

informes

investigación

UN MÉTODO RÁPIDO PARA LA DETECCIÓN DE TRASTORNOS METABÓLICOS EN RECIÉN NACIDOS



GERARDO MANUEL CABALLERO
MARIANO HERNÁN GARCÍA



UN MÉTODO RÁPIDO
PARA LA DETECCIÓN DE
TRASTORNOS METABÓLICOS
EN RECIÉN NACIDOS

Caballero, Gerardo Manuel

Un método rápido para la detección de trastornos metabólicos en recién nacidos
/ Gerardo Manuel Caballero ; Mariano Hernán García. - 1a ed. - Florencio Varela :
Universidad Nacional Arturo Jauretche, 2023.

Libro digital, PDF/A - (Cuadernos de investigación)

Archivo Digital: descarga y online

ISBN 978-987-3679-90-2

1. Genética Médica. I. García, Mariano Hernán. II. Título.
CDD 618.9201



Rector: Dr. Arnaldo Medina

Vicerrector: Ing. Miguel Binstock

Secretaría General: Mg. María Teresa Poccioni

Secretaría de Investigación y Vinculación Tecnológica: Dr. Patricio Narodowski

Directora de Gestión de la Investigación: Mg. Dolores Chiappe

Coordinadora de edición de la Secretaría de Investigación: Mayra Chaires

Coordinador Editorial: Ernesto Salas

Diseño de tapa: Gabriela Ruiz

Diagramación: Yanina Capdepón

Corrección de estilo: Victoria Piñera

1ª edición digital, noviembre de 2023

© 2023, UNAJ

Av. Calchaquí 6200 (CP1888)

Florencio Varela Buenos Aires, Argentina

Tel: +54 11 4275-6100

editorial@unaj.edu.ar

www.editorial.unaj.edu.ar

Este libro fue seleccionado, con referato externo, en la Convocatoria
de Publicaciones de Obras inéditas 2020, realizada por la UNAJ.

Queda hecho el depósito que marca la Ley 11.723



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 2.5 Argentina (CC BY-NC-ND 2.5 AR)

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

UN MÉTODO RÁPIDO PARA LA DETECCIÓN DE TRASTORNOS METABÓLICOS EN RECIÉN NACIDOS



GERARDO MANUEL CABALLERO

MARIANO HERNÁN GARCÍA



 EDITORIAL | UNAJ

ÍNDICE

Presentación (<i>Dr. Arnaldo Medina</i>).....	9
Resumen	11
1. Rápido y curioso	12
2. “Somos lo que comemos”	18
3. Acidemias orgánicas	27
4. Protocolos de análisis de ácidos orgánicos en orina	30
4.1 Preparación de la muestra	30
4.2 El recorrido de las moléculas en el equipo de GC-MS: un largo camino a casa	34
4.3 Un espectro de masa. Un caso detectivesco	38
5. Rápido y valioso	42
6. Conclusiones	45
Referencias bibliográficas	49
Sobre los autores	51

Los libros de la colección *Cuadernos de Investigación* son el resultado del trabajo continuo de equipos de investigación de nuestra universidad. Se trata de un proceso de permanente maduración de diversas líneas de trabajo y de actividades realizadas en el marco de los proyectos UNAJ Investiga, cuyas convocatorias dieron inicio en el año 2012, y de los Proyectos de Desarrollo Tecnológico y Social (PDTs) financiados por el Consejo Interuniversitario Nacional.

La publicación de los avances y resultados de las investigaciones de la UNAJ sobre temas de salud, ingeniería, ciencias sociales y humanas, resaltan el vínculo con las problemáticas particulares del territorio en el que nos insertamos a la vez que las trascienden contribuyendo al conocimiento de cuestiones generales nacionales.

Aunque no siempre considerada la actividad más visible, la investigación científica forma parte esencial de la tríada docencia, investigación, vinculación, constitutiva de la vida académica de las universidades públicas nacionales. La contribución al desarrollo del conocimiento de una comunidad es un patrimonio tangible construido por las instituciones de educación superior. En la tríada funcional de las universidades, la investigación es una zona de clivaje que mejora la actividad docente contribuyendo a la perspectiva del conocimiento y, por otro lado, escucha la voz de las necesidades de la comunidad proponiendo un determinado tipo de saberes para abordar los problemas del territorio. Como dijera

Arturo Jauretche, la construcción de un conocimiento construido desde nuestra realidad y centrado en nuestras necesidades.

Como parte de las universidades del Bicentenario, entre las que se incluye la UNAJ, asumimos la particularidad de nuestra inserción en comunidades con saberes, experiencias y culturas diversas que enriquecen la perspectiva del saber propio de la universidad. En este sentido se orientan las nuevas obras y artículos de investigación que aquí estamos presentando: *Jóvenes, identidades y territorios. La práctica del rap en el conurbano de Buenos Aires*; *Guía para la comunicación universitaria. Hacia un lenguaje no excluyente y con perspectiva de géneros*; *Postales varelenses: identidades, memorias y patrimonios*; *La enseñanza de la lectura y la escritura en la universidad. Dificultades, propuestas y desafíos*; *Una historia cultural descentrada. Estudios sobre el partido bonaerense de Florencio Varela en los años cuarenta*; *Un método rápido para la detección de trastornos metabólicos en recién nacidos*; *Alternativa sustentable para el manejo de un efluente de la industria del cuero*; *La Inteligencia Artificial y sus beneficios dentro del paradigma de la industria 4.0*; *Jabalíes y cerdos cimarrones en Argentina: una guía de manejo para los productores rurales*; *Relevamiento sociolingüístico en la UNAJ: 2019-2020*; *Feminización de la universidad y cuidados. Una mirada de género sobre la experiencia de ser estudiante en la UNAJ*; *Diversidad de Género, Diversidad y Género: Prácticas Organizacionales para Producir Diferencias*.

MARIANO H. GARCÍA

(Universidad Nacional Arturo Jauretche).

GERARDO M. CABALLERO

(Universidad Nacional Arturo Jauretche).

Las acidemias orgánicas son un conjunto de enfermedades metabólicas hereditarias en las que una vía metabólica en particular presenta una alteración a nivel enzimático. En general suelen manifestarse en los primeros años de vida y, de no tratarse, siguen un curso letal. Debido a su baja frecuencia de aparición, son consideradas dentro del conjunto de “enfermedades raras”. El pronóstico de estas enfermedades ha mejorado mucho en los últimos años debido a su detección temprana gracias al surgimiento de nuevas tecnologías, ya que cuanto antes comience el tratamiento, mejor será la prognosis del paciente y menores las secuelas, muchas de ellas neurológicas e irreversibles.

En este trabajo presentamos una mejora sobre un método de detección de acidemias orgánicas, basado en las técnicas de cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa, realizada en orina de recién nacidos. Esta mejora redundará en una mayor productividad del laboratorio, es decir, un mayor número de análisis realizables comparado con el método de referencia, como también en la concomitante disminución en los insumos utilizados.

Palabras claves: acidemias, cromatografía de gases, espectrometría de masa

1. Rápido y curioso

En este artículo nos proponemos contar los avances que hemos conseguido en la puesta a punto de un nuevo método rápido de análisis de ácidos orgánicos en muestras de orina usando la técnica analítica de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa (GC-MS, por su sigla universal en inglés). ¿Cuál es la relevancia de este trabajo? podría preguntarse el lector. Pues bien, la pronta detección de concentraciones anormales de ácidos orgánicos en orina de neonatos, mediante GC-MS, contribuye al diagnóstico eficaz de diversos trastornos congénitos del metabolismo, cuyo reconocimiento y tratamiento temprano puede ayudar a mitigar los daños neurológicos y de otra índole asociados a estos trastornos.

Nuevas tecnologías surgen día a día; algunas irrumpen en nuestra vida cotidiana para modificarla. Solo alcanza con mencionar la telefonía móvil, para dar un claro ejemplo de hasta qué punto nuestras costumbres y modos de vida pueden ser modificados por una nueva herramienta tecnológica. Muchas veces ocurre la misma revolución en campos acotados del saber, aunque este tipo de cambios pasan de alguna manera desapercibidos para una población entera, debido a los conocimientos fundamentales que se necesita poseer para la comprensión de los nuevos paradigmas que conllevan muchas nuevas técnicas. Recientemente, debido a la aparición del virus que causa la enfermedad COVID-19 y su carácter pandémico, la gente se ha habituado a mencionar una tecnología muy común para la genética: la técnica de PCR. Esta técnica significó una verdadera revolución en un campo disciplinar acotado desde su aparición, al permitir obtener cantidades hipotéticamente infinitas de prácticamente cualquier material genético. Pero fue necesario que ocurriera esta catástrofe, para que siquiera la utilidad de la técnica, aunque no el concepto, sea parte del conocimiento popular.

