



Iatreia

ISSN: 0121-0793

revistaiatreia@udea.edu.co

Universidad de Antioquia

Colombia

Osorio, José Henry

Estudio de la deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga con cardiomielopatía
mediante el uso de un sustrato deuterado

Iatreia, vol. 27, núm. 4, octubre-diciembre, 2014, pp. 410-416

Universidad de Antioquia

Medellín, Colombia

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180532151004>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Estudio de la deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga con cardiomielopatía mediante el uso de un sustrato deuterado

José Henry Osorio¹

RESUMEN

Introducción: la deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga (VLCAD) se manifiesta en los primeros meses de vida con cardiomielopatía hipertrófica o dilatada y arritmias, que pueden llegar a ser letales.

Objetivo: analizar la producción de metabolitos en fibroblastos de pacientes con deficiencia de VLCAD y cardiomielopatía, incubados con ácido oleico deuterado.

Materiales y métodos: se incubaron fibroblastos de cuatro pacientes con deficiencia de VLCAD y cardiomielopatía y 10 de controles en presencia de ácido oleico deuterado.

Resultados y conclusión: en pacientes con esta deficiencia se encontró un perfil característico luego de la incubación de los fibroblastos. Esta prueba se podría usar para confirmar *in vitro* la deficiencia de VLCAD con cardiomielopatía.

PALABRAS CLAVE

Ácidos Grasos; Metabolismo; β-Oxidación Mitocondrial

SUMMARY

Study of very long chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD) deficiency with cardiomypathy using a deuterated substrate

Introduction: Deficiency of VLCAD is present in the early months of life, with hypertrophic or dilated cardiomypathy and arrhythmias which may be lethal.

Objective: To analize the production of metabolites in fibroblasts from patients with VLCAD deficiency and cardiomypathy incubated with deuterated oleic acid.

Materials and methods: Fibroblasts from four patients with VLCAD deficiency and cardiomypathy and from ten controls were incubated in the presence of deuterated oleic acid.

¹ Profesor Titular, Facultad de Ciencias para la Salud. Departamento de Ciencias Básicas de la Salud, Universidad de Caldas, Manizales, Colombia.
Correspondencia: jose.osorio_o@ucaldas.edu.co

Recibido: abril 15 de 2013

Aceptado: abril 09 de 2014

Results and conclusion: A characteristic profile was found in the fibroblasts of patients with VLCAD after the described incubation. This test could be used to confirm VLCAD deficiency with cardiomyopathy.

KEY WORDS

Fatty Acids; Metabolism; Mitochondrial β -Oxidation

RESUMO

Estudo da deficiência de acil-CoA desidrogenase de corrente muito longa com cardiomiopatia mediante o uso de um substrato deuterado

Introdução: a deficiência de acil-CoA desidrogenase de corrente muito longa (VLCAD) manifesta-se nos primeiros meses de vida com cardiomiopatia hipertrófica ou dilatada e arritmias, que podem chegar a ser letais.

Objetivo: analisar a produção de metabólitos em fibroblastos de pacientes com deficiência de VLCAD e cardiomiopatia, incubados com ácido oleico deuterado.

Materiais e métodos: incubaram-se fibroblastos de quatro pacientes com deficiência de VLCAD e cardiomiopatia e 10 de controles em presença de ácido oleico deuterado.

Resultados e conclusão: em pacientes com esta deficiência se encontrou um perfil característico depois da incubação dos fibroblastos. Esta prova se poderia usar para confirmar *in vitro* a deficiência de VLCAD com cardiomiopatia.

