

# DIAGNÓSTICO DE LA DEFICIENCIA DE ACIL-COA DESHIDROGENASA DE CADENA MUY LARGA MEDIANTE EL USO DE SUSTRATOS TRITIADOS

José Henry Osorio\* DVM, BSc, DEA, MSc, MMB, MPhil, PhD  
Antonia Ribes\*\* BSc, PhD  
Montse Lluc\*\* MD

## Resumen

**Introducción:** *la acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga (VLCAD) cataliza la primera reacción de la degradación de ácidos grasos de 14 a 24 átomos de carbono. Su deficiencia debe ser siempre confirmada por estudios de laboratorio.*

**Materiales y métodos:** *en el presente trabajo, fueron incubados fibroblastos de pacientes que presentaban la deficiencia de VLCAD, en presencia de sustratos tritiados.*

**Resultados y discusión:** *Fue encontrada diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) al comparar la degradación de palmitato y miristato tritiado entre controles y pacientes con deficiencia de VLCAD. 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.*

**Palabras clave:** VLCAD, ácidos grasos, metabolismo

**Abreviaturas:** VLCAD, Acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga; MCAD, acil-CoA deshidrogenasa de cadena media; MAD, múltiples acil-CoA deshidrogenasas.

ARCH.MED. (Manizales); 8 (1) :40-44

---

\* Laboratorio de Patología Molecular, Departamento de Ciencias Básicas de la Salud. Universidad de Caldas.  
e.mail: jose.osorio\_o@ucaldas.edu.co

\*\* Instituto de Bioquímica Clínica. Corporació Sanitaria Clínic. Barcelona. España  
Correspondencia: Universidad de Caldas, Departamento de Ciencias Básicas de la Salud. Calle 65 N0. 26-10.  
Manizales.

## Diagnosis of very-long chain ACYL-CoA dehydrogenase deficiency using tritiated substrates

### Summary

**Introduction:** very long-chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD) is the key enzyme for degrading fatty acids with a chain of 14-24 atoms of carbon. It is necessary to confirm always this deficiency using laboratory methods.

**Materials and methods:** during the present work fibroblasts of patients suffering VLCAD deficiency were incubated with tritiated palmitate and miristate.

**Results and discussion :** it was found a significant difference ( $P < 0.05$ ) when comparing tritiated palmitate and miristate between controls and patients suffering VLCAD deficiency. It was observed mores depression for the oxidation of miristate compared to palmitate, whoever it was not possible to differentiate the 3 reported phenotypes.

**Key words:** VLCAD, fatty acids, metabolism

ARCH.MED. (Manizales); 8 (1) :40-44

### Introducción

La acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga (VLCAD) es la enzima específica para la degradación de acil-CoAs de 14-24 átomos de carbono y cataliza más del 90% de la deshidrogenación del palmitoil-CoA ( $C_{16}$ ) necesario para la producción de energía<sup>1</sup>. Se han reportado 3 fenotipos basados en la clínica presentada en esta deficiencia: una forma infantil severa<sup>2</sup>, conocida como VLCAD-C por presentar cardiomiopatía dilatada; una forma de presentación más benigna ocurrida también en la niñez<sup>3</sup> conocida como VLACD-H caracterizada por episodios de hipoglucemia y una forma muscular, la cual se manifiesta después de la niñez<sup>4,5</sup> y que ha sido descrita como VLCAD-M en la cual se presentan episodios de miopatía con rabdomiólisis<sup>6</sup>.

En el presente trabajo son presentados los hallazgos bioquímicos al incubar fibroblastos de seis pacientes que presentaban los tres fenotipos, en presencia de ácido palmítico y mirístico tritiados.

### Materiales y métodos

El presente estudio es de tipo experimental. El material biológico empleado en el presente estudio ha sido fibroblastos de 6 pacientes con deficiencia de VLCAD. 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%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 (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), quedando listas para ser incubadas en presencia de sustratos tritiados. Se utilizó el método de Lowry y Col.,<sup>7</sup> para la determinación de la proteína.

El método utilizado fue el de Manning<sup>8</sup>. 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 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 incubaba a 37 ° C durante 4 horas en cámara de CO<sub>2</sub> 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 tubo para microcentrifugar 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 VLCAD.

## 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, tal como lo sugirieron Olpin y colaboradores<sup>9</sup> (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 deficiencia de VLCAD 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 VLCAD. 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

Los primeros trabajos basados en la medición del  $^{14}\text{CO}_2$  liberado por incubación de

células con  $[1-^{14}\text{C}]$ ácidos grasos<sup>10,11,12</sup> 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  $\beta$ -oxidación se convierten inmediatamente a  $\text{CO}_2$ , mientras que el remanente se incorpora a intermediarios metabólicos no volátiles<sup>12</sup>. Posteriormente Moon y Rhead<sup>13</sup>, desarrollaron un método de valoración de  $^3\text{H}_2\text{O}$  en fibroblastos con ácidos grasos tritiados. Manning y colaboradores<sup>8</sup> postularon que  $[9,10](n)^{-3}\text{H}$ -miristato posee claras ventajas sobre  $[9,10^{-3}\text{H}]$ -palmitato para la detección de trastornos tales como la deficiencia de MCAD y las formas leves de la deficiencia MAD donde la  $\beta$ -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. Para otros autores<sup>14</sup>, utilizando  $[9,10^{-3}\text{H}]$ -palmitato, los porcentajes para la deficiencia VLCAD oscilaron entre 10-37%, en nuestro caso, en la deficiencia de VLCAD se encuentra mas deprimida la oxidación de miristato comparada con la oxidación de palmitato, lo que no concuerda con lo enunciado anteriormente (8) y en promedio obtuvimos una oxidación de palmitato para esta deficiencia en general del 50% lo que no concuerda con Nada y colaboradores (15),

