

ORIGINALES

Identificación de mutaciones en el gen *CPT2* en un caso con déficit muscular de carnitina palmitoiltransferasa II, ☆, ☆ ☆

Eva Márquez Liétor^a, Rosa Pello Gutiérrez^{a,b}, Sara Jiménez García^{a,b},
Vanesa Castañón Bernardo^a, Joaquín Arenas Barbero^{a,b} y
Miguel A. Martín Casanueva^{a,b,*}

^aLaboratorio de Enfermedades Mitocondriales y Neurometabólicas. Servicio de Bioquímica y Centro de Investigación. Hospital Universitario 12 de Octubre. Madrid. España

^bU723. CIBER de Enfermedades Raras. Madrid. España

Recibido el 2 de abril 2008; aceptado el 6 de junio de 2008

PALABRAS CLAVE

Carnitina palmitoil-
transferasa II;
CPT2;
Diagnóstico
molecular;
Intolerancia al
ejercicio;
Miopatía metabólica

Resumen

Introducción: El déficit de carnitina palmitoiltransferasa II (CPT-II) se debe a mutaciones en el gen *CPT2* y se asocia con 3 fenotipos. La forma adulta o muscular con crisis de mialgia y mioglobinuria es la más frecuente. Los fenotipos infantil y neonatal son multiorgánicos y de mayor gravedad. La mutación común en la forma adulta, *p.S113L*, no se ha descrito en casos de la variante neonatal. Se presenta un caso de forma adulta con mutaciones que previamente se han asociado a fenotipos diferentes.

Paciente y métodos: Paciente de 22 años con episodios recurrentes de calambres musculares y orinas oscuras tras realizar esfuerzos prolongados de moderada intensidad, con una marcada elevación sérica de *srn-creatincinasa* (8.400 U/l) y *mioglobina* (2.800 ng/ml) y cuyo tejido muscular no mostró signos de miopatía. La actividad de CPT-II muscular se valoró radioquímicamente y el gen *CPT2* se amplificó y secuenció en el secuenciador ABI Prism 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA). La mutación *p.R151Q* se confirmó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)-fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP).

Resultados: La actividad de CPT-II fue del 16% respecto del valor inferior de referencia. Se identificaron 2 mutaciones en heterocigosis en el gen *CPT2*: *p.S113L* y *p.R151Q*.

☆ Este trabajo corresponde a una comunicación científica presentada y premiada en el I Congreso Nacional del Laboratorio Clínico celebrado en Sevilla del 17 al 20 de octubre de 2007

☆ ☆ Rosa Pello está financiada por el programa post-Formación Sanitaria CM05/00088 del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Fondo de Investigación Sanitaria (FIS). Sara Jiménez está financiada por un contrato de Técnico de Laboratorio del programa de recursos humanos del CIBER de Enfermedades Raras, ISCIII. Miguel A. Martín es beneficiario en el año 2008 del Programa de Intensificación de la Actividad Investigadora, ISCIII-Agencia Laín Entralgo (Comunidad de Madrid). El trabajo ha sido realizado con fondos de los proyectos de investigación del FIS-ISCIII PI04/0467, FIS06/0547 y de la Fundación Mutua Madrileña 2005-59.

*Autor de correspondencia.

Correo electrónico: mamcasanueva@h12o.es (M.A. Martín Casanueva).

Discusión: La mutación *p.R151Q* únicamente se ha descrito en homocigosis y en heterocigosis compuesta (*p.R151Q* y *p.P227L*) en formas graves, y previamente no se ha asociado *p.S113L* a una forma clínica grave, lo que sugiere que la expresión del alelo *p.S113L* podría compensar los efectos deletéreos de la expresión del alelo *p.R151Q*, dando lugar al fenotipo moderado observado en la paciente.

© 2008 AEEM, AEFA y SEQC. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Carnitine palmitoyl-transferase II;
CPT2;
Molecular diagnosis;
Exercise intolerance;
Metabolic myopathy

Identification of *CPT2* gene mutations in a patient with muscular carnitine palmitoyltransferase II deficiency

Abstract

Introduction: Mutations in the *CPT2* gene cause carnitine palmitoyltransferase (CPT-II) deficiency, which has been associated with three main phenotypes. The most frequent adult muscular form is characterized by recurrent episodes of myalgia and myoglobinuria. The infantile and neonatal variants are severe, multiorgan diseases. The commonest mutation, in the adult form, pS113L, has not been reported so far in neonatal cases. We report on an adult patient presenting with exercise intolerance who harboured mutations previously associated with diverse phenotypes.

