

DIAGNÓSTICO IN VITRO DE LA DEFICIENCIA LCHAD

JOSÉ HENRY OSORIO* PhD

Recibido para publicación: 17-09-2012 - Versión corregida: 21-03-2013 - Aprobado para publicación: 07-05-2013

Resumen

Objetivo: Analizar la oxidación de sustratos deuterados en fibroblastos de pacientes que sufren deficiencia de hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (LCHAD). **Materiales y métodos:** fibroblastos de pacientes y controles se incubaron con ácido palmítico deuterado y se determinaron los intermediarios de la oxidación del mismo en nmol/mg proteína/72 horas. **Resultados:** Las concentraciones observadas para los diferentes ácidos grasos, permiten diferenciar los fibroblastos de pacientes con deficiencia de LCHAD de los fibroblastos controles. **Conclusión:** Esta técnica permite el diagnóstico in vitro de la deficiencia de hidroxil-CoA de cadena larga.

Palabras clave: metabolismo energético, ácidos grasos, diagnóstico precoz.

Arch Med (Manizales) 2013; 13(1):24-30

In vitro diagnosis of LCHAD deficiency Summary

Objective: to analyse the oxidation rate of tritiated substrates in fibroblasts of patients suffering the deficiency and controls.

Materials and methods: fibroblasts from patients and controls were incubated with deuterated palmitic acid and the metabolites of the oxidation of this substrate were measured in nmol/mg proteína/72 hours.

Results: the observed concentrations for different fatty acids, enable us to differentiate fibroblasts of patients suffering LCHAD deficiency from normal fibroblasts.

Conclusion: A characteristic profile for this deficiency was found using this technique which its in vitro diagnosis.

Keywords: energy metabolism, fatty acids, early diagnosis.

Introducción

La β -oxidación mitocondrial, es el proceso mayoritario de oxidación de los ácidos grasos, siendo una fuente energética muy importante tanto para el músculo esquelético como para el músculo cardíaco, principalmente durante los períodos de ejercicio prolongado y durante el ayuno. Una vez al interior de la mitocondria, los ésteres acil-CoA de los ácidos grasos son degradados a través de cuatro reacciones secuenciales a saber: a. Reducción en la posición a-b del acil-CoA produciendo 2,3-enoil-CoA. b. Hidratación del doble enlace dando lugar a especies estereoespecíficas, L-3-hidroxiacil-CoA. c. Oxidación en la posición 3-hidroxi dando lugar a 3-cetoacil-CoA. d. Rotura tiolítica del 3-cetoacil-CoA a acetil-CoA y acil-CoA, cuya cadena carbonada es ahora dos átomos de carbono más corta. Este acil-CoA puede volver a entrar en el ciclo de la β -oxidación, tantas veces como sea necesario, hasta su completa oxidación a acetil-CoA. Se ha descrito un complejo de la membrana interna mitocondrial (llamado "proteína trifuncional" TFP) que realiza las tres actividades enzimáticas enoil-CoA hidratasa, hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, y cetoacil-CoA tiolasa, pasos b, c, y d de la β -oxidación mitocondrial, para los ácidos grasos de cadena larga¹. La deficiencia de 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de cadena larga (LCHAD) sola, o como parte de la deficiencia de proteína trifuncional (TFP), se manifiesta típicamente durante los episodios de ayuno o enfermedad, como hipoglicemia hipocetótica. Las complicaciones agudas o crónicas de la deficiencia de LCHAD, pueden ser manejadas evitando el ayuno y consumiendo una dieta baja en ácidos grasos de cadena larga y muy larga, así como suplementado a los pacientes con ácidos grasos de cadena media y corta². La deficiencia de LCHAD es rara y puede ser causada por mutaciones en la subunidad alfa (OMIM # 600890), o en la subunidad beta (OMIM #143450), de la TFP, siendo la mutación de cambio de sentido c.1528G>C en la subunidad

alfa la más prevalente^{3,4}. El presente estudio analizó la oxidación de sustratos deuterados en fibroblastos de pacientes con deficiencia de LCHAD como herramienta diagnóstica para este tipo de alteraciones metabólicas.

Materiales y métodos

El presente estudio es de tipo experimental descriptivo. El material biológico empleado en el presente estudio ha sido fibroblastos de 2 pacientes con deficiencia de LCHAD. Esta deficiencia fue confirmada por estudios enzimáticos, moleculares, o ambos. Como controles se utilizaron 20 cultivos diferentes de fibroblastos normales.

