

Implementación diagnóstica de la deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga

Diagnostic implementation of very long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency

Implementação diagnóstica da deficiência de acil-CoA desidrogenase de cadeia muito longa

► José Henry Osorio^{1a,c}, Antonia Ribes^{1b}, Montse Lluch^{2b}

¹ PhD

² MD

^a Departamento de Ciencias Básicas de la Salud, Laboratorio de Investigación en Bioquímica clínica y Patología Molecular. Universidad de Caldas. Manizales. Colombia.

^b Servicio de Bioquímica y Genética Molecular, Instituto de Bioquímica-CIBERER, Hospital Clínic. Barcelona. España.

^c Programa de Medicina. Universidad de Manizales. Manizales. Colombia,

Resumen

La enzima acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga (VLCAD) es un homodímero que cataliza la reacción inicial de la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos. El presente estudio tuvo como objetivo el análisis de los metabolitos producidos por fibroblastos incubados en presencia de sustratos tritiados vs. deuterados, como herramienta diagnóstica de la deficiencia de VLCAD. Fue encontrada severamente deprimida la oxidación de los sustratos tritiados en los fibroblastos de pacientes con esta enfermedad, asimismo la incubación con sustratos deuterados aportó un perfil característico en esta deficiencia. El método de valoración de agua tritiada, aunque inespecífico, debido a que la oxidación de sustratos tritiados también puede estar deprimida en otras deficiencias, es un buen método para sugerir una deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga, si el análisis se compara con otros hallazgos propios de la deficiencia enzimática. Sin embargo, la determinación de los metabolitos deuterados es más específica, por encontrarse un perfil característico que muestra niveles elevados de los ácidos grasos octanoico, decanoico, dodecanoico, tetradecanoico, tetradecanoico y hexadecanoico, lo que la hace diferente de otras deficiencias enzimáticas.

Palabras clave: acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga * β -oxidación mitocondrial * ácidos grasos

Summary

Very long-chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD) is a homodimer that catalyzes the initial reaction of fatty acid β -oxidation. The objective of the present study was to analyse the metabolites produced by fibroblasts incubated with tritiated vs. deuterated substrates, as a diagnostic tool for the diagnosis of VLCAD deficiency. A severe depression for oxidizing the tritiated substrates was observed for these patients' fibroblasts, and a characteristic profile for this deficiency was found when incubating fibroblasts with deuterated substrates.

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

The method which evaluates the production of tritiated water is nonspecific as the oxidation of tritiated substrates can be found depressed in other fatty acid β -oxidation disorders; however this method can suggest VLCAD deficiency if the tritiated water measurement is compared with others findings related to this deficiency. On the other hand the measurement of deuterated metabolites is more specific as a characteristic profile was found for this deficiency showing increased levels of the following organic acids: octanoic, decanoic, dodecenoic, dodecanoic, tetradecenoic, tetradecanoic and hexadecanoic, which is different from other fatty acid β -oxidation disorders.

Key words: *very long-chain acyl-CoA dehydrogenase * β -oxidation * fatty acids*

Resumo

A enzima acil-CoA desidrogenase de cadeia muito longa (VLCAD) é um homodímero que catalisa a reação inicial da β -oxidação mitocondrial dos ácidos graxos. O presente estudo teve como objetivo a análise dos metabólitos produzidos por fibroblastos incubados em presença de substratos tritiados vs. deuterados, como ferramenta de diagnóstico da deficiência de VLCAD. Foi encontrada severamente deprimida a oxidação dos substratos tritiados nos fibroblastos de pacientes com esta doença, do mesmo modo a incubação com substratos deuterados deu um perfil característico nesta deficiência. O método de avaliação de água tritiada, embora não específico, devido a que a oxidação de substratos tritiados também pode estar deprimida em outras deficiências, é um bom método para sugerir uma deficiência de acil-CoA desidrogenase de cadeia muito longa, se a análise é comparada com outros achados próprios da deficiência enzimática. Entretanto, a determinação dos metabólitos deuterados é mais específica, devido a que se encontra um perfil característico que mostra níveis elevados dos ácidos graxos octanoico, decanoico, dodecenoico, dodecanoico, tetradecenoico, tetradecanoico e hexadecenoico, o que a torna diferente de outras deficiências enzimáticas.

