

Determinación de valores normales de acilcarnitinas en una población infantil sana como herramienta diagnóstica de errores hereditarios de la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos

J.H. Osorio^a y M. Pourfarzam^b

^aUniversidad de Caldas. Laboratorio de Enfermedades Metabólicas. Departamento de Ciencias Básicas de la Salud. Manizales. Colombia. ^bSpence Biochemical Genetics Unit. Royal Victoria Infirmary. Newcastle upon Tyne. Reino Unido.

Introducción

La determinación de acilcarnitinas en sangre es una prueba útil en el diagnóstico de los errores hereditarios de la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos. Sin embargo, existen pocos datos en la literatura médica, relacionados con valores de referencia para acilcarnitinas y si esos valores dependen de la edad o el sexo.

Objetivos

Llamar la atención acerca de los errores innatos de la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos y establecer valores de referencia para acilcarnitinas en niños.

Pacientes y métodos

Fueron tomadas muestras de sangre de 309 niños normales divididos en cuatro grupos de edad (grupo A, < 1 mes; grupo B, 1-12 meses; grupo C, 1-7 años; grupo D, 7-18 años) y fueron analizadas por espectrometría de masas en tándem.

Resultados y discusión

Se aportan valores de referencia para acilcarnitinas en niños. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas relacionadas con la edad o el sexo. Nuestros resultados son diferentes cuando se comparan con los de la literatura médica encontrada. Es importante destacar la ausencia de hidroxiacilcarnitinas y glutarilcarnitina cuando se procesan muestras normales. Revisamos la bibliografía relacionada con los principales hallazgos clínicos y de laboratorio en las deficiencias de la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos.

Palabras clave:

Acilcarnitinas. Espectrometría de masas en tándem. Ácidos grasos. Metabolismo. Errores innatos del metabolismo.

DETERMINATION OF NORMAL ACYLCARNITINE LEVELS IN A HEALTHY PEDIATRIC POPULATION AS A DIAGNOSTIC TOOL IN INHERITED ERRORS OF MITOCHONDRIAL FATTY ACID β -OXIDATION

Introduction

Acylcarnitine measurement in blood is a useful test for the diagnosis of inherited errors of mitochondrial fatty acid β -oxidation. However, there are few data in the literature on the reference ranges of the various acylcarnitines and on whether these reference ranges are age- or sex-dependent.

Objectives

To draw attention to inherited errors of mitochondrial fatty acid β -oxidation and to establish reference acylcarnitine values in children.

Patients and methods

A total of 309 blood samples from healthy children divided into four age groups (group A: < 1 month; group B: 1-12 months; group C: 1-7 years; group D: 7-18 years) were obtained and analyzed using tandem mass spectrometry.

Correspondencia: Dr. J.H. Osorio.
Universidad de Caldas.
Departamento de Ciencias Básicas de la Salud.
Calle 65, 26-10. Manizales. Colombia.
Correo electrónico: josheno@yahoo.com

Recibido en julio de 2007.

Aceptado para su publicación en octubre de 2007.

Results and conclusion

Reference acylcarnitine values in children are provided. No significant differences were found in relation to age or sex. Our results differ from those reported in the literature reviewed. Importantly, hydroxyacylcarnitines and glutaryl carnitine are absent when normal samples are processed. We review the literature on the main clinical and laboratory findings in mitochondrial fatty acid β -oxidation deficiencies.

Key words:

Acylcarnitines. Tandem mass spectrometry. Fatty acids. Metabolism. Inherited inborn errors.

INTRODUCCIÓN

Los errores innatos de la oxidación mitocondrial de ácidos grasos conforman un grupo de enfermedades de carácter autosómico recesivo de espectro clínico y pronóstico variable, dependiendo del déficit enzimático. Desde su primera descripción han sido comunicados varios defectos incluyendo algunos subtipos.

Las manifestaciones clínicas resultan de la inhabilidad por parte de los tejidos que oxidan ácidos grasos para mantener el aporte de energía cuando hay un incremento en la demanda; por lo tanto, los órganos diana de los defectos de la oxidación de ácidos grasos incluyen el músculo esquelético y cardíaco, así como el hígado.

Los síntomas sugestivos de estas deficiencias incluyen síndrome de Reye (especialmente recurrente), hipotonía y/o miopatía, neuropatía periférica, niveles alterados de conciencia y muerte súbita, así como complicaciones metabólicas del embarazo^{1,2}.

