

# Perfil de acilcarnitinas en una población adulta colombiana como herramienta diagnóstica de las deficiencias de la oxidación mitocondrial de los ácidos grasos

José Henry Osorio\*  
Morteza Pourfarzam\*\*

## RESUMEN

**Fundamento y objetivo:** la determinación de acilcarnitinas en sangre es una prueba útil en el diagnóstico de los errores hereditarios de la  $\beta$ -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos, sin embargo, existen pocos datos en la literatura relacionados con valores de referencia para acilcarnitinas y si esos valores dependen de la edad o el sexo. Los objetivos del presente trabajo son llamar la atención acerca de los errores innatos de la  $\beta$ -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos y establecer valores de referencia para acilcarnitinas en adultos. **Pacientes y métodos:** fueron tomadas muestras de sangre de 316 adultos de los cuales 158 hombres y 158 mujeres, con un rango de edad comprendido entre 18 y 58 años; las muestras fueron analizadas por espectrometría de masas en *tándem*. **Resultados y conclusiones:** no fueron encontradas diferencias significativas relacionadas con el sexo. El intervalo y los valores promedio  $\pm$  la desviación estándar son presentados. Es importante resaltar la ausencia de hidroxilcarnitinas y glutarilcarnitina cuando se procesan muestras normales. Se revisó la bibliografía relacionada con los principales hallazgos clínicos y de laboratorio en las deficiencias de la  $\beta$ -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos (MED.UIS. 2008;21(2):63-70).

**Palabras clave:** Espectrometría de masas en *tándem*. Ácidos grasos. Metabolismo. Errores innatos del metabolismo.

## INTRODUCCIÓN

La oxidación mitocondrial de ácidos grasos es la mayor fuente de energía para el corazón y músculo esquelético y uno de los más importantes procesos para generar combustible durante el ejercicio y el ayuno<sup>1</sup>. Los ácidos grasos proveen cerca del 80% de la energía necesaria para el funcionamiento del corazón y el hígado<sup>2</sup>; la oxidación mitocondrial de

ácidos grasos además suministra la energía necesaria para la termogénesis en el tejido adiposo marrón<sup>3</sup>.

Las deficiencias de la  $\beta$ -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos son un grupo de enfermedades genéticas de carácter autosómico recesivo (tabla 1)<sup>4</sup>. Los primeros reportes de estas enfermedades se dan después de 1980<sup>5</sup> y en la actualidad son un campo importante de la medicina por su relación comprobada con problemas como el síndrome de muerte súbita del lactante, hipoglucemia con hipocetonemia, problemas cardíacos y musculares (tabla 2), entre otros con características bioquímicas específicas (tabla 3). Actualmente, se ha clonado y secuenciado el cDNA de la mayor parte de las proteínas implicadas. El espectro mutacional es amplio, excepto en la deficiencia de Acil Coenzima A Dehidrogenasa de Cadena Media (MCAD) y de Cadena Larga (LCHAD), donde un 90 y un 87%, respectivamente, de los alelos estudiados poseen la misma mutación<sup>6-8</sup>.

La principal característica clínica de estas enfermedades es la hipoglucemia hipocetósica asociada con el ayuno, pero el espectro de síntomas

\*DVM BSc DEA MSc MMB MPhil PhD. Profesor Titular. Departamento de Ciencias Básicas de la Salud. Laboratorio de Patología Molecular. Universidad de Caldas. Manizales. Colombia

\*\*BSc MSc PhD. Spence Biochemical Genetics Unit. Royal Victoria Infirmary, Newcastle upon Tyne, England.

Correspondencia: Dr. Osorio. Laboratorio de Patología Molecular. Departamento de Ciencias Básicas de la Salud. Universidad de Caldas. Cl. 65 N° 26-10. Manizales. Colombia. e-mail: jose.osorio\_o@ucaldas.edu.co

Artículo recibido el 23 de octubre de 2007 y aceptado para publicación el 18 de junio de 2008.

