

EFFECTO DE VARIABLES BIOLÓGICAS EN PERFILES DE AMINOÁCIDOS Y ACILCARNITINAS DE NEONATOS SANOS DE CALI

Indira Teresa Arroyo Payán

Universidad del Valle, Apartado Aéreo 25360, Cali, Colombia.

correo electrónico: indira.arroyo@correounivalle.edu.co

Myriam Arévalo Ramírez

Universidad del Valle, Apartado Aéreo 25360, Cali, Colombia.

correo electrónico: marevalo@inmuno.org

Carlos Echeverry

Centro Internacional de Vacunas, Cali, Colombia.

correo electrónico: carlos.echeverry@inmuno.org

RESUMEN

Los Errores Innatos del Metabolismo (EIM) son enfermedades de origen genético consideradas como raras debido a su baja prevalencia ($<1:5000$ recién nacidos vivos). El uso del espectrómetro de masas en tándem (MS/MS) para diagnosticar estas enfermedades es común en países desarrollados. Se ha reportado que las concentraciones de algunos marcadores bioquímicos de estas alteraciones, como aminoácidos y acilcarnitinas, varían con cada individuo debido a factores biológicos. Estas variaciones afectan el diagnóstico de algunos EIM con valores de referencia de marcadores cercanos al punto de corte de diagnóstico. Por lo anterior, el presente estudio tuvo como objetivo principal establecer la correlación de los factores de peso, talla, edad y sexo con los perfiles de aminoácidos y acilcarnitinas en 392 neonatos de la población de Cali. Se analizaron mediante pruebas estadísticas las concentraciones de ocho aminoácidos y 16 acilcarnitinas determinadas por MS/MS, calculándose el coeficiente de correlación de Pearson. También se evaluaron diferencias significativas para sexo con t-student y U de Mann-Whitney, y para la edad se realizaron los estadísticos de ANOVA, Kruskal-Wallis, Tukey, Nemenyi y prueba de aleatorización. Se encontró correlación y/o diferencias significativas entre grupos de las variables edad y sexo, contrario a lo hallado para las variables peso y talla. Los analitos mostraron correlación positiva entre ellos, y una correlación negativa entre leucina y acilcarnitinas. Si bien para la mayoría de los EIM los valores de corte de diagnóstico son alejados a los valores de referencia de la población, la edad podría afectar niveles de aminoácidos y acilcarnitinas.

Palabras clave: Aminoácidos, acilcarnitinas, errores innatos del metabolismo, tamizaje neonatal, espectrometría de masas en tándem, neonatos.

ABSTRACT

Inborn Errors of metabolism (EIM) are genetic diseases considered as rare due to their low prevalence ($<1:5000$ live Newborns). The use of the Tandem mass spectrometer (MS/MS)

to diagnose these diseases is common in developed countries. It has been reported that the concentrations of some biochemical markers of these alterations, such as amino acids and acylcarnitine, vary with each individual due to biological factors. These variations affect the diagnosis of some EIM with marker reference values close to the diagnostic cutoff point. Therefore, the main objective of this study was to establish the correlation of weight, size, age and sex factors with the amino acid and acylcarnitine profiles in 392 neonates of the population of Cali. The concentrations of eight amino acids and 16 acylcarnitine determined by MS/MS were analyzed by statistical tests, calculated the Pearson correlation coefficient. Significant differences were also assessed for sex with T-student and U of Mann-Whitney, and for the age the statisticians of ANOVA, Kruskal-Wallis, Tukey, Nemenyi and randomization test were performed. Was found correlation and/or significant differences between groups of the variables age and sex, contrary to what was found for the variables weight and size. The analytes showed positive correlation between them, and a negative correlation between leucine and Acylcarnitine. Although for most EIM the diagnostic cutoff values are removed from the population reference values, age may affect levels of amino acids and acylcarnitine.

Key words: Aminoacids, acylcarnitines, inborn errors of metabolism, neonatal screening, tandem mass spectrometry, neonates.

INTRODUCCIÓN

Los Errores innatos del metabolismo (EIM) son enfermedades producidas por defectos genéticos que conducen a la alteración de proteínas que actúan en las vías metabólicas, acarreando alteraciones bioquímicas (Colombo *et al.* 2003; Cabello & Giugliani, 2015). Estos desequilibrios bioquímicos conducen a un deterioro gradual del paciente, provocando crisis repentinas que generalmente concluyen en retraso psicomotor o incluso la muerte (Ruiz & Santana, 1998). La mayoría de ellos se diagnostican realizando pruebas metabólicas, que incluyen gases en sangre, glucosa, lactato, amoníaco, aminoácidos plasmáticos, ácidos orgánicos urinarios y un perfil de acilcarnitinas (Zschoche, 2010).

Los EIM considerados individualmente son raros, pero colectivamente tienen una incidencia general de más 1:1000 (El-Hattab, 2015). Actualmente, se han descrito más de 500 enfermedades metabólicas, de las cuales aproximadamente el 25 % son manifestadas en el periodo neonatal (El-Hattab, 2015). Geográficamente las frecuencias de los EIM varían de acuerdo a la región y

a las poblaciones, esto va ligado a la diversidad genética de los individuos y a la complejidad de su extensión territorial (Vela *et al.* 2009). En Colombia aún no se conocen los parámetros epidemiológicos para estas enfermedades, sin embargo se reporta aproximadamente un 62 % de muertes en la población infantil durante el primer año de vida y el 30 % de estas comparten cuadros clínicos semejantes a los que presentan los EIM (Ministerio de Salud y Protección Social, 2014).

