
OXIDACIÓN DE UN SUSTRATO TRITIADO POR LINFOCITOS PARA EL DIAGNÓSTICO RÁPIDO DE ALTERACIONES METABÓLICAS

José Henry Osorio¹

RESUMEN

Algunos métodos *in vitro* para el diagnóstico de alteraciones metabólicas son confiables, pero su realización consume mucho tiempo. El presente trabajo muestra una modificación substancial de la técnica de incubación de linfocitos en presencia de ácido palmítico tritiado, la cual reduce el tiempo de realización de la técnica de varios días a solo 6 horas. Estos cambios nos permiten la confirmación casi inmediata de los pacientes sospechosos de sufrir algunos errores innatos del metabolismo de los ácidos grasos.

Palabras clave: Linfocitos, errores hereditarios del metabolismo de los ácidos grasos, ácido palmítico.

OXIDATION OF A TRITIATED SUBSTRATE BY LYMPHOCYTES FOR THE RAPID DIAGNOSIS OF METABOLIC ERRORS

ABSTRACT

Some methods for *in vitro* diagnosis of metabolic alterations are precise but time consuming. The present study shows a substantial modification for the technique of incubation of lymphocytes with tritiated palmitic acid reducing the spent time from some days to only 6 hours. These changes allow us the almost immediate confirmation of patients suspicious of suffering some inherited errors of fatty acid metabolism.

Key words: Lymphocytes, inherited errors of fatty acid metabolism, palmitic acid.

¹ Departamento de Ciencias Básicas de la Salud, Laboratorio de Enfermedades metabólicas. Universidad de Caldas.

INTRODUCCIÓN

Manning y colaboradores postularon en 1990 (1) que la producción de agua tritiada después de incubar fibroblastos con ácidos mirístico y palmítico tritiado podía ser usada como una prueba para la detección de algunas deficiencias de la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos. Posteriormente, la técnica fue adaptada para ser utilizada con linfocitos (2), pero los resultados eran obtenidos entre 24 y 48 horas después. Sin embargo, en algunos pacientes descompensados metabólicamente y sospechosos de sufrir estas alteraciones, se hace necesario un diagnóstico rápido de laboratorio que permita descartar o confirmar estas alteraciones, por tal motivo el presente trabajo tuvo como objetivo modificar las dos técnicas anteriores para obtener resultados como máximo en 6 horas después de iniciado el procedimiento. Además, el presente estudio busca información acerca del efecto que tiene la conservación de los linfocitos en diferentes medios, comparado con el análisis de los mismos después de ser extraídos directamente de sangre entera.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio fue de tipo descriptivo. Muestras de sangre de voluntarios adultos sanos, que no estuvieran sometidos a tratamiento médico alguno, fueron obtenidas en tubos que contenían EDTA como anticoagulante. El aislamiento de linfocitos fue realizado utilizando HISTOPAQUE®-1077 como reactivo de Sigma-Aldrich recomendado para el aislamiento de células mononucleares. El procedimiento es el siguiente: 3 ml de reactivo (el cual se conserva refrigerado) son colocados en un tubo de centrifuga cónico de 15 ml y llevados a temperatura ambiente, 3 ml de sangre total son adicionados al reactivo y se centrifuga la mezcla a 400 g durante 30 minutos, a temperatura ambiente. Utilizando una pipeta Pasteur, se aspira con cuidado la capa superior

hasta 0,5 cm de la zona opaca que contiene las células mononucleares. La capa superior es desechada y la zona opaca se transfiere con cuidado a un tubo de centrifuga cónico limpio. A este tubo se le añaden 10 ml de solución salina isotónica tamponada con fosfato y se mezcla por aspiración suavemente. Después se centrifuga a 250 g durante 10 minutos y el sobrenadante es aspirado y desechado. El pellet de las células es resuspendido en 5,0 ml de solución salina isotónica tamponada con fosfato (PBS) y mezclado por aspiración suave con una pipeta de Pasteur. Luego de centrifugar a 250 g durante 10 minutos, los tres últimos pasos son repetidos, se desecha el sobrenadante y se vuelve a suspender los pellets de las células en 0,5 ml de solución salina isotónica tamponada con fosfato.

Como sustrato tritiado fue utilizado ácido [(9,10)(n)- ^3H] palmítico (diluido en tolueno, 50-62 mCi/mmol, 1 mCi/ml) (Amersham). Para obtener las mezclas radioactivas se prepararan las siguientes soluciones: Solución A: Ácido palmítico 12.5mg/1ml de etanol al 95%; Solución B: Albúmina 25mg/ml = 75mg/30ml de PBS 1; Reactivo C: Ácido [^3H] Palmítico (diluido en tolueno, 50-62 mCi/mmol, 1mCi/ml). 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 llevada al 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 traspa 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 coge 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 [³H]-palmitato por los linfocitos, se toma el pellet de células previamente resuspendido en 500 μ L de PBS. 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. 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 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 μ L de mezcla de reacción a la columna, dejando escurrir nuevamente. Cuando 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. Para realizar la determinación de proteína fue utilizado el método de Lowry (3). El estudio fue aprobado por los correspondientes comités de ética.