En el campo de la espectrometría de masa, la técnica analítica que usamos en este trabajo, también ha ocurrido una revolución tecnológica. La espectrometría de masa es una técnica analítica, nacida a inicios del siglo XX en los laboratorios de Joseph John Thomson (el descubridor del electrón) de la Universidad de Cambridge, que cambió la forma de estudiar la química en todos sus campos desde la década de 1940; y la bioquímica en particular desde fines de la década de 1980 del siglo pasado. Los avances registrados en los últimos años han expandido su aplicación hacia campos del conocimiento insospechados en el siglo anterior. Al presente, la espectrometría de masa se ha convertido en una herramienta imprescindible en diversas áreas de la bioquímica y de la investigación biomédica (Griffiths, 2008), tales como la microbiología, la farmacología, e incluso los análisis clínicos. En todos estos campos ha servido tanto para generar nuevo conocimiento, como para beneficiar a la población en general a través de su aplicación. Sin embargo, como se desprende de la lectura de la referencia recién mencionada, y de cualquier indagación que el lector interesado pueda hacer al respecto, y contrariamente a lo que muchos recién llegados al área creen, la espectrometría de masa es mucho más, muchísimo más, que una simple técnica bioquímica. Por ejemplo, en los últimos años nuevas disciplinas han nacido gracias, en parte, a la espectrometría de masa; la proteómica, la metabolómica y la lipidómica son algunos ejemplos. También es de resaltar su relevancia en la investigación espacial.¹ Un ejemplo de esto es el uso de espectrómetros de masa para monitorear la calidad del aire de estaciones espaciales y transbordadores. Sin embargo, la historia en este campo viene de antes; comenzó en 1978 con la sonda Pioneer enviada a Venus, la cual estaba provista de cinco espectrómetros de masa,

1 Ver <https://bioxano.wordpress.com/2012/08/14/la-espectrometria-de-masas-en-la-exploracion-espacial/>

uno de ellos, el destinado al estudio de la alta atmósfera, contaba con una fuente de ionización electrónica y un cuadrupolo hiperbólico como analizador.² La historia siguió; en 2012, la misión Curiosity enviada a Marte portaba el rover Mars Science Laboratory (MSL) explorador de la superficie marciana dedicado, entre otros objetivos, a la búsqueda de compuestos orgánicos que pudieran dar indicios de la existencia de vida presente o pasada. Para este propósito, estaba equipado con un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masa, similar al que usamos en nuestras investigaciones, y que describimos más adelante a grandes rasgos.

En este trabajo en particular, hemos mejorado una técnica de espectrometría de masa que permite la detección temprana de trastornos metabólicos en neonatos, utilizando una sencilla muestra de orina de un recién nacido. Pero para que el lector pueda comprender las bases de esta tecnología sofisticada y compleja, debemos comenzar dejando en claro conceptos fundamentales de la física y la química. Como diría George Harrison,³ vivimos en un mundo material que nos rodea, y del que formamos parte indisoluble desde nuestro nacimiento hasta nuestra muerte (“de la tierra vienes y a la tierra volverás”, adaptando un poco la famosa frase bíblica). Este mundo material está formado por sustancias elementales, es decir, sustancias que no pueden ser descompuestas en otras, las que para mayor simplicidad denominamos “elementos”, tales como el aluminio de las ollas de cocina y el oxígeno del aire; y por sustancias compuestas (o compuestos, para mayor sim-

2 Cabe mencionar que ese tipo de analizador estuvo disponible comercialmente recién a mediados de la década de 1980.

3 George Harrison publicó, en mayo de 1973, su tercer disco solista llamado *Living in the Material World* [Viviendo en el mundo material].

plicidad), tales como el agua y los ácidos orgánicos. Ahora, la teoría atómico-molecular (teoría central de las ciencias químicas) describe estas sustancias elementales y compuestas en términos de átomos y moléculas. Así, por ejemplo, el aluminio de las ollas está constituido solamente por átomos de aluminio, pero el agua nuestra de cada día está formada por moléculas que contienen átomos de dos elementos distintos (hidrógeno y oxígeno) que dan lugar a la famosa fórmula molecular H_2O . Los ácidos orgánicos que se encuentran en nuestro organismo, por su parte, están formados por átomos de tres elementos: carbono, hidrógeno y oxígeno. Por ejemplo, la fórmula molecular del ácido propiónico, uno de los ácidos orgánicos más simples excretados en la orina, es $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2$. Sin embargo, la teoría atómico-molecular va varios pasos más allá; no solo nos brinda la fórmula de un compuesto, sino también su estructura tridimensional, información esencial para una aproximación a la comprensión de la complejidad de las reacciones químicas y bioquímicas. Más información básica sobre la estructura de los átomos, puede encontrarse en un libro de divulgación recientemente publicado (Caballero y García, 2020).

Vamos a hablar de ácidos y bases, y cuestiones un poco más técnicas como el pH; pero antes de entrar en ese terreno trataremos de abonar su aridez con ejemplos de la vida cotidiana. Todos hemos experimentado alguna vez una sensación de “acidez” estomacal, usualmente después de una comida por demás abundante. Justamente esta “acidez” se debe a que nuestro estómago debe segregar más ácido clorhídrico, el cual junto a enzimas llamadas “pepsinas”, se encarga de parte de la digestión de las proteínas provenientes, por ejemplo, de cualquier tipo de carne. ¿Qué hacemos para aplacar esa acidez que a veces es como un fuego en la boca del estómago? Una posibilidad es tomar una solución de bicarbonato de sodio (una base) que va a reaccionar con el exceso de ácido clorhídrico del estómago neutralizándolo, es decir, transformándolo en una sal (cloruro de sodio en este caso) y otros compuestos inocuos

como agua, y el gas dióxido de carbono que eliminamos cuando eructamos. Otros ácidos cotidianos son el jugo de limón, que contiene ácido cítrico y ácido ascórbico (vitamina C) principalmente, y el vinagre, que contiene aproximadamente 5 gramos de ácido acético por 100 mililitros de vinagre, en cualquiera de sus formas. Otras bases domésticas son el jabón, y una base aún más fuerte es la lavandina concentrada. La sensación que experimentamos cuando tocamos con un dedo una gota de lavandina concentrada, algo así como un exfoliado profundo de nuestra piel, es típica de las bases concentradas. Ahora, ¿cómo diferenciamos un ácido de una base? Una manera práctica y sencilla es con un papel de tornasol (quizás alguien lo recuerde de los juegos de química de la infancia o adolescencia). El papel de tornasol se pone rojo en contacto con un ácido y azul en contacto con una base. Por otro lado, no cambia de color en presencia de sustancias neutras tales como al agua pura, o soluciones acuosas de sal de mesa, o de agua azucarada. Cuando hablamos de ácidos, bases y sustancias neutras debemos tener en cuenta que estamos en presencia de un equilibrio químico. Un equilibrio químico puede relacionarse con el funcionamiento de una balanza de dos brazos: si un plato pesa mucho, este baja y el otro plato sube y viceversa. Por eso, una sustancia puede ser ácida o básica, pero no las dos cosas a la vez, y una se compensa con la otra, de tal manera que una sustancia neutra es justamente algo que no es ni ácido ni básico (balanza en equilibrio). Si algo es muy ácido podemos compensarlo agregando una base, bajando el otro plato de la balanza para que la solución deje de ser ácida. Esto es justamente lo que hacemos al tomar un antiácido para el estómago.

No vamos a discutir en profundidad los equilibrios químicos de ácidos y bases, ya que su tratamiento riguroso corresponde a un capítulo de un curso de química general; pero sí daremos una idea del pH, parámetro que nos permite saber si una sustancia, o solución, es ácida, básica o neutra. Esto es necesario porque la orina es, sin lugar a dudas, una solución

acuosa es decir, un líquido formado por un solvente (agua) y numerosos solutos (compuestos disueltos en esa agua, productos finales de diversas rutas metabólicas, entre ellos los ácidos orgánicos) cuyo pH puede verse alterado como consecuencia de determinadas patologías.⁴

La escala de pH en solución acuosa habitualmente se encuentra en el rango de 0 al 14, aunque en la mayoría de los seres vivos el rango es más acotado. Esta escala es la lectura de la balanza que utilizamos de ejemplo para un equilibrio químico. La escala de pH se utiliza para expresar la concentración de iones hidronio,⁵ que son las especies que liberan los ácidos cuando se disuelven en agua. Las concentraciones de hidronio son números muy pequeños, como por ejemplo 0,0000001 para una solución neutra. Esto es algo molesto que se trata de evitar; para esto se aplica la escala de pH: para que números muy pequeños, que son los habitualmente encontrados en sangre u orina, puedan ser expresados con pocas cifras, o una cifra. Por ejemplo, el valor recién indicado de una solución neutra corresponde a un $\text{pH} = 7$, ya que hay siete posiciones después de la coma; si el pH fuese de 3, la concentración de iones hidronio sería equivalente a 0,001. Obsérvese que cuanto mayor es la concentración de iones hidronio, es decir, cuanto mayor es la acidez, menor es el pH. A nivel del tubo digestivo se observa que el pH del estómago varía entre 1 y 3, y cuando se llega al intestino ya se encuentra a un valor de 5 a 7. Es decir que a medida que bajamos por el sistema digestivo, la acidez disminuye y el pH aumenta (ya en el colon es de 8, es decir básico: hemos pasado al otro lado de la balanza; esto quiere decir que la concentración de hidronio es menor a 0,0000001).

4 La orina también contiene sales disueltas y algunas células.

5 Los iones son especies químicas con carga: cationes, carga positiva; aniones, carga negativa.

El centro exacto de la escala de pH es 7, que es lo que consideramos neutro; ni ácido ni básico.

Los ácidos orgánicos metabólicos (denominados más precisamente ácidos carboxílicos) a los valores normales de pH de la orina (entre 5 y 8 aproximadamente) se encuentran mayormente solubilizados en ella en forma de sales solubilizadas. Son, justamente, estos metabolitos con carácter ácido los que se encuentran aumentados en la orina y otros fluidos en estas acidemias; el nombre “acidemia orgánica” o “acidemia metabólica” con que se designa al conjunto de enfermedades en las que trabajamos proviene de este hecho: la liberación de metabolitos ácidos, capaces de cambiar el pH de la orina, son enfermedades innatas que provienen como consecuencia de alguna mutación del material genético de un recién nacido. En ellas el metabolismo de algún aminoácido (las piezas que formaban a las proteínas) se encuentra defectuoso. Pero **¿qué es un *metabolito*?** Más aún: **¿qué es el *metabolismo*?** Y, en particular, **¿qué significa el *metabolismo de un aminoácido*?**

Vamos a plantear ahora una discusión que pretende responder estas preguntas.