PALAVRAS IMPORTANTES

Ácidos Gordurosos; Metabolismo; β -Oxidação Mitocondrial

INTRODUCCIÓN

Gran parte del proceso de utilización de los ácidos grasos en el organismo, para la obtención de energía, depende del ciclo de la carnitina necesario para la introducción de los ácidos grasos de cadena larga a la matriz mitocondrial, y de la espiral de la β -oxidación mitocondrial, donde se lleva a cabo su degradación hasta acetil-CoA, precursora de los cuerpos cetónicos, combustible final en los estados de ayuno prolongado y en el ejercicio físico (1). De manera global, este proceso

de oxidación incluye: captación celular de los ácidos grasos, activación a ésteres de acil-CoA, transesterificación a acilcarnitinas, translocación a través de la membrana mitocondrial y reesterificación a ésteres de acil-CoA para someterse finalmente a la espiral de la β -oxidación mitocondrial, un ciclo que incluye cuatro etapas (2). En esta espiral se generan acetil-CoA y electrones. La acetil-CoA se convierte en el hígado en cuerpos cetónicos, o bien se puede oxidar a CO_2 y H_2O a través del ciclo de Krebs (ciclo de los ácidos tricarboxílicos). Los electrones se transfieren a flavina adenina dinucleótido (FAD) y de ahí a la cadena mitocondrial de transporte electrónico (3). Los errores innatos de la oxidación mitocondrial de ácidos grasos conforman un grupo de enfermedades de carácter autosómico recesivo de espectro clínico y pronóstico variables, dependiendo del déficit enzimático. Desde su primera descripción en 1973, se han informado varios de estos defectos incluyendo algunos subtipos (4). El primer paso de la oxidación mitocondrial de los ácidos grasos necesita varias deshidrogenasas. La acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga es parte esencial de la degradación intramitocondrial de ácidos grasos de cadena larga y muy larga, es específica para las acil-CoA de 14-24 átomos de carbono y cataliza más del 90% de la deshidrogenación del palmitoil-CoA (C16) (5). El gen de la enzima acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga (VLCAD, por su sigla en inglés) se encuentra localizado en el cromosoma 17p13 (5). La enzima es un homodímero de 154-Kda y su cDNA consta de una región de 2.177 bp que codifica para un péptido líder de 40 aminoácidos y un polipéptido maduro de 615 aminoácidos, para un total de 655 aminoácidos en la proteína entera (6). Con base en la clínica que se presenta en la deficiencia de VLCAD, se han informado tres fenotipos: una forma infantil grave (7), una de presentación más benigna, que también aparece en la niñez (8) y una muscular, que se manifiesta después de la niñez (9). Más recientemente estas variantes han sido designadas en su orden como VLCAD-C, por presentar cardiomiopatía dilatada; VLCAD-H, caracterizada por episodios de hipoglicemia, y VLCAD-M en la que se presentan episodios de miopatía con rabdomiolisis (10). Los estudios bioquímicos son fundamentales en el diagnóstico de la deficiencia de VLCAD. Luego de la oxidación mitocondrial de ácidos grasos, los tioésteres Acil-CoA que se forman quedan confinados en la mitocondria debido a su incapacidad para atravesar la membrana mitocondrial, mientras que las acilcarnitinas

producidas pueden salir de la mitocondria y acumularse en el medio de cultivo (11). A partir de ese concepto, Nada y colaboradores (12) diseñaron un método para el diagnóstico de las deficiencias de la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos, mediante la incubación de fibroblastos con ácido linoleico deuterado ([17,17,18,18- d_4]-9,12-octadecadienoico), en presencia de L-carnitina, y utilizando espectrometría de masas en tandem, para medir las acilcarnitinas deuteradas en el medio de cultivo. Otros han diseñado técnicas que determinan las acilcarnitinas en medios de cultivo de fibroblastos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con monitorización selectiva de un ion (GC-Cl-MS y GC-MS) (13). En este trabajo se presentan los resultados de la incubación de fibroblastos con ácido oleico deuterado, detectando metabolitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, en pacientes que sufren VLCAD caracterizada por cardiomielopatía dilatada.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio fue de tipo experimental. El material biológico empleado lo constituyeron diez cultivos diferentes de fibroblastos normales y cuatro de pacientes con diagnóstico confirmado de deficiencia de VLCAD que presentaban cardiomielopatía. Esta deficiencia se confirmó por estudios enzimáticos, moleculares o ambos. Como sustrato se empleó el ácido oleico deuterado (*Cambridge Isotope Laboratories*). Se utilizaron los siguientes compuestos deuterados para preparar la curva de calibración [8,8,8- d_3]octanoil-L-carnitina.HCl, [10,10,10- d_3]decanoil-L-carnitina.HCl, [12,12,12- d_3]dodecanoil-L-carnitina.HCl, [14,14,14- d_3]tetradecanoil-L-carnitina.HCl, [16,16,16- d_3]hexadecanoil-L-carnitina.HCl (*Ten Brinx-Free University Amsterdam*). Como estándar interno durante el proceso de extracción de las muestras se adicionó ácido undecanodioico (*Fluka*).