Palavras chave: *acil-CoA desidrogenase de cadeia muito longa * β -oxidação mitocondrial * ácidos graxos*

Introducción

La enzima acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga (VLCAD) es un homodímero de 154-Kda (1) y su cADN consta de una región de 2.177 bp codificando un péptido líder de 40 aminoácidos y un polipéptido maduro de 615 aminoácidos, para un total de 655 aminoácidos en la proteína entera (2). Esta enzima es específica para acil-CoAs de 14-24 átomos de carbono y cataliza más del 90% de la deshidrogenación del palmitoil-CoA (C₁₆) (3) (4). El gen se encuentra localizado en el cromosoma 17p13 (5) y esta enzima es considerada un paso limitante en la oxidación de ácidos grasos de cadena larga (6).

Con base en la clínica presentada en esta deficiencia se han informado 3 fenotipos: una forma infantil severa (4), una forma de presentación más benigna que se presentan también en la niñez (7) y una forma muscular, la cual se manifiesta después de la niñez (8). Más recientemente estas variantes han sido descritas respectivamente como VLCAD-C por presentar cardiomiopatía dilatada, VLCAD-H caracterizada por episodios de hipoglicemia, y VLCAD-M en la cual se presentan episodios de miopatía con rabdomiólisis (9).

El diagnóstico de esta deficiencia, además de la clínica, involucra otros hallazgos, como el análisis por inmunohistoquímica para la enzima VLCAD en biopsias de músculo de estos pacientes, que muestra bajas canti-

dades de la enzima, así como una baja actividad enzimática de la misma. Por otro lado, los análisis bioquímicos en estos pacientes informan niveles elevados de C14n-9 en el análisis de ácidos grasos libres en plasma, por cromatografía de gases; niveles elevados de ácidos dicarboxílicos desde C6 hasta C14 en el análisis de ácidos orgánicos en orina, por espectrometría de gases acoplada a espectrometría de masas; y niveles altos de las acilcarnitinas C14:1, C14, C16 en el análisis de sangre por espectrometría de masas en *tandem* (10). El presente estudio analizó la producción de agua tritiada en fibroblastos, comparándola con la producción de intermediarios por incubación con sustratos deuterados como herramienta diagnóstica en pacientes con deficiencia de VLCAD.

Materiales y Métodos

El presente estudio es de tipo experimental. El material biológico empleado consistió en fibroblastos de 6 pacientes con deficiencia de VLCAD-C (forma infantil severa). Esta deficiencia fue confirmada por estudios enzimáticos, moleculares o ambos. Como controles normales se utilizaron 20 cultivos diferentes de fibroblastos de personas sanas. El trabajo cumplió con los requisitos y aprobaciones de los respectivos comités de ética.

CULTIVO DE CÉLULAS

Se cultivaron fibroblastos de pacientes y controles (4-20 pasajes) en medio de cultivo similar al medio basal Eagle's con bicarbonato y HEPES (4-(2-hidroxi-etil)-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 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 fueron transferidas y centrifugadas a 337 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 *et al.*, (11) para la determinación de la concentración de proteína.

PREPARACIÓN DE MEZCLAS RADIOACTIVAS

El método utilizado fue el de Manning (12). Para obtener las mezclas radioactivas se prepararon las siguientes soluciones: Solución A: Ácido palmítico 12,5 mg/mL de etanol 95% o ácido mirístico 12,5 mg/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, 1 mCi/mL) (Amersham). Se mezclaron en un tubo plástico de 3 mL, 25 µL de A + 3,8 µL de C (3,8 µCi), y el solvente se evaporó bajo gas nitrógeno. Se agregaron 2,5 mL de B y se analizó la mezcla en el contador de centelleo (Centelleo LS3801 Beckman Coulter Inc., Brea, CA, EE.UU.), 50 µL de la solución + 10 mL de líquido de centelleo (Ready Safe). Luego la mezcla se llevó al baño de ultrasonido durante 15 min y se incubó en baño a 37 °C durante 40 min; luego se colocó nuevamente en el baño de ultrasonido durante 30 min y se centrifugó durante 20 min a 5000 rpm. Se traspasó el máximo de volumen sobrenadante a otro tubo plástico de 3 mL, y se analizaron 50 µL de la solución, como se describió anteriormente.

