



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

**DISTRIBUCION DE VALORES DE AMINOACIDOS Y
ACILCARNITINAS DETERMINADOS MEDIANTE
ESPECTROMETRIA DE MASAS EN TANDEM EN UNA
POBLACION DE NIÑOS MEXICANOS.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

AIDA JANETTE HERNANDEZ MONTIEL

ASESOR: M. EN C. ISABEL CRISTINA IBARRA GONZÁLEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN



DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES
ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 26 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos
comunicar a usted que revisamos la Tesis:

Distribución de valores de aminoácidos y acilcarnitinas
determinados mediante Espectrometría de Masas en Tandem
en una población de niños mexicanos.

que presenta la pasante: Aida Janette Hernández Montiel
con número de cuenta: 09914444-7 para obtener el título de :
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en
el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 2 de Octubre de 2009.

PRESIDENTE	<u>QFB. Rosalba Bonilla Sánchez</u>	
VOCAL	<u>QFB. René Damián Santos</u>	
SECRETARIO	<u>MC. Isabel Cristina Ibarra González</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>MC. Gloria Leticia Arellano Martínez</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MC. Maritere Domínguez Rojas</u>	

"Aprender sin pensar es inútil, pensar sin aprender es peligroso."
Confucio.

"La sabiduría suprema es tener sueños bastante grandes para no perderlos de vista mientras se persiguen."
William Faulkner

"No se le puede enseñar nada a un hombre; sólo ayudarlo a encontrar la respuesta dentro de sí mismo."
Galileo Galilei

DEDICATORIAS.

A Dios por permitirme terminar esta etapa de mi vida, a pesar de los diversos obstáculos que he tenido a lo largo de ella, los cuales me han ayudado a crecer como persona.

A mi padre, por tus consejos, palabras de aliento y el interés que siempre mostraste hacia mis estudios, aunque no estés conmigo espero que siempre te sientas orgulloso de mí.

A mi madre, por tu apoyo incondicional en esta y todas las etapas de mi vida. Gracias a ustedes soy una persona de bien y con las herramientas necesarias para salir adelante.

A mis hermanos Marisol y Miguel Angel que me han apoyado siempre.

A toda mi familia, que de alguna manera me han apoyado durante toda mi vida y han estado al pendiente de mis estudios, se los agradezco de corazón.

A mis amigos Adolfo, David, Mario, Memo y Diego, que han compartido grandes momentos y me han apoyado, gracias por su amistad incondicional.

A mis amigos de la FES: María, Javier, Eyerahi, Pedro, Rogelio, Ana Rosa, Hugo Axel, Marduck, Jonathan, Beatriz, Marisol, Gabriela, Bere, Daniel, etc., por compartir conmigo esta etapa de mi vida, agradezco su apoyo y amistad.

A todos mis compañeros de la FES por que junto a ellos compartí las enseñanzas obtenidas durante toda la carrera.

A mis profesores de la FES, gracias por sus enseñanzas.

AGRADECIMIENTOS.

A mi asesora Isabel Ibarra, por brindarme la oportunidad de desarrollar esta tesis, por su paciencia y enseñanzas durante el tiempo que estuve en el instituto.

Al Laboratorio Tamiz-Mas de Químicos Maldonado y a la Secretaria de Salud del Estado de Tabasco por el apoyo proporcionado para la elaboración de estas tesis.

A las doctoras Marcela Vela Amieva y Leticia Belmont, por brindarme su apoyo durante mi estancia en el instituto y la realización de esta tesis.

A Cynthia Fernández, mi compañera, mi amiga, gracias por las enseñanzas que me brindaste durante mi paso por el instituto.

Al jurado, por tomarse el tiempo y la dedicación de revisar y evaluar este trabajo de tesis, muchas gracias.

ESTE ESTUDIO SE REALIZÓ EN LA UNIDAD DE GENÉTICA DE LA NUTRICIÓN DEL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA SS - INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS UNAM, MÉXICO DF, EN CONJUNTO CON EL LABORATORIO DE TAMIZ NEONATAL DEL ESTADO DE TABASCO.

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	I
RESUMEN	II
1. INTRODUCCIÓN	
1.1. Aminoácidos y acilcarnitinas en el contexto del metabolismo intermediario.	1
1.2. Defectos en el metabolismo de aminoácidos y acilcarnitinas.	6
1.3. Métodos de diagnóstico.	10
1.3.1. Fundamentos de Espectrometría de masas en tandem.	14
2. OBJETIVO	20
2.1. Objetivos Particulares.	20
3. JUSTIFICACIÓN	21
4. METODOLOGÍA	22
4.1. Clasificación del estudio	22
4.2. Población de estudio	22
4.3. Reactivos y consumibles	22
4.4. Equipo	23
4.5. Preparación de estándares internos	24
4.6. Procesamiento de muestra	24
5. RESULTADOS	26
6. DISCUSIÓN	39
7. CONCLUSIONES	45
8. REFERENCIAS	46

ÍNDICE DE FIGURAS.

1. Representación esquemática de una ruta bioquímica.	3
2. Ruta metabólica de la β -oxidación de los ácidos grasos.	6
3. Esquematación general de un sistema de MS.	15
4. Esquema General de un sistema MS/MS	16
5. Esquema y funcionamiento de un MS/MS Q3.	18

ÍNDICE DE TABLAS.

1. EIM de moléculas pequeñas detectados por MS/MS.	12
2. Valor promedio y percentiles de los aminoácidos estudiados.	26
3. Valor promedio y percentiles de las acilcarnitinas estudiados	27
4. Comparación de resultados con valores de corte establecidos por otros autores.	36
5. Muestras que presentaron elevación de metabolitos característicos de EIM.	38

ÍNDICE DE GRÁFICAS.

1. Distribución de concentraciones de Fenilalanina.	28
2. Distribución de concentraciones de Glicina.	28
3. Distribución de concentraciones de Valina.	28
4. Distribución de concentraciones de ILeu/Leu.	28
5. Distribución de concentraciones de Metionina.	28
6. Distribución de concentraciones de Citrulina.	28
7. Distribución de concentraciones de Tirosina.	29
8. Distribución de concentraciones de Arginina.	29
9. Distribución de concentraciones de Ornitina.	29
10. Distribución de concentraciones de C0.	30
11. Distribución de concentraciones de C2.	30
12. Distribución de concentraciones de C3.	30
13. Distribución de concentraciones de C3DC.	30
14. Distribución de concentraciones de C4DC.	30
15. Distribución de concentraciones de C5DC.	30
16. Distribución de concentraciones de C6DC.	31
17. Distribución de concentraciones de C10.	31
18. Distribución de concentraciones de C10:1.	31
19. Distribución de concentraciones de C10:2.	31
20. Distribución de concentraciones de C4.	31
21. Distribución de concentraciones de C4OH.	31
22. Distribución de concentraciones de C5.	32

23. Distribución de concentraciones de C5:1.	32
24. Distribución de concentraciones de C5OH.	32
25. Distribución de concentraciones de C6.	32
26. Distribución de concentraciones de C8.	32
27. Distribución de concentraciones de C8:1.	32
28. Distribución de concentraciones de C16.	33
29. Distribución de concentraciones de C16:1.	33
30. Distribución de concentraciones de C16:1OH.	33
31. Distribución de concentraciones de C16OH.	33
32. Distribución de concentraciones de C12.	33
33. Distribución de concentraciones de C12:1.	33
34. Distribución de concentraciones de C14.	34
35. Distribución de concentraciones de C14:1.	34
36. Distribución de concentraciones de C14:2.	34
37. Distribución de concentraciones de C14OH.	34
38. Distribución de concentraciones de C18.	34
39. Distribución de concentraciones de C18:1.	34
40. Distribución de concentraciones de C18:1OH.	35
41. Distribución de concentraciones de C18:2.	35
42. Distribución de concentraciones de C18OH.	35

LISTA DE ABREVIATURAS.

METABOLITO	SIMBOLO
Fenilalanina	Phe
Glicina	Gly
Valina	Val
Isoleucina/Leucina	Ile/Leu
Metionina	Met
Citrulina	Cit
Tirosina	Tyr
Arginina	Arg
Ornitina	Orn
Carnitina libre	C0
Acetilcarnitina	C2
Propionilcarnitina	C3
Malonilcarnitina	C3DC
Metilmalonilcarnitina	C4DC
Glutarilcarnitina	C5DC
Adipilcarnitina	C6DC
Decanoilcarnitina	C10
Decenoilcarnitina	C10:1
Decadienoilcarnitina	C10:2
Butirilcarnitina	C4
3-hidroxi-butirilcarnitina	C4OH
Isovalerilcarnitina	C5
Tigililcarnitina	C5:1
3-hidroxi-isovalerilcarnitina	C5OH
Hexanoilcarnitina	C6
Octanoilcarnitina	C8
Octenoilcarnitina	C8:1
Palmitoilcarnitina	C16
Hexadecenoilcarnitina	C16:1
3-hidroxi-palmitoleilcarnitina	C16:1OH
3-hidroxi-hexadecanoil o Hidroxypalmitoilcarnitina	C16OH
Dodecanoilcarnitina o Lauroilcarnitina	C12
Dodecenoilcarnitina	C12:1
Miristoilcarnitina o Tetradecanoilcarnitina	C14
Miristoleilcarnitina o Tetradecenoilcarnitina	C14:1
Tetradecadienoilcarnitina	C14:2
3-hidroxi-miristoilcarnitina	C14OH
Octadecanoilcarnitina o Estearoilcarnitina	C18
Octadecenoilcarnitina u Oleilcarnitina	C18:1
3-hidroxi-octadecenoilcarnitina o 3-hidroxi-oleilcarnitina	C18:1OH
Linoleilcarnitina	C18:2
3-hidroxi-octadecanoilcarnitina o 3-hidroxi-estearoilcarnitina	C18OH

RESUMEN.

Los recientes avances en tecnología han revolucionado la manera en que los sistemas biológicos se visualizan y se estudian. Los avances en espectrometría de masas (MS) han permitido el análisis de proteínas celulares y metabolitos (proteoma y metaboloma respectivamente) en una escala inimaginable.

El término metabolómica se refiere al estudio, identificación y cuantificación sistemática de compuestos de bajo peso molecular en la célula, tejido o fluido biológico que son producto de las reacciones metabólicas en los seres vivos; siendo uno de sus principales objetivos, identificar cambios sutiles en los perfiles metabólicos entre sistemas biológicos en estados fisiológicos o patológicos.

La espectrometría de masas en tándem (MS/MS) es una técnica analítica que permite la separación, identificación y cuantificación de múltiples metabolitos, en diferentes matrices biológicas, en un tiempo muy corto y de manera simultánea, ésta técnica ha sido adoptada para la determinación del perfil de aminoácidos (AA) y acilcarnitinas (AC) en el recién nacido a partir de muestras de sangre colectada en papel filtro (SPF) para el diagnóstico de errores innatos del metabolismo (EIM) de moléculas pequeñas.

Los EIM son trastornos genéticos causados por mutaciones que resultan en actividad nula o deficiente de una enzima o transportador lo que causa un bloqueo en la ruta metabólica implicada. Los síntomas clínicos que presentan los pacientes con algún EIM pueden ser explicados por la acumulación de sustrato, deficiencia de producto o por alteraciones en la concentración de metabolitos de vías colaterales a la del bloqueo.

El análisis del perfil de AA y AC permite conocer el estado metabólico del paciente y detectar en forma oportuna los casos positivos de EIM, para evitar la morbilidad que conduce a la discapacidad y en algunos casos hasta su muerte prematura.

Se determinaron los valores de aminoácidos y acilcarnitinas mediante MS/MS en una población de 13,770 recién nacidos del sureste de México. Se utilizaron muestras de SPF colectada del periodo de enero a mayo de 2008.

Los analitos estudiados no presentaron una distribución normal. Se obtuvo el valor promedio y percentiles de los metabolitos estudiados, proponiendo como valor de corte el percentil 97.5. Se compararon los valores de corte obtenidos de la población estudiada con los valores establecidos por otros autores donde se observaron diferencias entre ellos.

Tres casos de esta cohorte presentaron valores de algún metabolito muy por arriba del valor de corte propuesto, a los cuales se les realizaron los correspondientes estudios confirmatorios, teniendo una incidencia de 1:4590.

Este trabajo confirma la necesidad de hacer extensivo este tipo de programas a todos los recién nacidos mexicanos.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Aminoácidos y acilcarnitinas en el contexto del metabolismo intermediario

Las acilcarnitinas al igual que los aminoácidos son metabolitos presentes en el metabolismo intermediario.^{1, 2}

Los 20 aminoácidos encontrados en las proteínas son denominados α -aminoácidos. Están constituidos por un radical amino ($-\text{NH}_2$) y un grupo carboxilo ($-\text{COOH}$), unido al mismo átomo de carbono denominado, carbono α .^{1, 3}

Dependiendo de su producto final de degradación, algunos aminoácidos se pueden convertir en grupos cetónicos; en glucosa o en ambos. Los aminoácidos siguen 2 caminos^{1, 3}

- 1) Catabolismo que proporciona energía a la célula y/o productos de eliminación
- 2) Transformación en compuestos necesarios para el organismo.

1. *Catabolismo*. Los aminoácidos pierden primero el grupo amino, el resto de la molécula se incorpora a los ciclos metabólicos de los carbohidratos o ácidos grasos.

La pérdida del grupo amino se realiza por:^{1, 3}

1.1. *Transaminación*. Intercambio que lleva a cabo un aminoácido y un α -cetoácido, cambiando el grupo amino por cetona. Este proceso se lleva a cabo mediante la

acción de las enzimas transaminasas que presentan una acción reversible, teniendo como coenzima el fosfato de piridoxal. Los aminoácidos que sufren transaminación son alanina, arginina, fenilalanina, isoleucina, tirosina y valina.^{1,3}

1.2. *Desaminación.* Es la pérdida irreversible del grupo amino, su objetivo es dejar una cadena de carbonos capaz de incorporarse al metabolismo de los carbohidratos y ácidos grasos. Estas reacciones tiene lugar principalmente en el hígado y riñón; su producto es amoniaco libre en sangre, el cual no debe de elevarse debido a que podría provocar toxicidad, para evitarlo existen dos mecanismos:^{1,3}

1.2.1. *Fijación de amoniaco.* El amoniaco libre se une a glutamato y aspartato para formar glutamina y asparagina. La glutamina cede el radical a varios procesos como la formación de bases purínicas, en el tejido renal libera amoniaco por acción de la glutaminasa y por medio de la orina ayuda a la eliminación final de iones de hidrogeno.^{1,3}

1.2.2. *Formación de urea.* La urea es la forma más importante de eliminación de amoniaco del organismo. Este proceso se efectúa en el hígado por una serie de reacciones que se conocen como “Ciclo de la Urea” o de “Krebs Henseleit” (Fig. 1). El ciclo comprende tres etapas; primero se lleva a cabo la unión de una molécula de amoniaco proveniente del glutamato, una de anhídrido carbónico y dos ATP por acción del complejo carbamil fosfato sintetasa. El carbamil fosfato se transfiere a la ornitina, por acción de la ornitina transcarbamilasa originando citrulina; la cual recibe un radical amino (el segundo de la urea) a partir de aspartato. El aspartato se une a la ornitina

formando argininosuccinato y requiere un ATP, el argininosuccinato se separa en arginina y fumarato. El fumarato se incorpora al ciclo tricarboxílico y se transforma en oxalacetato, que por transaminación repone el aspartato. La arginina por hidrólisis catalizada por la arginasa, se desdobra en ornitina y urea, completando el ciclo.^{1, 3}