Cultivo de fibroblastos Se cultivaron los fibroblastos (4-20 pasajes) en un medio similar al basal de Eagle con bicarbonato y HEPES (4-[2-hidroxietil]-1-ácido piperazinaetano sulfúrico), MEM (medio mínimo esencial), suplementado con suero de bovino recién nacido al 10% (v/v) y gentamicina al 1% (v/v) a 37 °C, en estufa con 5% de CO₂ y 95% de aire. Después de alcanzar el punto de confluencia (80%-100%), se lavaron

las células dos veces con buffer fosfato salino (PBS), la solución se tripsinizó (1 mL de tripsina-EDTA a 37 °C), y posteriormente se neutralizó mediante la adición de 3-5 mL de MEM. Las células se transfirieron a tubos cónicos de 10 mL (0,8-1,2 mg de proteína) y se centrifugaron a 337Xg (5 min, 20 °C); así quedaron listas para la incubación en presencia de los sustratos deuterados. Para la determinación de proteínas se utilizó el método de Lowry y colaboradores (14).

Oxidación del ácido oleico deuterado en los fibroblastos

Se utilizó la técnica diseñada por Osorio y colaboradores (15): se preparó una solución de medio de cultivo con una concentración final de 0,15 mM de ácido oleico deuterado, 1mM de albúmina de suero de bovino (BSA, por su sigla en inglés) y L-carnitina 0,2 mM. La incubación de los fibroblastos se llevó a cabo de la siguiente manera: después de la tripsinización, fueron resuspendidos en MEM Enriquecido en frascos falcom de 2,5 mL (2 frascos por caso). Después de 72 h de incubación, se recogió el medio de cultivo mediante centrifugación y se lo almacenó a -20 °C hasta su análisis. Las células se resuspendieron en 1 mL de PBS1 para proceder a la determinación de proteínas. El análisis cuantitativo se basó en el método del estándar interno. Se prepararon curvas de calibración para los ácidos grasos C8, C10, C12, y C14, en un rango de 0 a 150 nM, y C16 en un rango de 0-1.000 nM, utilizando acilcarnitinas deuteradas en el último carbono, diluidas en MEM ($p < 0.00001$ para cada curva de calibración). El análisis de los ácidos grasos de los medios Enriquecidos (curvas de calibración y productos de la incubación) se hizo después de la hidrólisis con KOH. Las curvas de calibración se obtuvieron mediante el análisis de regresión lineal, representando la relación de concentraciones de cada ácido respecto al estándar interno frente a la relación de áreas.

Condiciones de la cromatografía gas-líquido

Flujo de gas portador (He): 1 mL/min; división de flujo: 1:30; tiempo de inyección: 1 min 5 segundos; temperatura del inyector: 250 °C; temperatura del horno y programación de temperaturas: T1 70 °C a 6 °C/min; T2 250 °C a 20 °C/min hasta T3 300 °C; volumen de inyección: 1 mL; tiempo total: 38,5 min. Las siguientes

fueron las condiciones de la espectrometría de masas; el análisis cualitativo se efectuó por cromatografía de gases-espectrometría de masas, con impacto electrónico y monitorización selectiva de iones. Para cada ácido se monitorizó el ion $M+15$, porque es el ion selectivo y uno de los más abundantes; la ionización se llevó a cabo por impacto electrónico a 70 eV y la fuente de iones se mantuvo a una temperatura de 200 °C. La temperatura del analizador fue de 100 °C; para la adquisición de datos, el instrumento utilizó un *scanning* repetitivo en un rango de 40 a 600 unidades de masa atómica. Se utilizó un cromatógrafo de gases 5890 Series II Plus (espectrómetro de masas Hewlett Packard serie 5972, Palo Alto, CA, año 2000).