Patient and methods: A 22 year-old woman presented with recurrent episodes of muscle cramps and dark urine after prolonged exercise of moderate intensity. She showed elevated serum CK (8400 U/L) and myoglobin (2800 ng/mL) levels. Muscle biopsy did not reveal signs of myopathy. Muscle CPT-II enzyme activity was determined by a radiochemical method. *CPT2* gene was amplified and sequenced in an ABIPrism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). The p.R151Q mutation was confirmed by PCR-RFLP analysis.

Results: The activity of CPT-II was decreased (16% of the reference lower limit). Two heterozygous missense mutations were identified in the *CPT2* gene: p.S113L and p.R151Q.

Discussion: The p.R151Q mutation has been described in homozygous and compound heterozygous (p.R151Q and p.P227L) patients with the severe form. The p.S113L mutation has not been associated with "severe mutations". We suggest that expression of the "benign" p.S113L allele might counteract the deleterious effects of the p.R151Q allele, which may account for the milder phenotype observed in the patient.

© 2008 AEEM, AEFA y SEQC. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La intolerancia al ejercicio es un síntoma frecuente de consulta neurológica. Su etiología es multifactorial pues en la mayoría de las ocasiones forma parte de un cuadro sindrómico más complejo. No obstante, hay miopatías metabólicas que cursan con intolerancia al ejercicio como principal síntoma y cuya etiología bioquímica o genética no se llega a identificar en muchos pacientes, y las mejor estudiadas son algunas deficiencias enzimáticas que intervienen en la generación del ATP celular. Entre ellas destacan las deficiencias del metabolismo glucogenolítico y glucolítico¹, como el déficit de la miofosforilasa (enfermedad de McArdle) que es la más frecuente de todas ellas², el déficit del metabolismo purínico (mioadenilato desaminasa)³ y las alteraciones del metabolismo oxidativo mitocondrial (deficiencias de cadena respiratoria mitocondrial y mutaciones en ADN mitocondrial)⁴ y déficit del metabolismo lipídico, como el déficit de deshidrogenasa de ácidos grasos de cadena larga⁵. Entre estos últimos se encuentra el déficit de la carnitina palmitoiltransferasa (CPT-II)⁶. Algunos datos clínicos, como el tipo de ejercicio que desencadena los

síntomas, y de laboratorio, como los valores de srm-creatincinasa (CK) en reposo, así como la medida de los valores de srm-lactato y srm-amonio ión en la prueba de ejercicio en isquemia en el antebrazo permiten delinear el diagnóstico clínico diferencial¹. Otras pruebas como los tests ergométrico-fisiológicos pueden ayudar al diagnóstico^{7,8}. Al diagnóstico definitivo se llega demostrando el déficit enzimático en tejido muscular o identificando mutaciones en los genes correspondientes en sangre o músculo⁹.

La CPT-II es una proteína homotetramérica que se encuentra en la membrana interna mitocondrial y que facilita el transporte de los ácidos grasos de cadena larga al interior de la matriz mitocondrial junto a la acción de la CPT-I y la acil carnitina translocasa¹⁰. Es una proteína ubicua y únicamente presenta una isoforma codificada por el gen *CPT2* (cromosoma 1p32) que está compuesto por 5 exones¹¹.

La deficiencia muscular de esta enzima es la alteración más frecuente del metabolismo lipídico. Sin embargo, se han descrito 3 fenotipos para la deficiencia de la CPT-II. La forma más prevalente (se han descrito más de 200 casos) es el fenotipo adulto o muscular (MIM 255110)¹² que cursa con

ataques recurrentes de mialgia y frecuentes episodios de mioglobulinuria cuyos agentes precipitantes son el ejercicio físico, el frío, la fiebre o el estrés. Es de destacar que los valores de CK en reposo suelen ser normales. Las otras 2 presentaciones son más raras pero más graves: a) el fenotipo infantil o hepatocardiomiopático (del que se han descrito 16 casos) (MIM:600649)¹³ cuya sintomatología aparece entre los 6 meses y los 2 años de vida, que se caracteriza por hipocetosis, hipoglucemia con afectación multiorgánica llegando a producir fracaso hepático, cardiomiopatía y miopatía periférica, falleciendo la mayoría de los pacientes de forma repentina durante su infancia debido a la afectación cardíaca, y b) el fenotipo neonatal (MIM 608836) cuya presentación es similar a la forma infantil pero acompañada de malformaciones y que se inicia desde pocas horas a 4 días posteriores al nacimiento y es letal durante el primer mes de vida¹³.

