

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso em Farmácia

EFEITOS DOS ÁCIDOS 3-HIDROXIDECANÓICO, 3-HIDROXIDODECANÓICO, 3-HIDROXITETRADECANÓICO E 3-HIDROXIPALMÍTICO SOBRE PARÂMETROS RESPIRATÓRIOS EM PREPARAÇÕES MITOCONDRIAIS DE CORAÇÃO DE RATOS JOVENS

Fernanda Hermes Hickmann

Porto Alegre, Junho de 2012

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso em Farmácia

EFEITOS DOS ÁCIDOS 3-HIDROXIDECANÓICO, 3-HIDROXIDODECANÓICO, 3-HIDROXITETRADECANÓICO E 3-HIDROXIPALMÍTICO SOBRE PARÂMETROS RESPIRATÓRIOS EM PREPARAÇÕES MITOCONDRIAS DE CORAÇÃO DE RATOS JOVENS

Fernanda Hermes Hickmann

Trabalho de Conclusão de Curso em Farmácia

Dr. César Augusto João Ribeiro

Orientador

Prof. Dr. Moacir Wajner

Co-orientador

Porto Alegre, Junho de 2012

**Artigo escrito de acordo com as normas da revista “Molecular Genetics and
Metabolism”**

Efeitos dos ácidos 3-hidroxi-decanoico, 3-hidroxi-dodecanoico, 3-hidroxi-tetradecanoico e 3-hidroxi-palmitico sobre parâmetros respiratórios em preparações mitocondriais de coração de ratos jovens

Fernanda Hermes Hickmann^a, Anelise Miotti Tonin^a, Mateus Grings^a, Estela Natacha Brandt Busanello, Moacir Wajner^{a,b}, César Augusto João Ribeiro^a

^aDepartamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

^bServiço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil.

Autor correspondente: César Augusto João Ribeiro, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600 - Anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil. Tel: +55 51 33085572. Fax: +55 51 33085539, E-mail: cesar.ribeiro@ufrgs.br

Resumo

O acúmulo de ácidos graxos 3-hidroxiados de cadeia longa é a característica bioquímica principal das deficiências da desidrogenase das 3-hidroxiacilas-CoA de cadeia longa e da proteína trifuncional. Essas doenças são caracterizadas clinicamente por sintomas neurológicos, bem como fraqueza muscular e cardiomiopatia. Levando em consideração que pouco se sabe sobre a fisiopatologia do dano cardíaco característico dessas doenças, o objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos *in vitro* do ácido 3-hidroxiodecanóico (3HDCA), 3-hidroxiodecanóico (3HDDA), 3-hidrotetradecanóico (3HTA) e 3-hidroxi palmítico (3HPA) nas concentrações de 10 a 100 μM sobre os parâmetros respiratórios estados 3 e 4 e razão do controle respiratório (RCR) medidos através do consumo de oxigênio em preparações mitocondriais de coração de ratos jovens. Observamos que os ácidos 3HDCA e 3HDDA não modificaram os parâmetros analisados. No entanto, o 3HTA e o 3HPA aumentaram o estado 4 da respiração e o RCR, sem alterar o estado 3. Estes resultados indicam que o 3HTA e o 3HPA comprometem a homeostase mitocondrial, agindo como desacopladores da fosforilação oxidativa. É possível, portanto, que esses efeitos possam estar envolvidos nas anormalidades cardíacas encontradas em pacientes afetados por estas doenças.

Palavras-chave: mitocôndria, coração, desidrogenase das 3-hidroxiacilas-CoA de cadeia longa, MTP, parâmetros respiratórios

Lista de Abreviações:

3HDCA - ácido 3-hidroxicanóico

3HDDA - ácido 3-hidroxicanóico

3HTA - ácido 3-hidrotetradecanóico

3HPA - ácido 3-hidroxipalmitico

CPT I - carnitina palmitoil transferase I

CPT II - carnitina palmitoil transferase II

LCHAD - desidrogenase das 3-hidroxiacilas-CoA de cadeia longa

MCAD - desidrogenase de acilas-CoA de cadeia média

MTP - proteína trifuncional

RCR - razão de controle respiratório

VLCAD - desidrogenase das acilas-CoA de cadeia muito longa

1. Introdução

Ácidos graxos de cadeia longa provenientes da dieta ou mobilizados a partir do tecido adiposo durante a lipólise são convertidos a ésteres de acil-CoA próximos a membrana mitocondrial externa pela enzima acil-CoA tioesterase. Após, são transportados para a matriz mitocondrial onde são metabolizados por β -oxidação. Para ácidos graxos de cadeia longa, o primeiro passo da β -oxidação é catalisado pela desidrogenase das acilas-CoA de cadeia muito longa (VLCAD), enquanto que as reações enzimáticas subsequentes são catalisadas pela proteína trifuncional mitocondrial (MTP). Defeitos genéticos no complexo da MTP, que abrange três atividades enzimáticas, podem causar uma deficiência isolada na desidrogenase das 3-hidroxiacilas-CoA de cadeia longa (LCHAD), com atividade normal ou parcialmente reduzida das atividades enzimáticas de tiolase e hidratase, ou uma deficiência no complexo MTP, com redução na atividade de todas as três enzimas [1, 2]. A prevalência estimada das deficiências LCHAD/MTP é de aproximadamente 1:110.000 recém-nascidos vivos [3].

Os pacientes afetados por essas doenças apresentam sintomas como vômitos, recusa alimentar, convulsão, letargia, coma, hipotonia, retardo no desenvolvimento motor, disfunção hepática e retinopatia. Além disso, é verificada uma alta incidência de cardiomiopatia com alterações da frequência cardíaca [4]. Em biópsia de músculo esquelético de pacientes foram encontradas infiltrações de ácidos graxos, bem como anormalidades na morfologia mitocondrial e na função dos complexos da cadeia respiratória, indicando disfunção mitocondrial [5].

Bioquimicamente, os pacientes apresentam episódios graves de hipoglicemia hipocetótica, acidemia láctica e o acúmulo de ácidos graxos de cadeia longa

hidroxilada, como os ácidos 3-hidroxi-decanoico (3HDCA), 3-hidroxi-dodecanoico (3HDDA), 3-hidroxi-tetradecanoico (3HTA) e 3-hidroxi-palmitico (3HPA) em líquidos biológicos, especialmente quando em jejum prolongado, infecções e outras formas de estresse metabólico.

Há duas hipóteses para explicar o fato de que o início da apresentação dos sintomas ocorre no período neonatal e a alta mortalidade nas deficiências da MTP e da LCHAD: a toxicidade dos metabólitos acumulados e a depleção energética devido ao bloqueio da β -oxidação.

Neste contexto, há alguns estudos descrevendo efeitos tóxicos *in vitro* de ácidos graxos e seus derivados hidroxilados em tecidos animais. Foi demonstrado que hidroxiacilas-CoA de cadeia longa inibem a síntese de ATP, o translocador de nucleotídeos de adenina, além de transportadores mitocondriais de ácidos dicarboxílicos, bem como enzimas da cadeia respiratória em preparações mitocondriais de fígado de ratos [6, 7]. Além disso, os 3-hidroxiácidos de cadeia longa foram capazes de alterar parâmetros respiratórios, tais como estados 3 e 4 da respiração mitocondrial, bem como o potencial de membrana e o conteúdo de NAD(P)H em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens [8]. Esses achados sugerem que a acidemia láctica descrita em pacientes afetados por essas doenças se deve a um possível distúrbio no sistema fosforilante causado pelo aumento intramitocondrial de acilas-CoA de cadeia longa hidroxilada [9, 10].

Além disso, Saudubray e colaboradores [11] analisaram o perfil patológico de 107 pacientes portadores de diversos erros inatos do catabolismo de ácidos graxos revelando que pacientes com deficiências nas enzimas carnitina palmitoil transferase I (CPT I) e desidrogenase de acilas-CoA de cadeia média (MCAD) não apresentaram nenhuma alteração cardíaca, enquanto que os pacientes com deficiências da LCHAD,

MTP, carnitina palmitoil transferase II (CPT II) e VLCAD tiveram diversas apresentações de cardiomiopatia, uma possível evidência de que o acúmulo de ácidos graxos de cadeia longa e seus derivados podem estar envolvidos no dano cardíaco característico dessas doenças.

