
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

José Henry Osorio¹
Antonia Ribes²
Montse Lluch²

RESUMEN

El sistema de transporte de la carnitina al interior de la mitocondria es fundamental para el metabolismo mitocondrial de los ácidos grasos de cadena larga. El presente estudio tuvo como objetivo el análisis de los ácidos grasos producidos por fibroblastos incubados en presencia de sustratos deuterados, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, como herramienta diagnóstica de las deficiencias de las tres enzimas responsables de este proceso. Se encontró un perfil característico solamente en la deficiencia de carnitina palmitoil transferasa I utilizando esta técnica, lo que nos permite su diagnóstico *in vitro*. En las otras dos deficiencias (carnitina acil carnitina translocasa y carnitina palmitoiltransferasa II) no fue posible encontrar un perfil característico.

Palabras clave: Ácidos grasos, β -oxidación mitocondrial.

ANALYSIS OF THE PRODUCTION OF DEUTERATED FATTY ACIDS BY FIBROBLASTS FOR THE *IN VITRO* DIAGNOSIS OF ENZYMES DEFICIENCIES OF THE TRANSPORT SYSTEM OF CARNITINE

ABSTRACT

The carnitine transport system is required for the mitochondrial metabolism of long-chain fatty acids. The objective of the present study was to analyse the fatty acids produced by fibroblasts incubated with deuterated substrates, using gas chromatography-mass spectrometry as a diagnostic tool for the diagnosis of the deficiencies of the three enzymes of this way. A characteristic profile for the carnitine palmitoyl transferase I deficiency was found using this technique which enables us its *in vitro* diagnosis. For the other two deficiencies (carnitine acil carnitine translocase and carnitine palmitoyl transferase II) it was not possible to find a characteristic profile.

Key words: Fatty acids, mitochondrial β -oxidation.

¹ Departamento de Ciencias Básicas de la Salud, Laboratorio de Enfermedades metabólicas, Universidad de Caldas. Correspondencia: Universidad de Caldas, Departamento de Ciencias Básicas de la Salud. Calle 65 No. 26-10. Manizales. E-mail: josheno@yahoo.com

² Instituto de Bioquímica Clínica. Corporación Sanitaria Clínica. Barcelona, España.

INTRODUCCIÓN

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 (CACT); retroconversión de acilcarnitinas en ésteres de acil-CoA por la carnitina palmitoiltransferasa II, en la cara interna de la membrana mitocondrial interna (1,3,4).

Los productos de este ciclo son ésteres acil-CoA de cadena larga, que posteriormente se oxidarán en el interior de la mitocondria en el proceso de la β -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 (7) Esta investigación busca proveer una herramienta diagnóstica *in vitro* para la deficiencias de CPT I, CACT y CPT II.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio es de tipo descriptivo. El material biológico empleado ha sido fibroblastos de pacientes con las deficiencias de CPT I, CACT y CPT II (dos muestras diferentes de cada deficiencia). Estas deficiencias fueron confirmadas por estudios enzimáticos, moleculares o ambos. Como controles se utilizaron 5 cultivos diferentes de fibroblastos normales.

Como sustrato fue empleado el Ácido $^2\text{H}_3$ -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- d_3]octanoil-L-carnitina.HCl, [10,10,10- d_3]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 undecanodiólico (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% CO_2 /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); posteriormente, se neutralizó mediante la adición de 3-5 ml de MEM (*Minimun Esential 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), y quedaron listas para ser incubadas en presencia de sustratos deuterados.

Se utilizó el método de Lowry y Col., (5) para la determinación de la proteína.

Para la oxidación $^2\text{H}_3$ -palmítico en fibroblastos fue utilizada la técnica diseñada por Osorio y col. (8); se preparó una solución de medio de cultivo con una concentración final de 0.15 mM de ácido 16- $^2\text{H}_3$ 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 C_8 , C_{10} , C_{12} y C_{14} en un rango de 0 a 150 nM, y C_{16} 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).

