

PRODUCCIÓN DE METABOLITOS EN FIBROBLASTOS INCUBADOS CON ACIDO OLEICO DEUTERADO

JOSÉ HENRY OSORIO* PhD

Recibido para publicación: 14-03-2013 - Versión corregida: 18-04-2013 - Aprobado para publicación: 14-11-2013

Resumen

Objetivo: los estudios *in vitro*, que buscan intermediarios de la degradación mitocondrial de ácidos grasos, facilitan el diagnóstico de alteraciones hereditarias o adquiridas en esa ruta metabólica, el presente estudio analiza la producción de metabolitos en fibroblastos incubados con ácido oleico deuterado. **Materiales y métodos:** fibroblastos de personas sin antecedentes de alteraciones metabólicas, fueron incubados en presencia de ácido oleico deuterado, y sus metabolitos fueron analizados mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) **Resultados:** Se encontró un perfil característico luego de la incubación de este sustrato por fibroblastos. **Conclusiones:** Este sustrato podría ser usado para realizar estudios *in vitro* de algunas deficiencias de la β -oxidación mitocondrial de ácidos grasos, mediante la comparación de fibroblastos normales vs fibroblastos de pacientes que presenten deficiencias de esa vía metabólica.

Palabras clave: ácidos grasos, metabolismo, diagnóstico precoz.

Metabolite production of fibroblasts incubated with deuterated oleic acid

Summary

Objective: *In vitro* studies for searching intermediates of mitochondrial fatty acid degradation, are a tool for diagnosis of hereditary or acquired alterations of the above mentioned metabolic pathway. The present work analyzes the metabolite production in fibroblasts incubated with deuterated oleic acid. **Materials and methods:** fibroblasts of persons without antecedents of metabolic alterations, were incubated with deuterated oleic acid and its metabolites were analyzed using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **Results.** It was found a characteristic profile after incubation of fibroblasts with this substrate. **Conclusion:** this substrate could be used to perform *in vitro* studies of some

Referencia Vancouver:

Osorio JH. Producción de metabolitos en fibroblastos incubados con ácido oleico deuterado. Arch Med (Manizales) 2013; 13(2):202-7

Referencia Redalyc:

José Henry Osorio. Archivos de Medicina (Manizales). Volumen 13 N° 2. Julio-Diciembre 2013. ISSN versión impresa 1657-320X. ISSN versión en línea 2339-3874. Universidad de Manizales. Manizales (Colombia).

* Laboratorio de Investigación en Bioquímica Clínica y Patología Molecular, Departamento de Ciencias Básicas de la Salud, Universidad de Caldas, estudiante Programa de Medicina, Universidad de Manizales. Correo: jose.osorio_o@ucaldas.edu.co

mitochondrial fatty acid β -oxidación deficiencies, by comparison of normal fibroblasts vs fibroblasts of patients who present deficiencies of the above named metabolic pathway.

Key words: *fatty acids, metabolism, early diagnosis.*

Introducción

Los estudios bioquímicos de las alteraciones de la oxidación mitocondrial de los ácidos grasos, son fundamentales para su diagnóstico^{1,2,3}. Las acilcarnitinas producidas, luego de la oxidación mitocondrial de ácidos grasos, pueden salir de la mitocondria y acumularse en el medio de cultivo, mientras que los tioésteres Acil-CoA formados, quedan confinados en la mitocondria debido a su incapacidad para atravesar la membrana mitocondrial⁴. A partir de ese precepto, Nada⁵ et al diseñaron un método para el diagnóstico de las deficiencias de la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos, mediante la incubación de fibroblastos utilizando ácido [17,17,18,18-2H4]-9,12-octadecadienoico; (ácido linoléico deuterado), en presencia de L-carnitina; utilizando espectrometría de masas en tandem, para medir las acilcarnitinas deuteradas en el medio de cultivo. Mediante ese procedimiento, 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 implica, por lo que se han diseñado otras técnicas que determinan acilcarnitinas en medios de cultivo de fibroblastos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con monitoreo selectivo de un ion (GC-CI-MS y GC-MS)⁶. Por otro lado, algunos estudios muestran que mediante el uso de cromatografía de gases acoplada espectrometría de masas, pueden medirse los ácidos grasos, luego de hidrolizar las acilcarnitinas del medio de cultivo⁷, lo que facilita el diagnóstico temprano de algunas alteraciones del metabolismo intramitocon-

drial de los ácidos grasos⁸. En este trabajo se presentan los resultados de la incubación de fibroblastos con ácido oléico deuterado, detectando metabolitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Materiales y métodos