Dentro de los hallazgos sugestivos se encuentran la hipoglucemia hipocetótica, miocardiopatía, arritmias cardíacas, acidosis metabólica y, en algunos casos, hiperamoniemia, síndromes AFLP/HELLP (hígado adiposo agudo del embarazo/hemólisis, enzimas hepáticas elevadas, plaquetas bajas), rbdomiólisis recurrente, aciduria dicarboxílica, deficiencia de carnitina e insuficiencia hepática, recurrente o fulminante¹. Debido a que la carnitina es el vehículo mediante el cual los grupos acilo pueden abandonar la mitocondria y existe un equilibrio entre las acilcarnitinas y sus respectivos ésteres de coenzima A (CoA) en la mitocondria, el análisis de carnitina y acilcarnitinas en sangre es aproximadamente equivalente al análisis de acil-CoA en la mitocondria³. El concepto de un perfil de acilcarnitinas para reemplazar al perfil de ácidos orgánicos en orina ha sido indicado como una herramienta potencialmente más útil para el diagnóstico de las alteraciones del metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada y la oxidación mitocondrial de los ácidos grasos.

El objetivo del presente estudio fue establecer valores de referencia para acilcarnitinas en una población infantil sana como herramienta diagnóstica de errores hereditarios de la β -oxidación mitocondrial y revisar la literatura médica relacionada con estas alteraciones.

PACIENTES Y MÉTODOS

Se tomaron muestras de sangre de 309 niños (154 niños y 155 niñas) normales divididos en cuatro grupos de edad (grupo A, < 1 mes; grupo B, 1-12 meses; grupo C, 1-7 años; grupo D, 7-18 años) y fueron analizadas por espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Los padres firmaron un consentimiento escrito y toda la información se considera confidencial. Las muestras 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.

El estudio cumplió con las normas establecidas por los correspondientes comités de ética y contó con su respectiva aprobación. La determinación de acilcarnitinas se realizó de acuerdo con Millington et al⁴. 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) que se añade a las muestras como patrón interno. El equipo utilizado fue un VG Quattro II, *triple quadrupole tandem mass spectrometer* (Micromass, Reino Unido), equipado con una fuente de ionización en aerosol (ESI), 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, Reino Unido), acoplado a una bomba Jasco PU980 HPLC. Para obtener las concentraciones de acilcarnitinas se realizó un registro de precursores m/z 85 (PAR 85). La prueba t de Student fue utilizada para establecer las posibles diferencias relacionadas con la edad o el sexo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Nuestros resultados (tabla 1) muestran un valor promedio total de acilcarnitinas en niños de $15,2 \pm 6,9$; $14,4 \pm 8,3$; $14,9 \pm 9,9$ y $14,6 \pm 6,8$ mM/l, para los cuatro grupos de edad respectivamente (grupo A, < 1 mes; grupo B, 1-12 meses; grupo C, 1-7 años; grupo D, 7-18 años), conformado por valores promedio de $10,7 \pm 4,8$; $10,6 \pm 5,3$; $10,8 \pm 6,9$, y $10,5 \pm 3,9$ para las acilcarnitinas de cadena corta; $8,3 \pm 0,2$; $0,2 \pm 0,2$; $0,3 \pm 0,3$, y $0,3 \pm 0,3$ para las acilcarnitinas de cadena media, y $4,1 \pm 2,4$; $3,6 \pm 2,8$; $4,0 \pm 2,7$, y $3,8 \pm 2,6$ para las acilcarnitinas de cadena larga para cada grupo de edad respectivamente. Estos valores son diferentes de los publicados por otros autores⁵, quienes trabajaron con niños con seis grupos de edad (cordón umbilical, menores de 2 meses, de 2 a 18 meses, de 18 meses a 5 años, de 5 a 10 años y de 11 a 17 años) y compararon los valores obtenidos para estos grupos con las muestras recibidas para cribado neonatal (primera semana de vida).

