

Centro Nacional de Investigaciones Científicas

RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR PROTONICA (RMN ^1H) EN EL DIAGNOSTICO DE DESORDENES METABOLICOS

Lic. Maritza Díaz Gómez,* Téc. Olga Galup Zayas,** Dr. Herman Vélez Castro*** y Dr. Aristides Rosado Pérez****

RESUMEN

La resonancia magnética nuclear protónica (RMN ^1H) es un método adecuado para la detección de metabolitos de orina humana, especialmente en casos de desórdenes metabólicos. La aplicación en el análisis clínico es de gran importancia, pues se pueden identificar los diferentes metabolitos de forma simultánea, de una manera rápida y simple, sin pretratamiento de la muestra. En este trabajo se reportan los espectros de RMN ^1H de la orina de niños aparentemente sanos y de 5 años que presentan diferentes desórdenes metabólicos, en los cuales fue posible confirmar el diagnóstico mediante la identificación de los metabolitos anómalos específicos de cada enfermedad. Se demuestra mediante estos ejemplos ilustrativos que la aplicación de la RMN ^1H al estudio de los errores congénitos del metabolismo, incluso con instrumentos de campo bajo (90 MHz), puede ser de mucha utilidad para el reconocimiento rápido de un gran número de estas enfermedades.

INTRODUCCION

La resonancia magnética nuclear protónica (RMN ^1H) es un método analítico poderoso que se ha utilizado en la detección e identificación de los metabolitos de diferentes medios fisiológicos: plasma,¹ suero^{2,3} y orina.^{4,5}

La técnica de RMN ^1H es capaz de detectar en pocos minutos todos los protones de los metabolitos orgánicos en un rango de concentración milimolar, por lo que puede ser usada para el diag-

nóstico rápido de un grupo de acidurias orgánicas hereditarias, entre las cuales se pueden citar: la acidemia propiónica, la aciduria metilmalónica, la cetoaciduria de cadena ramificada (jarabe de arce), la acidemia isovalérica y la aciduria glutárica tipo I.⁶ Muchos datos bioquímicos sobre estas enfermedades han sido obtenidos usando CG-EM. Sin embargo, esta metodología analítica implica un tiempo de análisis relativamente largo, así como una necesaria extracción previa de la muestra de orina. Por el contrario, la RMN ^1H puede ser llevada a cabo sin

* Investigador Agregado. Laboratorio Espectroscopia Molecular.

** Técnico Medio en Química. Laboratorio de Espectroscopia Molecular.

*** Investigador Titular. Laboratorio de Espectroscopia Molecular.

**** Investigador Titular. Laboratorio de Espectroscopia Molecular.

pretratamiento de la muestra y puede proveer un espectro diagnóstico en muy corto tiempo (de 5 a 10 minutos). En uno de los primeros trabajos sobre la aplicación de la RMN ^1H al estudio de enfermedades metabólicas, Nicholson⁷ plantea que la resolución de espectrómetro de 90 MHz es muy baja para la realización de mediciones cuantitativas, a causa de las interferencias presentadas y sugiere que se utilice un equipo de 250 a 400 MHz, por cuanto se minimiza el solapamiento de picos y los espectros ofrecen una mayor información. Sin embargo, Yamaguchi⁸ demostró posteriormente que si bien el uso del espectrómetro de 90 MHz no permitía un estudio detallado sobre la asignación y cuantificación de las señales, la resolución de estas últimas era suficiente para la identificación de metabolitos patológicos. De esto se concluyen que aún utilizando instrumentos de campo bajo, el método representa una ayuda muy valiosa para el diagnóstico rápido de diversos desórdenes innatos del metabolismo.

El objetivo de este trabajo es presentar nuestras experiencias preliminares sobre la aplicación de la RMN ^1H con la utilización de un espectrómetro de 90 MHz, en el estudio de pacientes que presentan diferentes desórdenes metabólicos.

