestra intermedia).
  - c) Al momento del egreso del hospital, cuando el paciente estaba recuperado nutricionalmente y su déficit de peso para la talla era menor de 15 % (muestra final).
- De este modo cada individuo fue su propio control.

En cada ocasión una muestra de orina tomada al azar fue colectada e inmediatamente congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$ ; se tuvo cuidado de evitar la contaminación de los especímenes por heces o por secreciones de lesiones que algunos pacientes presentaban. Todas las muestras fueron obtenidas temprano en la mañana antes de tomar alimentos.

Por razones administrativas nueve pacientes (2K, 2MK, y 5 SB) fueron transferidos a otro hospital antes de alcanzar su recuperación nutricional, por lo tanto no se obtuvo la muestra final de ellos. Todos los casos se encontraban en vías de recuperación, pero no habían alcanzado un déficit de peso para la talla menor del 15%.

El tratamiento habitual de la DEP, una vez que se ha restablecido el equilibrio hidro-electrolítico, consiste en la administración de soluciones parenterales durante el tiempo requerido para iniciar la tolerancia a la vía oral y en el momento en que ésta existe se indica una fórmula preparada con caseinato de calcio, glucosa, aceite de maíz, y cloruro de potasio, (esta fórmula no contiene adicionalmente leche o vitaminas); cantidades crecientes de leche en polvo (iniciando con 8 gr. por 100 ml de fórmula) se agregaron tan pronto como fueron toleradas; todos los pacientes toleraron bien la fórmula y tenían una dieta normal al momento del estudio final.

### **6.3 Estudio de ácidos orgánicos por CGEM**

La determinación de los ácidos orgánicos fue realizada por CGEM después de su *extracción en fase sólida*

#### **6.3.1 Extracción en fase sólida**

Para la extracción de los ácidos orgánicos se utilizaron cartuchos de sílica-gel (Spe-ed 1000 / 6ml), que fueron acondicionados lavándolos primero con 4 ml de HCl 0.1 M en metanol y después con 4 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5 mM en metanol. Los cartuchos se secaron con vacío antes de su uso.

La orina fue acidificada y cada muestra (volumen necesario de orina para tener  $0.5\ \mu\text{mol}$  de creatinina) fue aplicada a un cartucho acondicionado. Cada cartucho se secó con vacío por 15 min., los ácidos orgánicos se eluyeron con 2ml de 20% (v:v) t-butanol/cloroformo, que fueron recolectados en tubos de vidrio con tapón de rosca. Se

adicionaron 100  $\mu$ l de NaOH 0.05 N en metanol y se llevaron a sequedad en un rotoevaporador.

### **6.3.2 Procedimiento de silanización**

Los derivados trimetilsilano fueron formados adicionando 100  $\mu$ l de N, O-bis-(trimetilsilil)-acetamida (BSTFA) y calentando las muestras durante 30 minutos a 60°C.

### **6.3.3 Análisis de los derivados por CGEM**

Se obtuvo el perfil de ácidos orgánicos inyectando 1  $\mu$ l de cada muestra a un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard modelo 5890, acoplado a un detector de masas Hewlett-Packard modelo 5971A. Se usó una columna de metilfenilsilicón de 25m, 25 $\mu$  de espesor de película, 0.25 mm de diámetro. El programa de temperatura de la columna fue: temperatura inicial 40°C por 5 min., temperatura final: 280°C por 2 min., velocidad de calentamiento 10°C por min. La temperatura del inyector fue de 250°C, la de la línea de transferencia 280°C y de la fuente 150°C. El tipo de inyección fue Spitless con un tiempo de encendido de la purga de 2 min. Se realizó monitoreo total de iones ("scan") en el intervalo m/z de 45 a 650.

La concentración fue calculada con el uso de factores de respuesta determinados a partir de las curvas de calibración de los estándares, en las mismas condiciones de análisis, a través de las áreas de los cromatogramas de extracción iónica de iones únicos (o cercanamente únicos) para cada compuesto (29,35).

## 7 RESULTADOS

El presente estudio incluyó 39 pacientes con desnutrición energético-proteínica de las variedades Kwashiorkor (n=9), Kwashiorkor-marasmático (n=10) y Marasmo (n=10) de acuerdo a la clasificación de Wellcome (44) y 10 pacientes clasificados como "sugar-baby" según la definición de Platt (43).

Los pacientes se agruparon de acuerdo a la variedad clínica de desnutrición; la tabla 1 muestra un resumen de los datos clínicos de cada grupo. Se puede observar que el grupo de menor edad son los pacientes marasmáticos y el de mayor edad fue el grupo kwashiorkor-marasmático; no existen diferencias significativas en cuanto al sexo de los pacientes, en cuanto al tiempo de recuperación: los niños con marasmo y Kwashiorkor-marasmáticos tienen un tiempo de recuperación más prolongado evidenciado por una estancia hospitalaria mayor.

Definimos como concentraciones anormales de ácidos orgánicos aquellos valores situados por arriba del más alto observado al momento del egreso, (cuando los pacientes estaban nutricionalmente recuperados). Algunos de los valores obtenidos en la muestra final (egreso) fueron más altos que los de los controles normales estudiados por nosotros (tabla 2) o los publicados por otros (2), lo que posiblemente resulte en subestimar la frecuencia real de acidurias orgánicas en la DEP.

De acuerdo al criterio arriba mencionado, treinta y siete (94.8%) de 39 pacientes estudiados tuvieron excreción anormal de ácidos orgánicos. En el apéndice se muestran las concentraciones individuales de todos los ácidos orgánicos evaluados en las diferentes muestras de cada paciente.

De los 37 niños que tuvieron anomalías, sólo 5 presentaron elevación de un solo ácido orgánico; el resto tuvieron elevaciones en más de uno de ellos. Además, en varios pacientes dichas anomalías se encontraron tanto en la muestra inicial como en la intermedia (tablas apéndice).

Tabla 1. Características de los pacientes\*

Pacientes y tiempo de muestreo	Numero (masculinos: femeninos)	Edad (meses)	Periodo de recuperación (días)	déficit (%) edad	Talla/ déficit (%) Talla/ edad	Peso/ déficit (%) Peso/ talla
<b>Marasmo</b>						
Inicial	10 (5:5)	7 ± 5		51.1 ± 8.8	14.2 ± 7.2	28.2 ± 7.5
Intermedia	10 (5:5)					
Final	10 (5:5)		41 ± 12	38.4 ± 13.7	12.7 ± 6.9	9.5 ± 3.6
<b>Kwashiorkor</b>						
Inicial	9 (5:4)	25 ± 11		29.8 ± 13.9	8.6 ± 4.6	16.2 ± 9.6
Intermedia	9 (5:4)					
Final	7 (4:3)		28 ± 8	23.7 ± 15.8	8.6 ± 4.6	7.0 ± 3.1
<b>kwashiorkor Marasmítico</b>						
Inicial	10 (5:5)	16 ± 6		52.8 ± 9.1	12.4 ± 3.9	25.7 ± 9.8
Intermedia	10 (5:5)					
Final	8 (3:5)		45 ± 22	32.7 ± 8.8	10.8 ± 3.9	12.0 ± 1.1
<b>Sugar babies</b>						
Inicial	10 (5:5)	14 ± 11		33.5 ± 8.5	13.4 ± 5.8	8.7 ± 5.5
Intermedia	10 (5:5)					
Final	5 (3:2)		28 ± 6	31.2 ± 9.4	12.4 ± 5.2	8.3 ± 5.3

\* Los valores se encuentran expresados como media ± DS

**Tabla 2** Mediana, valores mínimo y máximo \* de los ácidos orgánicos seleccionados en diferentes tipos clínicos de desnutrición energético-proteínica†

Ácidos orgánicos seleccionados y tiempo de toma de muestra ‡	Marasmo	Kwashiorkor	Kwashiorkor-marasmático	Sugar babies	Controles normales	Valores normales en niños Norteamericanos II
<b>2-Metilglútrico</b>						
Inicial	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-480)	0 (0-0)		
Intermedia	0 (0-256)	0 (0-40)	0 (0-152)	0 (0-88)		
Final	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0-12
<b>Metilmalónico</b>						
Inicial	0 (0-5)	1 (0-8)	1 (0-16)	0 (0-9)		
Intermedia	2 (0-28)	1 (0-161)	1 (0-32)	1 (0-15)		
Final	4 (0-13)	1 (0-10)	4 (0-7)	2 (0-6)	0 (0-10)	<2
<b>Láctico</b>						
Inicial	216 (5-1747)	28 (7-787)	313 (2-6665)	65 (17-43)		
Intermedia	126 (17-790)	40 (23-223)	452 (129-2278)	85 (5-292)		
Final	41 (24-124)	38 (29-49)	36 (24-123)	74 (38-112)	26 (20-123)	0-25
<b>3-Hidroxibutírico</b>						
Inicial	10 (5-797)	5 (1-1232)	5 (0-275)	8 (0-158)		
Intermedia	8 (1-75)	7 (2-164)	5 (2-79)	6 (2-107)		
Final	6 (0-63)	7 (0-8)	3 (0-20)	5 (0-42)	4 (0-16)	0-3
<b>Dicarbóxílicos¶</b>						
Inicial	10 (0-177)	12 (0-456)	7 (0-158)	94 (6-712)		
Intermedia	2 (0-142)	5 (2-39)	5 (1-19)	18 (1-327)		
Final	2 (0-9)	2 (0-9)	4 (1-28)	1 (0-26)	4 (0-15)	0-16
<b>Etilmalónico</b>						
Inicial	1 (0-2)	1 (0-4)	1 (0-10)	2 (0-10)		
Intermedia	0 (0-1)	1 (0-3)	1 (0-2)	2 (1-34)		
Final	1 (0-2)	0 (0-2)	1 (0-3)	1 (0-1)	0 (0-3)	0-7
<b>4-Hidroxifenil-láctico</b>						
Inicial	17 (1-151)	19 (0-127)	3 (0-73)	21 (0-144)		
Intermedia	3 (0-150)	6 (0-157)	7 (0-54)	10 (0-131)		
Final	1 (0-6)	0 (0-7)	0 (0-6)	3 (0-18)	2 (0-15)	<2
<b>Benzoico</b>						
Inicial	0 (0-1)	0 (0-10)	2 (0-65)	0 (0-5)		
Intermedia	0 (0-1)	0 (0-10)	1 (0-8)	1 (0-3)		
Final	0 (0-1)	0 (0-1)	1 (0-9)	0 (0-2)	6 (1-16)	NR