Como sustrato fue empleado el Ácido² H₃-metil-palmitico (Cambridge Isotope Laboratories). Fueron utilizados los siguientes compuestos deuterados para la preparación de la curva de calibración (Ten Brinck-Free University Amsterdam): [8,8,8-d₃]octanoil-L-carnitina.HCl, [10,10,10-d₃]decanoil-L-carnitina.HCl, [12,12,12-d₃]dodecanoil-L-carnitina.HCl, [14,14,14-d₃]tetradecanoil-L-carnitina.HCl, [16,16,16-d₃]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%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 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 deuterados. Se utilizó el método de Lowry y Col.⁵, para la determinación de la proteína. Para la oxidación $^2\text{H}_3$ -palmitato en fibroblastos fue utilizada la técnica diseñada por Osorio y cols⁶; se preparó una solución de medio de cultivo con una concentración final de 0.15 mM de ácido $16\text{-}^2\text{H}_3$ 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 realizada 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 $6^\circ\text{C}/$

min, T2 250°C a $20^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta T3 300°C ; volumen de inyección: 1 μl ; 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 un cromatógrafo de gases 5890 Series II Plus – Espectrómetro de masas 5972 Series (Hewlett Packard).

De acuerdo con el artículo 11 literal a. de la Resolución No. 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Normas Científicas, Técnicas, y Administrativas para la Investigación en Salud, el presente estudio es considerado sin riesgo.

Resultados

En todas las curvas de calibración se obtuvo un coeficiente de correlación superior al 0.99. (C_8 : $y=0.9762x + 10.6$; C_{10} : $y=1.0129x + 8.6$; C_{12} : $y=0.9885x + 9.5$; C_{14} : $y=0.985x + 10.4$; C_{16} : $y=1.015x + 10.61$). La Figura 1 muestra los espectros de masas del ácido $^2\text{H}_3$ -palmítico (A) y del estándar interno (IS) ácido undecano-diólico (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.