**Tabla 1. Trastornos de la  $\beta$ -oxidación mitocondrial<sup>28</sup>.**

Enfermedad y/o defecto enzimático	Acrónimo	Nº McKusick	Localización cromosómica	Mutación prevalente
Transportador de carnitina	OCTN2	212140	5q33.1	-
Carnitina palmitoil transferasa I CPT IA (hepática) CPT IB (muscular)	CPTI	255120	11q13	-
Carnitina/acil-carnitine translocasa	CACT	212138	3p21.31	-
Carnitina palmitoil transferasa II	CPTII	255110	1p32	S113L
Acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga	VLCAD	201475	17p11.2-p11.13	-
Acyl-CoA deshidrogenasa de cadena media	MCAD	201450	1p31	K304E
Acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta	SCAD	201470	12q22-qter	G185S-R174W
3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de cadena larga	LCHAD	600890	2p23	E474Q
2-enoyl-CoA hidratasa de cadena larga				
3-oxoacyl-CoA tiolasa de ácido graso de cadena larga (Proteína Trifuncional)	MTP	143450	2p23	-
3-hidroxiacyl-CoA deshidrogenasa de cadena corta	SCHAD	601609	4q22q26	-
Flavoproteína para transferencia de electrones (ETF) ( $\alpha$ -subunit GA IIA ) ( $\beta$ -subunit GA IIB )	ETF	231675	15q23-q25-19q13.3	T266M
ETF deshidrogenasa (GA I)( $\beta$ -subunit GA IIB )	ETFDH	231675	4q33-qter	-
2,4-Dienoil-CoA reductasa	DR	222745	8q21.3	-
3-keto-acil-CoA tiolasa de cadena media	MCKAT	602199	-	-

Nota: Las frecuencias de la mutación prevalente descritas para CPT II forma adulta, MCAD, y LCHAD son 60, 90, y 87% respectivamente<sup>28</sup>.

clínicos es muy amplio y abarca desde pacientes sintomáticos o con ligera hipotonía, hasta pacientes con debilidad muscular y cardiomiopatía<sup>9</sup>. En general, el pronóstico es bueno, condicionado al hecho de que se establezca un diagnóstico temprano y un tratamiento terapéutico correcto<sup>10,11</sup>.

En el presente estudio se han analizado las acilcarnitinas mediante el uso de espectrometría de masas en tándem (MS/MS), para establecer valores de referencia en sangre de adultos normales, como

herramienta diagnóstica de las alteraciones enzimáticas de la degradación mitocondrial de los ácidos grasos.

## PACIENTES Y MÉTODOS

El presente estudio es de tipo transversal. Se tomaron muestras de sangre de 316 adultos voluntarios normales, con edades entre 18 y 60 años, 158 hombres y 158 mujeres, que acudieron al laboratorio de Patología Molecular de la Universidad de Caldas en

Manizales para participar en la consecución de muestras para la conformación del Banco de ADN. Entre los participantes se encontraban personas de 17 departamentos de Colombia, especialmente de la Región Andina. Cada voluntario fue identificado plenamente y respondió un cuestionario específico para este tipo de análisis. Se tuvo como criterio de inclusión la edad, mayores de 18 años. Fueron excluidos del estudio personas que tuvieran problemas de salud crónicos o agudos y personas que estuvieran en algún tratamiento con medicamentos, así como personas con sobrepeso u obesidad. El valor promedio

(desviación estándar) del índice de masa corporal en el grupo estudiado fue de 22,7 (2,34) kg/m<sup>2</sup>. El muestreo se realizó entre julio de 2004 y julio de 2005; a los participantes no se les realizó posteriormente ningún seguimiento ni intervención. La muestra fue recolectada por conveniencia. Los datos obtenidos fueron digitados en Excel y procesados en el paquete estadístico SAS.