**Tabla 1. Oxidación de  $[9,10^3\text{H}]$ -ácidos grasos en pacientes con deficiencias de VLCAD**

| Deficiencia | n  | Oxidación<br>$[9,10^3\text{H}]$ -palmitato<br>nmol/hora/mg proteína | Oxidación<br>$[9,10^3\text{H}]$ -miristato<br>nmol/hora/mg proteína | Oxidación<br>$[9,10^3\text{H}]$ -palmitato<br>% | Oxidación<br>$[9,10^3\text{H}]$ -miristato<br>% |
|-------------|----|---------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Controles   | 20 | 4.7                                                                 | 4.4                                                                 | 100                                             | 100                                             |
| VLCAD-C     | 2  | 2.3                                                                 | 1.1                                                                 | 48                                              | 25                                              |
| VLCAD-H     | 2  | 2.1                                                                 | 1.4                                                                 | 45                                              | 30                                              |
| VLCAD-M     | 2  | 2.4                                                                 | 1.2                                                                 | 50                                              | 28                                              |

Abreviaturas: VLCAD-C, Deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga con alteraciones cardíacas; VLCAD-H, Deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga con hipoglicemia, VLCAD-M, Deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga con alteraciones musculares.

además encontramos para el miristato una degradación cercana solo al 30%, mientras que otros autores la encontraron cercana al límite inferior de los controles (16), por lo que diseñaron la técnica de incubación con ácido oleico tritiado para establecer diferencias en pacientes con deficiencias VLCAD reportando buenos resultados. Las diferencias en nuestro estudio pueden ser debidas las modificaciones que introducimos, entre otras, la supresión de algunos pasos y la reducción del tiempo de incubación, ya que encontramos que después

de 5 horas de incubación, las células no modifican el porcentaje de agua tritiada producida, por lo cual las modificaciones introducidas reducen el tiempo de ejecución de la técnica de 24-36 horas a 6 horas solamente.

Se puede concluir que la valoración de agua tritiada, aunque inespecífico, es un buen método para sugerir una deficiencia acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga, sin poder hacer diferenciación acerca del fenotipo implicado.

## Literatura citada

1. IZAI K, UCHIDA Y, ORII T, YAMAMOTO T, HASHIMOTO T. Novel fatty acid  $\beta$ -oxidation enzymes in rat liver mitochondria I. Purification and properties of very-long chain acyl-coenzyme A dehydrogenase. *J Biol Chem.* 1992; 267:1027-1033.
2. AOYAMA T, SOURI M, USHIKUBO S, KAMIJO T, YAMAGUCHI S, KELLEY RI, et al. Purification of human very-long-chain- acyl-coenzyme A dehydrogenase and characterization of its deficiency in seven patients. *J Clin Invest.* 1995; 95:2465-2473.
3. VIANEY-SABAN C, DIVRY P, BRIVET M, NADA N, ZABOT MT, MATHIEU M, et al.. Mitochondrial very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: clinical characteristics and diagnostic considerations in 30 patients. *Clin Chim Acta.* 1998; 269:43-62.
4. OLGIVIE I, POURFARZAM, JACKSON S, STOCKDALE S, BARTLETT K, TURNBULL DM. Very long-chain acyl coenzyme A dehydrogenase deficiency presenting with exercise-induced myoglobinuria. *Neurology* 1994; 44:467-473.
5. MINETTI C, GARAVAGLIA G, BADO M, INVERNIZZI F, BRUNO C, RIMOLDI M, ET AL. Very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency in a childwith recurrent myoglobinuria. *Neuromuscul. Disord.* 1998; 8:3-6.
6. ROE DS, VIANEY-SABAN C, SHARMA S, ZABOT MT, ROE CR. Oxidation of insaturated fatty acids by human fibroblasts with very-long-chain- acyl-CoA dehydrogenase deficiency: aspects of substrate specificity and correlation with clinical phenotype. *Clin Chim Acta.* 2001; 312:55-67.
7. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, 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- $^3$ HPalmitic and 9.10- $^3$ Hmyristic 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  $^3$ H $_2$ O from [9,10- $^3$ H]-myristic and [9,10- $^3$ H]-palmitic acids by intact cultured fibroblasts. *J Inher Metab Dis.* 1992;15:883-890.
10. KOLVRAA S, GREGERSEN N, CHRISTIENSEN 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.
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.  $^{14}$ CO<sub>2</sub>-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.  $^{14}$ CO<sub>2</sub> production is no measure of [ $^{14}$ C]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  $\beta$ -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- $^3$ H]-oleic acid. *J Inher Metab Dis.* 1997; 20:415-419.