El análisis de los ácidos grasos de los medios enriquecidos (curvas de calibración y productos de la incubación) fue realizado 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 $6^{\circ}\text{C}/\text{min}$, T2 250°C a $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta T3 300°C ; volumen de inyección: $1\mu\text{l}$; 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 ión M^+-15 , ya que es el ión 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, además, un cromatógrafo de gases 5890 Series II Plus - Espectrómetro de masas 5972 Series (Hewlett Packard).

RESULTADOS

En todas las curvas de calibración se obtuvo un coeficiente de correlación superior al 0.99. La figura 1 muestra los espectros de masas del ácido $^2\text{H}_3$ -palmítico (A) y del estándar interno (IS) ácido undecanodióico (B). La figura 2 muestra el cromatograma de la mezcla de ácidos grasos deuterados de la curva de calibración, producto de la hidrólisis de las acilcarnitinas deuteradas. Se obtuvo un perfil característico en los cromatogramas en la deficiencia de CPTI comparado con los controles, pero no en la deficiencia de CACT ni en la deficiencia de CPT II (figura 3). Los valores de estas dos últimas deficiencias no nos permiten diferenciarlas con claridad (tabla 1).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los Acil-CoA tioésteres formados durante el proceso de β -oxidación mitocondrial, están confinados en la mitocondria, debido a su incapacidad para atravesar la membrana mitocondrial, mientras que las acilcarnitinas pueden salir de la mitocondria y acumularse en el medio de incubación (2).

Con base en lo expuesto, Nada y colaboradores (6) idearon un método para el diagnóstico de las deficiencias de la β -oxidación que consiste en la incubación de fibroblastos utilizando ácido $[17,17,18,18-^2\text{H}_4]-9,12$ -octadecadienóico, es decir, ácido linoléico deuterado, en presencia de L-carnitina. Al final de la incubación se valora, con la ayuda de un espectrómetro de masas en tandem, las acilcarnitinas deuteradas en el medio de cultivo. 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 para numerosos laboratorios en el mundo, dado los costos que representa, por lo que se han diseñado otras técnicas y determinado acilcarnitinas en medios de cultivo de fibroblastos por GC-CI-MS y GC-MS (8,9).

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 con diferentes autores (6, 9). Nosotros encontramos bajas concentraciones de C8, C10, y C12 en CPT I; sin embargo, y tal como era de esperar en dicha deficiencia, los valores no se normalizaron al agregar carnitina al medio de cultivo. En consecuencia, este hecho diferencia la deficiencia de CPT I de la deficiencia de OCTN2. Observamos concentraciones de intermediarios

similares al de los controles en la deficiencia de CACT, así como los niveles de C8 disminuidos, mientras los niveles de C14:1 y C14 ligeramente incrementados en la deficiencia de CPT II.

Algunos autores han reportado una gran depresión en la formación de acilcarnitinas en fibroblastos de pacientes con estas deficiencias (9), mientras que otros han encontrado niveles de C8 y C10 bastante reducidos en la deficiencia de CPT II (11). Nosotros no podemos distinguir con significación el perfil de ácidos de estas deficiencias respecto a los controles, dado que nuestros resultados para estas dos deficiencias son similares a los de otros, quienes afirman que no es posible distinguir las realizando este tipo de incubaciones (11).

En conclusión, es posible utilizar esta técnica para el diagnóstico "in vitro" de la deficiencia de CPT I, pero no para las deficiencias de CPT II y CACT.

Tabla 1. Producción de ácidos grasos deuterados en fibroblastos control y de pacientes con deficiencias de CPT I, CACT y CPT II, 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	16,7	10,4	0,8	5,2	4,1	9,2	16,9	nd	63,3
Intervalo	(5,8-28,6)	(7,8-14,3)	(0,3-1,3)	(1,0-17,6)	(2,8-5,7)	(2,8-25)	(11,1-28,6)		(31,6-121,1)
CPT I	3,1	0,76	0,76	0,3	3,9	6,9	23	nd	38,8
CACT	2,8	11,7	1,5	1,5	8,3	25	16,6	nd	67,5
CPT-II	18	14	1,8	1,8	10	30	30	nd	105,6

nd: no detectado.