Considerando que pouco se sabe sobre a fisiopatogenia da disfunção cardíaca apresentada pelos pacientes e que os metabólitos acumulados nessas doenças têm sido relatados como possivelmente tóxicos, o objetivo desse trabalho foi investigar os efeitos *in vitro* dos 3-hidroxiácidos 3HDCA, 3HDDA, 3HTA e 3HPA (10-100 μ M), sobre os parâmetros respiratórios estados 3 e 4 e razão do controle respiratório (RCR) medidos através do consumo de oxigênio em preparações mitocondriais de coração de ratos jovens.

2. Material e Métodos

2.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar de 30 dias de vida criados no biotério do Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS. Os animais foram mantidos em ciclo de 12 h claro / escuro em uma sala com temperatura controlada de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, com livre acesso à água e comida (ração comercial Supra, contendo 20% de proteínas P/P). Os experimentos realizados seguiram o “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (publicação do NIH N° 80-23, revisado em 1996) e as normas do “Canadian Council on Animal Care (CCAC)”. Todos os esforços foram realizados para minimizar o número de animais utilizados e o seu sofrimento.

2.2 Reagentes

Todos os reagentes utilizados no presente trabalho foram adquiridos do SIGMA (St. Louis, MO, USA). Os 3-hidroxiácidos de cadeia longa foram dissolvidos e diluídos no tampão utilizado na técnica no dia da realização dos ensaios e tiveram seu pH ajustado a 7,4.

2.3 Preparação da amostra

O isolamento da fração mitocondrial foi realizado de acordo com Ferranti e colaboradores [12]. Os animais foram sacrificados por decapitação com guilhotina e sem anestesia, a caixa torácica foi aberta e o coração retirado rapidamente, lavado em tampão de isolamento contendo manitol 225 mM, sacarose 75 mM, EGTA 1 mM e HEPES 10 mM, pH 7,4, para remover o sangue em excesso, cortado e colocado na presença de 2-4 mg de protease por 10 min em gelo. O excesso de protease foi removido com o mesmo tampão utilizado contendo 1mg/mL de albumina bovina. O coração foi então homogeneizado manualmente e centrifugado a 600 x g por 5 min a 4 °C. O sobrenadante resultante foi novamente centrifugado a 9000 x g por 8 min a 4 °C. O sedimento obtido foi lavado duas vezes e centrifugado a 9000 x g por 10 min a 4 °C. O sedimento final foi ressuspensão em 400 µL do mesmo tampão sem EGTA, resultando em preparações com 10mg/ml de proteína.

2.4 Avaliação dos parâmetros respiratórios

A taxa de consumo de oxigênio foi medida utilizando-se um eletrodo de Clark em um meio de incubação com agitação magnética e temperatura controlada (37 °C). Os ácidos 3HDCA, 3HDDA, 3HTA ou 3HPA, nas concentrações de 10-100 µM, foram adicionados ao meio de incubação no começo do ensaio. O experimento foi realizado com 0,2 mg . mL⁻¹ de proteína mitocondrial na presença dos substratos glutamato e malato (2,5 mM cada) ou succinato (5,0 mM) em tampão contendo 300 mM de sacarose, 5 mM de KH₂PO₄, 1 mM de EGTA, 0,1% de albumina bovina e 5 mM de MOPS (pH 7,4). O estado 4 é o estado mitocondrial basal, caracterizado por consumo baixo de oxigênio sem disponibilidade de ADP. Por outro lado, o estado 3 é o estado ativo, com alto consumo de oxigênio e suprimento suficiente de ADP. Após a depleção de substratos endógenos, o estado 3 da respiração mitocondrial foi medido com adição de 1 mM de ADP. Posteriormente à estabilização do consumo de oxigênio, foi adicionado ao meio de incubação 1 µg . mL⁻¹ de oligomicina A, inibidor da ATP sintase, para induzir o estado 4 da respiração mitocondrial. A função mitocondrial foi inferida através do RCR, que é aceito como indicador do acoplamento entre a cadeia de transporte de elétrons e a síntese de ATP. O RCR foi calculado como a razão entre estado 3 e estado 4. Somente preparações mitocondriais com RCR superior a 4 foram utilizadas para esses experimentos. Os resultados dos estados 3 e 4 da respiração celular foram expressos em nmol de O₂ consumido . min⁻¹ . mg de proteína⁻¹.