Debido a las graves consecuencias de estas enfermedades es necesaria su detección temprana e inicio de tratamientos oportunos y adecuados. En países desarrollados se iniciaron los programas de Tamizaje Neonatal Ampliado (TNA), los cuales permiten identificar en el neonato un gran número de EIM antes que se manifiesten clínicamente (Ruiz & Santana, 1998; Campos, 2010). El TNA usa como herramienta principal la espectrometría de masas en tándem (MS/MS); esta técnica diagnóstica fue implementada por Millington en la década de los 80, el procedimiento permite la separación, identificación y cuantificación de moléculas ionizadas mediante el análisis de sus relaciones masa/carga (González, 2010; Millington, 1989; Millington, 1990). En América Latina, países como Chile, Costa Rica, Cuba, Brasil, Costa Rica y México se encuentran desarrollando distintos programas de tamizaje neonatal (Campos, 2010).

En Colombia, en el departamento del Valle del Cauca, el Centro Internacional de Vacunas (CIV) ha implementado y validado el método de espectrometría MS/MS, por medio del cual se establecieron los valores de concentración de aminoácidos (AA), acilcarnitinas (AC) y succinilacetona (SUAC) en niños sanos de las ciudades de Cali y Quibdó; para este fin se usaron 57 analitos (19 AA, 37 AC y SUAC). El establecer los valores normales de estas poblaciones, permite que se usen como referencia para el diagnóstico de EIM. En este estudio también se encontró que la edad tiene un efecto en los niveles de los analitos (Arévalo *et al.*

2015). En estudios similares se ha reportado que estos analitos son afectados por factores biológicos inherentes a cada individuo, factores como, sexo, raza, edad, ritmos biológicos, grupo sanguíneo, masa corporal, embarazo, hábitat, alimentación, hormonas, entre otros (Arderiu *et al.* 1998; Borum, 1978; Marrero *et al.* 2004; Ruoppolo *et al.* 2015).

Si bien, la influencia de los factores biológicos en las concentraciones de los AA y las AC ha sido anteriormente estudiada, en Colombia no se han realizado este tipo de estudios, por lo que es importante establecer si son variables que afectan de manera significativa los valores de referencia, ya que cada población cuenta con una carga genética y un contexto socioeconómico, educativo y cultural distinto. Tal es el caso de la variación leve que se encuentra en hombres de la India y hombres occidentales para valores de carnitina plasmática, ocasionados por variación en hábitos alimenticios, es decir una población con una dieta alta en grasas y baja en carbohidratos tendrá niveles de AC mas altos que una población con una dieta baja en grasa y alta en carbohidratos (Khan-Siddiqui & Bamji, 1980; Krajcovicova-Kudlackova *et al.* 2000; Rebbeck & Sankar, 2005).

Es importante conocer si las concentraciones de los AA y las AC en neonatos de Colombia son afectadas por factores biológicos para así establecer adecuadamente los valores de referencia en la población y evitar diagnósticos errados, ya que para algunas enfermedades metabólicas los valores de corte de diagnóstico son cercanos a estos valores de referencia, por ejemplo en la deficiencia de la holocarboxilasa o la del cofactor de la biotina, elevaciones menores de propionilcarnitina y/o 3-hidroxivalerilcarnitina podrían ser consistentes con estas patologías, y no se sabe si la concentración de estos analitos guardan correlación con factores biológicos inherentes a los individuos (Cavedon *et al.* 2005; Millington, 2003). Por lo anterior el objetivo principal de este estudio es determinar la correlación de las variables peso, talla, edad y sexo con los perfiles de aminoácidos y AC en sangre de neonatos de la ciudad de Cali.

MÉTODOS

Población de estudio y consentimiento informado

Este es un estudio observacional descriptivo de tipo transversal, la población de estudio cuenta con un total de 392 neonatos nacidos entre los años 2012 y 2013, con una edad entre 4 y 18 días de nacidos, 51 % son niños y 49 % son niñas. Las muestras de sangre de los neonatos incluidos en el estudio fueron tomadas en la clínica Versalles de la ciudad de Cali, para esto, el grupo investigador del CIV visitó a las madres al final del control prenatal. Al momento de la toma de las muestras, se les explicó el estudio y se diligenció el consentimiento informado con las respectivas madres. El consentimiento informado firmado por las madres de los niños que participaron en el estudio incluye información sobre el estudio y garantías de privacidad para los datos recolectados de los neonatos. Este estudio se realizó siguiendo las Directrices para Buenas Prácticas Clínicas de la ICH E-6 y el protocolo de investigación fue aprobado por el comité de ética institucional de la Clínica Versalles (acta CV-PI-0023) y del CIV (CECIV, acto número 005). Los criterios de inclusión para el estudio fueron:

- Neonatos entre ≥ 2500 y ≤ 4000 gramos
- Neonatos entre 37 y 40 semanas de edad gestacional
- APGAR entre 7 y 10 minutos
- Neonatos mayores de 72 horas
- Neonatos sin signos, ni síntomas evidentes de alguna patología.
- Neonatos que no tenga un fenotipo compatible con algún síndrome genético.

- Materna con un control prenatal sin patologías que potencialmente interfieran con los metabolitos a medir, o se asocien con asfixia perinatal, por ejemplo: Desnutrición severa, Diabetes neonatal, Preeclampsia/eclampsia, Hipertensión arterial crónica, Tabaquismo durante el embarazo, Infecciones durante el embarazo que impliquen hospitalización, Cirugías durante el embarazo, Incompatibilidad Rh sensibilizada, Enfermedad autoinmune, Enfermedad que requiera el uso crónico de glucocorticoides
- Materna con ecografía prenatal sin evidencia de malformaciones congénitas mayores.