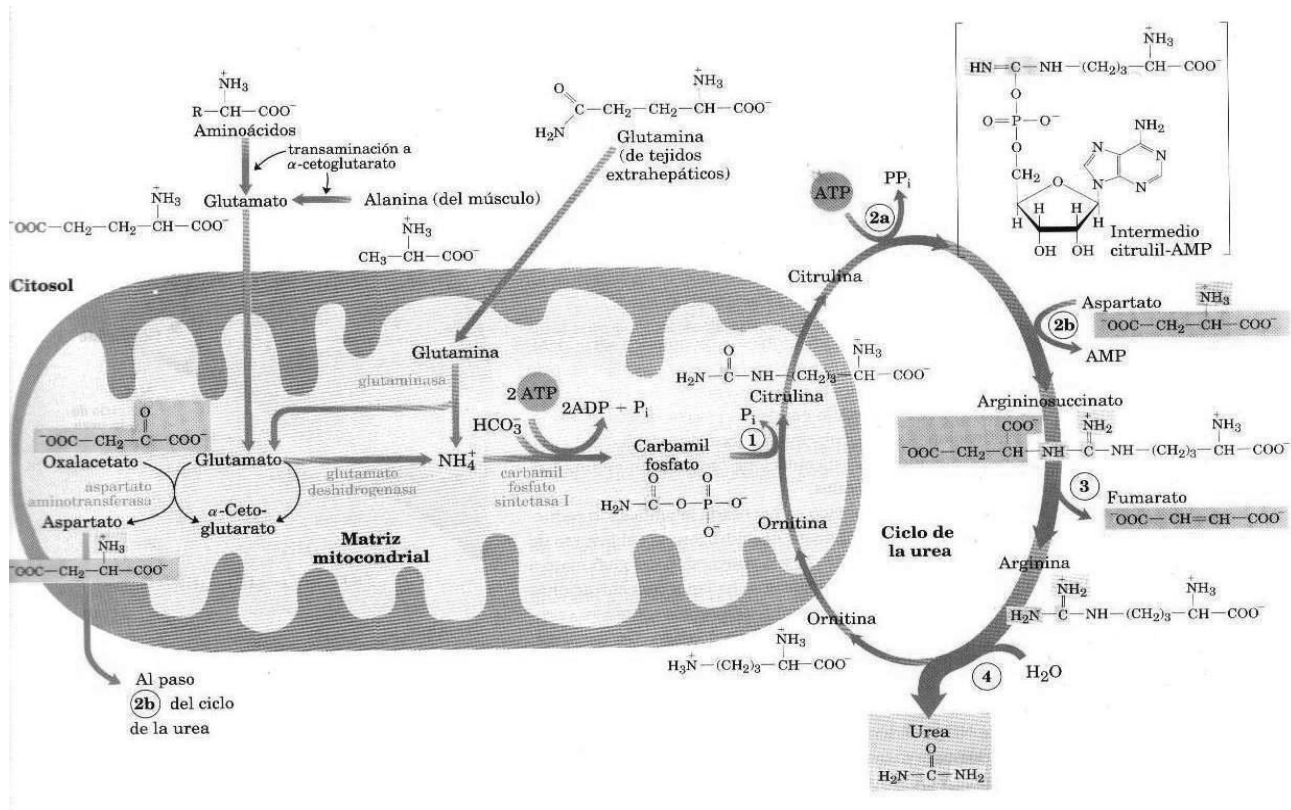


Figura 1. Representación esquemática de una ruta bioquímica. Ciclo de la urea.¹

2. **Transformación:** Los aminoácidos sirven como precursores de compuestos de importancia para el organismo, esto depende del tipo de tejido, de las condiciones bioquímicas y fisiológicas del organismo.^{1, 3}

2.1. **Glicina.** Se forma a partir de la serina por adición reversible de un carbono del ácido fólico, por su conversión a serina puede llegar a piruvato. La glicina puede

formar de manera irreversible varios compuestos de importancia biológica, como son: porfirinas, creatinina, betaína-sarcosina, ácido glioxálico, ácido oxálico, bases purínicas, grupo formil y ácido glucocólico. También es importante en la detoxificación de moléculas no polares o de difícil eliminación.^{1, 3}

2.2. *Alanina*. Se forma a partir de piruvato de manera reversible catalizada por la transaminasa glutamicopirúvica con fosfato de piridoxal como coenzima. Mediante una serie de reacciones en músculo-hígado constituye el principal nutriente de la neoglucogénesis hepática.^{1, 3}

2.3. *Valina, Leucina e Isoleucina*. Estos aminoácidos pierden el grupo amino formando su correspondiente α -cetoácidos, la cadena se une a la CoA por descarboxilación oxidativa mediante el complejo enzimático deshidrogenasa de α -cetoácidos.^{1, 3}

2.4. *Arginina*. Su formación es constante en el hígado en el ciclo de la urea, por acción de la arginasa da urea y ornitina, a través de la ornitina genera ácido glutámico reversible; en intestino genera putrescina. Cede un grupo amidina a la glicina para la formación de creatinina.^{1, 3}

2.5. *Metionina*. Es un precursor de la cisteína y homocisteína. Activa el transporte de grupos metilo entre almacenes (betaínas y glicina) y receptores (noradrenalina), cede un grupo metilo al ácido fólico que lo transforma en formilo o hidroximetilo.^{1, 3}

2.6. *Fenilalanina*. Es precursor de la tirosina, se realiza en el hígado por medio de la enzima fenilalanina hidroxilasa.^{1, 3}

2.7. *Tirosina*. Se forma a partir de la fenilalanina, su importancia radica en que es un precursor de varios compuestos biológicos como; hormonas tiroideas, formación de catecolaminas (dopamina, noradrenalina y adrenalina), formación de melanina.^{1, 3}

Estas rutas metabólicas integran la degradación de aminoácidos en el metabolismo intermediario y pueden ser críticas para la supervivencia en condiciones en las que los aminoácidos constituyen una fuente significativa de energía metabólica.¹

La obtención de energía a través de la oxidación mitocondrial de ácidos grasos es particularmente importante en los primeros días de vida. La carnitina está presente en tejidos y fluidos corporales en forma libre y esterificada (acilcarnitinas de cadena corta, media y larga) y la carnitina total consiste en la sumatoria de la carnitina libre y todas las acilcarnitinas. La L-carnitina es sintetizada en humanos principalmente en el hígado, pero también en riñón y cerebro, sin embargo del 50% al 75% de los requerimientos diarios son tomados de la dieta.²

La función principal de la carnitina (ácido β -hidroxi- γ -trimetilaminobutírico) es actuar como transportador de ácidos grasos de cadena larga activados desde el citoplasma, al interior de la matriz mitocondrial para ser degradados en la β -oxidación y remover del interior de la mitocondria los ácidos grasos de cadena larga, media y corta que se acumulan como resultado del metabolismo normal y anormal, manteniendo niveles adecuados de coenzima A libre (CoA). La L-carnitina interactúa con diferentes tipos de membranas celulares para cambiar sus propiedades fisicoquímicas. Esto significa que, modula la

relación acil-CoA/CoA libre mediante la formación de acilcarnitinas. Si las acil-CoA son producidas a velocidad mayor de la que son utilizadas, el CoA libre intramitocondrial es regenerado mediante la unión de carnitina a grupos acilo y la alta relación de acil-CoA/CoA libre se corrige (Fig. 2).^{1, 2}

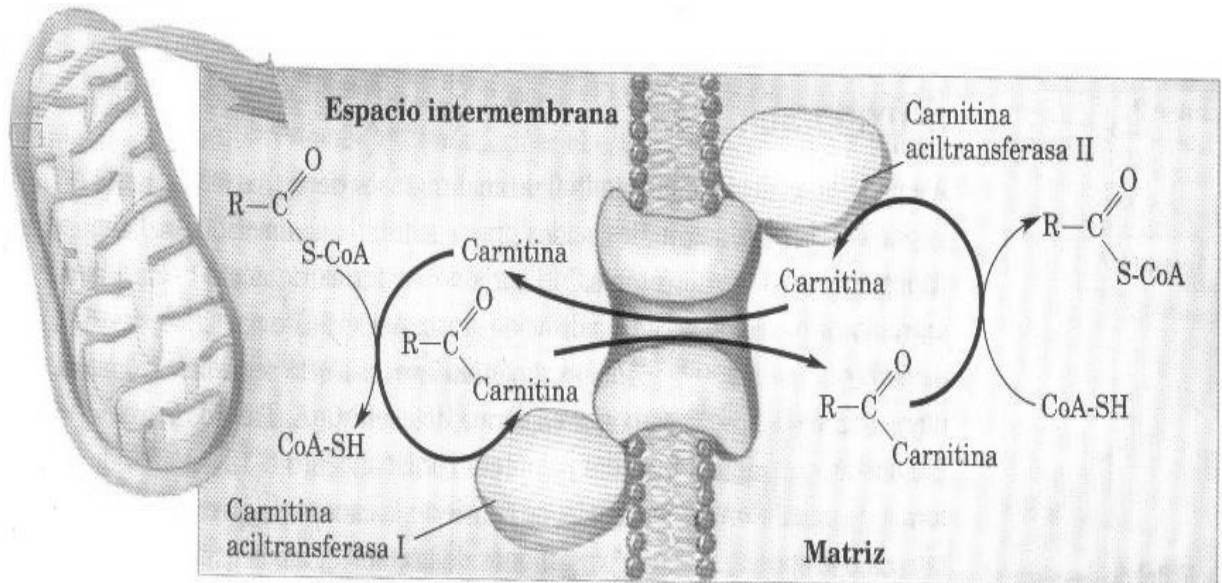


Figura 2. Ruta metabólica de la β -oxidación de los ácidos grasos.¹

1.2. Defectos en el metabolismo de aminoácidos y acilcarnitinas

El estudio de los aminoácidos y las acilcarnitinas es importante debido a que se han encontrado diversos defectos genéticos del metabolismo que conducen a enfermedades hereditarias en los seres humanos, denominadas Errores Innatos del Metabolismo.

Los errores innatos del metabolismo (EIM) son trastornos genéticos, causados por mutaciones en las cuales está afectada una proteína (enzima, receptor, transportador estructural o bomba membranal) lo cual origina actividad nula o deficiente, lo que causa el bloqueo de alguna ruta metabólica provocando la acumulación del sustrato (a nivel

plasmático o intracelular) y la deficiencia del producto o por alteraciones en la concentración de metabolitos de vías colaterales a la del bloqueo, generando los síntomas característicos de estas enfermedades.^{4, 5, 6}

El modo de herencia de la mayor parte de estas enfermedades es autosómico recesivo (98%), también pueden presentarse de forma autosómico dominante o ligados al cromosoma X.⁷

Los EIM son denominados enfermedades raras (frecuencia en la población menor o igual a 5 casos por cada 10,000 habitantes)⁸ debido a su baja frecuencia en la población, pero al considerarlos en conjunto son numerosas.^{2, 9, 10} Los EIM representan una importante causa de morbilidad y mortalidad en la población pediátrica, tienen una frecuencia acumulada de 1:500 a 1:2,500 recién nacidos,^{11, 12, 13, 14} y se pueden encontrar en la práctica médica cotidiana, especialmente en centros de tercer nivel de atención.

En la literatura, varios autores han descrito y establecido los signos y síntomas que clasifican a los pacientes como de alto riesgo de padecer algún EIM^{15, 16, 17}, entre los cuales se encuentran: hipoglucemia, acidosis metabólica, ictericia, retardo en el aumento de talla y/o peso, diarrea, vómito, hepato y/o esplenomegalia, cataratas, apnea, convulsiones, hipo o hipertensión, historia de hermanos previos con diagnóstico de un EIM o con muerte inexplicable, consanguinidad positiva, entre otros.

Existen diferentes formas de clasificar a los EIM, Saudubray clasifica 3 grupos, en función de su patofisiología y para su abordaje clínico:^{8, 18, 19}

1. Los EIM intermediario o de moléculas pequeñas o simples, dan origen a un síndrome de intoxicación por acumulación de compuestos tóxicos próximos al bloqueo metabólico y síntomas neurológicos graves. La alteración del metabolismo se traduce en anomalías de los perfiles bioquímicos en líquidos biológicos (sangre, orina y/o LCR). En este grupo se encuentran las aminoacidopatías (i.e. fenilcetonuria, enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce), acidemias orgánicas (i.e. acidemia metilmalónica, propiónica, isovalérica), defectos del ciclo de la urea (i.e. deficiencia de OTC, argininemia, citrulinemia) y del metabolismo de los carbohidratos (i.e. galactosemia).^{8, 18, 19}
2. Los EIM de moléculas complejas afectan la síntesis o catabolismo en organelos celulares (lisosoma, peroxisoma, retículo endoplásmico o aparato de Golgi). Incluye los padecimientos por depósito lisosomal (cistinosis), peroxisomales, defectos de glicosilación y síntesis de colesterol.^{8, 18, 19}
3. Los EIM de tipo energético, son enfermedades debidas a defectos en hígado, miocardio, músculos y cerebro, que afectan los procesos energéticos citoplasmáticos, se presentan con hipoglucemia e involucran la glucólisis, glucogenosis hepáticas (I y III), glucogenolisis, hiperinsulinismos, defectos de la β -oxidación de los ácidos grasos, defectos de la cadena respiratoria mitocondrial y del metabolismo del piruvato.^{8, 18, 19}

Desde que Sir Archibald Garrod introdujo el concepto de EIM hace 100 años, varios cientos de estas enfermedades genéticas se han descrito.^{20, 21} La disponibilidad de nuevas herramientas bioquímicas y moleculares amplían día a día este grupo de enfermedades^{22,}

En 1961, el Dr. Roberto Guthrie diseñó un método para la detección de Fenilcetonuria mediante el análisis de una muestra de sangre colectada sobre papel filtro, por lo que es considerado el pionero en las pruebas de detección de los EIM.²⁴

El análisis bioquímico constituye la base del diagnóstico de estas enfermedades, el punto de partida más frecuente es el estudio de los metabolitos, lo cual se debe a que hay un gran número de trastornos determinados genéticamente que afectan el compartimento metabólico intermedio, que incluye el conjunto de moléculas sencillas implicadas en actividades sintéticas, catabólicas y procesos energéticos a través de una complicada red de vías metabólicas muy relacionadas entre sí.

Los recientes avances en tecnología han revolucionado la manera en que los sistemas biológicos se visualizan y se estudian. Los avances en espectrometría de masas (MS) han permitido el análisis de proteínas celulares y metabolitos (proteoma y metaboloma respectivamente) en una escala inimaginable.²⁵

El término metabolómica se refiere al estudio, la identificación y cuantificación sistemática de compuestos de bajo peso molecular en cierta célula, tejido o fluido biológico que son producto de las reacciones metabólicas en los seres vivos²⁶; siendo uno de sus principales objetivos, identificar cambios sutiles en los perfiles metabólicos entre sistemas biológicos en diferentes estados fisiológicos o patológicos.²⁷

Los componentes del metaboloma pueden ser comprendidos como los productos finales de la expresión genética y definen el fenotipo bioquímico de una célula o tejido u organismo. La cuantificación de estos metabolitos proporciona un amplio panorama del

estatus bioquímico, el cual puede ser utilizado para monitorear y establecer la función de un gen.²⁵

Inicialmente el uso de la MS estaba limitado a laboratorios de investigación en física y química, así como en las industrias del petróleo y farmacéutica desde la década de los 60s, se ha utilizado también en el área de la química clínica y en los laboratorios de diagnóstico.²⁸ La accesibilidad a esta nueva tecnología ha abierto el camino al desarrollo de diversas aplicaciones.²⁹

1.3. Métodos de diagnóstico

Antes de 1980, el diagnóstico de los EIM, requirió el análisis de orina por cromatografía de gases (GC) con detectores poco específicos. La identificación del metabolito se basó solamente en su tiempo de retención. La adición de la espectrometría de masas (MS) a la GC a finales de los 70`s mejoró el análisis de los ácidos orgánicos con la identificación del espectro de masas de cada compuesto en un tiempo particular de retención. Esto combinó la técnica, conocida como GC / MS, que se convierte en un estándar de oro para identificación de desórdenes metabólicos en orina.¹⁶

A mediados de 1980, debido a que los pacientes con deficiencia de carnitina eran diagnosticados frecuentemente con un desorden metabólico, aumentó la sospecha de una posible relación entre la carnitina y los desórdenes del metabolismo de los ácidos grasos y orgánicos. Cuando se sospechaba de un desorden metabólico se realizaba cuantificación de carnitinas libre y total en plasma y orina. Los métodos que se utilizaban, implicaban pruebas enzimáticas, radioenzimáticas y Cromatograficas.¹⁶, poco precisos. Estas

limitaciones llevaron a la búsqueda de nuevos métodos lo que condujo al auge de la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) para el tamizaje del recién nacido.¹⁶

Esta herramienta analítica se introdujo en los laboratorios de análisis clínicos en la década de los 80's.³⁰ La palabra tándem viene del inglés tandem, y si bien su significado inicial es "bicicleta de dos asientos", también tiene la acepción de "conjunto de dos elementos que se complementan" o "conjunto de dos personas que colaboran en algo".³¹

Las limitaciones de los métodos previos llevaron a la búsqueda de un método más simple y más directo para la cuantificación de los aminoácidos y acilcarnitinas. Como consecuencia, surgió una nueva forma de MS para muestras no volátiles, las modificaciones condujeron a la adición de la cromatografía de líquidos para la separación de los metabolitos de los presentes en una muestra.¹⁶

