

## Determinación de ácidos grasos de cadena muy larga en suero por cromatografía gaseosa acoplada a la espectrometría de masas.

## Determination of long-chain fatty acids in serum by gas chromatography coupled to mass spectrometry.

Lauro Nuevas Paz,<sup>I</sup> Ivette Camayd Viera.<sup>II</sup>

### Resumen

La cuantificación de los ácidos grasos de cadena muy larga es fundamental en el diagnóstico de varias enfermedades peroxisomales, en particular de aquellas donde se afecta la  $\beta$ -oxidación peroxisomal de los ácidos grasos. En este trabajo se describe la implementación de un método analítico para la determinación de estos marcadores en suero por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas. Además, se analizaron muestras de pacientes con impresión diagnóstica de adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X. Se obtuvieron las condiciones experimentales adecuadas para la separación y cuantificación de los ácidos grasos C22:0, C24:0 y C26:0 en suero, que son marcadores bioquímicos de varias de enfermedades peroxisomales. La aplicación de este método permitió confirmar el diagnóstico de tres pacientes con impresión diagnóstica de adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X y su aplicación en la práctica permitirá al sistema cubano de salud contar con un nuevo parámetro de laboratorio en el diagnóstico de las enfermedades peroxisomales.

**Palabras clave:** Adrenoleucodistrofia, ácidos grasos de cadena muy larga, diagnóstico, cromatografía gaseosa, espectrometría de masas.

### Abstract

The quantification of long-chain fatty acids is fundamental for the diagnosis of several peroxisome disorders, particularly those in which the  $\beta$ -oxidation peroxisome of fatty acids is affected. In this work the implementation of an analytical method for the determination of these markers in serum by gas chromatography coupled to mass spectrometry is described. Besides, samples from patients with a diagnostic impression of adrenoleukodystrophy linked to the X chromosome were analyzed. The necessary experimental conditions were achieved for the separation and quantification of C22:0, C24:0 and C26:0 fatty acids in serum, which are biochemical markers of various peroxisome diseases. The application of this method allowed confirming the diagnosis of three patients with a diagnostic impression of adrenoleukodystrophy linked to the X chromosome. The application of the method in daily practice will allow the Cuban medical system to count on a new laboratory parameter for the diagnosis of peroxisome disorders.

**Keywords:** Adrenoleukodystrophy, long-chain fatty acids, diagnosis, gas chromatography, mass spectrometry.

<sup>I</sup> Doctor en Ciencias Farmacéuticas. Ingeniero Químico. Investigador Auxiliar. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana, Cuba. E-mail: [lauro@cngen.sld.cu](mailto:lauro@cngen.sld.cu).

<sup>II</sup> Máster en Ciencias en Bioinformática. Licenciada en Bioquímica. Investigador Agregado. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana, Cuba.

## **Introducción**

Los peroxisomas son organelos presentes en las células eucariotas esenciales en varios procesos metabólicos; entre ellos la catálisis de las reacciones de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos saturados de cadena muy larga (AGCML), los ácidos grasos ramificados y los ácidos biliares.<sup>1</sup> En la actualidad se conocen 17 errores innatos del metabolismo peroxisomal que se agrupan en dos grupos fundamentales: (1) los trastornos de la biogénesis de los peroxisomas, con ausencia de estos organelos y disfunción de varias enzimas; y (2) los defectos monoenzimáticos, con peroxisomas normales y deficiencia de una enzima peroxisomal única.

La adrenoleucodistrofia, (ALD-X, MIM 300100)<sup>2</sup> con un patrón de herencia ligado al cromosoma X, es la enfermedad peroxisomal más frecuente. En este sentido, se estima que la prevalencia de la ALD-X es de 3,5/100 000<sup>3</sup> y la incidencia de 1/17 000 recién nacidos.<sup>4</sup> La ALD-X se produce por mutaciones en el gen *ABCD1*, que codifica para una proteína que participa en el transporte de los esqueletos carbonados durante la oxidación peroxisomal de los AGCML.<sup>1</sup>