Para ellos hay diferencias significativas para algunas acilcarnitinas, cuando se comparan los grupos estudiados,

TABLA 1. Valores de referencia para acilcarnitinas en la sangre de niños, por espectrometría de masas en tándem (promedio \pm DE, n = 309)

Acilcarnitinas	Grupo A (n = 35)		Grupo B (n = 43)		Grupo C (n = 118)		Grupo D (n = 113)	
	Intervalo (mM/l)	Promedio (mM/l)	Intervalo (mM/l)	Promedio (mM/l)	Intervalo (mM/l)	Promedio (mM/l)	Intervalo (mM/l)	Promedio (mM/l)
Acilcarnitinas de cadena corta								
Acetilcarnitina C ₂ cn	0,8-16,0	9,6 \pm 4,1	0,9-22,4	9,4 \pm 4,8	0,8-27,2	9,8 \pm 6,1	1,0-26,1	9,3 \pm 3,1
Propionilcarnitina C ₃ cn	nd-2,6	0,8 \pm 0,5	nd-2,3	0,9 \pm 0,3	nd-2,8	0,7 \pm 0,5	nd-3,2	0,9 \pm 0,6
Butirilcarnitina C ₄ cn	nd-0,5	0,2 \pm 0,1	nd-0,4	0,2 \pm 0,1	nd-0,5	0,2 \pm 0,1	nd-0,9	0,2 \pm 0,1
Isovalerilcarnitina C ₅ cn	nd-0,3	0,1 \pm 0,1	nd-1,0	0,1 \pm 0,1	nd-0,8	0,1 \pm 0,1	nd-0,7	0,1 \pm 0,1
Acilcarnitinas de cadena media								
Hexanoilcarnitina C ₆ cn	nd-0,1	nd	nd-0,2	nd	nd-0,1	nd	nd-0,1	nd
Octanoilcarnitina C ₈ cn	nd-0,1	nd	nd-0,3	nd	nd-0,1	nd	nd-0,2	nd
Decanoilcarnitina C ₁₀ cn	nd-0,4	0,1 \pm 0,1	nd-0,3	0,1 \pm 0,1	nd-0,5	0,1 \pm 0,1	nd-0,4	0,1 \pm 0,1
Glutarilcarnitina DC ₅ cn	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Dodecanoilcarnitina C ₁₂ cn	nd-0,5	0,2 \pm 0,1	nd-0,6	0,1 \pm 0,1	nd-0,7	0,2 \pm 0,2	nd-0,4	0,2 \pm 0,2
Acilcarnitinas de cadena larga								
Tetradecanoilcarnitina C _{14:1} cn	nd-0,4	0,1 \pm 0,1	nd-0,9	0,2 \pm 0,2	nd-0,7	0,1 \pm 0,1	nd-0,8	0,2 \pm 0,1
Tetradecanoilcarnitina C ₁₄ cn	nd-0,5	0,3 \pm 0,2	nd-0,4	0,1 \pm 0,2	nd-0,3	0,2 \pm 0,2	nd-0,6	0,2 \pm 0,1
Hidroxitetradecanoilcarnitina C _{14:OH} cn	nd-0,02	nd	nd-0,1	nd	nd-0,02	nd	nd-0,01	nd
Hexadecanoilcarnitina C _{16:1} cn	nd-0,1	0,1 \pm 0,1	nd-0,3	0,1 \pm 0,1	nd-0,1	0,1 \pm 0,1	nd-0,2	0,1 \pm 0,1
Hexadecanoilcarnitina C ₁₆ cn	1,0-2,0	1,0 \pm 0,5	nd-2,8	1,0 \pm 0,7	2,1-3,2	1,0 \pm 0,8	0,8-3,3	1,0 \pm 0,5
Hidroxihexadecanoilcarnitina C _{16:OH} cn	nd-0,01	nd	nd-0,01	nd	nd-0,01	nd	nd-0,01	nd
Octadecenoilcarnitina C _{18:2} cn	nd-1,0	0,2 \pm 0,2	nd-1,5	0,3 \pm 0,2	nd-1,2	0,4 \pm 0,3	nd-1,5	0,3 \pm 0,2
Octadecenoilcarnitina C _{18:1} cn	0,1-2,2	1,5 \pm 0,7	0,7-5,5	1,0 \pm 0,9	0,2-5,0	1,3 \pm 0,8	0,1-2,2	1,2 \pm 0,9
Octadecanoilcarnitina C ₁₈ cn	0,5-1,8	1,0 \pm 0,6	0,3-2,9	0,9 \pm 0,5	0,4-1,9	0,7 \pm 0,4	0,2-3,7	0,8 \pm 0,7
Hidroxioctadecenoilcarnitina C _{18:1-OH} cn	nd-0,01	nd	nd-0,01	nd	nd-0,01	nd	nd-0,01	nd
Hidroxioctadecanoilcarnitina C _{18:OH} cn	nd-0,01	nd	nd-0,01	nd	nd-0,01	nd	nd-0,01	nd