Tabla 2 Continua

Ácidos orgánicos seleccionados y tiempo de toma de muestra †	Marasmo	Kwashiorkor	Kwashiorkor-marasmático	Sugar babies	Controles normales	Valores normales en niños Norteamericanos II
<b>Fumárico</b>						
Inicial	3 (1-51)	4 (1-7)	3 (1-47)	12 (1-95)		
Intermedia	4 (1-20)	2 (1-28)	3 (1-30)	4 (1-98)		
Final	4 (1-23)	2 (1-5)	2 (2-6)	5 (2-13)	3 (1-26)	<2
<b>Succínico</b>						
Inicial	12 (0-541)	12 (2-122)	9 (2-306)	44 (0-313)		
Intermedia	84 (3-290)	37 (0-431)	9 (0-217)	32 (0-244)		
Final	133 (15-349)	41 (0-328)	10 (5-183)	109 (6-203)	2 (1-36)	NR
<b>4-Hidroxifenilacético</b>						
Inicial	18 (1-85)	9 (2-306)	29 (1-458)	13 (1-95)		
Intermedia	29 (2-79)	9 (0-217)	19 (4-136)	11 (0-140)		
Final	7 (3-23)	10 (5-183)	18 (6-21)	34 (1-166)	7 (2-75)	6-28

\* Los resultados están expresados como mmol / mol creatinina.

† Para observar los valores individuales, referirse a las figuras 1-3.

‡ Las muestras iniciales fueron colectadas antes de iniciar ingesta proteica. Las muestras intermedias fueron colectadas entre el 5° y 20° día del estudio, una vez que la alimentación oral se había iniciado y las muestras finales fueron colectadas al momento del egreso, cuando el déficit de peso para la talla era menor al 14%.

|| Referencia 2. Únicamente los valores mínimo y máximo fueron reportados. N.R. No reportado.

¶ Ácidos dicarboxílicos suma de adipico, subérico y sebácico.

Las figuras 3 a 12 muestran las concentraciones individuales para cada ácido orgánico en las diferentes momentos de estudio de los todos los pacientes. Cabe destacar como puede observarse en dichas gráficas que en la mayoría de los ácidos orgánicos hubo individuos cuyas concentraciones se encuentran claramente por arriba de las obtenidas al momento del egreso.

La tabla 3 muestra la frecuencia de incremento en la excreción de los ácidos orgánicos en cada grupo estudiado, se puede apreciar una gran heterogeneidad en cuanto a las anormalidades presentes, así como la carencia de asociación de un patrón de excreción urinaria de ácidos orgánicos con un tipo clínico particular de DEP. Los ácidos que más frecuentemente se encontraron elevados fueron el láctico y 4-hidroxifenil-láctico (figuras 7 y 8), los de menor frecuencia fueron succinato, 4-hidroxifenilacetato y benzoato (figuras 10-12).

Existen sorprendentes diferencias en relación al tiempo de la excreción máxima de ácidos orgánicos, la mayoría de las anormalidades estuvieron presentes al ingreso, por ejemplo, fue desde el momento de la admisión al hospital, cuando los pacientes estaban en ayuno, cuando la excreción de ácidos dicarboxílicos fue mayor (tabla 3 figura 5). Por otro lado en la mayoría de los casos en los que se observó incremento del 2-metilcítrico y especialmente del metilmalónico, no fue en la muestra inicial sino hasta varios días después, cuando los pacientes ya habían empezado a recibir proteínas (tabla 3 figuras 3 y 4).

**Tabla 3** Número de niños con excreción anormal\* de ácidos orgánicos seleccionados, a diferentes tiempos de el estudio

Ácidos orgánicos seleccionados	En la muestra inicial †	Únicamente en la muestra intermedia‡	Total	Porcentaje (%) (n = 39)
2-Metilcitrónico	4	6	10	25.6
Metilmalónico	1	5	6	15.4
Láctico	20	7	27	69.2
3-Hidroxibutírico	7	3	10	25.6
Dicarboxílicos   (con 3-Hidroxibutírico normal o normal bajo)	11	1	12	30.8
Etilmalónico	4	1	5	12.8
4-Hidroxifenil-láctico	17	2	19	48.7
Benzoico	2		2	5.1
Fumárico	4	2	6	15.4
Succínico	1	1	2	5.1
4-Hidroxifenilacético	2		2	5.1

\* Excreción anormal definida como aquellos valores por arriba del más alto observado al momento del egreso, cuando el déficit de peso para la talla era menor al 14%. Para observar los valores individuales, referirse a las figuras 1-3.

† Las muestras iniciales fueron colectadas antes de iniciar ingesta proteica. Algunos de estos niños presentaron anomalías también en la muestra intermedia.

‡ Las muestras intermedias fueron colectadas entre el 5º y 20º día del estudio, una vez que la alimentación oral se había iniciado

|| Ácidos dicarboxílicos suma de adípico, subérico y sebácico.

Idealmente los resultados deberían ser expresados en términos de colección de orina de 24 horas. En la práctica estas muestras son difíciles de obtener en niños severamente desnutridos, debido a que frecuentemente presentan dermatitis en la región perianal, especialmente al momento de la admisión. En este trabajo, usamos muestras de orina al azar y expresamos los resultados en términos del contenido de creatinina en la muestra para corregir la concentración variable de las orinas (16,20,27).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las cuatro variedades clínicas de desnutrición para la excreción de ningún ácido orgánico. Se analizaron comparativamente los resultados en los diferentes momentos del estudio (Kruskal-Wallis  $p < 0.05$ ).

A pesar de que existe una tendencia de una concentración baja de creatinina en la muestra inicial e intermedia comparada con las muestras finales, varios ácidos diferentes (2-metilcitrato, fumarato, 3-hidroxi butirato, etilmalonato, 4-hidroxifenilacetato y benzoato), no mostraron diferencias estadísticamente significativas por creatinina en los tres diferentes períodos de colección.

En los ácidos: metilmalonato, succinato, las concentraciones en la muestra inicial son estadísticamente diferentes de las concentraciones en la muestra final.

En cuanto a el lactato, 4-hidroxifenil-lactato y dicarboxílicos, sus concentraciones tanto de la muestra inicial como la intermedia difieren estadísticamente de las concentraciones de la muestra final.

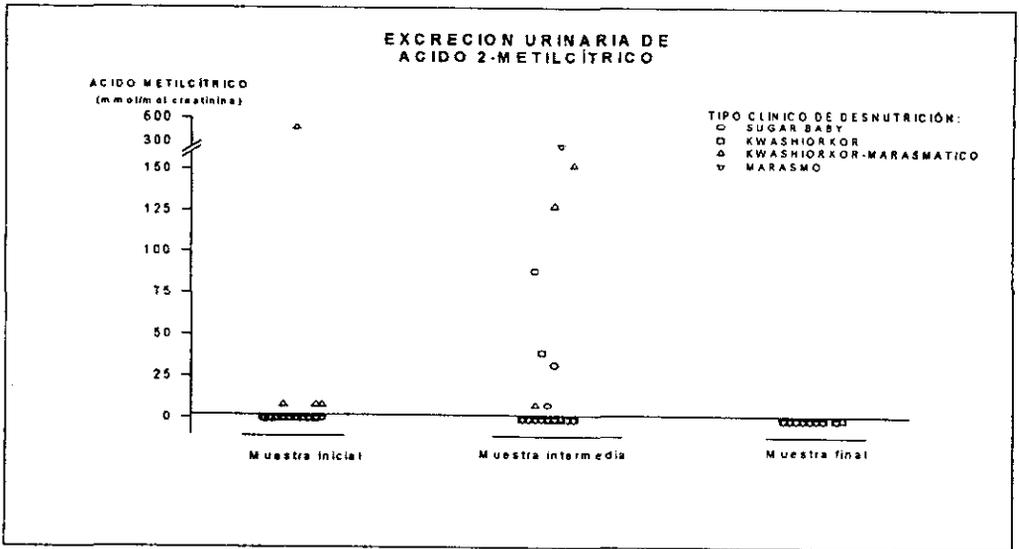


Figura 3. Concentración urinaria de ácido 2-metilcitríco en niños con DEP en la muestra inicial (ingreso); intermedia (entre el día 5-20) y final (egreso).