2. “Somos lo que comemos”

Los ácidos orgánicos objeto de nuestros estudios son metabolitos intermediarios de muchos de los grupos principales de los componentes celulares orgánicos: aminoácidos, lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos. Estos nombres adquieren un significado más claro si mencionamos que:

- Los aminoácidos son los eslabones que componen las cadenas de las proteínas, las cuales son constituyentes, entre otras cosas, de las fibras musculares y las enzimas; el lector puede estar en estas épocas pandémicas acostumbrado a escuchar hablar sobre la proteína S de la envoltura del coronavirus SARS-CoV-2.

- Los lípidos son un conjunto de sustancias insolubles en agua; dentro del grupo de los lípidos se encuentran los triglicéridos y el colesterol cuyo consumo los médicos recomiendan moderar por su asociación con enfermedades cardiovasculares.
- Los hidratos de carbono son un grupo de moléculas biológicas asociadas al manejo de energía por parte de los seres vivos; sin embargo, tienen muchas otras funciones. El representante conspicuo de esta familia es la glucosa. El valor de glucosa en sangre (glucemia) suele ser muchas veces informado en análisis clínicos de rutina, y es un metabolito muy reconocido por la sociedad en general, por su vinculación con la diabetes.
- El ácido desoxirribonucleico (ADN) es el ácido nucleico presente en los cromosomas en el interior núcleo celular, portador de la información genética capaz de sintetizar cualquier proteína. También, al igual que las proteínas, se trata de una molécula muy larga formada por unidades conocidas como nucleótidos.

Ahora volvamos a nuestras preguntas originales: ***¿qué es un metabolito y qué relevancia tienen todos los compuestos mencionados y cómo se originan en nuestro organismo?*** Todos estos compuestos vienen, directa o indirectamente, de nuestros alimentos, ya que “somos lo que comemos”, famosa frase que se aproxima a la original de su autor, Ludwig Feuerbach,⁶ filósofo alemán del siglo XIX, que se ha adjudicado erróneamente a Hipócrates.⁷ Feuerbach escribió esta frase

6 *Der Mensch ist, was er isst* es la frase original: “el hombre es lo que come”.

7 “Sea el alimento tu medicina, y la medicina tu alimento”, esto es lo más aproximado que ha dicho Hipócrates, quien, como se ve, plantea una idea bien distinta.

en su reseña del libro del filósofo y médico fisiólogo holandés Jacob Moleschott: *Doctrina sobre los alimentos. Para el pueblo (Lehre der Nahrungsmittel. Für das Volk)*, publicado en 1850. La frase completa es: “Si se quiere mejorar al pueblo, en vez de discursos contra los pecados denle mejores alimentos. El hombre es lo que come” (Oxford University Press, 2016). Feuerbach, quien sostenía posturas ateas y materialistas, pretendía defender el derecho de las clases sociales más desfavorecidas a contar con una buena alimentación, en contra de las posturas dominantes de las clases religiosas de la época, las que se preocupaban solo del alimento espiritual para el alma de todos los seres humanos.

Más allá de estas discusiones filosóficas y teológicas, hay que destacar que su observación es de una profundidad asombrosa. Lo expresado por el humanista alemán es rigurosamente cierto en cualquier contexto bioquímico que se lo analice: somos lo que comemos. Nuestro cuerpo es una verdadera fábrica de aminoácidos, proteínas, hidratos de carbono, lípidos, etcétera. Con los alimentos que consumimos, no solo obtenemos la energía fundamental para mantenernos con vida, sino que también utilizamos casi todos los compuestos contenidos para construir y reparar nuestro organismo y para recambiarlo continuamente. Nuestra estructura orgánica (huesos, músculos, piel, ojos y cualquier parte del cuerpo) no proviene de otro lugar más que de los alimentos que consumimos. Aquel trozo de pollo y aquellas verduras digeridas en la cena del otro día serán procesados para luego encontrarse en prácticamente cualquier tejido. Ni el propio Feuerbach llegó a darse cuenta, seguramente, del acierto que su pequeña oración conlleva.

Una de las características de gran parte de los organismos vivos es esta capacidad de procesar alimentos de diversos orígenes, para obtener energía, y para recambiar todas las biomoléculas del organismo. A este procesamiento de los alimentos se lo conoce como “metabolismo”. Se

estima que una persona en un período de 40 años consume literalmente toneladas de alimentos y unos 20.000 litros de agua (Voet y Voet, 2011). Obsérvese que el metabolismo es un delicado proceso entre lo que se consume y lo que se excreta; a pesar de la gran cantidad de alimentos que necesitamos ingerir, el peso corporal, en la mayoría de las personas, no varía significativamente en la vida adulta. La palabra metabolismo es un neologismo formado por la palabra griega *metabole*, que significa cambio, y el sufijo *-ismo*, que significa “tendencia” o “cualidad” (Segura Munguía, 2014). Actualmente, el metabolismo se define como “todos los procesos físicos y químicos del cuerpo que convierten o usan energía” (Shulman y Petersen, 2017). Sin embargo, esta definición es extremadamente amplia y dice algo así como “es todo lo que ocurre en un organismo vivo” y nos deja sin comprender la profundidad y complejidad que la palabra atesora. Teniendo en cuenta que nuestro cuerpo está formado por miles de compuestos, de una complejidad y un tamaño muy diversos, el metabolismo sería algo así como una central de energía térmica y una fábrica, al mismo tiempo. Esto es así, debido a que el metabolismo se encarga, como dijimos, de convertir los compuestos de los alimentos consumidos en compuestos más pequeños y sencillos, obteniendo energía en este proceso. Estas reacciones y procesos del metabolismo relacionados a la obtención de energía (nuestra comparativa central térmica) son conocidos en su conjunto como *catabolismo*. Necesitamos energía para vivir, y esa energía la obtenemos de lo que comemos. Si un ser vivo deja de comer, a la larga la falta de energía lo llevará a la muerte. Pero, así como el catabolismo es un subconjunto de reacciones del metabolismo encargado de convertir moléculas complejas en moléculas sencillas, también existe otro subconjunto de reacciones que se encargan de construir moléculas complejas, a partir de moléculas sencillas. Se lo denomina *anabolismo*, y es la contrapartida del catabolismo. Las reacciones *anabólicas* suelen requerir de energía; la

misma energía que se obtuvo por medios catabólicos.⁸ De esta manera, vemos que nuestro organismo es capaz de sintetizar moléculas complejas utilizando la energía que proviene de los alimentos ingeridos.⁹ Nuestro cuerpo puede sintetizar muchísimas moléculas de una complejidad increíble. Sin embargo, en algunos casos no existe una maquinaria para sintetizar un compuesto en particular, con lo cual solo podemos obtenerlo directamente de la alimentación. Ejemplo de estos compuestos son algunos lípidos (ω -3) presentes en pescados y frutas secas, y lípidos (ω -6) que se encuentran en el girasol y en paltas; así como los diez aminoácidos esenciales: arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina. Si no comemos algún alimento que los contenga, su carencia nos puede traer distintos problemas de salud,¹⁰ de acuerdo con la función que presenten en nuestro organismo, y la capacidad que tengamos para almacenarlo.

8 Quizás el lector haya escuchado hablar de los esteroides anabólicos, sustancias de uso prohibido en el deporte profesional, cuya función es, justamente, acelerar los procesos de síntesis de proteínas aumentando así rápidamente la masa muscular.

9 Es interesante marcar en este punto que, en el caso del reino vegetal, la energía proviene del sol, y los nutrientes para las reacciones anabólicas son moléculas sencillas provenientes del nitrógeno, oxígeno y dióxido de carbono del aire. Así, toda la energía utilizada para la vida vegetal y la vida de herbívoros, carnívoros y omnívoros proviene, en última instancia, de la energía solar.

10 Por ejemplo, la deficiencia prolongada de vitamina C en la dieta origina una enfermedad denominada “escorbuto”, la que provoca lesiones en la piel y mala cicatrización de las heridas. Esta enfermedad era muy común entre los marineros que realizaban largos viajes de exploración en los siglos XV y XVI, situación en la que escaseaban frutas y verduras frescas.