PREPARACIÓN DE COLUMNAS DE INTERCAMBIO IÓNICO

Para preparar las columnas de intercambio iónico pueden ser usadas las resinas Dowex 1 X 8-200 o Dowex 1 X 2-400. Se agregó agua destilada a la resina hasta que se hidrató. Se sellaron al mechero pipetas Pasteur, aproximadamente a 3 cm de la punta, y se aisló el cuerpo de la pipeta respecto de la punta mediante la introducción de algodón comprimido, tratando que el volumen de algodón ocupara aproximadamente 1 cm. Se tomó igual volumen de agua que de resina, se llevó a agitación

suave y mientras se agitaba, se tomaron 2,5 mL y se depositaron cuidadosamente en la pipeta, habiendo previamente humedecido totalmente el algodón con agua milli Q para evitar la retención de burbujas de aire que pudieran posteriormente hacer caminos en la resina. Las pipetas se conservaron en posición vertical. Después de depositar la resina, se verificó que no quedarán burbujas de aire y que la pipeta no perdiera agua, para que la resina permaneciera hidratada; luego las columnas se conservaron en refrigeración hasta su uso.

EVALUACIÓN DE OXIDACIÓN EMPLEANDO SUSTRATOS TRITIADOS

Para evaluar la oxidación de sustratos tritiados por los fibroblastos se tomó el *pellet* de células previamente resuspendido en 500 µL de PBS 1. Se utilizaron bandejas de incubación con capacidad para 24 pozos. El blanco se preparó con 40 µL (0,05 µCi) de mezcla radioactiva y 160 µL de PBS 2 mientras que las muestras con 60 µL de células resuspendidas, 40 µL (0,05 µCi) de mezcla radioactiva, y 100 µL de PBS 2. La bandeja se envolvió en papel de aluminio y se incubó a 37 °C durante 4 horas en cámara de CO₂ 5%, aire 95%. La reacción se detuvo, colocando la bandeja en hielo y agregando a cada pozo 200 µL de ácido tricloroacético 10%. El contenido de los pozos se traspasó a tubos para microcentrífuga y se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min. Trescientos sesenta µL de la mezcla fueron transferidos de nuevo a un tubo de microcentrífuga nuevo que contenía 50 µL de NaOH 1 M. Esta mezcla se mantuvo 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 partió cuidadosamente, se colocó un vial bajo la misma, y se dejó escurrir su contenido, aplicando luego cuidadosamente los 410 µL de la mezcla de reacción a la columna, dejando escurrir nuevamente. Cuando terminó el goteo, se lavó la columna tres veces con 500 µL agua milli Q, recogiendo todo el producto del lavado. Se desechó la columna y se agregó a cada vial 10 mL de líquido de centelleo, agitando fuertemente para su posterior análisis.

EVALUACIÓN DE OXIDACIÓN EMPLEANDO SUSTRATOS DEUTERADOS Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS

En el segundo grupo de experimentos fue empleado como sustrato el ácido ³H₃-metil-palmítico (*Cambridge Isotope Laboratories*). Fueron utilizados los siguientes compuestos deuterados para la preparación de la curva de calibración (*Ten Brinx-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.

PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

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. Las curvas de calibración se obtuvieron mediante análisis de regresión lineal, representando la relación de concentraciones de cada ácido respecto al estándar interno frente a la relación de áreas. Como estándar interno fue adicionado ácido undecanodioico (Fluka), durante el proceso de extracción de las muestras.

TÉCNICA PARA LA OXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DEUTERADOS

Los cultivos de fibroblastos de pacientes y controles, así como la determinación de proteína, fueron realizados como se enunció anteriormente para la incubación con sustratos tritiados. Para la oxidación de ³H₃-palmitato en fibroblastos fue utilizada la técnica diseñada por Osorio *et al.* (13); se preparó una solución de medio de cultivo con una concentración final de 0,15 mM de ácido 16-³H₃ palmítico, de albúmina de suero bovino (BSA) 1mM, 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 *falcon* 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.

ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS

El análisis de los ácidos grasos de los medios enriquecidos (curvas de calibración y productos de incubación) fue realizado después de la hidrólisis con KOH. 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*: 1 min 5 s; 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: 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 cro-

matógrafo de gases 5890 Series II Plus – Espectrómetro de masas 5972 Series (Hewlett Packard).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La prueba *t* de *student* fue utilizada para comparar los valores obtenidos de la incubación de fibroblastos controles y de pacientes con deficiencia de VLCAD.

Resultados

OXIDACIÓN DE SUSTRATOS TRITIADOS

La Tabla I 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 cuyos valores corresponden al rango de resultados obtenidos; estos valores no son valores de referencia, dado que para esta técnica, debe obtenerse un rango de valores en cada experimento.

Fue encontrada diferencia significativa (P<0,05) al comparar la degradación de palmitato y miristato tritiados 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.