Los avances rápidos en la tecnología de MS y la introducción de más sistemas cuadrupolos costeables de MS/MS produjeron instrumentos con sensibilidad y selectividad incrementada que a su vez eliminó la necesidad de la separación cromatográfica.¹⁶

El esfuerzo común para desarrollar el tamiz para el recién nacido por MS/ MS, se detecta en un ensayo con sangre en papel de filtro que comenzó en 1990. Más de una docena de años de mejoras en la ionización, automatización y procesamiento de datos han facilitado el tamizaje del recién nacido en enfermedades metabólicas.¹⁶

El método tiene el potencial de tamizar efectivamente al menos una docena de otras alteraciones (Tabla 1). Algunos autores sugieren que el perfil de aminoácidos y

acilcarnitinas en sangre debería ser determinado en todos los pacientes que presenten los signos y síntomas característicos de las alteraciones hereditarias de la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos, aminoacidopatías y acidemias orgánicas que han sido identificados.^{15, 32, 33}

Tabla 1. EIM detectados por MS/MS.^{15, 16, 24, 28, 30, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41}

<p>Aminoacidopatías</p> <p>Fenilcetonuria (PKU)</p> <p>Hiperfenilalaninemia (HFA)</p> <p>Enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce (EOJA, EOJM, MSUD)</p> <p>Hiperglicinemia no cetósica (NKHG)</p> <p>Homocistinuria (HCU)</p> <p>Hipermetioninemia (H-MET)</p> <p>Citrulinemia (CIT-I y II)</p> <p>Tirosinemia tipo I, II y III (TYR – I, II, III)</p> <p>Argininemia (ARGD)</p> <p>Hiperornitinemia, hiperamonemia, hiperhomocitrulinuria (HHH)</p> <p>Acidemia Argininosuccinica. (ASA)</p> <p>Atrofia Girata (AG)</p>
<p>Acidemias Orgánicas</p> <p>Acidemia Metilmalónica (AMM)</p> <p>Acidemia Propiónica (AP)</p> <p>Deficiencia de Malonil-CoA Descarboxilasa, acidemia malonica (MAL)</p> <p>Deficiencia de 2-metil-butiril-CoA Deshidrogenasa (2-MBCD)</p> <p>Acidemia Isovalérica (IVA)</p>

Deficiencia de acetoacetyl-CoA tiolasa mitocondrial (BKT)

Deficiencia de 3-metil-crotonil-CoA carboxilasa (3-MCC)

Deficiencia de Isobutiril-CoA deshidrogenasa (IBCD)

Deficiencia de halocarboxilasa sintasa o def. múltiple de carboxilasas (MCD)

Deficiencia de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA liasa (HMG)

Deficiencia de glutaril-CoA deshidrogenasa (GA-I)

Trastornos de β -oxidación de ácidos grasos.

Defecto de Captación de Carnitina (CUD)

Deficiencia de Carnitin Palmitoil Transferasa Tipo I (CPT-I)

Deficiencia Neonatal de Carnitina Palmitoil Transferasa -Tipo II (CPT-II)

Deficiencia de Acil-CoA dehidrogenasa de cadena muy larga (VLCAD)

Deficiencia Carnitina/Acilocarnitina Translocasa (CACT)

Deficiencia 3-Hidroxi-Acil-CoA Dehidrogenasa de cadena larga (LCHAD)

Deficiencia de Proteína Trifuncional (TFP)

Deficiencia de Acil-CoA Dehidrogenasa de de cadena corta (SCAD)

Acidemia Etilmalónica o encefalopatía etilmalónica (EE)

Deficiencia Múltiple de Acil-CoA Dehidrogenasa o Acidemia Glutárica-Tipo II (MADD o GA-II)

Deficiencia de Acil-CoA Hidroxi Dehidrogenasa de cadena corta (SCHAD)

Deficiencia de 3-metilglutaconil-CoA reductasa (MGA)

Deficiencia de 2,4-dienoil-CoA reductasa

Deficiencia de Acil-CoA Dehidrogenasa de cadena mediana (MCAD)

Defectos del transportador de carnitina (CTD)

Deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga (LCAD)

1.3.1. Fundamentos de Espectrometría de masas en tándem

La MS es una técnica analítica que permite la identificación, separación y cuantificación de iones derivados de moléculas, basada en su relación masa/carga (m/z) en diferentes matrices.^{42, 43}

El uso de MS creció en forma exponencial desde que J. J. Thompson describiera en 1910 experimentos en los que iones gaseosos producidos por bombardeo electrónico de especies gaseosas neutras eran separados según el valor de su relación m/z .⁴⁴

Un equipo de MS está constituido de los siguientes módulos (Fig. 3)^{44, 45}

Sistema de introducción de muestra: Proporciona flujo de disolvente constante que transporta la muestra hasta la fuente de ionización. En el caso de mezclas complejas, se acopla un sistema cromatográfico⁴⁶ para una separación previa al análisis. Un análisis por MS cuándo es usado sin filtración por cromatografía no es completamente selectivo y los datos pueden ser no interpretables o proporcionar falsos positivos debido a los compuestos con espectros de masas similares producidas por iones intactos y fragmentados.

Fuente de ionización: Su función es ionizar a las moléculas, es decir aplicarle energía a la muestra para generar moléculas cargadas (carga + / -), puesto que para medir las moléculas por MS estas deben estar “eléctricamente cargadas”.⁴⁷

Analizador de masas: Separa y ordena los iones formados en la fuente de ionización de acuerdo a su relación m/z .⁴⁸

Detector: Registra y amplifica la señal proveniente del analizador de masas, las cuales pueden ser las masas de moléculas individuales y sus fragmentos.⁴⁷

Procesador de datos: Los resultados de la detección son presentados en una gráfica denominada *espectro de masas*, donde las posiciones a lo largo del *eje de las abscisas* representan la relación m/z , mientras que la altura de un pico a lo largo del *eje de las ordenadas* representa la cantidad de iones.⁴⁷

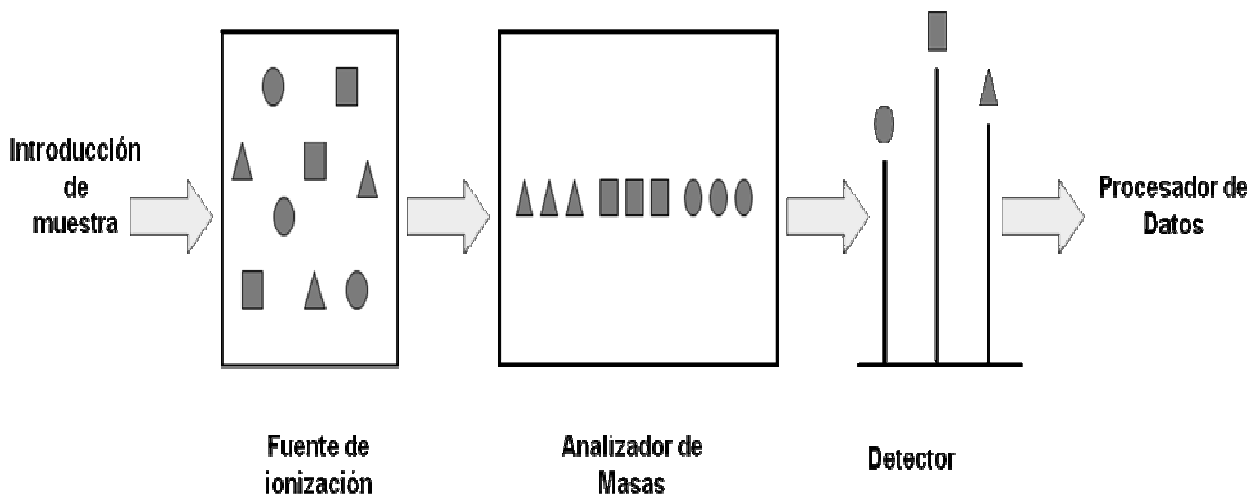


Fig 3. Esquematización general de un sistema de MS.⁴⁵

Un equipo de MS/MS consta de los mismos componentes que un equipo de MS simple, excepto que éste cuenta con dos o más analizadores de masas unidos en serie (de donde se deriva la denominación “tándem”) y en algunos casos tiene una celda de colisión entre los dos analizadores de masas.

Se han diseñado una gran variedad de acoplamientos entre cada uno de los módulos que constituyen un equipo de MS/MS, el tipo de acoplamiento que se selecciona, va de

acuerdo a las características físicas y químicas de la molécula de interés, así como de acuerdo con el objetivo del estudio (cuantificación, descripción, cambios en la expresión de proteínas, estructura molecular). (Fig. 4)^{45, 49}

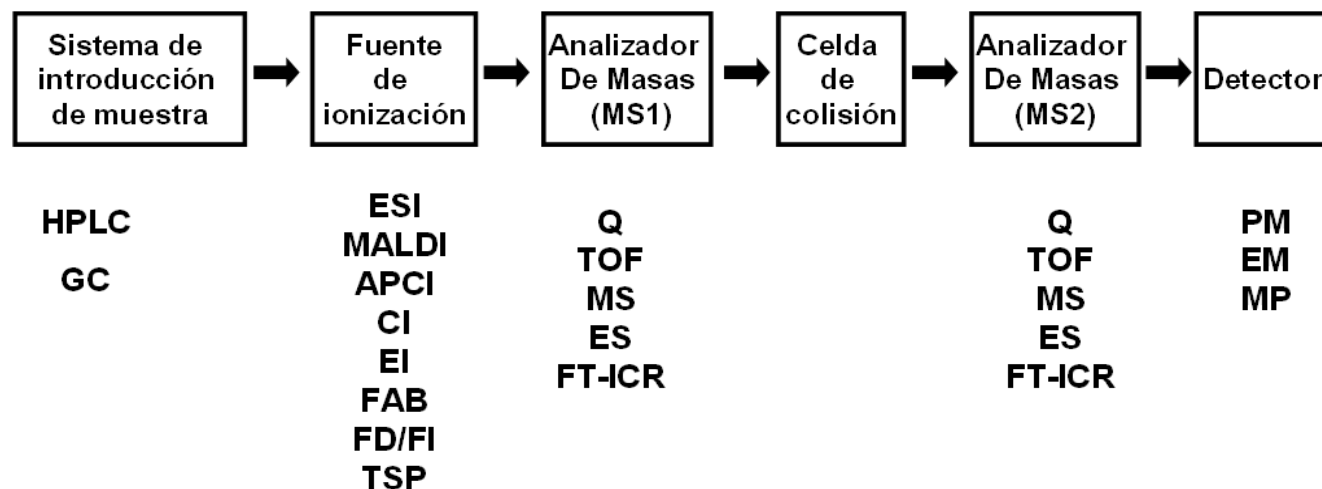


Fig. 4. Esquema general de un sistema MS/MS con ejemplos de cada módulo en la parte inferior. Abreviaturas: HPLC High Performance Liquid Chromatography, **GC** Gas Chromatography, **ESI** Electrospray Ionisation, **MALDI** Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation, **APCI** Atmospheric Pressure Chemical Ionisation, **CI** Chemical Ionisation, **EI** Electron Impact, **FAB** Fast Atom Bombardment, **FD/FI** Field Desorption / Field Ionisation, **TSP** Thermospray Ionisation, **Q** Quadrupole, **TOF** Time of Flight, **MS** Magnetic sector, **ES** Electronic sector, **FT-ICR** Fourier transform, **PM** Photomultiplier, **EM** electron multiplier, **MP** Microchannel Plate.

Un MS/MS, provee una solución para la cuestión de selectividad en el análisis sin consumir tiempo cromatográfico.

El MS/MS triple cuadrupolo (Q3), (denominación otorgada debido a que contiene dos cuadrupolos y un hexapolo, considerado como un cuadrupolo más), comprende los siguientes componentes (Fig. 5)^{16, 43, 44, 50}

Sistema de introducción de muestra (bomba de HPLC): Proporciona flujo de disolvente constante que transporta la muestra hasta la fuente de ionización.

Sistema de ionización por Electrospray (ESI): La ionización ESI es una técnica adecuada para el análisis de moléculas polares en un intervalo de masa de 2 a 2000 uma.

Primer analizador de masas (Q1): Separa y ordena los iones formados en la fuente de ionización de acuerdo a su relación m/z.

Celda de colisión (hexapolo q2): Fragmenta las moléculas haciéndolas colisionar con un gas inerte (Ar, Xe).

Segundo analizador de masas (Q3): Detecta los iones de interés provenientes de la celda de colisión.

Detector: Registra y amplifica la señal proveniente del analizador de masas, posteriormente la envía al procesador de datos en donde esta información, se registra en forma de *espectro de masas*.

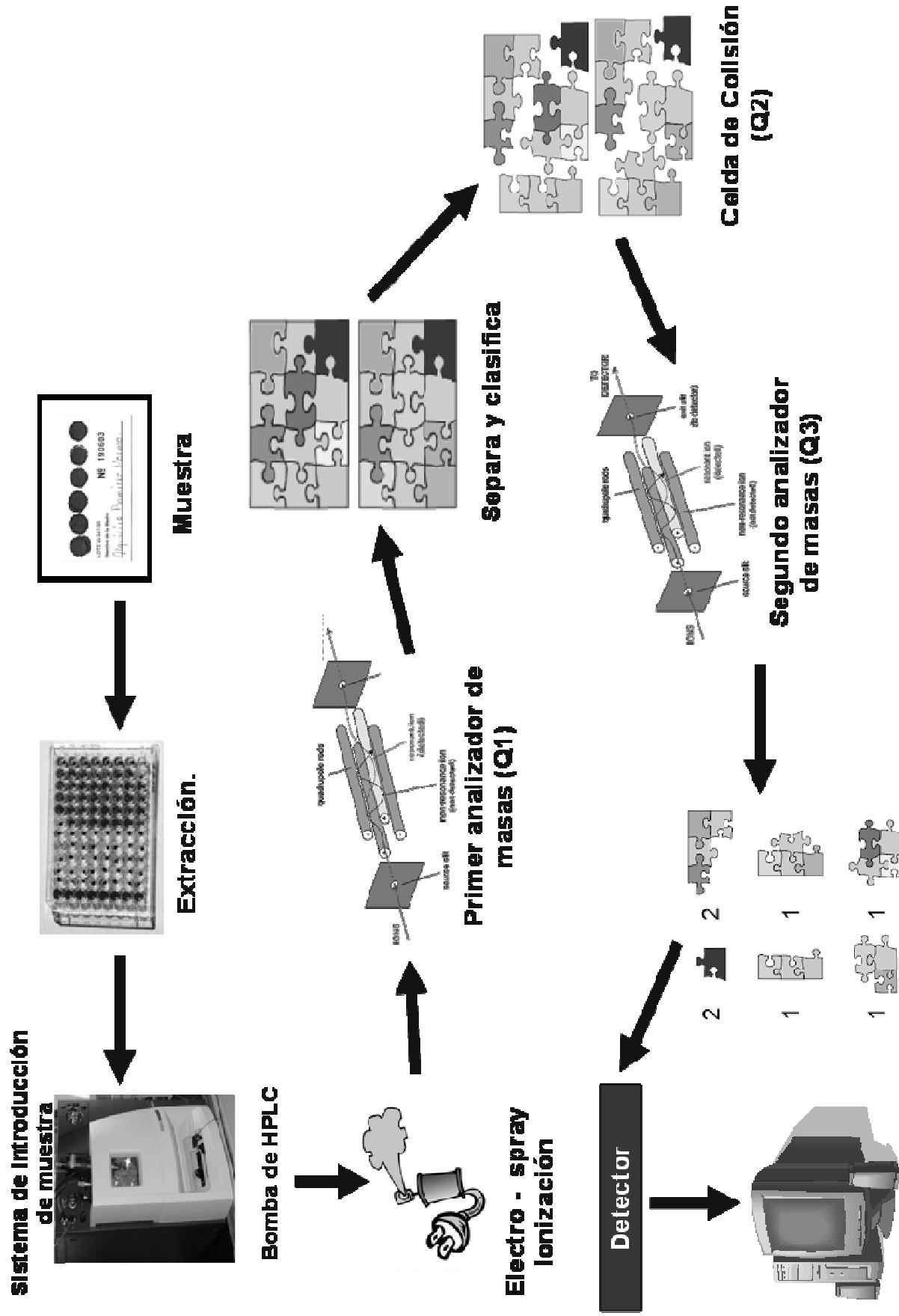


Fig. 5. Esquema y funcionamiento de un MS/MS Q3.⁵¹

La MS/MS permite realizar el análisis de los componentes presentes en matrices biológicas complejas y con un volumen de muestra menor a 100µL, obteniendo como resultado los espectros de masas de más de 40 metabolitos en un tiempo aproximado de 3 minutos.

