
COMPARACIÓN DE DOS TÉCNICAS COMO HERRAMIENTA DIAGNÓSTICA DE LA DEFICIENCIA DE CARNITINA ACILCARNITINA TRANSLOCASA

José Henry Osorio¹

RESUMEN

Objetivo: comparar dos técnicas como herramientas para el diagnóstico por laboratorio de la deficiencia de carnitina acilcarnitina translocasa, desorden poco frecuente de herencia autosómico recesiva en la oxidación de ácidos grasos. **Materiales y métodos:** los fibroblastos de pacientes y controles fueron incubados con sustratos tritiados y sustratos deuterados. **Resultados:** la oxidación de los sustratos tritiados se encontró muy deprimida en los fibroblastos de pacientes con esta enfermedad; sin embargo, no fue posible establecer un perfil característico para el diagnóstico de la enfermedad utilizando sustratos deuterados. **Conclusión:** la incubación de fibroblastos en presencia de sustratos tritiados constituye una buena herramienta para el diagnóstico por laboratorio de pacientes afectados por la deficiencia de carnitina acilcarnitina translocasa, no así la incubación con sustratos deuterados.

Palabras clave: ácidos grasos, carnitina, metabolismo, errores innatos del metabolismo, fibroblastos, marcaje isotópico.

COMPARISON OF TWO TECHNIQUES AS CARNITINE ACYLCARNITINE TRANSLOCASE DEFICIENCY DIAGNOSIS TOOLS

ABSTRACT

Objective: to compare two laboratory diagnosis techniques for carnitine acylcarnitine translocase deficiency, a rare inherited autosomal recessive disorder in fatty acid oxidation. **Materials and methods:** fibroblasts of patients and controls were incubated with tritiated substrates and deuterated substrates. **Results:** a severe depression for oxidizing the tritiated substrates was observed for the fibroblasts of patients with this disease; however it was not possible to establish a characteristic profile for the diagnosis of the disease using deuterated substrates. **Conclusion:** the incubation of fibroblasts using tritiated substrates constitutes a good tool for laboratory diagnosis of patients suffering carnitine-acylcarnitine translocase deficiency, in contrast, incubation with deuterated substrates does not.

Key words: fatty acids, carnitine, metabolism, inborn errors of metabolism, fibroblasts, isotope labeling.

¹ Departamento de Ciencias Básicas de la Salud, Laboratorio de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Universidad de Caldas. Correo electrónico: jose.osorio_o@ucaldas.edu.co

INTRODUCCIÓN

La carnitina acilcarnitina translocasa (CACT) es el segundo componente de la lanzadera de la carnitina, necesaria para el ingreso de los ácidos grasos de cadena larga, desde el citosol hasta el interior de la mitocondria donde son oxidados. Es una proteína de la membrana interna mitocondrial, necesaria para mediar el transporte de los ésteres de acilcarnitina dentro de la matriz mitocondrial para ser intercambiados por carnitina libre (1).

La proteína consta de 301 residuos de aminoácidos y es codificada por el gen CACT, también conocido como el gen *SLC25A20* (solute carrier family 25, member 20), localizado en el cromosoma 3p21.31, el cual consta de 9 exones y es ampliamente expresado, particularmente en el corazón, el hígado y el músculo esquelético (2,3). La deficiencia de CACT (OMIM 212138) es uno de los defectos más severos de la degradación mitocondrial de los ácidos grasos. La patogénesis de este desorden es una combinación de la deficiencia en la producción de energía por degradación mitocondrial de ácidos grasos y la toxicidad por acumulación de de acilcarnitinas de cadena larga. Usualmente debuta clínicamente durante el período neonatal o durante el primer año de vida con alta mortalidad.