OXIDACIÓN DE SUSTRATOS DEUTERADOS

Para el segundo grupo de experimentos, en todas las curvas de calibración se obtuvo un coeficiente de correlación superior al 0,99. Se observó un perfil característico en los cromatogramas en la deficiencia de VLCAD y en los controles (Fig. 1). Las concentraciones observadas para los diferentes ácidos grasos permiten diferenciar los fibroblastos de pacientes con deficiencia de VLCAD de los fibroblastos controles (Tabla II), los cuales fueron encontrados significativamente diferentes.

COMPARACIÓN ENTRE LOS DOS MÉTODOS

De acuerdo con los resultados obtenidos, se observa que los dos métodos pueden servir para corroborar una deficiencia de VLCAD, dado que ambos muestran buena sensibilidad y especificidad sobre los grupos de individuos estudiados. Sin embargo, en la metodología que emplea tritiados, a pesar de encontrarse deprimida la oxidación de ácidos grasos, no es posible en este caso diferenciar el porcentaje de oxidación de los fibroblastos de pacientes con deficiencia de VLCAD de otras deficiencias de la β-oxidación mitocondrial de los ácidos grasos, en las cuales también se puede encontrar de-

Tabla 1. Oxidación de [9,10³H]-ácidos grasos en pacientes con deficiencia de acil coenzima A de cadena muy larga (VLCAD)

Individuos	n	Oxidación [9,10 ³ H]-palmitato nmol/hora/mg proteína	Oxidación [9,10 ³ H]-miristato nmol/hora/mg proteína	Oxidación [9,10 ³ H]-palmitato %	Oxidación [9,10 ³ H]-miristato %
Controles	20	4,7 ± 0,5	4,4 ± 0,4	100	100
VLCAD	6	2,3	1,2	47,6	27,7

primida; en la oxidación de sustratos deuterados es posible establecer cuáles son los ácidos grasos que se encuentran acumulados en mayores cantidades, lo que le otorga un perfil diagnóstico característico a esa deficiencia, cuando se compara con el perfil de otras deficiencias de la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos.

Discusión y Conclusiones

Moon y Rhead (14), desarrollaron un método de valoración de $^3\text{H}_2\text{O}$ en fibroblastos incubados en presencia de ácidos grasos tritiados. Posteriormente, Manning *et al.* (12) postularon que [9,10(n)- ^3H]-miristato posea claras ventajas sobre [9,10- ^3H]-palmitato para la de-

tección de trastornos tales como la deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena media y las formas leves de la deficiencia múltiple de deshidrogenasas donde la β -oxidación se encuentra detenida a nivel de los sustratos con 8 átomos de carbono. Por otro lado, estos mismos autores demostraron que el miristato era menos sensible que el palmitato para la detección de deficiencias específicas relacionadas con ácidos grasos de cadena larga. Para otros autores (15), utilizando [9,10- ^3H]-palmitato, los porcentajes para la deficiencia de VLCAD oscilaron entre 10-37%. En el presente estudio se encontró en los fibroblastos de pacientes con deficiencia de VLCAD, la oxidación de miristato más deprimida al ser comparada con la oxidación de palmitato, lo que no concuerda con lo enunciado anteriormente (14) y en promedio se obtuvo una oxidación de palmitato para esta deficiencia en