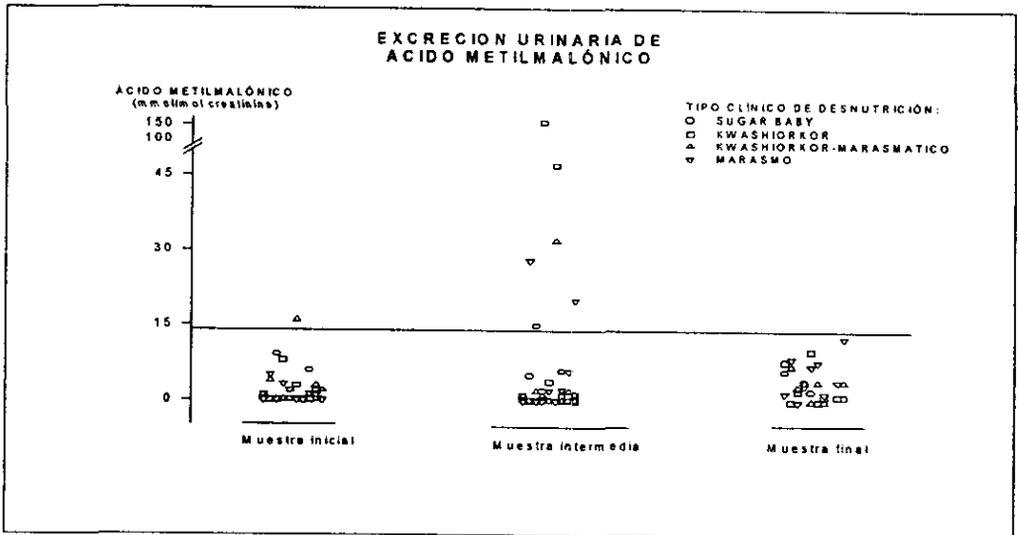


Figura 4. Concentración urinaria de ácido metilmalónico en niños con DEP en la muestra inicial (ingreso); intermedia (entre el día 5-20) y final (egreso).

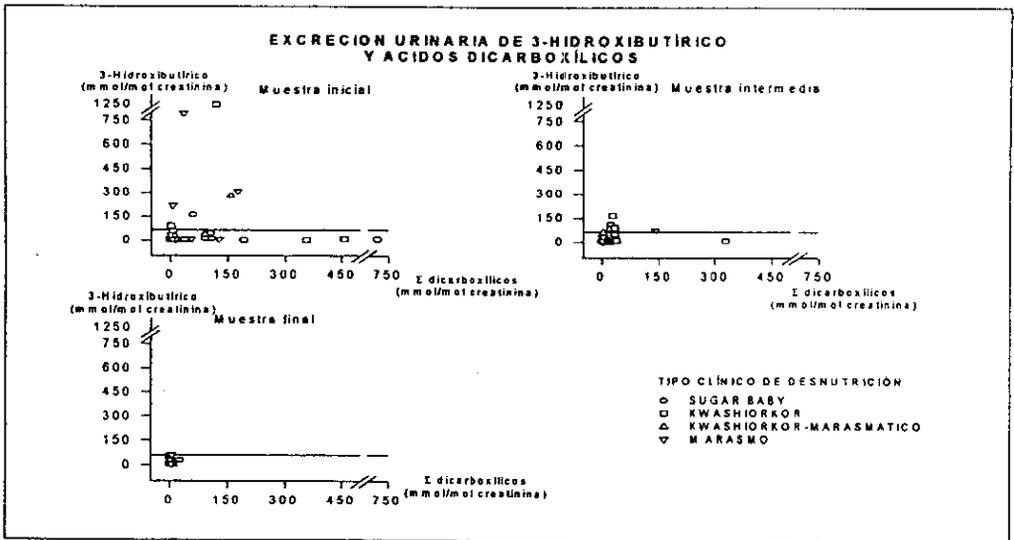


Figura 5. Concentración urinaria de de 3-hidroxitubúrico versus suma ácidos dicarboxílicos (adípico, subérico, sebácico) en niños con DEP en la muestra inicial (ingreso); intermedia (entre el día 5-20) y final (egreso).

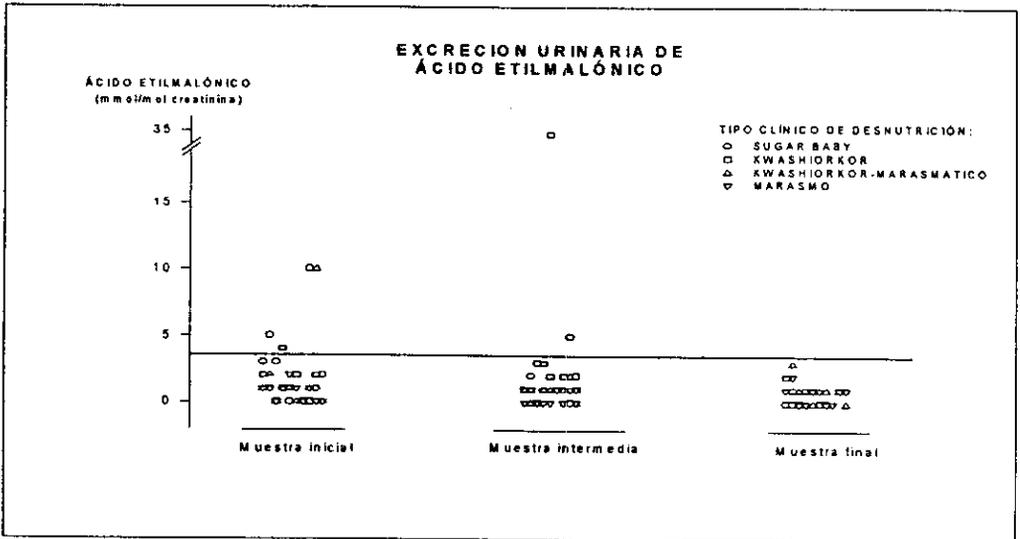


Figura 6. Concentración urinaria de ácido etilmalónico en niños con DEP en la muestra inicial (ingreso); intermedia (entre el día 5-20) y final (egreso).

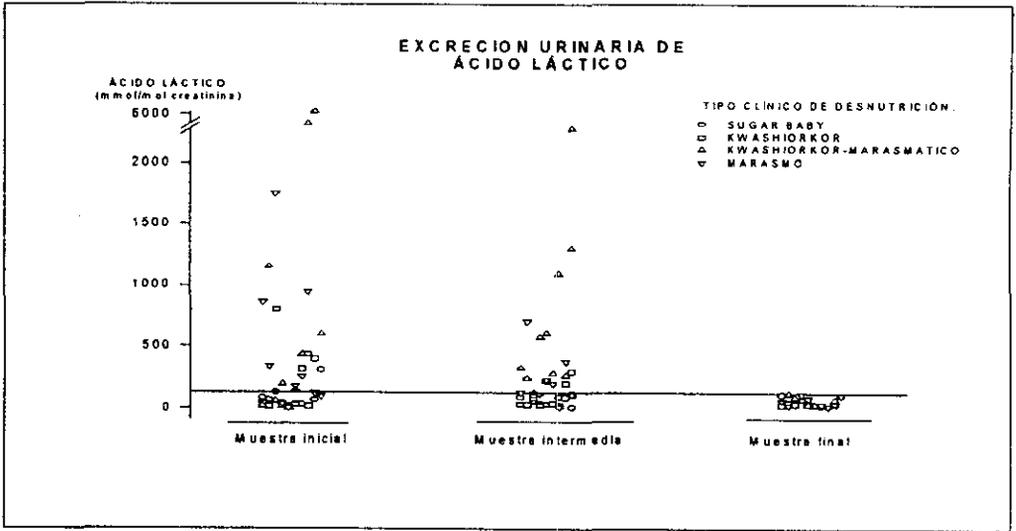


Figura 7. Concentración urinaria de ácido láctico en niños con DEP en la muestra inicial (ingreso); intermedia (entre el día 5-20) y final (egreso).

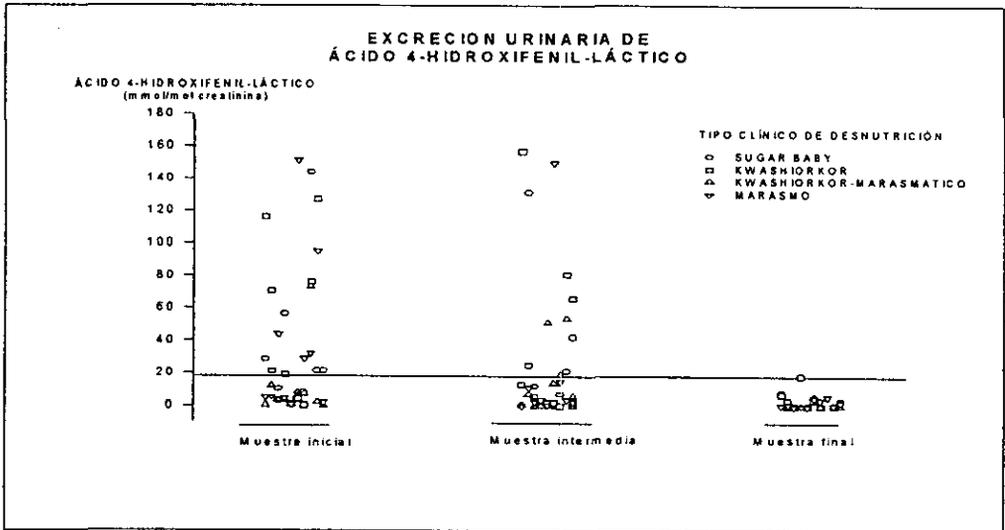


Figura 8. Concentración urinaria de ácido 4-hidroxifenil-láctico en niños con DEP en la muestra inicial (ingreso); intermedia (entre el día 5-20) y final (egreso).