Las muestras de sangre fueron depositadas en tubos de vidrio con EDTA y posteriormente se prepararon tarjetas de sangre seca en papel de filtro y analizadas

**Tabla 2. Principales características clínicas de las deficiencias de la  $\beta$ -oxidación mitocondrial.**

Deficiencia	Hipoglicemia	Hepatomegalia	Cardiomiopatía	TRC	Debilidad muscular/ miopatía	Otros síntomas
OCTN2	+	+	+++	-	+	SIDS
CPT I (A y B)	+	+++	-	-	+	Tubulopatía, Nefromegalia
CACT	+	+	+++	+	+	SIDS
CPT II -Adulta	-	-	-	-	+++	Quistes renales
CPT II -Infantil	+	+	+++	+	+	Mioglobinuria
VLCAD	+	+	+/-	+/-	+	SIDS, mioglobinuria
MCAD	+++	+	+	+	+	SIDS, coma hiperamonémico neonatal
SCAD	+/-	+/-	-	-	+/-	SIDS
LCHAD	+	+++	+++	+	+	SIDS, retinitis pigmentosa, neuropatía periférica, mioglobinuria
MTP	+	+++	+++	+	+	SIDS, mioglobinuria, polineuropatía periférica
SCHAD-Muscular	+	-	+	-	+	SIDS
SCHAD-Hepática	+	+	-	-	+	SIDS
ETF	+++	+	+	+	+	SIDS
ETFD	+++	+	+	+	+	SIDS
DR	-	+	-	-	+	SIDS
MCKAT	+	+	+	+	+++	SIDS, mioglobinuria

Abreviaturas: TRC, trastornos del ritmo cardíaco; SIDS, síndrome de muerte súbita infantil. Nota: Las formas severas de ETF y ETFD pueden cursar con dismorfia facial, quistes renales, malformaciones cerebrales, distonía, disquinesia, megacefalia.

Tabla 3 Principales hallazgos bioquímicos en las deficiencias de la  $\beta$ -oxidación mitocondrial<sup>28</sup>.

Deficiencia	C <sub>14:1n-9</sub> C <sub>10:1n-6</sub>	Acilglicinas o metabolito específico	Acilcarnitinas	Oxidación de palmitato en fibroblastos
OCTN2	Muy baja -	-	-	baja
CPT I	Alta -	-	-	baja
CACT	baja -	-	C <sub>14</sub> , C <sub>18</sub>	baja
CPT II	baja -	-	C <sub>16</sub> , C <sub>16:1</sub> , C <sub>18</sub> , C <sub>18:1</sub>	baja
VLCAD	baja C <sub>14:1n-9</sub> elevado	-	C <sub>14:1</sub> , C <sub>14:2</sub>	baja
MCAD	baja C <sub>10:1n-6</sub> elevado	Acilglicinas	C <sub>6</sub> , C <sub>8</sub> , C <sub>10</sub>	baja
SCAD	Normal-baja	Acido etilmalónico	C <sub>5</sub> , C <sub>6</sub>	Normal-baja
LCHAD	baja C <sub>14:1n-9</sub> elevado	-	C <sub>16:OH</sub> , C <sub>18:OH</sub> , C <sub>18:1OH</sub>	baja
MTP	Normal-baja C <sub>14:1n-</sub> elevado	-	C <sub>16:OH</sub> , C <sub>18:OH</sub> , C <sub>18:1OH</sub>	baja
SCHAD	baja -	-	-	baja
ETF	baja C <sub>14:1n-9</sub> elevado C <sub>10:1n-6</sub> elevado	Isovalerilglicina	C <sub>4</sub> , C <sub>5</sub> , Isovaleril, 2-metilbutiril	baja
ETFD	baja C <sub>14:1n-9</sub> elevado C <sub>10:1n-6</sub> elevado	-	C <sub>4</sub> , C <sub>5</sub> , Isovaleril, 2-metilbutiril	baja
DR	baja -	-	-	baja
MCKAT	Normal-baja -	-	-	baja

**Nota:** La carnitina libre puede encontrarse normal o disminuida en todas las deficiencias excepto en la CPTI que puede mostrar valores normales o incrementados<sup>28</sup>.

por espectrometría de masas en *tándem*. Los participantes firmaron un consentimiento informado y toda la información se considera confidencial. Las tarjetas de papel de filtro que contenían sangre seca para el análisis, se mantuvieron en congelación (-20°C) antes de la determinación de acilcarnitinas por MS/MS, hasta obtener la totalidad de los especímenes necesarios para realizar el estudio.