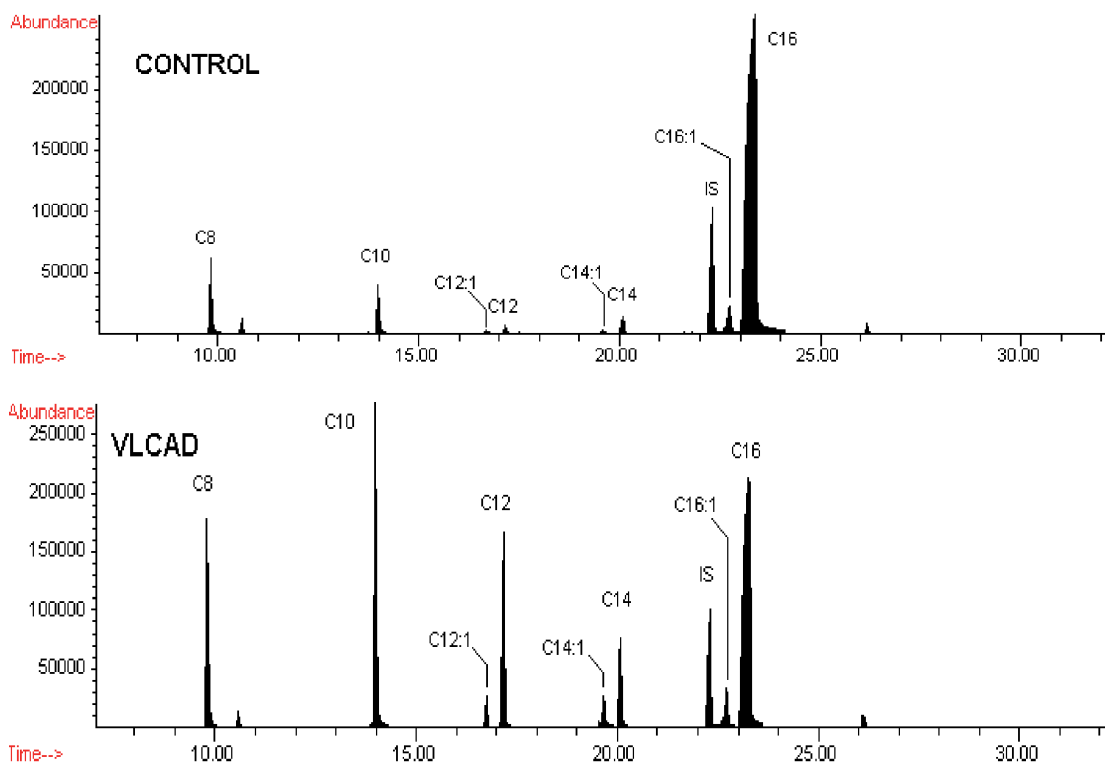


Figura 1. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con monitoreo iónico selectivo (GC-MS-SIM) de la incubación del ácido $^2\text{H}_3$ -palmitico en fibroblastos control y de pacientes con deficiencia de VLCAD. Están indicados los ácidos grasos deuterados según el número de átomos de carbono: C8, octanoico; C10, decanoico; C12:1, dodecenoico; C12, dodecanoico; C14:1, tetradecenoico; C14, tetradecanoico; C16, hexadecanoico. IS identifica el estándar interno.

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

Individuos	Ácidos grasos intermediarios (nmol/mg proteína/72 h)								Total
	C8	C10	C12:1	C12	C14:1	C14	C16:1	C16:OH	
Controles n=20	16,7	10,4	0,8	5,2	4,1	9,2	16,9	nd	63,3
Rango	(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)	nd	(31,6-121,1)
VLCAD n=6	67,6	94,6	8,1	81,1	16,2	54,1	27	nd	348,6

Abreviaturas: nd, no detectado

general del 50% lo que no concuerda con Manning *et al.* (16), además, se encontró para el miristato una degradación cercana sólo al 30%, mientras que otros autores la encontraron cercana al límite inferior de los controles (16). Las diferencias observadas entre este estudio comparado con los otros, puede ser la variabilidad en los fibroblastos utilizados, ya que para esta deficiencia (VLCAD) existen varias formas de presentación.

Los acil-CoA tioésteres formados durante el proceso de β -oxidación mitocondrial, están confinados en la mitocondria, debido a su incapacidad para atravesar la membrana mitocondrial, mientras que las acilcarnitinas pueden salir de la mitocondria y acumularse en el medio de incubación. Con base en lo expuesto, Nada *et al.* (17) idearon un método para el diagnóstico de las deficiencias de la β -oxidación que consiste en la incubación de fibroblastos utilizando ácido [17,17,18,18- $^2\text{H}_4$]-9,12-octadecadienoico; o sea, ácido linoleico deuterado, en presencia de L-carnitina. Al final de la incubación se valoraron, con la ayuda de un espectrómetro de masas en *tandem*, los niveles de acilcarnitinas deuteradas en el medio de cultivo. Los resultados obtenidos fueron buenos, ya que se consiguió establecer el diagnóstico de varias deficiencias de la β oxidación mitocondrial, pero a pesar de ser una técnica altamente sensible y precisa, tiene el inconveniente de la accesibilidad para algunos países, dado los costos que representa, por lo que se han diseñado otras técnicas determinando acilcarnitinas en medios de cultivo de fibroblastos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con ionización química (GC-CI-MS) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) (12) (20).