Es importante notar la habilidad de MS/MS para analizar diferentes familias químicas del producto en un solo análisis en un corto periodo de tiempo, también se puede obtener información estructural acerca de un compuesto a través de la formación de fragmentos específicos y es útil para el descubrimiento de compuestos en mezclas complejas de acuerdo a su patrón de fragmentación.⁴⁷ Por lo tanto es una herramienta eficiente, en el análisis del perfil de aminoácidos y acilcarnitinas para la detección de EIM. Se tiene previsto un análisis amplio y un rendimiento específico, para un instrumento altamente eficiente en base a costos y una perspectiva analítica que se aprovecha de la clínica cuando se usa para los múltiples desórdenes.¹⁶

2. OBJETIVO.

Determinar los valores (concentración) de aminoácidos y acilcarnitinas por medio de la Espectrometría de Masas en Tándem (MS/MS) en muestras de sangre de recién nacidos, depositada en papel filtro, para detectar Errores Innatos del Metabolismo.

2.1 Objetivos particulares.

- ✓ Analizar la distribución de la concentración de aminoácidos y acilcarnitinas en una población de niños del sureste de México.

- ✓ Analizar el perfil de aminoácidos y acilcarnitinas para utilizarlo como una herramienta diagnóstica de los Errores Innatos del Metabolismo.

3. JUSTIFICACIÓN.

En la actualidad el abordaje clínico, el diagnóstico y la evaluación del tratamiento de los padecimientos genéticos metabólicos no pueden realizarse de manera eficiente sin la tecnología adecuada, dentro de la cual destaca la Espectrometría de Masas en Tándem la cual es una valiosa herramienta que permite analizar con alta sensibilidad y especificidad, metabolitos en muestras de sangre depositada en papel filtro.

El procesamiento de una muestra realizado con un espectrómetro de masas en tándem tarda sólo 3 minutos e incluye la medición de más de 40 metabolitos en un solo análisis el cual permite el diagnóstico de los trastornos de β -oxidación de ácidos grasos, ácidos orgánicos y aminoácidos.

El estudio de los metabolitos realizado mediante esta técnica, únicamente requiere de 1 gota de sangre (20 μ L), misma que se puede recolectar en papel filtro, lo cual aumenta y diversifica las posibilidades para realizar estudios de investigación.

4. METODOLOGÍA.

4.1. Clasificación del estudio. Longitudinal, retrospectivo, descriptivo, comparativo y observacional.

4.2. Población de estudio. 13,770 muestras de sangre colectada en papel filtro, tomada del talón de recién nacido en el Sureste de México durante el periodo de enero a mayo del 2008.

4.3. Reactivos y Consumibles:

- Kit NeonGram para MS/MS para aminoácidos y acilcarnitinas no derivatizados PerkinElmer que contiene:

➤ Estándares internos: Isótopos estables de los siguientes aminoácidos.

$^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}$ -Glicina.

$^{13}\text{C}_6$ -Tirosina

$^2\text{H}_4$ -Alanina.

$^2\text{H}_3$ -Aspartato

$^2\text{H}_8$ -Valina.

$^2\text{H}_2$ -Ornitina.2HCl

$^2\text{H}_3$ -Leucina.

$^2\text{H}_2$ -Citrulina

$^2\text{H}_3$ -Metionina

$^2\text{H}_4, ^{13}\text{C}$ -Arginina.HCl

$^2\text{H}_5$ -Fenilalanina

➤ Estándares internos: Isótopos estables de las siguientes acil-carnitinas.

d_9 -carnitina libre ($\text{d}_9\text{-C0}$)

d_3 -Decanoilcarnitina ($\text{d}_3\text{-C10}$)

d_3 -acilcarnitina ($\text{d}_3\text{-C2}$)

d_6 -Glutarilcarnitina($\text{d}_6\text{C5DC}$)

d_3 -propionilcarnitina ($\text{d}_3\text{-C3}$)

d_3 -Lauroilcarnitina ($\text{d}_3\text{-C12}$)

d ₃ -Butirilcarnitina (d ₃ -C4)	d ₃ -Miristoilcarnitina (d ₃ -C14)
d ₉ -Isovalerilcarnitina (d ₉ -C5)	d ₃ -Palmitoilcarnitina (d ₃ -C16)
d ₃ -Hexanoilcarnitina (d ₃ -C6)	d ₃ -Octadecanoilcarnitina(d ₃ -C18)
d ₃ -Octanoilcarnitina (d ₃ -C8)	

➤ Controles de sangre depositada en papel secas de sangre; nivel alto y nivel bajo:

Carnitina libre (C0)	Palmitoilcarnitina (C16)
Acetilcarnitina (C2)	Octadecanoilcarnitina (C18)
Propionilcarnitina (C3)	Alanina
Butirilcarnitina (C4)	Citrulina
Hexanoilcarnitina (C6)	Glicina
Glutarilcarnitina (C5DC)	Leucina
Octanoilcarnitina (C8)	Metionina
Decanoilcarnitina (C10)	Fenilalanina
Lauroilcarnitina (C12)	Tirosina
Miristoilcarnitina (C14)	Valina

- Flujo de solvente (mezcla grado HPLC; Acetonitrilo y 18 MΩ de agua)).
- Solución de extracción (mezcla de metanol grado HPLC y 18 MΩ de agua).
- Hojas de aluminio.
- Microplacas claras de fondo V.

4.4. Equipo:

- Perforador de papel de 1/8" (3mm) de diámetro, DELFIA Plate Punch.
- Micropipeta manual multicanal (8canales), 30-300 µL

- Incubador/agitador de placas Labssystem iEMS Incubator/Shaker HT
- Espectrómetro de masas en tándem configurado para tamiz neonatal que consta:
 - Software NeonGram
 - Degasificador de vacío Series 200 PerkinElmer.
 - Automuestreador Waters 2777C Simple Manager.
 - Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Waters 1525μ, Binary HPLC pump.
 - Espectrómetro de Masas en Tándem Micromass Quattro micro™ API

4.5. Preparación de la disolución de estándares internos:

Se realizó la reconstitución de los viales que contienen los estándares de aminoácidos y acilcarnitinas con 1 ml de solución de extracción respectivamente, hasta su completa disolución; posteriormente se realizó una dilución 1:200 de los dos estándares usando la solución de extracción.

4.6. Procesamiento de la muestra:

Se perforaron las muestras de sangre seca en papel filtro de los recién nacidos así como los controles de niveles altos y bajos incluidos en el kit, obteniendo discos de 1/8" (3mm) de diámetro, los cuales se colocaron en microplacas con pozos de fondo cónico, cada pozo debe contener solo un disco. Los controles se colocan en el pozo 5, 6, 95 y 96.

A los primeros cuatro pozos se les agregó solo la solución que contiene los estándares internos, estos pozos fueron utilizados como blancos para sincronizar el equipo, Usando una micropipeta de 8 canales, realizando pipeteando en reversa, se agregaron 190 μL de

solución de estándares internos a cada pozo para realizar la extracción de la sangre de los discos de papel filtro, inmediatamente después la placa fue cubierta y sellada con una lamina de aluminio para reducir la evaporación, posteriormente las placas se incubaron durante 30 minutos a 30°C con una velocidad de agitación de 650 a 750 rpm, fueron colocadas en el automuestrador, por último las muestras son introducidas al espectrómetro de masas en tándem mediante el equipo de HPLC.

Por cada muestra analizada cuyo tiempo de análisis total será de 3 minutos, se obtuvieron las concentraciones de 11 aminoácidos y 33 acilcarnitinas.

Análisis estadístico:

El análisis estadístico se realizó mediante Excel y el programa estadístico MedCalc.

Se calcularon los valores del promedio, y los percentiles 75, 90, 95, 97.5 y 99 de cada metabolito.

5. RESULTADOS.

Se realizó el análisis de 13770 muestras de sangre colectada en papel filtro, obtenidas por punción de talón de recién nacidos del sureste de México, las cuales pertenecen al periodo de enero a mayo de 2008.

Las muestras fueron analizadas por MS/MS, obteniendo las concentraciones de los aminoácidos y acilcarnitinas en $\mu\text{mol/L}$.

Posteriormente se elaboraron las gráficas de distribución correspondientes a cada uno de los metabolitos en ningún caso presentan una distribución normal, así como el cálculo de los promedios y percentiles (Tablas 2 y 3).

Tabla 2. Valor promedio y percentiles de los aminoácidos estudiados.

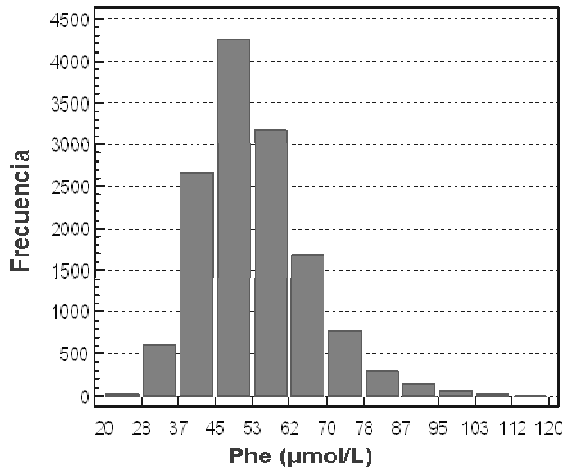
Metabolito	Promedio	Percentiles				
		75%	90%	95%	97.5%	99%
Fenilalanina	53.59	60.16	69.44	76.01	82.52	91,56
Glicina	298.11	342.47	409.29	459.01	513.25	582,72
Valina	126.11	143.68	165.05	179.45	193.32	207,81
Ile/Leu	143.56	166.99	194.84	213.62	228.95	245,81
Metionina	16.88	20.27	24.51	27.31	30.06	33,60
Citrulina	17.97	21.04	25.35	28.56	31.51	35,41
Tirosina	97.69	116.31	152.83	181.11	205.39	243,28
Arginina	17.26	23.50	32.87	39.22	45.29	51,53
Ornitina	125.78	148.62	179.96	201.14	221.41	248,02

Tabla 3. Valor promedio y percentiles de las acilcarnitinas estudiados.

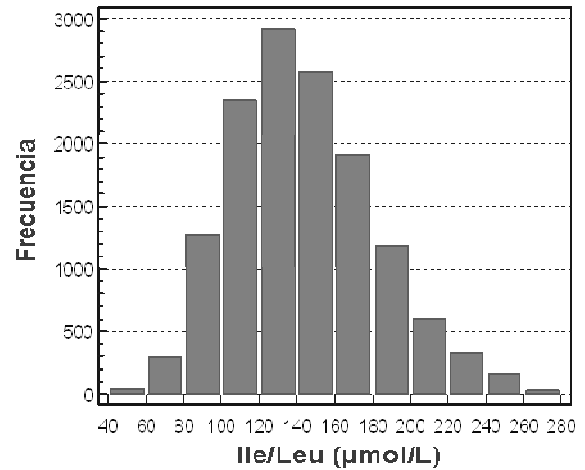
Metabolito	Promedio	Percentiles				
		75%	90%	95%	97.5%	99%
C0	22.38	26.31	31.69	35.69	39.73	44,65
C2	15.35	19.31	25.12	28.96	33.23	38,50
C3	1.39	1.77	2.41	2.87	3.34	3,96
C3DC	0.53	0.65	0.85	1.00	1.14	1,29
C4DC	1.51	1.76	2.09	2.32	2.57	2,93
C5DC	0.21	0.27	0.32	0.36	0.40	0,46
C6DC	0.16	0.19	0.23	0.25	0.28	0,32
C10	0.06	0.07	0.09	0.10	0.12	0,13
C10:1	0.06	0.07	0.10	0.12	0.16	0,22
C10:2	0.01	0.02	0.02	0.02	0.03	0,03
C4	0.21	0.24	0.30	0.35	0.40	0,47
C4OH	0.08	0.09	0.12	0.15	0.17	0,20
C5	0.13	0.16	0.21	0.25	0.29	0,34
C5:1	0.05	0.02	0.02	0.03	0.03	0,04
C5OH	0.20	0.23	0.27	0.30	0.33	0,38
C6	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0,08
C8	0.05	0.06	0.08	0.09	0.11	0,12
C8:1	0.11	0.13	0.17	0.20	0.23	0,26
C16	2.15	2.77	3.57	4.09	4.57	5,00
C16:1	0.11	0.15	0.22	0.26	0.30	0,34
C16:1OH	0.04	0.04	0.06	0.06	0.07	0,08
C16OH	0.01	0.02	0.02	0.03	0.03	0,04
C12	0.06	0.07	0.09	0.10	0.12	0,14
C12:1	0.06	0.07	0.11	0.15	0.21	0,29
C14	0.11	0.13	0.16	0.18	0.21	0,23
C14:1	0.04	0.05	0.07	0.09	0.12	0,15
C14:2	0.02	0.02	0.04	0.05	0.08	0,12
C14OH	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0,02
C18	0.60	0.74	0.93	1.05	1.17	1,29
C18:1	1.09	1.35	1.64	1.83	2.01	2,19
C18:1OH	0.02	0.02	0.03	0.03	0.04	0,04
C18:2	0.24	0.30	0.38	0.43	0.49	0,56
C18OH	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0,02

Gráficas de distribución de los metabolitos analizados.

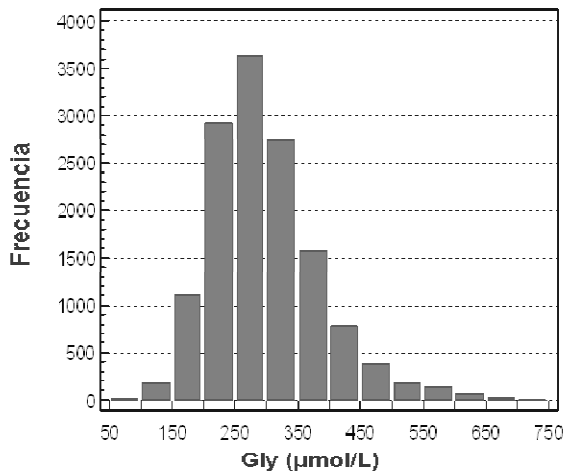
AMINOÁCIDOS:



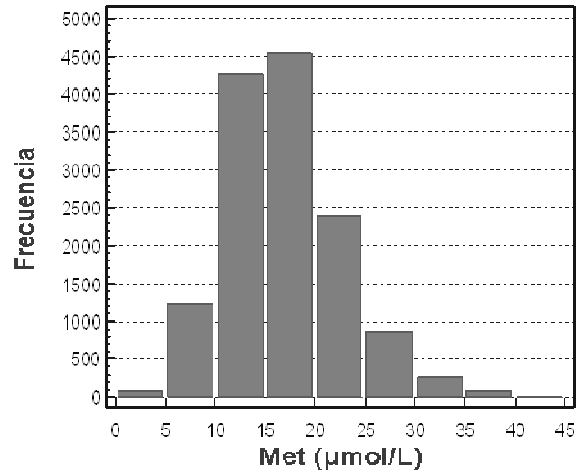
Gráfica 1. Distribución de concentraciones de Fenilalanina.



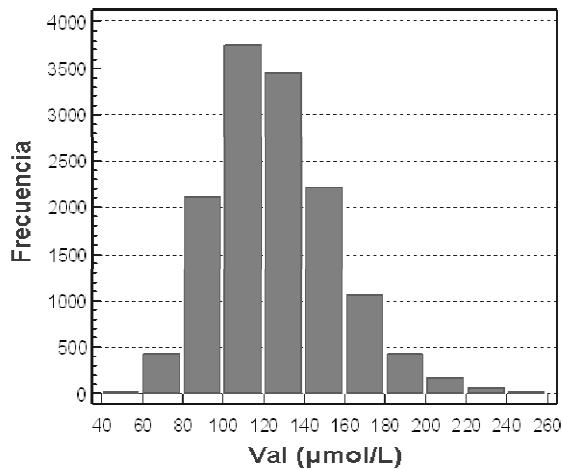
Gráfica 4. Distribución de concentraciones de Ileu/Leu.