El diagnóstico bioquímico y molecular de esta deficiencia se realiza mediante un análisis enzimorradiométrico que demuestra la deficiencia de la actividad enzimática de la CPT-II en músculo o fibroblastos¹⁴, y/o mediante análisis molecular de mutaciones en el gen *CPT2*¹¹. En este sentido, cabe decir que aunque se han descrito más de 60 mutaciones patogénicas, alrededor del 60%^{15,16} de los pacientes con fenotipo muscular presenta la mutación *p.S113L*. Por otro lado, se ha logrado establecer, en cierta medida, algún tipo de asociación para algunas mutaciones con cada uno de los 3 fenotipos descritos^{9,17}.

En este artículo se presenta un caso de forma adulta con mutaciones que previamente se han asociado a fenotipos diferentes.

Paciente y métodos

Paciente

Mujer de 22 años, sin historia familiar de miopatía ni de enfermedad genética que trabajó como monitora de

aeróbic durante el año anterior, que inicia, en un contexto de cuadro febril, con dolor intenso y progresivo en los miembros inferiores mientras ejercía de camarera. Al ingresó en urgencias el electrocardiograma, la imagen radiográfica de tórax y el electromiograma fueron normales. Las pruebas de laboratorio mostraron unos valores de CK de 8.400 U/L (valor de referencia [VR] <170), srm-mioglobina de 2800 ng/ml (VR <74) y srm-creatinina de 0,85 mg/dl (VR <1,1). Presentó una mioglobulinuria intensa. El test de drogas de abuso en orina resultó negativo. Se practicó una biopsia muscular en la que los hallazgos morfológicos no fueron relevantes y no se observaron acúmulos de lípidos ni de glucógeno. Las tinciones histoquímicas demostraron la presencia de actividades de enzimas relacionadas con otras deficiencias que producen intolerancia al ejercicio, como miofosforilasa, fosfofructocinasa y mioadenilato deaminasa.

Métodos

- **Análisis bioquímico.** La actividad de la CPT-II se midió en homogenado de músculo esquelético mediante el método de intercambio isotópico de Norum¹⁴ con adición de 300 nM de palmitoil-carnitina
- **Análisis genético-molecular.** El ADN de músculo se aisló con un método estándar basado en la extracción con fenol-cloroformo tras digestión con proteinasa K recombinante PCR Grade (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Se amplificó la región codificante y las regiones de unión intrón-exón del gen *CPT2* mediante reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR) en 8 fragmentos, dado que el exón 4 se amplificó en 4 fragmentos solapados por su gran tamaño (1.305 pb) (tabla 1), que se purificaron con el kit IllustraTM GFXTM PCR ADN y Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Se secuenciaron ambas hebras del ADN amplificado siguiendo las instrucciones del fabricante del d-Rhodamine Cycle Sequencing Terminador Kit

Tabla 1 Cebadores utilizados para amplificar la región codificante y las regiones adyacentes de las uniones intrón/exón del gen *CPT2*

| Cebador | 5' → 3' | Producto de PCR (pb) | TH (°C) |
|---------|------------------------------------|----------------------|---------|
| CPT1s | CTT GTG TTT AGA CTC CAG AAC TCC C | 292 | 57 |
| CPT1a | gtc atg agt gac tgc agt cag gtt t | | |
| CPT2s | ctt gta aag cta att aac ctc ttc c | 238 | 58 |
| CPT2a | tca cag aca ttc cct gaa gct tgg t | | |
| CPT3s | atg agt tcc tcg cca tga acc taa a | 305 | 58 |
| CPT3a | cgt tac ttc att tgc tgg tct cac c | | |
| CPT4As | ggg aca gca tta aca ttt tat gt | 392 | 55 |
| CPT4Aa | GTT TGG GTA AAC GAG TTG AGT T | | |
| CPT4Bs | CTG GAT ATG TCC CAG TAT TTT CGG CT | 412 | 60 |
| CPT4Ba | TTT GTG CCA TCC CCA TGC AGC ATA T | | |
| CPT4Cs | GAT GAC TTC CCC CAT TAA GGA CCT T | 408 | 60 |
| CPT4Ca | AGG GCT CAG CTT TTG CTT CTT CAG | | |
| CPT4Ds | CTG CTA AGG AAA AGT TTG ATG CCA C | 418 | 60 |
| CPT4Da | tgc tta ccc aag cac tga gga caa | | |
| CPT5s | ttt cct gag gtc ctt ttc cat cct g | 425 | 58 |
| CPT5a | ATG AGG AAG TGA TGG TAG CTT TTC A | | |