MATERIAL Y METODO

Se recolectaron muestras de la primera orina de la mañana de 15 niños aparentemente sanos y de 5 niños con diferentes desórdenes metabólicos. Para la obtención de los espectros de RMN ^1H se introdujo 0,3 mL de este fluido en un tubo de 5 mm de diámetro externo, se añadió 0,02 mL de agua deuterada (D_2O), para mantener la relación campo-frecuencia constante, y DSS (sal sódica del ácido 3-trimetilsililpropanosulfónico) como referencia interna. Los espectros fueron registrados

en un equipo FX-90Q de la firma JEOL, con transformada de Fourier. Se utilizó el método HMG (gated homonuclear decoupling) para eliminar la señal intensa de los protones del agua, pulsos de 45°, un ancho de barrido de 900 Hz, 8 K de memoria interna y 4 s de repetición de pulso.

RESULTADOS Y DISCUSION

El espectro de RMN ^1H de la orina de un niño aparentemente sano se muestra en la figura 1. Se observa el doblete del grupo metilo de la alanina en 1,4 ppm, el doblete de los protones metilénicos del ácido cítrico en 2,6 ppm, el singlete de los protones metílicos de la creatina y creatinina en 3,02 ppm y los protones aromáticos del ácido hipúrico en 7,6 ppm. Las señales que aparecen entre 7 y 7,4 ppm son atribuibles a los protones derivados del fenol y del ácido benzoico. Todas estas señales fueron encontradas en 15 niños de control, aparentemente sanos, y se consideran compuestos químicos normales en la orina.

En la figura 2 se muestra el espectro de RMN ^1H de un niño con hiperglicinuria, lo que se demuestra por el desplazamiento químico del grupo metilénico de la glicina en 3,5 ppm. Esto fue comprobado al añadirse glicina a la muestra y obtenerse un incremento de esta señal.

La detección rápida de hiperglicinuria es un elemento muy importante en el estudio bioquímico de pacientes con sospecha de padecer un desorden innato del metabolismo, pues un gran número de estas patologías que evolucionan con aciduria orgánica presentan el incremento de glicemia en plasma y orina como una característica secundaria.

El espectro de RMN ^1H de la orina de un niño que excreta ácido láctico como componente mayoritario se muestra en la figura 3. Se observa el doblete del grupo metilo en 1,34 ppm.

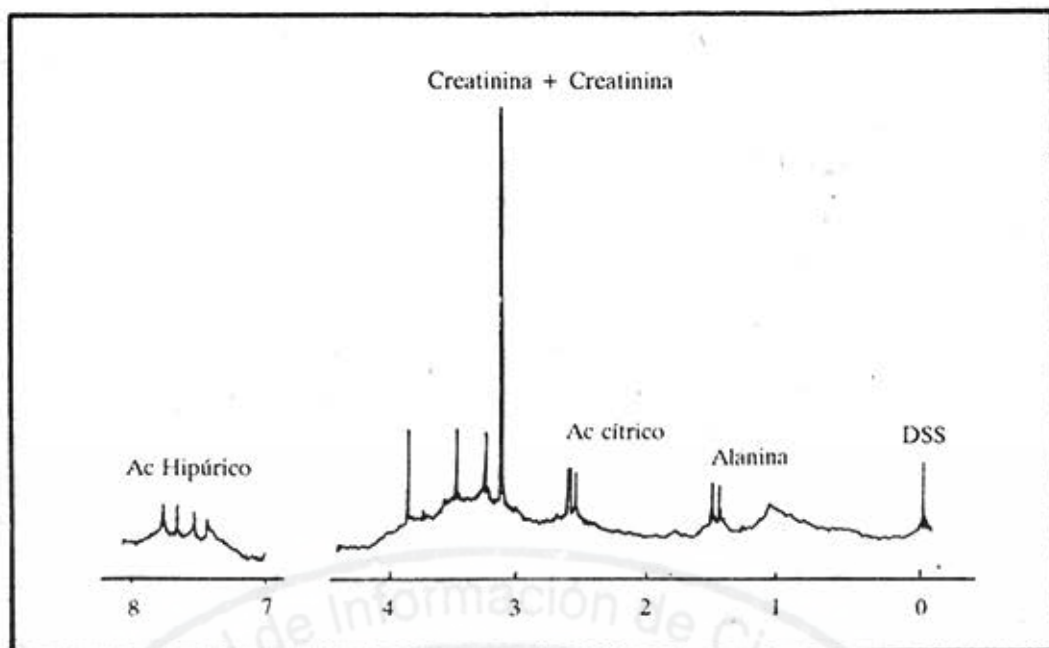


FIGURA 1. Espectro de RMN ^1H de la orina de un niño aparentemente sano.