Los hallazgos típicos incluyen cardiomiopatía, arritmias, disfunción hepática, lesión en músculo esquelético, hiperamonemia, hipoglicemia hipocetótica y aciduria dicarboxílica, elevación sanguínea de las acilcarnitinas de cadena larga y deficiencia de carnitina libre. En una proporción significativa de casos, se presenta muerte súbita, probablemente debido a las arritmias, aunque una minoría de casos se presenta de forma tardía, con manifestaciones clínicas no tan severas. Sin embargo, han sido reportados unos pocos casos de pacientes con deficiencia de CACT que han sobrevivido por largo tiempo, siguiendo un protocolo intensivo de manejo, el cual incluye alimentación frecuente o continua con una

fórmula que provee la mayoría de la grasa de la dieta en forma de ácidos grasos de cadena media y no de cadena larga (4,5). El presente estudio busca analizar la producción de agua tritiada en fibroblastos, comparándola con la producción de intermediarios por incubación con sustratos deuterados como herramienta diagnóstica en pacientes con deficiencia de CACT.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio es de tipo experimental. El material biológico empleado en este trabajo ha sido fibroblastos de tres pacientes con deficiencia de CACT. Estas deficiencias fueron previamente confirmadas por estudios enzimáticos, moleculares o ambos. Como controles se utilizaron 20 cultivos diferentes de fibroblastos de personas que no presentaban deficiencia alguna en la degradación de ácidos grasos. El trabajo cumple con los requisitos y aprobaciones de los respectivos comités de ética.

Células utilizadas: fibroblastos de pacientes y controles (4-20 pasajes) fueron cultivados en *bicarbonate-HEPES-buffered Eagle's minimal essential médium* (MEM), suplementado con 10% (v/v) *newborn calf serum*, y 1% (v/v) de antibiótico (gentamicina) a 37°C, en estufa con 5%CO₂/95% de aire. Después de alcanzar el punto de confluencia (80-100%), las células fueron lavadas dos veces con PBS y 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 (*Minimun Essential Medium*). Las células fueron transferidas y centrifugadas a 337 X g (5 min, 20°C) en tubos cónicos de 10 ml (0,8-1,2 mg proteína), quedando listas para ser incubadas en presencia de sustratos tritiados. Se utilizó el método de Lowry *et al.* (6) para la determinación de la proteína.

Preparación de sustratos tritiados: el método utilizado fue el de Manning (6) con modificaciones. Para obtener las mezclas radioactivas se prepararon las siguientes

soluciones: Solución A: ácido palmítico 12,5 mg/1 ml de etanol al 95% o ácido mirístico 12,5 mg/1 ml etanol 95%. Solución B: albúmina 25 mg/ml = 75 mg/30 ml de PBS 1 Reactivo C: ácido [9,10(n)-³H] palmítico (Diluido en tolueno, 50-62 mCi/mmol, 1 mCi/ml) (Amersham) o ácido [9,10(n)-³H] mirístico (Diluido en tolueno, 40-60 Ci/mmol, 1mCi/ml) (Amersham). Se mezcla en un tubo plástico de 3 ml, 25 μ L de A + 3,8 μ L de C (3.8 μ Ci), y el solvente se evapora bajo gas nitrógeno. Se agregan 2,5 ml de B y se analiza la mezcla en el contador de centelleo (LS3801-Beckman), (50 μ l de la solución + 10 ml de líquido de centelleo (Ready Safe). Luego la mezcla es puesta en baño de ultrasonido durante 15 minutos y se lleva a incubación al baño a 37°C durante 40 min, posteriormente se coloca nuevamente en el baño de ultrasonido durante 30 min, y se centrifuga durante 20 min a 5000 rpm. Se traspasa el máximo de volumen sobrenadante a otro tubo plástico de 3 ml, y se analizan 50 μ L de la solución, como se describió anteriormente.

Preparación de columnas de intercambio iónico: para esto pueden ser usadas las resinas Dowex 1 X 8-200 o Dowex 1 X 2-400, se le agrega agua destilada a la resina hasta que se hidrate. Se sellan al mechero pipetas Pasteur, aproximadamente a 3 cm de la punta, y se aísla el cuerpo de la pipeta de la punta, mediante la introducción de algodón comprimido, tratando de que el volumen de algodón ocupe aproximadamente 1 cm. Se toma aparentemente, igual volumen de agua que de resina se lleva a agitación suave, y mientras se agita, se toman 2,5 ml y se depositan cuidadosamente en la pipeta, habiendo previamente humedecido totalmente el algodón con agua milli Q para evitar la retención de burbujas de aire que puedan posteriormente hacer caminos en la resina. Es recomendable conservar las pipetas en posición vertical. Después de depositar la resina, se debe verificar que no queden burbujas de aire y que la pipeta no pierda agua, para que la resina permanezca hidratada; luego, las columnas pueden ser conservadas en refrigeración hasta su uso.