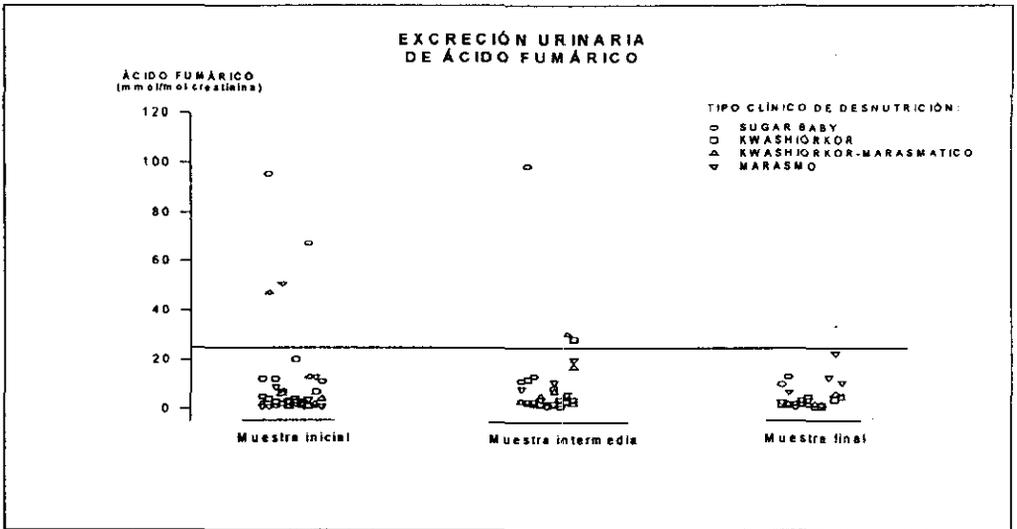


Figura 9. Concentración urinaria de ácido fumárico en niños con DEP en la muestra inicial (ingreso); intermedia (entre el día 5-20) y final (egreso).

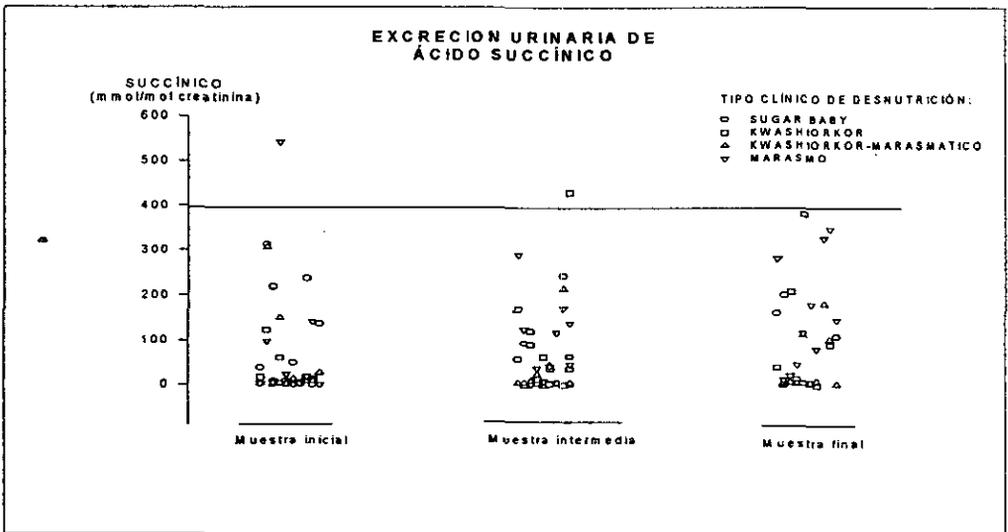


Figura 10. Concentración urinaria de ácido succínico en niños con DEP en la muestra inicial (ingreso); intermedia (entre el día 5-20) y final (egreso).

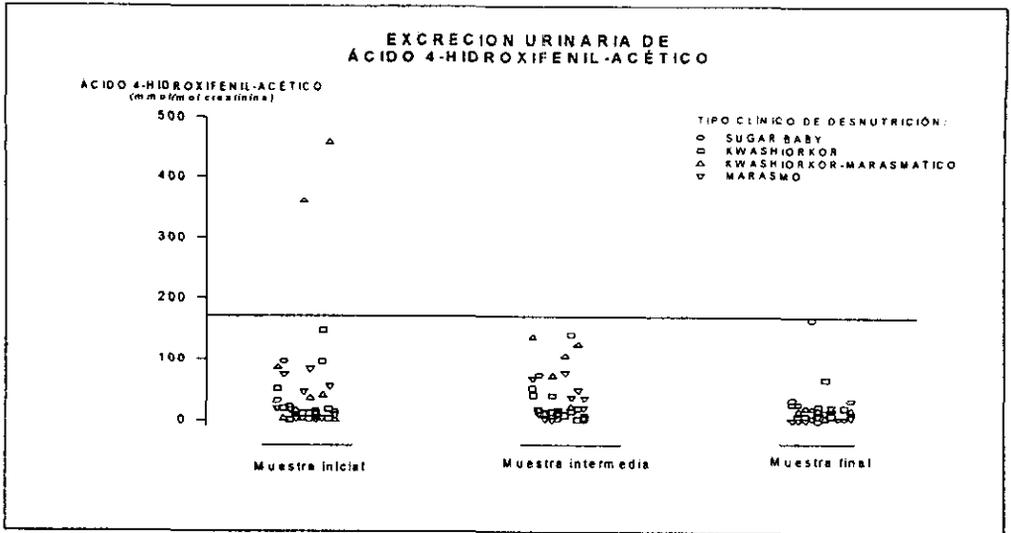


Figura 11. Concentración urinaria de ácido 4-hidroxifenilacético en niños con DEP en la muestra inicial (ingreso); intermedia (entre el día 5-20) y final (egreso).

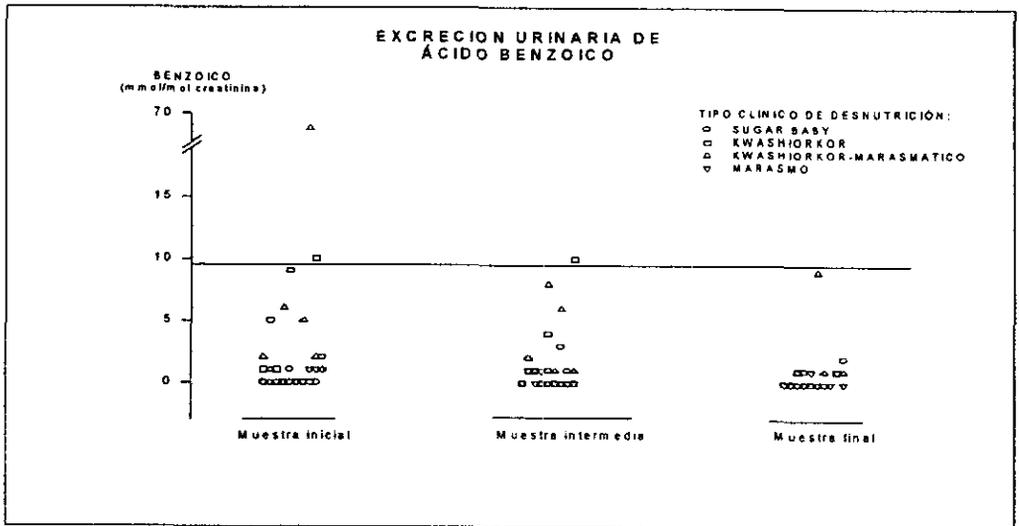


Figura 12. Concentración urinaria de ácido benzoico en niños con DEP en la muestra inicial (ingreso); intermedia (entre el día 5-20) y final (egreso).

## 8. DISCUSIÓN

El presente estudio muestra que la mayoría de los niños gravemente desnutridos presentan acidurias orgánicas. Estas usualmente desaparecen en la muestra final cuando los pacientes se recuperan nutrimentalmente, sin embargo, algunos de estos valores finales continúan siendo más altos que nuestros valores normales (tabla 2), o los publicados por otros (27), probablemente esto refleje una recuperación metabólica incompleta en algunos pacientes al momento del egreso (60). La gran diversidad de anomalías presentes en cada paciente así como la carencia de asociación a un patrón de excreción con el tipo clínico de DEP, concuerda con la naturaleza multifactorial y heterogénea de este padecimiento.

Algunos de los ácidos orgánicos excretados anómalamente son muy probablemente endógenos, debido a que ellos son encontrados principalmente como intermediarios (o como sus derivados) de vías metabólicas, acumulándose y excretándose durante bloqueos de estas vías. Otros son productos típicos de metabolismo bacterial.

Los siguientes compuestos pueden ser considerados como marcadores de deficiencias enzimáticas específicas, basados en estudios de acidurias orgánicas genéticas (1): 2-metilcitrónico es específicamente excretado cuando la propionil-CoA carboxilasa está deficiente, metilmalónico es excretado en grandes cantidades durante la deficiencia de metilmalonil-CoA mutasa –ambos en la vía del propionato (55), y los ácidos dicarboxílicos (adípico, subérico y sebácico), cuando son acompañados con niveles bajos o normales de 3-hidroxi-butírico, son indicativos de bloqueos en la  $\beta$ -oxidación mitocondrial de ácidos grasos (53).

La frecuencia de elevación en nuestra muestra fue 15.4% para el metilmalónico, 25.6% para el 2-metilcitrónico y 30.8% para los ácidos dicarboxílicos (tabla 3, figuras 3-5). De este modo, cerca de la mitad de los niños desnutridos tuvieron evidencia de bloqueos en las vías del propionato y  $\beta$ -oxidación. Cinco pacientes (12.8%: SB3, SB6, K4, K6, 2M) tuvieron excreción elevada tanto de dicarboxílicos como de metilmalónico y/o 2-metilcitrónico, indicando que tuvieron bloqueos simultáneos en las vías del propionato y  $\beta$ -oxidación. La implicación diagnóstica de estos resultados es que bloqueos en las vías del propionato y  $\beta$ -oxidación pueden detectarse en pacientes con desnutrición severa a través del estudio de orina, una muestra no invasiva y fácil de obtener.