El manejo de datos se hizo utilizando Microsoft Excel y Minitab Statistical Software.

El presente estudio se considera sin riesgo, de acuerdo con el artículo 11 literal *a* de la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud (Normas Científicas, Técnicas, y Administrativas para la Investigación en Salud). El

trabajo fue aprobado por el respectivo comité de ética y los pacientes firmaron el consentimiento informado.

RESULTADOS

En todas las curvas de calibración se obtuvo un coeficiente de correlación superior al 0.99. La figura 1 muestra el cromatograma GC-MS-SIM de ácidos grasos en fibroblastos incubados con ácido 2-oleico deuterado. Los ácidos grasos saturados no deuterados corresponden a la oxidación del ácido palmitíco del medio de cultivo. Se observaron solamente los metabolitos deuterados de 12, 14 y 16 átomos de carbono ($D_2C_{12}:1$), ($D_2C_{14}:1$) ($D_2C_{16}:1$), respectivamente, producto de la degradación del ácido oleico deuterado. La tabla 1 muestra las concentraciones observadas para los diferentes ácidos grasos deuterados. Con el análisis estadístico mediante la prueba *t* de Student se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los datos de los pacientes y los de los controles, para los ácidos grasos deuterados de 14 y 16 átomos de carbono.

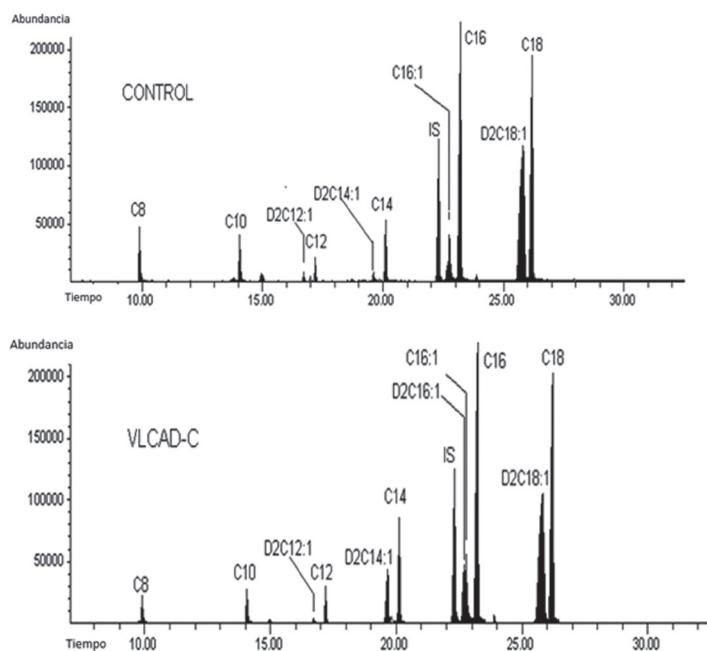


Figura 1. GC-MS-SIM de la incubación del ácido 2-oleico deuterado en fibroblastos control y de pacientes con deficiencia VLCAD-C. Están indicados los ácidos grasos del medio de cultivo, según el número de átomos de carbono. C8: octanoico; C10: decanoico; C12:1: dodecanoico; C12: dodecanoico; C14:1: tetradecenoico; C14: tetradecanoico; C16: hexadecanoico; OH-C16:0: hidroxihexadecanoico; así como los ácidos grasos deuterados, de 12 átomos de carbono ($D_2C_{12}:1$) dodecanoico; 14 átomos de carbono ($D_2C_{14}:1$) tetradecenoico deuterado; y 16 átomos de carbono ($D_2C_{16}:1$) hexadecenoico deuterado, producto de la degradación del ácido oleico deuterado. IS identifica el estándar interno