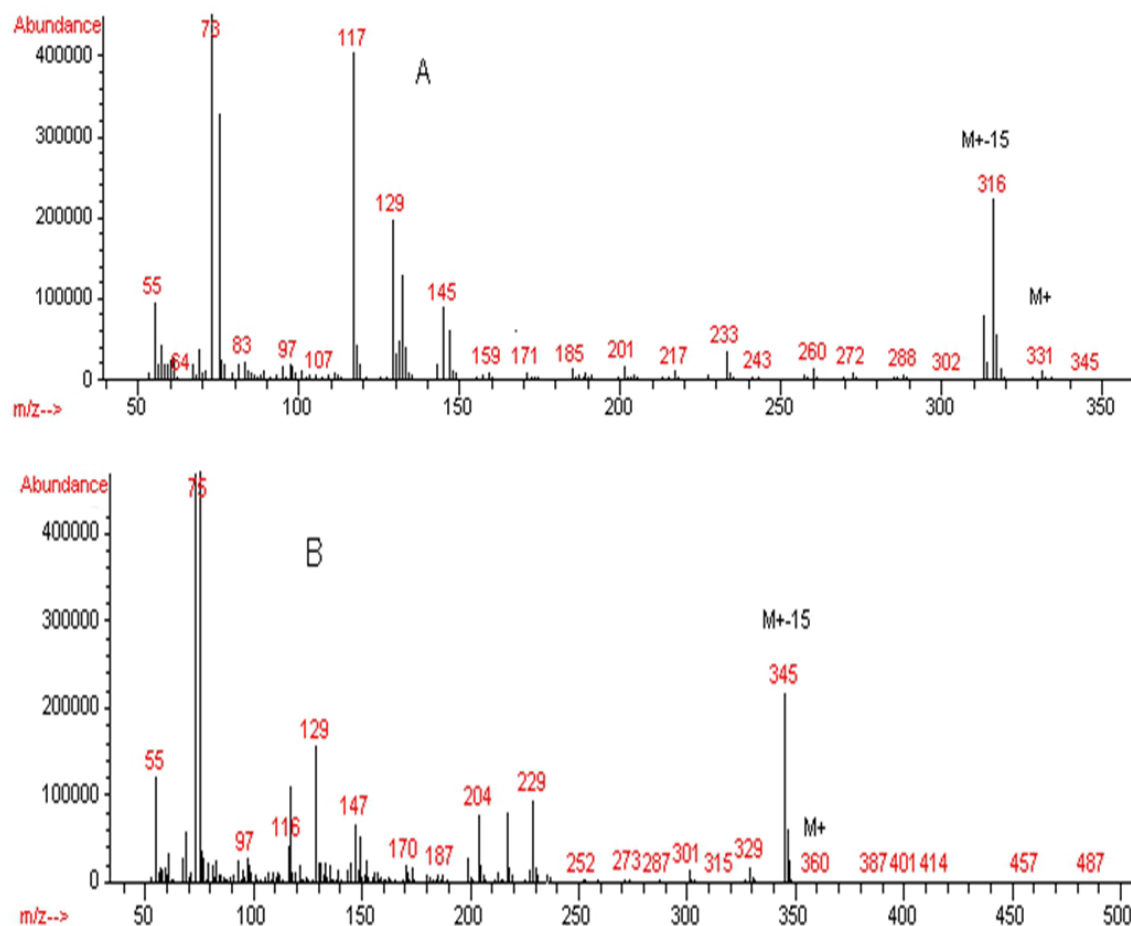


Figura 1. Espectros de masas del ácido 2H_3 -palmitico (A) y del estandar interno (IS) ácido undecanodiico (B). Obtenidos del equipo utilizado en el presente estudio.

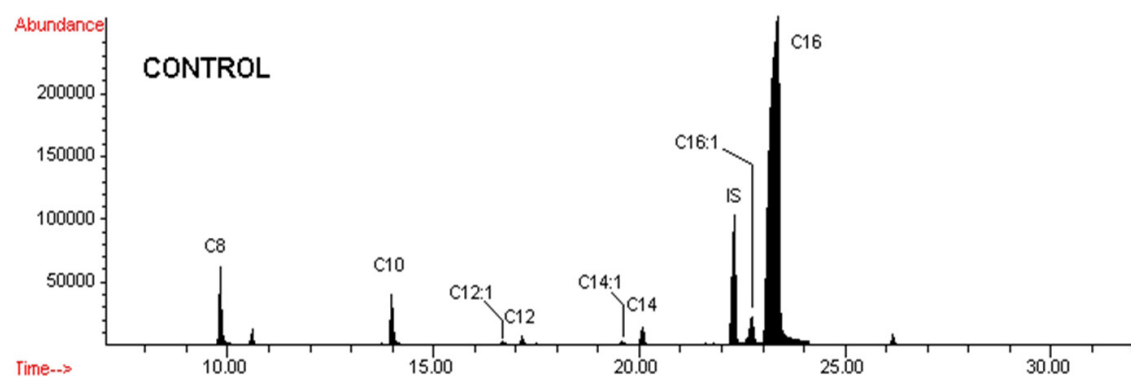


Figura 2. GC-MS-SIM de la mezcla de ácidos grasos deuterados de la curva de calibración. Están indicados según el número de átomos de carbono en la cadena así: C8, octanóico; C10, decanóico; C12, dodecanóico; C14, tetradecanóico; C16, hexadecanóico, así como el estandar interno (IS). Obtenidos del equipo utilizado en el presente estudio.

Se obtuvo un perfil característico en los cromatogramas en la deficiencia de LCHAD y en los controles (Figura 3).