La determinación de acilcarnitinas se realizó de acuerdo con Millington et al<sup>12</sup> por espectrometría de masas en *tándem*. La técnica utiliza métodos de fragmentación de moléculas positivamente cargadas mediante ionización electrodifusora de los ésteres butílicos. Las concentraciones se calculan después

de obtener la relación entre la intensidad de la señal correspondiente para cada compuesto y la intensidad de la señal producida por un Estándar Interno (IS del inglés *Intern Standard*) que se añade a las muestras como patrón interno. El equipo utilizado fue un VG Quattro II, triple cuadrupole *tandem mass spectrometer* (Micromass, UK), equipado con una fuente de ionización en aerosol, y un sistema de análisis de datos *micromass* (MassLynx). La introducción de las muestras a la fuente se hizo mediante el dispositivo automático Jasco AS980 (Jasco UK), acoplado a una bomba Jasco PU980 HPLC. Para obtener las concentraciones de acilcarnitinas se realizó un registro de precursores m/z 85 (PAR 85). El cálculo de las concentración de

**Tabla 4.** Valores de referencia para acilcarnitinas en la sangre de adultos normales por espectrometría de masas en tándem (promedio  $\pm$  DE, n = 316).

Acilcarnitina	m/z	Promedio (mM/L)	Intervalo (mM/L)
<b>Acilcarnitinas de cadena corta</b>			
Acetilcarnitina C <sub>2</sub> cn	260	8.1 $\pm$ 2.8	2.8-24.7
Propionilcarnitina C <sub>3</sub> cn	274	1.1 $\pm$ 0.5	0.3-3.6
Butirilcarnitina C <sub>4</sub> cn	288	0.2 $\pm$ 0.2	nd-1.0
Isovalerilcarnitina C <sub>5</sub> cn	302	0.2 $\pm$ 0.1	nd-0.8
<b>Acilcarnitinas de cadena media</b>			
Hexanoilcarnitina C <sub>6</sub> cn	316	nd $\pm$ 0.05	nd-0.7
Octanoilcarnitina C <sub>8</sub> cn	344	0.1 $\pm$ 0.1	nd-0.3
Decanoilcarnitina C <sub>10</sub> cn	372	0.2 $\pm$ 0.1	nd-1.3
Glutarylacilcarnitina DC5cn	388	nd $\pm$ nd	nd-0.2
Dodecanoilcarnitina C <sub>12</sub> cn	400	0.1 $\pm$ 0.1	nd-0.8
<b>Acilcarnitinas de cadena larga</b>			
Tetradecanoilcarnitina C <sub>14:1</sub> cn	426	0.1 $\pm$ 0.1	nd-1.0
Tetradecanoilcarnitina C <sub>14</sub> cn	428	0.1 $\pm$ 0.1	nd-1.0
Hidroxitetradecanoilcarnitina C <sub>14:0H</sub> cn	444	nd $\pm$ nd	nd-0.1
Hexadecanoilcarnitina C <sub>16:1</sub> cn	454	0.1 $\pm$ 0.1	nd-1.0
Hexadecanoilcarnitina C <sub>16</sub> cn	456	1.0 $\pm$ 0.3	0.4-2.0
Hidroxihexadecanoilcarnitina C <sub>16:0H</sub> cn	472	nd $\pm$ nd	nd
Octadecdienoilcarnitina C <sub>18:2</sub> cn	480	0.2 $\pm$ 0.1	nd-1.0
Octadecenoilcarnitina C <sub>18:1</sub> cn	482	1.0 $\pm$ 0.5	0.3-3.0
Octadecanoilcarnitina C <sub>18</sub> cn	484	0.6 $\pm$ 0.4	nd-6.0
Hidroxiocetadecenoilcarnitina C <sub>18:1-0H</sub> cn	498	nd $\pm$ nd	nd-0.1
Hidroxiocetadecanoilcarnitina C <sub>18:0H</sub> C <sub>n</sub>	500	nd $\pm$ nd	ud-0.1

Abreviaturas: m/z, relación masa/carga. nd, no detectable (< 0.002). SD, desviación estandar. n=31

acilcarnitinas se realizó conociendo la concentraciones del IS en 100µl, adicionados a 12µl de sangre extraídos de la tarjeta de papel de filtro<sup>13</sup>. La prueba *t* de *student* fue utilizada para establecer las posibles diferencias relacionadas con el sexo. El estudio cumplió con las normas establecidas por los correspondientes comités de ética.