Varios pasos en estas dos vías requieren cofactores, que por sí mismos o sus precursores, son vitaminas: adenosil cobalamina para metilmalonil-CoA mutasa, biotina para propionil-CoA carboxilasa, riboflavina, niacina y carnitina para varias de las enzimas involucradas en la  $\beta$ -oxidación (39). La elevada excreción de etilmalónico que nosotros observamos en cinco pacientes (tabla 3), ha sido reportada en deficiencia de riboflavina (62-64) y en deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta, un defecto de la  $\beta$ -oxidación (65). Puesto que en individuos con DEP las deficiencias vitamínicas ocurren frecuentemente, éstas pueden haber causado bloqueos metabólicos resultando en las acidurias orgánicas observadas. Ciertamente, existen reportes de excreción anormal de ácidos orgánicos urinarios en deficiencias aisladas de algunas de estas vitaminas (6-12, 62-64, 66). Por consiguiente nuestros hallazgos en DEP pueden representar fenocopias nutricionales de algunos errores innatos del metabolismo (48).

En el caso de la supuesta deficiencia de biotina, nosotros no detectamos 3-hidroxiisovalerico ni 3-metilcrotonilglicina (producto de degradación de leucina) en nuestras muestras. Estos compuestos pudieron haber estado presentes pero no haber sido detectados, debido al límite de sensibilidad del procedimiento que utilizamos. Alternativamente la privación de proteína (y con ello la leucina) en desnutridos, pudo haber reducido esas dos acidurias orgánicas, aun si hubiese habido una deficiencia de la carboxilasa dependiente de biotina que participa en el catabolismo de leucina (3-metilcrotonil-CoA carboxilasa) (60).

Existen sorprendentes diferencias entre las vías de la  $\beta$ -oxidación y propionato en relación al tiempo de la excreción máxima de ácidos orgánicos. Fue desde el momento de la admisión al hospital, cuando los pacientes estaban en ayuno, cuando la excreción de ácidos dicarboxílicos fue mayor (tabla 3 figura 5). La movilización de los ácidos grasos libres, sustratos de la  $\beta$ -oxidación, se incrementa en esta condición (67). Si no pueden ser  $\beta$ -oxidados, una proporción significativa de ellos será  $\omega$ -oxidados, resultando en un incremento de ácidos dicarboxílicos de cadena media (2). En efecto, un bloqueo casi completo en la  $\beta$ -oxidación en niños severamente desnutridos ha sido postulado como la posible causa de episodios de hipoglucemia (69).

Por otro lado en la mayoría de los casos en los que se observó elevación del el 2-metilcitríco y especialmente del metilmalónico, no fue en la muestra inicial sino hasta varios días después, cuando los pacientes ya habían empezado a recibir proteínas (tabla 3 figuras 3 y 5). Puesto que la mayoría de los sustratos de la vía del propionato son de origen dietético (55), su disponibilidad pudo haber estado limitada en el momento de la admisión, cuando los pacientes fueron evaluados por primera vez. Esta observación puede tener implicaciones muy importantes, indicando una acumulación de compuestos tóxicos (intermediarios acil-CoA)(61) como resultado de la ingestión de sustratos que los desnutridos no puedan metabolizar, por las deficiencias de biotina y/o vitamina B12. Este mecanismo podría contribuir al bien conocido pero pobremente comprendido agravamiento de los niños desnutridos, cuando son abundantemente realimentados (67).

El incremento de otros ácidos orgánicos urinarios es menos específico: láctico, 3-hidroxi-butírico, fumárico, succínico, 4-hidroxifenilacetico o benzoico probablemente no reflejen el estado de desnutrición pero más bien son resultado de enfermedad aguda (deshidratación, ayuno, infección) usualmente asociados con DEP. (39). Sería interesante ver en un estudio futuro otro grupo de niños que sufren de estos problemas clínicos, para determinar cuales anomalías de las observadas son específicas de la DEP.

Los bloqueos metabólicos también pueden resultar de toxinas exógenas tales como hipoglicina, un tóxico extraído de la planta del ackee, responsable de la enfermedad del vómito jamaicano, una enfermedad letal resulta en severa hipoglucemia, acidosis y una aciduria orgánica compleja (14). En el caso de nuestros pacientes no existen antecedentes que sugieran de este tipo de bloqueos metabólicos tóxicos.

Si bien este estudio se refiere a desnutrición primaria, sus conclusiones pueden ser aplicadas a pacientes con desnutrición secundaria (71-73), por ejemplo, por enfermedad celiaca (74). De esta manera, el análisis de los ácidos orgánicos urinarios por CGEM, representa una herramienta novedosa, eficiente y no invasiva para el estudio de desórdenes nutricionales. Cabe además la posibilidad de que en algunos desnutridos, uno de los pasos limitantes en su homeostasis nutricional esté dado por la deficiencia de estas vitaminas, lo que tendría implicaciones terapéuticas

## 9 BIBLIOGRAFÍA

1. Sweetman L. 1984 Qualitative and Quantitative Analysis of Organic Acids in Fluids for Diagnosis of the Organic Acidurias In: Nyhan WL, ed. Abnormalities in amino acid metabolism in clinical medicine. Appleton-Century-Crofts, Norwalk pp 419-53
2. Lehotay DC, Clarke JTR. 1995 Organic acidurias and related abnormalities. *Crit Rev Clin Lab Sci* 32(4):377-429
3. Brandt NJ. 1984 Symptoms and signs in organic acidurias. *J Inher Metab Dis* 7 Suppl 1: 23-27
4. Ozand PT, Gascon GG. 1991 Organic acidurias: a review. Part I. *J Child Neurol* 6: 196-214
5. Duran M, Dorland L, Bruinvis L, Ketting D, van Sprang F. J. 1991 Organic Acidurias In: Schaub J, Van Hoof F, Vis HL. eds. *Inborn Errors of Metabolism*. edited by Nestlé Nutrition Workshop Series vol 24. Raven Press, New York, pp 93-108
6. Cardinale GJ, Dreyfus PM, Auld P Abeles, RH 1969 Experimental vitamin B<sub>12</sub> deficiency: Its effects on tissue vitamin B<sub>12</sub> -coenzyme levels and on the metabolism of methylmalonyl-Coa. *Arch Biochem Biophys* 131:92-99
7. Stabler SP, Marcell PD, Podell ER, Allen RH, Lindenbaum J 1986 Assay of methylmalonic acids in the serum of patients with cobalamin deficiency using capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J Clin Invest* 77:1606-1612
8. Matchar DB, Feussner JR, Millington DS, Wilkinson RH Jr, Watson DJ, Gale D 1987 Isotope-dilution assay for urinary methylmalonic acid in the diagnosis of vitamin B<sub>12</sub> deficiency. A prospective clinical evaluation. *Ann Int Med* 106(5):707-710
9. Norman EJ 1987 New urinary methylmalonic acid test is a sensitive indicator of cobalamin (vitamin B<sub>12</sub>) deficiency: a solution for a major unrecognized medical problem. *J Lab Clin Med* 110:369-370
10. Specker BL, Miller D, Norman EJ, Greene H, Hayes KC 1988 Increased urinary methylmalonic acid excretion in breast-fed infants of vegetarian mothers and identification of an acceptable dietary source of vitamin B-12. *Am J Clin Nutr* 47:89-92
11. Rasmussen K, Moelby L, Jensen MK 1989 Studies on methylmalonic acid in human II. Relationship between concentrations in serum and urinary excretion, and the correlation between serum cobalamin and accumulation of methylmalonic acid. *Clin Chem* 35(12):2277-2280

12. Geypens B, Ghooos Y, Hiele M, Rutgeerts P, Vantrappen G, Joosten E, Pelemans W 1991 Determination of urinary methylmalonic acid in urine by gas chromatography with an ion-trap detector, chemical ionization and isotope dilution. *Anal Chim Acta* 247:243-248
13. Tanaka K, Kean E A, Johnson B. 1976 Jamaican vomiting sickness *N Engl J Med* 295:461-467
14. Tanaka K, Rosemberg LE 1983 Disorders of branched chain amino acid and organic acid metabolism. In Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS, Goldstein JL, and Brown MS, eds. *The metabolic basis of inherited disease*. McGraw-Hill Inc, New York, pp 448-449
15. Chalmers RA, Lawson AM, Whitelaw A, Purkiss P. 1979 Measurement of 4-hydroxyphenylacetic aciduria as a screening test for small bowel disease. *Clin Chem* 25: 1791
16. Chalmers RA, Lawson AM 1982 *Organic acids in man* Chapman and Hall, New York
17. Nau H, Biemann K. 1974 Computer-assisted assignment of retention indices in gas chromatography-mass spectrometry and its applications to mixtures of biological origin. *Anal Chem* 46(3):426-34
18. Tanaka K, Hine DG, West-Dull A, Lynn TB. 1980 Gas-chromatography method of analysis for urinary organic acids. I. Retention indices of 155 metabolically important compounds. *Clin Chem* 26(13):1839-1845
19. Tanaka K, West-Dull A, Hine DG, Lynn TB, Lowe T. 1980 Gas-chromatography method of analysis for urinary organic acids. II. Description of the procedure, and its applications to diagnosis of patients with organica acidurias. *Clin Chem* 26(13):1847-53
20. Goodman SI, Markey SP 1981. *Diagnosis of organic acidemias by gas chromatography-mass spectrometry*. Alan R Liss Inc., New york
21. Meier-Augenstein W, Hoffmann GF, Holmes B, Nyhan WL, Sweetman L. 1993 Use of thick-film capillary column for the analysis of organic acids in body fluids. *J Chromatogr B* 615:127-135
22. Gleispach H, Leis H-J, Windischhofer W. 1994 Applications of gas chromatography-mass spectrometry in clinical chemistry. *J Chromatogr A*;665:155-162
23. Deyl Z, Hyaneek J, Horakova M. 1986 Profiling of amino acid in body fluids and tissues by means of liquid chromatography. *J Chromatogr* 374: 177-250