Grupo A: < 1 mes; grupo B: 1-12 meses; grupo C: 1-7 años; grupo D: 7-18 años.
DE: desviación estándar; nd: no detectable (< 0,002).

con el grupo de muestras recibidas para el cribado neonatal. Sin embargo, no encuentran diferencias significativas entre los otros grupos de edad ni entre sexos. Nosotros presentamos cuatro grupos de edad y no encontramos diferencias significativas relacionadas con la edad o el sexo entre ningún grupo. Los estudios son similares al afirmar que a medida que se incrementa la edad, los valores de acilcarnitinas son menores; sin embargo, los intervalos para algunas acilcarnitinas, comunicados por ellos, son muy superiores, cuando se comparan con los nuestros, por lo que consideramos necesario más investigación al respecto.

La identificación de acilcarnitinas en fluidos corporales utilizando espectrometría de masas en tándem fue desarrollada a finales de la década de 1980^{3,6} y representa una herramienta útil para el diagnóstico de algunos defectos de la oxidación de los ácidos grasos, los cuales son difíciles de diagnosticar mediante el método cromatográfico tradicional. El método tiene el potencial de tamizar efectivamente al menos una docena de otras alteraciones⁷⁻¹¹. Algunos autores sugieren que el perfil de acilcarnitinas en sangre debería ser determinado en todos los pacientes que presenten un episodio agudo de hipoglucemia hipocetótica, síndrome de Reye, miocardiopatía hipertrófica, insuficiencia cardíaca o muerte súbita durante el período neo-

natal o durante la infancia, además en estados de hipotonía con retardo en el crecimiento, retinitis pigmentosa e incluso dolor muscular ocasionado por el ejercicio¹².

La determinación de acilcarnitinas ha sido comunicada en sangre entera¹³, plasma¹⁴, orina¹⁵, líquido amniótico¹⁶ y bilis¹⁷.

La mayoría de los signos y síntomas de los pacientes sospechosos de sufrir alteraciones hereditarias de la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos han sido identificados. En general, estas alteraciones deben ser incluidas como diagnóstico diferencial en casos de hipoglucemia sin explicación, acidosis metabólica, síndrome de Reye-like, miopatía, mioglobulinuria persistente y miocardiopatía¹⁸. Los hallazgos de laboratorio soportan el diagnóstico clínico, niveles de metabolitos intermediarios en orina (glucosa, cuerpos cetónicos, lactato, piruvato) y en sangre (ácidos grasos no esterificados)¹⁹; perfil de ácidos orgánicos en orina²⁰; perfil de acilcarnitinas²¹; análisis enzimáticos en cultivos celulares y leucocitos^{22,23} y análisis de ADN²⁴ son utilizados para confirmar el diagnóstico del tipo de alteración.

Los principales hallazgos bioquímicos de los trastornos de la β -oxidación mitocondrial incluyen disminución en la concentración de carnitina en plasma excepto en la deficiencia de carnitina palmitoiltransferasa I, donde se en-

cuentra incrementado; concentraciones normales o disminuidas de carnitina libre en plasma excepto en la deficiencia del transportador de carnitina, en el que las concentraciones son siempre muy bajas; incremento en la relación acilcarnitinas/carnitina libre excepto en las deficiencias del transportador de carnitina y carnitina palmitoiltransferasa I, en el que las concentraciones son normales; perfil alterado de ácidos grasos en plasma, con incremento en los niveles de C14:1n-9 en la deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de cadena larga, flavoproteína de transferencia de electrones y deshidrogenasa de la proteína de transferencia de electrones, así como niveles elevados de C10:1n-6 en las deficiencias de acil-CoA deshidrogenasa de cadena media, flavoproteína de transferencia de electrones, y deshidrogenasa de la proteína de transferencia de electrones. La oxidación de ácidos grasos en fibroblastos está, además, deprimida en todas las deficiencias^{25,26}.

Los ácidos orgánicos en orina son muy variables en pacientes con alteraciones de la β -oxidación mitocondrial, la mayoría de ellos presentan excreción normal durante la remisión. Incluso durante los episodios de descompensación, la aciduria dicarboxilica no cetótica puede ser el único hallazgo anormal. Pocos trastornos, sin embargo, presentan metabolitos anormales característicos; acilglicinas en la deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena media, glutarato e isovalerilglicina en la deficiencia de la proteína de transferencia de electrones (aciduria glutárica tipo II), etilmalonato y adipato en la deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta^{7,8}.