Toda la información relacionada con los neonatos participantes en el estudio fue manejada exclusivamente por los investigadores del estudio.

Toma y manejo de la muestra.

A cada neonato se le tomó una muestra de sangre por punción de talón, colectada en papel filtro (filtro Whatman n° 903, GE Healthcare, Westborough, EE.UU.), de acuerdo a las guías de tomas de muestras de talón para tamizaje neonatal (CLSI -guía NBS01-A6) (Standard and Edition, 2013), junto con los datos demográficos de cada uno. Después de 3 horas de secado, se almacenaron en bolsas de papel con desecante a 4°C hasta su procesamiento y análisis por MS/MS

Procesamiento de la muestra para el posterior análisis en HPLC-MASAS

Para el procesamiento de las muestras se perforaron los discos de sangre secos con un diámetro de 3,2 mm y se colocaron en un solo pozo de una placa de poliestireno de 96 pozos, a la cual se añadieron 120 μ L de una solución que contenía acetonitrilo: agua (80:20) 0,08 % de ácido fórmico, 3,6 mol / L de hidrato de hidrazina y estándares internos de AAs, ACs y

SUAC. La placa se selló con una película de sellado adhesiva (Fisherbrand No 08-408-240) y se agitó a 600 rpm durante 45 min a 45°C. Los extractos se transfirieron a una nueva microplaca de poliestireno de 96 pozos y luego se secaron bajo atmósfera de N₂ a temperatura ambiente durante aproximadamente 25 minutos a 40°C. A continuación, se añadieron 50 μ L de metanol y se secó de nuevo durante 10 minutos. Las muestras se reconstituyeron a continuación en 60 μ L de n-butanol 3N HCl y se incubaron a 65 ° C +/- 5 ° C durante 20 min. Las mezclas resultantes se secaron de nuevo durante aproximadamente 20 minutos y cada residuo se reconstituyó finalmente en 150 μ L de fase móvil (acetonitrilo: agua 50:50 que contenía ácido fórmico al 0,025 %), se cubrió con papel de aluminio, se agitó durante 10 min a temperatura ambiente, se centrifugado a 500 rpm durante 4 minutos y finalmente se introduce la microplaca en la bandeja del muestreador del HPLC que esta acoplado al espectrómetro de masas en tándem.

Cuantificación de analitos por espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS)

La metodología usada para el análisis en el MS/MS corresponde a una variación de la usada por Millington y colaboradores (Millington *et al.* 1990) Brevemente, la cuantificación de los analitos fue realizada por medio de un espectrómetro de masas en tándem 3200 Q Trap (AB Siex), operado en modo positivo, equipado con ionización en electrospray y acoplado a un cromatógrafo líquido HPLC (Shimadzu). Las muestras se corrieron en modo isocrático usando como fase móvil acetonitrilo: agua 50:50, conteniendo 0.025 % de ácido fórmico, a un flujo de 70 μ L/min en un tiempo de 3 min, por muestra. En total se evaluaron 8 AA y 16 AC como analitos marcadores. Las AC se midieron usando análisis de precursor iónico de m/z 85 (rango m/z: 200–500), mientras los aminoácidos, se analizaron usando modo de pérdida neutra (m/z 103 para Ala, Val, Leu, Ile, Met, Phe, Tyr, Asp, Glu) y RMM para Ornitina

(m/z 189 $\rightarrow$ 70), Arg (231 $\rightarrow$ 70) Gly (132 $\rightarrow$ 76) Citrulina (232 $\rightarrow$ 113) y homocitrulina (246 $\rightarrow$ 127). El tiempo total de análisis fue de 5 min por muestra. Todo el procesamiento de las muestras se realizó en las instalaciones del CIV.

Recolección y almacenamiento de datos.

Los datos resultantes del análisis de las muestras y producidos por el LC-MS/MS fueron analizados usando el software ChemoView (Microsoft Access database program, Applied Biosystem), mediante este software se calculó la concentración de cada uno de los analitos en sangre. Los datos de las concentraciones de AA y AC, así como las variables demográficas fueron almacenadas en la plataforma REDCap vs. 6.9.4 y descargadas para su análisis en el lenguaje de programación estadístico R vs. 3.3.2 y Microsoft Excel 2007.

Manejo estadístico de los datos.

Las variables evaluadas fueron la edad postnatal, sexo, peso y talla al nacer y valores de los metabolitos cuantificados en sangre.

Inicialmente se realizó un análisis descriptivo de las variables del estudio, mediante medidas de tendencia central y dispersión. Se realizó el test de Shapiro Wilk para probar la normalidad en la distribución de las variables, y las pruebas Levene, Bartlett y F para probar homocedasticidad, esto con el fin de saber qué tipo de pruebas estadísticas eran las adecuadas para el análisis. A los valores de las variables de respuesta (AA y AC) se les realizó la transformación logarítmica con el fin de estabilizar la varianza y obtener distribuciones más simétricas que permitieran que la mayoría de pruebas que se realizarán fueran paramétricas. Se usó el coeficiente de correlación de Pearson para establecer si existía alguna relación lineal entre las variables (peso, talla, edad y concentración de los analitos). Se categorizó la variable edad en tres niveles,

correspondientes a las tres primeras semanas de edad de los neonatos. Con el fin de evaluar diferencias significativas entre los niveles de la variable sexo, se usaron las pruebas t-student y U de Mann-Whitney; y para la variable de edad categorizada se utilizó un análisis de varianza (ANOVA), Kruskal-Wallis y una prueba de aleatorización con el estadístico F, posteriormente se hicieron pruebas *post-hoc*, Tukey y Nemenyi, estas pruebas fueron elegidas teniendo en cuenta los supuestos de normalidad y homocedasticidad cumplidos para cada analito. Lo anterior se realizó por medio del software estadístico R vs. 3.4.0.