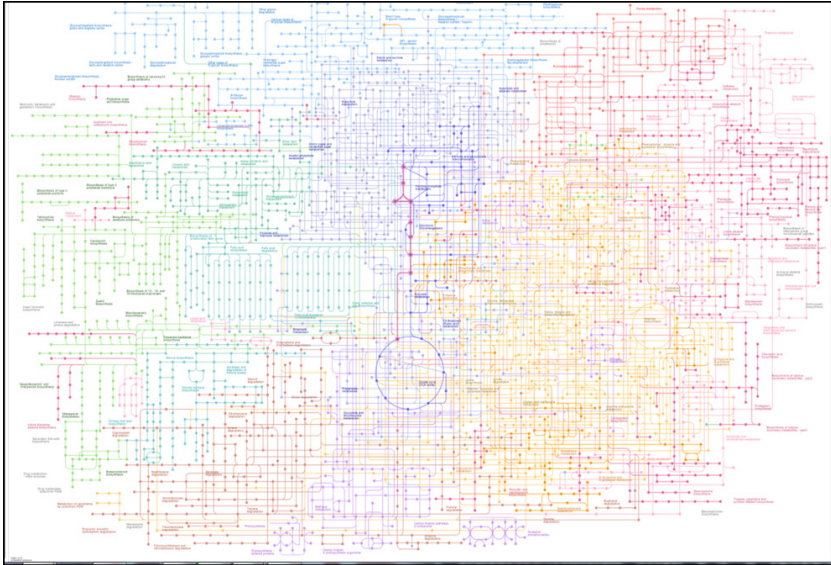
Podemos comparar el metabolismo con una fábrica de autos, que recibe las autopartes provistas por las empresas autopartistas las que fabrican sus partes a partir de grandes chapas de acero inoxidable o aluminio (catabolismo). Con estas partes de diversas formas y tamaños, la fábrica de autos comienza el proceso de ensamblado de un automóvil (anabolismo). Esta no es una comparación fortuita; nos interesa que el lector pueda pensar en que cada parte de un automóvil será fabricada por una secuencia de ensamblaje. La secuencia es en serie, es decir que primero ocurre una acción y después otra; las partes van transcurriendo a lo largo de una línea de ensamblaje, y van pasando por distintas secciones en donde secuencialmente, primero un operario y después otro, van modificando la parte, hasta que al final de esa secuencia, tenemos una parte lista (por ejemplo, un chasis). De la misma forma se fabrican moléculas complejas en nuestro organismo: moléculas sencillas se unen para formar moléculas cada vez más complejas, las cuales se siguen modificando hasta obtener compuestos aún más complejos, imposibles de ser hallados en algo que no esté o haya estado vivo. Parte de la energía obtenida por el catabolismo a partir de los alimentos ingeridos será utilizada en esta enorme y compleja fábrica a la que hemos llamado “metabolismo”. En química biológica, a la línea de producción de un compuesto se lo conoce como “vía metabólica”, y no es más que la descripción bioquímica detallada de la serie de pasos que llevan a la producción de una molécula. Un detalle muy importante a tener en cuenta es que las vías metabólicas no son independientes entre sí. De la misma manera que ocurre en el ensamblaje de un automóvil: si una línea de producción fabrica una puerta izquierda, debería producirla a la misma velocidad que la línea que produce la puerta derecha; así la velocidad de producción del automóvil completo va a depender de la velocidad de fabricación de cada parte. Además, la puerta será luego una parte del ensamblado de la carrocería en otra línea de montaje. Si no se fabrican puertas, no se fabricarán automóviles. Todo debe estar

funcionando sincronizada y coordinadamente. Lo mismo sucede en el metabolismo humano cuando este funciona normalmente.

Cada molécula, por más pequeña que sea, que forma parte de cualquiera de las muchísimas vías metabólicas de nuestro cuerpo, se denomina *metabolito*. En nuestra comparación del automóvil, los metabolitos serán cada una de las partes que forman el automóvil; sea un tornillo o una cubierta. Un automóvil convencional está formado por unas setenta mil a noventa mil partes, ¡realmente asombroso!¹¹ Un automóvil actual es una pieza de ingeniería muy compleja. Por otro lado, en nuestro organismo se han podido detectar y describir, al presente, unos 114.265 metabolitos, y todo indica que este valor continuará aumentando (The Human Metabolome Data Base, 2021). Esta comparación que acabamos de hacer, entre el metabolismo humano y la fabricación de automóviles, solo tiene el fin de que el lector pueda aproximarse a un tema muy complejo, casi críptico, como el metabolismo humano. De todas maneras, debemos ser cautelosos con estas comparaciones ilustrativas, ya que existe el riesgo de una sobresimplificación que lleve a ideas alejadas de la realidad, o incluso a ideas erróneas. De hecho, el metabolismo completo de un organismo multicelular difícilmente será comprendido en su totalidad por una sola persona, y a cada momento se agrega más información a este proceso extremadamente intrincado. Para que el lector se haga a la idea de la complejidad de la maquinaria metabólica humana, presentamos en la Figura 1 un esquema actual que es tan enrevesado que por momentos parece incomprensible. En esta figura se muestran todas las vías metabólicas y su relación con otras. Se ha marcado una vía metabólica en particular, que es la vía de producción anabólica de glucosa (Kanehisa y Goto, 2000).

11 Ver <https://noticias.autocosmos.cl/2019/06/13/sabes-cuantas-piezas-tiene-un-automovil>

Figura 1
Mapa metabólico



Nota. Adaptado de Kanehisa y Goto (2000).

Hoy en día continúa estudiándose el metabolismo, e intentando que la información que va agregándose a nuestro conocimiento sea cabalmente comprendida. Pareciera que esto que llamamos “vida” se vuelve cada vez más un término esquivo, con una complejidad que nuestros humildes cerebros no logran interpretar, ¿será quizá que “cuanto más sabemos, menos comprendemos”? O como escribió aquel incansable viajero del Mediterráneo, anticipándose inadvertidamente en varios siglos a la forma de entender el conocimiento científico, “si alguien cree conocer algo, aún no lo conoce como se debe conocer...”¹²

12 San Pablo, Primera carta a los corintios (1Cor 8:2).

Un último aspecto de nuestra analogía fabril debe necesariamente tener en cuenta las personas con puestos operativos (o los robots en las fábricas modernas). Estas personas en todo sistema metabólico son unas proteínas muy complejas llamadas “enzimas”.¹³ Así, al igual que nuestros operarios de la empresa automotriz, llevan a cabo la tarea de unir o modificar los distintos metabolitos que darán lugar a una molécula final. Y era justamente en estos operarios, en estas enzimas, en donde queríamos centrar la mirada para poder hablar de enfermedades congénitas del metabolismo. Muchas veces estas enzimas están deterioradas;¹⁴ son personas que no saben hacer bien su trabajo, o lo hacen de forma muy lenta. En ese caso, por ser una secuencia de pasos la que sintetiza una molécula en particular, ocurren dos cosas: el producto de la síntesis no es fabricado (disminuye su concentración), y todas las moléculas anteriores a ese paso comienzan a acumularse (aumenta la concentración). En nuestro ejemplo fabril, si la cadena de armado de una rueda, por ejemplo, estuviera deteriorada, la cantidad de ruedas sería cada vez menor, mientras que la de llantas y cubiertas sería mayor, ya que se producen menos ruedas por día que la cantidad de llantas y cubiertas que ingresan a la fábrica en el mismo lapso de tiempo.

13 Las enzimas en particular, y todas las proteínas en general, se sintetizan en los ribosomas de las células a partir de la lectura del ácido nucleico ácido ribonucleico (ARN) que, a su vez, es sintetizado de la información del ADN presente en el núcleo de cada célula. Los detalles de estos procesos pertenecen a la especialidad de la genética y a la nueva disciplina de la proteómica.

14 Químicamente una enzima es un catalizador, es decir, una especie que facilita el avance de una reacción química al aumentar su velocidad, pero que no se consume durante esta. Las enzimas son catalizadores naturales de una complejidad, precisión y especificidad imposibles de encontrar en un laboratorio químico.

3. Acidemias orgánicas

Estamos ahora en condiciones de explicar con mayor detalle las acidemias orgánicas, los trastornos congénitos de metabolismo objeto de nuestro estudio, una vez respondidas las preguntas planteadas en secciones previas. ¿Cuál es el estado actual del conocimiento sobre estas acidemias orgánicas? Como mencionamos, el metabolismo humano normal funciona de manera precisa y fluida con caminos enzimáticos diseñados para pasar metabolitos ordenadamente entre enzimas, y también entre caminos metabólicos; caminos que son esenciales para el crecimiento normal y el desarrollo; y para la generación de energía. Los errores congénitos del metabolismo se definen como desórdenes metabólicos que afectan la conversión de nutrientes entre ellos, o la conversión de nutrientes en energía. Estos trastornos están causados por la actividad defectuosa de ciertas enzimas, la cual resulta en la acumulación de metabolitos normales próximos a la vía metabólica bloqueada –en nuestra analogía automovilística, acumulación de llantas que no se transforman en ruedas–, o la falta de productos necesarios para rutas metabólicas subsiguientes –siguiendo con la analogía, faltante de ruedas para el ensamble final de un auto–. Otros trastornos se dan cuando se utilizan caminos alternativos para desechar el exceso de metabolitos normales, lo cual termina en la producción de metabolitos anormales secundarios –en la analogía fabril, podríamos pensar en chapas metálicas que no entraron a la línea de pintado, y se acumulan en un depósito al aire libre donde se oxidan con el transcurso del tiempo–.

Las consecuencias médicas de los errores congénitos del metabolismo son diversas, van desde retrasos en el desarrollo a enfermedad aguda que puede conducir en algunos casos a daños cerebrales, al coma y a la muerte. En muchos casos, la presentación aguda es precedida por un período libre de síntomas de duración variable que depende de la

enfermedad específica. Para ciertos casos, existen tratamientos disponibles de estos desórdenes, consistentes en dietas especiales que carecen de los nutrientes específicos que no pueden ser metabolizados, sumadas a la administración de vitaminas y otros cofactores. El tratamiento es efectivo si comienza antes de que los síntomas se manifiesten; una vez ocurrido el daño este es usualmente irreversible. Por esta razón, el tiempo ideal de identificación de pacientes con desórdenes metabólicos es al momento del nacimiento (Pasquali y Sawyer, 2008).