## RESULTADOS

Los resultados obtenidos (Tabla 4) muestran un valor promedio total de acilcarnitinas en adultos de  $13,7 \pm 5,5$  mM/L, conformado por valores promedio de  $9,6 \pm 3,6$ ,  $0,4 \pm 0,35$  y  $3,1 \pm 1,5$  para las acilcarnitinas de cadena corta; media y larga respectivamente. Los datos obtenidos son una aproximación de los valores de referencia de la población Colombiana y no tuvieron distribución normal.

## DISCUSIÓN

Los estudios actuales de las deficiencias de la  $\beta$ -oxidación mitocondrial muestran que algunas de estas enfermedades no habían sido diagnosticadas, mientras que otras han sido clasificadas como síndrome de muerte súbita infantil o síndrome de Reye<sup>14-16</sup>. De aquí el interés del estudio, ya que un diagnóstico positivo conlleva a la adopción de medidas preventivas.

A pesar de que la determinación de acilcarnitinas es valiosa para la confirmación del diagnóstico, pueden realizarse otras pruebas antes de instaurar medidas preventivas como son la determinación de ácidos grasos en plasma, carnitina libre y total en suero, u oxidación de ácidos grasos por linfocitos y fibroblastos<sup>17,18</sup>.

La utilización de la espectrometría de masas en *tándem* para el análisis de acilcarnitinas, se ha constituido en una herramienta fundamental para la confirmación de los pacientes que sufren deficiencias enzimáticas de la  $\beta$ -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos y otro tipo de deficiencias. Han sido realizados estudios de los valores de acilcarnitinas en diferentes fluidos corporales y los realizados en sangre, han tenido en cuenta diferentes poblaciones, estudiadas de acuerdo al sexo y a diferencias en los grupos de edad<sup>19, 20, 21</sup>.

Se ha establecido claramente que a medida que se incrementa la edad, los valores de acilcarnitinas son menores<sup>21,22</sup>. Cuando se compararon los valores obtenidos en el presente estudio, con otros<sup>21</sup>, se encontró que los intervalos para algunas acilcarnitinas,

son muy superiores a los del presente estudio, por lo que se considera necesaria más investigación al respecto para establecer si es debido a la metodología empleada o son variaciones propias de las poblaciones estudiadas.

El reconocimiento de las deficiencias de la  $\beta$ -oxidación es a menudo difícil, ya que la sintomatología clínica puede ser intermitente y las pruebas rutinarias de laboratorio y los análisis de metabolitos pueden no ser informativos, particularmente si las muestras de plasma y de orina no han sido recogidas durante el episodio de descompensación aguda. El estudio de los ácidos grasos libres, de la carnitina en plasma y las acilcarnitinas en sangre han sido muy útiles, ya que estos parámetros son informativos tanto si la muestra es de un episodio de crisis como si es de un periodo de estabilidad clínica<sup>23,24</sup>. Sin embargo, no todas las deficiencias presentan alteración de estos parámetros. El siguiente paso en el diagnóstico consiste en los estudios enzimáticos y de oxidación de sustratos en fibroblastos o linfocitos en presencia de precursores marcados con tritio y/o con deuterio, los que aportan una valiosa información para el diagnóstico de estas deficiencias<sup>17</sup>.

Para la deficiencia de MCAD y LCHAD, donde existe una mutación prevalente en, aproximadamente, un 90% de los alelos (tabla 1), no son en general necesarios los estudios enzimáticos, ya que es mucho más rápido y sencillo proceder al diagnóstico a través del análisis de la mutación prevalente<sup>26</sup>.

Los estudios de valoración de acilcarnitinas en muestras diferentes a las recibidas en el cribado neonatal son poco numerosos<sup>13,19,27</sup> por eso se hace necesario que otros grupos de investigación también hagan su aporte con relación a valores de referencia en diferentes poblaciones y tratar de unificar criterios.

