

Estudio de pacientes con aciduria glutárica tipo II, mediante la incubación de fibroblastos con ácidos palmítico y mirístico tritiados

José Henry Osorio Orozco*

RESUMEN

Introducción: la aciduria glutárica tipo II, o deficiencia múltiple de acil-CoA deshidrogenasas, es un trastorno causado por deficiencia de la flavoproteína de transferencia de electrones, de su oxidorreductasa o de ambas; se trata de una enfermedad metabólica autosómica recesiva, caracterizada por acidosis, hipoglicemia, aciduria orgánica, olor a pies sudados y malformaciones en cerebro y riñones.

Objetivo: analizar las tasas de oxidación de sustratos tritiados por fibroblastos de pacientes con aciduria glutárica tipo II.

Materiales y métodos: se incubaron fibroblastos de dos pacientes con aciduria glutárica tipo II y de 20 controles en presencia de ácidos palmítico y mirístico tritiados.

Resultados: se encontró muy deprimida (16%-18%) la oxidación de los sustratos tritiados por los fibroblastos procedentes de pacientes con aciduria glutárica tipo II en comparación con los controles.

Conclusión: la prueba estudiada permite la confirmación *in vitro* del diagnóstico de aciduria glutárica tipo II.

PALABRAS CLAVE

Ácidos Grasos; Aciduria glutárica tipo II; β - oxidación mitocondrial; Deficiencia múltiple de deshidrogenasas; Trastornos del metabolismo

* Profesor Titular, Coordinador de la Maestría en Ciencias Biomédicas y del Laboratorio de Investigación en Bioquímica Clínica y Patología Molecular de la Universidad de Caldas, Manizales, Colombia.
Correspondencia: jose.osorio_o@ucaldas.edu.co

Recibido: mayo 20 de 2010

Aceptado: abril 5 de 2011

SUMMARY

Study of patients with type II glutaric aciduria by incubation of fibroblasts with tritiated palmitic and myristic acids

Introduction: Glutaric aciduria type II (GA II), or multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency, is a disorder caused by deficiency of either electron transport flavoprotein or electron transport flavoprotein oxyreductase. It is an autosomal recessive metabolic disease, characterized by acidosis, hypoglycemia, organic aciduria, sweat-sock odour, and malformations in brain and kidneys.

Objective: To analyse the oxidation rate of tritiated substrates by fibroblasts of patients with GA II.

Materials and methods: Fibroblasts of two patients with GA II were incubated with tritiated palmitic and myristic acids.

Results: Oxidation of tritiated substrates by fibroblasts of patients with GA II was very depressed (16%-18%) in comparison with controls.

Conclusion: Diagnosis of GA II may be confirmed *in vitro* by the studied test.

KEY WORDS

Fatty Acids; Glutaric aciduria type II; Metabolic disorders; Mitochondrial β -oxidation; Multiple dehydrogenase deficiency

INTRODUCCIÓN

Los trastornos múltiples de la deshidrogenación del acetil CoA, o aciduria glutárica tipo II, son un grupo de enfermedades metabólicas que afectan al catabolismo de aminoácidos, ácidos grasos y la colina. Se deben a un transporte defectuoso de los electrones desde los acetil CoA hasta la ubiquinona. En la mayoría de los casos estas alteraciones se deben a la deficiencia de una de las tres proteínas necesarias a saber: subunidades alfa o beta de la flavoproteína de transferencia de electrones (ETF; OMIM #231680 y 130410, respectivamente; ETF: por la sigla en inglés de *electron transfer flavoprotein*. OMIN: por la sigla en inglés de *Online Mendelian Inheritance in Man*) o de

la ubiquinona-oxidorreductasa de la flavoproteína de transferencia de electrones (ETF-QO: por la sigla en inglés de *electron transfer flavoprotein-Q coenzyme*; OMIM #231675), aunque en algunos pacientes obedecen a alteraciones no identificadas todavía del metabolismo de la riboflavina (1-3).

La aciduria glutárica tipo II se clasifica en dos formas: grave y leve; sus síntomas clínicos incluyen hipoglicemia con hipocetonemia, acidosis metabólica, hiperamonemia y algunas veces hiperlactacidemia; en algunos pacientes hay anomalías congénitas similares a las informadas en el síndrome de Zellweger (4). En el presente estudio se analizó la oxidación de sustratos trititados en fibroblastos de pacientes con deficiencia MAD (por la sigla en inglés de *multiple acyl-CoA dehydrogenases*) como herramienta diagnóstica para estas alteraciones metabólicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material biológico empleado en el presente estudio fueron fibroblastos de dos pacientes con aciduria glutárica tipo II. Esta deficiencia se confirmó por estudios enzimáticos, moleculares o ambos. Como controles se utilizaron 20 cultivos diferentes de fibroblastos normales.