Según la *X-linked Adrenoleukodystrophy Database* (<http://www.x-ald.nl>)<sup>5</sup> se han descrito más de 1 500 mutaciones en *ABCD1*, el 44 % son no recurrentes y más del 75 % de ellas afecta la síntesis de la proteína. La ALD es variable desde el punto de vista clínico, y es posible encontrar fenotipos distintos incluso dentro de la misma familia.<sup>6</sup>

Las variantes clínicas más frecuentes en varones son la forma cerebral infantil (35-40 % de los individuos afectados), la adrenomieloneuropatía (40-45 %) y la enfermedad de Addison (10 %); además, entre un 20 y un 50 % de las mujeres heterocigotas presenta una mieloneuropatía de moderada a severa que se asemeja a una adrenomieloneuropatía, y su aparición se ha relacionado con el envejecimiento.<sup>7</sup>

La forma cerebral infantil y la juvenil son las más severas, con un desarrollo normal en edades tempranas y una degeneración rápida a un estado vegetativo.<sup>8</sup> En estos casos en particular se recomienda el trasplante de progenitores hematopoyéticos, que puede detener la diésmelenización si se realiza en estadios iniciales, pero no es eficaz si la enfermedad está avanzada.<sup>9,10</sup> Además, hay tres casos de ALD-X que han sido tratados exitosamente con terapia génica.<sup>11</sup> Los resultados del tratamiento son tan alentadores que se han desarrollado métodos para el diagnóstico de ALD-X en muestras de sangre seca en papel de filtro, para su pesquisa neonatal masiva.<sup>12-14</sup>

El diagnóstico de las enfermedades peroxisomales

se realiza a través de algoritmos complejos que implican el uso de datos clínicos, los niveles de ácidos grasos saturados de cadena muy larga (AGCML) y otros marcadores bioquímicos, estudios enzimáticos en cultivos de fibroblastos y pruebas de genética molecular.<sup>15</sup> Los AGCML de 24 a 26 átomos de carbono aumentan en todas las enfermedades peroxisomales, excepto en aquellas donde no se afecta la  $\beta$ -oxidación peroxisomal de los ácidos grasos; por tanto, su cuantificación se encuentra entre los análisis de laboratorio de primera línea cuando se sospecha de una enfermedad peroxisomal. En el caso particular de la ALD-X, el 100 % de los varones afectados y el 85 % de las mujeres portadoras presentan AGCML elevados en plasma.<sup>16-18</sup>

El objetivo de este trabajo es el desarrollo de un método analítico para cuantificar ácido docosanóico (C22:0), tetracosanóico (C24:0), y hexacosanóico (C26:0); y su aplicación en el diagnóstico de pacientes cubanos con impresión diagnóstica de forma cerebral de ALD-X.

## **Métodos**

### *Reactivos*

El cloroformo, metanol, n-hexano y el cloruro de acetilo fueron suministrados por Merck. Los patrones de referencia de los esteres metílicos de los ácidos grasos nonadecanóico (C19:0), docosanóico (C22:0), tetracosanóico (C24:0), hexacosanóico (C26:0) y heptacosanóico (C27:0) todos con una pureza mínima de 99 % fueron adquiridos de Sigma-Aldrich.

### *Pacientes y controles*

Se utilizaron como control negativo veinte muestras de suero de donantes adultos voluntarios sin trastornos metabólicos o nutricionales aparentes. Se analizaron además muestras de ocho pacientes con impresión diagnóstica de ALD-X en su forma cerebral infantil, remitidos por especialistas de genética y neurología del Hospital Pediátrico Juan Manuel Márquez de La Habana, del Instituto de Neurología y Neurocirugía y del Centro Provincial de Genética de Holguín.

En todos los casos, se pidió el consentimiento informado a los pacientes o sus tutores legales, así como a los individuos que participaron como controles negativos.

### *Obtención de las muestras*

Las muestras de suero se obtuvieron por venopunción, en tubos sin anticoagulantes, en controles y pacientes con un ayuno superior a las seis horas. El suero se obtuvo por centrifugación a 2 000 g durante 10

minutos y las muestras de suero se conservaron a -20 °C hasta su procesamiento y análisis.