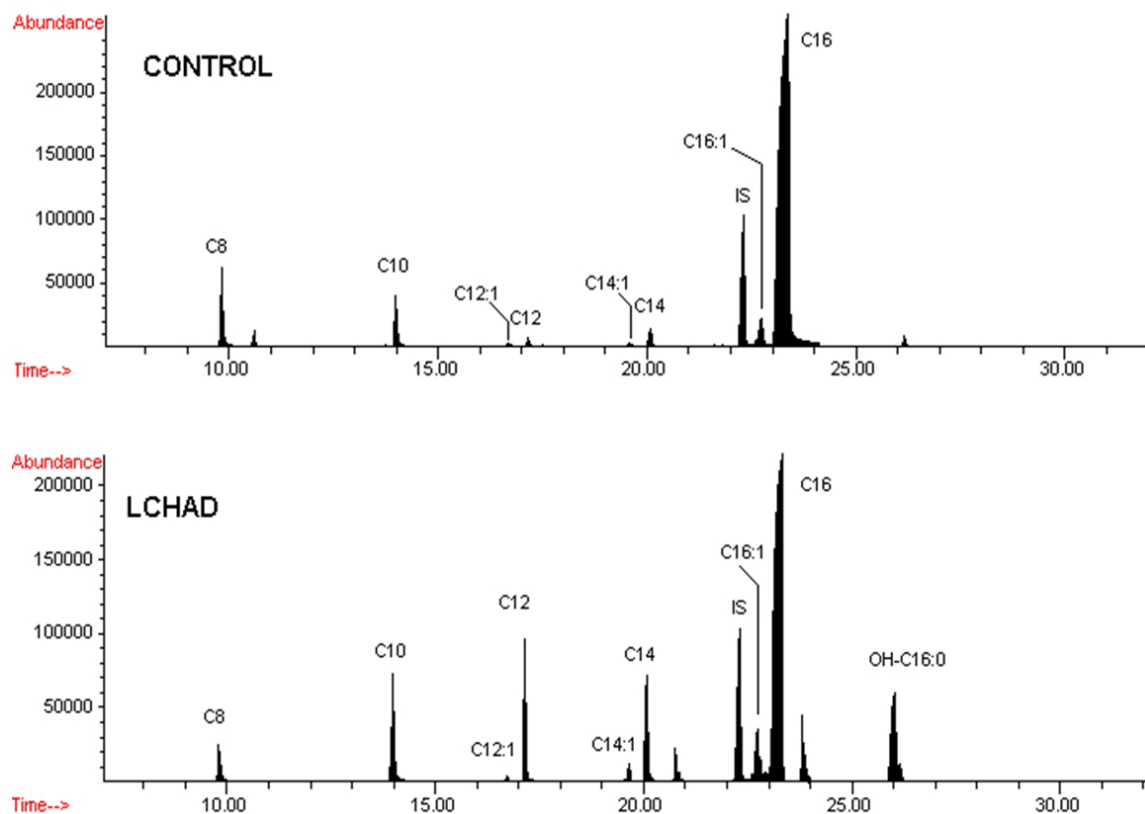


Figura 3. GC-MS-SIM de la incubación del ácido $^2\text{H}_3$ -palmitico en fibroblastos control y de pacientes con deficiencia de VLCAD. Están indicados los ácidos grasos deuterados según el número de átomos de carbono: C8, octanóico; C10, decanóico; C12:1, dodecenóico; C12, dodecanóico; C14:1, tetradecenóico; C14, tetradecanóico; C16, hexadecanóico. IS identifica el estandar interno. Obtenidos del equipo utilizado en el presente estudio.

Tabla 1. Producción de ácidos grasos deuterados en fibroblastos control y de pacientes con deficiencia de LCHAD, posterior a la incubación con ácido $^2\text{H}_3$ -palmitico.