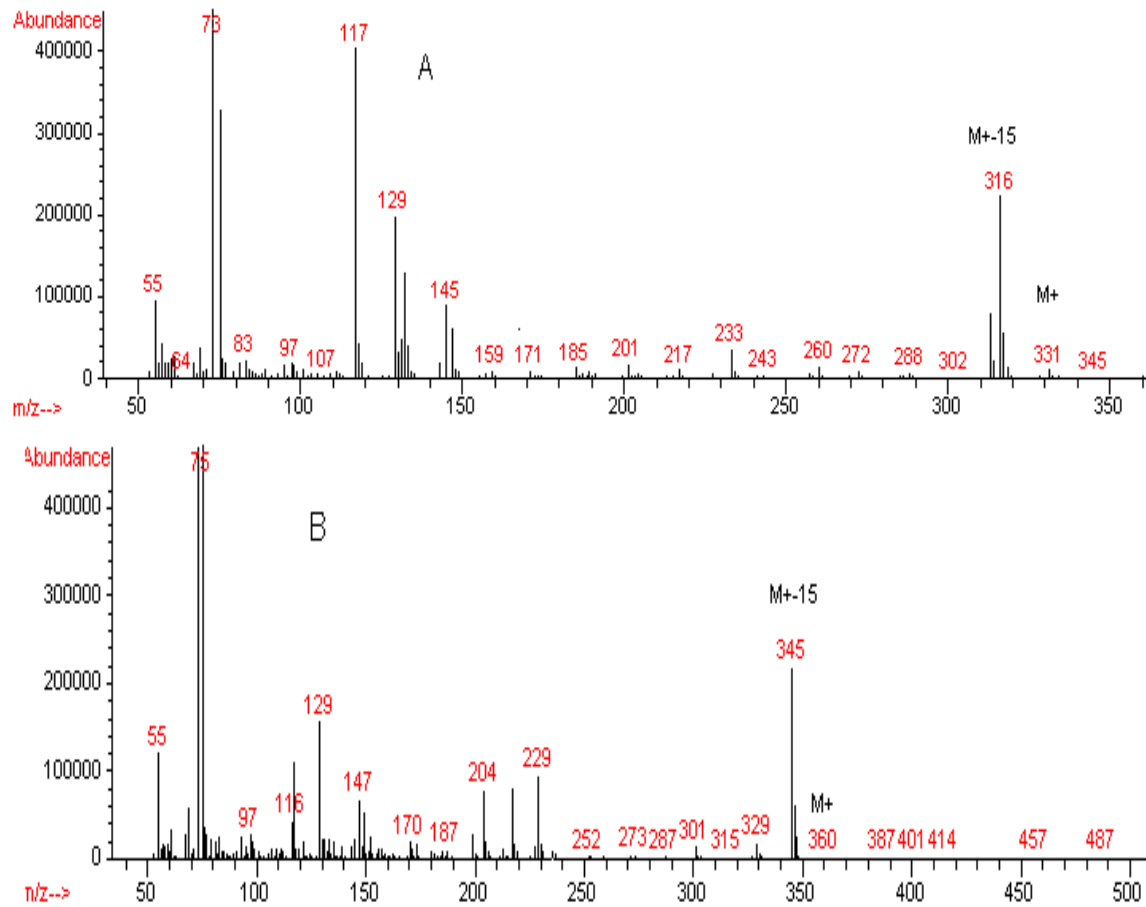


Figura 1. Espectros de masas del ácido $^2\text{H}_3$ -palmitico (A) y del estándar interno (IS) ácido dodecanoico (B).