RESULTADOS

Para el estudio se usaron 392 muestras de sangre de neonatos en papel filtro, de los cuales 51 % fueron hombres y 49 % fueron mujeres, con un peso al nacer entre 2500 y 4000 gramos, talla entre 40 y 57 cm, y edad de 4 a 18 días. Se analizaron 24 analitos (8 AA y 16 AC).

Los datos de los niveles de analitos en sangre tienen una distribución no normal y una varianza no homogénea, razón por la cual se realizó transformación logarítmica de los datos con el fin de facilitar su análisis estadístico, sin embargo, en la Tabla 1 se muestran las medidas estadísticas descriptivas de las concentraciones de cada uno de los analitos estudiados sin dicha transformación.

Con el fin de probar una posible correlación entre analitos y factores biológicos, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson y también se realizó un diagrama de correlación entre las variables cuantitativas (Tabla 2 y Figura 1).

Variable sexo:

Con respecto a la variable de sexo, se encontró diferencia significativa ($p=0.04988$) solo para el analito carnitina libre (C0) (tabla 3), aunque con un valor muy cercano al corte del intervalo de confianza.

La concentración de este analito fue mayor en hombres (Fig.2).

Variable edad:

los niveles de AC en los analitos C16, C14, y C18, los cuales muestran coeficientes de correlación mas altos. En el caso de los AA solo Tirosina, fenilalanina y alanina mostraron una correlación negativa notoria con respecto a la edad. Para las variables de talla y peso no se encontraron correlaciones fuertes (Figura 1).

Se encontraron correlaciones importantes entre la edad y la concentración de los analitos y, se calculó la diferencia significativa entre grupos para esta variable (Tabla 4-6).

Los niveles de la carnitina libre no mostraron diferencias significativas entre las tres semanas de edad de los neonatos. Las AC de cadena corta que presentaron diferencias significativas entre las tres semanas fueron C2, C3 y C6. Para C4OH se encontraron variaciones solo en la tercera semana y las concentraciones de C5 y C5DC variaron entre la segunda y la tercera semana. Los niveles de C4 y C5OH no variaron entre las tres semanas.

Las AC de cadena media en las que se observó variación entre semanas fueron; C12, entre las tres semanas y C10, solo en la tercera semana. Para los niveles de C8 no se encontraron diferencias significativas.

Las AC de cadena larga C14, C16 y C18 presentan diferencias significativas entre las tres semanas. C18OH no variaron entre la primera y la segunda semana.

En el caso de los AA se encontró que solo para tirosina hay diferencia significativa entre las tres semanas, los niveles de leucina variaron entre la primera y la tercera semana, los de valina solo en la segunda semana; alanina y fenilalanina presentaron diferencias significativas entre la primera y segunda semana. Para arginina, citrulina y metionina no se encontró diferencia significativa entre semanas.

Correlación entre analitos.

En la figura 1 se observó correlación positiva entre las AC, siendo más alta entre C18OH, C12, C2 y C0. Las AC C4OH, C5DC, C6, C8, C10, C12 y C18OH, mostraron correlación negativa con Leucina, siendo el último el de coeficiente de correlación más alto. En el caso de los AA, se correlacionaron positivamente, valina-fenilalanina y alanina-valina, se encontró también correlación negativa alta entre valina y leucina.

DISCUSIÓN

En este estudio, las variables peso y talla no difieren significativamente en ninguno de los analitos, contrario a lo reportado en estudios anteriores (Ruoppolo *et al.* 2015; Siddiqui & Bamji, 1980). Este resultado puede ser explicado dado que el peso y la talla en la población objeto son homogéneos y los neonatos incluidos en el estudio presentan rangos de peso y talla normales para Colombia, es decir, no había niños en condición de desnutrición u obesidad (Gobierno de la República de Colombia, Ministerio de Salud y Protección Social, 2016).

Se encuentra una correlación negativa entre la variable edad y las AC, es decir, en los neonatos de menor edad se mantienen niveles altos de AC contrario a lo encontrado en los neonatos mayores, con el paso de los días los niveles de estas moléculas disminuyen, estos resultados concuerdan con la literatura encontrada (Chace *et al.* 1997; Cavedon *et al.* 2005). Esta disminución de AC se debe a que durante la vida intrauterina el feto recibe cantidades significativas de estas moléculas por parte de su madre a través de la placenta, al tiempo del nacimiento el neonato refleja los niveles de AC de su progenitora, niveles que se verán disminuidos debido a que el neonato cuenta con un metabolismo aun inmaduro, sus enzimas sintetizadoras de AC y sus mecanismos de conservación (reabsorción tubular renal) provocarán

que los niveles bajos de AC se mantengan hasta que se logre la adaptación al uso de los lípidos para obtener energía, finalmente se establecerán los niveles de AC entre los 3 y 6 meses de edad y se mantendrán hasta la vida adulta (Scaglia and Longo, 1999; Longo *et al.* 2016).