Cultivo de fibroblastos: se cultivaron fibroblastos de pacientes y controles (cuatro a 20 pasajes) en el medio MEM (por la sigla en inglés de *Minimum Essential Medium*), medio de cultivo similar al medio basal Eagle con bicarbonato y hepes [4-2-hidroxi-etil-1-ácido piperazinaetano sulfúrico], suplementado con 10% (v/v) de suero de ternero recién nacido y 1% (v/v) de antibiótico (gentamicina) a 37 °C, en estufa con 5% de CO₂ y 95% de aire. Después de alcanzar el punto de confluencia (80%-100%) las células se lavaron dos veces con buffer fosfato salino 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. Las células se transfirieron y centrifugaron 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 trititados. Se utilizó el método de Lowry y colaboradores (5) para la determinación de la proteína. El método utilizado fue el de Manning (6) con modificaciones (7).

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 se consideró de bajo riesgo, y se contó con el consentimiento informado de los participantes.

RESULTADOS

La oxidación de palmitato y miristato trititados en nmol/hora/mg de proteína y el porcentaje de

oxidación de los sustratos trititados por parte de los fibroblastos de los pacientes comparados con los controles paralelos, se encontraron muy deprimidos (tabla n.º 1). Los porcentajes de oxidación son similares para el palmitato y el miristato trititados (16%-18% comparados con los controles). En el presente trabajo se determinó que después de cinco horas de incubación en presencia de sustratos trititados, los fibroblastos no modifican la cantidad de $^3\text{H}_2\text{O}$ producida.

Tabla n.º 1. Oxidación de [9,10 ^3H]-ácidos grasos en pacientes con aciduria glutárica tipo II

Deficiencia	n	Oxidación [9,10 ^3H]-palmitato nmol/hora/mg proteína	Oxidación [9,10 ^3H]-miristato nmol/hora/mg proteína	Oxidación [9,10 ^3H]-palmitato %	Oxidación [9,10 ^3H]-miristato %
Controles	20	4,7	4,4	100	100
MAD	2	1,6	1,6	18	16

DISCUSIÓN

El diagnóstico de la aciduria glutárica tipo II se basa en las manifestaciones clínicas y se apoya en los hallazgos de laboratorio. Las investigaciones bioquímicas demuestran elevación del nivel sérico de creatina-quinasa y de los ácidos 2-hidroxi-glutárico, pirúvico, etilmalónico, hipúrico, adípico y sebáico en la orina. Las biopsias hepáticas pueden mostrar cambios progresivos en los tejidos y las biopsias de músculo, una miopatía vacuolar con acumulación lipídica (8). Los estudios *in vitro* de estos pacientes incluyen, entre otros, la utilización de fibroblastos y linfocitos (9). En los fibroblastos se encuentran preservadas las relaciones entre la oxidación de ácidos grasos, los sistemas de transferencia de electrones y otras vías que interactúan en el metabolismo intermediario. La integración de estos sistemas es esencial para el estudio de la organización y control de las enzimas involucradas en la β -oxidación mitocondrial, lo que hace este tipo de células ideal

para el presente estudio. A partir del desarrollo de los ensayos para medir las tasas de oxidación de ácidos grasos en células mediante la incubación con sustratos radiactivos, se avanzó notablemente en el diagnóstico de las deficiencias de la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos. Moon y Rhead desarrollaron en 1987 (10) un método de valoración de $^3\text{H}_2\text{O}$ en fibroblastos con ácidos grasos trititados. La liberación de tritio unido a los carbonos 9 y 10 del palmitato depende de tres mecanismos: 1) la acción de una acyl-CoA deshidrogenasa formando un 2,3-enoyl-CoA éster y transfiriendo el 50% del tritio a la proteína de transferencia de electrones (flavina adenina dinucleótido reducida, FADH); 2) la reacción de la 3-hidroxiacyl-CoA deshidrogenasa que remueve la mitad del tritio remanente, el cual finaliza en la nicotinamida adenina dinucleótido (NADH); 3) el ciclo del ácido tricarbóxico que libera el 25% restante. La incorporación final del tritio al agua es, por lo tanto, dependiente de la reoxidación de esos cofactores en la cadena de transporte de electrones. Los complejos 2,

3 y 4 de la cadena respiratoria se requieren para cuidar del tritio que viene de la proteína de transferencia de electrones y los complejos 1, 3 y 4 son necesarios para la reoxidación de la NADH, por lo que la prueba se puede utilizar también en ciertos defectos de la cadena respiratoria (11). Manning y colaboradores (6) propusieron que [9,10(n)-³H]-miristato posee ventajas claras sobre [9,10-³H]-palmitato para la detección de trastornos tales como la deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena media (MCAD, por la sigla en inglés de *medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase*) en la que la β -oxidación se encuentra detenida en los sustratos con ocho átomos de carbono. Otros estudios utilizando esta técnica han hallado niveles de oxidación de ácidos grasos en varias deficiencias de esta vía (12,13). En este estudio se encontró para esta deficiencia una tasa de oxidación que oscila entre el 16% y el 18% comparada con los controles normales; al igual que otros autores (12), encontramos que existe una gran variabilidad en las tasas de β -oxidación medidas con los ensayos con miristato y palmitato tritiados; 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 de dos o tres controles, ya que los rangos de oxidación en nmoles/mg de proteína/hora son muy amplios. El coeficiente de variación obtenido al trabajar con esta prueba fue similar al obtenido por otros autores (14); al igual que ellos, se encontró que a pesar de la buena estabilidad a corto plazo de la mezcla radiactiva, existen problemas de reproducibilidad originados en la unión de los sustratos a la albúmina sérica bovina. Los resultados obtenidos con mezcla radiactiva fresca utilizada inmediatamente después de su preparación muestran casi el doble de actividad que la observada con mezclas de preparación previa (5).

