

**ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXCRECIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS DE CADENA
CORTA Y MEDIA EN NEONATOS QUE RECIBEN FÓRMULAS INFANTILES**



**Presentado por: Angie Marcela Calvo Barbosa
Stefany Casallas Cortes**

**Carrera Bacteriología
Facultad de Ciencias Básicas
Pontificia Universidad Javeriana**

Bogotá D.C Noviembre 2016

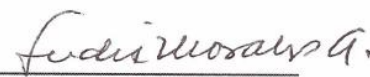
ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXCRECIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS DE CADENA CORTA Y MEDIA EN NEONATOS QUE RECIBEN FÓRMULAS INFANTILES

**Presentado por: Angie Marcela Calvo Barbosa
Stefany Casallas Cortes**

NOMBRE: JOHANA MARIA GUEVARA MORALES

FIRMA 
DIRECTOR TRABAJO DE GRADO

NOMBRE: LUDIS MORALES

FIRMA 
PAR EVALUADOR

NOMBRE: OLGA YANETH ECHEVERRY PEÑA
GIRALDO

FIRMA 
CODIRECTOR TRABAJO DE GRADO

NOMBRE: CLAUDIA MARCELA PARRA

FIRMA 
PAR EVALUADOR

**Nota de Advertencia: Artículo 23 de la Resolución N° 13
de Julio de 1946.**

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por qué no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a:

La Pontificia Universidad Javeriana y a todos las docentes de la carrera por su gran aporte académico.

Olga Yaneth Echeverri y Johana Maria Guevara, Docentes Investigadoras. Por su valiosa y gran colaboración.

A Dios, a nuestras familias por el apoyo que recibimos a los largo de nuestra etapa de formación profesional y a nuestros compañeros por su valiosos aportes académicos.

CONTENIDO

RESUMEN.....	7
INTRODUCCIÓN.....	8
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	9
JUSTIFICACIÓN.....	10
ANTECEDENTES	12
Antecedentes internos.....	12
Pontificia Universidad Javeriana (PUJ), Instituto de Errores Innatos del Metabolismo (IEIM).....	12
Antecedentes externos.....	12
MARCO TEÓRICO.....	18
NEONATOS	18
Clasificación de la población neonatal según edad gestacional.....	18
Clasificación de acuerdo con el peso corporal al nacer se clasifican en tres grupos..	19
DIETA EN NEONATOS.....	21
LACTANCIA MATERNA.....	21
FÓRMULAS INFANTILES	21
Fórmulas de inicio	22
Fórmulas infantiles para lactantes prematuros.....	22
Fórmulas para lactantes hipocalóricas y/o específicas de enfermedad	23
ÁCIDOS ORGÁNICOS.....	23
Origen metabólico de los ácidos orgánicos.....	23
Determinación de ácidos orgánicos	24
CROMATOGRAFÍA DE GASES.....	24
ESPECTROMETRÍA DE MASAS	25
Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas (GC-MS).....	25
EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS	25
Extracción líquido- líquido.....	26
Separación de ácidos orgánicos.....	26

Identificación de ácidos orgánicos	27
OBJETIVOS	28
Objetivo general.....	28
Objetivos específicos	28
METODOLOGÍA.....	29
POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	29
CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN.....	29
RECOLECCIÓN DE MUESTRAS.....	30
PROCESAMIENTO DE MUESTRAS.....	30
Examen químico de orina.....	30
Cuantificación de Creatinina.....	31
Extracción de ácidos orgánicos.....	31
PARÁMETROS DE CONTROL DE CALIDAD.....	32
Control de Calidad de Extracción	32
Control de Calidad del Cromatógrafo de Gases y el Espectrómetro de masas	33
Inyección, separación e Identificación	33
Interpretación de perfil de excreción de ácidos orgánicos.....	34
Análisis Estadístico	34
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
Descripción del perfil de excreción de ácidos orgánicos de cadena corta y media en neonatos nacidos a término que reciben lactancia materna.	36
Relación del perfil de excreción de ácidos orgánicos con la edad en lactantes que consumen leche materna	38
Descripción del perfil de excreción de ácidos orgánicos de cadena corta y media en neonatos nacidos a término que reciben formulas infantiles de inicio	40
Relación del perfil de excreción de ácidos orgánicos con la edad en lactantes que consumen formulas infantiles	42
Comparación del perfil de excreción de ácidos orgánicos de cadena corta y media entre las poblaciones de estudio	44
CONCLUSIONES.....	50
RECOMENDACIONES.....	51
BIBLIOGRAFÍA.....	52

ANEXOS	54
Anexo 1. Encuesta Nutricional	54
ANEXO 2. Consentimiento informado, para el acceso a la información y toma de muestras para el estudio: “Caracterización del perfil de excreción de ácidos orgánicos urinarios en lactantes hasta 12 meses mediante GC-MS”	55
Anexo 3. Bases de datos de muestras analizadas	60
Anexo 4. Abundancia relativa (UA) de los metabolitos detectados en el perfil urinario de la población de estudio	64
Anexo 5. Gráficas de metabolitos con tendencia a disminuir con la edad en lactantes que consumían leche materna.....	73
Anexo 6. Gráficas de metabolitos con tendencia a aumentar con la edad en lactantes que consumían leche materna.....	75
Anexo 7. Gráficas de metabolitos con tendencia a aumentar con la edad en lactantes que consumían formulas infantiles.....	76
Anexo 8. Resultados análisis de correlación entre la abundancia relativa de los metabolitos y la dieta.	81
Anexo 9. Gráficas de comparación de la abundancia relativa de los metabolitos analizados según la dieta.....	84

Lista de Tablas

Tabla 1. Resumen Antecedentes	14
Tabla 2. Factores de riesgo del bajo peso al nacer	20
Tabla 3. Metabolitos a evaluar en el perfil de excreción de ácidos orgánicos	35
Tabla 4. Comportamiento de metabolitos según la edad en lactantes que consumen leche materna.	38
Tabla 5. Comportamiento de metabolitos con la edad en lactantes que consumen formulas infantiles.....	42
Tabla 6. Metabolitos correlacionados con la dieta.....	48
Tabla 7. Tendencia de los metabolitos excretados en las poblaciones de estudio de acuerdo a la dieta	49

Lista de gráficas

Gráfica 1. Grupo funcional característico de los ácidos orgánicos.	24
Gráfica 2. Comportamiento de los niveles de ácido Fumárico, con relación a la edad de los lactantes que consumen leche materna. Se observó significancia por Rho de Spearman con un $p < 0,05$	39
Gráfica 3. Comportamiento de los niveles de Ácido Heptenedioico, con relación a la edad de los lactantes que consumen leche materna. Se observó significancia por Rho de Spearman con un $p < 0,05$	40
Gráfica 4. Comportamiento de los niveles de Ácido Láctico, con relación a la edad de los lactantes que consumen leche materna. Se observó significancia por Rho de Spearman con un $p < 0,05$	43
Gráfica 5. Comportamiento de los niveles de Ácido 3 Metil Adípico, con relación a la edad de los lactantes que consumen leche materna. Se observó significancia por Rho de Spearman con un $p < 0,05$	45
Gráfica 6. Comportamiento de la abundancia de metabolitos excretados en la orina de los lactantes según la dieta. ° Outlier. * Valores extremos	46
Gráfica 7. Comportamiento del Ciclo de Krebs dependiendo de la dieta.	467

RESUMEN

Las acidemias orgánicas (AO) son un grupo de enfermedades dentro de los errores innatos del metabolismo que involucran con frecuencia a la población pediátrica, debido a que su sintomatología se presenta desde los primeros días de vida. Estas enfermedades se diagnostican por medio del análisis del perfil de excreción de ácidos orgánicos, realizado por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS), donde se puede observar el aumento o presencia de uno o varios metabolitos, que pueden ser representativos de una enfermedad específica y que contribuyen a su aproximación diagnóstica. En el metabolismo humano muchos de los ácidos orgánicos son sintetizados a partir de la dieta, por medio de vías metabólicas implicadas en la degradación de aminoácidos, ácidos grasos y carbohidratos. En estudios previos se ha evidenciado que hábitos alimentarios específicos pueden influir en el perfil de excreción de ácidos orgánicos, sin embargo, la mayoría de estos estudios, no han sido realizados en nuestro medio y usualmente evalúan población infantil fuera del periodo neonatal y adultos principalmente; por esta razón, se planteo como objetivo, describir el perfil de excreción de ácidos orgánicos de cadena corta y media en neonatos nacidos a término que reciben lactancia materna y formulas infantiles. Para alcanzar el objetivo propuesto, se llevó a cabo un análisis semicuantitativo del perfil de excreción de ácidos orgánicos, mediante GC-MS, en muestras de orina de población neonatal que consumía leche materna (N=30), comparada con población que consumían formulas infantiles (N=20). Una vez obtenidos los perfiles, se observó excreción urinaria de alrededor de 35 ácidos orgánicos de cadena corta y media que incluyen metabolitos derivados del ciclo de Krebs, del metabolismo de aminoácidos ramificados y ácidos grasos, entre otros. Entre las dos poblaciones estudiadas se observó diferencia en la presencia de metabolitos adicionales a los reportados en la literatura, como también diferencias en la abundancia relativa en alrededor de 10 metabolitos incluyendo el ácido glicólico, el ácido 3,4-dihidroxi-butírico, entre otros. En base a los resultados obtenidos de la investigación, es posible concluir que los cambios evidenciados en el perfil de excreción de ácidos orgánicos de las poblaciones evaluadas, afectan de manera importante la interpretación del mismo. Adicionalmente, se reportaron niveles basales de metabolitos asociados a acidemias orgánicas en la población de 0 a 4 meses, algunos de los cuales se ven influenciados por la dieta (ácido glutárico, ácido 2-metil 3-cetovalérico, ácido 3 Hidroxi-3-metilglutárico y ácido metilmalónico).

INTRODUCCIÓN

El presente trabajo de investigación tiene como propósito analizar el impacto del consumo de leches de fórmula en el perfil de excreción de ácidos orgánicos de cadena corta y media en población de lactantes entre 0 y 4 meses de edad. Para esto, se llevó a cabo un estudio de tipo descriptivo correlacional, de corte transversal, en el cual se dividió la población de estudio en dos grupos, el primer grupo conformado por lactantes nacidos a término que consumen lactancia materna con un $n=30$ y el segundo, conformado por lactantes nacidos a término que consumen fórmulas infantiles con un $n=20$.

De este modo, el desarrollo de este trabajo se fundamenta principalmente en la importancia que tiene el análisis del perfil de excreción de ácidos orgánicos urinario para el diagnóstico de las acidemias orgánicas, enfermedades que se encuentran dentro de los errores innatos del metabolismo, y que involucran con frecuencia la población pediátrica, ya que su sintomatología generalmente se evidencia dentro de los primeros días de vida. El análisis de dicho perfil, se realiza mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas. Esta técnica permite detectar el aumento, presencia o disminución, de uno o varios metabolitos, lo que hace posible identificar cambios característicos de entidades específicas, permitiendo así un diagnóstico oportuno.

Dentro de los estudios reportados en la literatura, se evidencia el impacto que tiene la dieta sobre el perfil de excreción de ácidos orgánicos, mostrando como resultado el cambio que puede detectarse en los mismos, dependiendo de las características alimentarias de cada población. Esto puede aumentar la dificultad en la interpretación de algunos hallazgos en el perfil. Lo anterior pone de manifiesto que es importante contar con un perfil de referencia, que permita evidenciar los posibles cambios que pueden existir en el perfil entre poblaciones que reciben lactancia materna y las que reciben fórmulas infantiles disponibles en el mercado colombiano. Es de resaltar, además, la importancia que tiene el desarrollo de este estudio en población lactante de 0 a 4 meses de edad, ya que no se encuentran reportes en la literatura que evidencien una variación entre los perfiles de excreción de ácidos orgánicos de cadena corta y media en esta población.

La obtención de un perfil de referencia para la población estudiada con características alimentarias específicas, permitirá mejorar la interpretación de los perfiles urinarios de población lactante Colombiana, ayudando significativamente al diagnóstico claro y eficaz de las acidemias orgánicas con el fin de implementar tratamientos oportunos en los lactantes que padezcan estas enfermedades.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las acidemias orgánicas son un grupo de enfermedades dentro de los errores innatos del metabolismo que involucran con frecuencia la población pediátrica, debido a que la sintomatología se presenta desde los primeros días de vida. Estas enfermedades se diagnostican por medio del análisis del perfil de excreción de ácidos orgánicos, realizado por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS) por sus siglas en inglés, donde se puede observar el aumento, presencia o disminución de un metabolito o varios, que pueden ser representativos de la enfermedad y permiten su diagnóstico oportuno.

Durante los primeros años de vida, un porcentaje elevado de niños reciben alimentación con fórmulas infantiles. La *United States Food and Drug Administration*, estima que el 40, el 50 y >75% de los bebés de 3, 6 y 12 meses respectivamente, reciben fórmulas infantiles. Estas fórmulas infantiles se han suplementado con ingredientes funcionales: ácidos grasos poli-insaturados, beta-palmitato, nucleótidos, prebióticos, probióticos, simbióticos, carnitina, etc., convirtiéndose así en alimentos necesarios para los neonatos.

En el metabolismo humano muchos de los ácidos orgánicos son sintetizados a partir de la dieta, por medio de vías metabólicas implicadas en la degradación de aminoácidos, ácidos grasos y carbohidratos. En estudios previos se ha evidenciado que hábitos alimentarios específicos pueden influir en el perfil de excreción de ácidos orgánicos, sin embargo, la mayoría de estos estudios evalúa principalmente adultos y población infantil fuera del periodo neonatal.

El metabolismo de un neonato es diferente al de un niño y un adulto, por su dieta y por su estilo de vida, por lo que es de esperar que existan diferencias en los perfiles de excreción de ácidos orgánicos. Las fórmulas infantiles son el alimento esencial en un lactante luego de la leche materna, ya que la información disponible al respecto en la literatura es limitada, es de importancia ver como las fórmulas infantiles influyen en el metabolismo de los neonatos. Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo de este estudio será identificar de qué manera los metabolitos presentes en dichas fórmulas afectan el perfil de excreción de ácidos orgánicos, y si algún componente de estas fórmulas podría falsear los resultados, aumentando o enmascarando metabolitos que pueden ser de importancia en el diagnóstico de las acidemias orgánicas.

JUSTIFICACIÓN

Se ha evidenciado que la edad más común de inicio de la sintomatología de las acidemias orgánicas, es la edad neonatal. Estas enfermedades son causadas por defectos en proteínas involucradas en las vías de degradación de lípidos, aminoácidos y carbohidratos, generando acúmulo de ácidos orgánicos en el organismo y provocando daños irreversibles, dentro de los cuales la afectación neurológica, es el más importante. La principal herramienta para el diagnóstico de estas enfermedades es el análisis del perfil urinario de excreción de ácidos orgánicos obtenido por medio de la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

Estudios realizados en poblaciones normales de diferentes edades confirman el impacto de la dieta y de los medicamentos sobre el perfil de excreción de ácidos orgánicos, mostrando el aumento de algunos metabolitos específicos. En una de las publicaciones más recientes se llevó a cabo un estudio con población pediátrica sana del norte de la India (1 día – 16 años) sin restricciones en su dieta. Se extrajeron ácidos orgánicos a partir de muestras de orina y se analizaron por medio de la técnica de GC-MS, obteniendo como resultado un aumento de los metabolitos hallados en comparación con otras poblaciones. Los autores, concluyeron que la dieta de esta población influye en el aumento de los diferentes metabolitos excretados en la orina y que esto puede ser un aporte para el diagnóstico de anomalías metabólicas en grupos con hábitos alimentarios específicos. **(Kumari 2014)**

La población neonatal es de especial importancia debido a que su dieta es diferente, ya que consumen leche materna y leches de fórmula infantiles para complementar su alimentación. Adicionalmente, es una de las poblaciones donde se manifiestan de manera más común las acidemias orgánicas, con sintomatología como convulsiones, rechazo al alimento e hipotonía. Estas enfermedades deben ser diagnosticadas lo más pronto posible, por medio de un perfil de excreción de ácidos orgánicos, ya que un diagnóstico temprano lleva a un manejo oportuno, haciendo que el pronóstico de los pacientes resulte mejor. **(Barrera Avellaneda 2014)**

Teniendo en cuenta que los reportes en la literatura sobre población neonatal son escasos, este estudio busca evaluar la relación de las fórmulas infantiles con el perfil de excreción de ácidos orgánicos. Se pretende observar aquellos metabolitos que se pueden presentar y/o aumentar en la lectura cualitativa de este perfil, debido al consumo de fórmulas. Esto con el fin de identificar la ocurrencia de falsos positivos o falsos negativos en la interpretación del perfil cromatográfico en neonatos, que

consumen fórmulas infantiles disponibles en el mercado Colombiano. El desarrollo de este trabajo proveerá una herramienta de apoyo diagnóstico para agilizar la confirmación de la presencia o no, de estas anomalías metabólicas y contribuirá instaurar un tratamiento oportuno para evitar complicaciones de salud en los neonatos.

ANTECEDENTES

Antecedentes internos

Pontificia Universidad Javeriana (PUJ), Instituto de Errores Innatos del Metabolismo (IEIM)

El Instituto de Errores Innatos del metabolismo de la Pontificia Universidad Javeriana hace más de 15 años trabaja en la aproximación diagnóstica de acidemias orgánicas por medio de la técnica GC-MS, siendo el único laboratorio en Colombia que cuenta con este equipo para la identificación del perfil de ácidos orgánicos de cadena corta y media excretados en fluidos biológicos. Gracias a la experiencia acumulada durante estos años en la lectura e interpretación del perfil de ácidos orgánicos, en el instituto se ha detectado que el perfil de excreción se ve afectado por el consumo de medicamentos o incluso por la ingesta de alimentos, de manera que estos pueden llegar a alterar los resultados, observándose metabolitos nuevos o aumentando los existentes.

Antecedentes externos

Varios estudios disponibles en la literatura reportan las interferencias que se pueden evidenciar en un perfil de excreción de ácidos orgánicos, por factores como la dieta y/o el consumo de ciertos medicamentos. La técnica por la cual se ha logrado obtener el perfil de excreción de ácidos orgánicos de los individuos, es la GC-MS, siendo esta el Gold estándar para el análisis de estos metabolitos en la orina.

En la población neonatal las fórmulas infantiles son el alimento de elección luego de la lactancia materna, ya sea para suplirla o para complementarla. En la literatura no se han reportado estudios relacionados con la influencia de la dieta con fórmulas infantiles sobre el perfil de excreción de ácidos orgánicos.

En Colombia, se tienen como referencia los estudios realizados en otros países, para la lectura del perfil de excreción de ácidos orgánicos, lo cual puede cambiar el diagnóstico de una acidemia orgánica debido a los diferentes hábitos alimenticios propios de cada población (**Kumari 2014**), por esta razón, lo ideal sería evaluar el perfil de excreción de ácidos orgánicos en personas que consuman los alimentos disponibles en el mercado Colombiano.

En la siguiente tabla se encuentran algunas de las publicaciones, en donde se realizaron estudios que evidencian la relación de la dieta con el perfil de excreción de ácidos orgánicos en orina.

Tabla 1. Resumen Antecedentes

Nombre del artículo	País	Autor / Año	Datos importantes	Referencia
<p>Cuantificación de Ácidos Orgánicos en Orina en una Población Pediátrica Sana al Norte de la India.</p>	<p>India</p>	<p>(Chandrawati Kumari, 2014)</p>	<p>Población de Estudio: Niños de 1 día a 16 años de nacidos, sin restricción en su dieta, que no presentaran ninguna enfermedad. Metodología: Medición de concentración de Creatinina Técnica para la cuantificación de Ácidos Orgánicos: GC-MS Resultados: Población de 1 día nacido a 45 días, presentó una disminución en comparación con la población pediátrica mayor, en metabolitos como el ácido adípico, ácido subérico, ácido sebácico, ácido acelaico, ácido 3-metilglutárico, ácido glutárico.</p>	<p>(Kumari 2014)</p>

<p>Ácidos Orgánicos en la segunda orina de la mañana en una Población Pediátrica Sana.</p>	<p>Suiza</p>	<p>Oliver 2003 Boulat,</p>	<p>Población de Estudio: Niños adolescentes sanos de 1 día a 17 años, de tres escuelas de diferentes áreas de Lausanne, que no tuvieran antecedentes personales o familiares de enfermedades renales o metabólicas, que no tomaran ningún medicamento. Metodología: Medición de concentración de Creatinina Técnica para la cuantificación de Ácidos Orgánicos: GC-MS</p>	<p>(Boulat 2005)</p>
<p>Intervalos Pediátricos de Referencia</p>	<p>Canadá</p>	<p>Kareena. Schnabl, 2008</p>	<p>Población de Estudio: Niños de 1 año a 15 años. La práctica de laboratorio en la medicina pediátrica es de gran importancia para el diagnóstico de diferentes enfermedades.</p>	<p>(Schnabl 2006)</p>

			Es importante tener un intervalo de referencia pediátrica, para diferentes pruebas de laboratorio, debido a que es diferente el metabolismo de un bebe, un niño y un adulto, por lo tanto así mismo pueden cambiar los intervalos de referencia, dependiendo del área geográfica.	
Ácidos Orgánicos en orina: Efectos de la variación Individual y la dieta, en la excreción urinaria de metabolitos ácidos		Ronald Chalmers, 1976 A.	<p>Población de estudio: Un hombre y una mujer sometidos a una dieta controlada, comparados frente a un grupo de personas sin restricciones en su dieta.</p> <p>Técnica de Cuantificación de ácidos orgánicos: GC-MS</p> <p>Resultados: Se observó que la dieta si impacta en el perfil de excreción de ácidos orgánicos</p>	(Chalmers, Healy et al. 1976)

<p>Valores de referencia relacionados con la edad de una población pediátrica sana de Turquía.</p>	<p>Turquía</p>	<p>Feza 1994</p>	<p>Guneral,</p> <p>Población de estudio: Lactantes sanos, edad de 2 días a 16 años, sin toma de medicamentos, con una dieta libre y sin restricciones.</p> <p>Técnica de Cuantificación de ácidos orgánicos: GC-MS</p> <p>Resultados: Presencia de ácido succínico en todas las muestras, 2-oxoglutarato significativamente mayores que los reportados en la literatura, citrato mayor al reportado en la literatura en todos los grupos.</p>	<p>(Guneral and Bachmann 1994)</p>
--	----------------	------------------	--	------------------------------------

MARCO TEÓRICO

NEONATOS

Se considera periodo neonatal a los 28 primeros días de vida, tiempo durante el cual se lleva a cabo la maduración de los distintos órganos para la adaptación a la vida extrauterina. Los neonatos pueden clasificarse según su edad de gestación en cuatro grupos:

- Recién nacidos pre-término o prematuros
- Recién nacidos inmaduros
- Recién nacidos a término
- Recién nacidos pos-término

Clasificación de la población neonatal según edad gestacional

Recién nacidos pre-término

Se denomina prematuros a los recién nacidos antes de las 37 semanas de gestación, donde aún el neonato no está totalmente preparado para la vida extrauterina, por lo que requiere una serie de cuidados especiales debido a que sufren hipotermia con facilidad; su dificultad para respirar es uno de los problemas por que no sea han desarrollado sus órganos completamente; de igual manera sufren complicaciones adicionales como las infecciones debido a la baja respuesta de su sistema inmune, por lo tanto es necesario una alimentación con leche materna o implementando fórmula especial para prematuros, ya que el objetivo que se debe cumplir en estos, es conseguir un crecimiento y una composición corporal similar a las de un recién nacido a término; para esto se han desarrollado una serie de fórmulas infantiles con contenidos superiores de nutrientes críticos como calcio, fosforo y Vitamina D, que permiten suplementar los requerimientos nutricionales de hierro, evitar las deficiencias hematológicas con Vitamina K y E, reparar el sistema respiratorio con Vitamina A; igualmente se deben tener precauciones para la ingesta adecuada de estas fórmulas en los niños prematuros con crecimiento estable y peso superior a 1800 gr. (**Pedron Ginera 2011**)

Cada año nacen aproximadamente 15 millones de niños prematuros, es decir, más de uno de cada diez neonatos son prematuros; el 60% de ellos nacen en África

subsahariana y Asia meridional. De igual manera cada año mueren cerca de 1 millón de recién nacidos prematuros, y muchos otros sufren algún tipo de discapacidad física, neurológica o cognitiva de por vida, situaciones que si no son tratadas a tiempo pueden llevar a la perder la vida los bebés, ya que tienen un alto costo para las familias. Los recién nacidos pre término deben tener acceso a cuidados eficaces para reducir la mortalidad; cuidados especiales desde el primer día de nacimiento esta alcanzar un crecimiento y desarrollo normal. **(OMS 2015)**

Recién Nacidos inmaduros

Producto de la concepción de 28 a menos de 37 semanas o con un peso de 500 gramos o menor a 1000 gramos

Recién Nacidos a término

Se denominan Recién nacidos a término a los neonatos que nacen entre la semana 37 a 41 de gestación y que además tienen un peso mayor a 2,500 gramos.