Tabla 1. Producción de ácidos grasos deuterados en fibroblastos control y de pacientes con deficiencia de VLCAD-C incubados con ácido oleico deuterado

Ácidos grasos intermediarios (nmol/mg proteína/72 h)	Promedio controles	Intervalo controles	Promedio VLCAD-C	p < 0,05
D2C12:1	3,6	2,8-4,2	1,8	-
D2C14:1	2,9	1,9-5,1	16,8	0,0122
D2C16:1	3,2	2,5-3,8	18,2	0,0231

Ácidos grasos deuterados de 12 átomos de carbono (D2C12:1) dodecanoico deuterado; de 14 átomos de carbono (D2C14:1) tetradecenoico deuterado; de 16 átomos de carbono (D2C16:1) hexadecenoico deuterado, producto de la degradación del ácido oleico deuterado

DISCUSIÓN

En los pacientes con deficiencia de VLCAD y cardiomielopatía se pueden observar arritmias, a veces letales, así como taquicardia ventricular, fibrilación ventricular y bloqueos auriculoventriculares (16). Aunque la morbilidad resultante de la cardiomielopatía puede ser grave, la disfunción cardíaca es reversible con cuidado intensivo y soporte temprano, mediante la modificación de la dieta, evitando en estos pacientes la degradación de ácidos grasos de cadena larga y muy larga (17). En el análisis de los ácidos grasos libres en el plasma de estos pacientes por cromatografía de gases, se pueden observar, además, niveles elevados de C14n-9 (18); niveles elevados de ácidos dicarboxílicos desde C6 hasta C14 en el análisis de ácidos orgánicos en orina, por espectrometría de gases acoplada a espectrometría de masas (19); y niveles altos de las acilcarnitinas C14:1, C14, C16 en el análisis de sangre por espectrometría de masas en tandem (20). En biopsias de músculo de estos pacientes, el análisis por inmunohistoquímica para la enzima VLCAD muestra cantidades bajas de la enzima y de su actividad (21). La VLCAD es específica para la degradación de la acil-CoA de 14-24 átomos de carbono (22) y cataliza más del 90% de la deshidrogenación del palmitoil-CoA (C16) intra-mitocondrial (23,24). Esta enzima es considerada un paso limitante en la oxidación de ácidos grasos de cadena larga (25). Por diferentes métodos se ha estudiado ampliamente la detección de metabolitos intermedios de la β-oxidación mitocondrial de los ácidos grasos (26-28), y la espectrometría de masas

en tandem sigue siendo el método más efectivo para detectar alteraciones en esta vía metabólica (29). Sin embargo, es una técnica que no está disponible en muchos laboratorios, por lo cual se deben buscar alternativas. Se ha documentado plenamente el uso de fibroblastos para el análisis del funcionamiento de la β-oxidación mitocondrial de los ácidos grasos, mediante la incubación con diferentes sustratos (30,31). En el presente estudio se encontró un perfil con incremento en los niveles de varios ácidos grasos deuterados luego de incubar fibroblastos de pacientes con deficiencia de VLCAD-C con cardiomielopatía en presencia de ácido oleico deuterado, principalmente metabolitos de 14 (D2C14:1) y 16 (D2C16:1) átomos de carbono. Estos resultados refuerzan el diagnóstico, toda vez que en otros estudios *in vitro* de esta deficiencia se han encontrado elevados los niveles de estos metabolitos al incubar los fibroblastos con ácido palmítico deuterado (32).