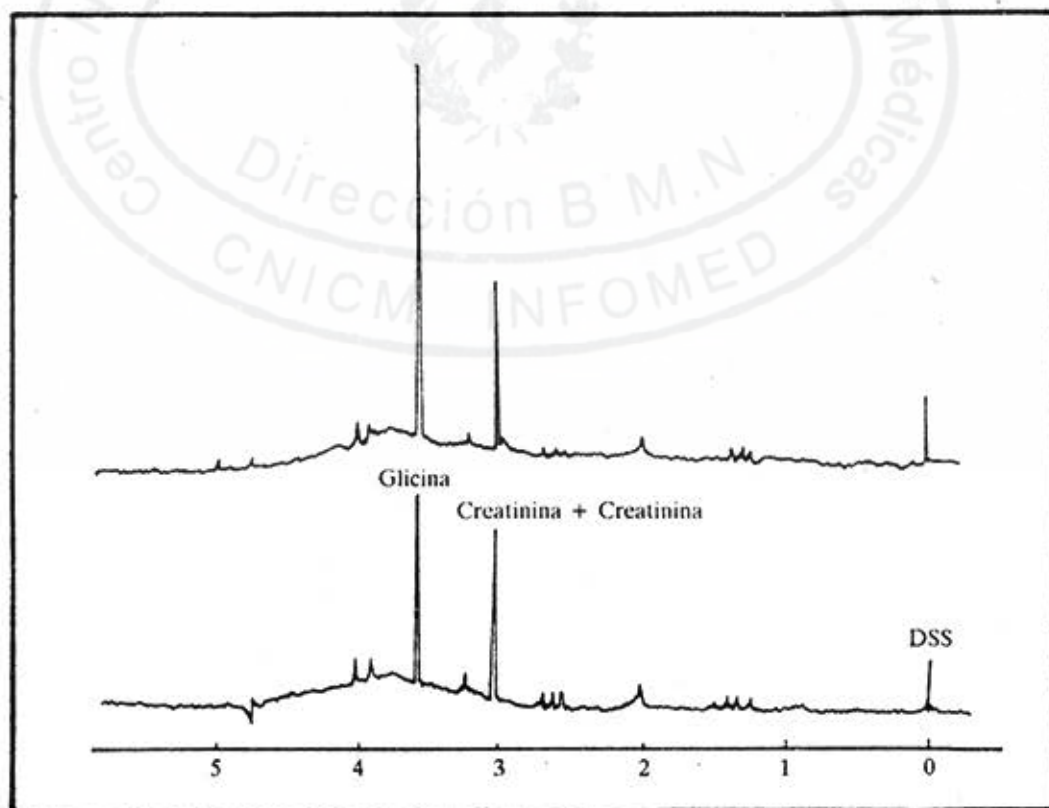


FIGURA 2. Espectro de RMN ^1H de la orina de un niño con hiperglicinuria.