## CONCLUSIÓN

La espectrometría de masas en *tándem* es una técnica eficaz para la determinación de acilcarnitinas en muestras de sangre, en adultos. Se cumplió con el objetivo propuesto de aportar valores de referencia de acilcarnitinas en adultos de nuestro medio como herramienta diagnóstica de las enfermedades hereditarias de la  $\beta$ -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos y otras deficiencias enzimáticas. La limitación principal es que los datos obtenidos son aplicables para los individuos muestreados, sin embargo estos datos son extrapolables a la población colombiana adulta. Se hace necesario que la

comunidad científica internacional investigue más acerca de los valores de referencia en otras regiones

## SUMMARY

**Acilcarnitines profile in adults as a tool for diagnosis of mitochondrial fatty acid oxidation deficiencies.**

Introduction: the acylcarnitines measurement in blood is a useful test for the diagnosis of inherited errors of fatty acid mitochondrial  $\beta$ -oxidation, however there is little data in the literature regarding the reference ranges of various acylcarnitines and whether these reference ranges are age or sex dependent. The aims of this work are to draw the attention to inherited disorders of mitochondrial fatty acid  $\beta$ -oxidation and to establish reference values for acylcarnitines in adults using *tándem* mass spectrometry. Patients and methods: 316 blood samples normal adults, 158 male, 158 female, with a range of age between 18 and 58 years, were obtained and analysed using *tándem* mass spectrometry. No significant differences were found related to sex; the interval and average values  $\pm$  standard deviation are presented. It is important to remark the absence of hydroxyacylcarnitines and glutaryl carnitine processing normal samples. Was reviewed the literature related to the main clinical and laboratory findings in mitochondrial fatty acid  $\beta$ -oxidation deficiencies (MED.UIS. 2008;21(2):63-70).