Recién Nacidos post termino

Un recién nacido post término es aquel producto de la concepción de 42 semanas o más de gestación.

Clasificación de acuerdo con el peso corporal al nacer se clasifican en tres grupos

Recién nacido con bajo peso (hipotrófico)

Un recién nacido con bajo peso es aquel que tiene un peso inferior a 2500 g, es decir, que es inferior al percentil 10 de la distribución de los pesos correspondientes para la edad de gestación, sin tener en cuenta la edad gestacional y la causa del bajo peso. Una serie de estudios han demostrado que la proporción de neonatos con bajo peso al nacer, en los países desarrollados varía del 3-7 % y en los países en desarrollo se ubica sobre el 8 %, con proporciones que superan el 40 % en algunos de éstos.

Esta condición en los neonatos está asociada con situaciones que interfieren en la circulación placentaria por interacción del intercambio madre- placenta- feto, lo que

trae como consecuencia una malnutrición intrauterina. Los principales factores de riesgo del bajo peso al nacer, se han descrito en 5 categorías (tabla 1): socio demográfico, riesgos médicos anteriores al embarazo, riesgos médicos del embarazo actual, cuidados prenatales inadecuados y riesgos ambientales y de conducta. Este grupo de neonatos igual que los prematuros, requieren de una alimentación especial, con nutrientes adicionales que aporten a su desarrollo y ganancia de peso normal para la edad.

Recién Nacido con peso adecuado (eutrófico)

El recién nacido con peso adecuado corresponde al neonato que tiene su peso de acuerdo a su edad gestacional, es decir, cuando el peso corporal se sitúa entre el percentil 10 y 90 de la distribución de los pesos para la edad de gestación. Si es recién nacido a término debe tener un peso promedio de 3200 gramos a las 40 semanas de gestación, que varía entre 2500 a 4000 gramos y si es recién nacido pre-término su rango de peso puede variar entre 1000 gramos a 2500 gramos.

Tabla 2. Factores de riesgo del bajo peso al nacer

Factores socio Demográficos	Riesgos médicos anteriores al embarazo	Riesgos médicos del embarazo actual	Cuidados prenatales inadecuados	Riesgos ambientales y de conducta
Edad de la madre (<20 años o >40 años)	Hipertensión arterial (HTA)	Desnutrición u obesidad materna (peso pre gestacional)	Inicio tardío de los Cuidados prenatales	Consumo de tabaco, alcohol, café y drogas.
Estrato socioeconómico bajo	Antecedentes de hijos con BPN	Síndrome Anémico	Número insuficiente de Cuidados Prenatales	Esfuerzo físico en el último trimestre

Nivel de educación bajo	Múltiparas	Intervalo intergenésico <2	No suplementación	
-------------------------	------------	----------------------------	-------------------	--

Tomada de: (Salud 2015)

Recién Nacidos con sobre peso (hipertrófico)

Se denomina a un recién nacido con sobre peso cuando este supera el percentil 95 o 97 de peso para su edad. En pediatría se habla de macrosomía para describir a un recién nacido demasiado grande. Algunos autores sugieren un peso mayor de 4 kilos otros, proponen un peso superior a 4.100 o 4.500. **(Errasti 2009)**

DIETA EN NEONATOS

LACTANCIA MATERNA

La Organización Mundial de la Salud recomienda para la alimentación infantil, la lactancia materna exclusiva durante los 6 primeros meses de vida, complementándose posteriormente con las fórmulas infantiles que son generalmente una alimentación adecuada hasta al menos los 2 años de edad. La lactancia materna es ideal por sus innumerables beneficios: protege frente a infecciones, promueve el neurodesarrollo y reduce la presión arterial y el riesgo de padecer enfermedades como diabetes u obesidad. Sin embargo, existen circunstancias en las que es necesario complementar o suplir la lactancia materna, ya sea cuando existe contraindicación para realizar un proceso de lactancia adecuado o cuando la madre decide por voluntad propia no lactar. Por tal motivo se indica el uso de las denominadas fórmulas infantiles.

FÓRMULAS INFANTILES

La fórmula láctea Infantil se define como una “leche modificada en su composición química, física y en sus características organolépticas, para adaptar el producto a las necesidades de los lactantes y niños en la primera infancia”. **(Rodríguez Lubari 2011)**

Se han desarrollado preparados para la etapa pediátrica y dentro de esta para diferentes grupos de edad. Dentro de los preparados se encuentran las fórmulas para lactantes nacidos a término, prematuros y las formulas especiales hipocalóricas y/o específicas de enfermedad.

Las fórmulas infantiles han sido diseñadas con el fin de suplir los requerimientos nutricionales de los lactantes, ya sea en su uso como complemento de la leche materna o en su uso exclusivo, indicado anteriormente. Con el fin de no alterar la nutrición de los neonatos de ninguna manera las formulas infantiles dentro de su composición, tanto de macro nutrientes como de micronutrientes, tratan de ser diseñadas lo más parecido posible a la leche materna. **(Hernandez 2011)**

Fórmulas de inicio

Las fórmulas de inicio son el alimento de elección en los neonatos desde el nacimiento hasta los 6 meses de vida, siendo utilizadas como única fuente de alimento o como alimento complementario a la leche materna.

El uso de estas fórmulas se indica de forma total o parcial de acuerdo a los requerimientos nutricionales y energéticos del neonato. La composición de las fórmulas para lactantes a término consta de una densidad calórica de 0,6-0,7kcal/ml, un contenido de proteínas mayor a la de la leche humana, que oscila entre 1.8 a 3gr/100kcal, la proporción caseína/sero-albumina es de 40:60 en las fórmulas de inicio y de 80:20 en las de continuación. Las grasas son de origen vegetal y aportan 40-54% de las calorías totales (4,4-6gr/100kcal), con una relación ácido oléico/linoleico, Entre 5:1 y 15:1.

La leche materna contiene como hidrato de carbono fundamentalmente la lactosa, por esta razón el hidrato de carbono es el mismo en las fórmulas infantiles en una concentración de 9-14gr/100kcal. La adición de ácidos grasos poli insaturados de cadena larga, como el ácido docosahexaenoico (DHA) y el ácido araquidónico han sido beneficiosos a nivel cognitivo, también pueden adicionarse nucleótidos sin exceder los 5mg/100kcal, demostrando beneficios gastrointestinales e inmunológicos.

Fórmulas infantiles para lactantes prematuros

Dentro de las fórmulas infantiles en la etapa pediátrica, existen fórmulas específicas consumidas por los lactantes prematuros, que contienen mayor densidad calórica y proteica 0,8kcal/ml-2,75-3g/100kcal, mayores concentraciones de calcio, fosforo y vitaminas A y D que las fórmulas de inicio para lactantes a término; de esta manera se ajustan a las necesidades específicas de este grupo de lactantes. El aumento de estos componentes permite un mejor desarrollo pondoestatural y una mejor

mineralización, de igual manera tienen un bajo contenido de lactosa debido a que los niños pre-término tienen una menor actividad de lactasa intestinal, el resto de hidratos de carbono se completan con polímeros de glucosa con fin de que la osmolaridad se mantenga por debajo de 300mOsm/kg. Su administración se recomienda hasta que el neonato alcance la semana 40 postparto. **(Ospina Martinez 2016)**

Fórmulas para lactantes hipocalóricas y/o específicas de enfermedad

Se trata de fórmulas en las que el aporte proteico representa un 6% del valor calórico total, constituido por proteína de suero de leche de vaca suplementada con aminoácidos esenciales, de alto valor biológico. Se debe administrar en volúmenes pequeños de leche (12 a 24 cc/kg/día) fraccionados en varias tomas diarias y que se administran de forma intragástrica en los primeros días después del nacimiento en los recién nacido pre termino, sin aumentar el volumen de la alimentación durante la primera semana postnatal.

Estas fórmulas se indican en patologías como la mal absorción, la intolerancia a la lactosa o los errores innatos del metabolismo en los que el consumo de algún alimento en específico sea el causante de intoxicación. **(Ruzafa Lopez. E 2011)**

ÁCIDOS ORGÁNICOS

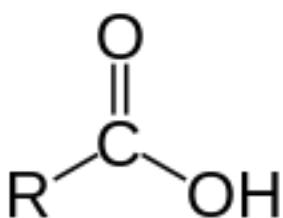
Origen metabólico de los ácidos orgánicos

En el metabolismo humano los ácidos orgánicos son sintetizados como intermediarios en las vías metabólicas implicadas en el catabolismo de aminoácidos, ácidos grasos y carbohidratos.

Los ácidos orgánicos son compuestos oxigenados que se caracterizan por la presencia de un grupo carboxilo **(Grafica 1)**. Según el número de grupos carboxilo presente los ácidos orgánicos se clasifican en: mono carboxílicos, di carboxílicos y tricarboxílicos. Además pueden clasificarse en alifáticos y aromáticos, se denominan ácidos orgánicos alifáticos cuando se acompañan de una cadena lineal de carbonos y aromáticos si por el contrario están acompañados de un anillo de carbonos respectivamente. **(Anangonó Lara 2014)**

Se sabe que, de manera normal, se encuentra presencia de ácidos orgánicos en fluidos biológicos humanos, los cuales han sido detectados mediante (GC-MS). Estos

ácidos se encuentran principalmente en orina, en la literatura se dispone de varios reportes que pretenden realizar la descripción del perfil normal de excreción de ácidos orgánicos, para lo cual se han estudiado poblaciones tanto adultas como pediátricas, en un amplio rango de edades. **(Kumari 2014)**. Dentro de estos estudios algunos incluyen población neonatal (0 a 4 meses de edad) aunque cuentan con pocos individuos. Por otro lado, se han descrito algunos estudios realizados específicamente en esta población, sin embargo hasta el momento no se han descrito las posibles variaciones que pueden presentarse en este perfil en relación con la dieta de los neonatos. En la **Tabla 3** se muestra el perfil normal descrito en la literatura para neonatos **(Chalmers 1982)**



Gráfica 1. Grupo funcional característico de los ácidos orgánicos.

Determinación de ácidos orgánicos

El proceso que se debe llevar a cabo para la determinación de ácidos orgánicos consiste en tres pasos consecutivos, extracción de ácidos orgánicos, separación y finalmente identificación de los metabolitos excretados.

Esta técnica se utiliza principalmente para el hallazgo de ácidos orgánicos en el organismo, los cuales están implicados en una serie de enfermedades metabólicas denominadas acidemias orgánicas. Es una técnica importante de diagnóstico para estas enfermedades, donde se requiere un tratamiento inmediato, con el fin de evitar complicaciones futuras en las personas que las padezcan. Una vez realizada la extracción, se lleva a cabo la inyección manual de la muestra en el cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas.

CROMATOGRAFÍA DE GASES

La cromatografía de gases como principio de funcionamiento básico, implica la volatilización de una muestra en una entrada o inyector de un cromatógrafo de gases, seguido de separación de componentes de la mezcla en una columna. Sólo aquellos

compuestos que pueden ser vaporizados sin descomposición son adecuados para el análisis de cromatografía de gases. Estos compuestos incluyen la mayoría de los disolventes y pesticidas, numerosos componentes de sabores, aceites esenciales, combustibles de hidrocarburos, y muchos medicamentos. Ácidos, aminoácidos, aminas, amidas, las drogas no volátiles, sacáridos, y los esteroides están entre las clases de compuestos que requieren con frecuencia derivatización para incrementar su volatilidad.

Normalmente se utiliza un gas inerte como gas portador (hidrógeno o helio), para transferir la muestra desde el inyector, a través de la columna, y en un detector de espectrometría de masas. Actualmente la gran mayoría de columnas que se utilizan, son tubos capilares con una fase estacionaria revestida en la pared interior. La separación de los componentes se determina por la distribución de cada componente entre la fase móvil y la fase estacionaria. **(Sparkman 2011)**

ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La espectrometría de masas se basa en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa; una vez obtenidos estos iones, se separan de acuerdo con su masa y su carga. Dependiendo de la técnica de ionización, estos iones representan la molécula intacta que puede tener energía suficiente para someterse a fragmentación y finalmente se detectan por medio de un dispositivo adecuado.

Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas (GC-MS)

En la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, la cuantificación de un analito puede llevarse a cabo por medio de los datos adquiridos con una fuente de ionización en cualquier tipo de analizador de m/z . Estos datos pueden ser adquiridos mediante monitoreo continuo (SM), o un control de reacción seleccionada (SRM) con MS/MS. Cuando la cuantificación se realiza utilizando los datos adquiridos en la supervisión continua del espectro completo, se selecciona un ion cuantificado. El ion cuantificado es un ion característico del analito y tiene gran abundancia, este ion está representado comúnmente por el pico de base en el espectro de masas proporcionado. **(Sparkman 2011)**

EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS

Extracción líquido- líquido

La extracción líquido-líquido consta de la separación de una sustancia de una mezcla después de equilibrar las fases, sin embargo, existen diferentes tipos de técnicas de extracción líquido-líquido debido a que en algunas prácticas no se consigue la transferencia total desde un disolvente a otro, y por otra parte es frecuente que al intentar separar una mezcla de sustancias las diferencias de estas sean pequeñas, por lo tanto no se consigue la separación completa realizando un único proceso de equilibrio.

Los tres tipos de técnicas de extracción líquido-líquido son: simple, continua y en contracorriente. La técnica simple se realiza cuando se va a separar una mezcla sencilla, cuyos componentes son muy heterogéneos en sus relaciones de distribución. La técnica continua se utiliza cuando la solubilidad del compuesto a extraer, en los disolventes de extracción habituales no es muy elevada. Para evitar utilizar grandes volúmenes de disolvente de extracción, el proceso se hace en un sistema cerrado, en el que el disolvente de extracción se calienta en un matraz y los vapores del disolvente se concentran en un refrigerante, puesto sobre un tubo o cámara de extracción que contiene la disolución acuosa a extraer. **(Cases and Hens 1988)**

Separación de ácidos orgánicos

La determinación requiere una muestra de orina, debido a que es el líquido biológico por el cual se excreta todo lo que se consume y se metaboliza en el organismo, esta debe ser procesada, utilizando un método de extracción mediante solventes orgánicos.

Para obtener el perfil de excreción de los ácidos orgánicos presentes en el organismo, se utiliza la técnica GC-MS.

En el cromatógrafo el puerto de inyección debe exceder el punto de ebullición de todos los componentes de la muestra. Luego de la inyección, la corrida de la muestra tarda aproximadamente 35 minutos. Durante este tiempo dentro del equipo, la muestra es sometida a procesos de vaporización instantánea, después de un corto periodo de tiempo que permita la completa vaporización de la muestra, la válvula se prende para despejar la zona caliente en la columna. La velocidad de migración de los diferentes componentes y su tiempo de retención en la columna, serán determinantes para la distribución de estos en la fase móvil y la fase estacionaria. La fase móvil está

compuesta por un gas inerte, que será helio en este caso y la fase estacionaria está compuesta de polimetilxiloxano, que se encuentra fijada en una columna capilar, donde se utiliza una rampa de temperatura que inicia en 80°C y termina en 280°C cada 5 minutos. Posteriormente el equipo entra en reposo durante tres minutos a una temperatura de 290°C.

Una vez separada la muestra dentro del espectrómetro de masas se da paso a la ionización de la muestra por medio de impacto electrónico, este tipo de ionización se encarga de cargar las moléculas específicamente.

Una vez cargadas las moléculas por el impacto electrónico, estas son atraídas por un campo magnético formado por un cuádruplo que está cargado con 150 Mes. Esta atracción se da en función de la masa y la carga de la molécula.

Identificación de ácidos orgánicos

El software del equipo (Data análisis) posee una serie de librerías (MIST98-Metabolitos químicos, ORGACIDS.L y ORGA_CIDS.L.). Estas librerías están diseñadas para comparar el espectro de masas de un metabolito de interés con el espectro de masas específico puro de cada uno de los metabolitos que se pueden encontrar en una muestra de orina. El espectro de masas específico de la molécula se compara con librerías previamente mencionadas (colección de espectros de masas correspondientes a los compuestos químicamente puros), por medio de una interpretación cualitativa se da paso al análisis de los picos que aparecen en el perfil cromatográfico del minuto 4 al minuto 25, teniendo en cuenta el tiempo de retención y la abundancia relativa de cada metabolitos.

Una vez realizado todo el proceso dentro del equipo se procede con el análisis cualitativo del perfil de ácidos orgánicos; en este perfil se determina la abundancia relativa y el tiempo de retención de los metabolitos hallados. En el análisis cualitativo del perfil se tiene en cuenta tanto la presencia como la abundancia de los metabolitos excretados, dado que estos dos parámetros pueden ser indicativo de alguna patología. **(Prieto 2007)**

OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar el perfil de excreción de ácidos orgánicos de cadena corta y media en neonatos.

Objetivos específicos

- Describir el perfil de excreción de ácidos orgánicos de cadena corta y media en neonatos nacidos a término que reciben lactancia materna.
- Describir el perfil de excreción de ácidos orgánicos de cadena corta y media en neonatos nacidos a término que reciben formulas infantiles de inicio
- Comparar el perfil de excreción de ácidos orgánicos de cadena corta y media entre las poblaciones de estudio

METODOLOGÍA

Se llevó a cabo un estudio de tipo descriptivo correlacional, que permitió evaluar la relación de la dieta de dos poblaciones de lactantes con el perfil de excreción de ácidos orgánicos de cadena corta y media. Se estudiaron dos poblaciones de neonatos según el tipo de dieta habitual que estaban recibiendo en el momento: fórmulas infantiles o lactancia materna.

POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se reclutaron lactantes a conveniencia y/o por medio de pediatras de diferentes instituciones, que cumplieran con características requeridas para llevar a cabo el estudio. Por medio de la aplicación de una encuesta a las madres se buscó conocer datos del lactante como: peso, talla, perímetro cefálico y principalmente dieta. Esto con el fin de tener un material de apoyo para correlacionarlo con los resultados del estudio. **(Anexo 1)**

CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN

Definición de grupos

La población a estudiar se dividió en dos grupos según la edad y alimentación que recibían: nacidos a término con adecuado peso al nacer que consumieran leche de fórmula y nacidos a término con lactancia materna, todos los grupos debían cumplir con una serie de criterios de inclusión y exclusión, establecidos con el fin de delimitar las poblaciones evaluadas.

Criterios de inclusión

Recién nacidos a término con adecuado peso al nacer que consumieran fórmulas infantiles

Se incluyeron en el estudio lactantes nacidos entre la semana 37 a 40 de gestación con un peso entre 2500gr-3500gr quienes consumían leche de fórmula y cuyas madres aceptaron participar en el estudio, firmando el consentimiento informado.

Recién nacidos a término con adecuado peso al nacer que consumieran leche materna

Se tuvieron en cuenta recién nacidos entre la semana 37 a 40 de gestación con un peso entre 2500 – 3500gr, siempre y cuando estos lactantes se encontraran en la etapa de lactancia materna.

Criterios de exclusión

- Recién nacidos con patologías o diagnósticos sintomáticos,
- Recién nacidos que estuvieran en algún tratamiento con medicamentos,
- Recién nacidos con historia familiar de muertes en el periodo neonatal, madres con historia de abortos anteriores e historia familiar de acidemias orgánicas y
- Recién nacidos cuyas madres no firmaran el consentimiento informado (**Anexo 2**) aceptando participar en el estudio.

Estos criterios se tuvieron en cuenta con el fin de evitar cualquier interferencia que afecte el perfil de excreción de ácidos orgánicos de cadena corta y media.

RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Para la recolección de la muestra se pidió a la madre que realizara, previa a la toma una limpieza adecuada en los genitales del lactante, evitando uso de cremas, talcos y aceites, ya que esto puede llevar a la alteración de los resultados. Luego ella misma colocó el colector de orina especial para bebés, esperó una micción espontánea y posteriormente transfirió la orina depositada en la bolsa a un frasco de plástico colector de orina nuevo. Una vez recolectada la muestra, esta se mantuvo en congelación.