El análisis de acilcarnitinas es probablemente la prueba más útil para el diagnóstico diferencial de estas alteraciones, y presentan en su gran mayoría un perfil anormal característico. Por ejemplo, se encuentran niveles incrementados de C₄cn y C₅cn en la deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta; C₆cn, C₈cn y C_{10:1}cn en la deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena media; C_{14:1}cn y C_{14:2}cn en la deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga; C₁₄cn y C₁₈cn en la deficiencia de carnitina acilcarnitina translocasa; C₁₆cn, C_{16:1}cn, C₁₈cn, C_{18:1}cn y C_{18:2}cn en la deficiencia de carnitina palmitoiltransferasa II y C_{16:OH}cn, C_{18:1 OH}cn, y C_{18:OH}cn en la deficiencia de 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de cadena larga. La C_{10:2}cn, identificada como 2-trans,4-cis-C_{10:2}, un intermediario en la degradación del ácido linoleico, ha sido encontrada en un paciente con deficiencia de 2,4-dienoil-CoA reductasa. Además, otras alteraciones metabólicas hereditarias son responsables de perfiles de acilcarnitinas anormales (acidurias orgánicas tales como las deficiencias de glutaril-CoA deshidrogenasa, 3-hidroximetilglutaril-CoA liasa, β -cetotiolasa, propionil-CoA carboxilasa, metilmalonil-CoA mutasa, e isovaleril-CoA deshidrogenasa)²⁷. Los estudios de valoración de acilcarnitinas en muestras dife-

rentes a las recibidas en el cribado neonatal son poco numerosos^{5,28,29}. Por eso se hace necesario que otros grupos de investigación también hagan su aporte con relación a valores de referencia y tratar de unificar criterios.

En conclusión, la espectrometría de masas en tándem es una técnica eficaz para la determinación de acilcarnitinas en muestras de sangre, de niños en diferentes grupos de edad. Es posible aportar valores de referencia como herramienta diagnóstica de las enfermedades hereditarias de la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos.

BIBLIOGRAFÍA

- Vockley J, Whiteman DA. Defects of mitochondrial beta-oxidation: A growing group of disorders. *Neuromuscul Disord.* 2002;12:235-46.
- Bellig LL. Maternal acute fatty liver of pregnancy and the associated risk for long-chain 3-hydroxyacyl-coenzyme a dehydrogenase (LCHAD) deficiency in infants. *Adv Neonatal Care.* 2004;4:26-32.
- Millington DS, Kodo N, Terada N, Roe D, Chace DH. The analysis of diagnostic markers of genetic disorders in human blood and urine using tandem mass spectrometry with liquid secondary ion mass spectrometry. *Int J Mass Spectrometry Ion Proc.* 1991;111:211-28.
- Millington DS, Chace DH, Hillman SL, Kodo N, Terada N. Diagnosis of metabolic disease. En: Matsudo T, Capriolo RM, Gross ML, Sevama Y, editors. *Biological mass spectrometry: Present and future.* New York: Wiley; 1994. p. 559-79.
- Cavedon CT, Bourdoux P, Mertens K, Van Thi HV, Herremans N, de Laet C, et al. Age-related variations in acylcarnitine and free carnitine concentrations measured by tandem mass spectrometry. *Clin Chem.* 2005;51:745-52.
- Millington DS, Kodo N, Norwood DL, Roe CR. Tandem mass spectrometry: A new method for acylcarnitine profiling with potential for neonatal screening for inborn errors of metabolism. *J Inher Metab Dis.* 1990;13:321-4.
- Bartlett K, Pourfarzam M. Inherited disorders of mitochondrial fatty acid oxidation. *Curr Paediatr.* 1997;7:118-22.
- Bartlett K, Eaton SJ, Pourfarzam M. New developments in neonatal screening. *Arch Dis Child.* 1997;77:151-4.
- Bartlett K, Pourfarzam M. Tandem mass spectrometry—The potential. *J Inher Metab Dis.* 1999;22:568-71.
- Green A, Pollit RJ. Population newborn screening for inherited metabolic disease: Current UK perspectives. *J Inher Metab Dis.* 1999;22:572-9.
- Levy HL. Newborn screening by tandem mass spectrometry: A new era. *Clin Chem.* 1998; 44:2401-2.
- Vianey-Saban C, Guffon N, Delolne F, Guibaud P, Mathieu M, Divry P. Diagnosis of inborn errors of metabolism by acylcarnitine profiling in blood using tandem mass spectrometry. *J Inher Metab Dis.* 1997;20:411-44.
- Millington DS, Kodo N, Norwood DL, Roe CR. Tandem Mass Spectrometry: A new method for acylcarnitine profiling with potential for neonatal screening for inborn errors of metabolism. *J Inher Metab Dis.* 1990;13:321-4.
- Millington DS, Chace DH. Carnitine and acylcarnitines in metabolic disease diagnosis and management. En: Desiderio DM, editor. *Mass spectrometry: Clinical and biomedical applications.* Vol. I. New York: Plenum Press; 1992. p. 299-316.