Con respecto a la variable sexo, solo la carnitina libre (C0) mostró diferencia significativa ($p=0.04988$) y valores mayores en hombres. En estudios anteriores se ha acuñado esta diferencia a la producción de estrógeno, lo cual provocaría niveles menores de C0 en mujeres (Borum, 1978; Schmidt-Sommerfeld *et al.* 1988).

La variación de los analitos en las diferentes edades de los neonatos incluidos en el estudio probablemente se deba al perfil nutricional de las madres o a la etapa de lactancia de los neonatos en la que se encontraban al momento de la toma de muestra. Es decir, el desarrollo embrionario y fetal dependerá de hábitos alimenticios maternos y estos condicionarán el crecimiento y la maduración metabólica del neonato (Demmelmair & Koletzko, 2016; Sánchez *et al.* 2013). Además de los hábitos alimenticios de la madre, la composición de la leche también influirá en el perfil metabólico del neonato, esto debido a que sus componentes se modificarán de acuerdo a la etapa de lactancia y a las necesidades que tenga el neonato. En este sentido, se han reportado cambios durante el primer mes de lactancia para los AA; en el caso de los lípidos se sabe que son bastante variables en términos de concentración (Demmelmair & Koletzko, 2016).

Con respecto a las correlaciones entre analitos se encontró que las AC tienen correlación negativa con leucina (Figura 1), es decir, una relación inversamente proporcional. Esta correlación negativa podría ser un indicador de un rol importante por parte de la leucina en el metabolismo de los ácidos grasos, se ha reportado que este aminoácido influye en la β -oxidación de ácidos grasos y la biogénesis mitocondrial, estudios en células HepG2 encontraron que la vía de β -oxidación de ácidos grasos se activa por privación de leucina, se formula que este

aminoácido tendría un control transcripcional sobre los genes del metabolismo de los ácidos grasos (Sun & Zemel, 2007; Yan *et al.* 2017).

Se determinó que, para la población de estudio, las variables peso y talla no tienen ninguna correlación con los perfiles de AA y AC, contrario al hallazgo obtenido para la variable edad, en la cual se encontró correlación negativa y diferencias significativas de los analitos entre las semanas de edad de los neonatos. En el caso de la variable sexo se encontró diferencia significativa para C0.

Si bien para la mayoría de los EIM los valores de corte de diagnóstico son bastante alejados de los valores de referencia de la población, la edad podría afectar los niveles de los AA y AC y con esto el diagnóstico de las enfermedades que tienen valores de corte de diagnóstico muy cercanos a los valores de referencia. Por ende la variable edad solo sería relevante para este tipo de enfermedades, razón por la cual es de importancia realizar estudios de casos en los que se tenga en cuenta el efecto de la edad en los niveles de los analitos marcadores de estas enfermedades.

La correlación negativa encontrada entre las concentraciones de leucina y AC requieren estudios más específicos a futuro, donde se recomienda investigar sobre un posible control transcripcional de este aminoácido en el metabolismo de los ácidos grasos como ya han sugerido otros investigadores. Se recomienda análisis con tamaños de muestra superiores a los estudiados.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi gratitud a Dios y mi familia por su constante apoyo en mi formación como persona y profesional.

Gracias a mis directores de trabajo, la doctora Myriam Arevalo y el doctor Carlos Echeverry, por su dedicación y apoyo. De igual manera al grupo de investigación del Centro Internacional de Vacunas, especialmente al estadístico Fabián Chicagana, y a las doctoras Nora Céspedes y Angela Valencia por su apoyo y sugerencia de ideas.

Gracias también a las madres de los recién nacidos que participaron en este estudio y a la Clínica Versalles por abrirnos sus puertas y facilitar la investigación en la ciudad de Cali

LITERATURA CITADA

- Arderiu, F., Castiñeiras, I., and Queralto, C. (1998), *Bioquímica clínica y patología molecular*, Volume 2, Reverté, España.
- Borum, P. (1978) "Variation in Tissue Carnitine Concentrations with Age and Sex in the Rat", *Biochemical Journal*, Vol. 176, pp.677-681.
- Cabello, J. and Giugliani, R. (2015), "Errores Innatos del Metabolismo", *Revista Médica Clínica Las Condes*, Vol. 26, pp. 483-486.
- Campos, D. (2010), "Tamizaje neonatal por espectrometría de masas en tándem: actualización". *Revista Panamericana Salud Pública*, Vol. 27, pp.309-318.
- Campos, D. (2012), "Aplicación de la espectrometría de masas en tándem en el tamiz neonatal de los errores innatos del metabolismo", *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, Vol. 46, pp. 195-204.
- Cavedon, C. T., Bourdoux, P., Mertens, K., Van Thi, H. V., Herremans, N., De Laet, C., & Goyens, P. (2005). Age-related variations in acylcarnitine and free carnitine concentrations measured by tandem mass spectrometry. *Clinical chemistry*, 51(4), 745-752.
- Chace, D. H., Hillman, S. L., Van Hove, J. L., & Naylor, E. W. (1997). Rapid diagnosis of MCAD deficiency: quantitative analysis of octanoylcarnitine and other acylcarnitines in newborn blood spots by tandem mass spectrometry. *Clinical chemistry*, 43(11), 2106-2113.
- Chace, D., Pons, R., Chiriboga, C., McMahon, D. Tein, I., Naylor, E. and De Vivo, D. (2003), "Neonatal Blood Carnitine Concentrations: Normative Data by Electrospray Tandem Mass Spectrometry", *Pediatric Research*, Vol. 53, No. 5, pp. 823-829.
- Colombo, M., Cornejo, V. and Raimann, E. (2003). *Bases moleculares de las enfermedades genéticas, en Errores innatos en el metabolismo del niño*. Editorial E. Universitaria. Chile.
- Cocho de Juan, J.A. (2007) . *Desarrollo de un método por espectrometría de masas en tándem para la determinación de acilcarnitinas y la detección neonatal de alteraciones del metabolismo de ácidos orgánicos y ácidos grasos*. Tesis de doctorado, Universidad de Santiago de Compostela.
- Demmelair, H., & Koletzko, B. (2016). Variation of metabolite and hormone contents in human milk. *Clinics in perinatology*.
- El-Hattab, A. W. (2015). Inborn errors of metabolism. *Clinics in perinatology*, 42(2), 413-439.
- Garrido, A, and Teijon, J. (2009). *Fundamentos de bioquímica metabólica*, Tercera edición. Editorial Tebar. Madrid.
- Gil, A. (2010), *Tratado de nutrición: Nutrición clínica*, 2nd ed. Editorial Médica Panamericana, S.A., España.
- Gobierno de la República de Colombia, Ministerio de Salud y Protección Social (2016) *Resolución 2465 de 2016*. Colombia
- González, A. (2012), *Principios de bioquímica clínica y patología molecular*, Elsevier, España.