2.5 Dosagem de proteínas

O conteúdo proteico das amostras foi determinado de acordo com o método de Bradford [13] usando albumina sérica bovina como padrão.

2.6 Análise estatística

Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão e foram analisados através de análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan. A análise estatística foi realizada através do programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 19.

3. Resultados

Neste estudo analisamos parâmetros respiratórios em preparações mitocondriais de coração de ratos para identificar possíveis alterações causadas pelos metabólitos acumulados na deficiência da LCHAD/MTP.

Assim, determinamos a influência do 3HDCA, 3HDDA, 3HTA e 3HPA sobre parâmetros respiratórios avaliados pelo consumo de oxigênio. Pode-se observar que as mitocôndrias de coração de ratos incubadas nas condições descritas neste trabalho estão acopladas, pois a taxa de consumo de oxigênio ficou 4-10 vezes maior na presença de ADP (estado 3) quando comparada ao estado 4, aonde é adicionado ao meio oligomicina A, um inibidor da ATP sintase.

Não observamos diferenças significativas nos parâmetros estado 3, estado 4 bem no RCR com o 3HDCA e 3HDDA em preparações mitocondriais utilizando

tanto succinato quanto glutamato/malato como substratos (Figuras 1 e 2, painéis A e B, respectivamente).

No entanto, observamos que o 3HTA e o 3HPA aumentaram o estado 4 de maneira dose dependente em mitocôndrias de coração de rato utilizando tanto glutamato/malato (3HTA: $F(4,10)=68,45$, $P<0,001$; $\beta = 0,850$, $P<0,001$; 3HPA: $F(4,20)=32,25$, $P<0,001$; $\beta = 0,845$, $P<0,001$) quanto succinato como substratos (3HTA: $F(4,10)=6,45$, $P<0,01$; $\beta = 0,810$, $P<0,001$ 3HPA: $F(4,10)=57,97$, $P<0,001$; $\beta = 0,903$, $P<0,001$), sem modificarem o estado 3 (Figuras 1 e 2, painéis C e D, respectivamente). Estes dois metabólitos também foram capazes de diminuir o RCR [glutamato/malato: 3HTA $F(4,10)=39,88$; $P<0,001$; 3HPA: $F(4,20)=6,10$; $P<0,01$; succinato: 3HTA: $F(4,10)=8,84$; $P<0,01$; 3HPA: $F(4,10)=49,25$] (Figura 3, painéis C e D).

4. Discussão

A maior parte do ATP produzido no cérebro é gerado pela glicólise e fosforilação oxidativa, sendo que uma diminuição na produção de ATP é um reflexo de disfunção mitocondrial, podendo ocasionar estados patológicos e doenças neurodegenerativas [14]. Já no coração, uma parcela significativa da energia é obtida através da oxidação de ácidos graxos.

Recentemente foi proposto que ácidos graxos acumulados, como o 3HDCA, 3HDDA, 3HTA e o 3HPA e seus derivados podem desempenhar um papel importante na fisiopatologia nas deficiências da MTP e da LCHAD [15]. Ventura e colaboradores [6] demonstraram que alguns derivados de acilas-CoA de cadeia longa inibem a síntese de ATP e o consumo de oxigênio (estado 3) em mitocôndrias de fígado. Além

disso, Tonin e colaboradores [16] demonstraram que 3-hidroxiácidos de cadeia longa comprometem o metabolismo energético e induzem estresse oxidativo em cérebro de ratos jovens. Por outro lado, pouco se sabe sobre os mecanismos fisiopatológicos, especialmente os responsáveis pelas alterações cardíacas apresentadas por esses pacientes.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi o de investigar mecanismos que pelos quais os metabólitos acumulados na LCHAD podem influenciar o metabolismo mitocondrial no coração. Para tal, mitocôndrias isoladas foram utilizadas para a determinação de parâmetros respiratórios, tais como os estados 3 e 4 e o RCR na presença dos ácidos 3HDCA, 3HDDA, 3HTA e 3HPA.