Evaluación de la oxidación de sustratos tritiados por los fibroblastos: se toma el pellet de células previamente resuspendido en 500 μ L de PBS 1. Se utilizan bandejas de incubación con capacidad para 24 pozos. El blanco contiene 40 μ L (0,05 μ Ci) de mezcla radioactiva y 160 μ L de PBS 2, las muestras contienen 60 μ L de células resuspendidas, 40 μ L (0,05 μ Ci) de mezcla radioactiva, y 100 μ L de PBS 2. La bandeja se envuelve en papel de aluminio y se incuba a 37°C durante 4 horas en cámara de CO₂ 5%, aire 95%. La reacción se detiene, colocando la bandeja en hielo y agregando a cada pozo 200 μ L de TCA 10%. El contenido de los pozos se traspasa a tubos para microcentrífuga y se centrifuga a 5000 rpm durante 5 min. 360 μ L de la mezcla son transferidos de nuevo a un tubo de microcentrífuga nuevo que contiene 50 μ L de NaOH 1 M.

Esta mezcla se mantiene en hielo hasta el momento de aplicarla a la columna. Para la aplicación a la columna de intercambio iónico la punta sellada de la pipeta Pasteur (columna) se parte cuidadosamente, se coloca un vial bajo la misma y se deja escurrir su contenido, aplicando luego cuidadosamente 455 μ L de mezcla de reacción a la columna, dejando escurrir nuevamente. Para el goteo se lava la columna tres veces con 500 μ L agua milli Q, recogiendo todo el producto del lavado. Se desecha la columna y se agrega a cada vial 10 ml de líquido de centelleo, agitando fuertemente para su posterior análisis. La prueba t de student fue utilizada para comparar los valores obtenidos de la incubación de fibroblastos controles y los de los pacientes que sufren la deficiencia.

Incubación con sustratos deuterados: en el segundo grupo de experimentos, como sustrato deuterado, fue empleado el ácido²H₃-metilpalmítico (Cambridge Isotope Laboratories). Fueron utilizados los siguientes compuestos deuterados para la preparación de la curva de calibración (Ten Brinx-Free University Amsterdam): [8,8,8-d₃]octanoil-L-carnitina.HCl, [10,10,10-d₃]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. Como estándar interno fue adicionado ácido undecanodióico (Fluka), durante el proceso de extracción de las muestras. Fibroblastos de pacientes y controles (4-20 pasajes) fueron cultivados en bicarbonate-HEPES-buffered Eagle's minimal essential médium (MEM), suplementado con 10% (v/v) newborn calf serum y 1% (v/v) de antibiótico (gentamicina) a 37° C, en estufa con 5% CO₂/95% de aire. Después de alcanzar el punto de confluencia (80-100%), las células fueron lavadas dos veces con PBS y 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 (*Minimum Essential Medium*). Las células fueron transferidas y centrifugadas a 337 X g (5 min, 20°C) en tubos cónicos de 10 ml (0,8-1,2 mg proteína), quedando listas para ser incubadas en presencia de sustratos deuterados. Se utilizó el método de Lowry y *et al.* (6) para la determinación de la proteína.

Oxidación ²H₃-palmitato en fibroblastos: se preparó una solución de medio de cultivo con una concentración final de 0,15 mM de ácido 16-²H₃ palmítico, 1mM BSA, y 0,2 mM L-carnitina. La incubación por los fibroblastos se llevó a cabo de la siguiente manera: después de la tripsinización, las células fueron resuspendidas en MEM enriquecido en frascos *falcom* de 2,5 ml (2 frascos por caso). Después de 72 horas de incubación, el medio de cultivo fue recogido mediante centrifugación y almacenado 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 0-1000 nM, utilizando acilcarnitinas deuteradas en el último carbono, diluidas en MEM ($p < 0,00001$ para cada curva de calibración).

Análisis de los ácidos grasos deuterados de los medios enriquecidos: los análisis de las curvas de calibración y de los productos de la incubación fueron realizados después de la hidrólisis con KOH. Las curvas de calibración se obtuvieron mediante el análisis de la regresión lineal, representando la relación de concentraciones de cada ácido respecto al estándar interno frente a la relación de áreas. Las condiciones de la cromatografía gas-líquido fueron las siguientes: flujo de gas portador (He): 1 ml/min; división de flujo: 1:30; tiempo de splitless: 1min 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: 1μl; tiempo total: 38,5 min.