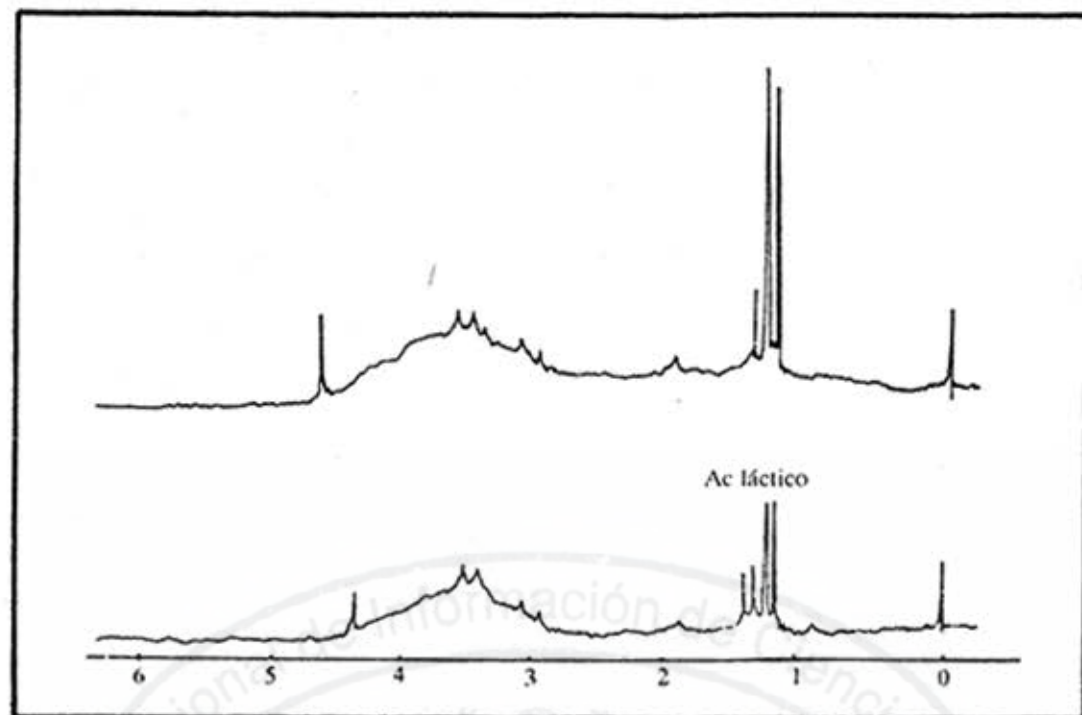


FIGURA 3. Espectro de RMN ^1H de la orina de un niño con acidosis láctica.

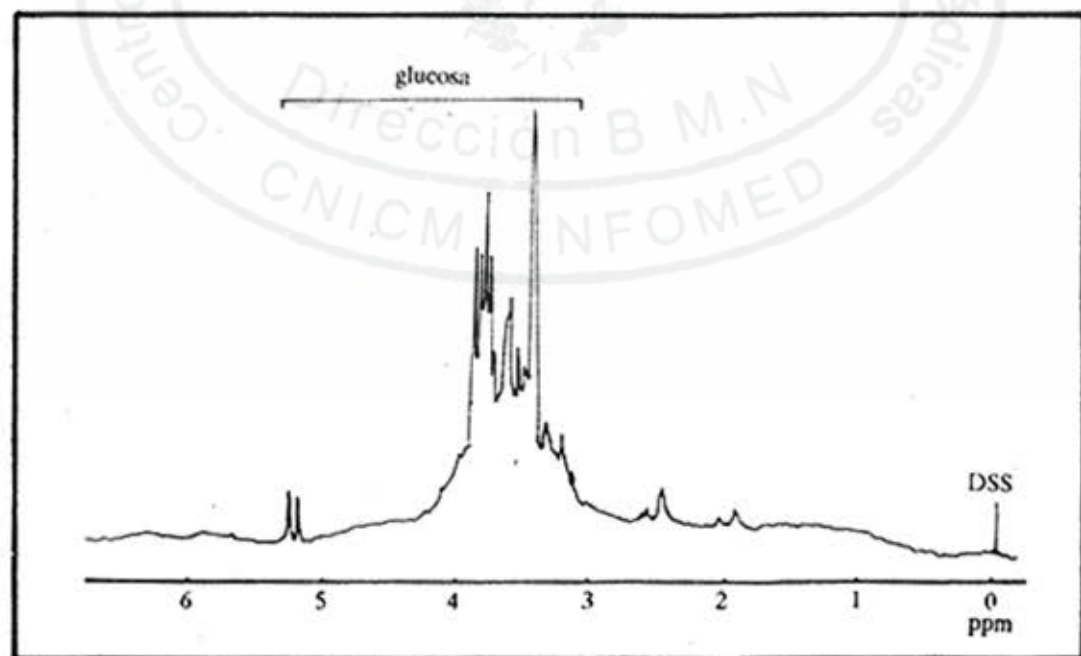


FIGURA 4. Espectro de RMN ^1H de la orina de un niño con diabetes mellitus.

La comprobación se realizó en forma idéntica al caso anterior. Finalmente la acidosis láctica severa fue confirmada mediante el estudio de la muestra de orina por el sistema CG-EM.

En la figura 4 se muestra el espectro de RMN ^1H de la orina de un niño que excreta como componente principal glucosa. Estas señales aparecen entre 3 y 5,3 ppm. Esto es indicativo de la existencia de diabetes mellitus en el paciente.