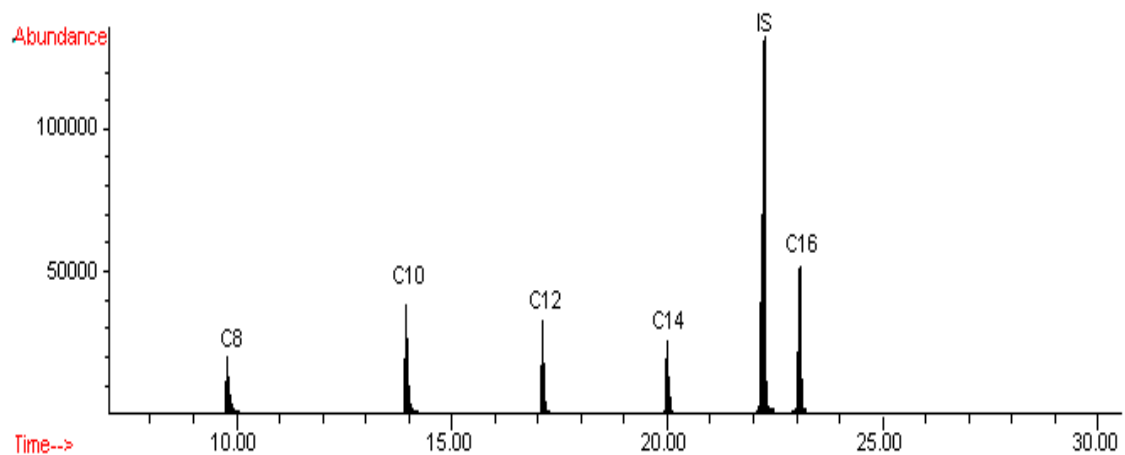


Figura 2. GC-MS-SIM de la mezcla de ácidos grasos deuterados de la curva de calibración. Están indicados según el número de átomos de carbono en la cadena, así: C8, octanoico; C10, decanoico; C12, dodecanoico; C14, tetradecanoico; C16, hexadecanoico, así como el estándar interno (IS).

