

---

# ESTUDIO *IN VITRO* DE LAS ENFERMEDADES POR DEFICIENCIAS ENZIMÁTICAS DEL SISTEMA DE TRANSPORTE DE LA CARNITINA

José Henry Osorio<sup>1</sup>  
Antonia Ribes<sup>2</sup>  
Montse Lluch<sup>2</sup>

## RESUMEN

Los errores innatos del metabolismo constituyen un grupo de enfermedades por deficiencias enzimáticas, las que incluyen a las deficiencias de las enzimas necesarias para el paso de los ácidos grasos de cadena larga desde el citoplasma al interior de la mitocondria, como paso necesario para la obtención de energía en los estados de ayuno y ejercicio prolongado. El presente trabajo muestra la utilidad de la incubación de fibroblastos con sustratos tritiados para su diagnóstico. Fue encontrada severamente deprimida la oxidación de estos sustratos en los pacientes con estas enfermedades. Sin embargo no fue posible diferenciar entre las tres deficiencias enzimáticas estudiadas.

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

**Abreviaturas:** CPT I, carnitina palmitoiltransferasa I; CPT II, carnitina palmitoiltransferasa II; CACT, carnitina acilcarnitina translocasa.

## *IN VITRO* STUDIE OF THE DISEASES CAUSED BY ENZYMATIC DEFICIENCIES OF CARNITINE TRANSPORT SYSTEM

### ABSTRACT

The inherited inborn metabolic errors are a group of diseases caused by enzymatic deficiencies, including deficiencies of the enzymes used for the income of long-chain fatty acids into the mitochondria, as a necessary step for obtaining energy during endurance exercise and fasting. The present work shows the utility of incubating fibroblasts with tritiated substrates for the diagnosis of these diseases. A severe depression for oxidizing these substrates was observed for these patients. However, it was not possible to differentiate between the three enzymatic deficiencies studied.

**Key words:** fatty acids, errores, metabolism, inborn errors, carnitine, fibroblast, isotope labeling.

---

<sup>1</sup> 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

<sup>2</sup> Instituto de Bioquímica Clínica. Corporació Sanitaria Clínic. Barcelona. España.

## INTRODUCCIÓN

Los ácidos grasos son movilizados desde el tejido adiposo, en respuesta al aumento de la relación glucagon/insulina, y son transportados hasta los tejidos a través de la corriente circulatoria ligados principalmente a la albúmina, para dar inicio a su degradación y producción de energía. Los ácidos grasos de cadena larga no pueden entrar en la mitocondria en su forma libre, pero lo hacen en forma de ésteres de coenzima A (CoA) a través de la lanzadera carnitina-acilcarnitina, que incluye cuatro etapas: un transportador de carnitina en la membrana plasmática, que mantiene el aprovisionamiento intracelular de carnitina; conversión de los compuestos acil-CoA en acilcarnitinas, a través de la acción de la carnitina palmitoiltransferasa I (CPT I), que se encuentra localizada en la cara interna de la membrana mitocondrial externa; transferencia de acilcarnitinas a través de la membrana mitocondrial interna, que tiene lugar a través de la carnitina-acilcarnitina translocasa; retroconversión de acilcarnitinas en ésteres de acil-CoA por la carnitina palmitoiltransferasa II, en la cara interna de la membrana mitocondrial interna. Los productos de este ciclo (ciclo de la carnitina) son ésteres acil-CoA de cadena larga, que posteriormente se oxidarán en el interior de la mitocondria en el proceso de la  $\beta$ -oxidación. Los ácidos grasos con menos de 12 carbonos (ácidos grasos de cadena media), atraviesan la membrana mitocondrial en forma de ácidos libres, y son activados en el interior de la matriz para formar ésteres de acil-CoA. Las deficiencias de las tres enzimas responsables de este ciclo carnitina palmitoil transferasa I, carnitina acilcarnitina translocasa y carnitina palmitoiltransferasa II, han sido identificadas con anterioridad y se hace necesario perfeccionar el diagnóstico *in vitro* que permita confirmar la presencia o no de las mismas en pacientes sospechosos de sufrirlas.

