

DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DA CARNITINA NO PLASMA

sua importância no estudo em doentes com doenças neuromusculares

MARIA CÍNTIA SIQUEIRA, FERNANDO MORGADO
Centro de Gastrenterologia. Faculdade de Medicina de Lisboa.
Serviço de Neurologia. Hospital de Santa Maria. Lisboa

RESUMO/SUMMARY

A L-carnitina desempenha um papel importante no transporte de ácidos gordos de cadeia longa para a β -oxidação na mitocôndria. A deficiência da carnitina está associada ao défice de β -oxidação de ácidos gordos de cadeia longa e a diferentes síndromes clínicas.

O objectivo deste estudo foi, determinar as concentrações plasmáticas da carnitina e dos seus metabolitos, em doentes com patologia neuromuscular dentro do grupo das miopatias mitocondriais, em comparação com um grupo normal.

O estudo compreendeu 11 voluntários saudáveis e 11 doentes com patologias neuromusculares mitocondriais. As concentrações plasmáticas da carnitina livre, carnitina total, acilcarnitina de cadeia curta e longa, foram determinadas utilizando o método radioenzimático com Acetil-Co A ^{14}C . Os valores foram calculados através da curva padrão em concentrações crescentes, da solução aquosa de L-carnitina.

Resultados: Os valores foram expressos em médias \pm D.P.

O grupo controlo teve os seguintes valores: para a carnitina livre ($32,6 \pm 4,95 \mu M$), carnitina total ($38,48 \pm 5,8 \mu M$), acilcarnitina de cadeia curta ($4,12 \pm 0,95 \mu M$) e para acilcarnitina de cadeia longa ($1,73 \pm 0,15 \mu M$).

DETERMINATION OF CARNITINE LEVELS IN THE PLASMA: IMPORTANCE ON THE STUDY IN PATIENTS WITH NEUROMUSCULAR DISEASES

L-carnitine plays a major role in the transport of the long chain fatty acids for the β -oxidation in the mitochondria. The deficiency of the carnitine is associated by the deficit of the β -oxidation of the long chain fatty acids and so a different syndromes. The purpose of this study was to determine the plasmatic concentrations of the carnitine and its metabolites in patients with neuromuscular pathologies within the group of mitochondrial myopathies by the comparison with a control group. The study comprised 11 healthy volunteers and 11 patients with neuromuscular mitochondrial diseases. The plasmatic concentrations of the free carnitine, total carnitine and the short and long chain acilcarnitine were determined by using the radio enzymatic method with Acetyl Co A ^{14}C . The values were calculated by the standard curve in increased concentrations of the L-carnitine in aqueous solution.

Results: The values were expressed as mean \pm S.D. The control group gave the following values: For free carnitine ($32.6 \pm 4.95 \mu M$), total carnitine ($38.48 \pm 5.8 \mu M$), short chain acilcarnitine

Os doentes foram divididos em dois grupos em função dos valores da carnitina encontrados:

O primeiro grupo teve os seguintes valores: Para a carnitina livre ($31,44 \pm 3,72 \mu\text{M}$), carnitina total ($36,6 \pm 3,86 \mu\text{M}$), acilcarnitina de cadeia curta ($3,52 \pm 1,56 \mu\text{M}$) e para acilcarnitina de cadeia longa ($1,68 \pm 0,08 \mu\text{M}$), respectivamente.

O segundo grupo teve valores mais baixos aos encontrados para o grupo controlo: Para a carnitina livre ($16,8 \pm 6,3 \mu\text{M}$), carnitina total ($20,88 \pm 6,26 \mu\text{M}$), acilcarnitina de cadeia curta ($2,98 \pm 0,81 \mu\text{M}$) e para a acilcarnitina de cadeia longa ($0,92 \pm 0,41 \mu\text{M}$), respectivamente.

Em conclusão, este método mostrou-se ser apropriado e rigoroso, para as determinações da carnitina e seus metabolitos no plasma, podendo vir a ser útil no apoio à clínica.

Palavras-chave: *deficiência em carnitina deficiência em carnitina palmitil transferase encefalomiopatias mitocondrial rbdomiólise, déficit de β -oxidação.*

($4.12 \pm 0.95 \mu\text{M}$) and for long chain acylcarnitine ($1.73 \pm 0.15 \mu\text{M}$).