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

Examen químico de orina

Una vez descongelada la muestra se llevó a cabo el examen químico de la orina, usando una tira reactiva la cual permitió observar la densidad, el pH, nitritos, leucocitos, cetonas y sangre presentes en la muestra, con el fin de correlacionar estos datos con el perfil de excreción de ácidos orgánicos.

Cuantificación de Creatinina

La cuantificación de Creatinina se realizó con el kit de creatinina K de Labtest (**Spencer 1986; O'Leary 1992; Junge 2004; Matensson 2004; Myers 2006; Peake 2006; Ceriotti 2008**), por medio de un procedimiento cinético optimizado de 2 puntos, el cual consistió en una reacción evaluada en diferentes tiempos (30 seg- 90 seg) a una misma temperatura (37°C), donde se realizaron diluciones 1/5 y 1/10 a la muestras, dependiendo de su densidad, para luego procesarla junto con el reactivo estándar del kit (Creatinina 4,0mg/dl)

Para la reacción de la prueba enzimática, se preparó Picrato alcalino, mezclando 4 volúmenes de NaOH con 1 volumen de ácido pícrico, para proceder a la cuantificación.

Procedimiento

- Se agregó 0.10 ml de Estándar a 1ml de Picrato Alcalino
- Se agregó 0,10 ml de Muestra a 1ml de Picrato Alcalino
- Se mezcló y se colocó inmediatamente en la cubeta
- Se disparó el cronometro y se leyeron las Absorbancias a los 30 segundos y a los 90 segundos frente al blanco de reactivo, con una longitud de onda de 510nm
- La concentración de creatinina se calculó de la siguiente manera:
$$\Delta AMx / \Delta A \text{ Estándar} * 4 * \text{Factor dilución}$$

Extracción de ácidos orgánicos

La extracción de ácidos orgánicos se realizó utilizando tres tubos falcón para cada muestra: En el tubo marcado como uno se añadieron 4gr de NaCl, 100 µl de ácido fenilbutírico (estándar interno), 100 ul de HCl 6N, 2.000 ul de acetato de etilo y 2.000 ul de orina. Posteriormente, este tubo se mezcló en vortex durante 3 minutos y se centrifugo 3 minutos a 3500 rpm a 20°C. Para realizar la primera extracción de ácidos orgánicos de cadena corta, con una micropipeta se extrajo la fase orgánica la cual se pasó al segundo tubo, el cual contenía 4gr de sulfato de sodio.

Una vez extraída la primera fase, se realizó una nueva extracción agregando 2.000 µl de éter etílico al tubo número uno, para extraer los ácidos orgánicos de cadena media y nuevamente este se mezcló en vortex durante 3 minutos y 3 minutos de

centrifugación a una velocidad de 3.500 rpm con una temperatura de 20°C. Con una micropipeta se extrajo la fase orgánica y se llevó igualmente al segundo tubo haciendo un pool de dos extractos.

Una vez puestas las dos fases en el segundo tubo, se agregó a los extractos 2 gramos de sulfato de sodio anhidro, este se mezcló en vortex durante un minuto y se llevó a centrifugación por tres minutos, a una velocidad de 3.500 rpm con una temperatura de 20°.

Finalmente, la fase líquida fue transferida al tercer tubo, el cual se llevó a un secado en plancha caliente a 37°C con atmósfera de nitrógeno.

Al finalizar el secado, la muestra se sometió a un proceso de derivatización. Los compuestos que contienen grupos funcionales con hidrógenos activos (-COOH, -OH, -NH y -SH) se suelen derivatizar antes de su análisis por cromatografía de gases. Estos grupos funcionales tienden a formar enlaces de hidrógeno intermolecular que afectan a la volatilidad y pueden interactuar negativamente con la fase estacionaria de la columna y pueden ser térmicamente inestables, debido a que los ácidos orgánicos no son lo suficientemente volátiles para pasar a través de la columna de cromatografía de gases, las muestras deben entonces ser derivatizadas por sililación, un tipo de derivatización donde se substituyen los hidrógenos activos de ácidos, alcoholes, tioles, aminas, amidas y cetonas y aldehídos enolizables con grupos TMS (TriMetilSilil). De tal manera que para el procesamiento de ácidos orgánicos en orina, se adicionaron 60 µl de O-bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) (puro), y se colocaron en baño maría a una temperatura de 80°C por 20 minutos; con el fin de transformar un compuesto químico en un producto con estructura similar denominado derivatizado.

PARÁMETROS DE CONTROL DE CALIDAD

Control de Calidad de Extracción

El estándar interno utilizado en el procesamiento de muestras es el ácido 2-fenilbutírico, preparado con HCL al 0,1N; compuesto que no es sintetizado o excretado fisiológicamente por el ser humano.

Este componente permitió verificar la adecuada extracción de la muestra, por medio del tiempo de retención y la abundancia relativa de los picos en el perfil.

Control de Calidad del Cromatógrafo de Gases y el Espectrómetro de masas

El Auto-tune es un programa informático que ajusta los parámetros del instrumento para corregir problemas; se debe realizar al equipo diariamente antes de inyectar una muestra. Esta revisión interna del equipo duró aproximadamente 7 minutos y posteriormente se dio paso a la impresión del reporte. En este, se verificó que los siguientes parámetros se cumplieran correctamente: % de agua menor a 1%, % de nitrógeno menor al 10%, foreline no debía ser mayor a 50, EM voltios no debía ser mayor a 2000. La sintonización automática se ve en las formas de los picos del espectro de masas en el modo de perfil. **(Sparkman 2011)**

Una vez verificado el cumplimiento de los parámetros anteriores, el equipo se encontraba listo para inyectar la muestra.

Inyección, separación e Identificación

Se tomaron 0.6ul de la muestra con una micro jeringa de inyección (Hamilton) previamente purgada con acetato de etilo, para eliminar residuos presentes en la jeringa. En el puerto de inyección se introdujo la aguja y se inició la corrida manualmente. De esta manera se llevó a cabo la separación de ácidos orgánicos en un cromatógrafo de gases (HP 6890).

La muestra fue inyectada en una columna capilar por medio de la técnica de inyección Splitless, donde la totalidad de la muestra inyectada es dirigida hacia la columna, que se mantiene durante la inyección a una temperatura inferior al punto de ebullición del componente más volátil de la muestra, en este caso, la rampa de temperatura inicia en 80°C. **(Sparkman 2011)**

Posteriormente la muestra pasa a una fase móvil, la cual está compuesta de un gas inerte que en este caso es Helio (ultra alta pureza 5,0000); este gas se encuentra a un flujo de 0.6ml/min, viaja a una velocidad de 45 cm/seg y a una presión de 3.78psi. La fase estacionaria (Polimetilxiloxano) se encuentra fijada en una columna capilar (longitud de la columna de 12m y diámetro interno de 0.33um); se utiliza una rampa de temperatura que inicia en 80°C y termina en 280°C con aumento progresivo de 5 °C cada 5 minutos. Posteriormente el equipo entra en fase de limpieza post-corrida durante 3 minutos a una temperatura de 290°C.

Una vez separada la muestra, dentro del espectrómetro de masas (Mass selective detector 5973) se da paso a la ionización de la muestra por medio de impacto

electrónico que se da a 230 MeV a 230°C. Este tipo de ionización carga las moléculas específicamente. Cuando las moléculas están cargadas son atraídas por el campo magnético, generado por un cuádrupolo cargado con 150 MeV.(260 °C) Esta atracción se da en función de la masa y la carga de la molécula. El espectro de masas específico de la molécula se comparara con las librerías presentes en el software del equipo.

Interpretación de perfil de excreción de ácidos orgánicos

Una vez finalizada la corrida a los 35 minutos, se dio paso al análisis de los picos que aparecen en el perfil cromatográfico del minuto 4 al minuto 25 por medio de una lectura manual, teniendo en cuenta el tiempo de retención y la abundancia relativa de cada metabolito.

El software del equipo (Data análisis) posee una serie de librerías (MIST98-Metabolitos químicos, ORGACIDS.L y ORGA_CIDS.L.). Estas librerías están diseñadas para comparar el espectro de masas de un metabolito problema con el espectro de masas específico de cada uno de los metabolitos puros que se pueden hallar en una muestra de orina.

En la siguiente tabla se observan algunos de los metabolitos que han sido detectados en la orina de individuos sanos de todos los grupos étnicos, los cuales fueron seleccionados para ser identificados en el perfil de excreción de ácidos orgánicos y posteriormente evaluar la abundancia relativa de cada compuesto.

La abundancia relativa de cada metabolito se determinó teniendo en cuenta el área bajo la curva de cada uno realizando una normalización frente al estándar interno y a la concentración de creatinina de la muestra analizada para controlar el efecto de variaciones inherentes a la inyección manual y la concentración de la orina, respectivamente. De esta manera, la abundancia relativa de cada metabolito normalizada se expresó en Unidades Arbitrarias (UA).

Análisis Estadístico

Una vez obtenidos los resultados de los perfiles de excreción de ácidos orgánicos de las dos poblaciones estudiadas, se realizó un análisis de correlación entre la

abundancia relativa de cada metabolito, la edad y la dieta. Para esto se utilizó un método estadístico no paramétrico, utilizando el estadístico de Rho de Spearman.

Tabla 3. Metabolitos a evaluar en el perfil de excreción de ácidos orgánicos

Metabolito (Ácido)	Tiempo retención (min)	Metabolito (Ácido)	Tiempo retención (min)
Láctico	3,742	Citramálico	13,06
2 OH butírico	2,953	Adípico	13,29
3 OH isobutírico	5,027	3 metil adípico	13,77
Oxálico	5,502	5 OH metil 2 furóico	13,88
2 metil 3 OH butírico	5,762	2 OH glutárico	14,62
Metilmalónico	3,955	3 OH fenilacético	14,76
3 OH isovalérico	7,961	3 OH 3 Metilglutárico	15,04
Urea	8,252	2 Cetoglutárico	15,06
2 Etilhidracrílico	6,312	4 OH fenilacético	15,19
Etilmalónico	9,373	Subérico	16,09
Fosfórico	9,325	Aconítico	16,98
Succínico	9,955	Hipúrico	17,49
Metilsuccínico	10,24	Cítrico	18,14
Fumárico	10,72	Metilcítrico	18,3
Estándar Interno (S.I)	10,96	VMA	18,53
Fenoxiacético	11,57	4 OH fenilacético	18,91
Glutárico	11,85	Palmítico	20,53
3 metilglutárico	11,98	4 OH hipúrico	22,19
Di-Hidroxiheptanóico	12,16	Estearico	22,71
3 metilglutacónico	12,21	PAG	24,25

Fuente: Elaboración propia (2016), adapto de (Chalmers & Lawson, 1982).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente estudio se realizó con población de 0-4 meses, la cual se dividió en dos grupos dependiendo de su dieta. Para el primer grupo, que consumía leche materna, se trabajó con 30 muestras, las cuales estaban conformadas por 16 niñas y 14 niños con una edad promedio de 70 días de nacidos (24-160 días). Para el segundo grupo, que consumía formulas infantiles, se trabajó con 20 muestras, 5 niñas y 15 niños con una edad promedio de 76 días de nacidos (16-120 días), los cuales consumían variedad de leches como Enfamil, Nestogeno, Similac, entre otras (**Anexo 3**). La recolección de las muestras se llevó a cabo por convocatoria abierta a conveniencia, donde se tuvo contacto personal con los acudientes de cada lactante para recolectar las muestras de orina, previo consentimiento informado, pidiendo a las madres realizar aseo genital previo a la toma de muestra. La recolección de la orina se realizó en bolsas pediátricas, una vez obtenida la muestra se transfirió a un recolector de orina estándar, para luego proceder a el procesamiento y análisis de las muestras.

Se realizó el análisis del perfil de excreción de ácidos orgánicos en las poblaciones evaluadas, para lo cual se normalizaron los resultados obtenidos en cada perfil frente a concentración de creatinina de cada muestra y abundancia relativa del estándar interno. En el **Anexo 4** se presentan los datos obtenidos de abundancia relativa para cada metabolito en cada una de las muestras analizadas.

El análisis de los resultados se realizó a partir de estadística no paramétrica, por Rho de Spearman, con el fin de determinar si hay correlación entre la abundancia de cada metabolito y la edad y/o dieta de la población. (**Anexo 5**)

Descripción del perfil de excreción de ácidos orgánicos de cadena corta y media en neonatos nacidos a término que reciben lactancia materna.

Se realizó el análisis del perfil de excreción de ácidos orgánicos en lactantes que consumían leche materna, evidenciando tanto la presencia, como la ausencia de algunos de los metabolitos hallados en perfiles urinarios normales tomados como referencia según la experiencia previa del Instituto de errores innatos del metabolismo y lo reportado en la literatura (**Tabla 3**).

Se evidenció, tanto en la población de leche materna como en la de fórmula infantil, la presencia de metabolitos como el Ácido Glicólico, el Ácido 4-Hidroxi Benzoico y el Ácido 3-Hidroxi-Sebácico, los cuales se encuentran relacionados con aditivos o aromatizantes comunes en los alimentos, bebidas y otros productos como extractos

de frutas y vegetales (**Salud 2007**). Su presencia en la población que consume leche materna puede deberse a una transferencia directa por este alimento, relacionado con la dieta de la madre y en cuanto al consumo de fórmula infantil, este hallazgo puede deberse a componentes propios de la misma. Dentro de los metabolitos adicionales también se encontró el Ácido 3-Hidroxi Adipato Lactóna el cual se ha reportado como un compuesto normal en la orina humana y su excreción se ha asociado principalmente con largos periodos de ayuno. Por su parte, el ácido Heptenedioico, es un ácido dicarboxílico resultado del metabolismo de ácidos los grasos de cadena impar, se ha reportado además, como un producto de la omega oxidación de ácidos grasos y posiblemente como un intermediario de la beta oxidación de los mismos (**Wishart DS 2009**). Del mismo modo, se encuentra como un metabolito asociado a la aciduria dicarboxílica, la cual es consecuencia de bloqueos en la oxidación de ácidos grasos de cadena media, por esta razón es importante tener en cuenta que este metabolito, puede ser excretado en niveles basales en población lactante sana a causa de su dieta. En la lectura del perfil de excreción de ácidos orgánicos podría generar falsos positivos, si no se tiene en cuenta o no se conoce la contribución de la dieta. (**David S. Wishart 2007**)

Así como en este estudio se evidenció la presencia de metabolitos adicionales, también se encontró ausencia de algunos reportados previamente en literatura (Chalmers 1982) como lo son: el Ácido 5-Hidroxi-2-metil-furóico, esto se explica debido a que este es un metabolito derivado principalmente del consumo de alimentos como chocolates, lácteos y jugos de frutas; lo cual se puede entender debido a que la población de estudio aún no tiene una alimentación complementaria. Otro de los metabolitos ausentes es el ácido Metilcitríco, este metabolito es derivado del metabolismo del ácido Propiónico en la vía catabólica de aminoácidos (valina, isoleucina y treonina) y ácidos grasos de cadena impar. La presencia de este ácido se ha observado de manera patológica en fluidos corporales de pacientes con acidemia propiónica, aciduria metilmalónica y deficiencia múltiple de carboxilasas.(Chalmers 1982) Este metabolito no ha sido reportado en estudios realizados únicamente en población neonatal, sin embargo se ha observado en estudios que incluyen población de mayor edad e incluso se ha asociado a condiciones como desnutrición y deficiencia de Vitamina B12. (**CHalmers 1982; Guneral and Bachmann 1994**) Teniendo en cuenta lo anterior, es posible que el hallazgo de este metabolito en otras poblaciones pueda asociarse a deficiencias nutricionales en algunos individuos, así como diferencias entre poblaciones y grupos étnicos.

Por último el Ácido 3-Hidroxi-fenilacético, se encuentra reportado como un metabolito normalmente excretado en neonatos, el cual proviene de la degradación de

aminoácidos como la tirosina y la fenilalanina. Similar a lo ocurrido con el Metilcátrico, nuestros resultados coinciden con la literatura ya que este metabolito ha sido reportado en estudios de poblaciones fuera del periodo neonatal. **(Chalmers 1982; Guneral and Bachmann 1994)**

Relación del perfil de excreción de ácidos orgánicos con la edad en lactantes que consumen leche materna

Debido a que la población estudiada se encontraba en un rango de edad de 0-4 meses, fue posible evidenciar que algunos metabolitos presentaron tendencia a disminuir con la edad, así como otros a aumentar con la misma **(Tabla 4, Anexos 5 y 6)**. En las gráficas 3 y 4 se presentan las tendencias de metabolitos representativos de cada grupo.

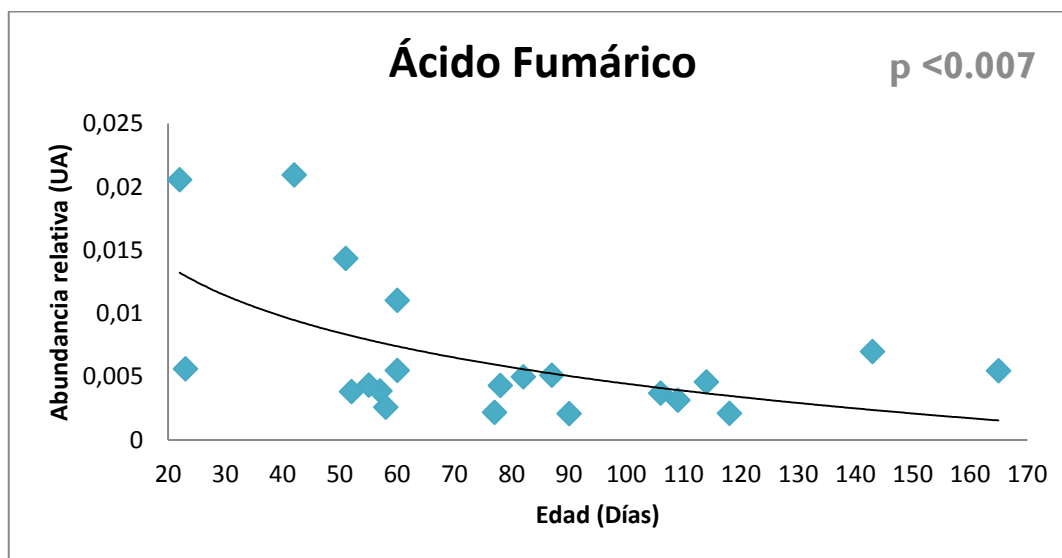
Dentro de los metabolitos que disminuyeron con la edad se encuentran los ácidos Láctico, Fumárico y Succínico **(Tabla 4; Anexo 5)**, los cuales son intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbónicos. Este hallazgo puede estar relacionado, como lo reporta la literatura, con que el requerimiento energético de los lactantes es mayor durante los primeros días de vida. Es por esto que en neonatos hay una alta tasa de gluconeogénesis a partir de proteínas para compensar el bajo aporte de carbohidratos que posee la leche materna, de esta manera al degradarse las proteínas, se obtienen aminoácidos cuyo catabolismo genera intermediarios en el ciclo de los ácidos tricarbónicos.**(Hernandez 2010 A)**. Adicionalmente, se ha reportado que el metabolismo de los neonatos se basa principalmente en la degradación de lípidos, por lo que puede explicarse la tendencia del ácido láctico a disminuir con la edad. Posiblemente, el aumento en el flujo de los metabolitos de la degradación de lípidos que entra al ciclo de Krebs, provoca una disminución de NAD, haciendo de esta manera que la actividad de la LDH (lactato deshidrogenas) aumente y provoque la elevación del ácido láctico en los primeros días de vida. **(John W. Baynes 2006)**

Además de los metabolitos mencionados anteriormente, los Ácidos 4 Hidroxi-hipúrico y el 4-Hidroxi-feniláctico, derivados del metabolismo bacteriano presente en el intestino, presentaron el mismo comportamiento a disminuir con la edad. Este comportamiento puede explicarse ya que la literatura reporta que existen cambios en la flora intestinal del lactante durante su proceso de maduración. **(Hernandez 2010 A)**

Tabla 4. Comportamiento de metabolitos según la edad en lactantes que consumen leche materna.

Metabolitos que disminuyeron con la edad	Metabolitos que aumentaron con la edad
Ácido Láctico	Ácido 3- metil-adípico
Ácido Fumárico	Ácido Heptenedíoico
Ácido 4-Hidroxi-Hipúrico	Ácido Aconítico
Ácido 4-Hidroxi-fenil-láctico	

Dentro de los metabolitos que presentaron tendencia a aumentar con la edad (**Tabla 4 - Anexo 6**), se encontraron: el ácido 3 metil-adípico. Este compuesto es producido por catabolismo del ácido fitánico mediante ω -oxidación, una vía metabólica alterna disponible para la degradación del mismo, al no poderse realizar por medio del proceso de alfa-oxidación que es la ruta principal para su degradación. Este hallazgo sugiere que el metabolismo del lactante hace uso de vías metabólicas alternas para el catabolismo de algunos metabolitos. (David S. Wishart 2007)

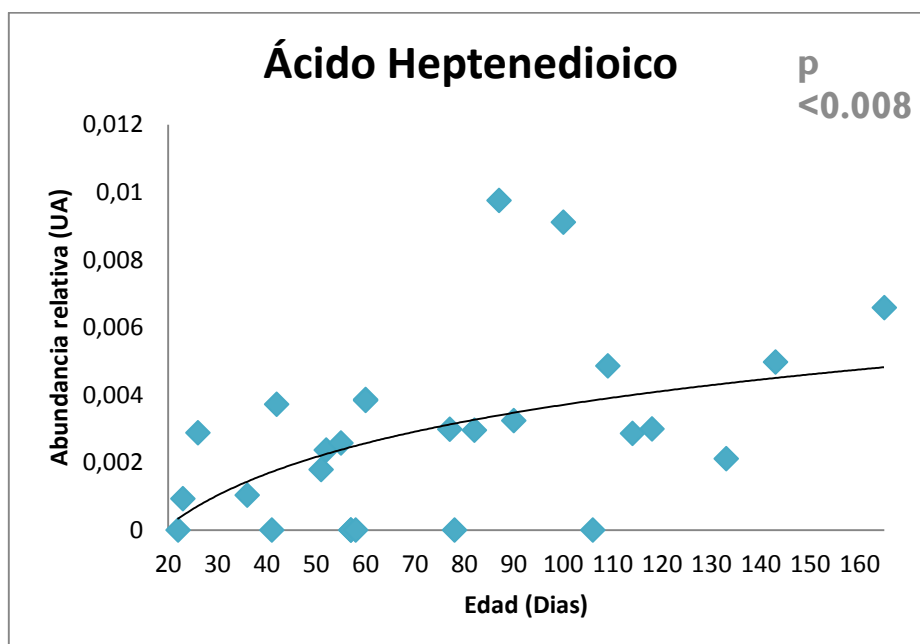


Gráfica 2. Comportamiento de los niveles de ácido Fumárico, con relación a la edad de los lactantes que consumen leche materna. Se observó significancia por Rho de Spearman con un $p < 0,05$.