El presente estudio busca analizar la producción de agua tritiada, como herramienta diagnóstica en pacientes deficientes de estas enzimas, después de hacer algunas modificaciones a la técnica tradicional.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio es de tipo experimental. El material biológico empleado en este trabajo ha sido fibroblastos de 4 pacientes con deficiencia de CPT I, 2 pacientes con deficiencia CPT II y 2 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.

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% CO<sub>2</sub>/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. (1) para la determinación de la proteína.

El método utilizado fue el de Manning (2) 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)-<sup>3</sup>H] palmítico (diluido en tolueno, 50-62 mCi/mmol, 1 mCi/ml) (Amersham) o ácido [9,10(n)-<sup>3</sup>H] mirístico (diluido en tolueno, 40-60 Ci/mmol, 1mCi/ml) (Amersham). Se mezcla en un tubo plástico de 3 ml, 25  $\mu$ L de A

+ 3,8  $\mu\text{L}$  de C (3,8  $\mu\text{Ci}$ ), 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  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  de PBS 1. Se utilizan bandejas de incubación con capacidad para 24 pozos. El blanco, contiene 40  $\mu\text{L}$  (0,05  $\mu\text{Ci}$ ) de mezcla radioactiva y 160  $\mu\text{L}$  de PBS 2, las muestras contienen 60  $\mu\text{L}$  de células

resuspendidas, 40  $\mu\text{L}$  (0,05  $\mu\text{Ci}$ ) de mezcla radioactiva, y 100  $\mu\text{L}$  de PBS 2. La bandeja se envuelve en papel de aluminio y se incubaba a 37°C durante 4 horas en cámara de  $\text{CO}_2$  5%, aire 95%. La reacción se detiene, colocando la bandeja en hielo y agregando a cada pozo 200  $\mu\text{L}$  de TCA 10 %. El contenido de los pozos se traspasa al tubo para microcentrífuga y se centrifuga a 5000 rpm durante 5 min. 360  $\mu\text{L}$  de la mezcla son transferidos de nuevo a un tubo de microcentrífuga nuevo que contiene 50  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  de mezcla de reacción a la columna, dejando escurrir nuevamente. Cuando para el goteo, se lava la columna tres veces con 500  $\mu\text{L}$  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 las diferentes deficiencias.

## RESULTADOS

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, (3 controles paralelos como mínimo). 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 deficiencias del sistema de transporte de la carnitina, 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 estas deficiencias. Se observó más deprimida la oxidación de miristato tritiado que la de palmitato tritiado, pero no fue posible establecer diferencia alguna entre los fenotipos relacionados con la deficiencia.

## DISCUSIÓN

En los fibroblastos se encuentran preservadas las relaciones entre la oxidación de ácidos grasos, los sistemas de transferencia de electrones y otras vías que interactúan en el metabolismo intermediario. La integración de estos sistemas es esencial para el estudio de la organización y control de las enzimas involucradas en la  $\beta$ -oxidación mitocondrial, lo que hace este tipo de células ideal para el presente estudio.

Los estudios "*in vitro*" de las deficiencias del sistema de transporte de la carnitina se han apoyado principalmente en la determinación del nivel de acilcarnitinas observadas después de incubar fibroblastos con ácido palmítico marcado. En las deficiencias de CPT I, CACT y CPT II, los estudios realizados por diferentes autores son controvertidos (3, 4, 5). Estas determinaciones hacen necesario utilizar espectrometría de masas en tándem, para determinar las acilcarnitinas deuteradas en el medio de cultivo, o cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (5). Los resultados obtenidos son muy buenos, ya que se consigue establecer el diagnóstico de varias deficiencias de la beta oxidación mitocondrial, pero a pesar de ser una técnica altamente sensible y precisa, tiene el inconveniente de la accesibilidad, por eso la incubación de células con sustratos tritiados, se presenta como una alternativa más barata para este tipo de estudios.