#### *Preparación de las muestras*

Las muestras de los pacientes con sospecha clínica de ADL-X, de los controles negativos y los patrones de referencia se prepararon de acuerdo con el procedimiento descrito por Moser y cols.<sup>19</sup>

#### *Condiciones de análisis*

La determinación de AGCML se realizó en un cromatógrafo gaseoso acoplado a un espectrómetro de masas Shimadzu modelo QP2010S. La separación cromatográfica de los esteres metílicos de los ácidos grasos se llevó a cabo en una columna DB-5 MS de 30 metros de largo y 1 µm de espesor de fase. Como gas portador se utilizó helio a un flujo de 1 mL/min. El gradiente de temperatura utilizado fue el siguiente: 0-5 min 150 °C, 5-20 min 150-280 °C, de 20-30 min 280-320 °C. Los tiempos de retención y los espectros de masa de cada marcador se obtuvieron a partir de los patrones comerciales. La adquisición de los cromatogramas y de los espectros de masas se realizó utilizando el modo SCAN en un intervalo de masas de 50 a 700 u.m.a.

#### **Validación del método**

##### *Especificidad*

Para garantizar la especificidad del método se empleó el monitoreo selectivo de iones (SIM). Se analizaron por CG capilar, en las condiciones propuestas para el método, los patrones de cada uno de los esteres metílicos de los ácidos grasos estudiados y se obtuvieron sus espectros de masa y tiempos de retención.

##### *Aplicabilidad del sistema*

Se realizaron seis réplicas de inyección de una muestra de suero con concentraciones conocidas de cada uno de los ácidos grasos estudiados preparada de acuerdo con la metodología de preparación de las muestras. A partir de los cromatogramas obtenidos, se determinó la repetibilidad de la inyección, dada por el CV (%) de la determinación cuantitativa ( $n = 6$ ), la que debía ser  $< 0,5\%$ .

##### *Linealidad*

El estudio de linealidad se realizó en el intervalo 14-120 nmol/L de C22:0; 10-130 nmol/L de C24:0 y 1-10 nmol/L de C26:0. Para ello se prepararon 6 concentraciones de cada patrón por dilución seriada

de las soluciones de los patrones en la matriz de suero. En cada caso se obtuvo el área del pico del marcador de interés y del patrón interno (C27:0). Se calculó la relación de áreas y la media, la desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación (CV) para cada concentración. Los parámetros de la recta – valores estimados de la pendiente (b) y del intercepto (a), sus significaciones estadísticas, la varianza residual constante y los coeficientes de correlación (r) y determinación ( $r^2$ ), se determinaron a través del programa estadístico STATGRAPHICS. Se realizó un análisis de homogeneidad de varianza prueba G de Cochram para determinar el tipo de regresión a emplear. Como criterios de linealidad se consideraron el coeficiente de correlación ( $r \geq 0,99$ ), el coeficiente de variación de los factores de respuesta  $\leq 5\%$ , la desviación estándar relativa de la pendiente  $\leq 2\%$ , y el cero incluido en los límites de confianza del intercepto para un 95 % de confiabilidad.

##### *Precisión*

Se analizaron nueve réplicas de la matriz de suero con una concentración conocida de cada uno de los ácidos grasos estudiados y se le determinó la concentración, por el mismo técnico, en el mismo día y equipo. El resultado se expresó como coeficiente de variación (CV). Se determinaron además los límites de confianza de la concentración para una probabilidad de 95 %.

##### *Exactitud*

El estudio de exactitud se determinó a partir del recobrado de los ácidos grasos C22:0, C24:0, C26:0 y el ácido heptacosanóico (C27:0), que se utilizó como patrón interno. Se preparó una matriz de suero a partir de los controles negativos. Se procesaron nueve réplicas de esta matriz a 40 µg/mL de cada uno de los ácidos estudiados y se usaron como blanco otras nueve alícuotas de suero, pero sin la adición de las sustancias de referencia. Se prepararon además nueve réplicas de disoluciones en n-hexano de los patrones a esta misma concentración. El recobrado se obtuvo según:  $R(\%) = \frac{Ai - Ab}{Ar} * 100$

donde  $R (\%)$  es el porcentaje de recobrado; mientras que  $Ai$ ,  $Ab$  y  $Ar$  representan las áreas del pico cromatográfico de la réplica, el blanco o la disolución en n-hexano correspondientes a cada patrón, respectivamente. El recobrado obtenido en cada punto se comparó con el 100 % mediante la prueba t de Student para un 95 % de confianza.