Así mismo, el ácido heptenedíoico presentó una excreción que aumenta con la edad de los lactantes (**Gráfica 4**). Esto puede deberse a que este ácido está implicado en la biosíntesis de la lisina, lo que se explica con la disminución de los requerimientos de aminoácidos a medida que la edad del lactante aumenta, por lo cual, quedarán

niveles residuales de este ácido, excretándose mayormente en la orina, al no ser necesaria su participación en la síntesis del aminoácido anteriormente mencionado.

El ácido aconítico, presenta un comportamiento igual al de los metabolitos anteriores, evidenciándose un aumento en la excreción del mismo con respecto a la edad. Este metabolito participa como intermediario en la isomerización de citrato a isocitrato en el ciclo de los ácidos tricarbónicos. Se ha reportado que el aumento de este ácido, se ve relacionado con dietas bajas en carbohidratos, lo que puede equipararse a lo que ocurre en la población que consume leche materna, ya que este es un alimento con bajo aporte de carbohidratos. **(Hernandez 2010 C)**



Gráfica 3. Comportamiento de los niveles de Ácido Heptenedioico, con relación a la edad de los lactantes que consumen leche materna. Se observó significancia por Rho de Spearman con un $p < 0,05$.

Descripción del perfil de excreción de ácidos orgánicos de cadena corta y media en neonatos nacidos a término que reciben formulas infantiles de inicio

Se realizó el análisis del perfil de excreción de ácidos orgánicos en lactantes que consumían formulas infantiles de inicio, evidenciándose tanto la presencia, como la ausencia de algunos de los metabolitos hallados en perfiles urinarios normales

tomados como referencia durante la experiencia previa, del Instituto de errores innatos del metabolismo adaptados a los reportados en la literatura **(Tabla 3, Anexo 7)**.

Dentro de los metabolitos adicionales en el consumo de fórmulas infantiles se encontraron el Ácido Glicólico, el Ácido 4-Hidroxi Benzoico, el Ácido 3-Hidroxi Sebacato, Ácido 3-Hidroxi Adipato Lactóna y el Ácido Heptenedíoico los cuales fueron descritos anteriormente en lactancia materna.

Por otra parte, los metabolitos que se encontraron exclusivamente en fórmulas infantiles fueron: el ácido 4 deoxytrónico, el D-glucitol y el ácido homovanílico, los cuales se han relacionado con dietas altas en glucosa, endulzantes y edulcorantes en fórmulas de inicio; de igual manera se ha asociado al consumo de leche de fórmula. **(Gunerl and Bachmann 1994)**

Adicionalmente se observó la presencia del Ácido 2-metil-3 cetovalérico, el cual es producto del metabolismo de la leucina. Es importante mencionar que el hallazgo de este metabolito se ha reportado en la literatura como un marcador de Acidemia propiónica, siendo esta una deficiencia de Propionil-CoA Carboxilasa. De manera similar, en la población que recibe fórmulas infantiles se encontró el ácido 3,4 Dihidroxi-butírico en niveles basales, el cual, según la literatura, es excretado normalmente en la orina humana en bajas concentraciones, pero que a su vez si se encuentra excretado en altas concentraciones está relacionado con la deficiencia de semialdehído-deshidrogenasa succínica. De tal manera que es importante considerar que según nuestros resultados, los lactantes que consumen formulas infantiles excretan niveles basales de estos metabolitos, lo que es de importancia a la hora de interpretar el hallazgo del mismo en el perfil de excreción de ácidos orgánicos con fines diagnósticos. **(Chalmers, Healy et al. 1976; Wishart DS 2009)**

Finalmente, se evidencio una relación directamente proporcional entre el ácido láurico y la edad de los lactantes que consumen formulas infantiles; el ácido láurico, es un ácido graso de cadena media, lo que se relaciona con el alto aporte de este tipo de ácidos grasos de que contienen las formulas infantiles; debido a que estas no aportan al lactante las enzimas digestivas necesarias para la degradación de ácidos grasos de cadena larga. **(Hernandez 2011)**

Relación del perfil de excreción de ácidos orgánicos con la edad en lactantes que consumen formulas infantiles

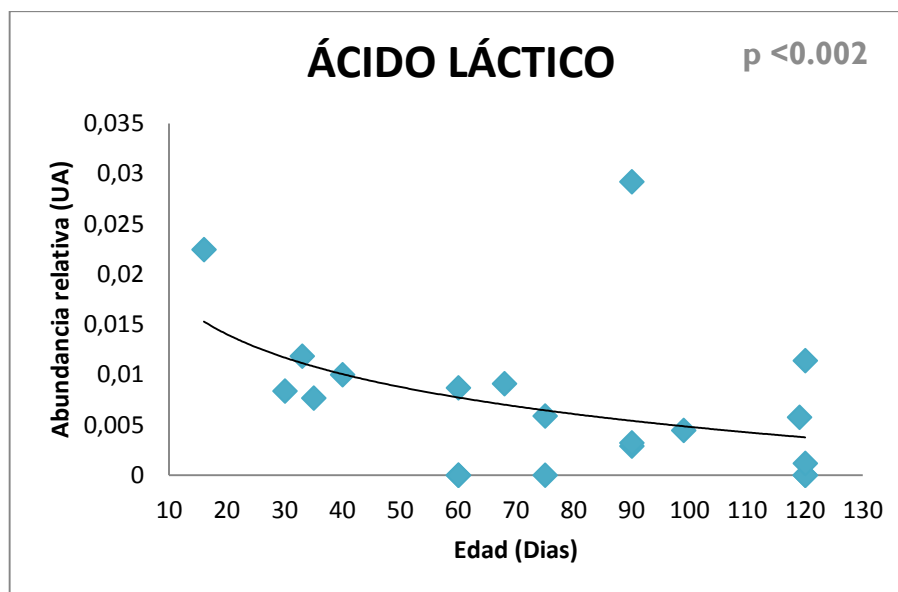
Debido a que la población estudiada se encontraba en un rango de edad de 0-4 meses, fue posible evidenciar que algunos metabolitos presentaron tendencia a disminuir con la edad, como otros a aumentar con la misma (**Tabla 5, Anexo 7**). Fue posible evidenciar que el único metabolito que presentó una tendencia a disminuir con la edad en esta población fue el ácido Láctico (**Grafica 5**), hallazgo que se comparte con la población que consume leche materna aunque con una tendencia menos significativa. Por el contrario, en esta población no se evidenció una relación con tendencia a disminuir de los ácidos Fumárico y Succínico, lo que puede deberse a que, a medida en que la edad aumenta en el lactante su metabolismo logra una normalización más rápida en los que consumen leche de fórmula, probablemente asociado al mayor aporte de carbohidratos en comparación con la leche materna. Teniendo en cuenta lo anterior, el lactante que consume leche de fórmula no requiere llevar a cabo el proceso de gluconeogénesis a partir de proteínas, de tal manera que no se favorece la elevación de intermediarios en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

Tabla 5. Comportamiento de metabolitos con la edad en lactantes que consumen formulas infantiles

Metabolitos que disminuyeron con la edad	Metabolitos que aumentaron con la edad
Ácido Láctico	Ácido Oxálico
	Ácido 2-Hidroxi butírico
	Ácido 2-metil 3-Hidroxi butírico
	Ácido Glutárico
	Ácido 3 metil adípico
	Ácido Adípico
	Ácido Cítrico
	Ácido 4-Hidroxi hipúrico

No obstante, se encontró una tendencia a aumentar con la edad en algunos metabolitos derivados del catabolismo de aminoácidos (**Tabla 5; Anexo 7**), como lo son los ácidos: 2-Hidroxi butírico, 2-metil-3 Hidroxi butírico y glutárico; que corresponden al catabolismo de la treonina, isoleucina y lisina-triptófano respectivamente. Estos resultados evidencian un mayor catabolismo de aminoácidos en esta población. El aumento de estos metabolitos con la edad, puede estar relacionado con que la demanda de consumo de leche de fórmula es directamente

proporcional a la edad, y considerando que el aporte de proteínas de las fórmulas infantiles es un poco mayor al de la leche materna, la mayor disponibilidad de aminoácidos puede favorecer el uso de estas vías catabólicas. **(Hernandez 2010 A)**. Es importante resaltar que si el ácido-Hidroxibutírico se detecta en concentraciones muy elevadas, junto con otros metabolitos sugestivos de alguna enfermedad hereditaria como la acidosis láctica cerebral, la aciduria glutárica tipo II y la acidemia propiónica, este ayudaría a su confirmación. De la misma forma elevaciones del ácido glutárico se consideran indicadores de patologías como las acidurias glutárica tipo I, II y III. De tal manera que, como se mencionó anteriormente, la identificación de la presencia en niveles basales y el comportamiento de estos metabolitos en la población que recibe fórmulas infantiles es de gran importancia para la interpretación de los perfiles urinarios de ácidos orgánicos en el contexto del diagnóstico de las acidemias orgánicas. **(Chalmers, Healy et al. 1976)**



Gráfica 4. Comportamiento de los niveles de Ácido Láctico, con relación a la edad de los lactantes que consumen leche materna. Se observó significancia por Rho de Spearman con un $p < 0,05$.

En esta población también se observó excreción del ácido Oxálico, este compuesto hace parte del metabolismo de la Vitamina C, que es uno de los componentes de las fórmulas infantiles. Otros metabolitos presentes en este grupo que se han relacionado con componentes específicos de la dieta, dentro de estos se incluyen los ácidos Adípico y cítrico. El ácido Adípico se ha reportado como agente aditivo o gelificante de algunos alimentos, lo que puede relacionarse con la adición del mismo en las fórmulas infantiles consumidas por los lactantes y el ácido Cítrico se ha reportado como un aditivo alimentario, aceptable en la preparación de fórmulas para lactantes o

como agente conservante adicionado a diferentes alimentos. En cuanto a la tendencia a aumentar con la edad que presentan estos dos metabolitos, puede deducirse que a medida que la edad de los lactantes aumenta, la demanda en el consumo de leche de fórmula es mayor, lo cual podría causar la mayor excreción de estos aditivos y conservantes en la orina de población de lactantes con mayor edad. **(Salud 2007)**

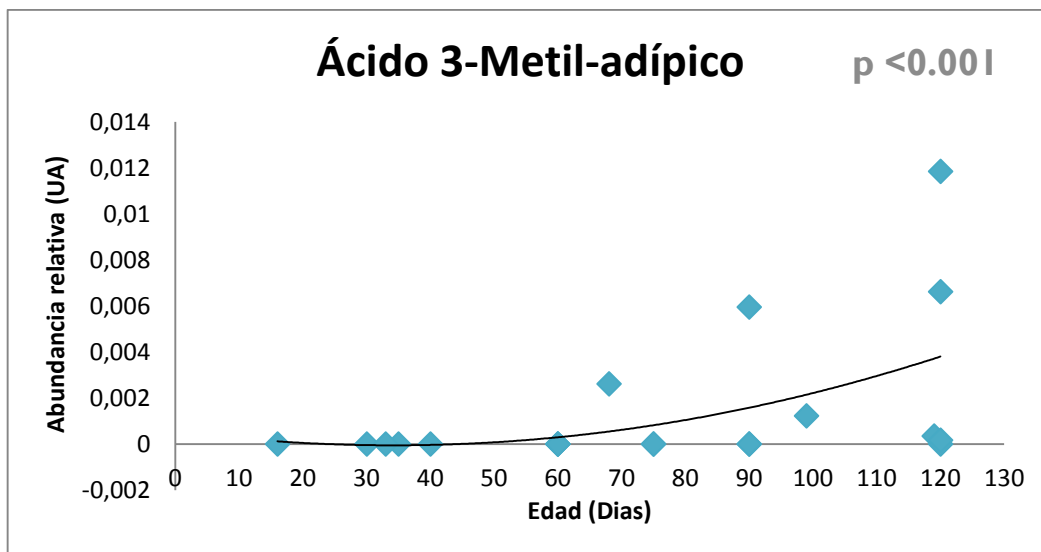
Se observó también aumento del ácido 3-hidroxisecabato, el cual está asociado a la administración de triglicéridos de cadena media y participa como sustrato energético alternativo en la nutrición parenteral total, lo cual está relacionado con el consumo de fórmulas infantiles debido a que estas en su composición son ricas en este tipo de lípidos y por tanto el aumento del mismo puede responder al aumento en la cantidad de la fórmula a medida de que los requerimientos nutricionales aumentan, como se mencionó anteriormente para metabolitos como el láurico, y derivados del catabolismo de aminoácidos. **(David S. Wishart 2007)**

Por último, se encontró una tendencia a aumentar con la edad en el ácido 4-hidroxihipúrico, al igual que los metabolitos mencionados anteriormente. Este ácido se ha definido como un producto final del metabolismo de los polifenoles en la microflora intestinal. Su presencia en esta población, puede estar relacionado con cambios entre la flora intestinal que se han asociado a la dieta. Previamente algunos autores han reportado que la composición de la flora bacteriana cambia entre poblaciones de niños alimentados con leche materna frente a los que consumen leches de fórmula. **(Hernandez, Lozano et al. 2010 B)**

El ácido 3 metil adípico, **(Grafica 5)** en la población que consumía fórmula infantil presento un comportamiento igual que en la población que consumía leche materna.

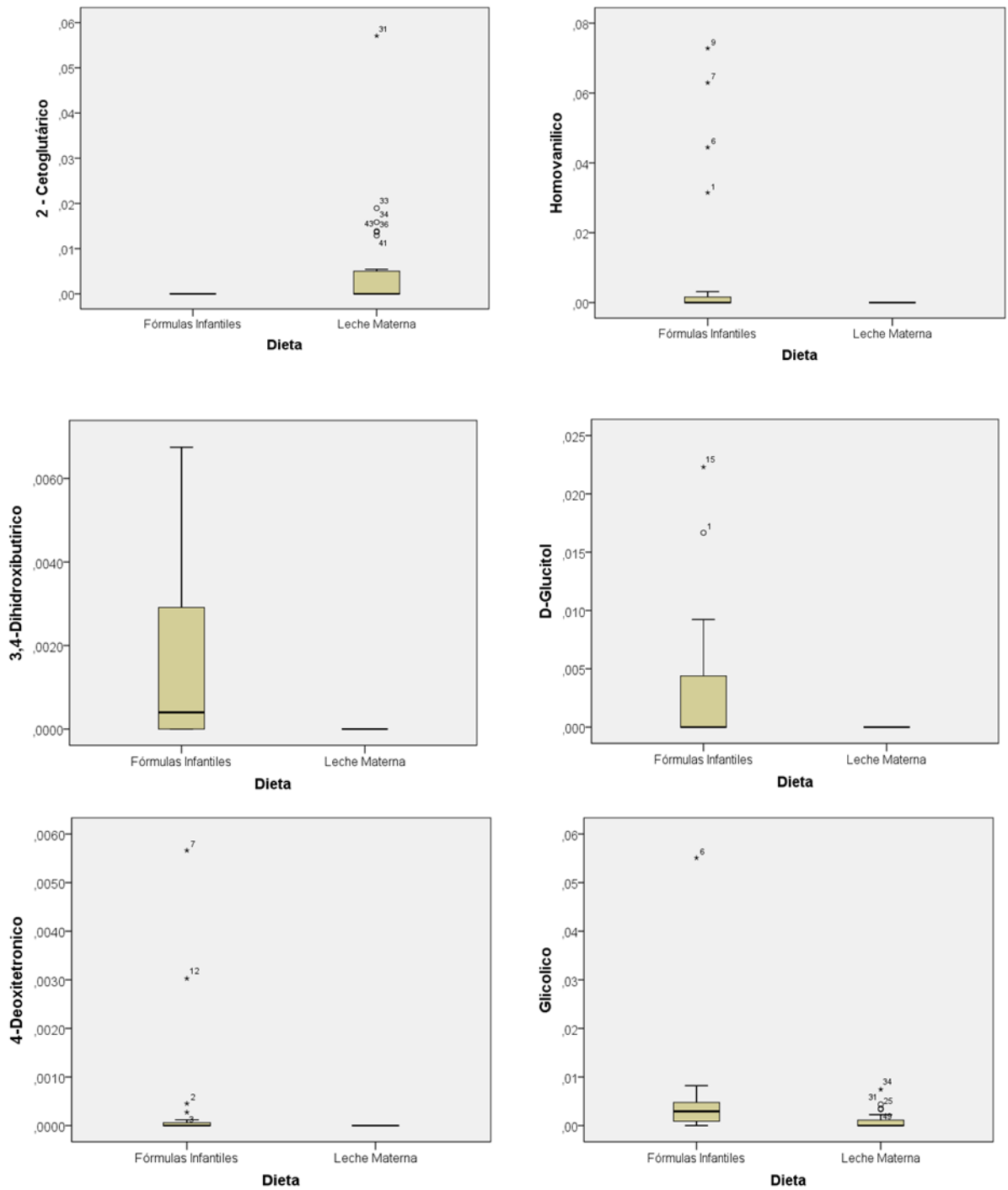
Comparación del perfil de excreción de ácidos orgánicos de cadena corta y media entre las poblaciones de estudio

Puesto que la población de estudio presento diversidad en los perfiles de excreción de ácidos orgánicos, fue de gran importancia comparar el comportamiento de cada metabolito tanto en los lactantes que consumían leche materna como en los que consumían fórmulas infantiles.

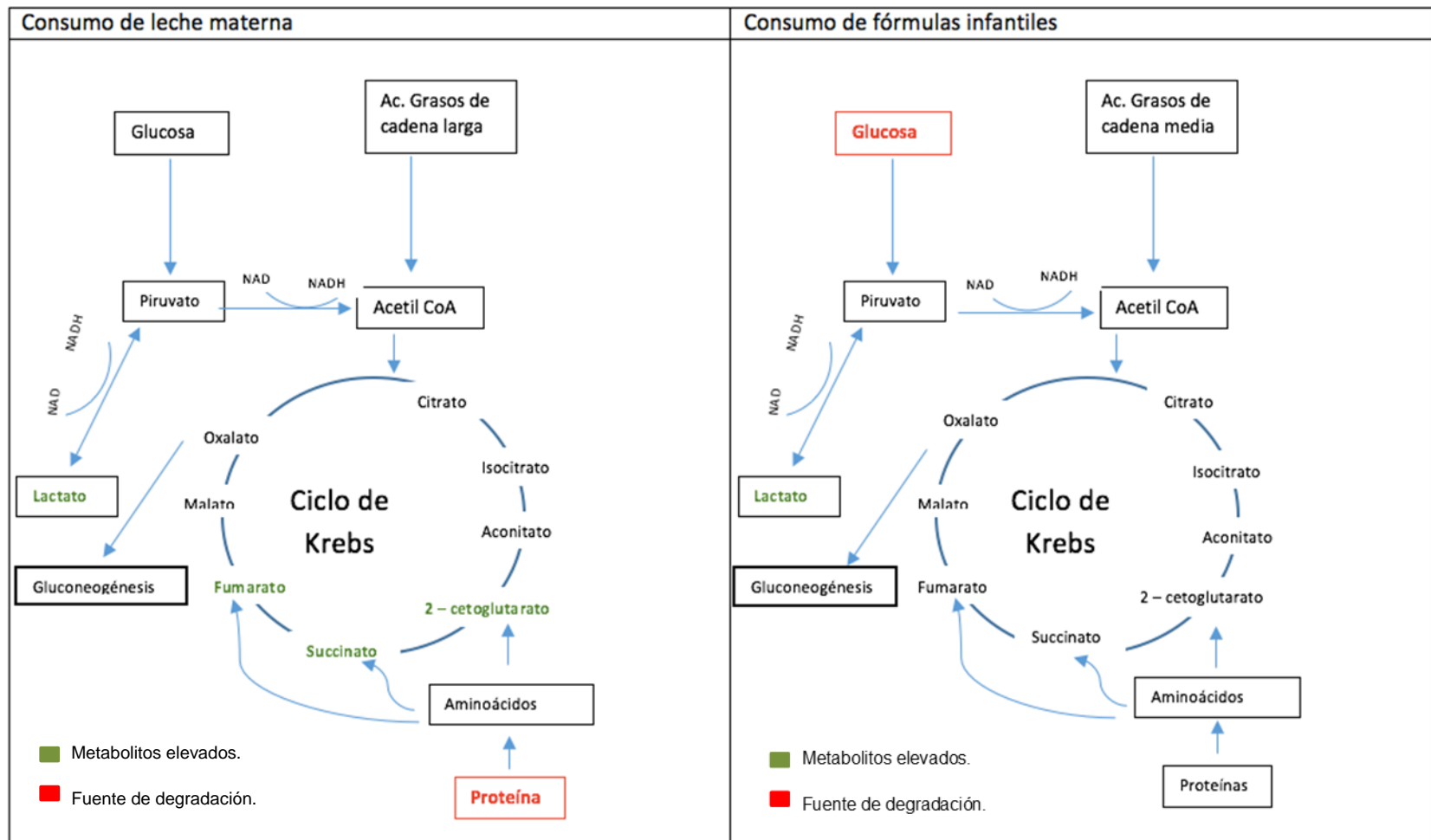


Gráfica 5. Comportamiento de los niveles de Ácido 3 Metil Adípico, con relación a la edad de los lactantes que consumen leche materna. Se observó significancia por Rho de Spearman con un $p < 0,05$.