Nossos resultados demonstram que o 3HTA e o 3HPA aumentaram significativamente o estado 4 da respiração e diminuíram o RCR em concentrações micromolares no coração dos animais. Estes dados sugerem que estes ácidos graxos se comportam como desacopladores da fosforilação oxidativa. Interações com transportadores aniônicos, com fosfolipídeos da membrana mitocondrial ou com os lipídeos da membrana mitocondrial interna, que levariam a alterações na fluidez de membrana e na sua permeabilidade a íons [17-21], podem estar relacionadas com o efeito desacoplador destes ácidos graxos. Já o 3HDCA e 3 o HDDA não tiveram nenhum efeito sobre esses parâmetros, indicando um efeito seletivo do 3HTA e do 3HPA.

Nossos dados indicam que 3-hidroxiácidos de cadeia longa acumulados nas deficiências da LCHAD e da MTP comprometem a homeostase mitocondrial podendo explicar, ao menos em parte, a acidose láctica, as alterações na atividade dos complexos da cadeia respiratória e anormalidades mitocondriais descritas em pacientes afetados por essas doenças [5]. Estes dados também reforçam a hipótese de

que o acúmulo intramitocondrial de ácidos graxos e seus derivados podem estar envolvidos na cardiomiopatia presente em pacientes afetados [22].

5. Conclusão

Neste trabalho foi demonstrado pela primeira vez que os ácidos 3HTA e 3HPA que se acumulam nas deficiências da LCHAD e MTP provocam disfunção mitocondrial em coração de ratos jovens, agindo como desacopladores da fosforilação oxidativa. Presumimos que esses efeitos podem estar envolvidos nas anormalidades cardíacas encontradas em pacientes afetados por estas doenças.

Declaração de conflitos de interesses

Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado financeiramente pelo CNPq, PRONEX II, FINEP, Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net) # 01.06.0842-00, INCT-EN.

Legendas das figuras

Figura 1. Efeitos dos ácidos 3-hidroxi-decanoico (3HDCA), 3-hidroxi-dodecanoico (3HDDA), 3-hidroxi-tetradecanoico (3HTA) e 3-hidroxi-palmitico (3HPA) sobre o consumo de oxigênio estimulado por ADP (estado 3) em preparações mitocondriais (0,2 mg. mL⁻¹) de coração de ratos utilizando glutamato/malato ou succinato como substratos. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão para quatro experimentos independentes e estão expressos em nmol O₂.min⁻¹.mg proteína⁻¹. Não foram observadas diferenças significativas (ANOVA de uma via).

Figura 2. Efeitos dos ácidos 3-hidroxi-decanoico (3HDCA), 3-hidroxi-dodecanoico (3HDDA), 3-hidroxi-tetradecanoico (3HTA) e 3-hidroxi-palmitico (3HPA) sobre o consumo de oxigênio não estimulado por ADP (estado 4) em preparações mitocondriais (0,2 mg. mL⁻¹) de coração de ratos utilizando glutamato/malato ou succinato como substratos. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão para quatro experimentos independentes e estão expressos em nmol O₂.min⁻¹.mg proteína⁻¹. * P < 0,05; ** P < 0,01 comparado com o grupo controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Duncan).

Figura 3. Efeitos dos ácidos 3-hidroxi-decanoico (3HDCA), 3-hidroxi-dodecanoico (3HDDA), 3-hidroxi-tetradecanoico (3HTA) e 3-hidroxi-palmitico (3HPA) sobre a razão de controle respiratório (RCR) em mitocôndrias de coração de ratos utilizando glutamato/malato ou succinato como substratos. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão para quatro experimentos independentes. * P < 0,05; ** P < 0,01 comparado com o grupo controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Duncan).