- Khan-Siddiqui, L., & Bamji, M. S. (1980). Plasma carnitine levels in adult males in India: effects of high cereal, low fat diet, fat supplementation, and nutrition status. *The American journal of clinical nutrition*, 33(6), 1259-1263.
- Krajcovicova-Kudlackova, M., Simoncic, R., Bederova, A., Babinska, K., & Beder, I. (2000). Correlation of carnitine levels to methionine and lysine intake. *Physiol Res*, 49(3), 399-402.
- Longo, N., Frigeni, M., & Pasquali, M. (2016). Carnitine transport and fatty acid oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1863(10), 2422-2435.
- Marrero, N. González, E., Frómeta, A., Baloy A., Castells E., Pérez P., González M., Pino A., (2004). “Influencia de la edad en los resultados del cribado neonatal de hipotiroidismo congénito, fenilcetonuria y galactosemia”, *Revista Mexicana de Patología Clínica*. Vol. 51. No. 4, pp. 220-225.
- Millington, D., Norwood, D., Kodo, N., Roe, C. and Inoue, F. (1989), “Application of Fast Atom Bombardment with Tandem Mass Spectrometry and Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry to the Analysis of Acylcarnitines in Human Urine, Blood, and Tissue”, *Analytical Biochemistry*, Vol. 180, pp. 331-339.
- Millington, D., Norwood, D., Kodo, N. and Roe, C. (1990), “Tandem Mass Spectrometry: A New Method for Acylcarnitine Profiling with Potential for Neonatal Screening for Inborn Errors of Metabolism”, *Journal Inhering Metabolism Diseases*, Vol. 13, pp. 321-324.
- Millington, D. S. (2003). Tandem mass spectrometry in clinical diagnosis. *Physician's guide to the laboratory diagnosis of metabolic diseases*. Berlin: Springer, 57-75.
- Ministerio de Salud y Protección Social (2014), *Análisis de Situación de Salud. Colombia*, 2014, Ministerio de Salud y Protección Social, Bogotá.
- Murray, R., Rodwell, V., Bender, D., Botham, K., Kennelly, P. and Weil, A. (2013), Harper. *Bioquímica ilustrada*, 28 ed., McGRAW-HILL, México.
- Noguera. R. (2009), *Manual de pediatría*, 1ra ed., Ronald Armando Noguera, Costa Rica.
- Riella, M. and Martins, C. (2015), *Nutrición y Riñón*, 2nd ed., Editorial Medica panamericana, Buenos Aires.
- Ruiz, P. and Santana, C. (1998). “Enfoque práctico para el diagnóstico de los errores congénitos del metabolismo”. *Acta pediátrica española*. Vol. 56. No. 1, pp. 39-52.
- Ruoppolo, M., Scolamiero, E., Caterino, M., Mirisola, V., Franconi, F. and Campesi, I. (2015). “Female and male human babies have distinct blood metabolomic patterns” *Molecular BioSystems*, Vol. 11, pp. 2483-92.
- Sánchez-Muniz, F. J., Gesteiro, E., Espárrago Rodilla, M., Rodríguez Bernal, B., & Bastida, S. (2013). La alimentación de la madre durante el embarazo condiciona el desarrollo pancreático, el estatus hormonal del feto y la concentración de biomarcadores al nacimiento de diabetes mellitus y síndrome metabólico. *Nutrición Hospitalaria*, 28(2), 250-274.
- Scaglia, F., & Longo, N. (1999). Primary and secondary alterations of neonatal carnitine metabolism. *Seminars in perinatology* , Vol. 23, No. 2, pp. 152-161

- Schmidt-Sommerfeld, E., Werner, D., & Penn, D. (1988). Carnitine plasma concentrations in 353 metabolically healthy children. *European journal of pediatrics*, 147(4), 356-360.
- Scriver, C., Beaudet, A., Sly, W. and Valle, D. (1995), *The metabolic & molecular bases of inherited disease*, 7th Ed., Mc graw-Hill.
- Standard, A., & Edition, S. (2013). CLSI Document NBS01-A6. *Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute*.
- Vela-Amieva, M., Belmont-Martínez, L., Fernández-Lainez, C., Ramírez-Frías, C., & Ibarra González, I. (2009). Frecuencia de enfermedades metabólicas congénitas susceptibles de ser identificadas por el tamiz neonatal. *Acta Pediátrica de México*, 30(3), 156-162.
- Zeyner, A. and Harmeyer J. (1999) “Metabolic functions of L-Carnitine and its effects as feed additive in horses. A review”, *Archiv für Tierernaehrung*, Vol. 52, pp. 115-138
- Zschocke, J. (2010). “Disorders of Intermediary Metabolism”, *Inherited Metabolic Diseases*. Pp. 3-6.