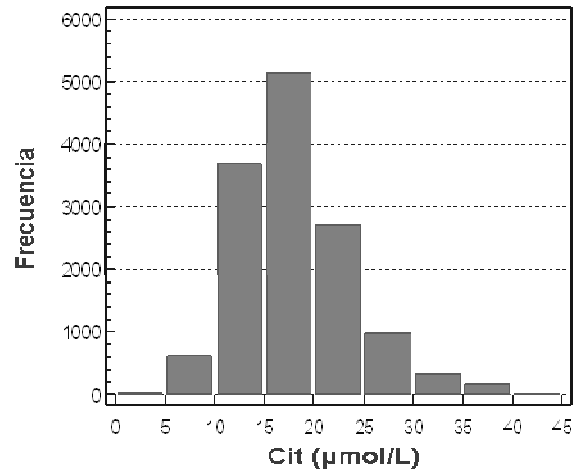
Gráfica 2. Distribución de concentraciones de Glicina.



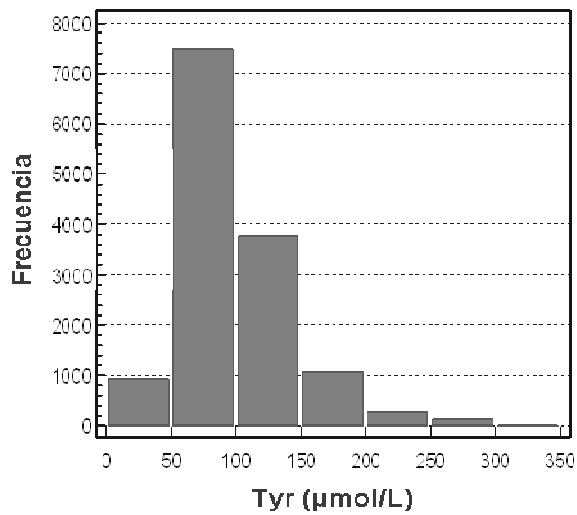
Gráfica 5. Distribución de concentraciones de Metionina.



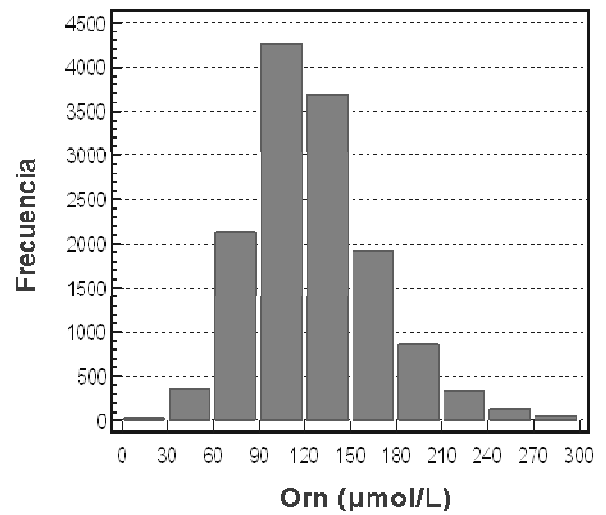
Gráfica 3. Distribución de concentraciones de Valina.



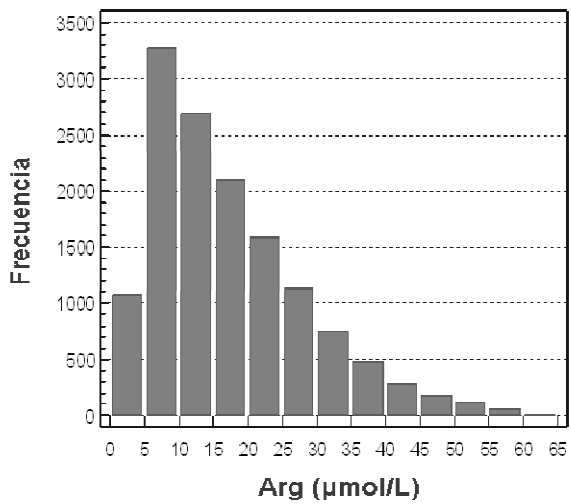
Gráfica 6. Distribución de concentraciones de Citrulina.



Gráfica 7. Distribución de concentraciones de Tirosina.

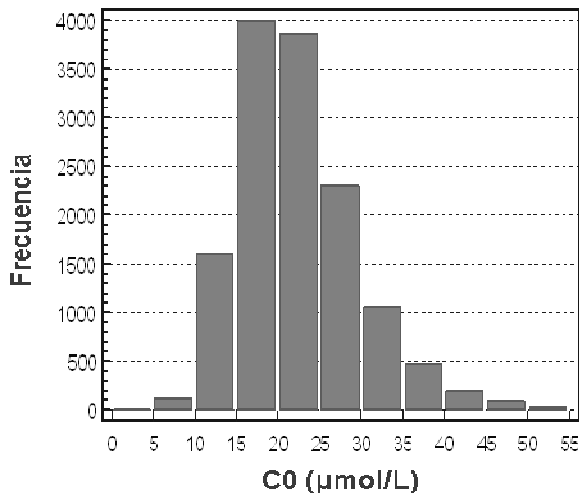


Gráfica 9. Distribución de concentraciones de Ornitina.

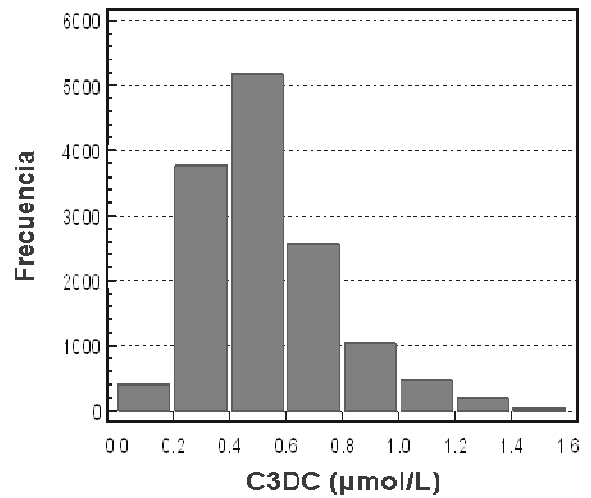


Gráfica 8. Distribución de concentraciones de Arginina.

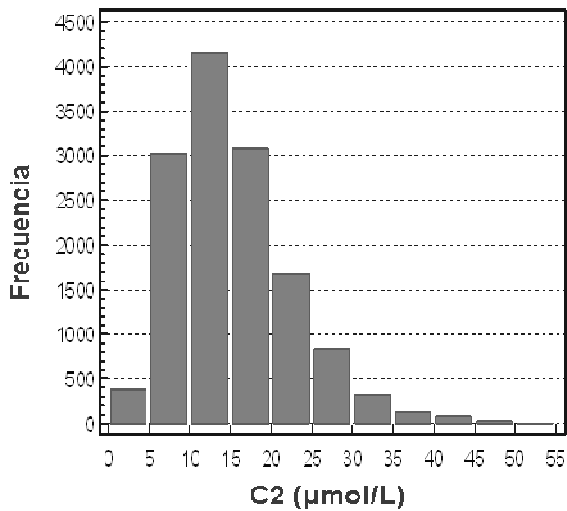
ACILCARNITINAS:



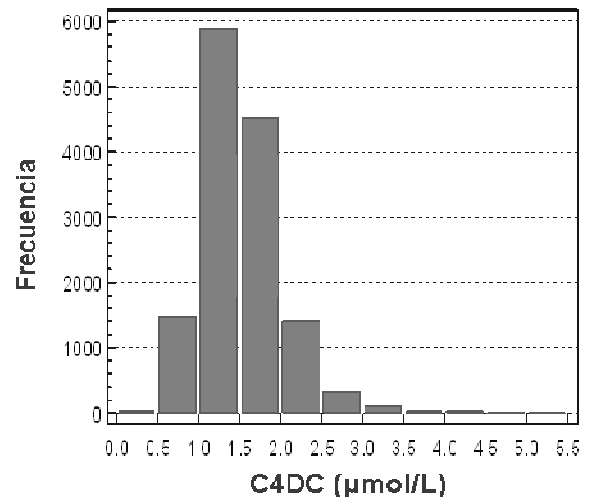
Gráfica 10. Distribución de concentraciones de C0.



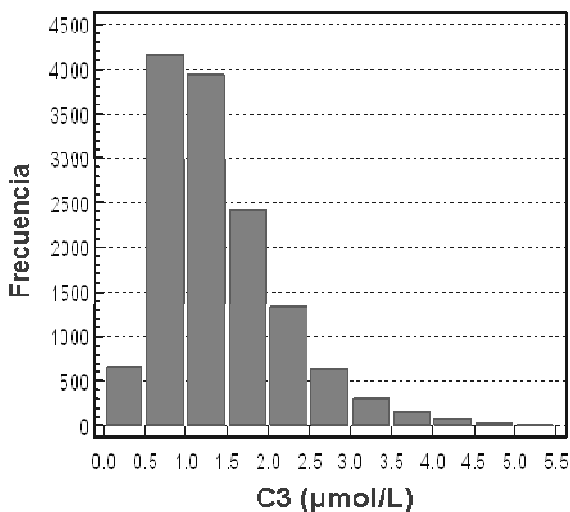
Gráfica 13. Distribución de concentraciones de C3DC.



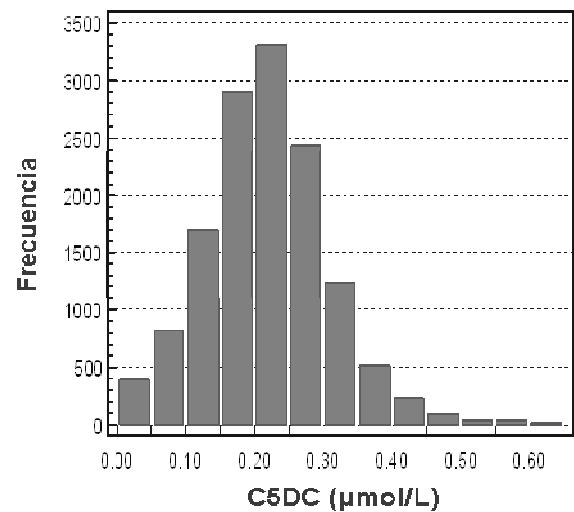
Gráfica 11. Distribución de concentraciones de C2.



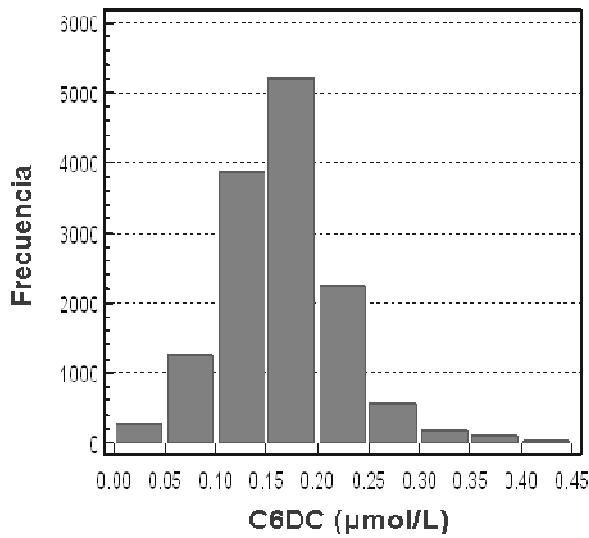
Gráfica 14. Distribución de concentraciones de C4DC.



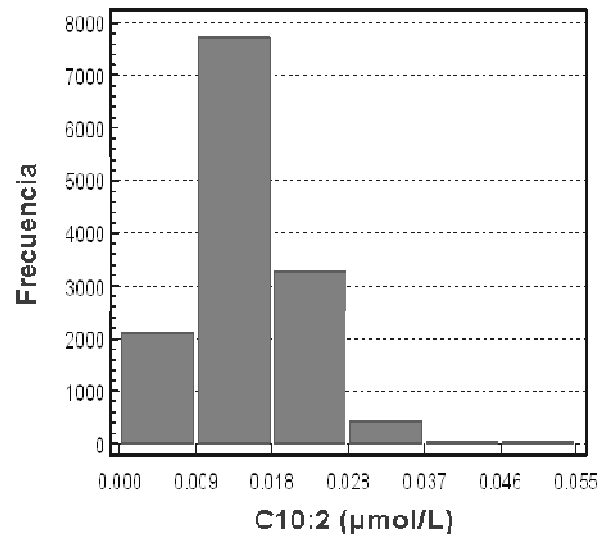
Gráfica 12. Distribución de concentraciones de C3.



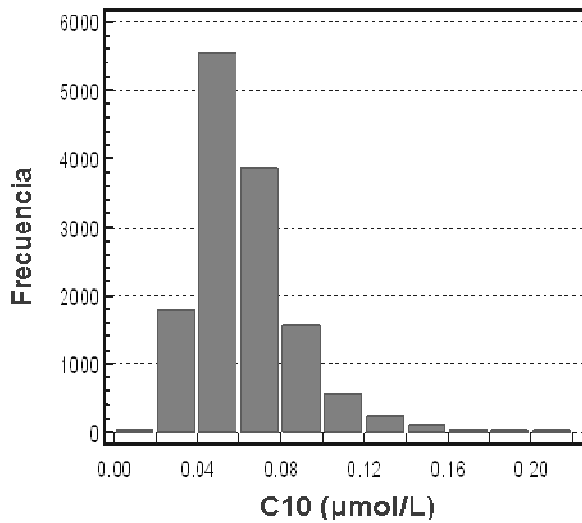
Gráfica 15. Distribución de concentraciones de C5DC.



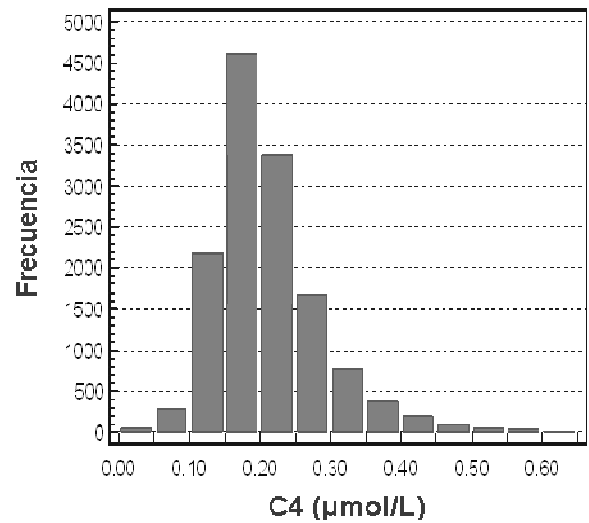
Gráfica 16. Distribución de concentraciones de C6DC.



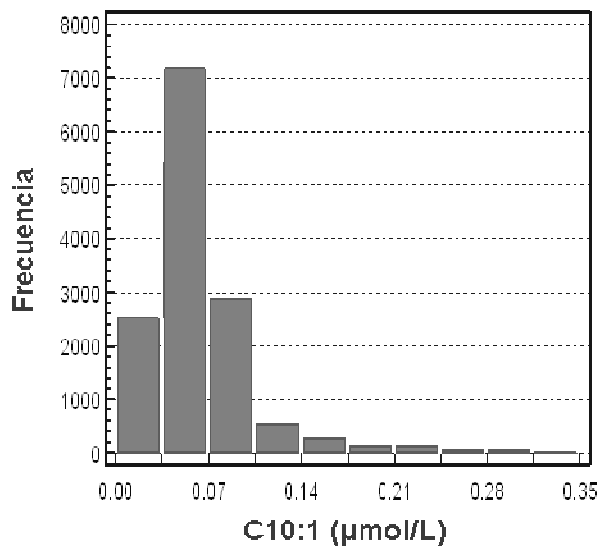
Gráfica 19. Distribución de concentraciones de C10:2.



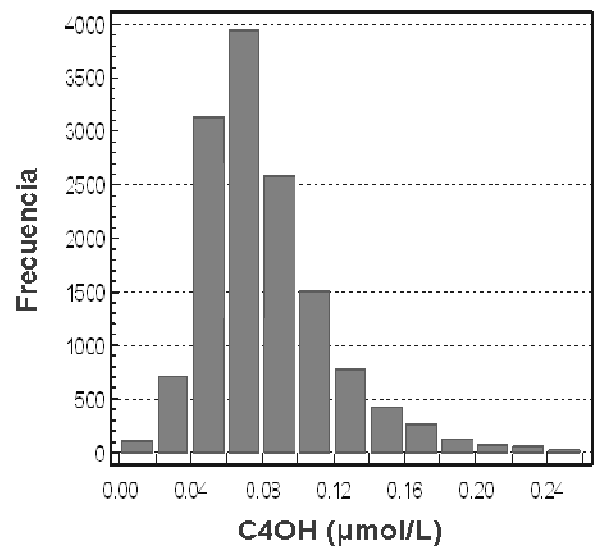
Gráfica 17. Distribución de concentraciones de C10.