Figura 1

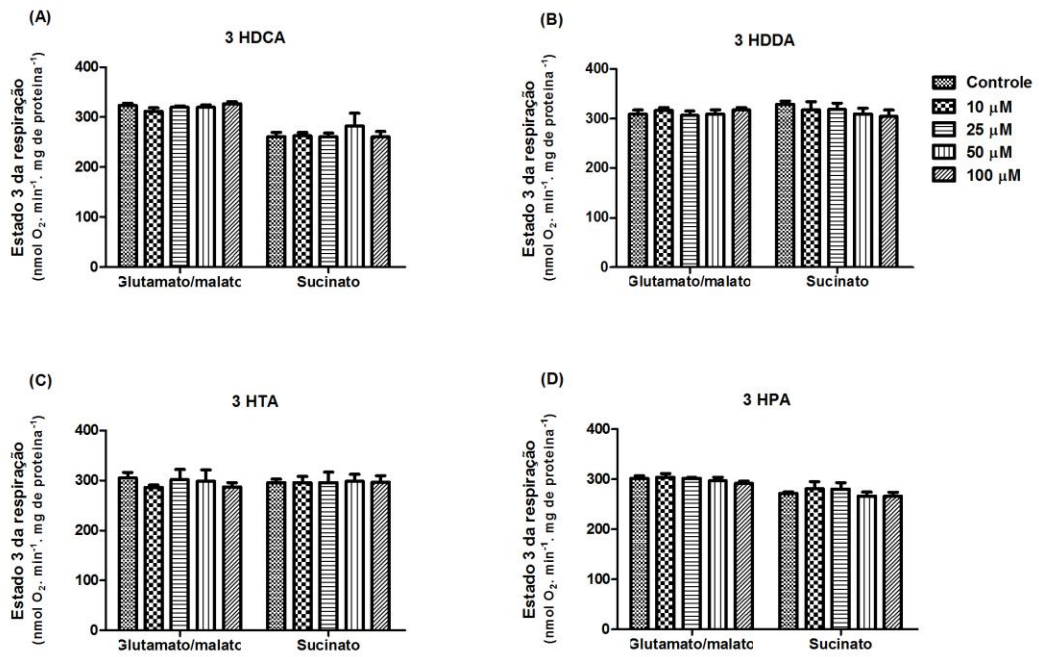


Figura 2