RESULTADOS

En el presente estudio se encontró que, después de 5 horas de incubación, las células no modifican la cantidad de ³H₂O producida (figura 1). El estudio del tiempo de almacenamiento de las células refrigeradas sobre la oxidación del sustrato es mostrado en la figura 2. Después de 24 horas de conservación de las muestras diluidas en dos tipos comerciales diferentes de PBS (Sigma), o extraídas directamente de sangre entera, los resultados no son confiables, ya que la tasa de oxidación disminuye en más de un 30%.

El análisis inter-ensayos fue realizado utilizando la misma mezcla radiactiva durante cinco veces en tres muestras diferentes, de acuerdo con las condiciones antes mencionadas. La tabla 1 muestra los resultados de los ensayos, con sus correspondientes coeficientes de variación, para el ácido [9,10³H]-palmítico, los cuales fueron encontrados dentro de límites aceptables.

Cada vez que era preparada una nueva mezcla radioactiva se obtenía mucha variabilidad en las dpm (desintegraciones por minuto) 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 23 controles, se decidió que era mejor hacer cálculos en función de los controles paralelos para cada experimento, tal como lo sugirieron Olpin y colaboradores (4).

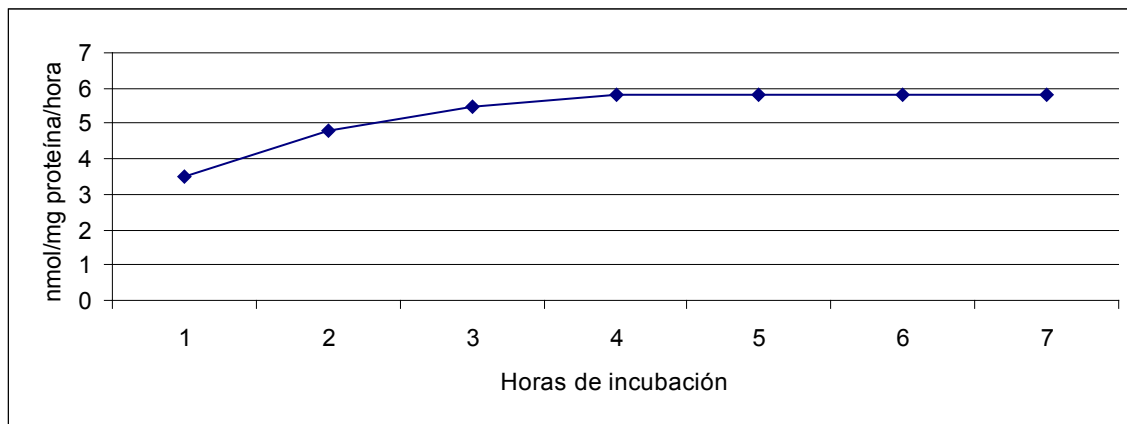


Figura 1. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre la capacidad de oxidación de sustrato tritado por los fibroblastos (se mide la cantidad en nmoles de [9,10³H]-palmítico oxidado por miligramo de proteína por hora).

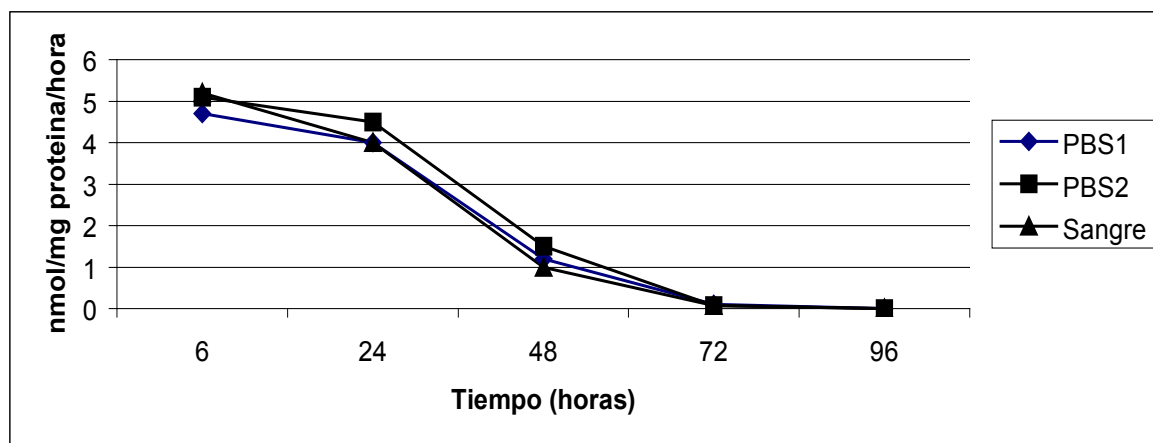


Figura 2. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre la capacidad de oxidación de sustrato tritado por los fibroblastos (se mide la cantidad en nmoles de [9,10³H]-palmítico oxidado por miligramo de proteína por hora).