A partir del desarrollo de los ensayos para medir las tasas de oxidación de ácidos grasos en células mediante la incubación con sustratos radioactivos, se avanzó notablemente en el diagnóstico de las deficiencias de la  $\beta$ -oxidación mitocondrial. Los primeros trabajos basados en la medición del  $^{14}\text{CO}_2$  liberado por incubación de células con  $[1-^{14}\text{C}]$ -ácidos grasos (6, 7), fueron poco eficientes debido a que solo una pequeña proporción (aproximadamente un 20%) de los grupos acetilo producidos por la  $\beta$ -oxidación se convierten inmediatamente a  $\text{CO}_2$ , mientras que el remanente se incorpora a intermediarios metabólicos no volátiles (8). Posteriormente Moon y Rhead (9), desarrollaron un método de valoración de  $^3\text{H}_2\text{O}$  en fibroblastos con ácidos grasos tritiados. La liberación de tritio unido a los carbonos 9 y 10 del palmitato depende de tres mecanismos: 1) la acción de una acyl-CoA deshidrogenasa formando un 2,3-enoyl-CoA éster y transfiriendo el 50% del tritio a la proteína de transferencia de electrones (FADH); 2) la reacción de la 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa que remueve la mitad del tritio remanente, el cual finaliza en el NADH; y 3) el ciclo del ácido tricarbóxico el cual libera el 25% restante. La incorporación final del tritio al agua, es por lo tanto dependiente de la re-oxidación de esos cofactores en la cadena de transporte de electrones. Los complejos 2,3, y 4 de la cadena respiratoria son requeridos para cuidar del tritio que viene de la proteína de transferencia de electrones y los complejos 1,3 y 4 son necesarios para la re-oxidación del NADH, por lo que la prueba puede ser utilizada también en ciertos defectos de la cadena respiratoria (10).

Buscando especificidad con relación a la longitud de la cadena del ácido graso, fue incorporado en el ensayo la oxidación en presencia de  $[9,10-^3\text{H}]$ -miristato, en el cual no debe haber producción de agua tritiada hasta que la  $\beta$ -oxidación alcance el carbono 6. Por lo tanto, incubando en paralelo  $[9,10-^3\text{H}]$ -palmitato y  $[9,10-^3\text{H}]$ -miristato, se puede tener una idea de la especificidad del defecto, con relación a la longitud de la cadena del ácido graso (2).

El nivel de intermediarios observados por incubación con ácido palmítico marcado, en las deficiencias de CPT I, CACT y CPT II es muy controvertido de acuerdo a diferentes autores (3, 4). En otros estudios se encontraron bajas concentraciones de varias acilcarnitinas (C8, C10, y C12) en CPT I, con concentraciones de intermediarios similares a el de los controles en la deficiencia de CACT, así como los niveles de C8 disminuidos y C14 ligeramente incrementados en la deficiencia de CPT II (5). Algunos autores han reportado una gran depresión en la formación de acetilcarnitinas en fibroblastos de pacientes con estas deficiencias (4), mientras que otros han encontrado niveles de C8 y C10 bastante reducidas en la deficiencia de CPT II (10).

En el presente estudio se encontró una oxidación en general menor del 30%, en las deficiencias de CPT I, CACT, y CPT II (Tabla 1), encontrándose la disminución más severa en la deficiencia de CPT II, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Ventura y colaboradores (2), quienes

encontraron muy deprimida la producción estudiando las deficiencias CPT II y CACT.

Algunos estudios (2, 9, 11), reportan la existencia de una gran variabilidad en las tasas de  $\beta$ -oxidación medida en los ensayos con miristato y palmitato tritizados, por eso sólo deben tenerse en cuenta los resultados por línea celular promedio de las determinaciones por triplicado en un solo ensayo, en presencia por lo menos dos o tres controles, ya que los rangos de oxidación en nmoles/mg proteína/hora son muy amplios. El coeficiente de variación obtenido al trabajar con esta prueba fue similar al obtenido por otros (inferior a 5) (12), al igual que ellos, se encontró que a pesar de la buena estabilidad a corto plazo de la mezcla radioactiva, existen problemas de reproducibilidad originados en la unión de los substratos a la albúmina sérica bovina. Los resultados obtenidos con mezcla radiactiva fresca inmediatamente utilizada después de su preparación muestran casi el doble de actividad observada con relación a mezclas utilizadas de preparación previa (13).

**Tabla 1.** Porcentaje de oxidación de [9,10<sup>3</sup>H]-ácidos grasos en pacientes con deficiencias del sistema de transporte de la carnitina.