Las condiciones de la espectrometría de masas fueron las siguientes: el análisis cualitativo se realizó por cromatografía de gases-espectrometría de masas, con impacto electrónico y monitorización selectiva de iones. Para cada ácido se monitorizó el ion M⁺-15, ya que es el ion selectivo y uno de los más abundantes; la ionización se realizó 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. Fue utilizado un cromatógrafo de gases 5890 Series II Plus - Espectrómetro de masas 5972 Series (Hewlett Packard).

RESULTADOS

La Tabla 1 muestra los valores promedio (5 determinaciones por cada muestra) para la oxidación de palmitato y miristato tritriados en nmol/hora/mg proteína y el porcentaje de oxidación de los sustratos tritriados por parte de los fibroblastos de los pacientes con deficiencia de CACT comparados con los controles paralelos. Fue encontrada una diferencia significativa ($P < 0,05$) al comparar la degradación

de palmitato y miristato tritiado entre controles y pacientes con esta deficiencia. Se observó más deprimida la oxidación de palmitato tritiado que la de miristato tritiado. En todas las curvas de calibración para sustratos deuterados, se obtuvo un coeficiente de correlación superior al 0,99. No se obtuvo un perfil característico en los cromatogramas en la deficiencia de CACT

comparado con los controles (Figura 1). Los valores de esta deficiencia no nos permiten diferenciarla con claridad (Tabla 2), toda vez que los valores obtenidos para los pacientes con la deficiencia no son significativamente diferentes de los controles y casi todos los valores se encuentran incluidos en el rango de máximos y mínimos de los mismos.

Tabla 1. Porcentaje de oxidación de [9,10³H]-ácidos grasos en pacientes con deficiencia de carnitina acilcarnitina translocasa.

Deficiencia	n	Oxidación [9,10 ³ H]-palmitato nmol/hora/mg proteína	Oxidación [9,10 ³ H]-miristato nmol/hora/mg proteína	Oxidación [9,10 ³ H]-palmitato %	Oxidación [9,10 ³ H]-miristato %
Controles	20	4,7	4,4	100	100
CACT	3	1,1	1,3	24	29

Tabla 2. Producción de ácidos grasos deuterados en fibroblastos control y de pacientes con deficiencia de carnitina acilcarnitina translocasa , posterior a la incubación con ácido ²H₃-palmítico.

Línea Celular	Ácidos grasos intermediarios (nmol/mg proteína/72 h)								Total
	C8	C10	C12:1	C12	C14:1	C14	C16:1	C16:OH	
Controles Intervalo	16,7 (5,8-28,6)	10,4 (7,8-14,3)	0,8 (0,3-1,3)	5,2 (1,0-17,6)	4,1 (2,8-5,7)	9,2 (2,8-25)	16,9 (11,1-28,6)	nd	63,3 (31,6-121,1)
CACT	2,8	11,7	1,5	1,5	8,3	25	16,6	nd	67,5

Abreviaturas: nd, no detectado.