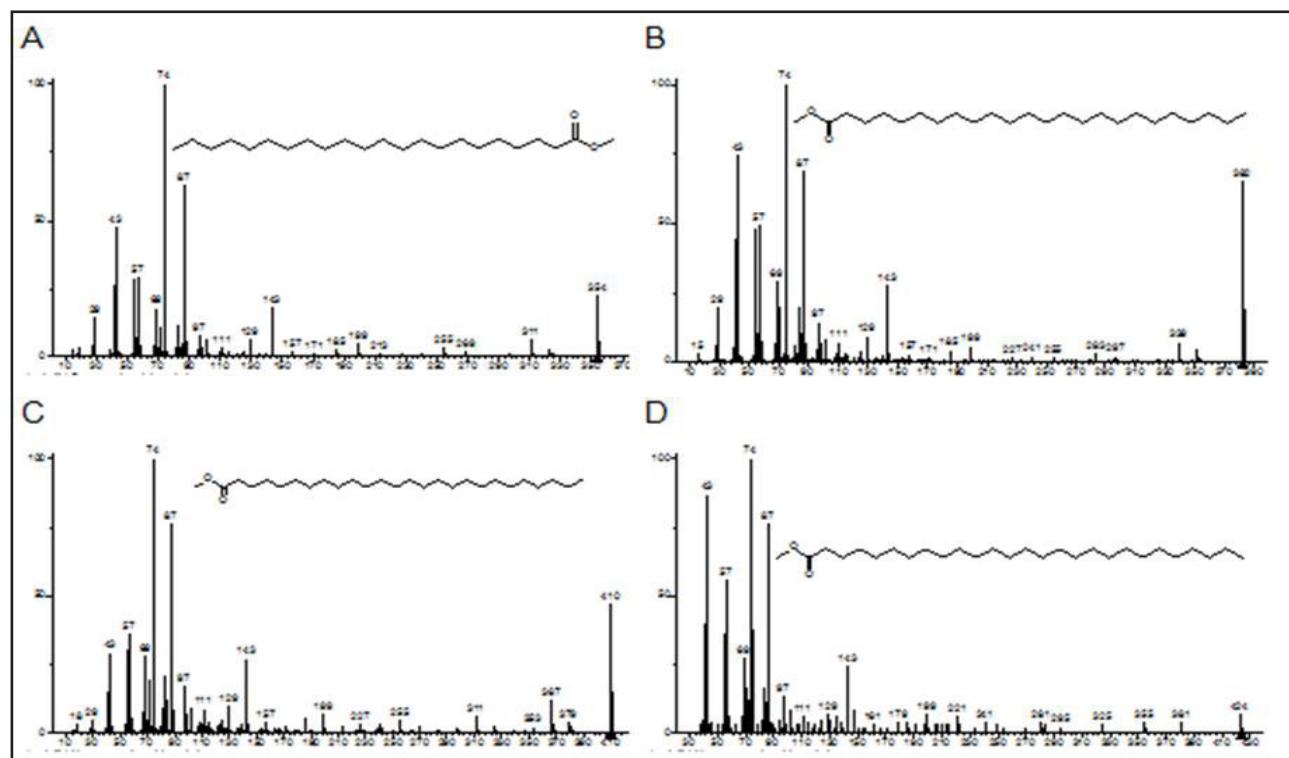
## Resultados y Discusión

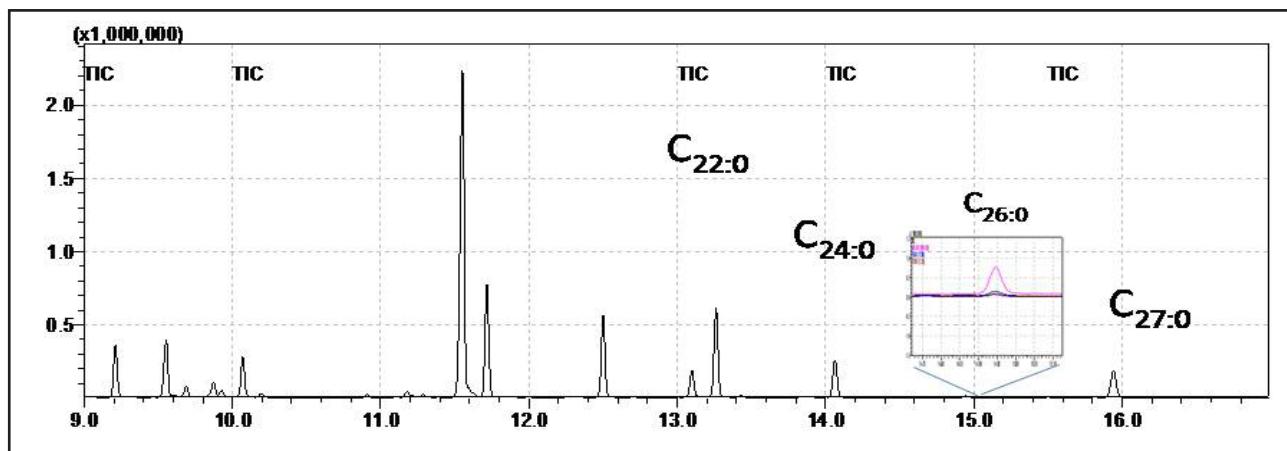
### Especificidad del método

Los espectros de masa de los AGCML, adquiridos en modo SCAN una vez metilados los patrones, permitió comprobar que coincidían con los descritos

en las bases de datos de espectrometría de masas por ionización electrónica, lo cual a su vez indica que el proceso de derivatización fue satisfactorio. La selección de los iones se realizó de acuerdo con los espectros de masa de cada compuesto (Figura 1).

**Figura 1.** Espectros de masas de los ácidos grasos ácidos docosanóico (A), tetracosanóico (B), hexacosanóico (C) y heptacosanóico (D).



**Figura 2.** Perfil de ácidos grasos de un control negativo.

El procesamiento de los controles negativos permitió detectar niveles endógenos de C22:0 y C24:0 en modo SCAN; pero no se detectó el C26:0 debido a la baja concentración en que este se encuentra en la muestra. No obstante, la adquisición en modo SIM permitió cuantificar a C26:0 en los controles negativos; por tanto, la adquisición de los datos en modo SIM bajo las condiciones descritas permitió una mayor sensibilidad y especificidad en la cuantificación, a partir de la medición de los iones específicos para cada compuesto.

#### *Aplicabilidad del sistema*

El CV de la determinación cuantitativa (0,16 %) cumplió con el límite establecido (0,5 %), por lo que el sistema se encontraba en condiciones de ser utilizado para la realización el resto de los ensayos