El presente estudio es de tipo experimental. El material biológico empleado fue 10 cultivos diferentes de fibroblastos normales. Como sustrato fue empleado el ácido oléico deuterado (Cambridge Isotope Laboratories). Fueron utilizados los siguientes compuestos deuterados para la preparación de la curva de calibración [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. (Ten Brinx-Free University Amsterdam). Como estándar interno fue adicionado ácido undecanodioico (Fluka), durante el proceso de extracción de las muestras. Los fibroblastos (4-20 pasajes) fueron cultivados en medio de cultivo similar al medio basal Eagle's con bicarbonato y HE-PES (4-(2-hidroxietil)-1-ácido piperazinaetano sulfúrico), (MEM: medio mínimo esencial), suplementado con suero de bovino recién nacido 10% (v/v) y gentamicina 1% (v/v) 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 (buffer fosfato salino), 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. 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 *et al*⁹, para la determinación de proteínas. Para la oxidación de ácido oléico deuterado en fibroblastos fue utilizada la técnica diseñada por Osorio *et al*¹⁰; se preparó una solución de medio de cultivo con una concentración final de 0.15 mM de ácido oléico deuterado, 1mM BSA, y L-carnitina 0.2 mM. 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 h 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 C8, C10, C12, y C14, en un rango de 0 a 150 nM, y C16 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 un análisis de 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 inyección: 1min 5 segundos; temperatura del inyector: 250 °C; temperatura del horno y programación de temperaturas:

T1 70 °C a 6 °C/min, T2 250 °C a 20 °C/min hasta T3 300 °C; volumen de inyección: 1mL; 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 Hewlett Packard serie 5972, (Palo Alto, CA, año 2000).

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. La figura 1, muestra el espectro de masas del ácido oleico deuterado.

La figura 2 muestra el espectro de masas del estándar interno (IS) ácido undecanodióico (B).

La figura 3 muestra el cromatograma GC-MS-SIM de ácidos grasos en fibroblastos incubados con ácido 2-oléico.

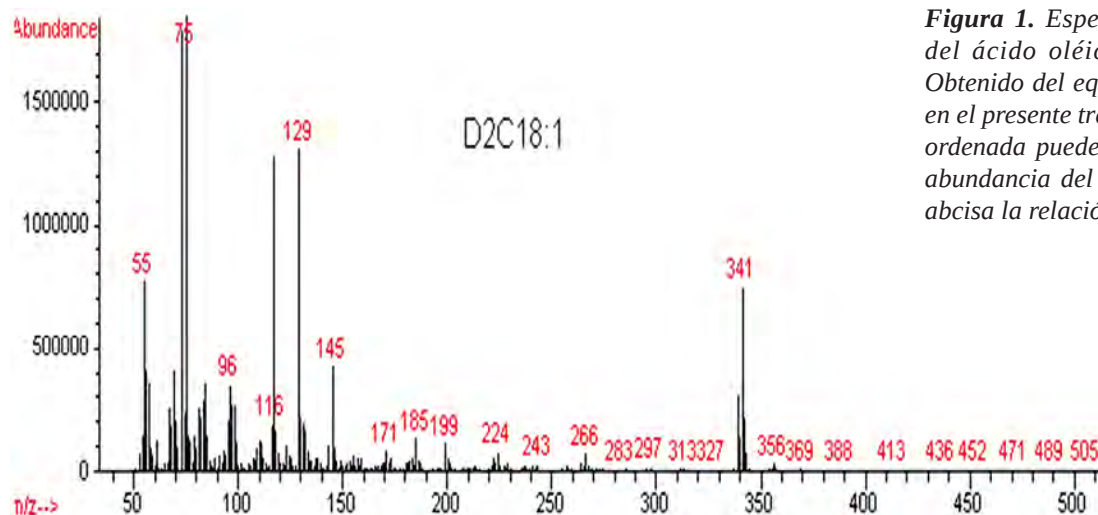


Figura 1. Espectro de masas del ácido oléico deuterado. Obtenido del equipo empleado en el presente trabajo. Sobre la ordenada puede observarse la abundancia del ión y sobre la abcisa la relación masa/carga.