En la figura 5 se muestra el espectro de RMN ^1H de la orina de neonato en estado grave, en el cual se sospechaba de

una acidemia orgánica sobre la base de criterios clínicos. Se observa el singlete de los grupos metílicos de la acetona en 2,2 ppm como la señal más intensa, lo que evidencia el estado de cetosis severa. Además, se observan algunas señales de compuestos patológicos, como la propionilglicina, con su triplete del grupo metilo en 1,13 ppm y el cuarteto del grupo metilénico a 2,38 ppm. El ácido 3-hidroxibutírico aparece con su doblete del grupo metílico a 1,21 ppm y el triplete del grupo metilénico en 2,42 ppm; las señales de la tigilglicina resuenan a 1,83

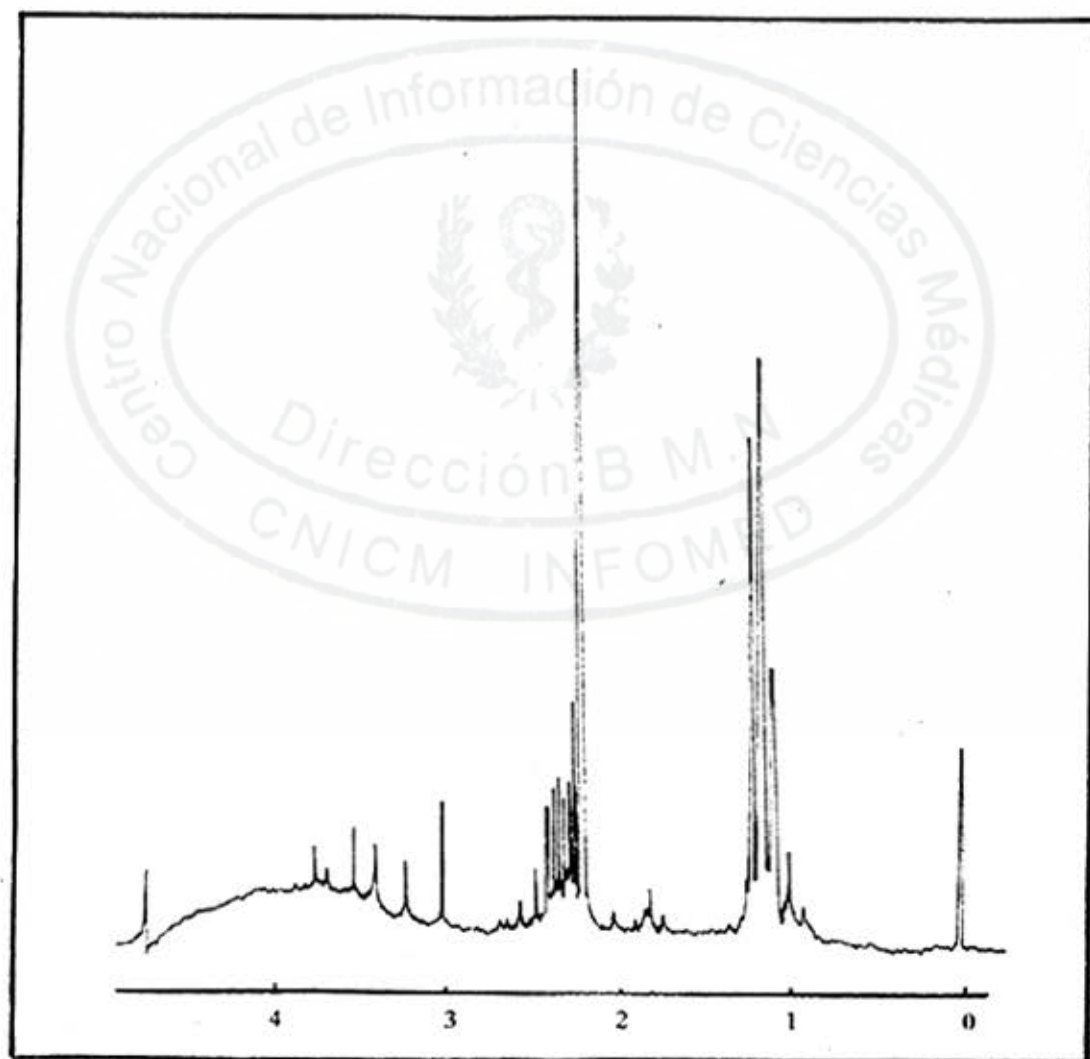


FIGURA 5. Espectro de RMN ^1H de la orina de un niño con acidemia propiónica.