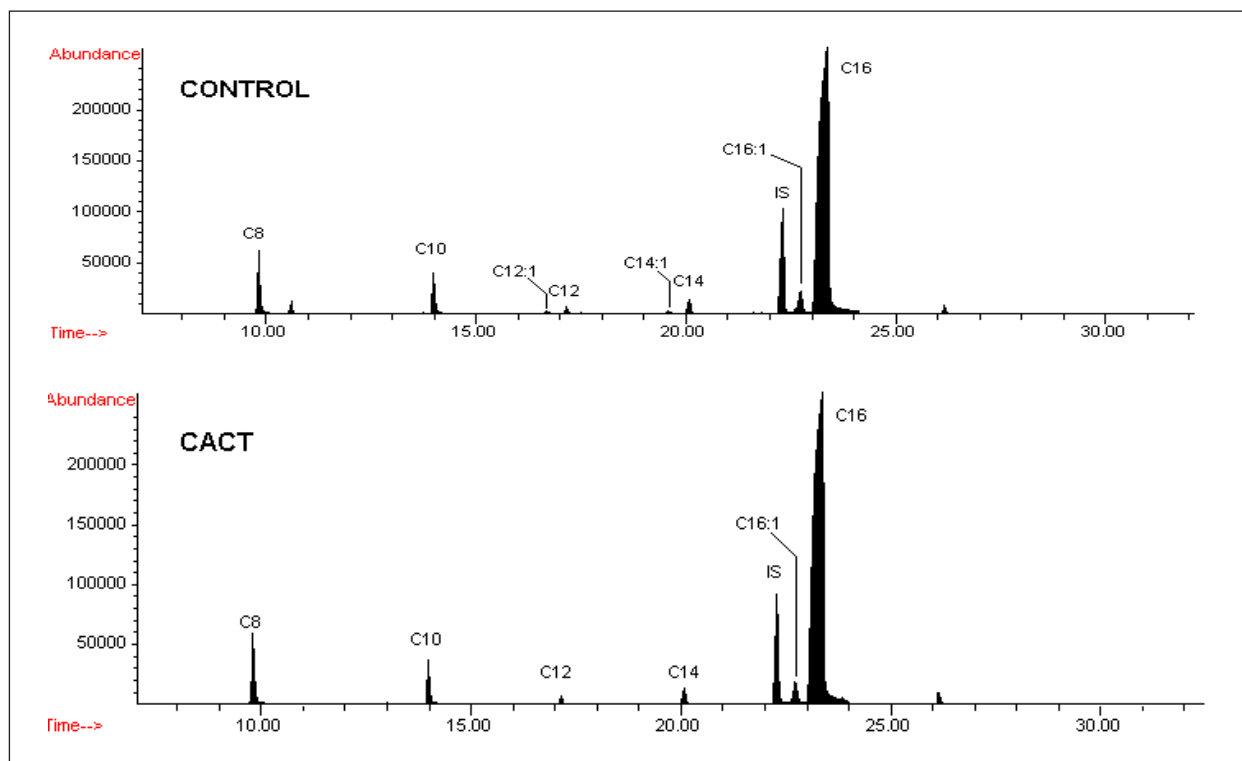


Figura 1. GC-MS-SIM de la incubación del ácido $^2\text{H}_3$ -palmítico en fibroblastos control y de pacientes con deficiencia de CACT. Están indicados los ácidos grasos deuterados según el número de átomos de carbono: C8, octanoico; C10, decanoico; C12:1, dodecenóico; C12, dodecanoico; C14:1, tetradecenóico; C14, tetradecanoico; C16, hexadecanoico. IS identifica el estándar interno.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se encontró una oxidación en general menor del 30% en las deficiencias de CACT, (tabla 1), lo que concuerda con los resultados obtenidos por Ventura *et al.* (7), quienes encontraron muy deprimida la producción de intermediarios estudiando varias deficiencias, entre ellas la deficiencia de CACT. El coeficiente de variación obtenido al trabajar con esta prueba fue similar al obtenido por otros (inferior a 5) (8), y al igual que ellos, se encontró que se debe trabajar con mezcla radiactiva fresca, debido a que inmediatamente después de su preparación muestra casi el doble de actividad observada en relación con mezclas utilizadas de preparación previa (9).

El nivel de intermediarios observados por incubación con ácido palmítico deuterado, en la deficiencia de CACT, es muy controvertido de acuerdo con diferentes autores (10,11). Observamos concentraciones de intermediarios similares al de los controles en la deficiencia de CACT. Algunos autores han reportado una gran depresión en la formación de acetilcarnitinas en fibroblastos de pacientes con esta deficiencia (10), pero nosotros no podemos distinguir con significación el perfil de ácidos de esta deficiencia respecto a los controles. Nuestros resultados para esta deficiencia son similares a los de otros, quienes afirman que no es posible distinguirlas realizando este tipo de incubaciones (12).

Actualmente cobra vigencia el diagnóstico en familias sospechosas de la deficiencia mediante análisis moleculares que podrían tener mayores ventajas sobre los métodos bioquímicos aquí planteados, pues el conocimiento de las mutaciones que causan la enfermedad hace que después de múltiples amplificaciones mediante el uso de PCR pueda hacerse determinación de estas mediante secuenciación directa de los 9 exones y de las uniones intrón-exón respectivas (13,14,15,16).