Tabla 1. Valores de las medidas estadísticas descriptivas de los AA y AC en plasma para recién neonatos incluidos en el estudio. Los valores son expresados en $\mu\text{mol/L}$ de sangre.

Analito marcador	$\bar{X}$	Me	DE
Alanina (Ala)	204.53	199.18	50.41
Arginina (Arg)	25.17	24.02	10.26
Citrulina (Cit)	15.48	14.54	5.11
Leucina (Leu)	311.65	327.32	122.95
Metionina (Met)	34.34	29.5	17.91
Fenilalanina (Phe)	40.17	39.45	8.15
Tirosina (Tyr)	107.97	101.89	33.36
Valina (Val)	142.44	139.19	27.72
Carnitina libre (C0)	27.99	26.33	9.28
Acetilcarnitina (C2)	20.04	19.42	5.19
Propionilcarnitina (C3)	1.11	1.04	0.43
Butirilcarnitina (C4)	0.3	0.29	0.11
Hidroxibutirilcarnitina (C4OH)	0.2	0.19	0.08
Isovalerilcarnitina (C5)	0.24	0.23	0.07
Glutarilcarnitina (C5DC)	0.1	0.1	0.05
3-Hidroxivalerilcarnitina (C5OH)	0.21	0.2	0.07
Hexanoilcarnitina (C6)	0.14	0.12	0.07
Octanoilcarnitina (C8)	0.14	0.13	0.06
Decanoilcarnitina (C10)	0.14	0.13	0.06
Dodecanoilcarnitina (C12)	0.22	0.2	0.1
Miristoilcarnitina (C14)	0.28	0.26	0.11
Palmitoilcarnitina (C16)	2.01	1.94	0.8
Estearoilcarnitina (C18)	0.71	0.67	0.27
Hidroxiestearoilcarnitina (C18OH)	0.06	0.05	0.04

Tabla 2. Coeficiente de correlación entre analitos y variables explicativas.

Analito	Coeficiente edad	Coeficiente peso	Coeficiente talla
Ala	-0.22	0.01	-0.05
Arg	-0.01	-0.07	-0.16
Cit	0.08	-0.02	0.01
Leu	0.11	-0.07	-0.02
Met	0.07	0.1	0.04
Phe	-0.23	-0.02	-0.02
Tyr	-0.3	-0.06	-0.08
Val	-0.06	0.04	-0.02
C0	-0.11	-0.04	-0.03
C2	-0.41	-0.04	-0.01
C3	-0.17	0.005	-0.03
C4	-0.19	-0.02	-0.05
C4OH	-0.29	4.31E-05	-0.05
C5	-0.11	-0.07	-0.13
C5DC	-0.13	-0.02	0.01
C5OH	-0.14	-0.03	-0.04
C6	-0.14	-0.05	-0.02
C8	-0.09	0.02	-0.02
C10	-0.16	0.03	-0.02
C12	-0.36	0.04	0.02
C14	-0.4	-0.07	-0.005
C16	-0.58	-0.04	0.05
C18	-0.4	-0.02	-0.02
C18OH	-0.31	0.002	-0.02

Se usó el coeficiente de correlación de Pearson

Tabla 3. Diferencias de los analitos entre niños y niñas.

Analito marcador	Niños			Niñas			Primera semana vs Segunda semana (Valor p)
	$\bar{X}$	Me	SD	$\bar{X}$	Me	SD	
Ala	203.1	197.3	50.8	206.0	200.5	50.1	0.3733
Arg	26.1	25.0	10.5	24.2	23.6	10.0	0.07862
Cit	15.8	15.0	6.0	15.1	14.0	4.0	0.2574
Leu	321.1	332.8	128.8	301.6	313.6	115.9	0.1307
Met	33.9	29.8	17.6	34.8	29.5	18.3	0.908
Phe	40.4	39.8	8.6	39.9	39.0	7.6	0.4888
Tyr	105.7	100.1	30.7	110.3	103.4	35.9	0.2372
Val	140.7	138.9	27.4	144.3	140.0	28.0	0.1895
C0	28.7	27.2	9.0	27.2	25.0	9.5	0.04988*
C2	20.0	19.7	5.2	20.1	19.1	5.2	0.7967
C3	1.1	1.1	0.4	1.1	1.0	0.4	0.09126
C4	0.3	0.3	0.1	0.3	0.3	0.1	0.6527
C4OH	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	0.1	0.57
C5	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	0.1	0.9732
C5DC	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	0.1729
C5OH	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	0.1	0.9694
C6	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.6588
C8	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2225
C10	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1554
C12	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	0.1	0.7934
C14	0.3	0.3	0.1	0.3	0.2	0.1	0.1745
C16	2.0	1.9	0.8	2.0	1.9	0.8	0.8993
C18	0.7	0.7	0.2	0.7	0.7	0.3	0.5619
C18OH	0.1	0.1	0.0	0.1	0.1	0.04	0.8427

*Diferencia significativa. Los estadísticos realizados para probar diferencia entre sexos son Prueba t-student, y U de Mann-Whitney.