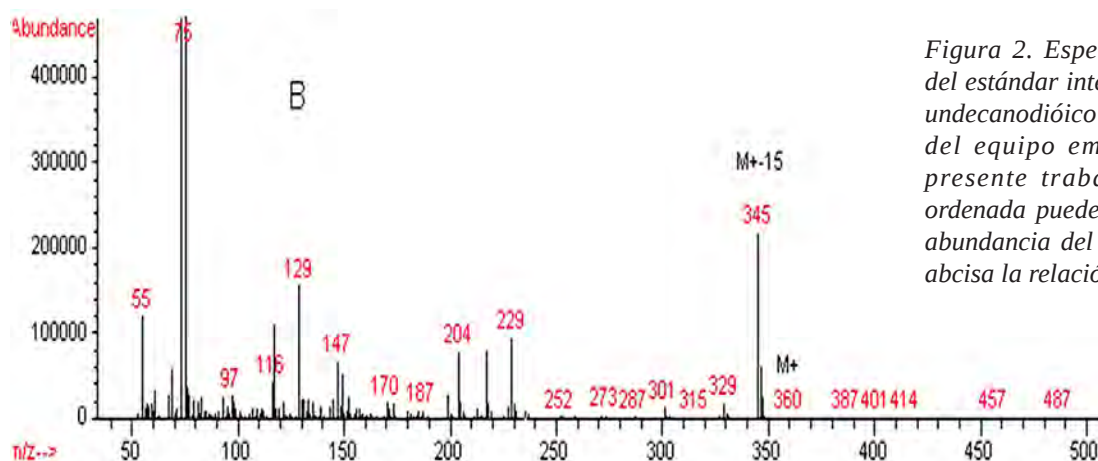


Figura 2. Espectro de masas del estándar interno (IS) ácido undecanodienoico (B). Obtenido del equipo empleado en el presente trabajo. Sobre la ordenada puede observarse la abundancia del ión y sobre la abcisa la relación masa/carga.

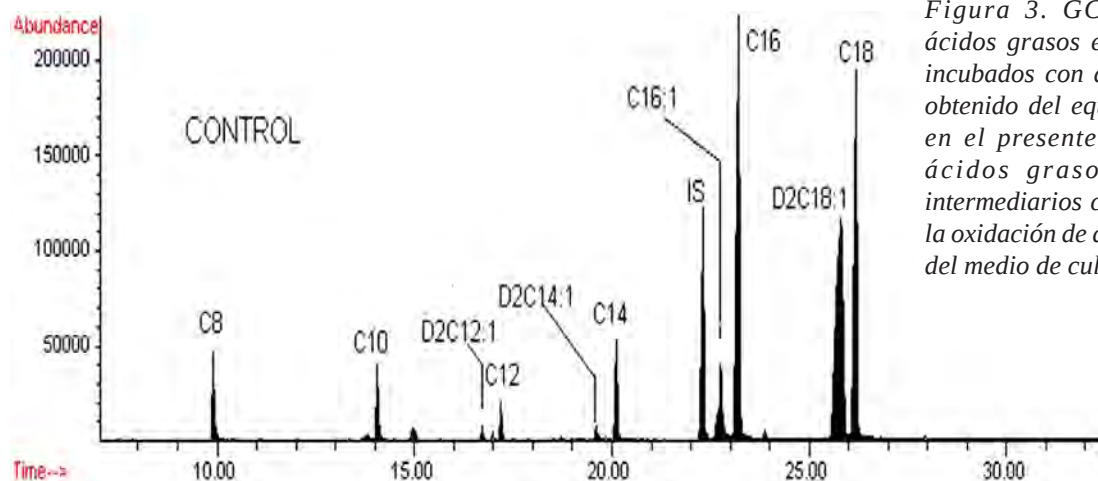


Figura 3. GC-MS-SIM de ácidos grasos en fibroblastos incubados con ácido 2-oléico, obtenido del equipo empleado en el presente trabajo. Los ácidos grasos saturados intermedios corresponden a la oxidación de ácido palmítico del medio de cultivo.

Fueron observados solamente los metabolitos de 12 (D2C12:1), 14(D2C14:1), y D2C16:1) 16 átomos de carbono, producto de la degradación del ácido oleico. Las concentraciones observadas para los diferentes ácidos grasos, permiten establecer un perfil para los ácidos grasos intermediarios mencionados en fibroblastos normales (tabla1).