CONCLUSIÓN

Se puede concluir que la valoración de agua tritiada es un buen método para sugerir una deficiencia de CACT. En cambio, no es posible establecer la presencia o no de esta deficiencia mediante incubación de fibroblastos con ácido palmítico deuterado.

BIBLIOGRAFÍA

1. Indiveri C, Iacobazzi V, Giangregorio N, Palmieri F. The mitochondrial carnitine carrier protein: cDNA cloning, primary structure and comparison with other mitochondrial transport proteins. *Biochem J* 1997; 321:713-19.
2. Indiveri C, Giangregorio N, Iacobazzi V, Palmieri F. Site-directed mutagenesis and chemical modification of the six native cysteine residues of the rat mitochondrial carnitine carrier: implications for the role of cysteine-136. *Biochemistry* 2002; 41:8649-56.
3. Tonazzi A, Giangregorio N, Indiveri C, Palmieri F. Identification by site-directed mutagenesis and chemical modification of three vicinal cysteine residues in rat mitochondrial carnitine/acylcarnitine transporter. *J Biol Chem* 2005; 280:19607-12.
4. Pierre G, Macdonald A, Gray G, Hendriksz C, Preece MA, Chakrapani A. Prospective treatment in carnitine-acylcarnitine translocase deficiency. *J Inher Metab Dis* 2007; 30(5):815.
5. Rubio-Gozalbo ME, Vos P, Forget PPh, Van Der Meer SB, Wanders RJA, Waterham HR, et al. Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency: case report and review of the literature. *Acta Paediatr* 2003; 92:501-4.
6. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-75.
7. Ventura FV, Costa CG, Struys EA, Ruiter J, Allers P, Ijlst L, et al. Quantitative acylcarnitine profile in fibroblasts using U-¹³Cpalmitic acid: an improved tool for the diagnosis of fatty acid oxidation defects. *Clin Chem Acta* 1999; 281:1-17.
8. Roe CR, Roe DS. Recent developments in the investigation of inherited metabolic disorders using cultures human cells. *Mol Genet Metab* 1999; 68:243-57.
9. Olpin SE, Manning NJ, Carpenter K, Middleton B, Pollit RJ. Differential diagnosis of hydroxydicarboxylic aciduria based on release of ³H₂O from [9, 10-³H]-myristic and [9,10-³H]-palmitic acids by intact cultured fibroblasts. *J Inher Metab Dis* 1992; 15:883-90.
10. Roe DS, Yang BZ, Vianey-Saban C, Struys E, Sweetman L, Roe CR. Differentiation of long-chain fatty acid oxidation disorders using alternative precursors and acylcarnitine profiling in fibroblasts. *Mol Genet Metab* 2006; 87(1):40-7.
11. Nada MA, Chace DH, Sprecher H, Roe CR. Investigation of β -oxidation intermediates in normal and MCAD-deficient human fibroblasts using tandem mass spectrometry. *Biochem Mol Med* 1995; 54:59-66.
12. Roe CR, Roe DS. Recent developments in the investigation of inherited metabolic disorders using cultures human cells. *Mol Genet Metab* 1999; 68:243-57.
13. Costa C, Costa JM, Slama A, Boutron A, Vequaud C, Legrand A, et al. Mutational spectrum and DNA-based prenatal diagnosis in carnitine-acylcarnitine translocase deficiency. *Mol Genet Metab* 2003; 78: 68-73.
14. Korman SH, Pitt JJ, Boneh A, Dweikat I, Zater M, Meiner V, et al. A novel SLC25A20 splicing mutation in patients of different ethnic origin with neonatally lethal carnitine-acylcarnitine translocase (CACT) deficiency. *Mol Genet Metab* 2006; 89(4):332-8.
15. Wang GL, Wang J, Douglas G, Browning M, Hahn S, Ganesh J, et al. Expanded molecular features of carnitine acyl-carnitine translocase (CACT) deficiency by comprehensive molecular analysis. *Mol Gen Metab* 2011; 103:349-57.
16. Yang BZ, Mallory JM, Roe DS, Brivet M, Strobel GD, Kerri M, et al. Carnitine/Acylcarnitine Translocase Deficiency (Neonatal Phenotype): Successful Prenatal and Postmortem Diagnosis Associated with a Novel Mutation in a Single Family. *Mol Gen Metab* 2011; 73: 64-70.