De los 45 metabolitos analizados, 38 de ellos no presentaron relación significativa entre la excreción en el perfil urinario de los lactantes y la dieta (**Anexos 8 - 9**). Dentro de los metabolitos que presentaron una correlación importante (**Tabla 6, Anexos 8,9**) con la dieta se encuentran el ácido 3,4 Dihidroxitetrónico, el ácido glicólico, el ácido Homovanílico, el ácido 4 deoxytetrónico, el D-glucitol, el ácido 3 Hidroxi-3 metilglutámico y el ácido 2-cetoglutámico (**Grafica 6**). Todos estos metabolitos se encontraron principalmente en el grupo de niños alimentados con fórmulas infantiles, con excepción del 2-cetoglutámico, el cual se encontró con mayor excreción en la población que consumía leche materna. Esto puede estar asociado a que en esta población se espera una alta tasa de gluconeogénesis a partir de proteínas, para compensar el bajo aporte de carbohidratos que posee la leche materna; de esta manera al degradarse las proteínas, se obtienen aminoácidos cuyo esqueleto carbonado se integra al ciclo de los ácidos tricarboxílicos, generando así aumento del ácido 2 cetoglutámico, el ácido Fumámico y el ácido succínico, lo cual es diferente en lactantes que consumían formulas infantiles, debido a que estas tienen un mayor aporte de carbohidratos. (**Grafica 7**). Con relación al ácido Homovanílico, el ácido 4 deoxytetrónico y al D-glucitol, los cuales fueron de los metabolitos únicamente encontrados en población alimentada con fórmula infantil, su hallazgo en esta población puede estar asociado al alto componente de edulcorantes y endulzantes que son aceptables en la preparación de los alimentos como las fórmulas para lactantes. (**Salud 2007**).



Gráfica 6. Comportamiento de la abundancia de metabolitos excretados en la orina de los lactantes según la dieta. ° Outlier. * Valores extremos



Grafica 7. Comportamiento del Ciclo de Krebs dependiendo de la dieta. En la gráfica se muestran las hipótesis generadas en base a lo observado en los hallazgos en los perfiles cromatográficos de las poblaciones analizadas.

Por su parte, es de importancia resaltar, que el ácido 3 Hidroxi-3-metil glutárico es un metabolito que se ha reportado en la Aciduria 3-Hidroxi-3 metil glutárica, la cual es causada por una deficiencia de 3-Hidroxi-3-metil-glutaril-CoA Liasa, una enzima clave en la cetogénesis y en el metabolismo de la leucina. En este estudio el Ácido 3-Hidroxi-3-metil-glutárico se encontró presente únicamente en la población que consumían leche de fórmula, hallazgo que puede relacionarse con algún componente de las formulas infantiles o con el metabolismo normal del neonato, ya que se ha reportado como un indicador de cetosis cuando este está acompañado de otros metabolitos. **(Wishart DS 2009)**

Tabla 6. Metabolitos correlacionados con la dieta

	Metabolitos (Acido)	Significancia *
LECHE MATERNA	Ácido 2 cetoglutárico	p < 0,001
	Ácido 3 Hidroxi-3 metilglutárico	p < 0,000
	Ácido Homovánilico	p < 0,002
FORMULAS INFANTILES	D-glucitol	p < 0,000
	Ácido 4-deoxytetrónico	p < 0,002
	Ácido 3,4 Dihidroxi-butírico	p < 0,000
	Ácido Glicólico	p < 0,000

Tabla 4. Se observó significancia por Rho de Spearman con p < 0,05.

Finalmente se realizó una comparación de los metabolitos que presentaron tendencia a disminuir o aumentar con la edad en ambas poblaciones (**Tabla 7**). Se observó que el ácido láctico presento el mismo comportamiento tanto en los lactantes que consumían leche materna como en los lactantes que consumían formulas infantiles,. Este resultado sugiere que hay cambios en el metabolismo energético del neonato en los primeros 4 meses que son independientes de la dieta que consuma el lactante.

Por el contrario, el ácido fumárico y el ácido succínico, no presentaron tendencia a disminuir con la edad en lactantes que consumían formulas infantiles, por lo tanto su comportamiento puede deberse, como se dijo anteriormente, al mayor aporte de carbohidratos suministrado por las formulas infantiles. De la misma manera, el ácido 4-Hidroxi-Hipúrico y el ácido 4-Hidroxi-fenil-láctico presentaron diferente comportamiento en las dos poblaciones, estos metabolitos provienen del metabolismo de las bacterias presentes en el intestino, de tal manera que estos hallazgos posiblemente se relacionan con cambios en la flora intestinal del lactante durante su proceso de maduración debido a su dieta. **(Salvatori 2012)**

Por otra parte, en lactantes que consumían formulas infantiles, se observó una mayor excreción de metabolitos con tendencia aumentar con la edad, esto se puede deber, al mayor aporte de nutrientes de estas en comparación a la leche materna.

(Tabla 7)

Tabla 7. Tendencia de los metabolitos excretados en las poblaciones de estudio de acuerdo a la dieta

	LECHE MATERNA	FORMULAS INFANTILES
Tendencia Disminuir con la edad	Ácido Láctico Ácido Fumárico Ácido Succínico Ácido 4-Hidroxi-Hipúrico Ácido 4-Hidroxi-fenilláctico	Ácido Láctico
Tendencia Aumentar con la edad	Ácido Heptenedioico Ácido Aconítico Ácido 3- metil adípico	Ácido Oxálico Ácido 2-Hidroxi-butírico Ácido 3 metil adípico Ácido Adípico Ácido 2-metil 3-Hidroxi-butírico Ácido Glutárico Ácido Cítrico Ácido 4-Hidroxi hipúrico

CONCLUSIONES

El presente trabajo es el primer estudio realizado en Colombia que relaciona la excreción de ácidos orgánicos de cadena corta y media con la dieta (Fórmulas infantiles vs Leche materna) en población lactante menor.

Como resultado del análisis de los perfiles en la población de 0 a 4 meses, se puede concluir que dependiendo de la dieta que consume el lactante, ya sea leche materna o fórmula infantil, así mismo el metabolismo que realizará el lactante, estará relacionado con el aporte de nutrientes de cada una de estas.

Después de haber analizado el perfil de excreción de ácidos orgánicos de la población que consume fórmulas infantiles, se concluye que estas interfieren en la interpretación del mismo, debido al mayor aporte de carbohidratos, lo que hace menos evidente observar un perfil cetótico como el hallado en la población de lactantes que consumen leche materna.

Como resultado de la investigación, es posible concluir que existen metabolitos excretados en niveles basales, asociados a acidemias orgánicas en la población de 0 a 4 meses, los cuales se ven influenciados por la dieta, interfiriendo de esta manera en la interpretación del perfil de excreción de ácidos orgánicos.

RECOMENDACIONES

Al momento de realizar la encuesta para clasificar la población, es importante tener en cuenta realizar una anamnesis a la madre, acerca de su dieta durante las 24 – 48 horas previas la misma ya que puede haber transferencia directa de nutrientes por medio de la lactancia materna, haciendo que la alimentación de la madre interfiera en la excreción de ácidos orgánicos del lactante.

En estudios futuros, es importante realizar un análisis detallado de las correlaciones encontradas de los metabolitos entre sí.

Es importante, ampliar el número de muestra para obtener resultados más representativos de la población.

Se recomienda realizar un estudio antropométrico al bebe, en el momento de la toma de muestra, debido a que estos parámetros impactan de manera importante sobre los resultados, igualmente se recomienda verificar la lactancia materna exclusiva de acuerdo a los parámetros descritos en la Encuesta Nacional de la Situación Nutricional en Colombia (ENSIN).

BIBLIOGRAFÍA

- Anangonó Lara, C. A. (2014). Acidos Organicos en alimentos camaron Escuela superior Poletecnica de Litoral.
- Barrera Avellaneda, L. A. E. M., Angela Johana. Garcia Espinosa, Eugenia. Echeverri Peña, Olga Yaneth (2014). Errores innatos del metabolismo. Un abordaje integral del diagnóstico al tratamiento.
- Boulat, O. G., Marianne. Matos, Vera. Guignard, Jean-Pierre. Bachmann, Claude. (2005). "Organic Acids in the second morning urine in a Healthy Swiss Paediatric Population " Clinical Chemistry and Laboratory Medicine **41**(12): 1642–1658.
- Cases, M. V. and A. G. Hens (1988). Técnicas analíticas de separación, Reverté.
- Cerioti, F. B., JC. Klein, G. Henny, J. Queraltó, J. Kairisto, V. Panteghini, M. (2008). "Reference intervals for serum creatinine concentrations: assessment of available data for global application." Clin Chem **54**(3).
- Chalmers, R. A., M. J. Healy, et al. (1976). "Urinary organic acids in man. II. Effects of individual variation and diet on the urinary excretion of acidic metabolites." Clin Chem **22**(8): 1288-1291.
- Chalmers, R. A., Lawson A.M. (1982). "Organic Acids in Man. Analytical Chemistry, Biochemistry and diagnosis of the organic acidurias " Chapman and Hall Ltd.
- David S. Wishart, D. T., Lori Querengesser (2007). "HMDB: the Human Metabolome Database." Nucleic Acid Research 521-526.
- Errasti, A. G. (2009). "Bebes obesos " Salud Alternativa
- Guneral, F. and C. Bachmann (1994). "Age-related reference values for urinary organic acids in a healthy Turkish pediatric population." Clinical Chemistry **40**(6): 862-866.
- Hernandez, A. G. (2010 A). Tratado de nutricion / Nutrition Treatise: Composicion y calidad nutritiva de los alimentos / Composition and Nutritional Quality of Foods, Editorial Médica Panamericana S.A.
- Hernandez, A. G., J. M. Lozano, et al. (2010 B). Tratado de nutricion / Nutrition Treatise: Nutricion humana en el estado de salud / Human Nutrition in Health Status, Editorial Médica Panamericana.
- Hernandez, A. G. A. (2010 C). Tratado de nutricion / Nutrition Treatise: Nutricion Clinica / Clinical Nutrition, Editorial Medica Panamericana Sa de.
- Hernandez, V. (2011). "FÓRMULAS INFANTILES " Revista Gastrohnutp **13**(2): S31-S36.
- John W. Baynes, M. H., Dominiczak (2006). Bioquímica Medica
- Junge, W. W., B. Halabi, A. Klein, G. (2004). "Determination of reference intervals for serum creatinine, creatinine excretion and creatinine clearance with an enzymatic and a modified Jaffé method. " Clin Chim **344**(1 - 2): 137 - 148
- Kumari, C. S., Ankur. Ramji,Siddharth. Shoemaker, James D. Kapoor, Seema. (2014). "Urinary Organic Acids Quantitated in a Healthy North Indian Pediatric Population." Association of Clinical Biochemists of India **30**(2): 221–229.
- Matensson, A. R., P. Lund, H. Ossowicki, H. (2004). Clin lab invest **64**: 439-442.
- Myers, G. M., WG. Coresh, J. Fleming, J. Greenberg, N. Greene, T. Hostetter, T. Levey, AS. Panteghini, M. Welch, M. Eckfeldt, JH. (2006). "Recommendations for improving serum creatinine measurement: a report from the Laboratory Working Group of the National Kidney Disease Education Program." Clin Chem **52**(1): 5 - 18
- O'Leary, N. P., A. Duggan, PF. (1992). "A simplified procedure for eliminating the negative interference of bilirubin in the Jaffé reaction for creatinine." Clin Chem **38**(9): 1749 - 1751

- OMS (2015). "¿Qué es un niño prematuro?".
- Ospina Martinez, M. L. M. D., Mancel Enrique. Pacheco Garcia, Oscar Eduardo. Quijada Bonilla, Hernan. (2016). "VIGILANCIA Y ANALISIS DEL RIESGO EN SALUD PÚBLICA PROTOCOLO DE VIGILANCIA EN SALUD PUBLICA BAJO PESO AL NACER A TERMINO." INS.
- Peake, M. W., Malcom. (2006). "Measurement of serum creatinine - current status and future goals " Clin Biochem **27**(4): 173-184
- Pedron Giner, C. M.-V., José Manuel. Dalmau Serra, Jaime. (2011). "Fórmulas de nutrición enteral en pediatría." Nutricia- Advanced Medical Nutrition **9**(4).
- Prieto, J. A. A., F. Aldámiz-Echevarría, L. Sanjurjo,P (2007). "Análisis de ácidos orgánicos en orina mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas." Quimica Clinica **26**(2): 66-72.
- Rodriguez Lubari, D. D. (2011). "Que es una formula infantil características generales " Dosis capacitacion (1).
- Ruzafa Lopez. E, G. M., R. Cortes Mora, P. Rivero De La Rosa, M.C. Blanca Garcia, J.A. (2011). "formulas de nutricion enteral pediatrica. ¿ como elegir la adecuada? ." Acta pediatrica **69**(9): 393-402.
- Salud, I. N. d. (2015). "Protocolo de vigilancia y control del bajo peso al nacer a término " PROCESO R-02 VIGILANCIA Y CONTROL EN SALUD PÚBLICA: 4-29.
- Salud, O. M. d. I. (2007). "STANDARD FOR INFANT FORMULA AND FORMULAS FOR SPECIAL MEDICAL PURPOSES INTENDED FOR INFANTS." Codex alimentarius
- Salvatori, F. G. a. G. (2012). "Effect of Breast and Formula Feeding on Gut Microbiota Shaping in Newborns." Frontiers, In Cellular and infection Microbiology **2**.
- Schnabl, K. (2006). "Pediatric reference intervals: Critical gap analysis and establishment of a national initiative." Clinical Biochemistry **39**(6): 559-560.
- Sparkman, O. D. P., Z.Kitson, F.G. (2011). Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide, Elsevier Science.
- Spencer, K. (1986). "Analytical reviews In clinical biochemistry: the estimation of creatinine." SAGE journals **23**: 1 - 25
- Wishart DS, K. C., Guo AC (2009). "HMDB: a knowledgebase for the human metabolome." Nucleic Acids **37**: 603-610.

ANEXOS

Anexo 1. Encuesta Nutricional

Nombre de tutor legal:				
Teléfono:		Celular:		
Dirección:				
Nombre del Lactante:				
Fecha de Nacimiento:		Prematuro:	Si	No
Edad en la toma de muestra :				
Datos antropométricos al nacimiento:		Peso:	Talla:	Perímetro cefálico:
Dieta		Formula:		
Lactancia materna:	Si	No	Cantidad:	Preparación:
Frecuencia :				
Fecha toma de muestra :				
Observaciones:				

ANEXO 2. Consentimiento informado, para el acceso a la información y toma de muestras para el estudio: “Caracterización del perfil de excreción de ácidos orgánicos urinarios en lactantes hasta 12 meses mediante GC-MS”

Este formulario de consentimiento informado es para padres o acudientes de niños o jóvenes que serán incluidos en el estudio titulado: Perfil de excreción de ácidos orgánicos urinarios en lactantes hasta 12 meses mediante GC-MS

Los investigadores a cargo son Johana M. Guevara M. y Olga Y. Echeverri del Instituto de Errores Innatos del Metabolismo de la Pontificia Universidad Javeriana. El estudio tiene como objetivo Caracterizar el perfil de excreción de ácidos orgánicos urinarios de lactantes hasta los 12 meses de vida.

TENGA PRESENTE LO SIGUIENTE:

Es posible que existan palabras que usted no comprenda durante la lectura de este documento, por favor indíquenoslas y con mucho gusto tomaremos el tiempo para responderlas. En caso de necesitar más información respecto a este estudio y sus resultados preliminares, puede contactar a cualquiera de las personas enunciadas a continuación, quienes se encargarán de responder cualquier pregunta y aclarar las dudas que puedan surgir respecto a este estudio.

Johana M. Guevara M. (Bogotá) Tel: 3208320 Ext. 4086

Olga Yaneth Echeverri (Bogotá) Tel: 3208320 Ext. 4086

INFORMACION GENERAL

Las acidemias orgánicas son enfermedades que producen ciertos síntomas característicos en el paciente como adormecimiento, intolerancia al alimento, infecciones frecuentes, convulsiones, alteraciones del comportamiento, del crecimiento y malestar en general, entre otras. No todos los pacientes presentan los mismos síntomas y la severidad puede ser distinta según la enfermedad y las condiciones de cada paciente.

Estas enfermedades son hereditarias y hacen que el organismo no pueda procesar o producir algunas sustancias, según el caso. Estas enfermedades son consideradas raras, es decir, son aquellas que afectan a un número pequeño de personas en comparación con la población general y que a su vez pueden ser raras en una región, pero habitual en otra. Las enfermedades raras son enfermedades potencialmente mortales, o debilitantes a largo plazo, de baja prevalencia y alto nivel de complejidad. Este estudio busca obtener información de la excreción urinaria de ácidos orgánicos (sustancias cuyos niveles se ven afectados en las acidemias orgánicas) en población normal sana de niños menores a 1 año; el número total de muestras recolectadas será cerca de 150. Esta información será útil para ayudar a mejorar la detección de estas

enfermedades en pacientes en los que se sospecha un diagnóstico de acidemia orgánica

El proyecto será realizado en su totalidad en el Instituto de Errores Innatos del Metabolismo de la Pontificia Universidad Javeriana.

PROCEDIMIENTO

La información personal será obtenida mediante encuesta directa a los padres o tutor legal del niño(a).

Se necesitara el siguiente tipo de muestra:

MUESTRA DE ORINA

Usted recibirá 1 frasco de orina y le solicitamos el favor de recolectar una muestra por micción espontanea del lactante, sin cambiar la nutrición acostumbrada previo a la toma de la muestra. Las muestras deberán ir marcadas con la fecha y la hora de recolección y el nombre del paciente. (Nosotros asignaremos un código alfanumérico para todo propósito posterior)

RIESGOS DE LA TOMA DE LA MUESTRA

El riesgo asociado a la recolección de orina en un frasco especial, es mínimo.

Su procedimiento es muy usado en los análisis de laboratorio clínico.

BENEFICIOS

Es posible que no existan beneficios directos e inmediatos para el niño(a) y/o su familia derivados de la participación en este estudio.

Entiendo que aunque la participación puede no beneficiar directamente al paciente, la información puede contribuir a mejorar el diagnóstico de las acidemias orgánicas en nuestro medio y a largo plazo resultar en diagnósticos más precisos y oportunos de lactantes afectados por estas enfermedades.

CONFIDENCIALIDAD

La identidad de los participantes al igual que cualquier información obtenida con el estudio será confidencial y no será conocida sino por los investigadores que participan en el proyecto.

APROBACION ESCRITA RECOLECCIÓN VOLUNTARIA DE MUESTRAS

Yo _____ identificado(a) con número de cédula de ciudadanía _____ declaro que:

- 1. Entiendo que las muestras serán utilizadas para este proyecto de investigación dentro del cual se persiguen fines de información para investigación, en todo caso serán manejadas bajo las normas éticas pertinentes.*
- 2. Entiendo que la información referente al niño(a) será manejada de forma confidencial para proteger su identidad.*

3. Entiendo que es posible que **NO** nos beneficiemos de manera directa de los resultados de este estudio pero que los resultados servirán para mejorar y acelerar el diagnóstico de estas enfermedades en nuestro país.
4. Entiendo que **NO** recibiremos ninguna compensación económica por la recolección de las muestras y por la participación en el estudio.
5. Entiendo que la recolección de las muestras de orina **NO representa ningún peligro ni riesgo a la salud del niño(a)**.
6. Entiendo que las pruebas que serán realizadas en este estudio **NO tienen ningún costo para mí**.

7. Respecto al almacenamiento y posible manejo de las muestras una vez terminado el presente estudio se me ha informado lo siguiente:

La utilización de la muestra en estudios posteriores nos podría ayudar en el futuro a generar conocimiento de la excreción de ácidos orgánicos urinarios. Usted tiene el derecho a no permitir que las muestras del paciente sean guardados para estudios en el futuro. Los investigadores podrán guardar las muestras como parte del protocolo sin que estas sean incluidas en la investigación. Las muestras serán almacenadas respetando el anonimato y el sitio será el Laboratorio de Errores Innatos del Metabolismo de la Universidad Javeriana en Bogotá

Por lo tanto, a continuación expreso mi decisión con respecto al almacenamiento de la muestra y su utilización en estudios de investigación posteriores:

1. Deseo que la muestra que fue obtenida del niño(a) sea DESECHADA una vez completado este estudio de investigación. Si___ No___

2. Autorizo conservar la muestra que fue extraída al niño(a) con la posibilidad de emplearla en las situaciones señaladas a continuación: Si___ No___

- a. En estudios complementarios de diagnóstico para mí o algún miembro de mi familia: Si___ No___

- b. En estudios de investigación específicos para las acidemias orgánicas y aminoacidopatías, objeto de esta toma de muestra, siempre y cuando se conserve en anonimato los datos de identificación:
Si___ No___

- c. En estudios de investigación colaborativos con otras instituciones nacionales y/o internacionales, siempre y cuando exista acuerdo interinstitucional previo, aprobación del comité de ética y se conserve en anonimato los datos de identificación: Si___ No___

8. Entiendo que tengo el derecho de **RETIRAR** del estudio al niño en cualquier momento sin necesidad de ninguna explicación.

9. Entiendo que las muestras del niño(a) pueden ser utilizadas en una o en varias ocasiones durante el desarrollo del proyecto por lo que la duración de la participación dependerá de los resultados que se vayan obteniendo en las diferentes etapas del estudio.

10. Entiendo que puedo o no dar autorización para que los resultados de esta investigación sean socializados en forma de publicaciones/presentaciones científicas o clínicas.

Autorizo Si___ No___

11. Declaro que me han informado en forma clara la naturaleza y el propósito de este análisis, los riesgos asociados, los posibles efectos secundarios.

12. He podido formular todas las preguntas que he creído convenientes las cuales han sido resueltas y con respuestas que considero suficientes y aceptables.

Consiento voluntariamente que el niño(a) PARTICIPE en este estudio. El presente documento se firma en original y copia, de la cual yo recibiré una.

Este documento ha sido aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana. Con una vigencia hasta Marzo del 2017

Nombre del Participante _____

Nombre del Padre/Madre o Apoderado _____

Representante legal

Firmado: _____ Fecha: ___/___/___

Tipo y No. Identificación: _____ de _____

Dirección residencia:

“He sido testigo de la lectura exacta del documento de asentimiento al participante potencial y el individuo ha tenido la oportunidad de hacer preguntas. Confirmando de que ha dado su consentimiento libremente”.

Testigo

Firmado: _____ Fecha: ___/___/___

Tipo y No. Identificación: _____ de _____

Relación con el participante: _____

Dirección residencia: _____

Testigo

Firmado: _____ Fecha: ___/___/___
Tipo y No.

Identificación: _____ de _____

Relación con el participante: _____

Dirección residencia: _____

Certifico que he explicado la naturaleza y propósito de este estudio, así como los beneficios potenciales y los riesgos asociados con la participación a los padres o representantes legales del paciente, en la fecha indicada en este formulario de consentimiento. He respondido todas las preguntas y he presenciado la firma del presente documento. Se entregará una copia de este documento al tutor o representante legal del menor.