Tabla 1. Producción de ácidos grasos deuterados en fibroblastos incubados con ácido oléico deuterado

ÁCIDOS GRASOS INTERMEDIARIOS (nmol/mg proteína/72 h)	PROMEDIO	INTERVALO
D2C12:1	3,6	2,8-4,2
D2C14:1	2,9	1,9-5,1
D2C16:1	3,2	2,5-3,8

Discusión

La detección de metabolitos intermediarios de la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos, ha sido ampliamente estudiada ^{11, 12, 13}. La espectrometría de masas en tándem sigue siendo el método más efectivo para detectar alteraciones en esta vía metabólica ¹⁴. Sin embargo, es una técnica que no está disponible para muchos laboratorios, por lo cual se deben buscar otras alternativas. El uso de fibroblastos para el análisis del funcionamiento de la β -oxidación mitocondrial

de los ácidos grasos, mediante la incubación con diferentes sustratos ha sido plenamente documentada ^{15, 16, 17}. La técnica de análisis de ácidos grasos mediante GC/MS ha probado ser efectiva para este tipo de análisis; en trabajos anteriores, trabajando con ácido palmítico deuterado, han sido encontrados elevados los niveles de diferentes ácidos grasos, después de hidrolizar las acilcarnitinas presentes en el medio de cultivo de los fibroblastos de los pacientes que presentaban deficiencias de la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos ¹⁰. En el presente estudio ha sido encontrado un perfil que muestra detección de varios ácidos grasos deuterados luego de realizar incubación de fibroblastos normales con ácido oleico deuterado. En conclusión, el método propuesto, muestra un espectro característico de metabolitos intermediarios, de la incubación de fibroblastos con ácido oleico deuterado; por lo que puede recomendarse la realización de este mismo procedimiento, pero comparando fibroblastos normales con fibroblastos de pacientes que presenten deficiencias de la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos, lo cual servirá como herramienta diagnóstica de estas alteraciones.

Conflictos de Interés: Ninguno declarado.

Fuentes de financiación: Universidad de Caldas.

Literatura citada

1. Osorio JH. **Patología molecular de los errores hereditarios de la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos: alcances en el diagnóstico y tratamiento.** *Biosalud* 2006; 5:71-83.
2. Houten SM, Wanders RJ. **A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid β -oxidation.** *J Inher Metab Dis* 2010; 33(5):469-77.
3. Osorio JH, Pourfarzam M. **Early diagnosis of neurometabolic diseases by tandem mass spectrometry. Acylcarnitine profile from cord blood.** *Rev Neurol*. 2004; 38(1):11-6.
4. 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.
5. 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.
6. Ventura FV, Costa CG, Struys EA, Ruiter 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 Chim Acta* 1999; 281: 1-17.
7. Osorio JH, Ribes A, Lluch M. **Diagnóstico in vitro de la deficiencia primaria de carnitina.** *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2008; 42(2):245-50.
8. Osorio JH. **Comparación de dos técnicas como herramienta diagnóstica de la deficiencia de carnitina acilcarnitina translocasa.** *Biosalud* 2012; 11(1):17-24.
6. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
10. Osorio JH, Lluc M, Ribes A. **Analysis of organic acids after incubation with (16-2H3) palmitic acid in fibroblasts from patients with mitochondrial β -oxidation defects.** *J Inher Metab Dis* 2003; 26:795-803.
11. Houten SM, Wanders RJ. **A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid β -oxidation.** *J Inher Metab Dis* 2010; 33(5):469-77.
12. Moczulski D, Majak I, Mamczur D. **An overview of beta-oxidation disorders.** *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2009; 63:266-77.
13. Kompore M, Rizzo WB. **Mitochondrial fatty-acid oxidation disorders.** *Semin Pediatr Neurol* 2008; 15(3):140-9.
14. Osorio JH, Pourfarzam M. **Early diagnosis of neurometabolic diseases by tandem mass spectrometry. Acylcarnitine profile from cord blood.** *Rev Neurol* 2004; 38(1):11-16.
15. Kølvrå S, Gregersen N, Christensen E, Hobolth N. **In vitro fibroblasts studies in a patient with C6-C10 dicarboxylic aciduria: evidence for a defect in general acyl-CoA dehydrogenase.** *Clin Chim Acta* 1982; 126:53-67.
16. 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.
17. 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.

