
DIAGNÓSTICO DE LA DEFICIENCIA DE ACIL-CoA DESHIDROGENASA DE CADENA MEDIA MEDIANTE EL USO DE SUSTRATOS TRITIADOS

José Henry Osorio¹
Antonia Ribes²
Montse Lluch²

RESUMEN

La acil-CoA deshidrogenasa de cadena media (MCAD) cataliza la primera reacción de la degradación de ácidos grasos de 10 a 12 átomos de carbono. Su deficiencia debe ser siempre confirmada por estudios de laboratorio. En el presente trabajo, fueron incubados fibroblastos de pacientes que presentaban la deficiencia de MCAD, en presencia de sustratos tritiados. Fue encontrada diferencia significativa ($P < 0,05$) al comparar la degradación de palmitato y miristato tritiado entre controles y pacientes con deficiencia de MCAD. Se observó más deprimida la oxidación de miristato tritiado que la de palmitato tritiado.

Palabras clave: MCAD, ácidos grasos, metabolismo.

Abreviaturas: MCAD, acil-CoA deshidrogenasa de cadena media; MAD, múltiples acil-CoA deshidrogenasas.

DIAGNOSIS OF MEDIUM CHAIN ACYL Co-A DEHYDROGENASE DEFICIENCY USING TRITIATED SUBSTRATES

ABSTRACT

The medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) is the key enzyme for degrading fatty acids with a chain of 10 to 12 atoms of carbon. Its deficiency should be confirmed using laboratory methods. During the present work, fibroblasts from patients who presented MCAD deficiency were incubated, in tritiated substrates. A significant difference ($P < 0.05$) was found when comparing palmitate and miristate between controls and patients with MCAD deficiency. The tritiated miristate presented a more depressed oxidation in comparison to palmitate.

Key words: MCAD, fatty acids, metabolism.

¹ Departamento de Ciencias Básicas de la Salud, Laboratorio de Patología Molecular. Universidad de Caldas. Correspondencia: Universidad de Caldas, Departamento de Ciencias Básicas de la Salud. Calle 65 No. 26-10. Manizales. e-mail: jose.osorio_o@ucaldas.edu.co

² Instituto de Bioquímica Clínica. Corporació Sanitaria Clínic. Barcelona. España.

INTRODUCCIÓN

La deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena media (MCAD) es un desorden autonómico recesivo de la oxidación mitocondrial de los ácidos grasos. Es relativamente común en algunas poblaciones, pero en general se estima una presentación de 1 en 10.000 recién nacidos vivos (1, 2).

Las consecuencias de esta deficiencia son variables. Usualmente, los síntomas ocurren solamente durante períodos de estrés catabólico, cuando la oxidación defectuosa de ácidos grasos no alcanza a copar las demandas energéticas (3). El resultado es la hipoglucemia hipocetótica, a menudo acompañada por hiperamonemia e incremento de las transaminasas séricas. Típicamente se presenta letargia, vómito, y encefalopatía, y posteriormente convulsiones, apnea, falla cardíaca y muerte (4). Muchos niños afectados, mueren inesperadamente después de una aparente enfermedad con pocos riesgos, siendo clasificados como síndrome de muerte súbita y muchos permanecen asintomáticos, presumiblemente debido a que no han sido expuestos a estrés catabólico que desencadene la descompensación metabólica (5).

El diagnóstico por laboratorio se hace necesario para confirmar la deficiencia. Los estudios *in vitro* son útiles, sobre todo para realizarlos en familias donde se presentan individuos identificados previamente y en los centros donde no se cuenta con técnicas avanzadas como la espectrometría de masas en tándem para la determinación de acilcarnitinas, donde se presenta típicamente elevación de la octanoilcarnitina en estos pacientes (6).

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio es de tipo experimental. El material biológico empleado en el presente estudio ha sido fibroblastos de 3 pacientes con deficiencia de MCAD. Esta deficiencia

fue confirmada por estudios enzimáticos, moleculares, o ambos. Como controles se utilizaron 20 cultivos diferentes de fibroblastos de personas normales. El trabajo cumple con los requisitos y aprobaciones de los respectivos comités de ética.