#### **Linealidad del método**

Los parámetros de la ecuación de regresión ( $y = mx + b$ ) obtenida en el ensayo de linealidad para cada uno de los ácidos grasos estudiados se muestran en la tabla 1. Los intervalos de confianza (IC) de cada uno de los parámetros se calcularon para una probabilidad ( $p$ ) de 0,05.

**Tabla 1.** Resultados del estudio de linealidad para los ácidos estudiados.

Ácido graso	$m (\pm IC)$	$b (\pm IC)$	$r$
(C22:0)	0,0086 ( $\pm 0,0004$ )	0,0005 ( $\pm 0,0009$ )	0,9995
(C24:0)	0,58 ( $\pm 0,09$ )	0,0513 ( $\pm 0,065$ )	0,9986
(C26:0)	0,0084 ( $\pm 0,0005$ )	0,0003 ( $\pm 0,0005$ )	0,9978

El coeficiente de correlación fue de 0,999, lo que indicó la existencia de una correlación positiva con

una probabilidad superior al 99,9 %. En la prueba de linealidad se encontró que el CV de los factores de respuesta y de la pendiente, fueron menores que los límites de aceptación establecidos (5 %) para cada ácido graso estudiado.<sup>20</sup> En la prueba de proporcionalidad se pudo comprobar que no existía sesgo, pues el intervalo de confianza del intercepto incluye el cero en todos los casos, por lo que se puede afirmar que el método es lineal y proporcional en todo el intervalo de concentraciones estudiado para cada uno de los ácidos grasos.