CONCLUSIÓN

En el presente estudio se analizó la oxidación del ácido oleico deuterado en fibroblastos de pacientes con deficiencia de VLCAD y cardiomielopatía, buscando una herramienta diagnóstica para esta alteración metabólica. Se encontraron niveles significativamente altos de ácidos grasos de 14 y 16 átomos de carbono: D2C14:1 y 16 D2C16:1, respectivamente. Es posible entonces utilizar este método para confirmar *in vitro* esta deficiencia y establecer un tratamiento temprano que busque revertir la cardiomielopatía.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cheng Z, Ristow M. Mitochondria and metabolic homeostasis. *Antioxid Redox Signal.* 2013 Jul 20;19(3):240–2.
2. Vamecq J, Dessein A-F, Fontaine M, Briand G, Portelet N, Latruffe N, et al. Mitochondrial dysfunction and lipid homeostasis. *Curr Drug Metab.* 2012 Dec;13(10):1388–400.
3. Serra D, Mera P, Malandrino MI, Mir JF, Herrero L. Mitochondrial fatty acid oxidation in obesity. *Antioxid Redox Signal.* 2013 Jul 20;19(3):269–84.
4. Walterfang M, Bonnot O, Mocellin R, Velakoulis D. The neuropsychiatry of inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis.* 2013 Jul;36(4):687–702.
5. Schiff M, Mohsen A-W, Karunanidhi A, McCracken E, Yeasted R, Vockley J. Molecular and cellular pathology of very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Mol Genet Metab.* 2013 May;109(1):21–7.
6. Gobin-Limballe S, McAndrew RP, Djouadi F, Kim JJ, Bastin J. Compared effects of missense mutations in Very-Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase deficiency: Combined analysis by structural, functional and pharmacological approaches. *Biochim Biophys Acta.* 2010 May;1802(5):478–84.
7. Aoyama T, Souris M, Ushikubo S, Kamijo T, Yamaguchi S, Kelley RI, et al. Purification of human very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase and characterization of its deficiency in seven patients. *J Clin Invest.* 1995 Jun;95(6):2465–73.
8. Vianey-Saban C, Divry P, Brivet M, Nada M, Zabot MT, Mathieu M, et al. Mitochondrial very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: clinical characteristics and diagnostic considerations in 30 patients. *Clin Chim Acta.* 1998 Jan 12;269(1):43–62.
9. Ogilvie I, Pourfarzam M, Jackson S, Stockdale C, Bartlett K, Turnbull DM. Very long-chain acyl coenzyme A dehydrogenase deficiency presenting with exercise-induced myoglobinuria. *Neurology.* 1994 Mar;44(3 Pt 1):467–73.
10. Minetti C, Garavaglia B, Bado M, Invernizzi F, Bruno C, Rimoldi M, et al. Very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency in a child with recurrent myoglobinuria. *Neuromuscul Disord.* 1998 Feb;8(1):3–6.
11. Kler RS, Jackson S, Bartlett K, Bindoff LA, Eaton S, Pourfarzam M, et al. Quantitation of acyl-CoA and acylcarnitine esters accumulated during abnormal mitochondrial fatty acid oxidation. *J Biol Chem.* 1991 Dec 5;266(34):22932–8.
12. Nada MA, Chace DH, Sprecher H, Roe CR. Investigation of beta-oxidation intermediates in normal and MCAD-deficient human fibroblasts using tandem mass spectrometry. *Biochem Mol Med.* 1995 Feb;54(1):59–66.
13. Ventura FW, Costa CG, Struys EA, Ruiter J, Allers P, Ijlst L, et al. Quantitative acylcarnitine profiling in fibroblasts using [^{13}C] palmitic acid: an improved tool for the diagnosis of fatty acid oxidation defects. *Clin Chim Acta.* 1999 Mar;281(1-2):1–17.
14. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951 Nov;193(1):265–75.
15. Osorio J. Producción de metabolitos en fibroblastos incubados con ácido oleico deuterado. *Arch Med (Manizales).* 2013;13(2):202–7.
16. Bonnet D, Martin D, Pascale De Lonlay, Villain E, Jouvet P, Rabier D, et al. Arrhythmias and conduction defects as presenting symptoms of fatty acid oxidation disorders in children. *Circulation.* 1999 Nov 30;100(22):2248–53.
17. Spiekerkoetter U. Mitochondrial fatty acid oxidation disorders: clinical presentation of long-chain fatty acid oxidation defects before and after newborn screening. *J Inher Metab Dis.* 2010 Oct;33(5):527–32.
18. Pons R, Cavardini P, Baratta S, Invernizzi F, Lamantia E, Garavaglia B, et al. Clinical and molecular heterogeneity in very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *Pediatr Neurol.* 2000 Feb;22(2):98–105.
19. Touma EH, Rashed MS, Vianey-Saban C, Sakr A, Divry P, Gregersen N, et al. A severe genotype with favourable outcome in very long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Arch Dis Child.* 2001 Jan;84(1):58–60.
20. Osorio JH, Pourfarzam M. [Determination of normal acylcarnitine levels in a healthy pediatric population as a diagnostic tool in inherited errors of mitochondrial fatty acid beta-oxidation]. *An Pediatr (Barc).* 2007 Dec;67(6):548–52.
21. Hoffmann L, Haussmann U, Mueller M, Spiekerkoetter U. VLCAD enzyme activity determinations in newborns identified by screening: a valuable