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 tritiados. Se utilizó el método de Lowry y Col. (7) para la determinación de la proteína.

El método utilizado fue el de Manning (8) con modificaciones. Para obtener las mezclas radioactivas se prepararan 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 µL de A + 3,8 µL de C (3,8 µCi), 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 µl 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 μL de la solución, como se describió anteriormente.

Para preparar las columnas de intercambio iónico 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.

Para evaluar la oxidación de sustratos tritiados por los fibroblastos se toma el pellet de células previamente resuspendido en 500 μL de PBS 1. Se utilizan bandejas de incubación con capacidad para 24 pozos. El blanco, contiene 40 μL (0,05 μCi) de mezcla radioactiva y 160 μL de PBS 2, las muestras contienen 60 μL de células resuspendidas, 40 μL (0,05 μCi) de mezcla radioactiva, y 100 μL de PBS 2. La bandeja se envuelve en papel de aluminio y se incuba a 37°C durante 4 horas en cámara de CO_2 5%,

aire 95%. La reacción se detiene, colocando la bandeja en hielo y agregando a cada pozo 200 μL de TCA 10%. El contenido de los pozos se traspasa al tubos para microcentrifuga y se centrifuga a 5000 rpm durante 5 min. 360 μL de la mezcla son transferidos de nuevo a un tubo de microcentrifuga nuevo que contiene 50 μL de NaOH 1 M. Esta mezcla se mantiene en hielo hasta el momento de aplicar 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 μL de mezcla de reacción a la columna, dejando escurrir nuevamente. Cuando para el goteo, se lava la columna tres veces con 500 μL 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 de MCAD.

RESULTADOS

La Tabla 1 muestra los valores promedio (5 determinaciones por cada muestra), para la oxidación de palmitato y miristato tritiados en nmol/hora/mg proteína y el porcentaje de oxidación de los sustratos tritiados por parte de los fibroblatos de los pacientes con deficiencia de MCAD comparados con los controles paralelos. Fue encontrada diferencia significativa ($P < 0,05$) al comparar la degradación de palmitato y miristato tritiado entre controles y pacientes con deficiencia de MCAD. Se observó más deprimida la oxidación de miristato tritiado que la de palmitato tritiado.

Tabla 1. Oxidación de [9,10³H]-ácidos grasos en pacientes con deficiencia de MCAD.

Deficiencia	<i>n</i>	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
MCAD	3	1,1	0,8	22	18

DISCUSIÓN

Durante la realización de los experimentos del presente trabajo, cada vez que era preparada una nueva mezcla radioactiva se obtenía mucha variabilidad en las dpm resultantes, probablemente debido a que la unión con la albúmina no era muy constante. Este hecho daba lugar a un rango de valores control muy amplio. Después de estudiar 20 controles, se decidió hacer cálculos en función de los controles paralelos, tal como lo sugirieron Olpin y colaboradores (9) (3 controles paralelos como mínimo). Los primeros trabajos basados en la medición del ¹⁴CO₂ liberado por incubación de células con [1-¹⁴C]-ácidos grasos (10, 11, 12) para evaluar la oxidación de ácidos grasos fueron poco eficientes debido a que solo una pequeña proporción (aproximadamente un 20%) de los grupos acetilo producidos por la β-oxidación se convierten inmediatamente a CO₂, mientras que el remanente se incorpora a intermediarios metabólicos no volátiles (12). Posteriormente Moon y Rhead (13), desarrollaron un método de valoración de ³H₂O en fibroblastos con ácidos grasos tritizados. Manning y colaboradores (8) postularon que [9,10(n)-³H]-miristato posee

claras ventajas sobre [9,10-³H]-palmitato para la detección de trastornos tales como la deficiencia de MCAD y las formas leves de la deficiencia MAD donde la β-oxidación se encuentra detenida a nivel de los sustratos con 8 átomos de carbono. Manning y colaboradores (8) postularon que [9,10(n)-³H]-miristato posee claras ventajas sobre [9,10-³H]-palmitato para la detección de trastornos tales como la deficiencia de MCAD y las formas leves de la deficiencia MAD donde la β-oxidación se encuentra detenida a nivel de los sustratos con 8 átomos de carbono. Por otro lado, estos mismos autores demostraron que miristato es menos sensible que el palmitato para la detección de deficiencias específicas relacionadas con ácidos grasos de cadena larga. En el presente estudio pudimos corroborar la hipótesis anterior, en efecto, la oxidación del miristato está más deprimida que la de palmitato en las deficiencias de MCAD.