El error de estimación del método, calculado partir de los factores de respuesta para cada uno de los ácidos grasos estudiados, fue de 4,65 %, es decir, inferior al 5 %. Asimismo, se determinó que la concentración de los ácidos grasos en la muestra no influye en la variabilidad de los resultados mediante un análisis de homogeneidad de varianza, realizado a partir de la prueba G de Cochram ( $G_{exp} < G_{tab}$ ).<sup>20</sup>

#### *Precisión*

En el estudio de precisión intermedia realizado para las concentraciones estudiadas, el error relativo global de la determinación fue de 3,5 % para el C22:0; 4,1 % para el C24:0 y 5,6 % para el C26:0. Estos resultados son satisfactorios si se tiene en cuenta que se está trabajando en concentraciones en el orden de los  $\mu\text{g/L}$ , para las cuales se aceptan errores relativos globales menores del 15 %.<sup>21</sup>

#### *Exactitud*

En el ensayo de recobrado no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras cargadas con cada uno de los ácidos grasos estudiados y las muestras placebo. Para todos los ácidos grasos el valor de recobrado se encuentra

dentro del intervalo de 90-110 %, valores que se consideran satisfactorios.<sup>20</sup>

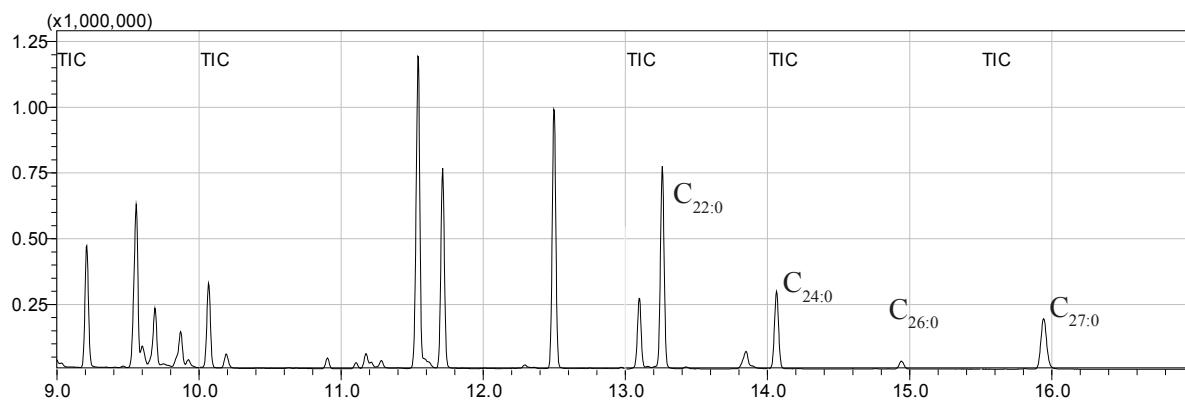
#### Aplicación

Teniendo en cuenta los resultados alcanzados, el método fue aplicado en muestras de suero de pacientes cubanos con impresión diagnóstica de ALD-X. Todos los casos mostraban cuadros neurodegenerativos y una RMN que sugiere alteraciones en la sustancia blanca del sistema nervioso central. Tres de los varones estudiados mostraron valores de concentración de AGCML que sugieren una ALD-X. A modo de

ejemplo, en la figura 3, se muestra el cromatograma de un paciente con sospecha clínica de ALD-X.

En la figura 3 se observa claramente la presencia de los ácidos grasos C22:0, C24:0 y C26:0, a diferencia del cromatograma del control negativo (Figura 2) para el que no se aprecia la presencia del C26:0. La relación de concentración entre los ácidos C24:0 y C26:0 con respecto a C22:0 paciente fue de 1,86 y 0,09 respectivamente. Estos valores se encuentran dentro del intervalo descrito en individuos afectados con ALD-X (Tabla 2).<sup>8</sup>

**Figura 3.** Cromatograma correspondiente a un paciente con sospecha clínica de ALD-X.



**Tabla 2.** Valores de referencia de la relación de concentraciones entre los ácidos C24:0 y C26:0 con respecto a C22:0.<sup>8</sup>