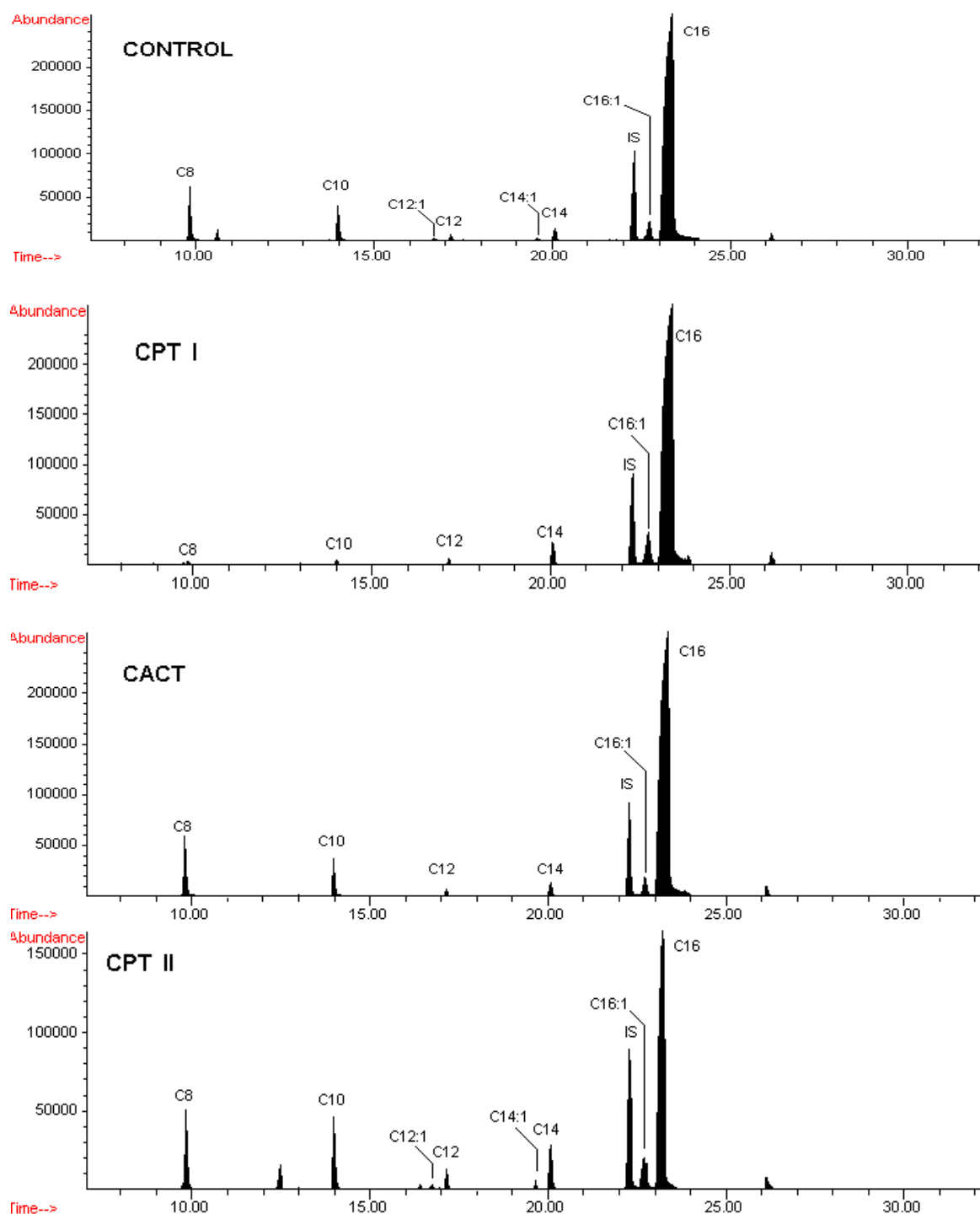


Figura 3. GC-MS-SIM de la incubación del ácido $^2\text{H}_3$ -palmitico en fibroblastos control y de pacientes con deficiencias de CPT I, CACT y CPT II primaria de carnitina. Están indicados los ácidos grasos deuterados según el número de átomos de carbono: C8, octanóico; C10, decanóico; C12:1, dodecenóico; C12, dodecanóico; C14:1, tetradecenóico; C14, tetradecanóico; C16, hexadecanóico. IS identifica el estándar interno.

REFERENCIAS

1. Ibdah JA. Acute fatty liver of pregnancy: an update on pathogenesis and clinical implications. *World J Gastroenterol* 2006; 12:7397-404.
2. Kler RS, Jackson S, Bartlett K, Bindoff LA, Eaton S, Pourfarzam M, et al. Quantitation of acyl-CoA and acylcarnitine esters accumulated during abnormal mitochondrial fatty acid oxidation. *J Biol. Chem.* 1991; 266:22932-38.
3. Longo N, Amat di San Filippo C, Pasquali M. Disorders of carnitine transport and the carnitine cycle. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2006; 142:77-85.
4. Leonhardt M, Langhans W. Fatty acid oxidation and control of food intake. *Physiol Behav.* 2004; 83:645-51.
5. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193:265-75.
6. 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.
7. Jogl G, Hsiao YS, Tong L. Structure and function of carnitine acyltransferases. *Ann N Y Acad Sci.* 2004; 1033:17-29.
8. Osorio JH, Rodés M, Garavaglia B, Briones P, Ribes A. Estudios bioquímicos en 46 pacientes con deficiencias de la β -oxidación mitocondrial. En: Sociedad Española de Pediatría. IV congreso de errores congénitos del metabolismo. Memorias. Puerto de la Cruz-Tenerife. Islas Canarias. España. 2001.18-21 de abril. p. 26.
9. 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.
10. Shen JJ, Matern D, Millington DS, Hillman S, Fezor MD, Bennet MJ, et al. Acylcarnitines in fibroblasts of patients with long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency and other fatty acid oxidation disorders. *J Inher Metab Dis* 2000; 23:27-44.
11. Roe CR, Roe DS. Recent developments in the investigation of inherited metabolic disorders using cultures human cells. *Mol Genet Metab* 1999; 68:243-257.