Se puede concluir que la valoración de agua tritizada, es un buen método para sugerir una deficiencia acil-CoA deshidrogenasa de cadena media, al encontrarse severamente deprimida la oxidación de los ácidos grasos tritizados utilizados en el presente estudio.

REFERENCIAS

1. Derks TG, Boer TS, van Assen A, Bos T, Ruiter J, Waterham HR, et al. Neonatal screening for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency in The Netherlands: the importance of enzyme analysis to ascertain true MCAD deficiency. *J Inher Metab Dis.* 2008;31(1):88-96.
2. Zeng J, Liu Y, Wu L, Li D. Mutation of Tyr375 to Lys375 allows medium-chain acyl-CoA dehydrogenase to acquire acyl-CoA oxidase activity. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1774:1628-1634.
3. Santos L, Patterson A, Moreea SM, Lippiatt CM, Walter J, Henderson M. Acute liver failure in pregnancy associated with maternal MCAD deficiency. *J Inher Metab Dis.* 2007;30:103.
4. Cyriac J, Venkatesh V, Gupta C. A fatal neonatal presentation of medium-chain acyl coenzyme a dehydrogenase deficiency. *J Int Med Res.* 2008;36:609-610.
5. Yang Z, Lantz PE, Ibdah JA. Post-mortem analysis for two prevalent beta-oxidation mutations in sudden infant death. *Pediatr Int.* 2007;49:883-7.
6. Osorio JH. Patología molecular de los errores hereditarios de la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos: alcances en el diagnóstico y tratamiento. *Biosalud.* 2006;5:71-83.
7. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AI, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-275.
8. Manning NJ, Olpin SE, Pollit RJ, Webley JA. Comparison of 9,10-³H-palmitic and 9,10-³H-myristic acids for the detection of defects of fatty acid oxidation in intact cultured fibroblasts. *J Inher Metab Dis.* 1990;13:58-68.
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;15:883-890.
10. Kolvraa S, Gregersen N, Christensen E, Hobolth N. In vitro fibroblasts studies in a patient with C₆-C₁₀ dicarboxylic aciduria: evidence for a defect in general acyl-CoA dehydrogenase. *Clin Chim Acta.* 1982;126:53-67.
11. Saudubray JM, Coude FX, Demaugre F, Johnson C, Gibson KM, Nyhan WL. Oxidation of fatty acids in cultured fibroblasts: a model system for the detection and study of defects in oxidation. *Pediatr Res.* 1982;16:877-881.
12. Rhead WJ, Moon A, Oettger V, Henkle K. ¹⁴CO₂-Labelled substrate catabolism by human diploid fibroblasts derived from infants and adults. *Biochem Med.* 1985;34:182-188.
13. Veerkamp JH, Van Moerkerk HTB, Glatz JFC, Zuurveld JGEM, Jacobs AEM, et al. ¹⁴CO₂ production is no measure of [¹⁴C]fatty acid oxidation. *Biochem. Med Metab Biol.* 1986;16:248-259.
14. Moon A, Rhead WJ. Complementation analysis of fatty acid oxidation disorders. *J Clin Invest.* 1987;79:56-94.
15. Nada MA, Rhead JW, Sprecher H, Schulz H, Roe CR. Evidence for intermediate channeling in mitochondrial β -oxidation. *J Biol Chem.* 1985;270:530-535.
16. Olpin SE, Manning NJ, Pollit RJ, Clarke S. Improved detection of long chain fatty acid oxidation defects in intact cells using [9,10-³H]-oleic acid. *J Inher Metab Dis.* 1997;20:415-419.