y 1,85 ppm como doblete y singlete, respectivamente. Debe señalarse por último que la señal a 3,55 ppm correspondiente al grupo metilo de la glicina aparece algo incrementada lo que demuestra una ligera hiperglicinuria. Esta caracterización del espectro de RMN ^1H permitió diagnosticar de forma rápida y precisa que el paciente padecía de una acidemia propiónica (deficiencia del enzima propionil CoA carboxilasa).⁹

En la figura 6 se muestra el espectro de un niño que se encontraba en una sala de terapia intensiva, con sospechas clínicas de una aciduria orgánica. En el espectro de RMN ^1H se observa la señal de los grupos metílicos de la acetona a 2,2 ppm. Aparece, además el doblete del grupo metilo a 1,26 ppm y el cuarteto del grupo metínico a 3,33 ppm del ácido metilmalónico. La existencia de

este compuesto en el fluido se comprobó con la adición de una cantidad adicional de ácido metilmalónico y permitió diagnosticar el caso como una aciduria metilmalónica. Este caso respondió al tratamiento con vit B₁₂, y se observó una mejoría clínica del paciente.

Una de las ventajas de la espectroscopia de RMN ^1H es que cada señal del espectro corresponde a grupos funcionales de distintos compuestos químicos presentes en la orina que muestran diferentes desplazamientos químicos. Esto permite analizar la composición de mezclas complejas e identificar los metabolitos presentes en ellas.

La aplicación de la RMN ^1H es de gran importancia en el análisis clínico, debido a que permite identificar los metabolitos normales y patológicos de forma simultánea, de una manera rápida