Deficiencia	<i>n</i>	Oxidación [9,10 <sup>3</sup> H]-palmitato nmol/hora/mg proteína	Oxidación [9,10 <sup>3</sup> H]-miristato nmol/hora/mg proteína	Oxidación [9,10 <sup>3</sup> H]-palmitato %	Oxidación [9,10 <sup>3</sup> H]-miristato %
Controles	20	4,7	4,4	100	100
CPT-I	4	1,4	1,1	30	25
CPT-II	2	1,0	0,9	21	20
CACT	2	1,1	1,3	24	29

## CONCLUSIÓN

Se puede concluir que la valoración de agua tritiada, es un buen método para sugerir una deficiencia del sistema de transporte de la carnitina, sin embargo no es posible diferenciar

con precisión el tipo de deficiencia enzimática, por lo que se recomienda realizar a los pacientes exámenes específicos que busquen confirmar cuál de las tres enzimas de este sistema se encuentra afectada.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
2. Manning NJ, Olpin SE, Pollit RJ, Webley JA. Comparison of 9.10<sup>-3</sup>Hpalmitic and 9.10<sup>-3</sup>Hmyristic acids for the detection of defects of fatty acid oxidation in intact cultured fibroblasts. *J Inher Metab Dis* 1990;13:58-68.
3. Nada MA, Chace DH, Sprecher H, Roe CR. Investigation of  $\beta$ -oxidation intermediates in normal and MCAD-deficient human fibroblasts using tandem mass spectrometry. *Biochem Mol Med* 1995;54:59-66.
4. Ventura FV, Costa CG, Struys EA, Ruiter J, Allers P, Ijlst L, et al. Quantitative acylcarnitine profile in fibroblasts using U-<sup>13</sup>Cpalmitic acid: an improved tool for the diagnosis of fatty acid oxidation defects. *Clin Chem Acta* 1999;281:1-17.
5. Osorio JH, Ribes A, Lluch M. Análisis de la producción de ácidos grasos deuterados por fibroblastos para el diagnóstico *in vitro* de las deficiencias de las enzimas del sistema de transporte de la carnitina. *Biosalud* 2007;25-31.
6. Kølvrå S, Gregersen N, Christensen E, Hobolth N. *In vitro* fibroblasts studies in a patient with C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> dicarboxylic aciduria: evidence for a defect in general acyl-CoA dehydrogenase. *Clin. Chim Acta* 1982;126:53-67.
7. Saudubray JM, Coude FX, Demaugre F, Johnson C, Gibson KM, Nyhan WL.
8. Veerkamp JH, van Moerkerk, HTB, Glatz JFC, Zuurveld JGEM., Jacobs AEM, Wagenmakers JM. <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> production is no measure of [<sup>14</sup>C]fatty acid oxidation. *Biochem Med Metab Biol* 1986;16:248-259.
9. Rhead WJ, Moon A, Roettger V, Henkle K. <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Labelled substrate catabolism by human diploid fibroblasts derived from infants and adults. *Biochem Med* 1985;34:182-188.
10. Venizelos N, Von Döbeln U, Hagenfeld L Fatty acid oxidation in fibroblasts from patients with defects in  $\beta$ -oxidation and in the respiratory chain. *J Inher Metab Dis* 1988;21:409-415.
11. Manning NJ, Olpin SE, Pollit RJ, Webley JA. Comparison of 9.10<sup>-3</sup>Hpalmitic and 9.10<sup>-3</sup>Hmyristic acids for the detection of defects of fatty acid oxidation in intact cultured fibroblasts. *J Inher Metab Dis* 1990;13:58-68.
12. Roe CR, Roe DS. Recent developments in the investigation of inherited metabolic disorders using cultures human cells. *Mol Genet Metab* 1999;68:243-257.
13. Olpin SE, Manning NJ, Carpenter K, Middleton B, Pollit RJ. Differential diagnosis of hydroxydicarboxylic aciduria based on release of <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O from [9, 10<sup>-3</sup>H]-myristic and [9,10<sup>-3</sup>H]-palmitic acids by intact cultured fibroblasts. *J Inher Metab Dis* 1992;15:883-890.