AGCML	Normal	Hombres con X-ALD	Portadoras obligadas
C26:0 $\mu$ g/mL	1	0,23 $\pm$ 0,09	1,30 $\pm$ 0,45
C24:0/C22:0	2	0,84 $\pm$ 0,10	1,71 $\pm$ 0,23
C26:0/C22:0	2	0,01 $\pm$ 0,004	0,07 $\pm$ 0,03

La aplicación del método que se describe para la cuantificación de AGCML permitió diagnosticar tres casos positivos, todos varones. El motivo de indicación de los tres pacientes refería cuadros neurodegenerativos, compromiso de la sustancia blanca en los estudios de RMN y niveles disminuidos de cortisol, elementos característicos de la forma cerebral de la ALD-X. Aunque los AGCML aumentan en otras enfermedades peroxisomales, estas tienen cuadros clínicos diferentes a la ALD-X. Por tanto, el aumento de los niveles de AGCML en estos pacientes sugiere que padecen la enfermedad.

Los niveles de AGCML pueden variar en dependencia de la dieta y proporcionar falsos negativos en pacientes

afectados.<sup>22,23</sup> En consecuencia, para el diagnóstico es necesario tener en cuenta las condiciones nutricionales en los momentos de la extracción y repetir muestras de aquellos pacientes en los cuales la evidencia clínica es muy sugestiva de la enfermedad.

Se recomienda además solicitar suero a la madre de los pacientes varones con ALD-X, que debe ser portadora de la enfermedad y tener valores intermedios.<sup>24</sup>

La aplicación del método cromatográfico descrito en este trabajo, junto con una caracterización clínica adecuada de los pacientes, permitirá introducir la cuantificación de AGCML en los esquemas de diagnóstico de las enfermedades peroxisomales. La cuantificación de AGCML permite identificar todas

las variantes de ADL-X en el 100 % de los varones afectados, antes de la aparición de los síntomas, y el 85 % de las mujeres portadoras.<sup>8</sup> En consecuencia, la cuantificación de AGCML en familias de riesgo debe realizarse independientemente de la edad o la sintomatología de los pacientes, debido a la posibilidad de detección de casos adicionales con ALD-X (incluso

con otras variantes clínicas de la enfermedad) y el tratamiento de casos asintomáticos o con signos leves para evitar o retrasar la aparición de los síntomas. Por otro lado, la detección de mujeres heterocigotas permite proporcionar asesoramiento genético y diagnóstico prenatal en parejas con riesgo.