Los trastornos del metabolismo de aminoácidos son individualmente raros, pero colectivamente afectan a uno de cada ocho mil recién nacidos. Los desórdenes del metabolismo de aminoácidos se dividen en dos grupos que dependen de la localización de la enzima bloqueada o defectuosa en el camino metabólico: 1) aminoacidopatías, en las cuales el aminoácido precursor se acumula en exceso en la sangre y se excreta luego en orina; y 2) acidemias orgánicas, en las cuales se acumulan los productos del catabolismo de ciertos aminoácidos. Un ejemplo de las primeras es la enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce (MSUD, por su sigla en inglés).¹⁵ Esta enfermedad hereditaria es causada por una deficiencia genética que altera el normal funcionamiento de la enzima específica que cataliza uno de los pasos de la degradación de los llamados aminoácidos ramificados, tales como la leucina, isoleucina y valina. Como consecuencia, se acumulan α -cetoácidos ramificados (metabolitos intermediarios del catabolismo de dichos aminoácidos), cuyos productos de descomposición son los compuestos que imparten a la orina su olor caracterís-

15 El jarabe de arce es un dulce, muy consumido en Norteamérica, fabricado a partir de la savia de diversas especies de arce. Ese árbol es un emblema de Canadá, al punto de que su hoja está representada en la bandera de dicho país.

tico a jarabe de arce; y también se elevan los niveles de leucina que puede provocar una encefalopatía aguda, la que debe ser prontamente tratada con una dieta baja en aminoácidos ramificados para reducir el riesgo de muerte (Metzler, 2002). Por otro lado, como ejemplo de las acidemias orgánicas, están las así llamadas “acidemias valérica, metilmalónica y propiónica”, por el nombre de los ácidos orgánicos involucrados. Las manifestaciones clínicas de estas acidemias varían desde consecuencias clínicas no observables hasta mortalidad neonatal. Retardos en el desarrollo, convulsiones, alteraciones sensoriales o alteraciones en el comportamiento ocurren en más de la mitad de los casos. Otro ejemplo es la acidemia glutárica de tipo I, un desorden del metabolismo de los aminoácidos lisina, hidroxilisina y triptófano causado por deficiencia de otra enzima específica. En esta condición, el ácido glutárico y el 3-hidroxiglutarico, formados en el camino catabólico de los aminoácidos mencionados, se acumulan especialmente en la orina. En estos casos el análisis de los ácidos orgánicos en orina indica la presencia de un exceso de ácido 3-hidroxiglutarico. Quienes poseen una afección por esta acidemia particular pueden sufrir de atrofia cerebral y macrocefalia, y también distonía secundaria aguda entre los seis y dieciocho meses de edad.¹⁶ La terapia en estos casos consiste en suplementación con carnitina, compuesto que ayuda a remover el ácido glutárico en exceso, una dieta restringida en aminoácidos capaces de producir ácido glutárico, y un rápido tratamiento de enfermedades secundarias, como ciertas infecciones (Pasquali y Sawyer, 2008). El diagnóstico rápido y la terapia adecuada reducen el riesgo de distonía aguda.

16 La distonía es un síndrome de contracciones sostenidas que causan movimientos de torsión y repetitivos o posturas anormales.

4. Protocolos de análisis de ácidos orgánicos en orina

4.1 Preparación de la muestra

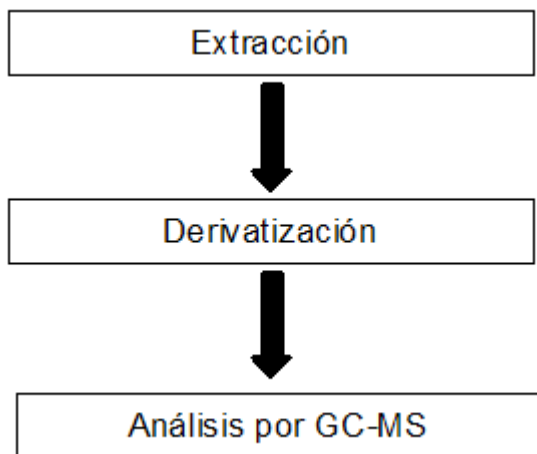
Todos los ácidos orgánicos mencionados en la sección anterior se excretan en orina. La orina es un fluido biológico que contiene cientos de ácidos orgánicos diferentes provenientes del metabolismo normal y anormal. Estos ácidos orgánicos en orina, normales y anormales, pueden ser rápidamente detectados mediante técnicas de GC-MS; y por esta característica estas se han convertido en la base del diagnóstico de los errores congénitos del metabolismo de ácidos orgánicos y aminoácidos, como los recién descritos (Jones y Bennett, 2010).

Dentro de las diversas variantes de la espectrometría de masa, la recién mencionada GC-MS, o la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masa (LC-MS, por su sigla en inglés), son las formas que se encuentran consolidadas en diversas áreas clínicas, ya que estas técnicas ofrecen un mayor nivel de sensibilidad y especificidad, comparadas con otras técnicas usuales en los laboratorios de análisis clínicos, en particular en la detección de trastornos metabólicos (Garg y Hammett-Stabler, 2010). Por ejemplo, en bioquímica se suelen utilizar reacciones colorimétricas, una para cada metabolito, mientras que la espectrometría de masa permite detectar centenares de ellos en un único análisis.

Ahora bien, los instrumentos de GC-MS no pueden analizar directamente una muestra de orina como tal en búsqueda de cualquier compuesto, incluidos los ácidos orgánicos. Antes, estos ácidos deben ser adecuadamente extraídos de la orina siguiendo un protocolo detallado.

El protocolo general que se utiliza para el estudio de los ácidos orgánicos en muestras de orina comprende tres etapas que pueden resumirse en el siguiente esquema:

Figura 2
Etapas del protocolo general



¿Cuál es la necesidad de cada etapa? ¿Qué se hace en cada una de ellas?

La etapa de extracción debe efectuarse porque los ácidos orgánicos producto del metabolismo normal y patológico, a los valores normales de pH de la orina, se encuentran solubilizados en agua en forma de sales. Entonces, para poder extraer estas sustancias con solvente orgánico (un líquido inmiscible con agua, por ejemplo, acetato de etilo o cloroformo) se debe previamente acidificar la orina para hacer que los ácidos orgánicos sean más solubles en el solvente orgánico que en agua. Estos dos líquidos se separan como el agua del aceite de cocina, y el solvente orgánico retiene los ácidos orgánicos en los que estamos interesados. De esta

manera conseguimos aislar estos compuestos, separándolos de todos los demás componentes solubles en agua de la orina.

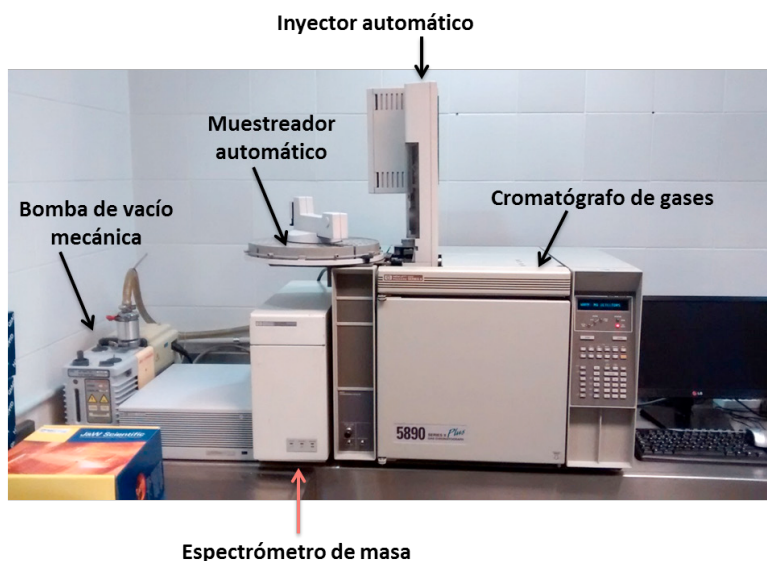
Los ácidos orgánicos como tales son sustancias sensibles a altas temperaturas y de baja volatilidad, poco aptas para el análisis por cromatografía de gases, técnica analítica que se aplica a sustancias de volatilidad media y alta, es decir, a sustancias que pueden pasar fácilmente a fase gaseosa. Por esta razón, los ácidos orgánicos deben ser transformados químicamente en compuestos de mayor estabilidad térmica y mayor volatilidad previamente a su análisis por cromatografía de gases. Con este propósito, la solución orgánica que contiene los ácidos carboxílicos se lleva primero a sequedad por evaporación del solvente, al residuo así obtenido se le agrega un reactivo líquido, y la solución resultante se calienta en tubo cerrado durante unas dos horas (este es, en general, el protocolo actualmente en uso en diversos laboratorios internacionales de análisis clínicos).

Estas etapas de extracción y derivatización se realizan siguiendo detalladamente un protocolo puesto a punto previamente. En cierto sentido, estos protocolos son similares a una receta de cocina, una receta que se sigue en la “cocina” que es el laboratorio químico. Pero, si en algo se diferencian estos protocolos con la elaboración de cualquier receta de cocina, es en la absoluta puntilliosidad con la que hay que trabajar. Un cocinero puede decidir poner más o menos huevos, batir más una crema, o guiarse por el instinto y dejar un tiempo más una preparación en el horno. En ciencia, dentro de un laboratorio, esto no puede suceder; las cantidades, los tiempos y los demás detalles de los protocolos deben ser absolutamente respetados. Si hay una reacción debe efectuarse a 70 °C, deben ser 70 °C exactos. Cualquier cambio podría modificar el resultado y llevaría a conclusiones inciertas. Por esto, las modificaciones que introdujimos en los protocolos de trabajo

respecto a los métodos en curso, son algo más laboriosas de lo que puede suponerse. Solo puede modificarse una variable por vez (por ejemplo, el tiempo de centrifugación), realizar el ensayo completo, y compararlo estadísticamente con el protocolo original para analizar cuáles, si las hay, son las diferencias.