PCR: reacción en cadena de la polimerasa. "TH: temperatura de hibridación.

en un secuenciador ABIPrism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA.).

La mutación *p.R151Q* se confirmó mediante el diseño de un método de PCR- fragmentos de restricción de longitud polimórfica (PCR-RFLP) usando los cebadores (tabla 2) y las condiciones de amplificación y digestión con la enzima de restricción *Ava I* descritas previamente¹⁸.

Resultados

La actividad enzimática de la carnitina palmitoiltransferasa II en homogenado muscular fue de $0,04 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}$ proteína no colágena⁻¹ (valor inferior de referencia, $0,25$ ($P_{2.5}$; $n = 30$), representando un 16% de actividad.

Mediante secuenciación del gen *CPT2* en ADN aislado de músculo esquelético se identificaron 2 mutaciones de sentido equivocado, es decir mutaciones que predicen un cambio de aminoácido, en heterocigosis: la mutación común *p.S113L* en el exón 3 (fig. 1A) y otra mutación previamente descrita, *p.R151Q* en el exón 4 (fig. 1B). Esta última mutación se confirmó mediante PCR-RFLP (fig. 1B).

Tabla 2 Cebadores utilizados para crear productos de PCR para posterior digestión enzimática

| Cebador | 5' → 3' | Localización |
|---------|--------------------------|--------------|
| R151Qs | CTGAGTATAATGACCAGCTCACCC | 428-451 |
| R151Qa | AGCCCGGAGTGCTTCAGAAAC | 482-504 |

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

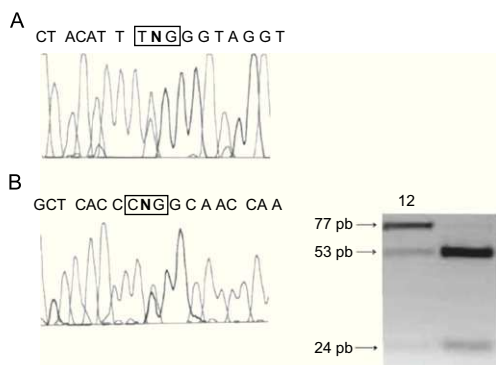


Figura 1 (A) Análisis por secuenciación de la mutación *p.S113L* (c.338C > T) en exón 3 del gen *CPT2*. El recuadro indica el codón 113 alterado. (B) Identificación de la mutación *p.R151Q* (c.452G > A) exón 4 del gen *CPT2*. Izquierda: el recuadro indica el triplete lesionado en la secuenciación del exón 4; derecha: análisis de PCR-RFLP en ADN muscular. Calle 1: paciente; calle 2: control. El amplicón de 77 pb se digirió con la enzima de restricción *Ava I* que genera 2 fragmentos de 53 pb y 24 pb en presencia del alelo normal, mientras que el alelo mutado pierde el sitio de restricción permaneciendo intacto. PCR: reacción en cadena de la polimerasa; RFLP: fragmentos de restricción de longitud polimórfica.