## Referencias bibliográficas

1. Amorosi CA, Treslova H, Dodelson de Kremer R, Coll MJ, Dvorakova L, Oller Ramirez AM. Novel human pathological mutations. Gene symbol: ABCD1. Disease: X-linked adrenoleukodystrophy. *Hum Genet*. 2011;127(4):486.
2. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. [último acceso: abril de 2013.]. Disponible en: <http://omim.org/>.
3. Orphanet Report Series-Prevalence of rare diseases: Bibliographic data. Última actualización: 2014; disponible en: [http://www.orpha.net/Orphacom/cahiers/docs/GB/Prevalence\\_of\\_rare\\_diseases\\_by\\_alpha.pdf](http://www.orpha.net/Orphacom/cahiers/docs/GB/Prevalence_of_rare_diseases_by_alpha.pdf).
4. Bezman L, Moser AB, Raymond GV, Rinaldo P, Watkins PA, Smith KD, et al. Adrenoleukodystrophy: incidence, new mutation rate, and results of extended family screening. *Ann Neurol*. 2001;49(4):512-7.
5. X-linked Adrenoleukodystrophy Database. [último acceso: febrero de 2013]. Disponible en: <http://www.x-ald.nl/>.
6. Coll MJ, Palau N, Camps C, Ruiz M, Pampols T, Giros M. X-linked adrenoleukodystrophy in Spain. Identification of 26 novel mutations in the ABCD1 gene in 80 patients. Improvement of genetic counseling in 162 relative females. *Clin Genet*. 2005;67(5):418-24.
7. Moser H, Smith K, Watkins P, Powers J, Moser A. X-linked adrenoleukodystrophy. En: Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 3257-301.
8. Steinberg SJ, Moser AB, Raymond GV. X-Linked Adrenoleukodystrophy. En: Pagon RA, Adam MP, Bird TD, editores. *GeneReviews™*. University of Washington, Seattle (WA); consultado el: 2 de diciembre de 2013; disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1315/>.
9. Niizuma H, Uematsu M, Sakamoto O, Uchiyama T, Horino S, Onuma M, et al. Successful cord blood transplantation with reduced-intensity conditioning for childhood cerebral X-linked adrenoleukodystrophy at advanced and early stages. *Pediatr Transplant*. 2011;16(2):E63-70.
10. Polgreen LE, Chahla S, Miller W, Rothman S, Tolar J, Kivistö T, et al. Early diagnosis of cerebral X-linked adrenoleukodystrophy in boys with Addison's disease improves survival and neurological outcomes. *Eur J Pediatr*. 2011;170(8):1049-54.
11. Cartier N, Aubourg P. Hematopoietic stem cell transplantation and hematopoietic stem cell gene therapy in X-linked adrenoleukodystrophy. *Brain Pathol*. 2010;20(4):857-62.
12. Theda C, Gibbons K, Defor TE, Donohue PK, Golden WC, Kline AD, et al. Newborn screening for X-linked adrenoleukodystrophy: Further evidence high throughput screening is feasible. *Mol Genet Metab*. 2014.
13. Sandlers Y, Moser AB, Hubbard WC, Kratz LE, Jones RO, Raymond GV. Combined extraction of acyl carnitines and 26:0 lysophosphatidylcholine from dried blood spots: prospective newborn screening for X-linked adrenoleukodystrophy. *Mol Genet Metab*. 2012;105(3):416-20.
14. Haynes CA, De Jesus VR. Improved analysis of C26:0-lysophosphatidylcholine in dried-blood spots via negative ion mode HPLC-ESI-MS/MS for X-linked adrenoleukodystrophy newborn screening. *Clin Chim Acta*. 2012;413(15-16):1217-21.
15. Shimozawa N. Molecular and clinical findings and diagnostic flowchart of peroxisomal diseases. *Brain Dev*. 2011;33(9):770-6.
16. Berger J, Gartner J. X-linked adrenoleukodystrophy: clinical, biochemical and pathogenetic aspects. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1763(12):1721-32.
17. Engelen M, Kemp S, de Visser M, van Geel BM, Wanders RJ, Aubourg P, et al. X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD): clinical presentation and guidelines for diagnosis, follow-up and management. *Orphanet J Rare Dis*. 2012;7:51.
18. Moser AB, Kreiter N, Bezman L, Lu S, Raymond GV, Naidu S, et al. Plasma very long chain fatty acids in 3,000 peroxisome disease patients and 29,000 controls. *Ann Neurol*. 1999;45(1):100-10.
19. Moser H, Moser A. Measurement of Saturated Very Long Chain Fatty Acids in Plasma. En: Hommes FA, editor. *Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics*. New York: Wiley-Liss, Inc.; 1991. p. 177-91.
20. ICH Steering Committee. International Conference of Harmonization (ICH). Validation of Analytical Procedures:Text and Methodology. consultado el: 25 de julio de 2014; disponible en: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf).

21. Huber L. Validation and qualification in analytical laboratories. Inc IP, editor.; 1999.
22. Cappa M, Bizzarri C, Petroni A, Carta G, Cordeddu L, Valeriani M, et al. A mixture of oleic, erucic and conjugated linoleic acids modulates cerebrospinal fluid inflammatory markers and improve somatosensorial evoked potential in X-linked adrenoleukodystrophy female carriers. *J Inherit Metab Dis.* 2011;35(5):899-907.
23. Poulos A, Gibson R, Sharp P, Beckman K, Grattan-Smith P. Very long chain fatty acids in X-linked adrenoleukodystrophy brain after treatment with Lorenzo's oil. *Ann Neurol.* 1994;36(5):741-6.
24. Steinberg SJ, Kemp S, Braiterman LT, Watkins PA. Role of very-long-chain acyl-coenzyme A synthetase in X-linked adrenoleukodystrophy. *Ann Neurol.* 1999;46(3):409-12.