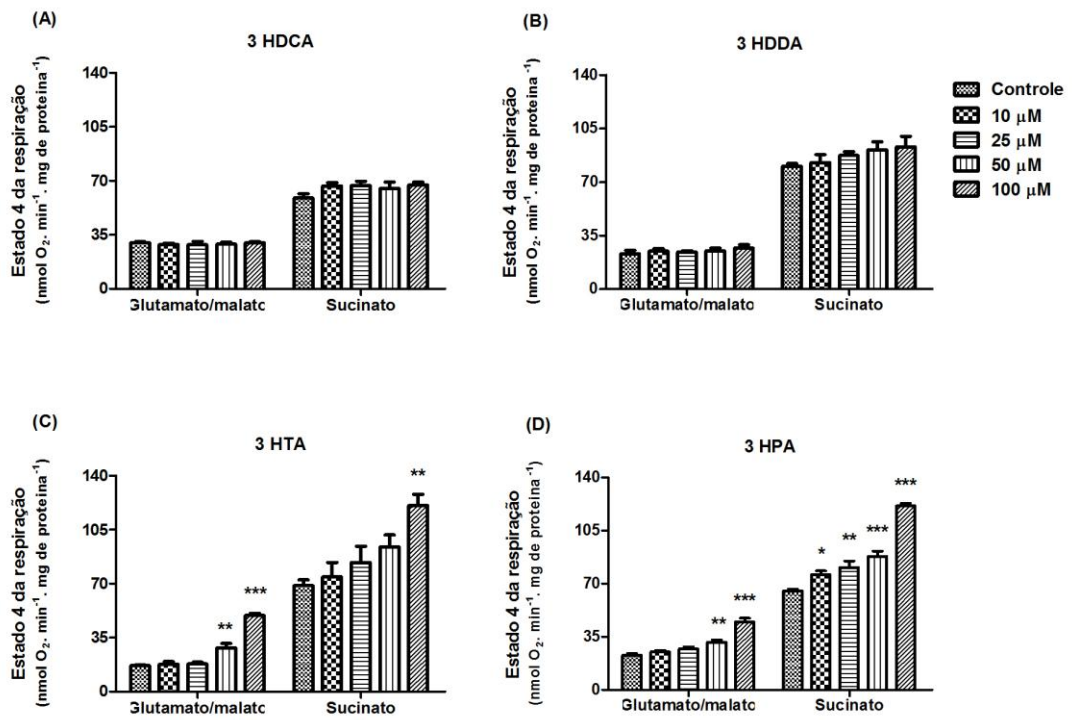
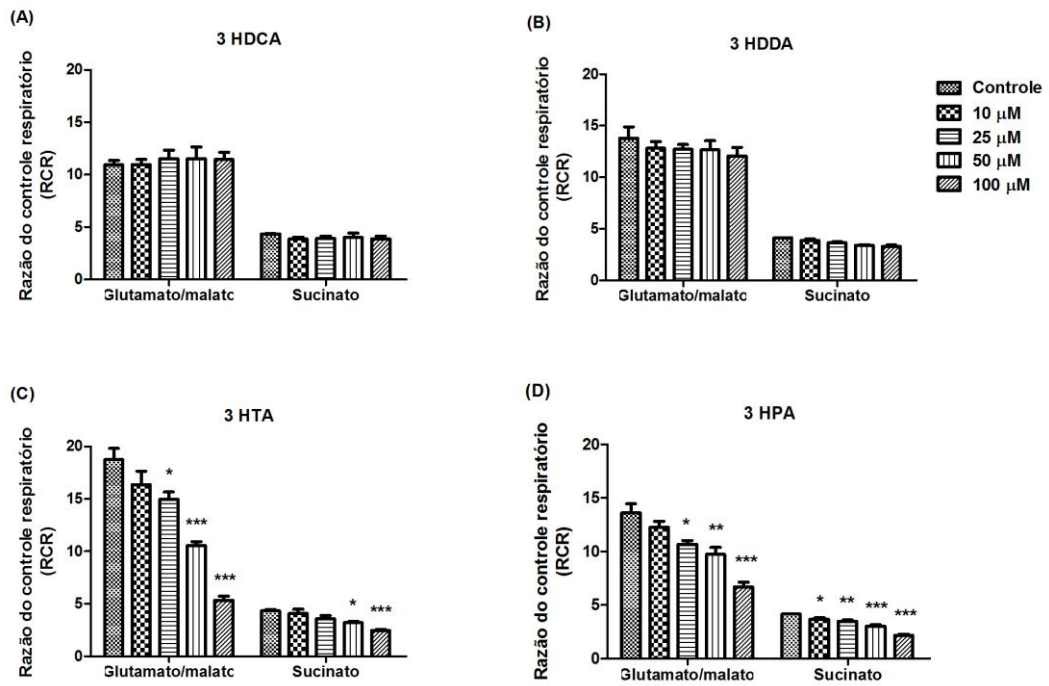