Key words: *Tándem* mass spectrometry. Fatty acids. Metabolism. Inherited inborn errors.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Mc Garry JD, Foster DW. Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production. *Annu Rev Biochem.*1980;49:395-420.
- Eaton S, Bartlett K, Pourfarzam M. Mammalian mitochondrial  $\beta$ -oxidation. *Biochem J.*1996;320:345-57.
- Nicholls DG, Locke RM. Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev.*1984;64:1-64.
- Stanley CA, Hale DE, Coates PM, Hall CL, Corkey BE, Yang W, et al. Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in children with non-ketotic hypoglycemia and low carnitine levels. *Pediatr Res.* 1983;17:877-84.
- Rhead WJ, Amendt A, Fritchman KS, Felts SJ. Dicarboxylic aciduria: deficient [1-14C] octanoate oxidation and medium chain acyl-CoA dehydrogenase in fibroblasts. *Science.* 1983; 221:73-5.
- Yokota I, Coates PM, Hale DE, Rinaldo P, Tanaka K. Molecular survey of a prevalent mutation, A985-to-G transition, and identification of five infrequent mutations in the medium-chain acyl-CoA dehydrogenase gene in 55 patients with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Am J Hum Genet.*1991;47:1280-91.
- Ijlst L, Wanders RJA, Ushikubo S, Kamijo K, Hashimoto T. Molecular basis of long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: identification of the major disease-causing mutation in the B-subunit of the mitochondrial trifunctional protein. *Biochim Biophys Acta.* 1994;1215:347-50.
- Olpin SE, Clark S, Andresen BS, Bischoff C, Olsen RK, Gregersen N, Chakrapani A, Downing M, Manning NJ, Sharrard M, Bonham JR, Muntoni F, Turnbull DN, Pourfarzam M. Biochemical, clinical and molecular findings in LCHAD and general mitochondrial trifunctional protein deficiency. *J Inher Metab Dis.* 2005;28:533-44.
- Vockley J, Singh RH, Whiteman DA. Diagnosis and management of defects of mitochondrial beta-oxidation. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2002;5:601-9.
- Halldin MU, Forslund A, von Dobeln U, Eklund C, Gustafsson J. Related Articles, Increased lipolysis in LCHAD deficiency. *J Inher Metab Dis.* 2007;30(1):39-46.
- Longo N, Amat di San Filippo C, Pasquali M. Disorders of carnitine transport and the carnitine cycle. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2006;15:142:77-85.
- Millington DS, Chace DH, Hillman SL, Kodo N, Terada N. Diagnosis of metabolic disease. In Matsudo T, Capriolo RM, Gross ML, Sevama Y, eds. *Biological mass spectrometry: present and future.* New York: Wiley; 1994. p. 559-79.
- Rashed MS, Bucknall MP, y Little D. Screening blood spots for inborn errors of metabolism by electrospray tandem mass spectrometry with a microplate batch process and a computer algorithm for automated flagging of abnormal profiles. *Clin. Chem.* 1997;43(7):1129-41.
- Roe RC, Coates PM. Mitochondrial fatty acid oxidation disorders. In: Scriver CR, Beaudet, Sly WS, Valle D eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 7th ed. New York, Mc Graw-Hill, Inc. 1995;45:1501-33.
- Stanley CA, Hale DE. Genetic disorders of mitochondrial fatty acid oxidation. *Curr Opin Pediatr.* 1994;6:476-81.
- Pollit RJ. Disorders of mitochondrial long-chain fatty acid oxidation. *J Inher Metab Dis.* 1995;18:473-90.
- Osorio JH, Lluç M, Ribes A. Analysis of organic acids after incubation with (16-2H3) palmitic acid in fibroblasts from patients with mitochondrial  $\beta$ -oxidation defects. *J Inher Metab Dis.* 2003;26:795-803.
- Osorio JH. Oxidación de un sustrato tritizado por linfocitos para el diagnóstico rápido de alteraciones metabólicas. *Biosalud.* 2007;6:25-32.
- Osorio JH, Pourfarzam M. Early diagnosis of neurometabolic diseases by tandem mass spectrometry. Acylcarnitine profile from cord blood. *Rev Neurol.* 2004;38:111-6.
- Zytkovicz TH, Fitzgerald EF, Marsden D, Larson CA, Shih VE, Johnson DM, et al. Tandem mass spectrometric analysis for amino, organic, and fatty acid disorders in newborn dried blood spots: a two-year summary from the New England Newborn Screening Program. *Clin. Chem.* 2001;47(11):1945-55.
- Cavedon CT, Bourdoux P, Mertens K, Van Thi HV, Herremans N, de Laet C, Goyens P. Age-related variations in acylcarnitine and free carnitine concentrations measured by tandem mass spectrometry. *Clin Chem.* 2005;51: 745-52.
- Osorio JH, Pourfarzam M. Determinación de valores normales de acilcarnitinas en una población infantil sana como herramienta diagnóstica de errores hereditarios de la  $\beta$ -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos. *An. Pediatr. (Barc).* 2007;67(6):548-52.

23. Martinez G, Jimenez-Sanchez G, Divry P, Vianey-Saban C, Ruidor E, Rodés M, Briones P, Ribes A. Plasma fatty acids in mitochondria fatty acid oxidation defects. *Clin Chim Acta*. 1997;267:143-57.
24. Osorio-Orozco JH, Pourfarzam M. Diagnostic error of mental retardation of neurometabolic origin confirmed by mass sequential spectrometry. *Rev Neurol*. 2000;30:728-30.
25. Gregersen N, Bross P, Andresen BS. Genetic defects in fatty acid beta-oxidation and acyl-CoA dehydrogenases. Molecular pathogenesis and genotype-phenotype relationships. *Eur J Biochem*. 2004;27;1:470-82.
26. Bartlett K, Pourfarzam M. Defects of beta-oxidation including carnitine deficiency. *Int Rev Neurobiol*. 2002;53:469-516.
27. Meyburg J, Schulze A, Kohlmüller D, Linderkamp O, Mayatepek E. Postnatal changes in neonatal acylcarnitine profile. *Pediatr Res*. 2001;49:125-9.
28. Bennet MJ, Rinaldo P, Strauss AW. Inborn errors of mitochondrial fatty acid oxidation. *Clin Rev Clin Lab Sci*. 2000;37:1-44.