El extracto final obtenido luego de la segunda etapa, que contiene de unos treinta a cuarenta compuestos diferentes, se inyecta luego en el instrumento de GC-MS. Abajo puede observarse una fotografía (Figura 2) del equipo de GC-MS actualmente instalado en el Centro de Medicina Traslacional (CEMET) del Hospital El Cruce (HEC).

Figura 3
Equipo de GC-MS



4.2 El recorrido de las moléculas en el equipo de GC-MS: un largo camino a casa

La muestra líquida, preparada como se explicó, se introduce en el cromatógrafo de gases (GC), mediante un inyector automático provisto de una jeringa de inyección (que no es más que una jeringa robotizada). Luego de esto, el helio utilizado como gas de transporte arrastra a los compuestos de la mezcla inyectada hacia la columna capilar,¹⁷ el corazón del instrumento de cromatografía de gases, que se encuentra en el interior de un horno.

El término “columna” no describe en ningún aspecto a la idea habitual de una columna, y su etimología responde a motivos históricos; si bien hay muchos tipos de columnas cromatográficas, las columnas utilizadas en GC el lector debe imaginarlas como el recubrimiento plástico que reviste el cobre de un cable eléctrico. De hecho, las columnas típicas suelen tener un diámetro de 0,25 milímetros y un largo de ¡30 metros! Está en el interior del horno como si fuera un cable eléctrico enrollado, pero con una cubierta plástica resistente a altas temperaturas. En las paredes interiores de esta larga cañería que llamamos “columna cromatográfica” hay una pequeñísima capa de una sustancia polimérica específicamente diseñada. A medida que los componentes de la mezcla inyectada transcurren por esta columna, se adhieren a este material polimérico: algunos se adhieren con mucha fuerza y otros apenas están ligados. Así, lo que se logra con esta técnica es un efecto sencillo pero poderoso: las moléculas de la muestra salen de la columna de a una por vez. Parece un pequeño logro, pero uno de los grandes desafíos de la

17 El helio es el segundo elemento más liviano de la tabla periódica y el segundo elemento más abundante del universo.

química analítica ha sido siempre la separación de componentes individuales de una muestra compleja.

Hacemos notar dos cosas:

- 1) Primero, en el proceso de preparación de la muestra se separa un conjunto de metabolitos sacándolos de la orina.
- 2) Luego se introducen en un equipo de GC para que cada metabolito se separe del otro. El metabolito que más se adhiere al material del interior de la columna será el último en salir. Lo contrario también es cierto: el primero en salir será aquel que apenas sienta algún tipo de atracción hacia dicho material.

Como mencionamos, el cromatógrafo de gases está acoplado a un espectrómetro de masa, de manera tal que los componentes de la mezcla separados por el cromatógrafo ingresan de a uno por vez al espectrómetro de masa, y esto permite el registro individual del espectro de masa de cada ácido orgánico. Tenemos que tener en cuenta que son dos equipos distintos, un aparato de cromatografía gaseosa y un espectrómetro de masa, conectados directamente uno al otro. En la Figura 2 se pueden apreciar los dos equipos uno al lado del otro. De esta manera, la salida del GC a través de un corto tubo se conecta a la entrada del MS. Así, los compuestos separados en el GC entran de a uno por vez en el MS para ser analizados.

Lo primero que les ocurre en su ingreso al nuevo equipo son dos cosas:

- 1) Por un lado, las moléculas se “rompen” en fragmentos más pequeños.

- 2) Los fragmentos generados quedan con una carga eléctrica positiva. Como a las especies químicas con cargas se las conoce en química con el nombre de “iones”, esta primera parte del equipo se llama fuente de ionización.

Una vez que los compuestos pasan la fuente de ionización, solo les queda un corto recorrido: deberán pasar por un analizador, para luego impactar en un detector y terminar su camino, que comenzó en la inyección de la muestra en el equipo de GC por parte de la jeringa automática.

Se han desarrollado diversos tipos de analizadores, basados en distintos fundamentos físicos. Así como la columna cromatográfica era el corazón de la cromatografía gaseosa, el analizador es el núcleo de la espectrometría de masa. En nuestro caso, hemos utilizado un analizador llamado “cuadrupolo”. Está formado por cuatro varillas cilíndricas metálicas centradas simétricamente alrededor de un eje, y de ahí proviene su nombre. Su funcionamiento escapa a los alcances de esta breve descripción; solo nos interesa el objetivo de este cuadrupolo. Todos los analizadores tienen como fin último que los fragmentos que se generaron en la fuente de iones (recuérdese que cada molécula fue “rota” en pequeñas partes o fragmentos, y que cada fragmento tenía una carga positiva) llegue de a uno por vez al detector.

Por último, el detector no solo detectará los fragmentos, sino que también será capaz de generar una señal que será tan intensa como la cantidad de que exista de cada uno de los fragmentos: si en la fuente de ionización se han generado pocos fragmentos de un ion en particular, esto se verá como una señal pequeña; por el contrario, si un fragmento es muy abundante, la señal será bien intensa.

Resumamos un poco entonces el funcionamiento de estos dos equipos acoplados, y el largo camino que recorre la muestra la ser inyectada:

- 1) Al pasar por la columna cromatográfica del equipo de GC, cada molécula de la muestra es separada, de tal manera que van saliendo de a uno, para ingresar de manera individual al segundo equipo.
- 2) En el espectrómetro de masa, cada molécula es dividida en pequeños fragmentos los cuales atraviesan el detector, que permite que se los detecte de a uno por vez.

Una de las características más importantes del espectrómetro de masa es que permite asignar a cada fragmento un peso, es decir, una masa. El nombre del equipo proviene de este hecho: una molécula se fragmenta en distintos trozos, los cuales son detectados de acuerdo a su cantidad y masa. De esta manera, el resultado que brinda el espectrómetro de masa es un gráfico de abundancia en función de la masa. Estos gráficos son muy complejos y difíciles de analizar. Pero el químico especializado puede obtener muchísima información de su análisis, como la masa de la molécula original, y muchos aspectos de la estructura e identidad del compuesto.

Es interesante entender que ambos equipos pueden utilizarse por separado, que era como se trabajaba con anterioridad a la posibilidad de hacerlos trabajar en serie. Si uno quería obtener el espectro de masa de un compuesto, debía primero obtener cierta cantidad de dicho compuesto de la forma más pura posible, para luego introducirlo en un espectrómetro de masa. Este proceso de purificación es algo bastante tedioso y que implica cierto tiempo. Al acoplarlos en serie se logra llevar cabo este trabajo en tan solo unos minutos.

Por su parte, las muestras biológicas deben entenderse como algo muy complejo. En una muestra de sangre, la cantidad de moléculas puede ser verdaderamente grande, inmensa. Miles y miles de compuestos. En general, en el laboratorio de análisis clínicos, las moléculas detectadas (glucosa, triglicéridos, enzimas hepáticas, ácido úrico etc., etc.) suelen detectarse de a una por vez. Necesitamos de una reacción química para cada una de ellas. La espectrometría de masa, acoplada a una técnica cromatográfica, permite resolver mezclas complejas en muy poco tiempo. Este es el caso de nuestro trabajo. Sin este equipo deberíamos buscar cada uno de los ácidos orgánicos que producen la acidemia por separado, con el costo y el tiempo que conlleva, para cada uno de los recién nacidos. Gracias a esta nueva herramienta tecnológica, se resuelve de manera rutinaria en pocos minutos. Más adelante mostraremos cómo este equipo de trabajo ha logrado disminuir más todavía el tiempo que habitualmente llevaba resolver este análisis, bajando aún más los costos y aumentando la cantidad de análisis diarios potenciales.

4.3 Un espectro de masa. Un caso detectivesco

Falta un último paso, luego de este largo recorrido, de esta suerte de epopeya que los compuestos de la muestra han realizado a través del cromatógrafo gaseoso, y del equipo de espectrometría de masa, para haber tratado todos los aspectos de las técnicas utilizadas. Este aspecto tiene que ver con la siguiente pregunta: ¿cuál es la utilidad de obtener un espectro de masa para cada una de las moléculas inyectadas?

Ya hemos anticipado un poco más arriba que el análisis de un espectro de masa puede no ser una tarea sencilla y requerir de conocimientos de química avanzada. Pero creemos que algunos aspectos pueden ser tratados para una mejor comprensión de la potencia y los alcances

de esta técnica. La Figura 5 muestra el espectro de masa del ácido metilmalónico derivatizado (recuérdese que vamos a obtener un espectro de este tipo para cada una de las moléculas que secuencialmente vayan ingresando al MS).¹⁸ Sin lugar a dudas, parece algo complicado. En el eje vertical está la escala de abundancia, que muestra la cantidad de un determinado fragmento que ha sido detectada. En el eje horizontal, se muestra la masa o el peso de cada fragmento que llegó al detector. Lo primero que se observa es que los fragmentos no son iguales y no tienen la misma abundancia. Imaginémonos que tiramos un vaso de vidrio al piso y este se rompe. Los fragmentos del vaso no serán todos iguales. Podríamos con una balanza, ordenar esos fragmentos de acuerdo con su masa. Eso es lo que se grafica en el eje horizontal. Sin embargo, podemos incluso continuar con la analogía, pero pensando en que no llega una molécula al espectrómetro de masa, sino que llegan millones de moléculas exactamente iguales. Sería como romper mil vasos y luego contar cuantos pedazos tenemos del mismo tamaño. Esto es lo que se muestra en el eje vertical: la cantidad de cada uno de los fragmentos. Cuanto más alta la señal, mayor la cantidad de un determinado fragmento. Esta analogía con el vaso roto, es útil, porque la tarea del químico será deducir la forma del vaso a través de los pedazos que se encuentran en el piso.¹⁹

18 Cuando la concentración de este compuesto está muy elevada estamos frente a una acidemia metilmalónica.

19 Para que los fragmentos generados en la fuente no sigan rompiéndose dando fragmentos más chicos que complicarían el trabajo de deducción, todos los componentes de un espectrómetro de masa deben estar mantenidos en un ambiente evacuado de aire. Esto se consigue mediante un sistema de bombas de vacío: una bomba mecánica y otra de alto vacío. Así se consigue una presión en el interior del espectrómetro del orden de la millonésima parte de un hectopascal, presión mil millones de veces inferior a la presión atmosférica.