15. Libert R, Van Hoof F, Thillaye M, Vincent MF, Nassogne MC, Stroobant V, et al. Identification of new medium-chain acylcarnitines present in urine of a patient with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inher Metab Dis.* 1999; 22:9-18.
16. Shigmatsu Y, Hata I, Nakai A, Kikawa Y, Sudo M, Tanaka Y, et al. Prenatal diagnosis of organic acidemias based on amniotic fluid levels of acylcarnitines. *Pediatr Res.* 1996;39:680-4.
17. Rashed MS, Ozand PT, Bennett MJ, Barnard JJ, Govindaraza DR, Rinaldo P. Inborn errors of metabolism diagnosed in sudden death cases by acylcarnitine analysis of postmortem bile. *Clin Chem.* 1995;41:1109-14.
18. Lteif AN, Schwenk WF. Hypoglycemia in infants and children. *Endocr Metab Clin North Am.* 1999;28:619-48.
19. Moser HW, Moser AB. Measurement of saturated very long chain fatty acids in plasma. En: Hommes FA, editor. *Techniques in diagnostic human biochemical genetics: A laboratory manual.* New York: Wiley-Liss; 1991. p. 177-92.
20. Greter J, Jacobson CE. Urinary organic acids: Isolation and quantification for routine metabolic screening. *Clin Chem.* 1987;33:473-80.
21. Millington DS, Chace DH. Carnitine and acylcarnitines in metabolic disease diagnosis and management. En: Desiderio DM, editor. *Mass spectrometry: Clinical and biomedical applications.* Vol. I. New York: Plenum Press; 1992. p. 299-316.
22. Pourfarzam M, Schaefer J, Turnbull DM, Bartlett K. Analysis of fatty acid oxidation intermediates in cultured fibroblasts to detect mitochondrial oxidation disorders. *Clin Chem.* 1994;40: 2267-75.
23. Schaefer J, Pourfarzam M, Bartlett K, Jackson S, Turnbull DM. Fatty acid oxidation in peripheral blood cells: Characterisation and use for the diagnosis of fatty acid oxidation. *Pediatr Res.* 1995;37:345-60.
24. Ziadeh R, Hoffman EP, Finegold DN. Medium chain Acyl-CoA dehydrogenase deficiency in Pennsylvania: Neonatal screening shows high incidence and unexpected mutation frequencies. *Pediatr Res.* 1995;37:675-8.
25. Osorio JH, Pourfarzam M. Plasma free and total carnitine measured in children by tandem mass spectrometry. *Braz J Med Biol Res.* 2002;35:1265-71.
26. Osorio JH, Lluç M, Ribes A. Analysis of organic acids after incubation with ($^{16}\text{-}^2\text{H}_3$) palmitic acid in fibroblasts from patients with mitochondrial β -oxidation defects. *J Inher Metab Dis.* 2003;26:795-803.
27. Vreken P, Van Lint AEM, Bootsma AH, Overmars H, Wanders RJA, Van Gennip AH. Quantitative plasma acylcarnitine analysis using electrospray tandem mass spectrometry for the diagnosis of organic acidemias and fatty acid oxidation defects. *J Inher Metab Dis.* 1999;22:302-6.
28. Meyburg J, Schulze A, Kohlmüller D, Linderkamp O, Mayatepek E. Postnatal changes in neonatal acylcarnitine profile. *Pediatr Res.* 2001;49:125-9.
29. Osorio JH, Pourfarzam M. Early diagnosis of neurometabolic diseases by tandem mass spectrometry. Acylcarnitine profile from cord blood. *Rev Neurol.* 2004;38:111-6.