Tabla 4. Diferencias de los analitos entre la primera y segunda semana de nacimiento.

Analito marcador	Semana 1			Primera semana vs Segunda semana (Valor p)
	$\bar{X}$	Me	SD	
Ala	214.80	210.80	52.37	1.19E-01
Arg	25.60	23.66	10.94	9.96E-01
Cit	14.78	14.75	3.77	5.82E-01
Leu	339.40	341.10	128.56	7.40E-03*
Met	31.25	27.13	14.96	2.78E-01
Phe	41.44	40.99	7.33	3.01E-01
Tyr	121.41	114.88	40.31	4.72E-04*
Val	148.70	144.50	28.00	2.38E-02*
C0	29.03	25.41	10.98	5.93E-01
C2	22.49	22.27	5.75	1.64E-05*
C3	1.25	1.15	0.51	2.47E-03*
C4	0.31	0.29	0.12	7.75E-01
C4OH	0.21	0.20	0.07	4.24E-01
C5	0.24	0.23	0.08	5.60E-01
C5DC	0.09	0.09	0.05	4.59E-01
C5OH	0.22	0.21	0.07	7.18E-01
C6	0.13	0.11	0.07	1.71E-02*
C8	0.13	0.12	0.06	2.13E-01
C10	0.15	0.15	0.06	9.97E-01
C12	0.24	0.22	0.11	4.24E-02*
C14	0.31	0.29	0.12	2.80E-03*
C16	2.47	2.41	0.81	2.91E-07*
C18	0.81	0.76	0.29	2.46E-04*
C18OH	0.06	0.05	0.04	3.47E-01

*Diferencia significativa. Los estadísticos realizados para probar diferencia entre semanas son ANOVA, Kruskal-Wallis y prueba de aleatorización.

Tabla 5. Diferencias de los analitos entre las segunda y tercera semana de nacimiento.

Analito marcador	Semana 2			Primera semana vs Segunda semana (Valor p)
	$\bar{X}$	Me	SD	
Ala	203.30	197.60	50.14	4.75E-02*
Arg	25.05	24.71	10.01	9.67E-01
Cit	15.69	14.43	5.58	7.57E-01
Leu	296.86	302.72	122.03	4.28E-03*
Met	35.32	30.00	19.16	5.11E-01
Phe	40.24	39.25	8.35	6.23E-04*
Tyr	105.38	100.00	29.42	6.15E-04*
Val	140.10	137.30	27.65	6.65E-01
C0	27.89	26.63	8.84	2.74E-01
C2	19.62	18.89	4.69	2.81E-06*
C3	1.06	1.01	0.38	9.99E-01
C4	0.31	0.29	0.11	9.50E-02
C4OH	0.21	0.19	0.08	3.32E-05*
C5	0.24	0.23	0.07	3.35E-02*
C5DC	0.10	0.10	0.05	4.38E-03*
C5OH	0.21	0.20	0.07	1.08E-01
C6	0.14	0.14	0.07	4.03E-05*
C8	0.15	0.13	0.07	7.72E-02
C10	0.14	0.13	0.06	2.35E-02*
C12	0.22	0.21	0.10	1.27E-05*
C14	0.27	0.26	0.11	4.25E-07*
C16	1.94	1.89	0.71	4.99E-09*
C18	0.69	0.66	0.25	1.65E-06*
C18OH	0.07	0.06	0.04	5.84E-08*

*Diferencia significativa.

Tabla 6. Diferencias de los analitos entre la primera y tercera semana de nacimiento.

Analito marcador	Semana 3			Primera semana vs Segunda semana (Valor p)
	$\bar{X}$	Me	SD	
Ala	178.80	172.70	33.67	3.55E-03*
Arg	24.80	22.96	10.72	9.60E-01
Cit	15.93	15.16	3.98	4.62E-01
Leu	368.00	366.20	67.03	9.64E-02
Met	35.50	32.03	12.32	1.58E-01
Phe	34.50	35.10	6.68	7.60E-05*
Tyr	84.84	80.43	25.29	2.14E-07*
Val	144.39	144.48	24.35	8.27E-01
C0	25.13	24.88	5.87	2.74E-01
C2	15.27	14.59	3.32	4.33E-12*
C3	1.09	0.89	0.50	1.64E-01
C4	0.25	0.24	0.06	5.76E-02
C4OH	0.14	0.14	0.03	6.70E-06*
C5	0.20	0.18	0.06	1.74E-01
C5DC	0.07	0.07	0.03	5.33E-02
C5OH	0.18	0.18	0.04	5.82E-02
C6	0.09	0.09	0.03	1.71E-02*
C8	0.12	0.12	0.04	4.94E-01
C10	0.11	0.10	0.04	3.47E-02*
C12	0.13	0.13	0.03	5.06E-07*
C14	0.18	0.16	0.08	1.51E-10*
C16	1.00	0.90	0.37	3.03E-14*
C18	0.48	0.45	0.18	7.63E-11*
C18OH	0.03	0.03	0.01	2.11E-05*

*Diferencia significativa. Los estadísticos realizados para probar diferencia entre semanas son ANOVA, Kruskal-Wallis y prueba de aleatorización.

Figura 1. Diagrama de correlación entre edad postnatal, peso y talla al nacer y logaritmos de valores de los metabolitos cuantificados en sangre.

Figura 2. Diagrama de cajas concentración de carnitina libre (C0) versus sexo.