Nombre completo de la persona que realiza el procedimiento de Consentimiento Informado (Letra de Imprenta):

Firma: _____ Fecha: ___/___/___

Tipo y No. Identificación: _____ de _____

Anexo 3. Bases de datos de muestras analizadas

Base de Datos lactantes en el grupo que consume leche de fórmula

Fecha Nacimiento	Fecha toma de muestra	Código	Edad	Peso (gramos)	Talla (cm)	Formula	A termino	Pre-termino	Edad Gestacional	Observaciones
Marzo 10/2016	Marzo 25/216	1F	16 días	2840	49	Enfamil Liquidia	X		39 semanas	
Noviembre 16/2015	Marzo 14/2016	2F	3 meses/28 días	2100	41	Enfamil para prematuros		X	35 semanas	
Abril 14/2016	Julio 30/2016	3F	3meses	2820	51	Nestogeno 1	X		39 semanas	
Noviembre 8/2016	Diciembre 15/2016	4F	1 mes/5 días	2850	49	Enfamil Confort	X		39 semanas	
Junio 14/2016	Julio 22/2016	5F	1 mes	3330	52	Mah firts love	X		39 semanas	Lactancia materna cada 4 horas, teteros de fórmula 1 o 2 diarios
Febrero 03/2016	Abril 11/2016	6F	2 meses/8 días	2980	50	NAN-1 opti-pro	X		39 semanas	Nacimiento 2 días S26 Gold /20 dais Enfamil/ Similac 2 Semanas
Enero 22/2016	Junio 10/2016	7F	4 meses	3320	52	NAN CONFORT	X		39 semanas	Biogua gotas(Probiótico)- 6 Glóbulos de NuxVomica(Homeopático)
Septiembre 1/2015	Enero 01/2016	8F	4 meses	3800	65	Nutrilon N°1	X		39 semanas	
Enero 23/2016	Abril 16/2016	9F	2 meses y medio	3090	49,5	Enfamil Para prematuros		X	36 semanas	
Marzo 01/2016	Abril 03/2016	10F	1 mes / 3 días	3130	52	Enfamil	X		39 semanas	
Febrero 05/2016	Mayo 13/2016	11F	3 meses/9 días	3155	50	Enfamil Premium	X		39 semanas	
Aril 7/2016	Agosto 13/2016	12F	4meses	3560	52	Nestogeno 1	X		39 semanas	

Base de Datos lactantes en el grupo que consume leche de fórmula. Continuación

Fecha Nacimiento	Fecha toma de muestra	Código	Edad	Peso (gramos)	Talla (cm)	Formula	A termino	Pre-termino	Edad Gestacional	Observaciones
Julio 2/2016	Agosto 12/2016	13F	1 mes-10 días	3180	48	NAN-Active Pro	X		39 semanas	Tomaba leche S26 hasta hace una semana
Abril 21/2016	Julio 23/2016	14F	3meses	3150	50	Enfamil Premium			39 semanas	
Junio 28/2016	Septiembre 11/2016	15F	2meses/medio	3130	51	Enfamil Premium	X		39 semanas	Dolex, Jugo de granadilla
Abril 22/2016	Septiembre 10/2016	16F	5meses/2 meses EC	1300	43	Nestogeno 1		X	39 semanas	Nutri baby prematuros, Similac 1, NAN prematuros
Abril 22/2016	Septiembre 10/2016	17F	5meses/2 meses EC	1350	43	Nestogeno 1		X	39 semanas	Nutri baby prematuros, Similac 1, NAN prematuros
Junio 08/2016	Septiembre 09/2016	18F	3meses	3240	46	NAN 1	X		39 semanas	
Abril 11/2016	Julio 21/2016	19F	3meses	3135	50	NAN 1	X		39 semanas	
Abril 28/2016	Septiembre 12/2016	20F	4meses	3090	69	Enfamil Premium	X		39 semanas	

Base de Datos lactantes en el grupo que consume leche materna

Fecha Nacimiento	Fecha toma de muestra	Código	Edad	Peso (gramos)	Talla (cm)	A termino	Pre- termino	Edad Gestacional	Observaciones
Agosto 10/2015	Diciembre 23/2015	1M	4 meses	3220	50	X		39 semanas	
Enero 25/2016	Marzo 22/2016	2M	27 días	3300	51	X		39 semanas	
Febrero 16/2016	Marzo 22/2016	3M	1 mes	2700	51	X		39 semanas	Moperid (antireflujo)
Octubre 4/2015	Enero 30/2016	4M	3 meses	2740	48	X		39 semanas	
Noviembre 11/2015	Abril 4 /2016	5M	4 meses	3010	48	X		39 semanas	
Septiembre 30/2015	Noviembre 11/2015	6M	2 meses	3200	48	X		39 semanas	
Abril 01/2016	Mayo 27/2016	7M	1 mes/27 días	3000	51	X		39 semanas	
Mayo 3/2016	Mayo 27/2016	8M	24 días	2720	48	X		39 semanas	Ictericia recién nacida, Fototerapia por incompatibilidad de Rh
Diciembre 04/2015	Marzo 31/2016	9M	3 meses	3550	50			39 semanas	
Abril 8/2016	Julio 27/2016	10M	3 meses/20 días	2920	47	X		38 semanas	Salbutamol, Bromuro de ipratropio
Marzo 24/2016	Junio 21/2016	11M	3 meses	3630	50	X		40.3 semanas	Dolex a los dos meses
Mayo 10/2016	Julio 8/2016	12M	1 mes 28 días	3010	50	X		37 semanas	Enfamil 3 primeros días, Vitamina D dos días antes TM
Febrero 29/2016	Abril 06/2016	13M	1 mes/ 8 días	3040	52	X		39 semanas	Antibiótico a los 15 días de Nacido
Enero 16/2016	Abril 08/2016	14M	2 meses/22 días	2470	46	X		39 semanas	
Enero 24/2016	Abril 11/2016	15M	2 meses/18 días	2770	50	X		39 semanas	

Base de Datos lactantes en el grupo que consume leche materna. Continuación

Fecha Nacimiento	Fecha toma de muestra	Código	Edad	Peso (gramos)	Talla	A termino	Pre- termino	Edad Gestacional	Observaciones
Abril 29/2016	Junio 20/2016	16M	1 mes/22 días	2620	48,5	X		37 Semanas	
Febrero 27/2016	Abril 28/2016	17M	2 meses	2970	49	X		39 semanas	dolex
Abril 23/2016	Mayo 15/2016	18M	22 días	2730	51	X		39 semanas	
Abril 15/2016	Junio 10/2016	19M	1 mes/25 días	3280	52	X		39 semanas	Tome enfamil y similac por una semana recién nacido
Septiembre 29/2015	Marzo 15/2016	20M	4 meses	2900	50	X		39 semanas	
Junio 18/2016	Julio 11/2016	21M	23 días	3450	50	X		39 semanas	Goticas BioGaia Proteics Lactobacillus
Mayo 31/2016	Julio 12/2016	22M	42 días	3250	51	X		39 semanas	
Abril 4/2016	Julio 14/2016	23M	3 meses	3030	50	X		39 semanas	Hermana de la madre murió de Cancer
Marzo 28/2016	Julio 26/2016	24M	4 meses	3150	53	X		39 semanas	Salbutamol 1 semana antes de toma de muestra
Abril 9/2016	Agosto 3/2016	25M	3 meses	3560	51	X		39 semanas	
Septiembre 24/2015	Noviembre 24/2015	26M	2 meses	3250	50	X		39 semanas	
Octubre 19/2015	Marzo 14/2016	27M	5 meses/EC 3 meses	1532	41		X	32 semanas	
Junio 23/2016	Septiembre 10/2016	28M	2 meses	3270	50	X		38 semanas	Cetiras-Congestion nasal Hermatome-Reflujo Dolex
Agosto 10/2016	Septiembre 5/2016	29M	26 días	2705	49	X		38 semanas	
Septiembre 20/2016	Octubre 14/2016	30M	24 días	3200	50	X		39 semanas	Goticas BioGaia Proteics Lactobacillus

Anexo 4. Abundancia relativa (UA) de los metabolitos detectados en el perfil urinario de la población de estudio

Datos de abundancia relativa (UA) de las muestras del grupo de lactancia materna

EDAD	Cre	CODIGO	Láctico	HB*	Glicólico *	Oxálico*	HIB*	MHB*	MMA*	HIV*	Urea*	EH*
133	13,1	1M	0,0029724	0,000343392	0,00135607	0,000345069	0,0012261	0,0003138	0,005080986	0	0,0102092	0,0005904
52	6,11	2M	0,0075752	0	0	0	0,0035453	0	0	0	0,0169989	0,0026255
36	9,14	3M	0,0030526	0	0	0	0,0028951	0	0	0	0,0280467	0
106	2,99	4M	0,0082472	0	0	0	0,0048956	0	0	0	0,0420145	0
143	14,45	5M	0,0059534	0	0,003353719	0,001275056	0,0061255	0	0,009513182	0	0,0096368	0,0058914
41	2,18	6M	0,0416979	0	0	0	0	0,0114646	0	0	0,0144648	0
57	5,81	7M	0,0003584	0	0	0	0,0002996	0	0	0	0,0015439	0
57	7,72	9M	0,0088447	0	0,002250583	0,003757021	0,0034394	0	0	0,0123842	0,0215322	0
109	10,7	10M	0,002425	0	0	0	0,0031992	0	0,007327899	0	0,0014118	0,0179141
87	8,61	11M	0,012597	0,002752795	0,004353152	0,004090318	0,003006	0	0	0,0116344	0,0258613	0,0025793
58	4,92	12M	0,0049766	0	0	0,003651849	0	0	0	0	0,0248683	0
82	5,17	14M	0,0198443	0,003961258	0,007439997	0,005234257	0	0	0,013000772	0	0,0106898	0
78	4,76	15M	0,0257302	0	0	0	0,0064142	0	4,66323E-07	0	0,0152086	0
51	8,77	16M	0,0159769	0	0,001121853	0,00112308	0,0051636	0,0009512	0,003050358	0	0,0059595	0,0021651
60	4,92	17M	0	0	0	0	0,0039383	0	0,003226994	0	0,0239709	0,0016568
22	4,15	18M	0,036727	0	0	0	0,0045685	0	0,009057399	0	0	0,0014314
55	7,79	19M	0,0165716	0	0	0	0,0040719	0	0,002147886	0	0,0069431	0,0007347
165	3,86	20M	0	0	0	0	0,0048225	0	0	0	0,0511161	0
23	9,99	21M	0,008769	0	0	0	0,0015611	0	0,003878672	0	0,0024976	0
42	5,88	22M	0,0248795	0,001344533	0	0	0,0093838	0,0017582	0	0,0161499	0,048167	0,0037817
100	5,5	23M	0,0117009	0	0	0,007487544	0	0	0	0	0,0046031	0
118	3,43	24M	0,0113564	0	0	0	0,0024523	0	0,003015691	0	0,0159193	0,0014112
114	32,91	25M	0,0051474	0,001297096	0,00075935	0,000610452	0,0033031	0,0011727	0,013482558	0	0,0111556	0,0020169
60	8,1	26M	0,0067242	0	0	0,001411606	0,0022043	0	0,002833228	0	0,0252832	0,0008759
90	5,7	27M	0,0147548	0	0	0,002218824	0,0041217	0	0,001953005	0	0,0193748	0,0035188
77	18,45	28M	0	0	0,001661276	0,002389766	0,001971	0	0,005473817	0	0,0119306	0
26	11,04	29M	0	0	0,003485535	0,001077233	0,001863	0	0	0,0038587	0,0025949	0
24	2,3	30M	0,0319682	0	0,013934993	0,048879603	0,0181237	0	0	0,015599	0,1051038	0

*La abundancia de todos los metabolitos esta expresada en Unidades arbitrarias. HB: 2- Hidroxibutírico, HIB: 3 Hidroxi-isobutírico, MHB: 2-metil-3-Hidroxi-butírico, MMA: Metilmalónico, HIV: 3-Hidroxi-isovalérico, EH: 2-Etilhidracrílico.

Datos de abundancia relativa (UA) de las muestras del grupo de lactancia materna. *Continuación*

EDAD	Cre	CODIGO	Fosfórico	EM*	Succínico	MS*	Fumárico *	FA*	Glutárico *	MG*	HA*	MGC*
133	13,1	1M	0	1,12182E-05	0,027056907	0,000338121	0	0	0	0	0,0024495	0,0004813
52	6,11	2M	0,0010605	0,002625474	0,071654135	0	0,0038105	0,008342	0,002821232	0	0,0069136	0
36	9,14	3M	0	0,002633421	0,022888624	0	0	0	0,001883708	0	0	0,0018103
106	2,99	4M	0	0	0,093525661	0	0,0036913	0	0	0	0	0
143	14,45	5M	0,0024245	0,008755977	0,049998064	0,001433982	0,0069881	0	0,003423276	0,0013801	0,021784	0,0027637
41	2,18	6M	0	0	0,110173603	0	0	0	0	0	0	0
57	5,81	7M	0	0	0,003166538	0	0	0	0	0	0	0
57	7,72	9M	0	0,005452168	0,04227456	0	0,0038588	0,0079627	0,002607649	0	0,0136413	0
109	10,7	10M	0	0,003686435	0,017080551	0	0,0031401	0	0	0	0,0033148	0,0014004
87	8,61	11M	0	0,006205537	0,095848245	0	0,005111	0,0164529	0	0	0,0169854	0,0051582
58	4,92	12M	0	0,004544432	0,019048514	0	0,0025746	0,0204009	0,002208629	0	0	0,0028542
82	5,17	14M	0	0	0,049362261	0	0,0049752	0,0021415	0,005020337	0	0	0
78	4,76	15M	0,0039503	0,003636754	0,042045014	0	0,0043102	0	0	0	0	0
51	8,77	16M	0,0025032	0,004397569	0,092818786	0,001396767	0,0143408	0,0271867	0	0	0,0013598	0,0023541
60	4,92	17M	0,0068139	0,004566187	0,092275726	0	0,0110245	0	0	0	0,0033735	0,0021211
22	4,15	18M	0,0036645	0,005273119	0,140603037	0	0,0205554	0,0015379	0	0	0	0
55	7,79	19M	0,0022669	0,003170224	0,050163233	0,001260419	0,0043304	0,0260154	0	0	0,0034461	0,0058311
165	3,86	20M	0,0042014	0	0,075260802	0	0,0054686	0,0199699	0	0	0	0
23	9,99	21M	0,0022251	0,003172178	0,057005928	0	0,0056244	0,0017121	0	0	0	0,0083347
42	5,88	22M	0,0031852	0,019899368	0,199287972	0,002481196	0,0209336	0,0370517	0,013632734	0	0,0183988	0,0044075
100	5,5	23M	0	0,006598692	0,085628738	0	0	0,0051534	0,004722031	0	0	0,0069551
118	3,43	24M	0	0,004012148	0,026334485	0	0,0021102	0,0014359	0,004078549	0	0,0048709	0,0017265
114	32,91	25M	0	0,003439792	0,022404786	0,000852577	0,0045821	0,1227231	0	0,0007385	0,0036181	0,0019905
60	8,1	26M	0,0010777	0,004330914	0,089597836	0,001050055	0,0054962	0,0117014	0,006663763	0	0,0033423	0,0123373
90	5,7	27M	0,0011019	0,005070503	0,044942228	0,001168622	0,002069	0,0020182	0	0	0,0055259	0,0012789
77	18,45	28M	0	0,003777192	0,027900322	0	0,0021826	0,0033837	0,002781545	0	0	0
26	11,04	29M	0,0015947	0,00219843	0,066307415	0,00115639	0	0,0084757	0,003530581	0	0,0051288	0
24	2,3	30M	0	0,021298728	0,468867295	0	0,0259519	0,024359	0,033931924	0	0	0,0127876

*La abundancia de todos los metabolitos esta expresada en Unidades arbitrarias. EM: Etilmalónico, MS :Metil-succínico, FA: Fenilacético, MG: 3-Metil-glutárico, HA: 3 Hidroxi-adipato-lactona, MGC: 3 metil-glutaónico

Datos de abundancia relativa (UA) de las muestras del grupo de lactancia materna. *Continuación*

EDAD	Cre	CODIGO	CM	Adípico*	MH*	Heptedienoato*	HG*	HMG*	CG*	HB*	HFA*	Subérico*
133	13,1	1M	0	0,006308474	0,000709034	0,002105666	0,0029094	0,0019575	0	0	0,0091022	0,0003758
52	6,11	2M	0	0,011223093	0,002123783	0,002361112	0,0010237	0	0	0	0,0093242	0,0072584
36	9,14	3M	0	0,003184955	0	0,001028288	0	0	0	0,0034879	0,008594	0,0025084
106	2,99	4M	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0129016	0
143	14,45	5M	0,0021898	0,046237028	0,005276189	0,00497522	0,0053422	0,0138942	0	0	0,013248	0,011962
41	2,18	6M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
57	5,81	7M	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0008027	0
57	7,72	9M	0	0	0	0	0,002531	0	0	0,0042966	0,005144	0,004317
109	10,7	10M	0	0,005244939	0,002490678	0,004860489	0,0013969	0	0,004602073	0	0,0549807	0,0037547
87	8,61	11M	0	0	0,003993771	0,009754986	0,0068665	0	0,057060491	0	0,0083105	0,0090645
58	4,92	12M	0	0,003414714	0	0	0,0013666	0	0,00217835	0	0,0055424	0,0036655
82	5,17	14M	0	0	0,003111874	0,002953644	0	0	0,015854486	0	0,0799878	0,0058669
78	4,76	15M	0	0	0	0	0	0	0	0,0029023	0,0078451	0
51	8,77	16M	0,0016551	0	0,001911526	0,001791542	0,0032607	0	0,013656335	0	0,008134	0,0071044
60	4,92	17M	0	0,066528298	0,004471537	0,003864844	0,0030548	0	0	0,0062582	0,0729284	0,0145406
22	4,15	18M	0	0	0	0	0,0030355	0	0	0,0022662	0,0079501	0
55	7,79	19M	0,0014113	0	0,001862997	0,002575725	0,0022924	0	0	0,0027762	0,0110564	0,0106445
165	3,86	20M	0	0	0,004047831	0,006580795	0	0	0	0,0043745	0,0050403	0
23	9,99	21M	0,0008071	0	0,000718844	0,000926454	0,0018953	0	0,012897058	0	0,0048913	0
42	5,88	22M	0,002046	0,021512162	0,003121703	0,003716352	0,003082	0,0034417	0	0,0025714	0,016884	0,0129116
100	5,5	23M	0	0	0,003936716	0,009116767	0	0	0,013884542	0	0,0172269	0,0088621
118	3,43	24M	0	0	0,002034842	0,002990433	0	0	0	0	0,0134165	0
114	32,91	25M	0,0008562	0,008254613	0,001505261	0,002858063	0,0022995	0	0,00469748	0	0,0557231	0,0058693
60	8,1	26M	0	0,020212539	0,001881614	0,003837905	0,0030624	0	0,005430769	0	0,0109162	0,0074573
90	5,7	27M	0,0016488	0	0,003155147	0,003232906	0,0020984	0	0,005020099	0	0,0162422	0,008049
77	18,45	28M	0	0	0,001405002	0,002984189	0	0	0	0	0,0164045	0,0019591
26	11,04	29M	0	0	0,001700523	0,002877271	0,0012675	0,0085167	0	0	0,0057064	0
24	2,3	30M	0,0095972	0	0,010993117	0,012578255	0,0184322	0	0	0,0388115	0,1185431	0,0359192

*La abundancia de todos los metabolitos esta expresada en Unidades arbitrarias. CM: Citramálico, MH: Metil-Hexanedioato, HG: 2 Hidroxi-glutárico, HMG, 3 Hidroxi-metil-glutárico, CG: 2-Cetoglutárico, HB: 4 Hidroxi-benzoico, HFA: 4-Hidroxi-fenilacético.

Datos de abundancia relativa (UA) de las muestras del grupo de lactancia materna. *Continuación*

EDAD	Cre	CODIGO	Aconítico*	Hipúrico*	Cítrico*	VMA*	HFL*	Palmitico*	HS*	HH*	Esteárico*	PAG*
133	13,1	1M	0,010169	0,007120699	0,017598123	0,003340008	0	0,0744167	0,004619206	0,0020075	0,0159764	0
52	6,11	2M	0,0249862	0,032117131	0,059405402	0,01039249	0,0016284	0,297034	0,019956287	0,0066822	0,1823212	0
36	9,14	3M	0,0148484	0,008056556	0,040328132	0,004167415	0,0032809	0,2415313	0,003050862	0,0448292	0,1524276	0
106	2,99	4M	0,0194929	0,022778953	0,061426525	0	0	0,996693	0	0	0,6504908	0
143	14,45	5M	0,1064911	0,025651343	0,137177963	0	0	0,1144134	0,053676545	0,0099363	0,0785603	0
41	2,18	6M	0,0195413	0	0,118196121	0	0	1,358011	0,005508623	0	0,8872964	0
57	5,81	7M	0,0014242	0	0,006783101	0,000371748	0	0,0392816	0,000227424	0	0,0239331	0
57	7,72	9M	0,0529468	0,030987025	0,074917257	0	0	0,1145142	0,021062428	0	0,0806959	0
109	10,7	10M	0,0237418	0,029870039	0,0446528	0,009783101	0,0035494	0,2328035	0,008771929	0,0103067	0,1458445	0,0176641
87	8,61	11M	0,135554	0,033698018	0,158423214	0,025421267	0	0,4019654	0,040111291	0	0,3087297	0
58	4,92	12M	0,0268222	0,053557531	0,07626041	0,006012116	0	0,2958838	0,002982002	0,0054345	0,1822886	0
82	5,17	14M	0,0412674	0,027788258	0,083682106	0	0,0275203	0,2892884	0,006290159	0,0119334	0,2154303	0
78	4,76	15M	0,0293386	0,011059775	0,059527303	0	0	0,3804653	0,008659879	0,0153682	0,2753287	0
51	8,77	16M	0,0317713	0,039355982	0,111991311	0,009700691	0,0074174	0,1911876	0,005318522	0,0119645	0,1363127	0
60	4,92	17M	0,0504779	0,097099575	0,106323654	0,018931598	0	0,5257154	0,025309533	0,0475891	0,3901534	0
22	4,15	18M	0,0216588	0,010085594	0,054961175	0,008825463	0,0069975	0,3904085	0,00462168	0,0043531	0,2653306	0
55	7,79	19M	0,0273274	0,11561094	0,055369067	0,012306898	0	0,2245982	0,015802452	0,0198148	0,1574502	0
165	3,86	20M	0,0272686	0,053799137	0,056888184	0,009892488	0	0,2736476	0,003422603	0,0180211	0,1683984	0
23	9,99	21M	0,0164401	0,008667375	0,043550832	0,007200082	0,0055036	0,1763792	0,003464237	0,0075763	0,1240347	0
42	5,88	22M	0	0,060618571	0,125305969	0,019964665	0,0091009	0,2367822	0,049859392	0,0186472	0,1727138	0
100	5,5	23M	0,0820876	0,008346645	0,106263652	0,019101704	0	0,4748847	0,126810985	0	0,3332271	0
118	3,43	24M	0,0239844	0,029377702	0,031537501	0,008626045	0	0,1690571	0,008245932	0	0,1044685	0
114	32,91	25M	0,0192232	0,028928293	0,039908688	0,012563892	0,0040472	0,0272639	0	0,0068016	0,0189434	0,0270618
60	8,1	26M	0,0301077	0,050783032	0,059421992	0,013051608	0,0049718	0,1591525	0,010302587	0,0111363	0,1016376	0
90	5,7	27M	0,0241667	0,045988697	0,114304746	0,007084584	0,0041888	0,1559658	0,012394456	0,0029259	0,1035034	0,0039805
77	18,45	28M	0,0241562	0,03208496	0,081678975	0,005104545	0,0067596	0,111388	0,003369716	0,0067802	0,0855555	0
26	11,04	29M	0,023054	0,018369206	0,025488741	0,004732435	0,0058567	0,1610924	0,00909438	0,0115893	0,1202348	0
24	2,3	30M	0,178935	0,101798153	0,1897521	0,066440964	0	0,755807	0,044551621	0,0510046	0,5374902	0

*La abundancia de todos los metabolitos esta expresada en Unidades arbitrarias, VMA: Vanilmandélico, HFL: 4 Hidroxi-fenil-láctico, HS: 3 Hidroxi-Sebacato, HH: 4 Hidroxi-hipúrico, PAG: Fenil-acetil-glutamina

Datos de abundancia relativa (UA) de las muestras del grupo de leche de fórmula.