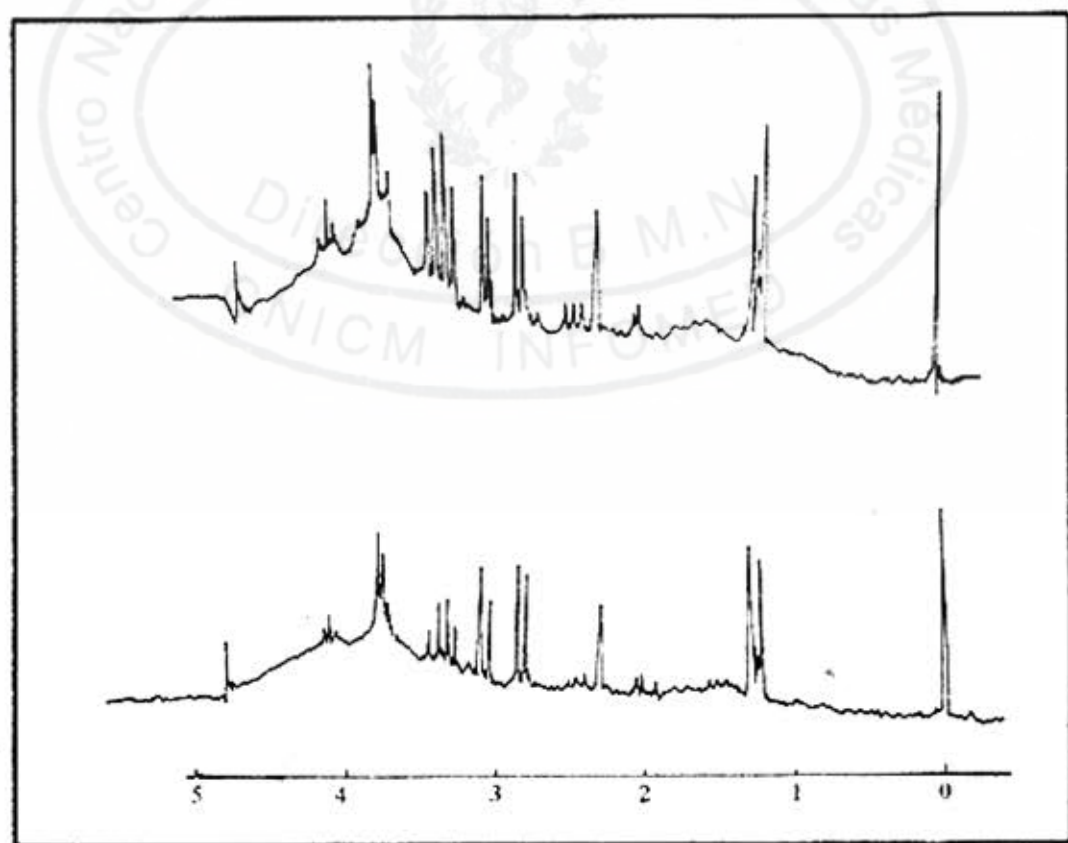


FIGURA 6. Espectro de RMN ^1H de la orina de un niño con aciduria metilmalónica.

y simple, sin pretratamiento de la muestra.

Existen diferencias entre los espectros de RMN ^1H de orina de niños aparentemente sanos y de enfermos con desórdenes metabólicos, que permiten la identificación de los metabolitos

anómalos.

Por lo costoso de estas técnicas, la RMN ^1H y la C6-EM no pueden ser utilizados para pesquisajes masivos de enfermedades metabólicas. No obstante, por su alta sensibilidad y resultados concluyentes, son los idóneos para la realización de un *screening* selectivo.

SUMMARY

Proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR) is an adequate method for the detection of human urine metabolites, especially in cases of metabolic disorders. Its application in clinical analysis is of great importance since different metabolites can be simultaneously identified in a simple and rapid form without a previous treatment of the sample. This paper reports on the spectra of ^1H NMR of the urine from seemingly healthy children and 5 children with different metabolic disorders, in whom the diagnosis could be evidenced by the identification of the anomalous metabolite specific for each disease. The application of ^1H NMR to the study of congenital errors of metabolism has proved to be very useful for a rapid recognition of a number of these diseases, even with low field instruments (90 MHz).

RESUME

La résonance magnétique nucléaire protonique (RMN ^1H) est une méthode adéquate pour le dépistage de métabolites d'urine humaine, notamment dans les cas de troubles métaboliques. Son application dans l'analyse clinique est d'une grande importance, puisqu'on peut identifier les différents métabolites simultanément d'une manière rapide et simple, sans traiter l'échantillon au préalable. Dans ce travail on rapporte les spectres de RMN ^1H de l'urine d'enfants apparemment sains et de 5 autres qui présentaient différents troubles métaboliques, chez lesquels il a été possible de confirmer le diagnostic au moyen de l'identification des métabolites anormaux spécifiques de chaque maladie. Au moyen de ces exemples, on démontre que l'application de la RMN ^1H à l'étude des erreurs congénitales du métabolisme, même avec des instruments à faible champ (90 MHz), peut être d'une grande utilité pour le dépistage rapide d'un grand nombre de ces maladies.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Bell J. ^1H NMR studies of human blood plasma, Federation of European Biochemical Societies Letters 1987;219:239-243.
2. Wilding P. Assessment of proton NMR spectroscopy for detection of malignancy. Clinical Chemistry 1988;34:503-511.
3. Boek J. Analysis of serum by High-field proton nuclear magnetic resonance, Clinical Chemistry 1982;28:1873-1877.
4. Bates J. Use of High-Resolution proton nuclear magnetic resonance spectroscopy for rapid multi-component analysis of urine, Clinical Chemistry 1984;30:426-432.
5. Matsushita Kazuhiro. ^1H -NMR of human urine, Jeol News, 1982;18A:2-4.
6. Iles R. Use of proton nuclear magnetic resonance spectroscopy in detection and study of organic acidurias, Clinical Chemistry 1985;31:1795-1801.
7. Yamaguchi K, Eto N, Aoki Y, Quick K. Screening and diagnosis of organic acidemias by NMR urinalysis. J Pediatr 1985;106:620-625.
8. Nicholson JK, Sadler PJ, Bales JR. Monitoring metabolic disease by proton NMR urinalysis, Lancet 1984;2:751.
9. Iles AR. Methylmalonic aciduria and propionic acidemia studied by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy, Clinical Chimica Acta 1986;173:173-189.

Recibido: 16 de julio de 1990. Aprobado: 31 de agosto de 1990.

Lic. Maritza Díaz. Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 No. 15406, Cubanacán, La Habana 11600.