24. Amberg S, McClure WB. 1917 The occurrence of citric acid in urine. *Am J Physiol* 44:453-458
25. Gamble W, Orten JM, Smith AH. 1961 Citric acid cycle in certain alterations of acid base balance in human subjects. *J Appl Physiol* 16:593-599
26. Tanaka K, Budd MA, Efron ML, Isselbacher KJ. 1966 Isovaleric acidemia: a new genetic defect of leucine metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 56:236-242
27. Sweetman L. 1991 Organic acids analysis. In: Hommes FA ed. *Techniques in diagnostic human biochemical genetics*. Wiley-Liss, New York pp 143-176
28. Jellum E, Stokke O, Eldjarn L. 1972 Combined use of gas chromatography, mass spectrometry, and computer in diagnosis and studies of metabolic disorders. *Clin Chem* 18(8):800-809
29. Gates SC, Dendramis N, Sweeley CC. 1978. Automated metabolic profiling of organic acid in human urine I Description of Methods. *Clin Chem* 24: 1674-1679
30. Gates SC, Sweeley C, Krivit W, DeWitt D, Blaisdell E. 1978 Automated metabolic profiling of organic acids in human urine. II: analysis of urine samples from "heatly" adults, sick children, and children with neuroblastoma. *Clin Chem* 24(10):1680-1689
31. Fitch WL, Anderson PJ, Smith D. 1979 Isolation, identification and quantitation of urinary organic acids. *J Chromatogr* 162:249-259
32. Shoemaker JD, Elliott WH. 1991 Automated screening of urine samples for carbohydrates, organic and amino acids after treatment with urease. *J Chromatogr* 562:125-138
33. Liebich HM. 1990 Sample preparation for organic acids in biological fluids. *Anal Chim Acta*;236:121-130
34. Liebich HM. 1990 Basic profiles of organic acids in urine. *J Chromatogr Biom Appl*;525:1-14
35. Hoffmann G, Aramakis, Blum-Hoffmann E, Nyhan WL, Sweetman L. 1989 Quantitative analysis for organic acids in biological samples: batch isolation folowed by gas chromatographic-mass spectrometry analysis. *Clin Chem* 35: 587-595
36. Bengtsson IM, Lehotay DC. 1996 Sample preparation with an automated robotic workstation for organic acid analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B* 685:1-7
37. Duez P, Kumps A, Mardens Y. 1996 CG-MS profiling of urinary organic acids evaluated as a quantitative method. *Clin Chem* 42(10):1609-1615

38. Cherchi A, Spanedda L, Tuberoso C, Cabras Paolo. 1994 Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatographic determination of organic acids in honey. *J Chromatogr A* 669:59-64
39. Ramos-Galván R 1975 Pediatric somatometry (Somatometría Pediátrica). *Arch Invest Med* 6(suppl):83-396 (in Spanish)
40. Alleyne GAO, Hay RH, Picou DI, Sonfiel JP, Whitehead RG. 1977 Protein-energy malnutrition. Edwar Arnoi Publishers,. London
41. Gómez F, Ramos-Galván R, Cravioto J. 1950 Estudios sobre el niño desnutrido. VIII El síndrome de recuperación nutricional. *Bol Hosp Inf Mex* 7:569-593
42. Waterlow JL. 1972 Classification and definition of protein energy malnutrition. *Br Med J* 3:566-569
43. Platt BS 1947 Colonial nutrition and its problems. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 40:379-398
44. Wellcome Trust Working Party 1970 Classification of infantile malnutrition. *Lancet* 2:302-303
45. Bhattacharyya AK. 1986 Protein-energy malnutrition (Kwashiorkor-marasmus syndrom) terminology, classification and evolution. *Wld Rev Nutr Diet* 47:80-133
46. Rosemberg LE. 1973 Vitamin -dependent genetic disease. In: McKusick VA, Claiborne R eds. *Medical Genetics*. HP Publishing New York pp73
47. Wolf B. 1995 Disorders of biotin metabolism. In: Scriber CR, Beaudet AL, Sly Ws, Valle D eds. *The metabolic basis if inherited disease*. McGraw-Hill, New York pp 3151
48. Velázquez A 1997 Biotin deficiency in protein - energy malnutrition: implications for nutritional homeostasis and individuality. *Nutrition* 13 (11 / 12): in press
49. Rosenberg LE 1973 Vitamin-dependen genetic disease. In: McKusick VA, Clairborne R, (eds). *Medical genetics* New York: HP Publishing
50. Mitchel M. 1978 Carnitine metabolism in human subjets I. Normal metabolism. *Am J Clin Nutr* 31:293-306
51. Bremer J. Carnitine metabolism and functions. 1983 *Physiol Rev* 63:1428-1480
52. Coombs GF 1992 *The vitamins fundamental aspects in nutrition and health*. Academic Press Inc, San Diego
53. Stanley CA 1995 Disorders of Fatty Acid Oxidation In: Fernandes J. Saudubray JM, Van den Berghe eds. *Inborn Metabolic Diseases Diagnosis and treatment* Springer, Berlin, pp 133-143
54. Gompertz D, Storrs CN, Bau DCK, Peters TJ, Hughes EA. 1970 Localization of enzyme defect in propionic acidemia. *Lancet* 1:1140

55. Fenton WA, Rossenberg LE 1995. Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. In: Scriber CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D eds. The metabolic basis of inherited disease. McGraw-Hill, New York 1423-1449
56. Ogier H, Charpentier C, Saudubray M. 1990 Organic acidemias. In: Fernandes J, Saudubray JM, Tada K eds. Inborn metabolic diseases: diagnosis and treatment Berlin: Springer:276-278
57. Baug CM, Malone JH, Butterworth CE. 1968 Human biotin deficiency. *A J Clin Nutr* 21:173-182
58. Sydentricker VP, Singal SA, Briggs AP, Devaugnn NM, Isbell H. 1942 Observations on the "egg white injury" in man and its cure with biotin concentrate *JAMA* 118: 1199
59. Sweetman L, Surh L, Baker H, Peterson RM, Nyhan WL. 1981 Clinical and metabolic abnormalities in a boy with dietary deficiency of biotin. *Pediatric* 68:553
60. Mock DM, Baswell DL, Baker H, Holman RT, Sweetman L 1985 Biotin deficiency complicating parenteral alimentation: diagnosis, metabolic repercussions, and treatment. *Ann NY Acad Sci* 447:314-333
61. Wendel U, Eißler A, Sperl W, Schadewaldt P 1995 On the differences between urinary metabolite excretion and odd-numbered fatty acid production in propionic and methylmalonic acidemias. *J Inher Metab Dis* 18:584-91
62. Veitch K, Draye JP, Vameq J, Causey AG, Bartlett K, Sherratt HSA, Van Hoof F 1989 Altered acyl-CoA metabolism in riboflavin deficiency *Biochem Biophys Acta* 1006:335-343
63. Draye JP, Veitch K Vamecq, Van Hoof F 1988 Comparison of the metabolism of dodecanedioic acid in vivo in control, riboflavin-deficient and clofibrate-treated rats. *Eur J Biochem* 178:183-189
64. Goodman SI 1981 Organic aciduria in the riboflavin-deficient rat. *Am J Clin Nutr* 34:2434-2437
65. Roe ChR, Coates PM 1995 Mitochondrial fatty acid oxidation disorders. In: Scriber CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. eds. The metabolic basis of inherited disease. McGraw-Hill, New York pp 1523
66. Mock NL, Malik MI, Stumbo PJ, Bishop WP, Mock DM 1997 Increased urinary excretion of 3-hydroxyisovaleric acid and decreased urinary excretion of biotin are sensitive early indicators of decreased biotin status in experimental biotin deficiency. *Am J Clin Nutr* 65:951-958
67. Waterlow JC 1994 Childhood malnutrition in developing nations: Looking back and looking forward. *Ann Rev Nutr* 14:1-19