Figura 3



Lista de Referências

- [1] P. Rinaldo, K. Raymond, A. al-Odaib, M.J. Bennett, Clinical and biochemical features of fatty acid oxidation disorders *Curr. Opin. Pediatr.* 10 (1998) 615-621.
- [2] M. Kompare, W.B. Rizzo, Mitochondrial fatty-acid oxidation disorders *Semin. Pediatr. Neurol.* 15 (2008) 140-149.
- [3] J. Sander, S. Sander, U. Steuerwald, N. Janzen, M. Peter, R.J. Wanders, I. Marquardt, G.C. Korenke, A.M. Das, Neonatal screening for defects of the mitochondrial trifunctional protein *Mol. Genet. Metab.* 85 (2005) 108-114.
- [4] A.M. Behrend, C.O. Harding, J.D. Shoemaker, D. Matern, D.J. Sahn, D.L. Elliot, M.B. Gillingham, Substrate oxidation and cardiac performance during exercise in disorders of long chain fatty acid oxidation *Mol. Genet. Metab.* 105 (2012) 110-115.
- [5] T. Tyni, A. Majander, H. Kalimo, J. Rapola, H. Pihko, Pathology of skeletal muscle and impaired respiratory chain function in long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency with the G1528C mutation *Neuromuscul. Disord.* 6 (1996) 327-337.
- [6] F.V. Ventura, J. Ruiter, L. Ijlst, I.T. de Almeida, R.J. Wanders, Differential inhibitory effect of long-chain acyl-CoA esters on succinate and glutamate transport into rat liver mitochondria and its possible implications for long-chain fatty acid oxidation defects *Mol. Genet. Metab.* 86 (2005) 344-352.
- [7] F.V. Ventura, I. Tavares de Almeida, R.J. Wanders, Inhibition of adenine nucleotide transport in rat liver mitochondria by long-chain acyl-coenzyme A beta-oxidation intermediates *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 352 (2007) 873-878.
- [8] A.M. Tonin, G.C. Ferreira, M. Grings, C.M. Viegas, E.N. Busanello, A.U. Amaral, A. Zanatta, P.F. Schuck, M. Wajner, Disturbance of mitochondrial energy homeostasis caused by the metabolites accumulating in LCHAD and MTP deficiencies in rat brain *Life Sci.* 86 (2010) 825-831.
- [9] F.V. Ventura, J.P. Ruiter, I.J. L, I.T. de Almeida, R.J. Wanders, Lactic acidosis in long-chain fatty acid beta-oxidation disorders *J. Inherit. Metab. Dis.* 21 (1998) 645-654.
- [10] M.E. den Boer, R.J. Wanders, A.A. Morris, I.J. L, H.S. Heymans, F.A. Wijburg, Long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: clinical presentation and follow-up of 50 patients *Pediatrics* 109 (2002) 99-104.
- [11] J.M. Saudubray, D. Martin, P. de Lonlay, G. Touati, F. Poggi-Travert, D. Bonnet, P. Jouvét, M. Boutron, A. Slama, C. Vianey-Saban, J.P. Bonnefont, D. Rabier, P. Kamoun, M. Brivet, Recognition and management of fatty acid oxidation defects: a series of 107 patients *J. Inherit. Metab. Dis.* 22 (1999) 488-502.
- [12] R. Ferranti, M.M. da Silva, A.J. Kowaltowski, Mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel opening decreases reactive oxygen species generation *FEBS Lett.* 536 (2003) 51-55.
- [13] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-254.
- [14] G.F. Hoffmann, J. Zschocke, W.L. Nyhan, *Inherited metabolic diseases: a clinical approach* Springer Verlag, 2009.
- [15] N. Gregersen, B.S. Andresen, C.B. Pedersen, R.K. Olsen, T.J. Corydon, P. Bross, Mitochondrial fatty acid oxidation defects--remaining challenges *J. Inherit. Metab. Dis.* 31 (2008) 643-657.

- [16] A.M. Tonin, M. Grings, E.N. Busanello, A.P. Moura, G.C. Ferreira, C.M. Viegas, C.G. Fernandes, P.F. Schuck, M. Wajner, Long-chain 3-hydroxy fatty acids accumulating in LCHAD and MTP deficiencies induce oxidative stress in rat brain *Neurochem. Int.* 56 (2010) 930-936.
- [17] H.K. Kimelberg, D. Papahadjopoulos, Effects of phospholipid acyl chain fluidity, phase transitions, and cholesterol on (Na⁺ + K⁺)-stimulated adenosine triphosphatase *J. Biol. Chem.* 249 (1974) 1071-1080.
- [18] M.Y. Abeywardena, J.S. Charnock, Modulation of cardiac glycoside inhibition of (Na⁺ + K⁺)-ATPase by membrane lipids. Difference between species *Biochim. Biophys. Acta* 729 (1983) 75-84.
- [19] P. Schonfeld, H. Struy, Refsum disease diagnostic marker phytanic acid alters the physical state of membrane proteins of liver mitochondria *FEBS Lett.* 457 (1999) 179-183.
- [20] E.N. Mokhova, L.S. Khailova, Involvement of mitochondrial inner membrane anion carriers in the uncoupling effect of fatty acids *Biochemistry (Mosc.)* 70 (2005) 159-163.
- [21] A.G. Lee, Model for action of local anaesthetics *Nature* 262 (1976) 545-548.
- [22] F.V. Ventura, C.G. Costa, E.A. Struys, J. Ruiten, P. Allers, L. Ijlst, I. Tavares de Almeida, M. Duran, C. Jakobs, R.J. Wanders, Quantitative acylcarnitine profiling in fibroblasts using [U-13C] palmitic acid: an improved tool for the diagnosis of fatty acid oxidation defects *Clin. Chim. Acta* 281 (1999) 1-17.