- tool for risk assessment. *J Inherit Metab Dis.* 2012 Mar;35(2):269–77.
22. Aoyama T, Uchida Y, Kelley RI, Marble M, Hofman K, Tonsgard JH, et al. A novel disease with deficiency of mitochondrial very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993 Mar 31;191(3):1369–72.
23. Izai K, Uchida Y, Orii T, Yamamoto S, Hashimoto T. Novel fatty acid beta-oxidation enzymes in rat liver mitochondria. I. Purification and properties of very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase. *J Biol Chem.* 1992 Jan 15;267(2):1027–33.
24. Vellekoop P, Diekman EF, van Tuijl I, de Vries MMC, van Hasselt PM, Visser G. Perioperative measures in very long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Mol Genet Metab.* 2011 May;103(1):96–7.
25. Aoyama T, Souris M, Ueno I, Kamijo T, Yamaguchi S, Rhead WJ, et al. Cloning of human very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase and molecular characterization of its deficiency in two patients. *Am J Hum Genet.* 1995 Aug;57(2):273–83.
26. Houten SM, Wanders RJA. A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid β -oxidation. *J Inherit Metab Dis.* 2010 Oct;33(5):469–77.
27. Moczulski D, Majak I, Mamczur D. An overview of beta-oxidation disorders. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2009 Jan;63:266–77.
28. Kompare M, Rizzo WB. Mitochondrial fatty-acid oxidation disorders. *Semin Pediatr Neurol.* 2008 Sep;15(3):140–9.
29. Osorio JH, Pourfarzam M. [Early diagnosis of neurometabolic diseases by tandem mass spectrometry. Acylcarnitine profile from cord blood]. *Rev Neurol.* 2004;38(1):11–6.
30. Kølvraa S, Gregersen N, Christensen E, Hobolth N. In vitro fibroblast studies in a patient with C6-C10-dicarboxylic aciduria: evidence for a defect in general acyl-CoA dehydrogenase. *Clin Chim Acta.* 1982 Nov 24;126(1):53–67.
31. Manning NJ, Olpin SE, Pollitt RJ, Webley J. A comparison of [9,10- 3 H]palmitic and [9,10- 3 H]myristic acids for the detection of defects of fatty acid oxidation in intact cultured fibroblasts. *J Inherit Metab Dis.* 1990 Jan;13(1):58–68.
32. Osorio JH, Lluch M, Ribes A. Analysis of organic acids after incubation with (16-2H3)palmitic acid in fibroblasts from patients with mitochondrial beta-oxidation defects. *J Inherit Metab Dis.* 2003 Jan;26(8):795–803.