68. Newsholme EA, Leech AR 1983 *Biochemistry for Medical Sciences*. John Wiley and Sons, United Kingdom pp 537
69. Bennish ML, Azad AK, Rahman O, Phillips RE 1990 Hypoglycemia during diarrhea in childhood. *N EN J Med* 332:1357-1363
70. Pettersen JE, Jellum E, Eldajarn L 1972 The Occurrence of adipic and suberic acid in urine from ketotic patients. *Clin Chim Acta* 38:17-24
71. Bennett MJ, Wienberger MJ, Sherwood WG, Burlina AB. 1994 Secondary 3-hydroxidicarboxylic aciduria mimicking long-chain L-3hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inher Metab Dis* 17:283-286
72. Bergoffen J, Kaplan P, Hale DE, Bennett MJ, Berry GT. 1993 Marked elevation of urinary 3-hydroxydecanedioic acid in a malnourished infant with glycogen storage disease, mimicking long-chain L-3hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inher Metab Dis* 16:851-856
73. Costa CG, Verhoeven NM, Kneepkens CMF, Douwes AC, Wanders RJA, Tavares de Almeida I, Duran M, Jakobs C. 1996 Organic acid profiles resembling a  $\beta$ -oxidation defect in two patients with coeliac disease. *J Inher Metab Dis* 19:177-180
74. Largillière C, Fontaine M, Marrakchi S, Boisin-Taboreau O 1993 Pseudo-glutaric aciduria type II in a patient with celiac disease. *J Pediatr* 122:504
75. Aramaky S, Lehotay D, Nyhan W. L, MacLeod P.M. Sweetman L. 1989 Methylcitrate in maternal urine during a pregnancy with a fetus affected with propionic acidaemia. *J Inher Metab Dis* 12:86-88
76. Harkness RA, Purkiss P, Duffy S, Chalmers RA, Jones M. 1988 The effects of fetal energy depletion on amniotic fluid concentrations of amino acids, organic acids and related metabolites. *J Inher Metab Dis* 11:103-113
77. Hoffmann G, Sweetman L. 1991 O-(2,3,4,5,6-Pentafluorobenzyl)oxime-trimethylsilyl esters derivatives for sensitive identification and quantitation of aldehydes, ketones, and oxoacids in biological fluids. *Clin Chim Acta* 199:237-242
78. Hoffmann GF, Seppel CK, Holmes B, Christen HJ, Hanefeld F, Nyhan WL. 1993 Quantitative organic acid analysis in cerebrospinal fluid and plasma: reference values in pediatric population. *J Chromatogr B* 617:1-10
79. Hoffmann GF, Sweetman L. 1990 An improved chemical ionization assay for mevalonic acid. *Biomed Environ Mass Spectrom* 19:517-519
80. Hogginbottom MG, Sweetman L, Nyhan WL. 1978 A syndrome of methylmalonic aciduria, homocystinuria, megaloblastic anemia and neurologic abnormalities in vitamin B12 deficient breast-fed infant of a strict vegetarian. *N Engl J Med* 299:317-323

81. Jakobs C, Dorland L, Sweetman L, Duran M, Nyhan WL, Wadman SK. 1984 Identification of methyl-branched chain dicarboxylic acids in amniotic fluid and urine in propionic and methylmalonic acidemia. *Pediatric Research* 18(11):1185-1191
82. Jakobs C, Ten Brink HJ, Stellaard F. 1990 Prenatal diagnosis of inherited metabolic disorders by quantitation of characteristic metabolites in amniotic fluid: facts and future. *Prenatal Diagnosis* 10:264-271
83. Jeliffe B 1968. Protein-energy malnutrition (Desnutrición energético-proteínica.) Geneva: World Health Organization, (in Spanish). (Monographic series) 53:10-101
84. Kay MA, O'Brien W, Kessler B, McVie R, McCabe ERB. 1990 Transient organic and methemoglobinemia with acute gastroenteritis. *Pediatrics* 85(4):589-590
85. Landaas S. 1974 Increased urinary excretion of 3-hydroxyvaleric acid in patients with ketoacidosis. *Clin Chim Acta* 54:39-46
86. Mannaerts GP, Van Veldhoven P 1991 Fatty acid oxidation: general overview. In: Schaub J, Van Hoof F, Vis HL. eds. *Inborn Errors of Metabolism*. edited by . Nestlé Nutrition Workshop Series vol 24. Raven Press, New York, pp 1-18
87. Matsumoto I, Kuhara T. 1996 A new chemical diagnostic method for inborn errors of metabolism by mass spectrometry-rapid, practical, and simultaneous urinary metabolites analysis. *Mass Spectr Rev*;15:43-57
88. Matsumoto M, Zhang Ch, Kosugi Ch, Matsumoto I. 1995 Gas chromatography-mass spectrometric studies of canine urinary metabolism. *J Vet Med Sci* 57(2): 205-211
89. Mock DM, DeLorimer AA, Liebman, WM Sweetman L, Baker H. 1981 Biotin deficiency: an unusual complication of parenteral alimentation. *N Eng J Med* 304(14): 820-23
90. Molnár-Perl I, Morvai M, Pintér-Szakács M, Petró-Turza M. 1990 Gas chromatographic determination of isocitric and malic acids in the presence of a large excess of citric acid. *Anal Chim Acta* 239:165-179
91. Rabier D, Barfet J, Parvy Ph, Poggi F, Brivet M, Saudubray JM, Kamoun P. 1995 Do criteria exist from urinary organic acids to distinguish  $\beta$ -oxidation defects? *J Inher Metab Dis* 18:257-260
92. Saudubray JM, Ogier H, Bonnefont JP, Munnich A, Lombes A, Hervé F, Mitchell G, Poll B, Specola N, Parvy P, Bardet J., Rabier D, Coudé M, Charpentier C, Frézal J. Clinical approach to inherited metabolic diseases in the neonatal period: a 20-year survey. *J Inher Metab Dis* 1989;12 (Suppl 1):25-41
93. Scott D. 1951 Clinical biotin deficiency (ess white injury) report of case with some remarkson serun cholesterol *Acta Med Scand* 162:69

94. Stabler SP, Marcell PD, Podell ER, Allen RH, Lindenbaum J. 1988 Elevation of total homocysteine in the serum of patients with cobalamin or folate deficiency detected by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J Clin Invest* 81:466-474
95. Stöckler S, Klopff M, Pokits P, Erwa W, Kurz R, Paschke E. 1988 A simple concept for the screening of amino and organic acidurias. *J Inher Metab Dis* 11:432-33
96. Velázquez A, Terán M, Báez A, Gutiérrez J, Rodríguez R. 1995 Biotin supplementation affects carboxylases and plasma biotin in severe protein-energy malnutrition. *Am J Clin Nutr* 61:385-391

## APÉNDICE

Concentraciones individuales de todos los ácidos orgánicos evaluados en las diferentes muestras de cada paciente.

Tabla 1

Excreción de ácidos orgánicos evaluados (mmol / mol creatinina) en niños con marasmo

Paciente	Día	Metil		Láctico	3OH		Butírico		Dicarbo- xilicos	Etil malónico	4-OH Fenlac	Benzoico	Fumárico	Succínico	4-OH FenAc
		cítrico	malónico		Adípico	Subérgico	Sebáico								
1	0	0	0	858	305	18	0	177	1	5	0	1	2	18	
	7	0	0	133	3	0	0	0	0	0	0	8	290	70	
	64	0	2	67	5	1	0	0	1	1	0	0	3	284	3
2	0	0	5	340	5	16	30	9	55	1	5	0	1	98	76
	14	0	28	709	75	67	63	12	142	1	11	1	3	125	11
	29	0	9	31	6	2	7	0	9	2	1	0	7	15	4
3	0	0	0	1747	216	0	1	5	6	0	43	0	9	5	17
	5	0	0	80	9	0	0	0	1	0	3	0	3	3	4
	40	0	0	24	4	2	1	0	4	0	0	0	1	24	3
4	0	0	3	39	10	1	0	2	3	1	4	0	51	3	
	6	0	0	119	9	5	0	0	5	0	4	1	4	38	2
	36	0	3	124	13	0	0	0	0	0	0	0	4	48	7
5	0	0	2	5	7	93	35	0	128	2	1	0	3	23	47
	20	0	2	234	8	0	0	0	0	0	0	0	1	10	11
	38	0	7	88	31	1	0	0	1	1	0	1	4	118	10
6	0	0	0	177	7	1	3	2	7	1	151	0	2	1	85
	5	0	0	201	6	3	6	4	13	1	150	0	11	43	79
	56	0	8	24	0	1	0	2	3	1	5	0	3	181	15

Tabla 1 (Continuación)

Paciente	Día	Metil	Metil	Láctico	3OH		Adípico	Subérico	Dicarbó-	Etil		4-OH	Benzoico	Fumárico	Succínico	4-OH
		cítrico	malónico	Butírico	Butírico	Butírico	malónico	malónico	xilicos	malónico	Fenlac	FenAc				
7	0	0	0	<b>255</b>	6	2	10	2	14	0	0	<b>28</b>	0	2	2	1
20	256	2	17	1	2	4	0	0	6	0	0	15	0	4	118	39
28	0	2	39	4	0	0	0	0	0	0	0	4	0	2	81	23
8	0	0	<b>938</b>	<b>796</b>	<b>18</b>	13	4	<b>35</b>	1	<b>32</b>	1	<b>32</b>	1	4	18	4
6	0	6	<b>382</b>	34	1	1	0	3	1	4	0	4	0	6	173	50
42	0	0	24	4	1	1	0	2	0	6	0	6	0	13	329	6
9	0	0	<b>125</b>	10	4	0	0	4	0	0	0	<b>95</b>	1	13	140	56
6	0	<b>20</b>	116	8	1	0	0	2	1	1	0	1	0	4	49	37
42	0	4	<b>43</b>	<b>60</b>	0	0	0	0	0	1	0	0	1	23	349	6
10	0	0	97	33	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	8
5	0	1	112	5	1	0	0	1	0	0	3	3	0	20	138	21
30	0	13	113	63	1	1	2	4	1	3	0	3	0	11	148	8

Resultados en números *italicos* y *negritas* están por arriba de los valores más altos observados al egreso y fueron considerados anormales.

4OHenLac: ácido 4-hidroxifenil-láctico; 4OHenAc: ácido 4-hidroxifenilacético.

