

DIAGNÓSTICO IN VITRO DE ALTERACIONES METABÓLICAS MEDIANTE INCUBACIÓN DE FIBROBLASTOS CON ÁCIDO PALMITICO TRITIADO

JOSÉ HENRY OSORIO*, NELSY LOANGO CHAMORRO** PATRICIA LANDÁZURI***

Resumen

Introducción: Algunos métodos in vitro para el diagnóstico de alteraciones metabólicas son confiables pero su realización consume mucho tiempo, por lo que se requiere modificarlos, con miras a que sean útiles en casos de urgencia.

Materiales y métodos: el presente trabajo muestra una modificación substancial de la técnica de incubación de fibroblastos en presencia de ácido palmítico tritado, se determinó la cantidad de agua tritada producida en los medios de cultivo.

Resultados y discusión: se redujo el tiempo de realización de la técnica de varios días a solo 6 horas. Estos cambios nos permiten la confirmación en breve, de los pacientes sospechosos de sufrir algunos errores innatos del metabolismo de los ácidos grasos.

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

ARCH. MED. (Manizales) 2008; 8 (2): 107-112

Summary

Introduction: Some methods for in vitro diagnosis of metabolic alterations are precise but time consuming, that is why it is necessary to modify it, then it can become useful in urgent cases.

Materials and methods: the present study shows a substantial modification for the technique of incubation of fibroblasts with tritiated palmitic acid. The production of tritiated water was measured in the culture medium.

* Departamento de Ciencias Básicas de la Salud, Laboratorio de Enfermedades Metabólicas. Universidad de Caldas.

** Facultad de Ciencias Básicas, Programa de Biología. Universidad del Quindío.

*** Grupo de Investigación en Enfermedades Cardiovasculares y Metabólicas. Laboratorio de Bioquímica y Genética. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad del Quindío.

Correspondencia: JH Osorio. Universidad de Caldas, Departamento de Ciencias Básicas de la Salud. Calle 65 N0. 26-10. Manizales.

e.mail: jose.osorio_o@ucaldas.edu.co

Remitido para publicación: 22-04-2008. Aprobado para publicación: 03-08-2008

Results and discussion: *the time consumed during the procedure was reduced from some days to only 6 hours. These changes allow us a quick confirmation of patients suspicious of suffering some inherited errors of fatty acid metabolism.*

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

ARCH. MED. (Manizales) 2008; 8 (2): 107-112

Introducción

Manning y colaboradores postularon en 1990¹ 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 linfocitos², 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 fibroblastos sobre el proceso de oxidación del sustrato.

Materiales y métodos

El presente estudio fue de tipo experimental. El material biológico empleado en el presente estudio ha sido fibroblastos de pacientes que no presentaban deficiencia alguna de la degradación intramitocondrial de ácidos grasos.

Los fibroblastos (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 (*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.,⁷ para la determinación de la proteína.

El método utilizado fue el de Manning⁸. 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 μ L de A + 3.8 μ L de C (3.8 μ 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 μ 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

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 tritados 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 CO₂ 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 microcentrífuga y se centrifuga a 5000 rpm durante 5 min. 360 μL de la mezcla son transferidos de nuevo a un tubo de microcentrífuga nuevo que contiene 50 μL de NaOH 1 M. Esta mez-

cla 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

Para evaluar la oxidación de sustratos tritados 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 CO₂ 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 microcentrífuga y se centrifuga a 5000 rpm durante 5 min. 360 μL de la mezcla son transferidos de nuevo a un tubo de microcentrífuga 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. El estudio fue aprobado por los correspondientes comités de ética.

Resultados

Se encontró en el presente estudio que después de 5 horas de incubación, las células no modifican la cantidad de $^3\text{H}_2\text{O}$ producida (figura 1). El estudio del tiempo de almacenamiento de las células refrigeradas, sobre la oxidación del sustrato muestra que 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 a las condiciones antes mencionadas. La tabla 1 muestra los resultados de los ensayos, con sus correspondientes coeficientes de variación, para

el ácido $[9,10^3\text{H}]$ -palmitico, 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 15 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.

Los valores promedio de palmitato tritiado oxidado para fibroblastos normales oscilan entre 3.8 y 4.9 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 un 2,3-enoyl-CoA ester y transfiriendo el 50% del tritio a la proteína de transferencia de electrones (FADH); (B) la reacción de la 3-

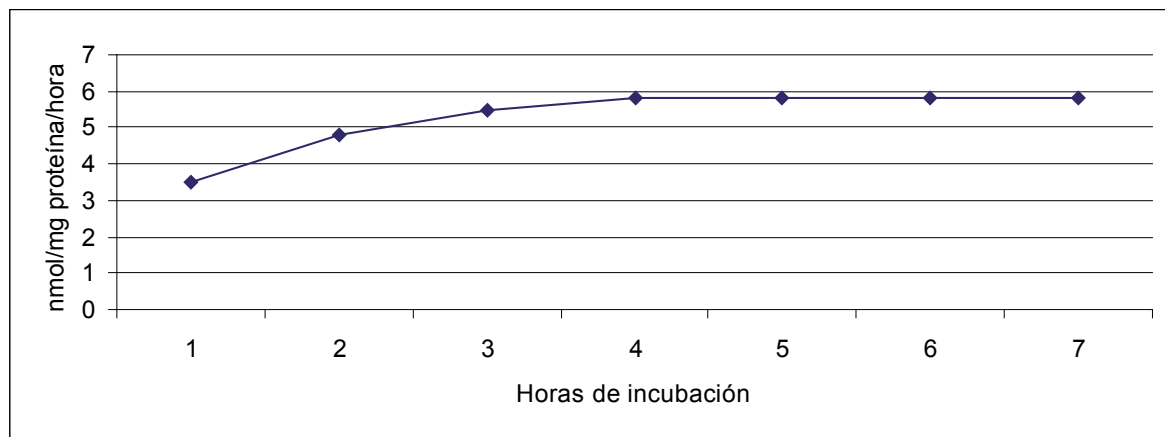


Figura 1. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre la capacidad de oxidación de sustrato tritiado por los fibroblastos (se mide la cantidad en nmoles de $[9,10^3\text{H}]$ -palmitico oxidado por miligramo de proteína por hora).

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

Muestra No.	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Ensayo 5	Media	SD	CV
1	4.5	4.5	4.3	4.2	4.3	4.4	0.21	5.1
2	4.0	4.1	4.0	3.9	3.8	3.9	0.17	3.6
3	4.0	4.0	3.8	3.7	4.0	3.9	0.20	5.5

Abreviaturas: SD desviación estandar, CV coeficiente de variación.

hidroxiacil-CoA deshidrogenasa que remueve la mitad del tritio remanente, el cual finaliza en el NADH; y (C) el ciclo del ácido tricarboxílico 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 ³H₂O 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 a estudiar pueden ser almacenados para este tipo de ensayos hasta 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% después de 24 horas de conservación y no encontramos 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 medida con los ensayos con palmitato tritiado, por eso solo 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 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 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. Los resultados del presente estudio son similares a los reportados previamente por nuestro grupo trabajando con linfocitos ⁸.

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

Los autores del presente trabajo quieren 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.

Literatura citada

1. Manning NJ, Olpin SE, Pollit RJ, 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 AI, 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 I. 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, Ruiter J, Allers P, Ijlst, I, 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.
8. Osorio JH. Oxidación de un sustrato tritiado por linfocitos para el diagnóstico rápido de alteraciones metabólicas. *Biosalud.* 2007;19-24.