EDAD	Cre	CODIGO	Láctico*	HB*	Glicólico*	Oxálico*	Pirúvico*	HIB*	MHB*	MMA*	HIV*	Urea*	EH*
16	6,1	1F	0,0224562	0	0	0,0037576	0	0	0	0	0,008199	0,022600974	0
119	20	2F	0,0057658	0	0,003703034	0,0017664	0	0,004100668	0,00062398	0	0,0055186	0,01737543	0,000497728
90	60	3F	0,0029045	0,0007717	0,001508827	0	0	0,004256755	0,00080847	0	0,0061797	0,006142606	0,001513026
35	5,05	4F	0,0076661	0	0,00292464	0	0	0	0	0	0	0,018138752	0
30	7,5	5F	0,0083605	0	0,00380521	0	0	0,002045117	0	0	0,0061909	0,004244045	0
68	9,95	6F	0,0091186	0	0,05509034	0,0035264	0	0,003245033	0	0	0,0079241	0	0
120	18,05	7F	0	0	0	0,0065393	0	0	0	0,003927	0	0,028734315	0
120	2,3	8F	0	0	0	0,0090237	0	0	0	0	0	0,062533597	0
75	9,9	9F	0,0059016	0	0,004403868	0	0	0	0	0	0,0025038	0	0
33	5,6	10F	0,0118305	0	0,007524212	0,0027082	0	0	0	0,0536174	0	0,010761386	0,006517354
99	9,75	11F	0,0044436	0,0009214	0,002441536	0,000923	0	0	0,00043084	0,0054907	0	0,017278321	0
120	8,5	12F	0,0114101	0,0060919	0,004788228	0	0	0	0,00319969	0	0,0273418	0,005060953	0,001767423
40	13,85	13F	0,0100095	0	0,002726993	0	0	0,003200629	0	0	0,0086737	0,004975201	0
60	25	14F	0	0,0008062	0	0	0,00145856	0,003920075	0	0	0,0051902	0,003162294	0,000581982
75	4,75	15F	0	0	0,008216235	0	0,00989366	0,003370368	0	0	0	0,018051991	0
60	12,4	16F	0,0087087	0	0,002942967	0	0	0,004536608	0	0	0	0,00350807	0,000967777
60	7,15	17F	0	0	0,00473234	0,0037592	0	0,00274573	0	0	0	0,004741059	0
90	4,25	18F	0,0291836	0	0,007998576	0,0053689	0	0	0	0	0	0,010723801	0
90	30	19F	0,0032253	0,0005483	0,001092787	0,0093371	0	0,003880962	0,00052167	0,0329583	0	0,009630398	0,001291552
120	72	20F	0,0011935	0,0005609	0,000675919	0,000697	0	0,000638734	0,00031041	0	0,0013842	0,001889356	0,00016346

*La abundancia de todos los metabolitos esta expresada en Unidades arbitrarias. HB:2- Hidroxibutírico, HIB: 3 Hidroxi-3 OH isobutírico, MHB: 2 metil 3 Hidroxi-butírico, MMA: Metilmalónico, HIV: 3 Hidroxi-isovalérico, EH: 2-Etilhidracrílico

Datos de abundancia relativa (UA) de las muestras del grupo de leche de fórmula. *Continuación*

EDAD	Cre	CODIGO	Octanoato*	Fosfórico*	EM*	Succínico*	MS*	Fumárico*	DOT*	FA*	Glutárico *	MG*	AL*
16	6,1	1F	0	0	0,011764138	0,0889483	0	0,006031132	0	0	0	0	0
119	20	2F	0	0,0023698	0,002873214	0,0163004	0,0004851	0	0,00045291	0,0007142	0,0025264	0	0,001086971
90	60	3F	0	0,0014489	0,003003123	0,0080456	0,00055845	0	0,00027314	0,0046869	0,0015762	0	0,002508045
35	5,05	4F	0	0	0,002814195	0,047297	0	0	0	0,0030427	0	0	0
30	7,5	5F	0	0	0	0,0241099	0	0,003541756	0	0,0045741	0	0	0
68	9,95	6F	0	0,0049726	0,005788501	0,0626131	0	0	0	0,0055001	0,0058832	0	0
120	18,05	7F	0	0,0035659	0,012194846	0,127533	0,00239678	0,006430295	0,00566093	0	0,0105712	0	0
120	2,3	8F	0	0	0	0,0770379	0	0	0	0,0210342	0	0	0
75	9,9	9F	0	0	0,003595779	0,0675932	0	0,004267314	0	0	0	0	0
33	5,6	10F	0,0077617	0	0	0,0717979	0	0,00495258	0	0,0017296	0,0031911	0	0
99	9,75	11F	0	0	0,002919692	0,0158127	0,00059667	0,001353667	0	0,0051033	0,0020242	0	0,003224123
120	8,5	12F	0,0052256	0,0043119	0,014787805	0,1134698	0,00398275	0	0,00302521	0,1015857	0,0072556	0,002228734	0,026924786
40	13,85	13F	0	0,0037101	0,004196587	0,0695673	0	0	0	0,0016827	0	0	0,004295293
60	25	14F	0	0	0	0,0513432	0,00104662	0	0	0,0202232	0	0	0,002162992
75	4,75	15F	0	0,0088242	0,003544924	0,0501411	0	0	0	0,0132327	0	0	0
60	12,4	16F	0	0	0	0,0699551	0,00130558	0	0	0	0	0	0,006024493
60	7,15	17F	0	0	0	0,0475792	0	0,002615952	0	0	0,0098425	0	0
90	4,25	18F	0	0	0	0,0341247	0	0	0	0	0	0	0
90	30	19F	0	0	0,023416555	0,0926854	0,00328371	0,005099408	0	0	0,007662	0,001424261	0
120	72	20F	0	0,0009882	0,000964614	0,0034516	0,00021098	0,000263359	0,000119	0,0013264	0,0002838	0,000132317	0,001492462

*La abundancia de todos los metabolitos esta expresada en Unidades arbitrarias. , EM: Etilmalónico, MS: Metilsuccínico, DOT: 4-Deoxytetrocico, FA: Fenilacético, MG: 3-Metil-glutárico, AL: 3 Hidroxi-adipato-lactona.

Datos de abundancia relativa (UA) de las muestras del grupo de leche de fórmula. *Continuación*

EDAD	Cre	CODIGO	DHH*	MGC*	DHB*	levalonato	CM*	Adípico*	MH*	CG*	ptenedióic	HG*	HMG*
16	6,1	1F	0,0088589	0,0026406	0	0	0	0	0	0	0,0035507	0	0,02101529
119	20	2F	0	0,0011926	0,001288545	0	0	0,004478208	0,00034595	0	0,0007267	0,00099432	0,003496059
90	60	3F	0	0,0011841	0,001213204	0	0,00072556	0,005546656	0	0	0,0027072	0,001033427	0,003530918
35	5,05	4F	0	0	0,003115801	0	0	0	0	0	0	0,002410233	0
30	7,5	5F	0,0068908	0	0,003251945	0	0	0	0	0	0,0040012	0,002375987	0
68	9,95	6F	0	0,002876	0,005341619	0	0	0,020462628	0,00261801	0	0	0,002887461	0,008867733
120	18,05	7F	0,011025	0,004898	0	0	0	0,04933548	0,00662408	0	0,0053247	0	0,009774208
120	2,3	8F	0	0	0	0	0	0	0,01184674	0	0	0	0
75	9,9	9F	0	0	0,006746574	0	0	0,027713983	0	0	0	0,003381604	0
33	5,6	10F	0	0,001633	0,006425537	0	0	0	0	0	0	0	0,006510498
99	9,75	11F	0	0,0010342	0,00270517	0	0	0	0,00122147	0	0,0020227	0,001398333	0,002997437
120	8,5	12F	0	0,0073486	0	0,0039744	0	0,06516862	0	0	0,0213253	0	0,025245857
40	13,85	13F	0	0,0021358	0	0	0	0	0	0	0,0023143	0	0,010210984
60	25	14F	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0028633	0	0,00729299
75	4,75	15F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60	12,4	16F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,009134064
60	7,15	17F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
90	4,25	18F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
90	30	19F	0	0,0092048	0,002568009	0	0	0	0,00594952	0	0,017257	0,004173338	0
120	72	20F	0	0	0,000796598	0	0,00043392	0,002793905	0,00016885	0	0,0005997	0	0,001246015

La abundancia de todos los metabolitos esta expresada en Unidades arbitrarias. DHH: DI-Hidroxi-heptanoico MGC: 3 metil-glutaconico DHB: 3,4 Dihidroxi-butirico, CM: Citramalico, MH: Metilhexanedioato, CG: 2- Cetoglutarico, HG: 2-Hidroxi-glutarico, HMG: 3 Hidroxi-metil-glutárico

Datos de abundancia relativa (UA) de las muestras del grupo de leche de fórmula. *Continuación*

EDAD	Cre	CODIGO	HB*	HFA*	Láurico*	Subérico*	Aconítico*	HVA*	Hipérico*	MCV*	Cítrico*	VMA*	HFL*
16	6,1	1F	0	0,0139554	0	0,0056815	0	0,031466065	0,0425416	0	0,055812	0	0,012998841
119	20	2F	0	0,0094503	0	0,0031765	0,01915599	0	0,01799203	0	0,0168134	0,004449208	0,001325689
90	60	3F	0	0,0360961	0	0,0031837	0,01632587	0	0,00219169	0	0,0321402	0,008030292	0,001211745
35	5,05	4F	0	0,0079094	0	0	0,0221529	0	0	0	0,032356	0,004841813	0
30	7,5	5F	0	0,0050405	0	0	0,04210947	0	0,01921012	0,0034261	0,0628014	0,009152487	0
68	9,95	6F	0	0,038495	0	0,0068833	0	0,044442375	0,00905365	0,0022228	0,0723009	0,013531377	0,004668186
120	18,05	7F	0	0,1591767	0	0,0138593	0	0,062943113	0	0	0,1601584	0	0
120	2,3	8F	0	0,0204097	0,015234084	0	0,08994345	0	0,06894957	0	0,0698303	0	0
75	9,9	9F	0	0,0149153	0,006684645	0,0163451	0	0,072803426	0,03126547	0	0,0486994	0	0
33	5,6	10F	0	0,0151697	0,009547013	0	0,04432977	0	0,02479769	0	0,0506088	0	0
99	9,75	11F	0	0,0042801	0	0,0049816	0,03141259	0	0,00428204	0,0008299	0,0262524	0,005176947	0
120	8,5	12F	0,0058391	0,0429919	0,005854233	0	0,11182798	0	0,04054548	0	0,1566176	0,034351422	0,004967402
40	13,85	13F	0,0034	0,0167223	0	0	0,03268322	0	0,01443872	0	0,0367209	0,006972411	0
60	25	14F	0	0,0565936	0	0,0049103	0,01869485	0	0,03712005	0	0,048949	0,005368023	0
75	4,75	15F	0	0,0288847	0	0	0	0	0,02186061	0	0,0436506	0	0
60	12,4	16F	0	0,0454487	0	0	0	0	0	0	0,0477152	0,007276926	0
60	7,15	17F	0	0,0263241	0	0	0	0	0,04744834	0	0,0479252	0	0
90	4,25	18F	0	0,041713	0	0	0,04703851	0	0,02509674	0	0,118803	0,009314147	0
90	30	19F	0,0122111	0,2242116	0	0,0089232	0	0,003139413	0,07183164	0	0,123374	0,031108487	0,024590554
120	72	20F	0	0,0030735	0	0,0011966	0,01030613	0	0,00666413	0	0,0114957	0,001919477	0

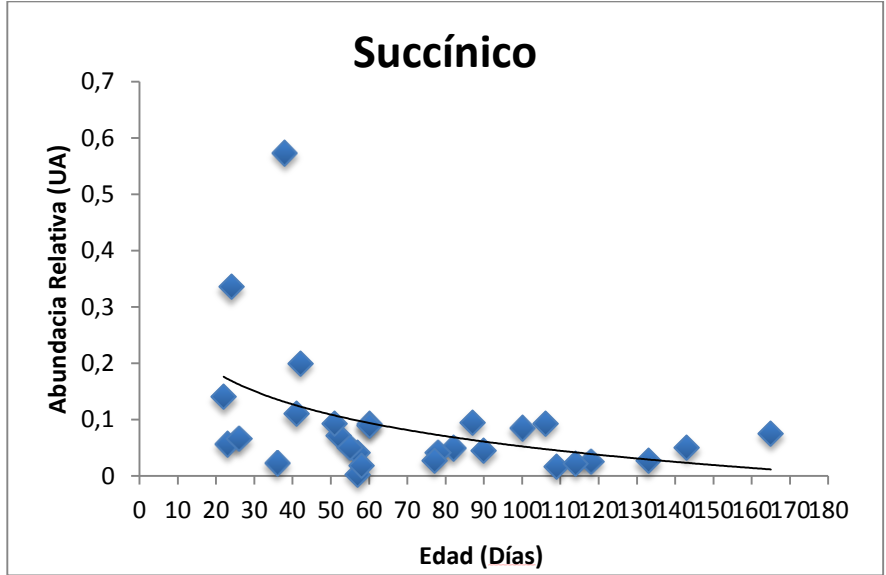
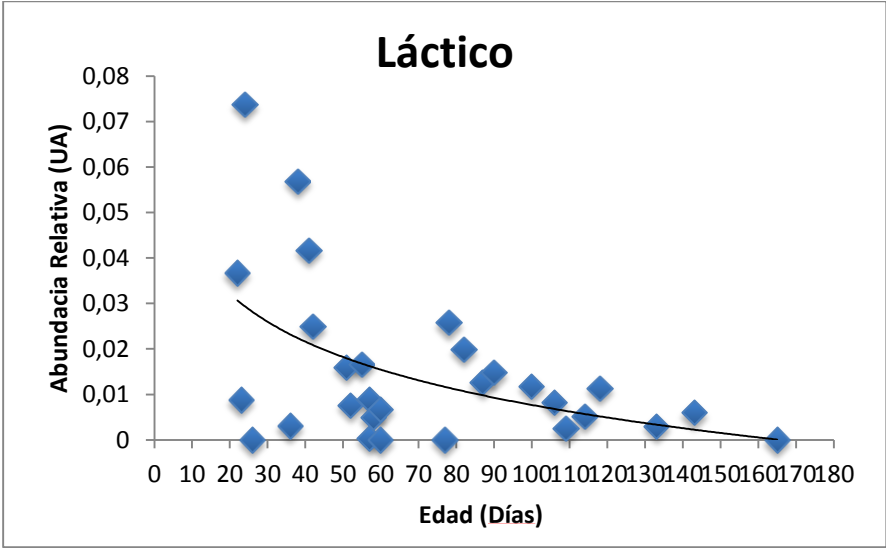
*La abundancia de todos los metabolitos esta expresada en Unidades arbitrarias, HB: 4 Hidroxi-benzoico, HFA: 4-Hidroxi-fenilacético, HVA: Homovanílico, MCV: 2-metil-cetovalerico, VMA: Vanilmandelico, HFL: 4 Hidroxi-fenil-láctico,

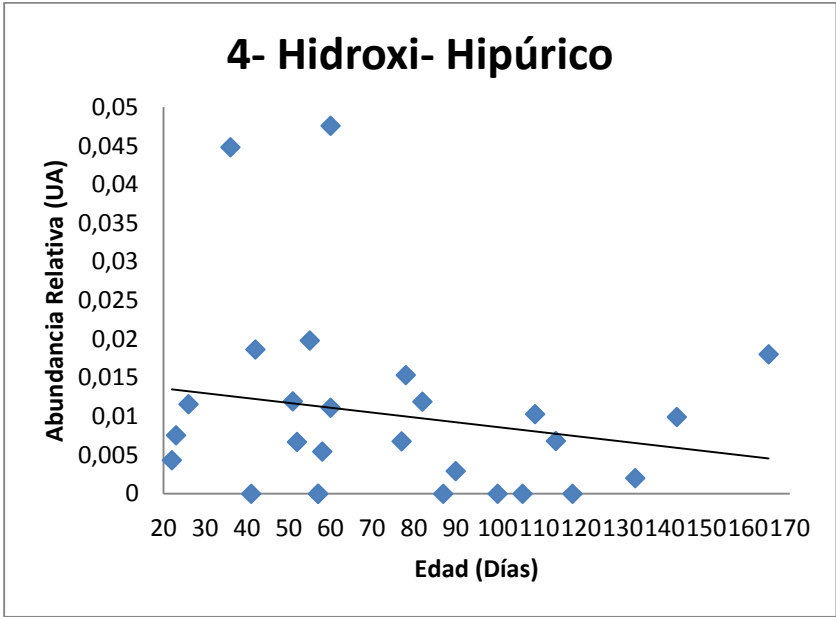
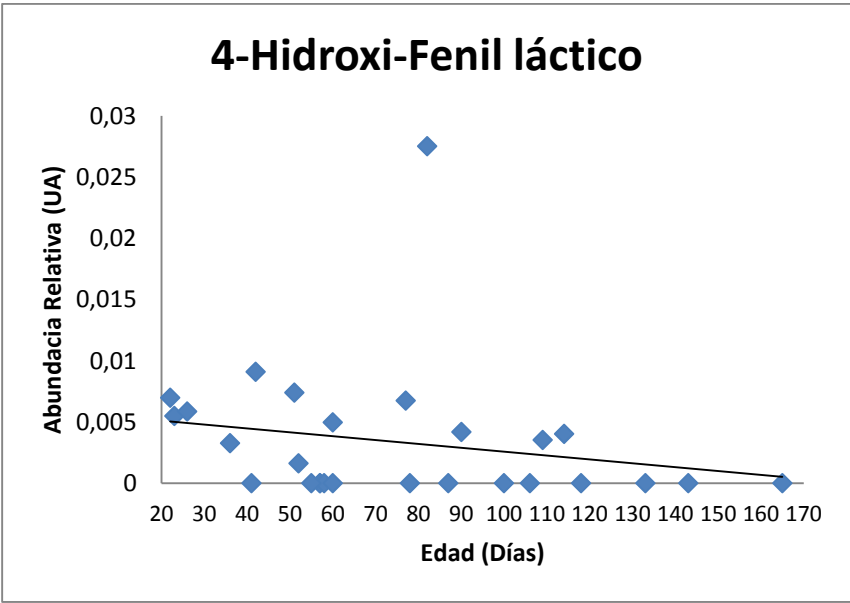
Datos de abundancia relativa (UA) de las muestras del grupo de leche de fórmula. *Continuación*

EDAD	Cre	CODIGO	D-glucitol	Palmitico	HS	HH	Esteárico	PAG
16	6,1	1F	0,016662156	0,2367523	0,010754231	0,0178181	0,17956962	0
119	20	2F	0	0,0304226	0,002346738	0,004309	0,02181157	0,00591173
90	60	3F	0	0,01517	0,005098655	0,0037866	0,01063335	0,000585226
35	5,05	4F	0	0,2257795	0,001863746	0	0,15772142	0
30	7,5	5F	0	0,2976782	0,01832832	0	0,23016962	0
68	9,95	6F	0	0,1883571	0,007224171	0,0032987	0,14541053	0
120	18,05	7F	0	0,0752118	0,031929345	0,0190987	0,0507519	0,061285467
120	2,3	8F	0	0,5863263	0,028092999	0,0338368	0,35124806	0
75	9,9	9F	0	0,238161	0,022613643	0,0214231	0,15079089	0
33	5,6	10F	0	0,3214539	0,006469128	0,0120239	0,18259777	0
99	9,75	11F	0,003113891	0,0900537	0,006523868	0	0,06151655	0
120	8,5	12F	0	0,2723844	0,021939396	0,0504684	0,24617605	0,013503627
40	13,85	13F	0,009223168	0,1834142	0,006609767	0,0091104	0,1306225	0
60	25	14F	0	0,0598872	0,004965351	0,0047047	0,04423653	0,009742787
75	4,75	15F	0,02229553	0,3969297	0	0	0,28148031	0
60	12,4	16F	0	0,1445921	0	0	0,11015253	0
60	7,15	17F	0,005649628	0,3442769	0,005260619	0	0,25145651	0
90	4,25	18F	0,008976865	0,5594271	0	0,0158134	0,39823154	0
90	30	19F	0	0,0463665	0,028576573	0,0194793	0,03021059	0,029683803
120	72	20F	0,001158181	0,0122144	0,002020616	0,0011534	0,0087341	0