La técnica de análisis de ácidos grasos mediante GC/MS ha probado ser efectiva para este tipo de análisis. En este estudio se encontraron niveles elevados de los ácidos grasos octanoico, decanoico, dodecenoico, dodecanoico, tetradecenoico, tetradecanoico y hexadecenoico, después de hidrolizar las acilcarnitinas presentes en el medio de cultivo de los fibroblastos de los pacientes que presentaban esta deficiencia. De igual manera ha

sido informada la presencia de concentraciones elevadas de las acilcarnitinas precursoras de estos ácidos grasos, mediante el uso de MS/MS (19). Además de las acilcarnitinas antes citadas, también se encuentra elevada la hexanoilcarnitina, pero en este estudio no fue posible medir el ácido graso producto de su hidrólisis, el ácido hexadecanoico, debido a que ese fue el producto utilizado para enriquecer el medio de cultivo. En conclusión, el método de valoración de agua tritiada, aunque inespecífico debido a que la oxidación de sustratos tritiados también puede estar deprimida en otras deficiencias, es un buen método para sugerir una deficiencia acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga si el análisis se co-teja con otros hallazgos propios de la deficiencia enzimática. Sin embargo, la determinación de los metabolitos deuterados es más específica, por encontrarse un perfil característico en esta deficiencia, que muestra niveles elevados de los ácidos grasos octanoico, decanoico, dodecenoico, dodecanoico, tetradecenoico, tetradecanoico y hexadecenoico, lo que la hace diferente de otras deficiencias enzimáticas.

CORRESPONDENCIA

JOSÉ HENRY OSORIO

Universidad de Caldas

Departamento de Ciencias Básicas de la Salud

Calle 65 N.º. 26-10. MANIZALES. Colombia

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

Referencias bibliográficas

1. Aoyama T, Ueno I, Hashimoto T. Rat very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase, a novel mitochondrial acyl-CoA dehydrogenase gene product, is a rate-limiting enzyme in long-chain fatty acid β -oxidation system. The cDNA and deduced amino acid sequence and distinct specificities of the cDNA-expressed protein. *J Biol Chem* 1994; 269: 19088-94.

2. Aoyama T, Uchida Y, Kelley RI, Marble M, Hofman K, Tonsgard JH, *et al.* A novel disease with deficiency of mitochondrial very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase. *Biochem. Biophys Res Commun* 1993; 191: 1369-72.
3. Izai K, Uchida Y, Orii T, Yamamoto S, Hashimoto T. Novel fatty acid β -oxidation enzymes in rat liver mitochondria. I. Purification and properties of very-long chain acyl-coenzyme A dehydrogenase. *J Biol Chem* 1992; 267: 1027-33.
4. 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: 2465-73.
5. Andresen BS, Bross P, Vianey-saban C, Divry P, Zobot MT, Roe CR, *et al.* Cloning and characterization of human very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase cDNA, chromosomal assignment of the gene and identification in four patients of nine different mutations within the VLCAD gene. *Hum Molec Genet* 1996; 5: 461-72.
6. Aoyama T, Souri M, Ueno I, Kamijo T, Yamaguchi S, Rhead WJ, *et al.* Cloning of human very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase and molecular characterization of its deficiency in two patients. *Am J Hum Gen* 1995; 57: 273-83.
7. Vianey-saban C, Divry P, Brivet M, Nada M, Zobot 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.
8. Olgivie I, Pourfarzam M, Jackson S, Stockdale C, Bartlett K, Turnbull DM. Very long-chain acyl coenzyme A dehydrogenase deficiency presenting with exercise-induced myoglobinuria. *Neurology* 1994; 44: 467-73.
9. Minetti C, Garavaglia B, Bado M, Invernizzi F, Bruno C, Rimoldi M, *et al.* Very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency in a child with recurrent myoglobinuria. *Neuromuscul Disord* 1998; 8: 3-6.
10. 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.
11. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
12. Manning NJ, Olpin SE, Pollit RJ, Webley JA. 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; 13: 58-68.
13. Osorio JH, Rodés M, Garavaglia B, Briones P, Ribes A. Estudios bioquímicos en 46 pacientes con deficiencias de la β -oxidación mitocondrial. En: Sociedad Española de Pediatría. IV Congreso de Errores Congénitos del Metabolismo. Memorias. Puerto de la Cruz-Tenerife. Islas Canarias. España. 18-21 de abril de 2001. pp 26.
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 β -oxidation. *J Biol Chem* 1985; 270: 530-5.
16. Olpin SE, Manning NJ, Pollit RJ, Clarke S. Improved detection of long chain fatty acid oxidation defects in intact cells using [9,10-³H]-oleic acid. *J Inher Metab Dis* 1997; 20: 415-9.
17. 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.
18. 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 Chim Acta* 1999; 281: 1-17.
19. 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(34): 22932-8.

Aceptado para su publicación el 26 de abril de 2011