The patients were divided in two groups according to their values: The 1st group gave the values within the control group: For free carnitine ($31.44 \pm 3.72 \mu\text{M}$), total carnitine ($36.6 \pm 3.86 \mu\text{M}$), short chain acylcarnitine ($3.52 \pm 1.56 \mu\text{M}$) and long chain acylcarnitine ($1.68 \pm 0.08 \mu\text{M}$).

The 2nd group gave values below the control group: For free carnitine ($16.8 \pm 6.3 \mu\text{M}$), total carnitine ($20.88 \pm 6.26 \mu\text{M}$), short chain acylcarnitine ($2.98 \pm 0.81 \mu\text{M}$) and long chain acylcarnitine ($0.92 \pm 0.41 \mu\text{M}$) respectively.

In conclusion, this method showed appropriate and accurate for the determinations of the carnitine and its metabolites in plasma, and must be useful for clinical support.

Key words: *carnitine deficiency carnitine palmitoyl transferase deficiency, encephalomyopathies mitochondrial deficit of β -oxidation, rbdomyolise*

INTRODUÇÃO

A síntese da carnitina (ácido β -hidroxi- γ N-trimetil amino butírico) a partir da lisina e da metionina é produzida principalmente no fígado e rim, depois transportada para o músculo onde desempenha um papel fundamental no metabolismo energético, controlando a entrada na mitocôndria, dos ácidos gordos de cadeia longa^{1,2}.

Com o aumento da frequência de determinações dos níveis da carnitina tornou-se evidente que as deficiências em carnitina são relativamente comuns, quer em doentes com doenças congénitas quer adquiridas. As doenças associadas à deficiência em carnitina podem envolver o fígado, coração, músculo esquelético, rins e cérebro³⁻⁶.

Três síndromes clínicas são em geral associadas às perturbações do metabolismo em carnitina:

1) Forma predominantemente miopáticas com fraqueza muscular de agravamento progressivo^{7,8}.

2) Forma sistémica de deficiência em carnitina. Para além de falta de forças de agravamento progressivo, os doentes têm crises de vômitos com alterações de estado de consciência podendo chegar ao coma, lembrando Síndrome de Reye⁷⁻¹⁰.

3) Neste grupo a baixa concentração da carnitina foi relacionada com a deficiência em carnitina palmitil transferase. Esta síndrome é caracterizada clinicamente por cri-

ses graves de rbdomiólise e mioglobinúria, que podem levar à insuficiência renal aguda, ficando os doentes assintomáticos no intervalo das crises^{8,11}.

Um estudo completo do metabolismo da carnitina é tecnicamente complexo e dispendioso, pois requer a determinação dos seus níveis nos tecidos e no plasma.

Assim optámos por avaliar sómente os níveis plasmáticos comparando um grupo normal com um grupo com reconhecida patologia neuromuscular.

POPULAÇÃO

Foram estudados onze voluntários saudáveis de ambos os sexos, de idades compreendidas entre 25 a 60 anos e onze doentes, sendo duas crianças de oito e dez anos e nove adultos entre 30 a 50 anos. Nos doentes, as análises foram realizadas sem conhecimento do diagnóstico. Os onze doentes têm patologias incluídas no grupo heterogéneo das miopatias mitocondriais. As duas crianças tem apenas patologias musculares, um dos casos tem oftalmoplegia externa e o outro uma miopatia que evoluiu por surtos de rbdomiólise. Dos restantes nove doentes, o diagnóstico em três era compatível com MELAS (miopatia e encefalopatia mitocondriais, acidose láctea e episódios *Stroke Like*), os seis restantes com encefalomiopatia tendo clinicamente ataxia, baixa da audição e um caso de

hiperlactacidémia e mialgias desencadeadas por pequenos esforços. No conjunto é um grupo heterogéneo, que tem como ponto comum, alterações mitocondriais observadas por histoenzimologia muscular. As amostras de sangue, (em tubos heparinizados) foram colhidas após jejum nocturno de 12 horas. Imediatamente após a colheita, os sangues foram centrifugados à temperatura de 4° C, os plasmas foram decantados em alíquotas para vários tubos e armazenados a -70° C até à realização do estudo.