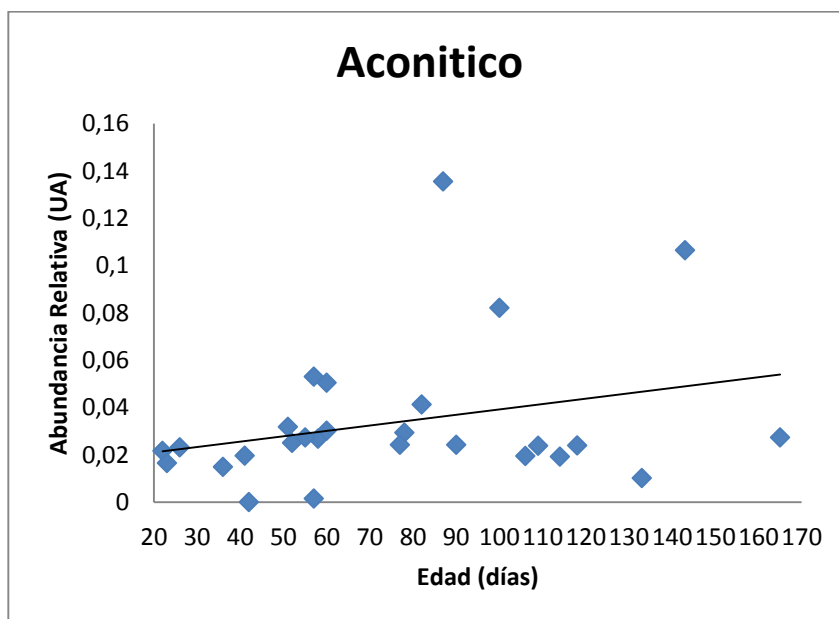
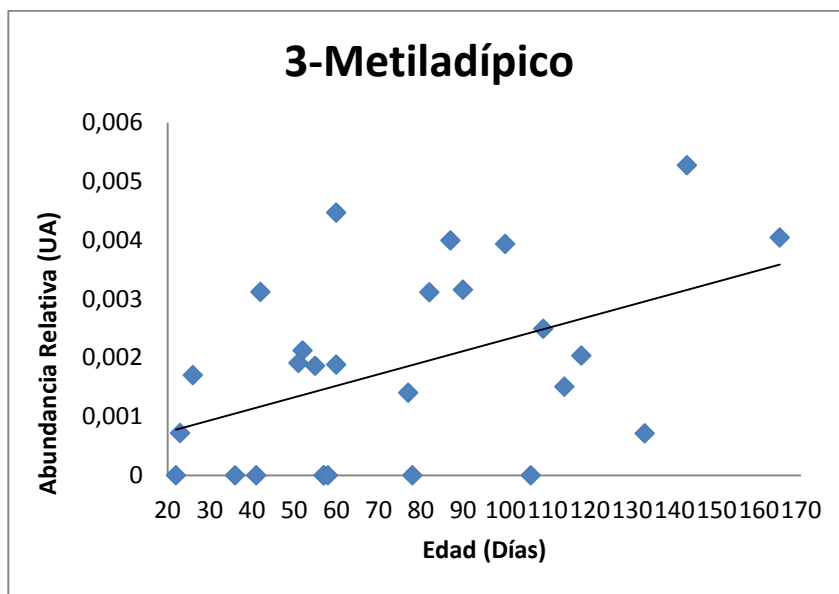
*La abundancia de todos los metabolitos esta expresada en Unidades arbitrarias, HS: 3 Hidroxi-Sebacato, HH: 4 Hidroxi-hipúrico, PAG: Fenil-acetilglutamina

Anexo 5. Gráficas de metabolitos con tendencia a disminuir con la edad en lactantes que consumían leche materna

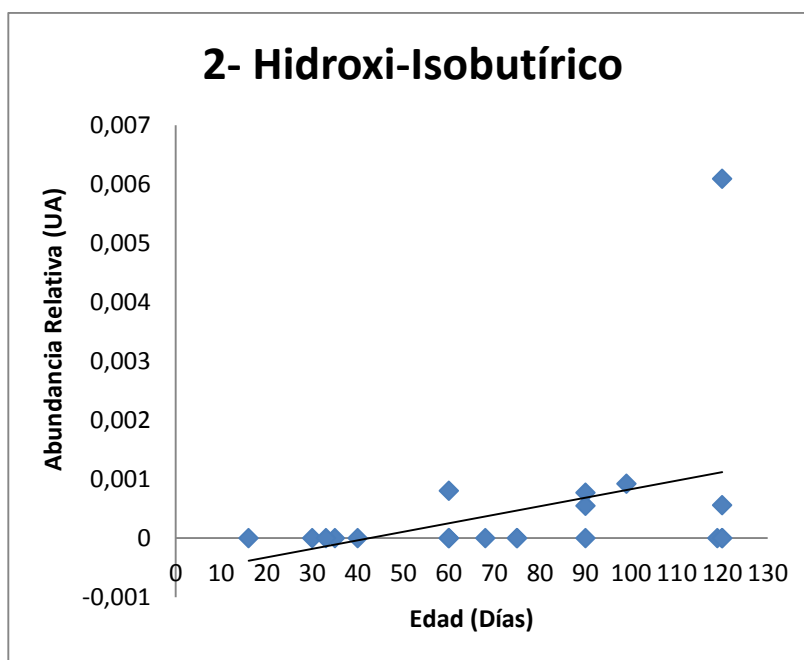
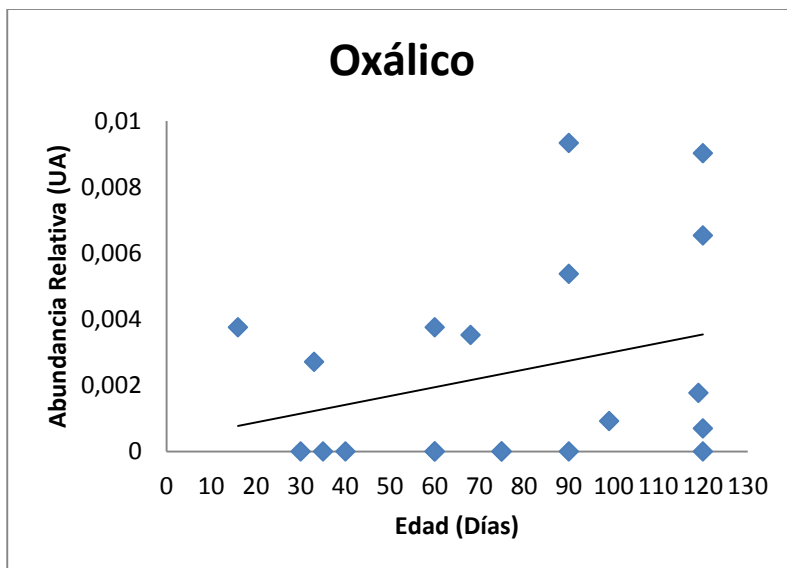


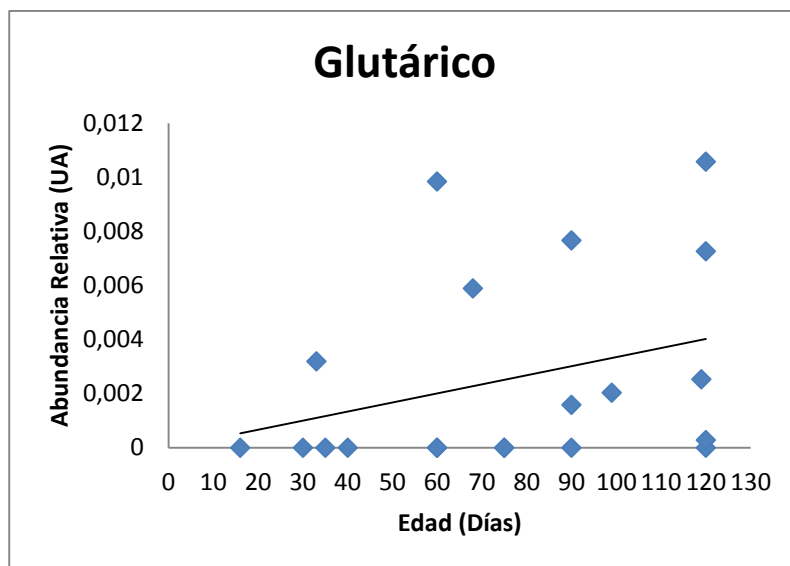
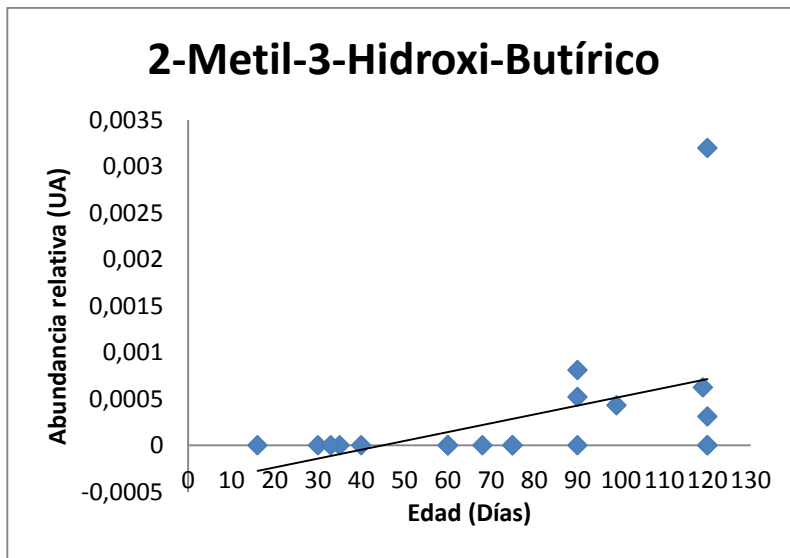


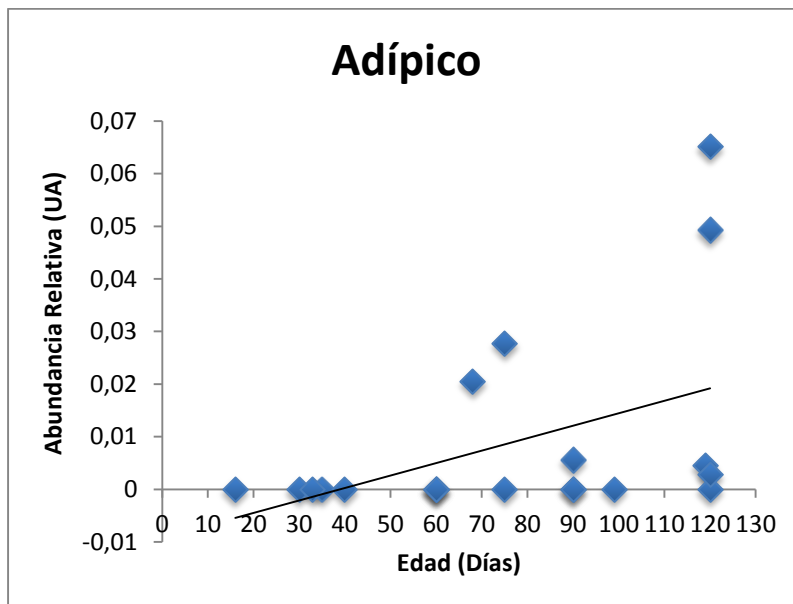
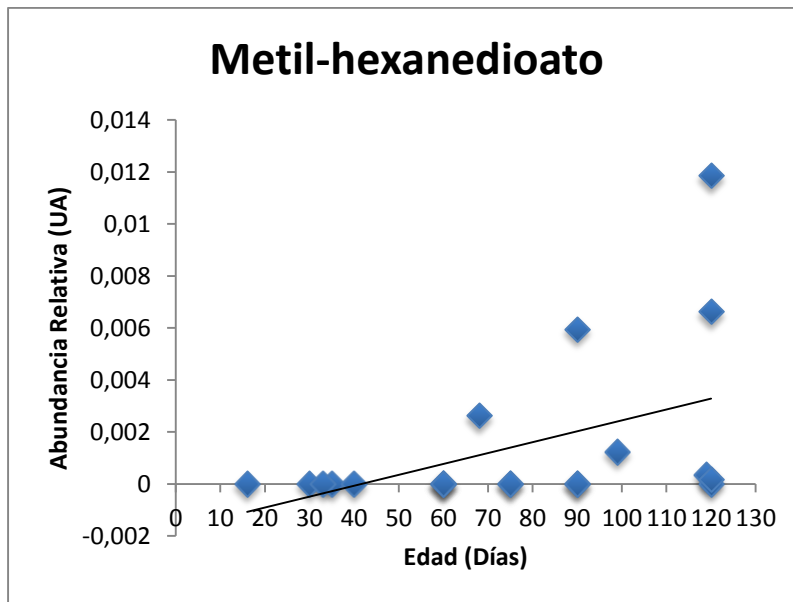
Anexo 6. Gráficas de metabolitos con tendencia a aumentar con la edad en lactantes que consumían leche materna

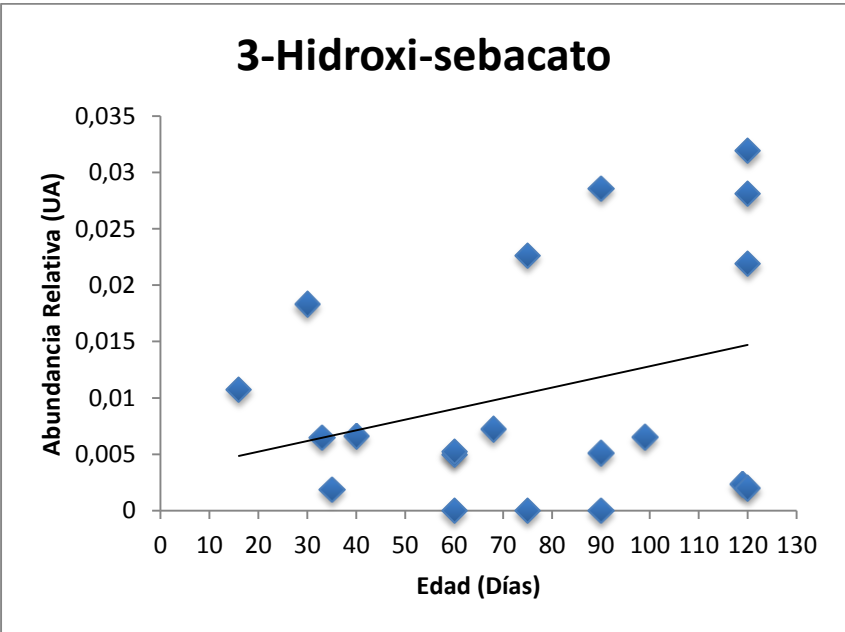
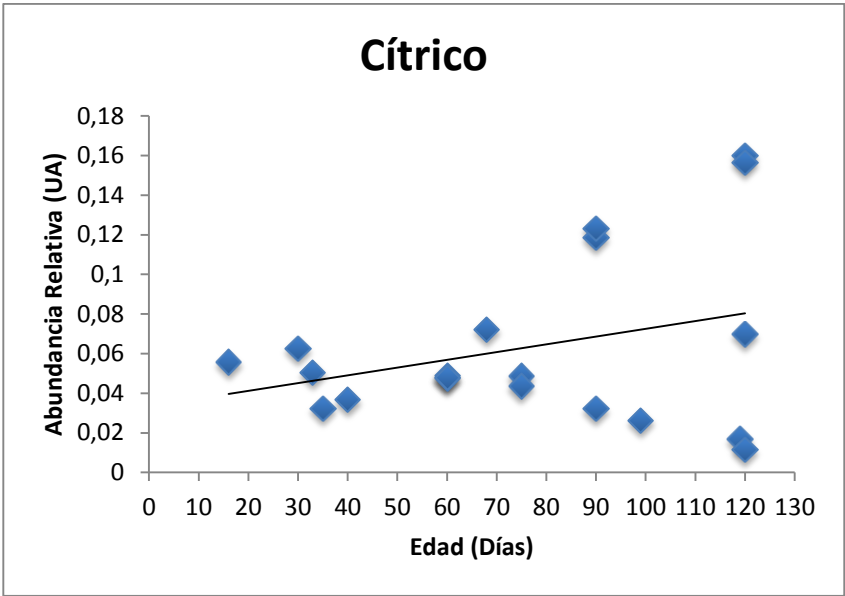


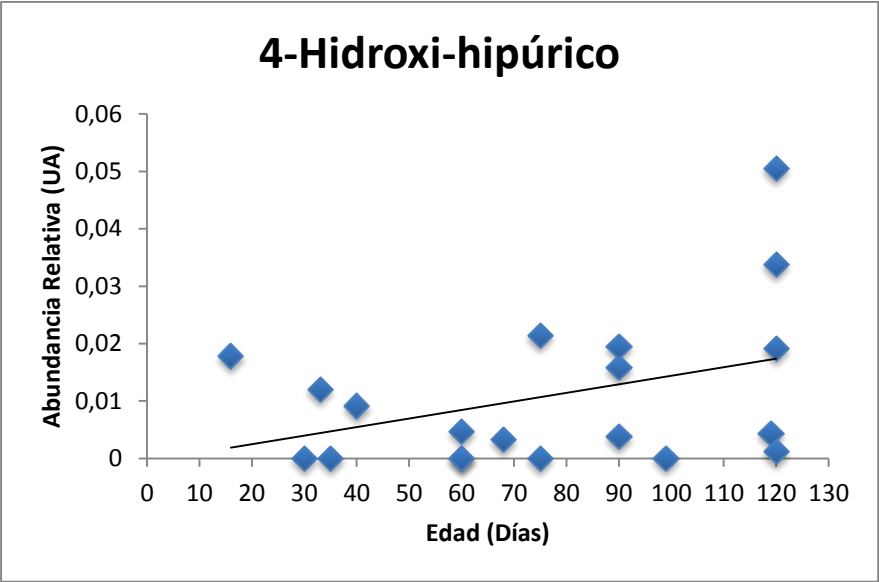
Anexo 7. Gráficas de metabolitos con tendencia a aumentar con la edad en lactantes que consumían formulas infantiles











Anexo 8. Resultados análisis de correlación entre la abundancia relativa de los metabolitos y la dieta.

Resultados análisis de correlación entre abundancia relativa y la dieta.

Metabolitos		Dieta	Metabolitos		Dieta	Metabolitos		Dieta
Cetoglutarico	Coeficiente de correlación	,442	Láctico	Coeficiente de correlación	,227	Succínico	Coeficiente de correlación	,106
	Sig. (unilateral)	,001		Sig. (unilateral)	,059		Sig. (unilateral)	,235
Aconítico	Coeficiente de correlación	,265	Hidroxi-butírico	Coeficiente de correlación	-,009	Metilsuccínico	Coeficiente de correlación	-,126
	Sig. (unilateral)	,033		Sig. (unilateral)	,476		Sig. (unilateral)	,195
Glicólico	Coeficiente de correlación	-,525	Oxálico	Coeficiente de correlación	-,120	fumárico	Coeficiente de correlación	,351
	Sig. (unilateral)	,000		Sig. (unilateral)	,205		Sig. (unilateral)	,007
Hidroxi-isovalérico	Coeficiente de correlación	-,354	Hidroxi-butirato	Coeficiente de correlación	,284	Hidroxitetrónico	Coeficiente de correlación	-,405
	Sig. (unilateral)	,006		Sig. (unilateral)	,024		Sig. (unilateral)	,002
Hidroxi-metilglutámico	Coeficiente de correlación	-,490	Metilhidroxi-butírico	Coeficiente de correlación	-,121	Fenoxiacético	Coeficiente de correlación	,105
	Sig. (unilateral)	,000		Sig. (unilateral)	,205		Sig. (unilateral)	,236

Significancia determinada mediante prueba de Rho de Spearman $\alpha < 0.05$

Resultados análisis de correlación. Continuación

Metabolitos			Metabolitos			Metabolitos		
Homovanílico	Coefficiente de correlación	-,405	Metilmalónico	Coefficiente de correlación	,284	Glutámico	Coefficiente de correlación	-,087
	Sig. (unilateral)	,002		Sig. (unilateral)	,024		Sig. (unilateral)	,276
Glucitol	Coefficiente de correlación	-,490	urea	Coefficiente de correlación	,229	Metilglutámico	Coefficiente de correlación	-,137
	Sig. (unilateral)	,000		Sig. (unilateral)	,057		Sig. (unilateral)	,174
Dihidroxibutírico	Coefficiente de correlación	-,605	Etilhidracrílico	Coefficiente de correlación	,204	Hidroxiadipatolactona	Coefficiente de correlación	,221
	Sig. (unilateral)	,000		Sig. (unilateral)	,080		Sig. (unilateral)	,064
Etilmalónico	Coefficiente de correlación	,182	Fosfórico	Coefficiente de correlación	,003	Metilglutacónico	Coefficiente de correlación	,074
	Sig. (unilateral)	,105		Sig. (unilateral)	,491		Sig. (unilateral)	,306
Subérico	Coefficiente de correlación	,179	Hipúrico	Coefficiente de correlación	,220	Citramálico	Coefficiente de correlación	,209
	Sig. (unilateral)	,109		Sig. (unilateral)	,064		Sig. (unilateral)	,075

Significancia determinada mediante prueba de Rho de Spearman $\alpha < 0.05$

Resultados análisis de correlación. *Continuación*

Metabolitos			Metabolitos		
Adípico	Coeficiente de correlación	,027	Cítrico	Coeficiente de correlación	,206
	Sig. (unilateral)	,426		Sig. (unilateral)	,078
Metiladípico	Coeficiente de correlación	,264	VMA	Coeficiente de correlación	,213
	Sig. (unilateral)	,034		Sig. (unilateral)	,070
Heptenedioato	Coeficiente de correlación	,140	Hidroxifeniláctico	Coeficiente de correlación	,201
	Sig. (unilateral)	,169		Sig. (unilateral)	,083
Hidroxiglutarico	Coeficiente de correlación	,236	Palmitico	Coeficiente de correlación	,179
	Sig. (unilateral)	,052		Sig. (unilateral)	,109
Hidroxibenzoico	Coeficiente de correlación	,119	Hidroxisebacato	Coeficiente de correlación	,129
	Sig. (unilateral)	,209		Sig. (unilateral)	,188
Hidroxifenilacético	Coeficiente de correlación	-,247	Hidroxipurato	Coeficiente de correlación	,009
	Sig. (unilateral)	,044		Sig. (unilateral)	,476
Láurico	Coeficiente de correlación	-,359	Estarico	Coeficiente de correlación	,144
	Sig. (unilateral)	,006		Sig. (unilateral)	,162

Significancia determinada mediante prueba de Rho de Spearman $\alpha < 0.05$

Anexo 9. Gráficas de comparación de la abundancia relativa de los metabolitos analizados según la dieta