Discusión

Se ha descrito que hay cierta asociación entre cada uno de los 3 fenotipos de deficiencia de CPT II y la presencia de unas determinadas mutaciones¹³. Además, se ha propuesto que la CPT-II se puede asociar con componentes distales de la beta-oxidación, de manera que mutaciones en distintas posiciones de la proteína provocarían una eficiencia variable del sistema de oxidación, o bien afectarían en algún grado a la unión de la enzima a la membrana interna mitocondrial, provocando eficiencias variables de actividad^{13,19,20}. Se ha observado que las mutaciones descritas para el fenotipo muscular se caracterizan porque pueden encontrarse en homocigosis (*p.P50H*, *p.S113L* y *p.R161W*) o en heterocigosis, existiendo siempre, en este caso, una mutación localizada en el exón 4 en heterocigosis compuesta con *p.S113L* (exón 3), la más frecuente del fenotipo adulto, o con *p.P50H* (exón 1). Sin embargo, las formas graves se han asociado con mutaciones que se localizan en los exones 4 y 5 (*p.R151Q*, *p.P227L*, *p.D328G*, *p.F383Y*) las cuales pueden encontrarse en homocigosis o en heterocigosis pero con la peculiaridad de que nunca se han descrito en asociación con las mutaciones *p.S113L* o *p.P50H*. Nuestro caso es una paciente de 22 años con fenotipo muscular en la que se identificó la presencia de 2 mutaciones, *p.R151Q* y *p.S113L*, cuya heterocigosis compuesta no se había descrito anteriormente. Además, la mutación *p.R151Q* (exón 4), únicamente se ha identificado en 2 casos, ambos asociados a un fenotipo grave. El primer caso¹⁸ es un fenotipo neonatal de heterocigosis compuesta para las mutaciones *p.R151Q* y *p.P227L* las cuales únicamente se han documentado hasta ahora en fenotipos graves. El otro paciente fue un caso de fenotipo grave que presentó la mutación *p.R151Q* en homocigosis¹⁰. El hecho de que estos 2 pacientes expresaran formas graves del déficit de CPT II, y que nuestra paciente con la mutación *p.R151Q* asociada con la mutación más frecuente del déficit en el adulto, *p.S113L*, expresara un fenotipo muscular, sugiere que la expresión del alelo *p.S113L* podría, de alguna manera, compensar los efectos deletéreos de la expresión del alelo *p.R151Q* ejerciendo de esta manera un efecto protector contra la aparición del fenotipo grave, como se ha indicado para otras mutaciones¹³.

Por otra parte, un ejemplo de las dificultades de establecer relaciones entre el genotipo y el fenotipo de este déficit es el hecho de que la mutación *p.R631C* se haya descrito en los 3 fenotipos con diferente expresión intrafenotipo²¹, lo que apunta a que podrían haber, además del genotipo, otros factores implicados en el desarrollo de la enfermedad, como factores ambientales, el efecto de diferentes polimorfismos (asociación de polimorfismos *p.V368I* y *p.M647V* con la mutación *p.S113L*)¹⁵, y el sexo, debido a que el fenotipo muscular de herencia autosómica recesiva se manifiesta en un mayor porcentaje en varones que en mujeres.

Recientemente, Corti et al²² han identificado en 2 familias que expresan clínicamente la forma muscular de déficit de CPT II la presencia de heterocigosis compuesta para las mutaciones *p.R151Q* y *p.S113L*. Estos hallazgos confirman que la mutación *p.S113L* puede jugar un papel modulador de los efectos fenotípicos de la mutación *p.R151Q*, e indican que dicha alteración está presente en

diferentes grupos poblacionales, lo que subraya su carácter patogénico.

La identificación molecular de las mutaciones responsables del déficit de CPT2 puede ayudar: *a)* al diagnóstico diferencial con otras IE pues no se dispone de una prueba histoquímica en músculo para el diagnóstico de este déficit, y su diagnóstico bioquímico depende de un método radiactivo; *b)* a comprender la compleja relación entre el genotipo y el rango de severidad de los fenotipos tan variables de este déficit, y *c)* puede tener importantes implicaciones en las predicciones fenotípicas en casos de diagnóstico prenatal.