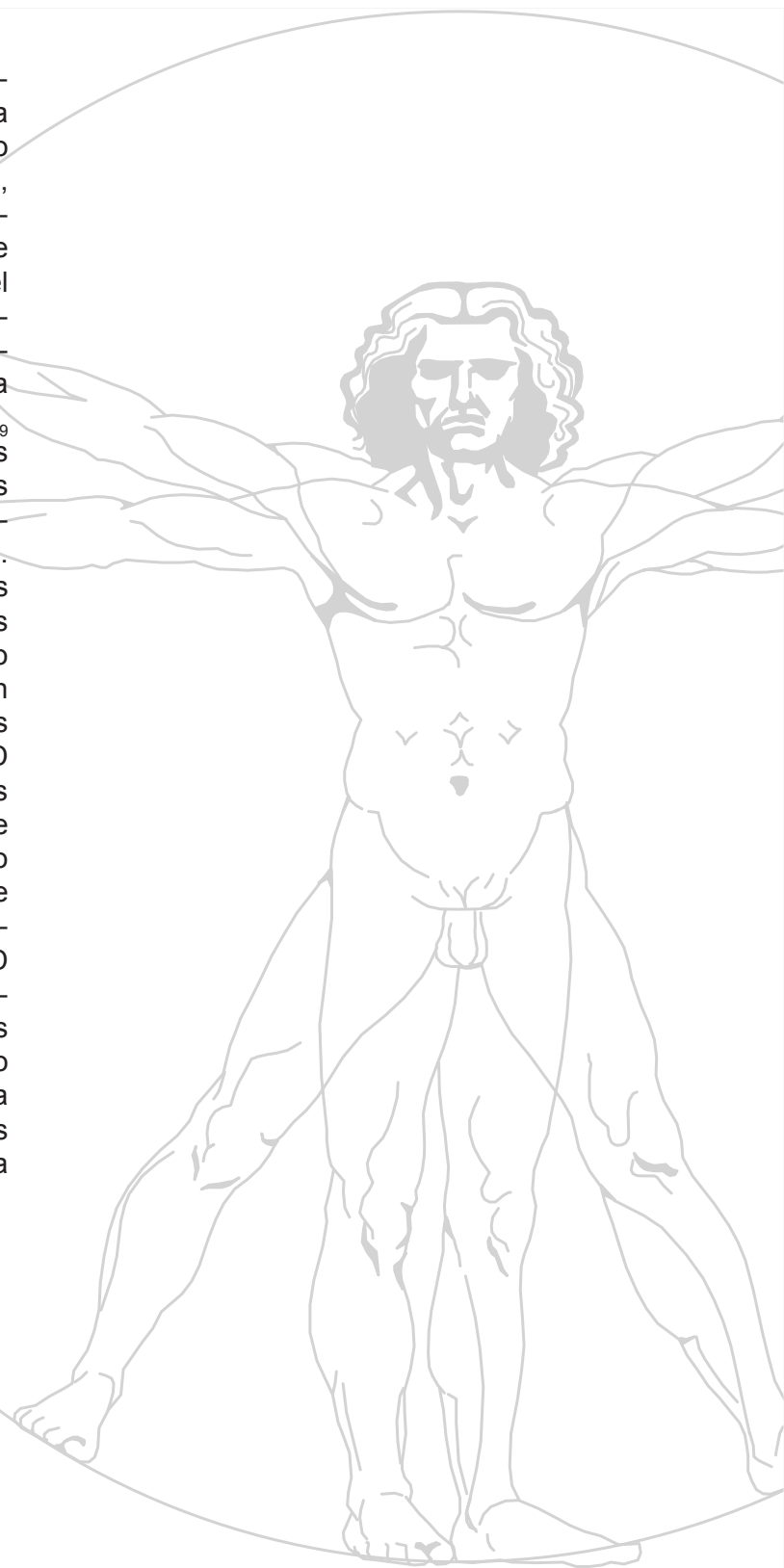
Línea Celular	Ácidos grasos intermediarios (nmol/mg proteína/72 h)							Total
	C8	C10	C12:1	C12	C14:1	C14	C16:1	
Controles	16,7	10,4	0,8	5,2	4,1	9,2	16,9	63,3
Intervalo	(5,8-28,6)	(7,8-14,3)	(0,3-1,3)	(1,0-17,6)	(2,8-5,7)	(2,8-25)	(11,1-28,6)	(31,6-121,1)
LCHAD	18	12,3	0,8	38,6	3,9	32,9	38,6	232,1

Abreviaturas: nd, no detectado

Las concentraciones observadas para los diferentes ácidos grasos, permiten diferenciar los fibroblastos de pacientes con deficiencia de LCHAD de los fibroblastos controles (tabla1). Al realizar análisis estadístico mediante la prueba *t* de *student* se encontró diferencia significativa ($P < 0,05$) entre los pacientes y los controles, para el total de ácidos grasos acumulados, con incrementos significativos de C12, C14 y C16:OH.

Discusión

El diagnóstico de la deficiencia de hidroxiacl-CoA deshidrogenasa de cadena larga se basa en las manifestaciones clínicas, tales como hipoglicemia, hepatomegalia, cardiomiopatía, trastornos del ritmo cardíaco, debilidad muscular o miopatía, principalmente⁷. También se han reportado síndrome de muerte súbita del lactante, retinitis pigmentosa, neuropatía periférica, y mioglobinuria^{8,9}. Las investigaciones bioquímicas demuestran niveles bajos de carnitina en sangre, así como niveles elevados de C_{14:1n-9} en suero, y elevación de hidroxiaclcarnitinas en sangre (C_{16:OH}, C_{18:OH}, C_{18:1OH})¹⁰. Los estudios “*in vitro*” de estos pacientes incluyen la utilización de fibroblastos y linfocitos entre otros¹¹. En la deficiencia de LCHAD encontramos elevación en los niveles de C12, C14 y niveles de C16:1; además se detectó C16:OH. Todo esto concuerda con otros trabajos que hacen referencia al perfil de acilcarnitinas para estas dos deficiencias^{12,13,14}. En la deficiencia LCHAD un porcentaje de intermediarios hidroxilados (entre C12 y C18) es retenido intracelularmente en mayor cantidad que los intermediarios no hidroxilados de similar longitud en la cadena de átomos carbono, debido a que en esta deficiencia, existen suficientes cantidades de SCHAD para metabolizar desde C10, hasta C12 parcialmente, pero no para metabolizar cadenas de mayor longitud completamente a^{15,16}. Esto implica que las hidroxiaclcarnitinas de cadena larga son substratos menos eficientes que los intermediarios no hidroxilados para salir de la mitocondria, o de la célula, o de ambos¹².