Tabla 2

Excreción de ácidos orgánicos evaluados (mmol / mol creatinina) en niños con con kwashiorkor

Paciente	Día	Metil clórico	Metil malónico	Láctico	3OH Butírico	Adípico	Subérico	Sebácico	Dicarbo- xilicos	Etil malónico	4-OH Fenlac	Benzoico	Fumárico	Succínico	4-OH FenAC
1	0	0	1	43	5	11	26	0	37	2	116	1	5	16	52
	19	0	1	36	9	1	4	0	5	1	157	0	3	0	43
	24	0	8	34	8	3	2	0	5	2	7	0	2	41	28
2	0	0	0	16	1	1	7	4	12	1	21	0	4	122	19
	5	0	0	31	2	9	10	0	19	1	25	1	12	91	18
	28	0	0	49	7	0	0	0	0	0	0	0	2	20	8
3	0	0	0	797	5	0	0	0	0	0	3	1	3	8	0
	17	0	0	116	21	1	1	0	2	0	6	1	2	14	12
	43	0	2	43	7	0	0	0	0	0	0	1	2	212	9
4	0	0	8	26	3	206	146	4	356	4	19	0	7	61	3
	5	40	161	27	2	0	3	2	5	3	3	0	2	65	42
5	0	0	2	7	86	0	1	0	1	1	1	9	1	2	11
	16	0	4	223	164	16	13	0	29	2	2	4	2	37	15
	24	0	10	42	0	0	8	1	9	1	0	0	5	382	24
6	0	0	3	28	8	184	154	118	456	2	4	0	4	4	10
	18	0	47	40	5	1	2	1	4	1	2	0	2	6	9
	32	0	0	31	3	1	0	2	3	0	4	0	1	5	70

Tabla 2 (Continuación)

Paciente	Día	Metil		Láctico	3OH		Adípico	Subérico	Sebáico	Dicarbo- xilicos	Dicarbo- malónico	Etil	4-OH		Benzoico	Fumárico	Succínico	4-OH FenAc	
		cítrico	malónico		Butírico	Fenlac													
7	0	0	0	<b>315</b>	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	11
	19	0	1	23	6	2	2	1	5	5	2	2	0	0	0	0	1	1	15
	25	0	1	29	5	1	1	0	2	2	0	0	0	0	0	0	1	0	10
8	0	0	0	18	2	1	2	0	3	3	0	0	0	76	0	1	12	147	
	7	0	1	<b>199</b>	7	5	2	<b>32</b>	<b>39</b>	<b>39</b>	0	0	0	81	0	3	38	2	
9	0	0	2	<b>400</b>	<b>1232</b>	<b>56</b>	<b>64</b>	0	<b>120</b>	2	2	2	<b>127</b>	<b>10</b>	7	7	12	17	
	5	0	0	116	<b>84</b>	<b>20</b>	14	0	<b>34</b>	1	1	1	<b>66</b>	<b>10</b>	<b>28</b>	<b>431</b>	7		
	21	0	1	38	7	1	0	0	1	1	1	1	0	1	4	92	22		

Resultados en números itálicos y negritas están por arriba de los valores más altos observados al egreso y fueron considerados anormales.

4OHFenLac: ácido 4-hidroxifenil-láctico; 4OHFenAc: ácido 4-hidroxifenilacético.

Tabla 3

Excreción de ácidos orgánicos evaluados (mmol / mol creatinina) en niños con kwashiorkor -marasmático

Paciente	Día	Metil cítrico		Láctico	3OH Butírico		Adípico	Subéxico	Sebáxico	Dicarbo- xilicos	Etili malónico	4-OH Fenilac	Benzoico	Fumárico	Succínico	4-OH FenAc
		malónico	malónico		Butírico	Fenilac										
1	0	0	1	20	8	9	2	0	11	1	0	2	2	2	3	86
	6	0	1	331	32	2	1	0	3	1	1	0	3	7	136	
2	0	0	4	1148	6	12	2	1	15	2	12	1	47	306	2	
	5	0	0	240	2	1	1	0	2	0	7	2	2	6	16	
3	0	0	0	58	2	1	1	0	2	0	3	0	1	2	22	
	14	8	2	129	4	1	2	1	4	0	0	1	2	10	10	
4	0	8	0	195	4	5	11	2	18	1	3	6	6	150	14	
	13	0	1	573	5	1	0	0	1	1	0	0	5	25	73	
5	0	0	0	2	0	0	0	0	0	1	1	0	1	2	360	
	14	0	0	608	4	1	5	0	6	1	51	8	1	0	12	
82	0	0	0	35	2	1	2	1	4	0	0	0	2	115	18	
	27	0	4	24	3	1	2	0	3	0	0	0	2	7	20	

Tabla 3 (Continuación)

Paciente	Día	Metil citrónico	Metil malónico	Láctico	3OH		Adípico	Subéico	Sebáico	Dicarbo- xílicos		Etil malónico	4-OH Fenlac	Benzoico	Fumáico	Succínico	4-OH FenAc
					Butírico	Malónico				Malónico	Fenlac						
6	0	<b>480</b>	<b>16</b>	<b>147</b>	4	1	1	0	2	2	0	0	8	0	3	12	36
5	5	<b>128</b>	<b>32</b>	<b>282</b>	16	3	11	1	15	1	1	14	1	1	7	47	106
	29	0	4	35	0	2	24	2	28	1	1	6	9	2	6	6	6
7	0	0	0	<b>432</b>	2	1	1	0	2	2	0	0	7	5	2	5	10
	5	0	0	<b>1092</b>	5	4	12	0	16	1	1	19	6	2	6	21	21
	45	0	0	24	3	1	0	0	1	0	0	0	1	2	10	20	20
8	0	0	1	<b>3362</b>	<b>275</b>	<b>119</b>	<b>39</b>	0	<b>158</b>	<b>10</b>	<b>73</b>	<b>65</b>	13	9	41	41	41
	5	0	2	<b>267</b>	61	3	0	0	3	2	2	<b>54</b>	0	<b>30</b>	217	125	125
9	0	8	3	<b>6665</b>	31	9	2	0	11	1	1	2	2	2	8	<b>458</b>	<b>458</b>
	8	0	1	<b>2278</b>	5	2	4	0	6	0	0	0	0	2	7	5	5
	55	0	0	76	2	7	1	0	8	1	1	1	1	6	183	6	6
10	0	8	2	<b>601</b>	9	3	0	0	3	0	0	0	0	1	4	26	1
	10	<b>152</b>	0	<b>1298</b>	<b>79</b>	<b>10</b>	0	9	19	1	6	1	17	170	4	4	4
	77	0	4	24	7	1	1	0	2	0	0	0	1	5	104	17	17

Resultados en números *italicos* y *negritas* están por arriba de los valores más altos observados al egreso y fueron considerados anormales.

4OHFenLac: ácido 4-hidroxifenil-láctico; 4OHFenAc: ácido 4-hidroxifenilacético.

Tabla 4

Excreción de ácidos orgánicos evaluados (mmol / mol creatinina) en niños con sugar-baby

Paciente	Día	Metil cítrico	Metil malónico	3OH		Adípico	Subérbico	Sebácbico	Dicarbo- xilicos		Etil malónico	Etil Fenilac	4-OH	Benzoico	Fumárbico	Succínico	4-OH FenAc
				Butírbico	Láctico				malónico	Fenilac							
1	0	0	0	83	31	55	39	0	94	3	28	0	12	38	32		
	18	0	0	91	33	23	13	0	36	1	13	0	11	59	52		
	25	0	6	112	0	0	0	0	0	0	8	0	10	162	35		
2	0	0	0	65	0	116	77	0	193	5	70	5	95	313	95		
	18	0	5	242	107	15	10	0	25	2	131	2	98	94	75		
3	0	0	0	49	42	0	0	0	0	1	3	0	13	203	27		
	0	0	9	125	39	62	29	16	107	3	10	1	12	219	22		
4	0	0	0	83	46	20	11	3	34	3	12	1	13	120	9		
	0	0	0	38	2	1	6	3	10	1	56	0	2	3	11		
5	0	0	0	40	3	1	0	0	1	1	0	0	1	3	13		
	0	0	4	74	0	0	3	0	3	1	18	1	3	15	166		
6	0	0	0	17	0	5	1	0	6	0	0	1	3	8	2		
	0	0	0	32	6	4	2	0	6	34	1	1	1	0	3		
7	0	0	2	38	5	1	0	0	1	1	0	0	2	6	1		
	0	0	0	33	7	71	3	19	93	2	4	0	20	50	1		
8	0	0	0	39	5	37	2	1	40	1	0	0	8	2	9		

Tabla 4 (Continuación)

Paciente	Día	Metil citrónico	Metil malónico	Láctico	3OH Butírico	Adípico	Subérico	Sebácico	Dicarbo- xilicos	Etil malónico	4-OH Fenlac	Benzoico	Fumárico	Succínico	4-OH FenAc	
7	0	0	0	26	52	2	3	3	8	0	0	8	0	1	4	13
	16	0	6	90	2	5	5	1	11	1	7	3	3	4	4	140
8	0	0	6	<b>433</b>	<b>158</b>	<b>30</b>	<b>23</b>	<b>8</b>	<b>61</b>	<b>10</b>	<b>144</b>	<b>0</b>	<b>67</b>	<b>237</b>	<b>94</b>	
	5	0	0	87	6	3	4	1	8	5	21	1	5	244	18	
9	0	0	0	65	6	<b>398</b>	<b>222</b>	<b>92</b>	<b>712</b>	1	<b>21</b>	0	1	0	1	
	6	0	1	5	5	<b>171</b>	<b>116</b>	<b>40</b>	<b>327</b>	2	<b>42</b>	0	3	64	1	
10	0	0	0	<b>309</b>	9	<b>52</b>	<b>50</b>	7	<b>109</b>	2	<b>21</b>	2	11	135	12	
	18	0	0	<b>293</b>	4	1	2	1	4	1	0	0	2	2	0	
	34	0	1	105	26	11	8	7	26	1	3	2	5	109	34	

Resultados en números *italicos* y *negritas* están por arriba de los valores más altos observados al egreso y fueron considerados *anormales*.

4OHFenLac: ácido 4-hidroxiifenil-láctico; 4OHFenAc: ácido 4-hidroxiifenilacético.