¿Difícil? Podríamos decir que a veces sí, y a veces, no. A veces nunca se logra determinar la estructura exacta de un compuesto.

Con un equipo de GC-MS puede ser más sencillo o, mejor dicho: quien se dedica a la química puede contar con herramientas adicionales. Muchas veces se compara un espectro de masa obtenido por GC-MS con una *huella dactilar*, en el sentido de que existe una única huella dactilar para cada individuo; de la misma manera, existe un único espectro de masa para cada compuesto. Muchas veces se habrá observado en una película o serie policial, que quienes investigan esperan horas en un pasillo el resultado del estudio de una huella dactilar. Porque una vez que se obtiene la huella dactilar se está muy cerca de averiguar la verdadera identidad de un criminal. De alguna manera, quien se dedica a la química se enfrenta a una tarea muy parecida al buscar la estructura de un compuesto. También, al igual que quien se dedica a la investigación policial, que cuenta con una base de datos de huellas dactilares, quien investiga en química posee bases de datos que contienen una enorme cantidad de espectros, y con un programa que permite comparar esta gran cantidad de espectros con el espectro incógnita. Así, por simple analogía, muchas veces se puede resolver cuál es la estructura y el nombre del compuesto de una muestra.

Pero el trabajo del detective no se remite únicamente a la búsqueda de huellas dactilares, también debe recabar otro tipo de información, descripciones del sujeto, posibles zonas donde viva, lugares que frecuenta, antecedentes, y demás datos. Quien investiga en química también puede recabar otros datos acerca del compuesto que quiere identificar (si es un lípido, si es un hidrato de carbono, si es ácido, cuánto tiempo le llevó atravesar la columna cromatográfica, etc.). Y así como a veces la huella digital no se encuentra en la base de datos, y el caso policial se termina resolviendo por el instinto y la experiencia de la persona a cargo de la investigación, en la resolución de la estructura

de un compuesto también juegan un rol importante los conocimientos químicos de quien realiza la interpretación manual de los espectros, ya que también suele suceder que el espectro incógnito no esté en la base de datos, y, en estas circunstancias, el sistema de procesamiento de datos puede proponer estructuras erróneas.

Una pieza de información que un espectro de masa puede brindar con facilidad es el peso molecular del compuesto. Esto se puede determinar debido a un pico muy buscado en un espectro, conocido como “ion molecular”. Siguiendo con la analogía del vaso de vidrio, sucede que muchas veces el vaso de vidrio no se rompe al arrojarlo al piso, es decir que muchas moléculas atraviesan la fuente de ionización sin fragmentarse; sin romperse, pasan intactas hasta el detector habiendo adquirido una carga positiva. De ahí el nombre de este pico: ion, porque posee una carga; molecular, debido a que es la molécula entera. Por supuesto que se va a tratar de la molécula de mayor tamaño que haya atravesado el analizador, por lo tanto, aparecerá a la derecha del gráfico entre los picos de mayor masa. En el caso del compuesto de la Figura 5, se trata del pico de masa 246. Esto es uno de los grandes alcances de la espectrometría de masa. Logra determinar la masa exacta de un compuesto con la mayor exactitud posible de todos los métodos conocidos.

Y esto no es todo. El total de iones pertenecientes a una determinada especie química, es decir, el conjunto de todos los diferentes fragmentos del vaso roto en nuestra analogía, es registrado durante todo el tiempo que reside en el espectrómetro de masa, desde su generación hasta su detección,²⁰ formando así una señal de forma gaussiana (simi-

20 El tiempo transcurrido entre la generación y la detección de los iones es del orden de los milisegundos.

lar a una campana en el mejor de los casos) cuya área se calcula. Esta área es proporcional a la cantidad del compuesto presente originalmente en la orina, de manera que, midiéndola, puede tenerse un valor de concentración del compuesto en orina (miligramos por litro, por ejemplo), valor que rápidamente puede asociarse a condiciones normales o patológicas del metabolismo. Puede observarse estas señales en forma, aproximada, de campana, o de montaña, en la Figura 4.

5. Rápido y valioso

En este trabajo no se debía hallar ningún compuesto desconocido. Ninguna investigación de ese tipo fue necesaria, ya que se supo desde un comienzo cuáles eran los metabolitos a buscar. Cada metabolito (doce en total) cuya concentración aparece alterada en orina, en cada una de las acidemias orgánicas se compró a empresas especializadas en la venta de compuestos orgánicos. Estos compuestos, que uno tiene de antemano y de forma purificada, se conocen como “patrones”, y se los utilizó para poner a punto el equipo de GC-MS y obtener de cada uno de ellos el correspondiente espectro de masa.

Con una mezcla de estos doce metabolitos patrones comenzó a ponerse a punto el nuevo método analítico.

Los métodos de análisis de ácidos orgánicos en orina usados en la actualidad por diversos laboratorios internacionales de análisis clínicos hacen uso de dos etapas de extracción con solvente orgánico para el aislamiento y separación de los ácidos orgánicos de la muestra de orina, hasta dos horas de reacción en la etapa de derivatización de los ácidos orgánicos, y un programa de cromatografía de gases de unos 67 minutos de duración. Por todo esto, nuestro trabajo de investigación se enfocó a estudiar alternativas al protocolo estándar de análisis de ácidos orgánicos en orina que resultaran en un método general optimizado

de menor tiempo de duración por muestra, desde el inicio de la preparación de la muestra de orina hasta el informe final de los resultados.²¹

En el presente trabajo, hemos conseguido reducir el tiempo de estos dos pasos: en el caso de la extracción, en vez de las dos etapas de extracción del protocolo original, nosotros solo empleamos una etapa de extracción con solvente orgánico. Por otro lado, redujimos el tiempo de transformación química en la derivatización de los ácidos orgánicos, de dos horas a treinta minutos subiendo solo 10 °C la temperatura de la reacción.

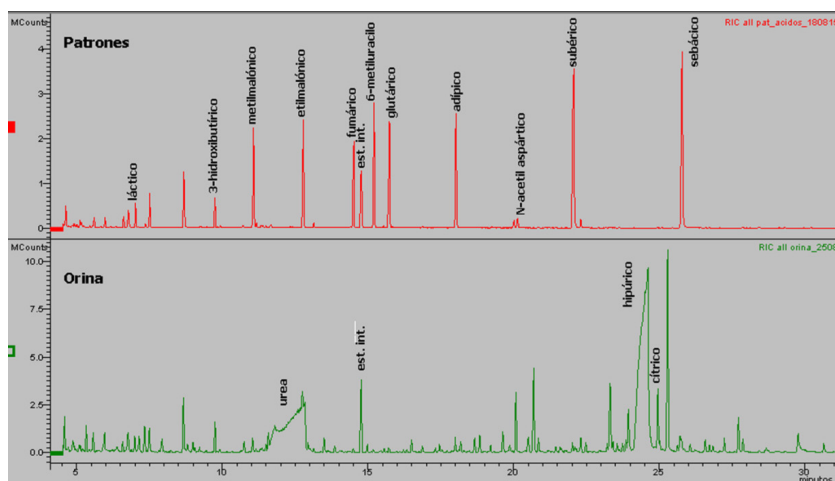
En la Figura 4 se presenta un gráfico denominado “cromatograma” de una muestra de orina. Este gráfico muestra cómo van saliendo los distintos compuestos, luego de ser separados en el equipo de cromatografía gaseosa y ser detectados en el espectrómetro de masa. El eje horizontal es el tiempo, y cada vez que sale del equipo un metabolito, aumenta la señal al ser detectado. Cada “montaña” del gráfico corresponde a un compuesto específico. Como se mencionó, el área bajo la curva de estas “montañas” es la que permite tener una idea si el metabolito en cuestión presenta un valor normal o anormal. En este último caso estas “montañas” serían notoriamente más altas que las correspondientes a valores normales. Como se observa en el eje x de dicho gráfico (la escala temporal), el tiempo total del análisis instrumental es de 31 minutos, lo cual implica una sustantiva reducción de unos 35 minutos respecto al tiempo de análisis de los métodos corrientes en uso

21 Las tareas iniciales del proyecto se desarrollaron en el Laboratorio de Control de Doping del Centro Nacional de Alto Rendimiento Deportivo (CeNARD), dependiente de la Secretaría de Deporte de la Nación, gracias al establecimiento de un convenio de cooperación informal entre dicho Laboratorio y este grupo de investigación.

en laboratorios internacionales. Es muy significativo que esta reducción temporal se haya conseguido sin sacrificar resolución cromatográfica,²² es decir, la capacidad del método cromatográfico de separar compuestos que presentan tiempos de retención muy próximos. Una adecuada resolución cromatográfica es necesaria para lograr que todos los compuestos lleguen a distintos tiempos al espectrómetro de masa, ya que, si dos compuestos ingresan superpuestos provocan errores cualitativos y cuantitativos.