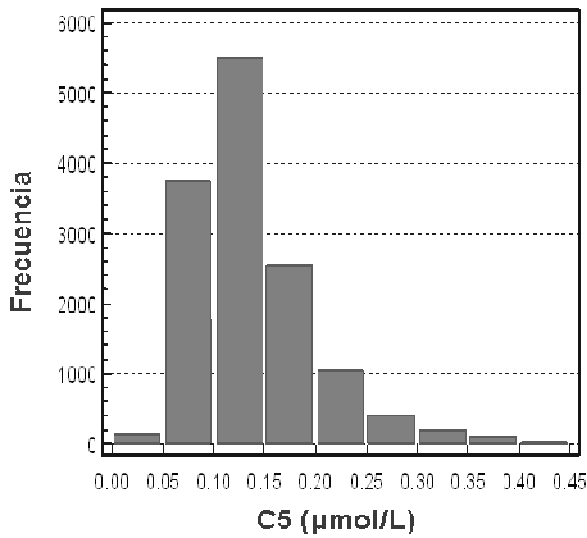
Gráfica 20. Distribución de concentraciones de C4.



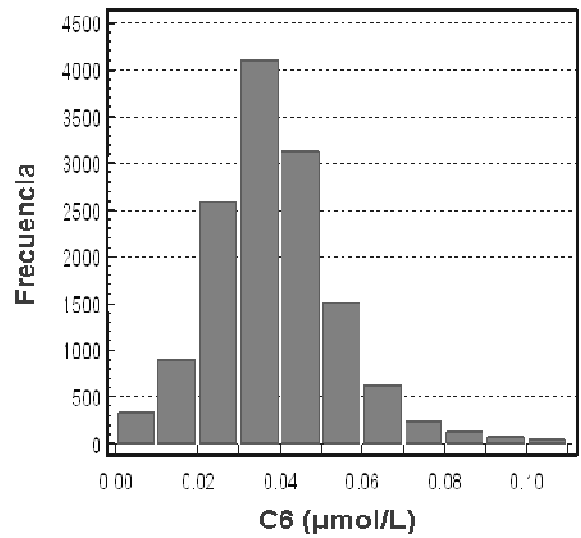
Gráfica 18. Distribución de concentraciones de C10:1.



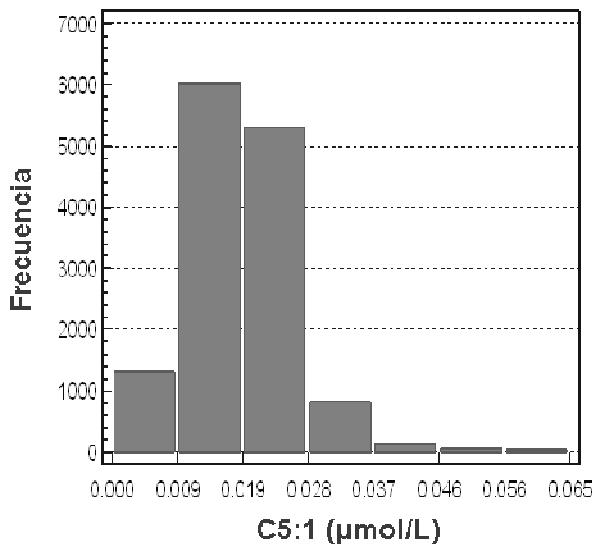
Gráfica 21. Distribución de concentraciones de C4OH.



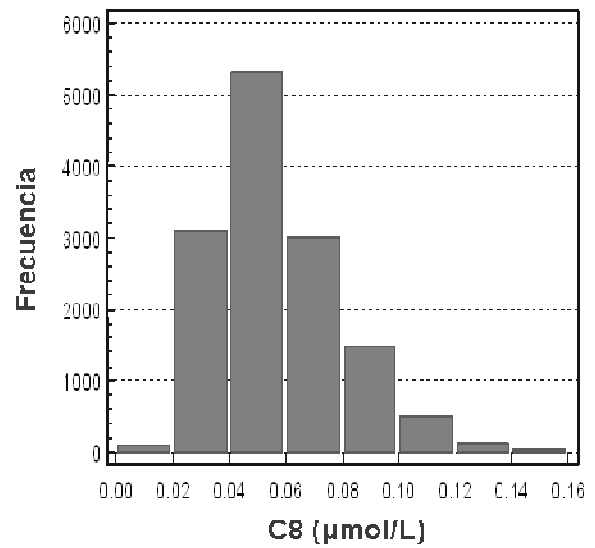
Gráfica 22. Distribución de concentraciones de C5.



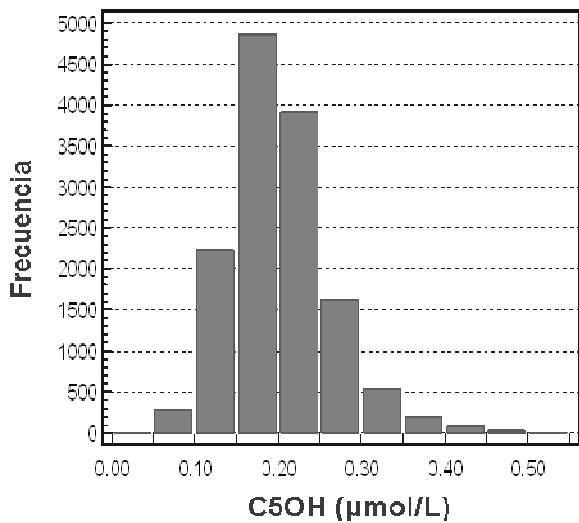
Gráfica 25. Distribución de concentraciones de C6.



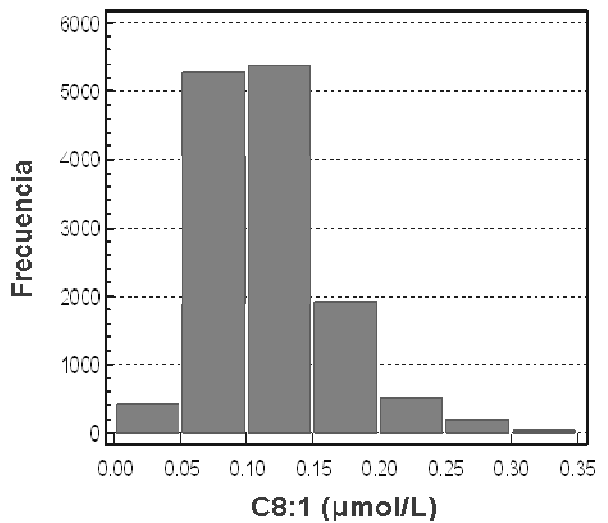
Gráfica 23. Distribución de concentraciones de C5:1.



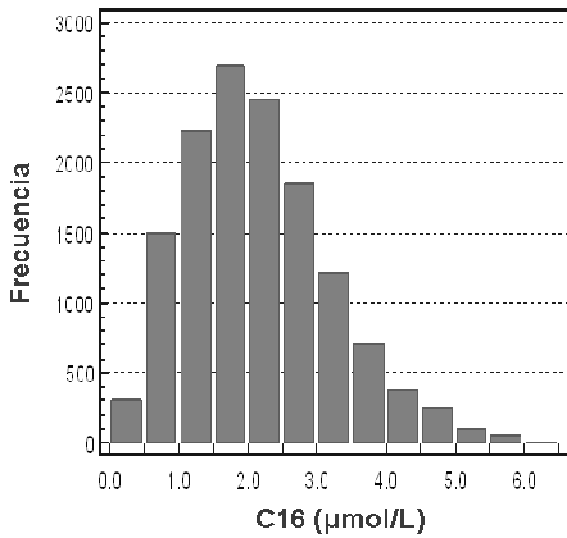
Gráfica 26. Distribución de concentraciones de C8.



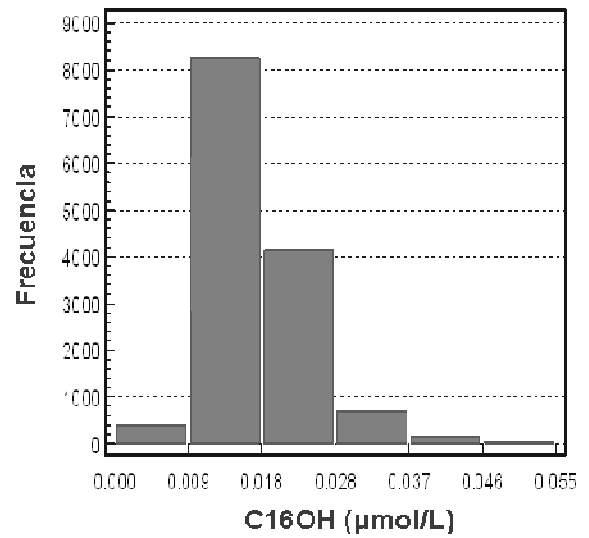
Gráfica 24. Distribución de concentraciones de C5OH.



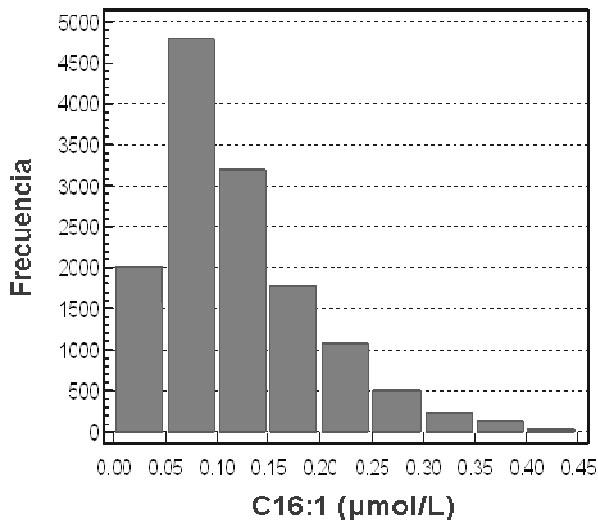
Gráfica 27. Distribución de concentraciones de C8:1.



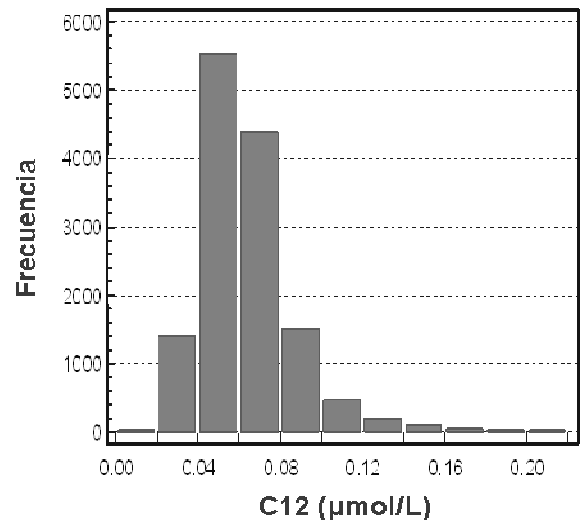
Gráfica 28. Distribución de concentraciones de C16.



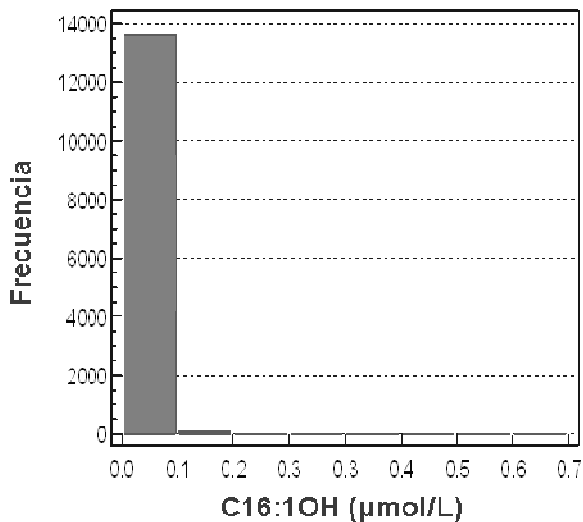
Gráfica 31. Distribución de concentraciones de C16OH.



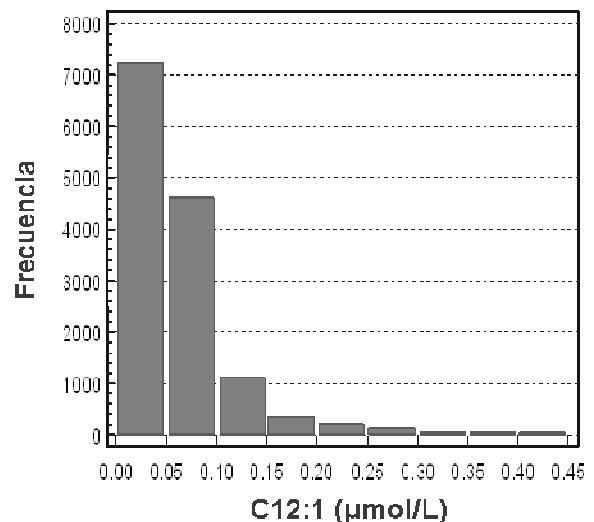
Gráfica 29. Distribución de concentraciones de C16:1.



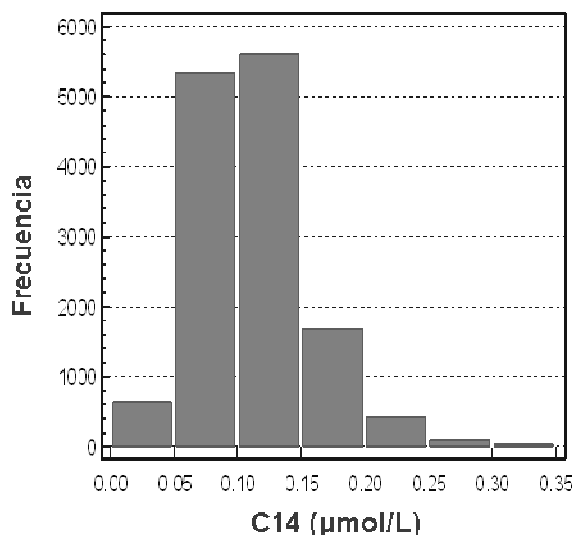
Gráfica 32. Distribución de concentraciones de C12.



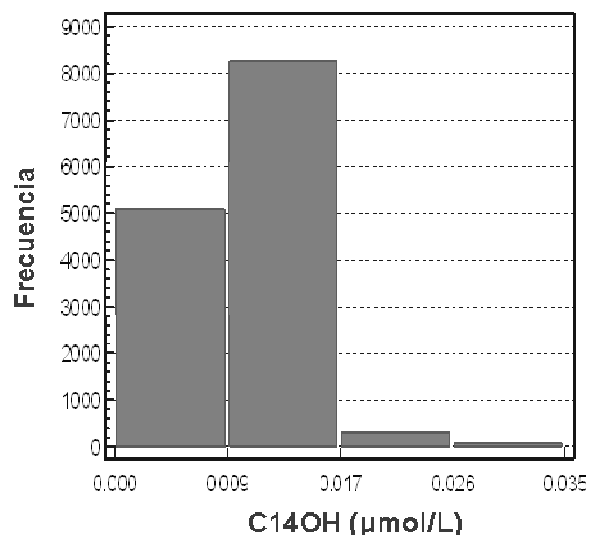
Gráfica 30. Distribución de concentraciones de C16:1OH.



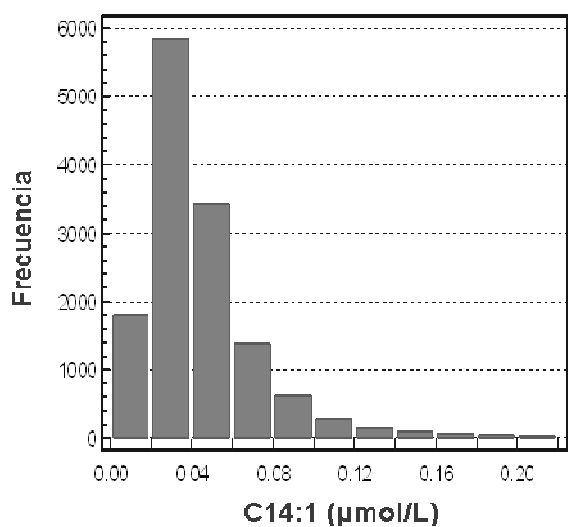
Gráfica 33. Distribución de concentraciones de C12:1.