CONCLUSIONES

En el presente estudio se analizó la oxidación de sustratos tritiados en fibroblastos de pacientes con la deficiencia aciduria glutárica tipo II, buscando una herramienta diagnóstica para este tipo de alteración metabólica. Se encontró una tasa muy baja de oxidación de dichos sustratos, entre 16% y 18%. Es posible entonces utilizar la valoración de agua tritiada,

producida en el metabolismo de los ácidos grasos por los fibroblastos de los pacientes afectados, como un buen método para confirmar la deficiencia múltiple de deshidrogenasas o aciduria glutárica tipo II. Sin embargo, los métodos de elección para este propósito siguen siendo el estudio de ácidos orgánicos en orina y el análisis de acilcarnitinas en sangre mediante espectrometría de masas en tándem (15).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rhead W, Roettger V, Marshall T, Amendt B. Multiple acyl-coenzyme A dehydrogenation disorder responsive to riboflavin: substrate oxidation, flavin metabolism, and flavoenzyme activities in fibroblasts. *Pediatr Res*. 1993 Mar;33(2):129-35.
2. Vergani L, Barile M, Angelini C, Burlina AB, Nijtmans L, Freda MP, et al. Riboflavin therapy. Biochemical heterogeneity in two adult lipid storage myopathies. *Brain*. 1999 Dec;122 (Pt 12401-11).
3. Gregersen N. Riboflavin-responsive defects of beta-oxidation. *J Inher Metab Dis*. 1985 Jan;8 Suppl 165-9.
4. Frerman F, Goodman S. Defects of electron transfer flavoprotein and electron transfer flavoprotein ubiquinone oxidoreductase: glutaric acidemia type II. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill; 2000. p. 2357-2365.
5. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951 Nov;193(1):265-75.
6. Manning NJ, Olpin SE, Pollitt RJ, Webley J. A comparison of [9,10-³H] palmitic and [9,10-³H] myristic acids for the detection of defects of fatty acid oxidation in intact cultured fibroblasts. *J Inher Metab Dis*. 1990 Jan;13(1):58-68.
7. Osorio JH. Implementación de un método mediante el uso de sustratos tritiados como herramienta diagnóstica de la deficiencia de OCTN2. *Colomb Med*. 2004;39(4): 323-327
8. Liang W-C, Tsai K-B, Lai C-L, Chen L-H, Jong Y-J. Riboflavin-responsive glutaric aciduria type II with recurrent pancreatitis. *Pediatr Neurol*. 2004 Sep;31(3):218-21.
9. Gordon N. Glutaric aciduria types I and II. *Brain Dev*. 2006 Apr;28(3):136-40.

10. Moon A, Rhead WJ. Complementation analysis of fatty acid oxidation disorders. *J Clin Invest.* 1987 Jan;79(1):59-64.
11. Venizelos N, Döbeln U von, Hagenfeldt L. Fatty acid oxidation in fibroblasts from patients with defects in beta-oxidation and in the respiratory chain. *J Inherit Metab Dis.* 1998 Jun;21(4):409-15.
12. Nada MA, Rhead WJ, Sprecher H, Schulz H, Roe CR. Evidence for intermediate channeling in mitochondrial beta-oxidation. *J Biol Chem.* 1995 Jan13;270(2):530-5.
13. Ventura FV, Costa CG, Struys EA, Ruiten J, Allers P, Ijlst L, et al. Quantitative acylcarnitine profiling in fibroblasts using [U-13C] palmitic acid: an improved tool for the diagnosis of fatty acid oxidation defects. *Clin Chim Acta.* 1999 Mar;281(1-2):1-17.
14. Olpin SE, Manning NJ, Carpenter K, Middleton B, Pollitt RJ. Differential diagnosis of hydroxydicarboxylic aciduria based on release of $^3\text{H}_2\text{O}$ from [9,10- ^3H] myristic and [9,10- ^3H] palmitic acids by intact cultured fibroblasts. *J Inherit Metab Dis.* 1992 Jan;15(6):883-90.
15. Osorio JH, Pourfarzam M. [Determination of normal acylcarnitine levels in a healthy pediatric population as a diagnostic tool in inherited errors of mitochondrial fatty acid beta-oxidation]. *An Pediatr (Barc).* 2007 Dec;67(6):548-52.