Figura 4

Cromatograma total de iones de una muestra de orina normal

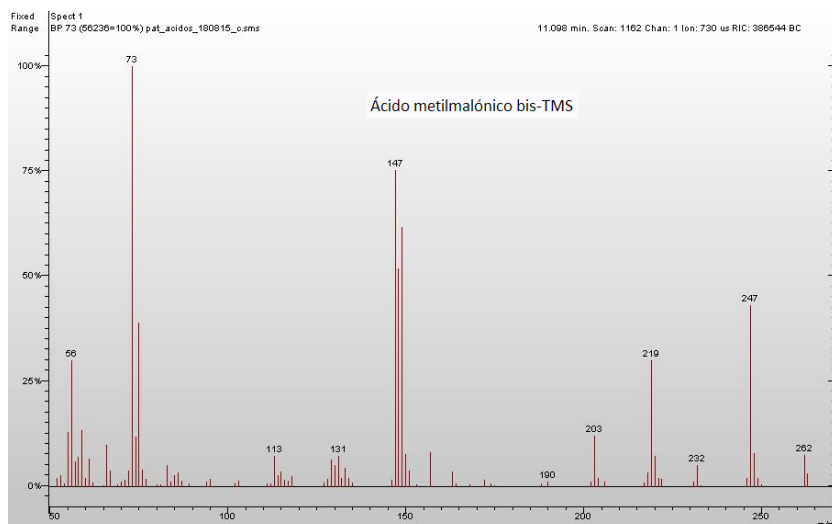


En resumen, el método que conseguimos poner a punto ha resultado en una reducción del tiempo de preparación de un lote de muestras en

22 Esto se manifiesta, en particular, en la separación entre los ácidos hipúrico y cítrico conseguida con nuestro método (Figura 4).

una hora y media hora; y media hora menos en el análisis instrumental. Estos menores tiempos analíticos son cruciales para informar más rápidamente los resultados al médico pediatra responsable del seguimiento clínico del paciente.

Figura 5
Espectro de masa del ácido metilmalónico derivatizado



6. Conclusiones

Las enfermedades metabólicas que las técnicas de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa permiten diagnosticar de manera efectiva y rápida son enfermedades que, de no tratarse a tiempo, traen aparejados trastornos neurológicos irreversibles y pueden llevar a la muerte. La modificación de la dieta evitando ciertos alimentos y agregando suplementos especiales puede lograr, en muchos casos, que el paciente tenga una mejor calidad de vida y evitar las secuelas neurológicas. Para esto, hay que diagnosticar estas en-

fermedades antes de que aparezcan los síntomas; por ejemplo, con la tecnología que acabamos de presentar. Debido a que la evolución depende de cada persona y pueden manifestarse a distintas edades, su diagnóstico no es tan sencillo para el médico clínico; y, por lo general, al ser detectada ya es tarde.

Cada una de estas acidemias orgánicas por sí misma tiene baja prevalencia y se las clasifica como enfermedades raras. Pero el conjunto de todas estas enfermedades comienza a ser no tan raro. Aquí es donde la aplicación de la espectrometría de masa marca sin dudas un gran avance, ya que permite la detección en un solo análisis de relativamente poco tiempo, la detección de muchísimas enfermedades, que de ser buscadas una a una, a través de ensayos bioquímicos individuales llevarían muchísimo tiempo y dinero. La espectrometría de masa hace posible la implementación de planes de pesquisa generales para la detección de estas enfermedades, a realizarse en todo recién nacido de manera rutinaria. Téngase en cuenta que para nuestro protocolo de trabajo solo se necesitan unos pocos mililitros de orina.

El protocolo desarrollado significa un gran avance metodológico en comparación con los protocolos en uso en laboratorios de análisis clínicos de hospitales de niños de diversos países, ya que la modificación del método de preparación de la muestra de orina, y la reducción del tiempo de análisis por GC-MS implica acortar en unas dos horas el tiempo total de análisis. Pensemos que, como nuestro método reduce el tiempo de análisis instrumental de 60 a 30 minutos aproximadamente, si para el procesamiento instrumental de unas 100 muestras con el método tradicional serían necesarios unos trece días con jornadas de ocho horas, con nuestro protocolo en cambio, se necesitarían solo unos seis días. Es decir que en la misma cantidad de tiempo se estarían evaluando al doble de recién nacidos, y esto en una búsqueda poblacional es muy relevante. Además, podemos anali-

zar el lado económico, algo que también es muy importante a la hora de establecer un control neonatal a una población numerosa. Resulta que las columnas de cromatografía tienen un tiempo de vida limitado de acuerdo al uso; en la cromatografía gaseosa se utiliza un gas que cada vez es más caro a nivel mundial, el helio; además de insumos que habitualmente no se tienen en cuenta como es la energía eléctrica. En este sentido, nuestro método presenta también una disminución del costo por cada uno de los análisis realizados.

Finalmente, esperamos que en algún momento esta metodología analítica, desarrollada en el contexto de la medicina traslacional, pueda ser transferida a algún hospital que decida implementar un servicio de análisis de ácidos orgánicos en orina de neonatos, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa, para ofrecerlo a la comunidad de su zona de influencia; un servicio que podría significar la diferencia entre una vida con trastornos neurológicos irreversibles, o una vida sana y plena para muchos bebés y sus familias.²³

23 El equipamiento mostrado en la Figura 3 se encuentra disponible en el HEC gracias a las gestiones realizadas por uno de los autores de este trabajo y el entonces director del hospital Dr. Arnaldo Medina. Los autores de este trabajo estarán siempre a disposición para el asesoramiento y la colaboración en la puesta a punto de estos protocolos analíticos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS |

- Caballero, G. y García, M. (2020). *Aplicaciones biomédicas de la espectrometría de masa. Del electrón de Thomson a la metabolómica*. Buenos Aires: UNAJ.
- Garg, U. y Hammett-Stabler, C. (2010). *Methods in Molecular Biology, 603 Clinical Applications of Mass Spectrometry*. Nueva York: Humana Press.
- Griffiths, J. (2008). A Brief History of Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 80(15), 5678-5683.
- Jones, P. y Bennett, M. (2010). Urine Organic Acid Analysis for Inherited Metabolic Disease Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. En U. Garg y C. Hammett-Stabler (Eds.), *Methods in Molecular Biology, 603 Clinical Applications of Mass Spectrometry* (pp. 423-432). Nueva York, Humana Press.
- Kanehisa, M. y Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27-30.
- Metzler, D. (2002). The Metabolism of Nitrogen and Amino Acids. En *Biochemistry: The Chemical Reactions of Living Cells* (p. 1394). San Diego: Academic Press.
- Oxford University Press (2016). *Oxford Essential Quotations* (4ta. ed.).
- Pasquali, M. y Sawyer, B. (2008). Newborn Screening. En C. Burtis, E. Ashwood, D. Bruns y B. Sawyer (Eds.), *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry* (pp. 825-835). Missouri: Saunders Elsevier.

Segura Munguía, S. (2014). *Diccionario etimológico de Medicina* (p. 17). Bilbao: Editorial Universidad de Deusto Publicaciones.

Shulman, G. y Petersen, K. (2017). Metabolism. En F. Boron y L. Boulpaep (Eds.), *Medical Physiology*. Filadelfia: Elsevier.

The Human Metabolome Database (2021). About the Human Metabolome Database. Recuperado de la base de datos The Human Metabolome Database.

Voet, D. y Voet, J. (2011). Metabolism. En *Biochemistry* (p. 559). New Jersey: John Wiley & Sons.

Gerardo Manuel Caballero

Licenciado y Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires. Profesor titular del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional Arturo Jauretche, y del Departamento de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Quilmes.

Autor y coautor de trabajos científicos publicados en revistas internacionales con referato en el campo de la química orgánica, la química analítica y la espectrometría de masa. Director del proyecto de investigación “Aplicaciones biomédicas de la Espectrometría de Masa” financiado por la UNAJ.

Mariano Hernán García

Bioquímico de la Universidad de Buenos Aires. Profesor adjunto del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional Arturo Jauretche. Ex docente de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, y de Odontología de la UBA, y de la Universidad Maimónides. Ha participado de proyectos, como investigador y codirector, en síntesis y caracterización de imidazolidinas, manejo de calcio en músculo liso, y metabólica. Autor y coautor de trabajos científicos en revistas internacionales con referato y de libros de divulgación científica. Actualmente se encuentra desarrollando su tesis doctoral vinculada a la metabólica.

Las acidemias orgánicas son un conjunto de enfermedades metabólicas hereditarias en las que una vía metabólica en particular presenta una alteración a nivel enzimático. En general suelen manifestarse en los primeros años de vida y, de no tratarse, siguen un curso letal. Debido a su baja frecuencia de aparición, son consideradas dentro del conjunto de “enfermedades raras”. El pronóstico de estas enfermedades ha mejorado mucho en los últimos años debido a su detección temprana gracias al surgimiento de nuevas tecnologías, ya que cuanto antes comienza el tratamiento, mejor será la prognosis del paciente y menores las secuelas, muchas de ellas neurológicas e irreversibles.

En este trabajo presentamos una mejora sobre un método de detección de acidemias orgánicas, basado en las técnicas de cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa, realizada en orina de recién nacidos. Esta mejora redunda en una mayor productividad del laboratorio, es decir, un mayor número de análisis realizables comparado con el método de referencia, como también en la concomitante disminución en los insumos utilizados.



ISBN 978-987-3679-90-2



9 789873 679902