Bibliografía

1. Arenas J, Martín MA. Intolerancias metabólicas al ejercicio. *Neurología* 2003;18:291–302.
2. Rubio JC, García-Consuegra I, Nogales-Gadea G, Blázquez A, Cabello A, Lucía A, et al. A proposed molecular diagnostic flowchart for myophosphorylase deficiency (McArdle disease) in blood samples from Spanish patients. *Hum Mutat* 2007;28:203–4.
3. Rubio JC, Martín MA, Del Hoyo P, Bautista J, Campos Y, Segura D, et al. Molecular analysis of Spanish patients with AMP deaminase deficiency. *Muscle Nerve* 2000;23:1175–8.
4. Andreu AL, Hanna MG, Reichmann H, Bruno C, Penn AS, Tanji K, et al. Exercise intolerance due to mutations in the cytochrome b gene of mitochondrial DNA. *N Engl J Med* 1999;341:1037–44.
5. Gregersen N, Andersen B, Boulund L, Bross P. Mutation analysis in mitochondrial fatty acid oxidation defects: Exemplified by acyl-CoA dehydrogenase deficiencies, with special focus on genotype-phenotype relationship. *Hum Mutat* 2001;18:169–89.
6. Spiegel R, Shaag A, Gutman A, Korman SH, Saada A, Elpeleg O, et al. Severe infantile type of carnitine palmitoyltransferase II (CPT II) deficiency due to homozygous R503C mutation. *J Inher Metab Dis* 2007;30:266.
7. Haller RG, Vissing J. No spontaneous second wind in muscle phosphofructokinase deficiency. *Neurology* 2004;62:82–6.
8. Maté-Muñoz JL, María M, Pérez M, Lucía A. Favorable responses to acute and chronic exercise in McArdle patients. *Clin J Sport Med* 2007;17:297–303.
9. Simmons Z, Peterlin BL, Boyer PJ, Towfighi J. Muscle biopsy in the evaluation of patients with modestly elevated creatine kinase levels. *Muscle Nerve* 2003;27:242–4.
10. Thuillier L, Rostane H, Droin V, Demangre F, Brivet M, Kadhon N, et al. Correlation between genotype, metabolic data, and clinical presentation in carnitine palmitoyltransferase 2 (CPT2) deficiency. *Hum Mutat* 2003;21:493–501.
11. Martín MA, Rubio JC, Del Hoyo P, García A, Bustos F, Campos Y, et al. Identification of novel mutations in Spanish patients with muscle carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Hum Mutat* 2000;15:579–80.
12. Deschauer MD, Wieser T, Zierz S. Muscle carnitine palmitoyltransferase II deficiency: clinical and molecular genetics features and diagnosis aspects. *Arch Neurol* 2005;62:37–41.
13. Bonnefont JP, Djouadi F, Prip-Boos C, Gobin S, Munnich A, Bastin J. Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects. *Mol Aspects Med* 2004;25:495–520.
14. Norum KR. Palmitoyl-CoA: carnitine palmitoyltransferase. Purification from calf-liver mitochondria and some properties of the enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1964;89:95–108.
15. Olpin SE, Afiti A, Clark S, Manning NJ, Bonham JR, Dalton A, et al. Mutation and biochemical analysis in carnitine palmitoyltransferase type II (CPT II) deficiency. *J Inher Metab Dis* 2003;26:543–57.
16. Martín MA, Rubio JC, Arenas J. Molecular analysis in Spanish patients with muscle carnitine palmitoyltransferase deficiency. *Muscle and Nerve* 1999;22:941–3.
17. Sigauke E, Rakheja D, Kitson K, Bennett MJ. Carnitine palmitoyltransferase II deficiency: a clinical, biochemical and molecular review. *Lab Invest* 2003;83:1543–54.
18. Yang BZ, Ding JH, Dewese T, He G, Wilkinson J, Day DW, et al. Identification of four novel mutations in patients with carnitine palmitoyltransferase II (CPT II) deficiency. *Mol Genet Metab* 1998;64:229–36.
19. Rufer AC, Thome JB, Stihle M, Gsell B, De Roo E, Banner DW, et al. The crystal structure of carnitine palmitoyltransferase 2 and implications for diabetes treatment. *Structure* 2006;14:713–23.
20. Hsiao YS, Jogl G, Esser V, Tong L. Crystal structure of rat carnitine palmitoyltransferase II (CPT II). *Biochem Biophys Res Commun* 2006;346:974–80.
21. Musumeci O, Mohammed A, Coni GP, Rodelico C, Antunno M, Bordoni A, et al. Identification of the infant-type R163C mutation in patients with the benign muscular form of CPT2 deficiency. *Neuromuscul Disord* 2007;17:960–3.
22. Corti S, Bordoni, Ronchi D, Musumeci O, Aguenouz M, Toscano A, et al. Clinical features and new molecular findings in Carnitine Palmitoyltransferase II (CPT II) deficiency. *J Neurol Sci* 2008;266:97–103.