Literatura citada

1. Chegary M, Brinke H, Ruiter JP, Wijburg FA, Stoll MS, Minkler PE, et al. **Mitochondrial long chain fatty acid beta-oxidation in man and mouse.** *Biochim Biophys Acta* 2009; 1791(8):806-15.
2. Gillingham M, Van Calcar SC, Ney DM, Wolv J, Harding CO. **Dietary Management of long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency (LCHADD). A case report and survey.** *J Inher Metab Dis* 1999; 22:123-31.
3. Saudubray JM, Martin D, de Lonlay P, Touati G, Poggi-Travert F, Bonnet D, et al. **Recognition and management of fatty acid oxidation defects: a series of 107 patients.** *J Inher Metab Dis* 1999; 22:488-502.
4. Eskelin PMA, Laitinen KA, Tyni TA. **Elevated hydroxyacylcarnitines in a carrier of LCHAD deficiency during acute liver disease of pregnancy – A common feature of the pregnancy complication?** *Mol Genet Metab* 2010; 100(2):204-06.
5. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** *J Biol Chem* 1951; 193:265-75.
6. Osorio JH, Rodés M, Garavaglia B, Briones P, Ribes A. **Estudios bioquímicos en 46 pacientes con deficiencias de la β -oxidación mitocondrial.** En: Memorias IV congreso de errores congénitos del metabolismo. Puerto de la Cruz-Tenerife, Islas Canarias: Sociedad Española de Pediatría; 2001.
7. Martínez-Quintana E, Peña-Quintana L, Artiles-Vizcaíno JA, Rodríguez-González F. **Long-chain 3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency and cardiogenic shock.** *International. J Cardiol* 2009; 136:e1-e2.
8. Spiekerkoetter, U. **Mitochondrial fatty acid oxidation disorders: clinical presentation of long-chain fatty acid oxidation defects before and after newborn screening.** *J Inher Metab Dis* 2012; 33(5): 527-32.
9. Fletcher AL, Pennesi ME, Harding CO, Weleber RG, Gillingham MB. **Observations regarding retinopathy in mitochondrial trifunctional protein deficiencies.** *Mol Genet Metab* 2012; 106(1):18-24.
10. Gillingham MB, Scott B, Elliott D, Harding CO. **Metabolic control during exercise with and without medium-chain triglycerides (MCT) in children with long-chain 3-hydroxy acyl-CoA dehydrogenase (LCHAD) or trifunctional protein (TFP) deficiency.** *Mol Genet Metab* 2006; 89:58-63.
11. Vianey-Saban C, Liaud C, Divry P, Gregersen N, Mathieu M. **The inborn errors of mitochondrial fatty acid oxidation.** *J Inher Metab Dis* 1987; 10:159-198.
12. Shen JJ, Matern D, Millington DS, Hillman S, Feezor MD, Bennett 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.
13. Ventura FV, Costa CG, Struys EA, Ruiter J, Allers P, Ijlst L, et al. **Quantitative acylcarnitine profile in fibroblasts using U-¹³C palmitic acid: an improved tool for the diagnosis of fatty acid oxidation defects.** *Clin Chem Acta* 1999; 281:1-17.
14. Roe CR, Roe DS. **Recent developments in the investigation of inherited metabolic disorders using cultures human cells.** *Mol Genet Metab* 1999; 68:243-257.
15. Costa CG, Struys EA, Bootsma A, Brink HJ, Dorland L, Tavares de Almeida I, et al. **Quantitative analysis of plasma acylcarnitines using gas chromatography chemical ionization mass fragmentography.** *J Lipid Res* 1997; 38:173-182.
16. Pourfarzam M, Schaefer J, Turnbull DM, Bartlett K. **Analysis of Fatty Acid Oxidation Intermediates in Cultured Fibroblasts to Detect Mitochondrial Oxidation Disorders.** *Clin Chem* 1994; 40(12): 2267-2275.