Tabla 1. Ensayo intra-día para la oxidación de ácido [9,10³H]-palmítico por linfocitos (nmol/hora/mg proteína)

Muestra No.	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Ensayo 5	Media	SD	CV
1	4.7	4.4	4.2	4.1	4.4	4.4	0.23	5.3
2	4.1	4.0	3.9	4.0	3.7	3.9	0.15	3.8
3	3.8	4.2	3.6	3.9	3.8	3.9	0.22	5.7

Abreviaturas: SD, desviación estandar; CV, coeficiente de variación.

Los valores promedio de palmitato tritiado oxidado, para linfocitos normales, oscilan entre 3.6 y 4.7 nmol/hora/mg proteína.

DISCUSIÓN

En el método de valoración de $^3\text{H}_2\text{O}$ en células incubadas con ácidos grasos tritiados, la liberación de tritio unido a los carbonos 9 y 10 del palmitato depende de tres mecanismos: (A) la acción de una acyl-CoA deshidrogenasa formando 2,3-enoyl-CoA estery transfiriendo el 50% del tritio a la proteína de transferencia de electrones (FADH); (B) la reacción de la 3-hidroxiacyl-CoA deshidrogenasa que remueve la mitad del tritio remanente, el cual finaliza en el NADH; y (C) el ciclo del ácido tricarbóxico, el cual libera el 25% restante (5). 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 (6).

Después de introducir modificaciones al procedimiento, se encontró que después de 5 horas de incubación, las células normales no modifican la cantidad de $^3\text{H}_2\text{O}$ producida, por lo cual no se justifica la incubación entre 12 y 24 horas como lo recomiendan Brivet y colaboradores (2). Algunos autores postulan que las células que hay que estudiar pueden ser almacenadas para este tipo de ensayos hasta por 48 horas (2, 5); sin embargo, en este estudio se demostró que el tiempo de almacenamiento tiene efecto negativo sobre la oxidación del sustrato tritiado por parte de las células refrigeradas (en PBS a 4 °C) (figura 1). Después de 24 horas de conservación, los resultados no son de confianza, se encontró diferencia

significativa dependiendo del tiempo de almacenamiento, con una declinación en la capacidad de oxidación hasta del 50%, y no se encontró otro grupo que mencione este efecto.

Al igual que otros autores (1, 4, 7), se encontró que existe una gran variabilidad en las tasas de β -oxidación medidas con los ensayos de palmitato tritiado. Por eso deben tenerse en cuenta solo los resultados por línea celular promedio de las determinaciones por triplicado en un solo ensayo, en presencia por lo menos de 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 (4); al igual que ellos, se encontró que a pesar de la buena estabilidad a corto plazo de la mezcla radio-activa, existen problemas de reproducibilidad originados en la unión de los sustratos 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.

Se puede concluir, entonces, que el método modificado de incubación de linfocitos en presencia de ácido palmítico tritiado puede usarse de manera rápida, para evaluar la producción de agua tritiada por estas células, lo que permitiría diferenciar células normales de aquellas provenientes de pacientes afectados de deficiencias enzimáticas de la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos.

AGRADECIMIENTOS

El autor del presente trabajo quiere agradecer a la doctora Antonia Ribes del Instituto de Bioquímica Clínica de Barcelona, por su colaboración para facilitar la consecución de los reactivos y equipos necesarios para la realización de este estudio.

REFERENCIAS

1. Manning NJ, Olpin SE, Pollit R.J, Webley JA. Comparison of 9.10-³Hpalmitic and 9.10-³Hmyristic acids for the detection of defects of fatty acid oxidation in intact cultured fibroblasts. *J. Inher. Metab. Dis.* 1990; 13:58-68.
2. Brivet M, Slama A, Saudubray JM, Legrand A, Lemonnier A. Rapid diagnosis of long chain and medium chain fatty acid oxidation disorders using lymphocytes. *Ann Clin Biochem* 1995; 32: 154-159.
3. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol.Chem* 1951; 193:265-275.
4. 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.
5. Moon A, Rhead WJ. Complementation analysis of fatty acid oxidation disorders. *J. Clin. Invest.* 1987; 79:56-94.
6. Venizelos N, Von Döbeln U, Hagenfeld L. Fatty acid oxidation in fibroblasts from patients with defects in β-oxidation and in the respiratory chain. *J. Inher. Metab. Dis.* 1998; 21:409-415
7. Ventura FV, Costa CG, Struys EA, Ruiten 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.