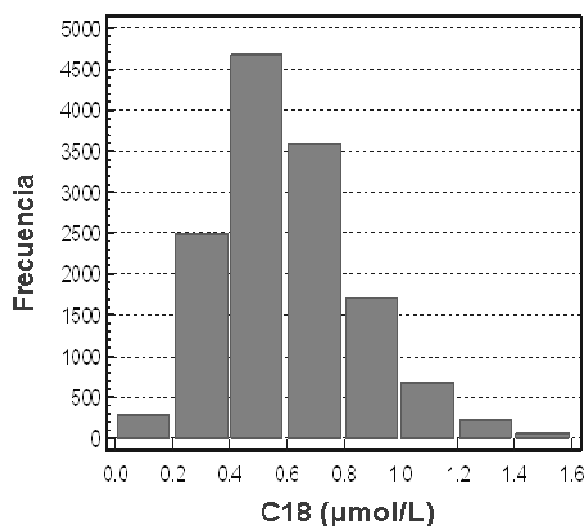
Gráfica 34. Distribución de concentraciones de C14.



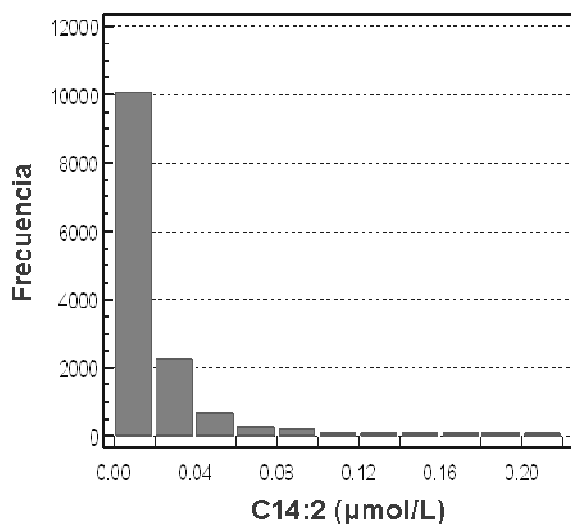
Gráfica 37. Distribución de concentraciones de C14OH.



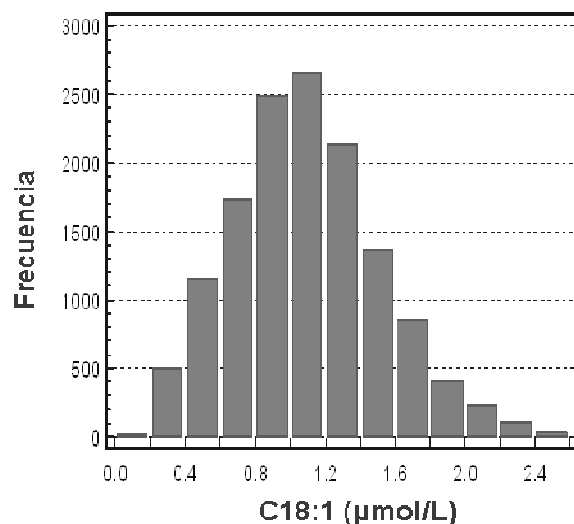
Gráfica 35. Distribución de concentraciones de C14:1.



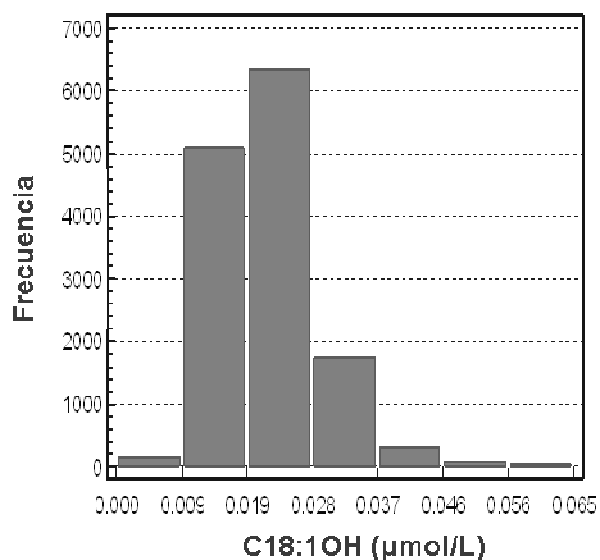
Gráfica 38. Distribución de concentraciones de C18.



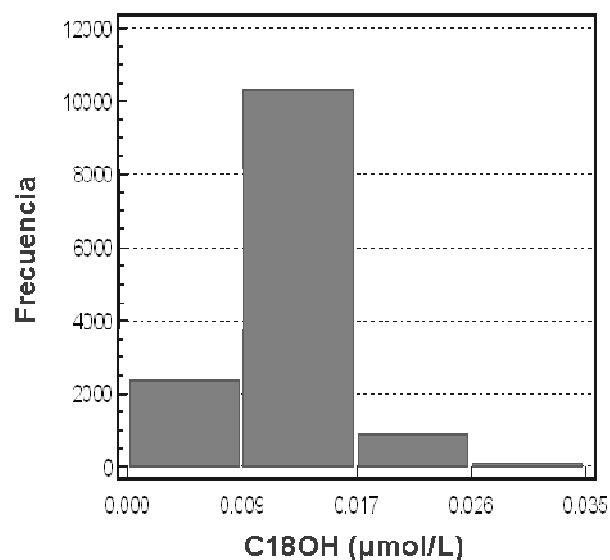
Gráfica 36. Distribución de concentraciones de C14:2.



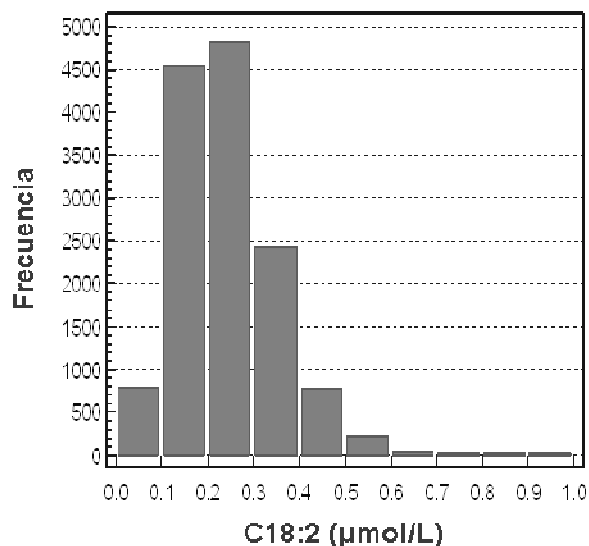
Gráfica 39. Distribución de concentraciones de C18:1.



Gráfica 40. Distribución de concentraciones de C18:1OH.



Gráfica 42. Distribución de concentraciones de C18OH.



Gráfica 41. Distribución de concentraciones de C18:2.

Se compararon los valores obtenidos de la población estudiada con los valores de corte establecidos por otros autores (Tabla 4).

Algunas muestras en esta cohorte presentaron valores de algún metabolito muy por arriba del valor de corte propuesto (Tabla 5).

Tabla 4. Comparación de los valores obtenidos con valores de corte establecidos por otros autores.

Metabolito	Percentil 97.5 ^a	Valores de corte reportados					
		Colombia ¹⁵	Monterrey, Mex. ³⁸	Corea del Sur ⁴⁰	Carolina del Norte, EUA ³⁹	Alemania ³⁶	EUA ⁵²
AMINOÁCIDOS:							
Fenilalanina	83	-	120	164	157	150	130
Valina	193	-	-	438	301	390	200
Ileu/Leu	229	-	450	402	-	490	300
Glicina	513	-	1020	752	-	2000	700
Metionina	30	-	133	87	106	65	60
Citrulina	32	-	44	75	76	65	55
Tirosina	205	-	309	358	500	200	150
Arginina	45	-	-	37	-	-	50
Ornitina	221	-	-	182	-	-	221
ACILCARNITINAS:							
C0	39.7	-	93.5	64.8	13	10	60.0
C2	33.2	16	35	-	2	5	-
C3	3.34	2.6	8	7.2	4.82	6.8	5.25
C3DC	1.14	-	-	-	-	-	0.35
C4DC	2.57	-	-	-	-	-	-
C5DC	0.40	ND	-	0.22	-	-	0.15
C6DC	0.28	-	-	-	-	-	0.10
C10	0.12	0.4	-	0.57	-	0.48	0.30
C10:1	0.16	-	-	0.23	-	0.28	0.30
C10:2	0.03	-	-	-	-	-	-
C4	0.40	0.4	1.4	1.47	2.15	2	1.40
C4OH	0.17	-	-	-	-	-	0.75
C5	0.29	0.3	1.19	1.2	1.16	2	0.50
C5:1	0.03	-	-	0.38	0.39	-	0.25

Tabla 4. Continuación...

Metabolito	Percentil 97.5 ^a	Valores de corte reportados					
		Colombia ¹⁵	Monterrey, Mex. ³⁸	Corea del Sur ⁴⁰	Carolina del Norte, EUA ³⁹	Alemania ³⁶	EUA ⁵²
ACILCARNITINAS:							
C5OH	0.33	-	0.8	0.38	1.37	1	0.60
C6	0.07	0.1	-	0.56	-	0.21	0.25
C8	0.11	0.1	0.4	0.52	-	0.32	0.35
C8:1	0.23	-	-	-	-	-	-
C16	4.57	2	-	8.47	-	-	7.00
C16:1	0.30	0.1	-	0.18	-	-	-
C16:1OH	0.07	-	-	0.12	-	0.22	0.10
C16OH	0.03	0.01	-	0.08	-	0.20	0.10
C12	0.12	0.5	-	0.32	-	-	0.80
C12:1	0.21	-	-	-	-	-	0.80
C14	0.21	0.5	-	1.05	-	0.76	0.70
C14:1	0.12	0.4	-	0.21	-	0.43	0.50
C14:2	0.08	-	-	0.13	-	-	0.15
C14OH	0.02	0.02	-	-	-	0.12	-
C18	1.17	1.8	-	0.66	-	-	2.00
C18:1	2.01	2.2	-	2.1	-	-	3.00
C18:1OH	0.04	0.01	-	0.07	-	0.12	0.07
C18:2	0.49	1.0	-	-	-	-	0.60
C18OH	0.02	0.01	-	0.05	-	0.11	0.07

^a Percentil 97.5. Valor de corte propuesto para la población estudiada.

Tabla 5. Muestras de neonatos que presentaron elevación de metabolitos característicos de EIM.

Muestra	Metabolito	Valor obtenido	Valor de corte. ^a	Interpretación	Prueba confirmatoria
1	Citrulina	1272.6	31.5	Pb. Cit / ASA	Cuantificación de aminoácidos plasmáticos
2	Tirosina	1309.4	205.4	Pb. Tirosinemia	Cuantificación de aminoácidos plasmáticos y ácidos orgánicos urinarios
3	C5-OH	5.84	0.33	Pb 3MCC/BKT/HMG/MCD	Determinación de ácidos orgánicos urinarios

Cit: Citrulinemia ^{16, 24, 30, 32, 34, 36, 37, 38, 39}

ASA: Acidemia Argininosuccínica ^{35, 36, 37}

3MCC: Deficiencia de 3-metilcrotonil-CoA Carboxilasa. ^{16, 24, 30, 32, 34, 36, 37, 38, 39}

BKT: Deficiencia de β cetotilasa ^{16, 30, 32, 34, 35, 37, 39,}

HMG: Deficiencia de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA liasa ^{16, 24, 30, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41}

MCD: Deficiencia multiple de carboxilasas. ^{16, 30, 35, 36, 37, 40}

^a Percentil 97.5. Valor de corte propuesto para la población estudiada.

6. DISCUSIÓN.

Los recientes avances en tecnología han revolucionado la manera en que se visualizan y estudian los sistemas biológicos. La espectrometría de masas (MS) ha permitido el análisis de proteínas celulares y metabolitos (proteoma y metaboloma respectivamente) en una escala inimaginable.²⁵ siendo uno de sus principales objetivos, identificar cambios sutiles en los perfiles entre sistemas biológicos en diferentes estados fisiológicos o patológicos.²⁷

Los componentes del metaboloma pueden ser comprendidos como los productos finales de la expresión genética y definen el fenotipo bioquímico de una célula o tejido u organismo. La cuantificación de estos metabolitos proporciona un amplio panorama del estatus bioquímico, el cual puede ser utilizado para monitorear y establecer la función de un gen.²⁵

Los valores de los metabolitos analizados (aminoácidos y acilcarnitinas) no presentan una distribución normal y tienen una tendencia a concentrarse en los valores menores, como se puede observar en las gráficas de distribución

Para la interpretación de los resultados se requiere determinar los valores de corte para cada analito, algunas veces se utilizan valores determinados en estudios previos, sin embargo este valor depende del tipo de población estudiada (i.e. cronicidad o tamiz) y de la metodología empleada. Los puntos de corte son útiles para convertir una variable

cuantitativa en cualitativa, son usados para clasificar pacientes en dos grupos, por ejemplo, normal o anormal⁵³.

Debido a que no existe un valor de corte universal para los aminoácidos y acilcarnitinas cuantificados por MS/MS cada laboratorio, en diferentes países realiza sus estudios para obtener los valores de corte característicos de su población. En la Tabla 2 se encuentra la comparación de los resultados obtenidos con los valores de corte publicados por otros autores. Para la población estudiada se propuso como valor de corte, el percentil 97.5, existen diversos parámetros estadísticos empleados por los diferentes autores; las variaciones entre estos demuestran que existe variabilidad entre cada población, la cual se puede deber a que existe heterogeneidad genética por lo tanto se propone que se deben realizar mas estudios al respecto.

En la Tabla 3 se presentan los resultados de 3 recién nacidos, que tienen valores de ciertos metabolitos muy por encima del valor de corte propuesto. El o los metabolitos elevados sugieren la presencia de un bloqueo metabólico específico, a estos indicadores se les denomina marcadores primarios³⁸, los cuales orientan hacia algún EIM, se procede a realizar pruebas confirmatorias. Una gran ventaja de esta metodología es que al obtener un perfil metabólico nos da mayor información de la vía involucrada, podemos utilizar diferentes cocientes denominados segundos marcadores, por ejemplo, en el caso de la fenilcetonuria, la enzima deficiente es la fenilalanina hidroxilasa la cual transforma la fenilalanina en tirosina, en el caso de deficiencia de esta enzima, tenemos elevación de fenilalanina, disminución de tirosina y elevación muy marcada del cociente fen/tir. Esto nos permite diferenciar los casos verdaderos de fenilcetonuria de aquellos que solo presentan elevación de fenilalanina secundaria a sobre ingesta de proteínas.⁵⁴

A pesar de que la MS/MS es una herramienta muy eficiente y útil en el tamiz del recién nacido para la detección de EIM, no es una técnica diagnóstica, si se obtiene un resultado anormal, este se debe de repetir, si el resultado sigue siendo anormal, se deben realizar pruebas confirmatorias por métodos enzimáticos o cromatográficos como la cuantificación de aminoácidos plasmáticos por CLAR, así como la determinación de ácidos orgánicos por CGEM.^{9, 16, 38, 55}

En el caso del recién nacido con elevación de citrulina tenemos que realizar el diagnóstico diferencial ya que existen dos enfermedades que presentan citrulina elevada, estas son citrulinemia y acidemia argininosuccínica, ambas defectos del ciclo de la urea. La prueba confirmatoria consiste en determinar el perfil de aminoácidos plasmáticos, la primera presenta marcada elevación de citrulina y en la segunda se tiene presencia de ácido argininosuccínico, el cual es patognomónico de la enfermedad, con niveles discretamente elevados de citrulina. Estos EIM se caracterizan por provocar hiperamonemia y daño neurológico grave si no son detectados y tratados oportunamente.^{30, 32, 38}. El análisis de aminoácidos plasmáticos del paciente mostró una marcada elevación de citrulina, este perfil de aminoácidos fue compatible con Citrulinemia, el tratamiento nutricional fue instaurado inmediatamente después del diagnóstico, actualmente el paciente tiene un desarrollo neurológico de acuerdo a la edad y no ha presentado ninguna crisis de hiperamonemia.

El segundo caso es un recién nacido que presentaba una importante elevación en la concentración de tirosina.^{30, 32} Las causas de hipertirosinemia son defectos del metabolismo de tirosina (Tirosinemia I, II y III), tirosinemia transitoria del recién nacido (inmadurez hepática), disfunción hepatocelular severa, hipertiroidismo y estado postprandial. Los exámenes confirmatorios son la cuantificación de ácidos orgánicos urinarios y aminoácidos plasmáticos. La tirosinemia tipo 1 causa grave daño hepático y excreción de succinilacetona en orina, la tirosinemia tipo dos causa excreción de N-acetiltirosina y la tipo III cursa sin daño hepático con excreción de tirosina y sus derivados. En el caso de la tirosinemia transitoria del recién nacido, esta desaparece a las pocas semanas de vida, lo que ocurrió en este paciente en el mes tres de vida. El estudio confirmatorio, en el perfil de ácidos orgánicos no se encontro succinilacetona ni N-acetiltirosina.

El tercer caso es un recién nacido que presentaba elevación de la acilcarnitina C5-OH, este metabolito se encuentra elevado en 3MCC, BKT, HMG, MCD, todas ellas acidemias orgánicas que tienen un perfil de ácidos orgánicos característico.^{30, 32, 38} Para el análisis de estas enfermedades existen otros marcadores que las pueden diferenciar entre si, para 3MCC y BKT es C5:1 para HMG es C5:1, C6DC y para MCD es C3, C5OH/C8 y C3/C2. La prueba confirmatoria consiste en determinar el perfil de ácidos orgánicos urinarios, la primera presenta excreción de ácido 3-hidroxi-isovalérico y 3-metilcrotonilglicina; en la segunda ácido 2-ceto-3-metilvalérico y ácido 2-metilglutacónico; en la tercera ácido 3-hidroxi-3-metilglutárico, ácido 3-metilglutacónico, ácido 3-hidroxi-isovalérico y 3-metilcrotonilglicina; en la cuarta 3-hidroxi-isovalérico, ácido metilcítrico, 3-metilcrotonilglicina y tiglilglicina.⁵⁶

Estos EIM se caracterizan por presentar vómito, letargía, hipotonía, hipoglucemia, cetoacidosis, taquiapnea; pero solo 3MCC puede presentarse de manera asintomático.³²

El objetivo principal de la implementación de esta técnica es que los padecimientos sean diagnosticados desde la etapa neonatal y tratados a tiempo, para evitar que el paciente sufra los daños irreversibles que causan éstas enfermedades como son: retraso mental, discapacidad y muchas veces la muerte, lo que se denomina tamiz neonatal (TN).

La MS/MS es un método altamente sensible y preciso que permite realizar el análisis multicomponente de fluidos biológicos como sangre completa, suero, orina y líquido cefalorraquídeo, teniendo como resultado un perfil metabólico que es mucho más informativo que la medición de un solo analito, lo que permite detectar varias enfermedades en un solo paso, teniendo la enorme ventaja de que dicho perfil se obtiene en un tiempo muy breve (aproximadamente 3 minutos para 44 analitos).^{30, 57, 58}

Esta técnica se comenzó a utilizar en la década de los 90's, para ampliar el número de EIM que se detectan a través del TN, que en conjunto con otras técnicas se denominó posteriormente Tamiz Neonatal Ampliado (TNA), considerado como el estándar de oro para la detección oportuna, con el cual se pueden detectar más de 20 enfermedades producidas por la alteración del metabolismo de aminoácidos, ácidos orgánicos y defectos de β -oxidación de los ácidos grasos, a partir del análisis de una gota de sangre

impregnada en papel filtro, convirtiéndose en una poderosa herramienta en el diagnóstico de EIM.^{8, 24, 37, 59, 60}

Esto ha llevado a que los EIM, especialmente en los países desarrollados, cuenten con sistemas y modelos integrados de atención que incluyen desde la consejería preconcepcional, el diagnóstico prenatal y el tamiz neonatal, hasta la monitorización del tratamiento y la vigilancia del desarrollo de los niños afectados⁶¹

Desafortunadamente en países en vías de desarrollo como México, el TN por MS/MS no se realiza de manera obligatoria para todas estas enfermedades y muchos de los pacientes son diagnosticados cuando ya presentan secuelas irreversibles.

7. CONCLUSIONES.

Se determinaron los valores de la concentración de los aminoácidos y acilcarnitinas obtenidos, en muestras de sangre de recién nacido depositadas en papel filtro por MS/MS.

Los analitos estudiados no presentan una distribución normal.

Dentro de la muestra estudiada, encontramos 3 casos sospechosos, a los cuales se les realizaron los correspondientes estudios confirmatorios, teniendo una incidencia de 1:4590

Este trabajo confirma la necesidad de hacer extensivo este tipo de programas a todos los recién nacidos mexicanos.

8. REFERENCIAS.

1. Nelson D, Cox. Lehninger. Principios de Bioquímica. Omega, 3ª edición, Barcelona, España, 2000, pp 115-118, 598-618, 623-656.
2. Osorio J, Pourfarzam M. Carnitina libre y total en sangre de cordón umbilical. Rev. Colomb Obstet Ginec 2002; 53:335-40.
3. Farias G. Química Clínica. El Manual Moderno, 9ª edición, México DF, 1988, pp 144-152 y 406-452.
4. Ibarra Gl. Extracción y cuantificación por cromatografía de líquidos de aminoácidos en muestras de sangre total colectada en papel filtro. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, 1995.
5. Vela M, Ibarra I, Velázquez A. Guía para el diagnóstico de errores innatos del metabolismo. En: Programa de Actualización en Pediatría (Ed.), Intersistemas, edición actualizada, Ciudad de México, 2005, pp 1087-1179.
6. Ibarra I. Estudio de la excreción urinaria de ácidos orgánicos en niños con desnutrición energético-proteínica. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM, 1998.
7. Jiménez-Sánchez G, Childs B, Valle D. The effect of mendelian disease on human health. En: The metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease. Scriver CR, Beaudet AL, Valle D (Eds.) McGraw-Hill Inc., 8ª Edición, New Cork, EUA, 2001, pp 167-174.
8. Fernández LC. Elevada mortalidad y discapacidad en niños mexicanos con enfermedad de orina con olor a jarabe de arce (EOJA). Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, 2008.

9. Vela M, Cicerón I, Pérez M, Ortiz J, Ibarra I, Olivares Z, Morales R. Interpretación del tamiz metabólico. Generalidades (I de IV partes). *Acta Pediátr Mex* 2001;22:432–440.
10. Ellaway C, Wilcken B, Christodoulou J. Clinical approach to inborn errors of metabolism presenting in the newborn period. *J Paediatr Child Health* 2002;38:511-7.
11. Applegarth D, Toone J, Lowry R. Incidence of inborn errors of metabolism in British Columbia, 1969-1996. *Pediatrics* 2000;105:e10.
12. Hoffmann G, von Kries R, Klose D, Lindner M, Schulze A, Muntau A, Röschinger W, Liebl B, Mayatepek E, Roscher A. Frequencies of inherited organic acidurias and disorders of mitochondrial fatty acid transport and oxidation in Germany. *Eur J Pediatr* 2004;163: 76-80.
13. Velázquez A, Vela M, Naylor E, Chace D, Resultados del tamiz neonatal ampliado, como nueva estrategia para la prevención de los defectos al nacimiento. *Rev Mex Pediatr* 2000; 67: 206-13.
14. Enns GM, MB, ChB, Pckman S. Diagnosing inborn errors of metabolism in the newborn: Laboratory Investigations. *Neo Reviews* 2001; 8:c192-c199.
15. Osorio J, Pourfarzam M. 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. *An Pediatr* 2007; 67:548-52.
16. Chace D, Kalas T, Naylor E. Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns. *Clin Chem* 2003; 49:1797-817.

17. Wajner M, Barschak A, Luft A, Pires R, Grillo E, Lohr A. Organic aciduria: diagnosis in high risk Brazilian patients, *J Pediatr* 2001; 77: 401-6.
18. Artuch R, Moreno J, Puig R, Quintana M, Montero R, Ormazábal A, Vilaseca M. El laboratorio en el diagnóstico de las enfermedades raras *An Sist Sanit Navar* 2008; 31: 91-103.
19. Saudubray J, Sedel F, Walter J. Clinical approach to treatable inborn metabolic diseases: An introduction. *J Inherit Metab Dis* 2006; 29: 261-274.
20. Garrod A. Inborn errors of metabolism (Croonian Lectures). *Lancet* 1908; 2: 1-7, 73-78, 142-148, 214-220.
21. Jones P, Bennett M. The changing face of newborn screening: diagnosis of inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 2002; 324: 121-128.
22. Pasquali M, Monsen G, Richardson L, Alston M, Longo N. Biochemical findings in common inborn errors of metabolism. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2006; 15:64-76.
23. Arn P. Newborn screening: current status. *Health Aff (Millwood)* 2007; 26: 559-66.
24. Martínez L, Torres M, Ruiz C, González R, Villarreal J. El tamiz neonatal. Detección oportuna de los errores innatos del metabolismo. *Medicina Universitaria* 2003; 5: 25-29.
25. Sumer LW, Mendes P, Dixon RA. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry* 2003; 62: 817-36.
26. Dunn WB, Bailey N, Johnson HE. Measuring the metabolome: current analytical technologies. *Analyst* 2005; 130: 606-25.

27. Pasikanti KK, Ho PC, Chan ECY. Gas chromatography/mass spectrometry in metabolic profiling of biological fluids. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008; 871: 202-11.
28. Chace DH. Mass spectrometry in the clinical laboratory. *Chem Rev* 2001; 101: 445-77.
29. Morris RG. LC Mass Spectrometry. *Clin Biochem* 2005; 38: 295.
30. Garg U, Dasouki M. Expanded newborn screening of inherited metabolic disorders by tandem mass spectrometry: clinical and laboratory aspects. *Clin Biochem.* 2006; 39:315-32.
31. Neufeldt V, Guralnik DB. Webster's new world college dictionary. 3rd ed. New York: Macmillan; 1997.
32. Marsden D, Larson C, Levy H. Newborn screening for metabolic disorders. *J Pediatr* 2006; 148:577-584.
33. Baumgartner C, Baumgartner D. Biomarker discovery, disease classification, and similarity query processing on high-throughput MS/MS data of inborn errors of metabolism. *J Biomol Screen* 2006 ;11: 90-9.
34. CDC, US Department of health and human services. Using tandem mass spectrometry for metabolic disease screening among newborns. *MMWR* 2001; 50(RR-3). Disponible en: www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5003a1.htm#top. Consultada feb 22, 2009.
35. Rashed M, Bucknall M, Little D, Awad A, Jacob M, Alamoudi M, Alwattar M, Ozand P. 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: 1129-41.

36. Schulze A, Lindner M, Kohlmüller D, Olgemöller K, Mayatepek E, Hoffmann G. Expanded newborn screening for inborn errors of metabolism by electrospray ionization-tandem mass spectrometry: results, outcome, and implications. Pediatrics 2003; 111:1399-406.
37. Zytkovicz T, Fitzgerald E, Marsden D, Larson C, Shih V, Johnson D, Strauss A, Comeau A, Eaton R, Grady G. 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; 47:1945-55.
38. Torres M, Martínez L, Esmer C, González R, Ruiz C, Sánchez A, Mendoza J, Villarreal J. Tamiz metabólico neonatal por espectrometría de masas en tándem: dos años de experiencia en Nuevo León, México. Salud Pública Mex 2008; 50:200-6.
39. Frazier D, Millington D, McCandless S, Koeberl D, Weavil S, Chaing S, Muenzer J. The tandem mass spectrometry newborn screening experience in North Carolina: 1997-2005. J Inherit Metab Dis 2006; 29:76-85.
40. Yoon HR, Lee K, Kang S, Lee D, Yoo H, Min W, Cho D, Shin S, Kim J, Song J, Yoon HJ, Seo S, Hahn S. Screening of newborns and high-risk group of children for inborn metabolic disorders using tandem mass spectrometry in South Korea: a three-year report. Clin Chim Acta 2005; 354:167-80.

41. Shekhawat P, Matern D, Strauss A. Fetal fatty acid oxidation disorders, their effect on maternal health and neonatal outcome: impact of expanded newborn screening on their diagnosis and management. *Pediatr Res* 2005; 57:78R-86R.
42. Chace DH, Kalas TA. A biochemical perspective on the use of tandem mass spectrometry for newborn screening and clinical testing. *Clin Chem* 2005; 38: 296-309.
43. Matern D, Magera MJ. Mass spectrometry methods for metabolic and health assessment. *J Nutr* 2001; 131: 1615-20.
44. Erra-Balsells R. Del vuelo de las proteínas y como lograrlo (espectrometría de masa UV-MALDI) *Qviva* 2004; 3: 56-69.
45. Mullen, S. Ionization Methods in mass spectrometry at the SCS mass spectrometry laboratory. Mass Spectrometry Center, School of Chemical Sciences, University of Illinois at Urbana-Champaign. Disponible en: www.scs.uiuc.edu/~msweb/SLM530.pdf. Consultada nov 10, 2008.
46. Chace DH, Kalas TA, Naylor EW. The application of tandem mass spectrometry to neonatal screening for inherited disorders of intermediary metabolism. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2002; 3: 17-45.
47. Spitzer A, Chace DH. Proteomics-and metabolimcs-based neonatal diagnostics in assessing and managing the critically ill neonate. *Clin perinatol* 2008; 35: 695-716.
48. Griffiths WJ, Johnson AP, Liu S, Rai DK, Wang Y. Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry. *Biochem J* 2001; 355: 545-61.

49. Middle Atlantic Mass Spectrometry Laboratory. Johns Hopkins University. Disponible en: <http://www.hopkinsmedicine.org/mams/>. Consultado: 15 de mayo de 2009.
50. Chace DH, Sparkman D. What is mass spectrometry? The importance of communicating de concept of mass spectrometry to professionals, media and the consumer. En: American Society for Mass Spectrometry. Disponible en: <http://www.asms.org/portals/0/WhatIsMSPoster.pdf>. Consultado: 2 de abril de 2009.
51. Chace D, Sparkman D. What is Mass Spectrometry? American Society for Mass Spectrometry. Disponible en: www.asms.org/ Consultada oct 6, 2008.
52. Región 4. Laboratory Quality Improvement Project. Disponible en: www.region4genetics.org/cluster1_information.aspx. Consultada oct 17, 2008
53. Björk J, Grubb A, Nyman U. Variability in diagnostic accuracy can be estimated using simple population weighting. *J Clin Epidemiol*. 2009 Jan; 62(1):54-7
54. la Marca G, Malvagia S, Casetta B, Pasquini E, Donati MA, Zammarchi E. Progress in expanded newborn screening for metabolic conditions by LC-MS/MS in Tuscany: Update on methods to reduce false tests. *J Inherit Metab Dis*. 2008
55. Velazquez A, Vela M, Ciceron I, Ibarra I, Perez M, Olivares Z, Jimenez G. Diagnosis of inborn errors of metabolism. *Arch Med Res* 2000;31: 145-50.
56. Kumps A, Duez Pierre, Mardens Y. Metabolic, nutritional, iatrogenic and artifactual sources of urinary organic acids: a comprehensive table. *Clin Chem* 2002; 48: 708-717.

57. Rinaldo P, Tortorelli S, Matern D. Recent developments and new applications of tandem mass spectrometry in newborn screening. *Curr Opin Pediatr* 2004; 16: 427-33.
58. Wilcken B, Wiley V, Hammond J, Carpenter K. Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. *N Engl J Med* 2003; 348:2304-12.
59. Shigematsu Y, Hirano S, Hata I, Tanaka Y, Sudo M, Tajima T, Sakura N, Yamaguchi S, Takayanagi M. Selective screening for fatty acid oxidation disorders by tandem mass spectrometry: difficulties in practical discrimination. *J Chromatogr B* 2003 15; 792: 63-72.
60. Kobayashi H, Hasegawa Y, Endo M, Purevsuren J, Yamaguchi S. ESI-MS/MS study of acylcarnitine profiles in urine from patients with organic acidemias and fatty acid oxidation disorders. *J Chromatogr B* 2007;855:80-7.
61. Pass K, Lane P, Fernhoff P, Hinton C, Panny S, Parks J, Pelias M, Rhead W, Ross S, Wethers D, Elsas L. 2nd. US newborn screening system guidelines II: follow-up of children, diagnosis, management, and evaluation. Statement of the Council of Regional Networks for Genetic Services (CORN). *J Pediatr* 2000; 137:S1-46.