MÉTODO

O plasma correspondente a cada amostra (0.5 ml), foi desproteinizado com 0.1 ml de ácido perclórico HClO₄ ou (APC) (300g/l). Após dez minutos de incubação, as amostras foram centrifugadas a 600 g e os precipitados, foram separados dos sobrenadantes. Para as determinações das formas livres e esterificadas da carnitina¹³⁻¹⁴ foram feitas as seguintes determinações.

FRACÇÃO 1:

(carnitina livre, CL): 0.12ml de sobrenadante correspondente a cada amostra foi misturado com 0.24 ml de Hepes (N-[2-hidroxietyl] piperazina -N' [2-ácido etanosulfónico]) em hidróxido de potássio(KOH) 0.48 M (pH=7.3) e 0.12 ml de KOH 0.9 M.

FRACÇÃO 2:

(carnitina total solúvel CT): 0.1 ml de sobrenadante foi misturado com 0.2 ml de KOH 0.9M, incubados durante duas horas a 37° C.

Seguidamente foram adicionados a cada amostra 0.2 ml de Hepes em KOH 0.48M (pH=7.3) e as amostras neutralizadas com 0.06 ml de HCL M.

FRACÇÃO 3:

(acilcarnitina de cadeia longa, CCL): o precipitado foi lavado duas vezes pela suspensão de 1 ml de APC (50 g/l) e centrifugado a 600 g.

Seguidamente o precipitado foi removido cuidadosamente e novamente ressuspensão com 0.4 ml de solução de KOH 1.8M.

Condições para a hidrólise foram as da fracção 2.

PREPARAÇÃO DA RESINA POR TROCA IÓNICA

50 gramas de resina Dowex 2x8 são agitadas em 300 ml de HCL 1M durante 15 minutos e armazenadas a 4° C durante a noite. Seguidamente são lavadas com 2 L de H₂O até o pH neutro. A concentração final da resina é de 0.75 g por ml.

ESTUDO DA CARNITINA E DOS SEUS METABOLITOS

Reagentes utilizados para a mistura do sistema reaccional:

Hepes em KOH 0.1M (pH=7.3)

Acetil Coenzima A 31µM

¹⁴C Acetil Coenzima A 31nCi/ml

31µg/ml de carnitina acetil transferase ou 31 µg/ml de soro bovino.

Para cada tubo juntou-se 0.2 ml de cada uma das fracções 1,2,3 e 0.8 ml da mistura do sistema reaccional. Para o ensaio em branco utilizaram-se todos constituintes da mistura do sistema reaccional, menos a enzima carnitina acetil transferase que é substituída por soro bovino e o volume da amostra por igual volume de sulfato de amónio (NH₄)₂SO₄.

Todas as amostras foram incubadas à temperatura ambiente durante 30 minutos. Ao fim deste tempo, juntaram-se 0.3 ml da suspensão da resina previamente preparada e os tubos foram agitados no vortex horizontal. Seguidamente os tubos foram centrifugados a 2000 g durante uma hora. Após a centrifugação retirou-se de cada um dos tubos 0.8 ml de sobrenadante para os frascos de cintilação líquida, aos quais se juntou o líquido cintilador e foi medida a radioactividade (¹⁴C) no contador de cintilação líquida Packard 3330.

Os valores das amostras, foram calculados através da curva padrão preparada a partir de L-carnitina em solução aquosa com quantidades crescentes (0 - 0,24 µM).

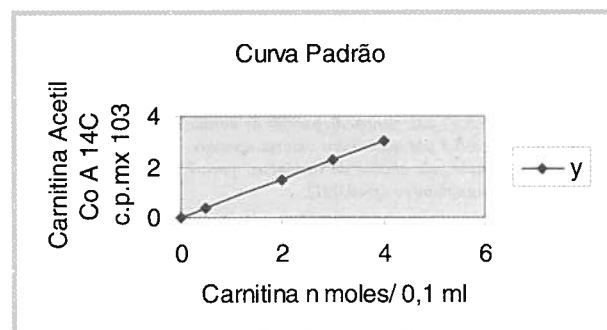


Fig. 1 - L-Carnitina+ ¹⁴C Acetil Co A
¹⁴C Acetil Carnitina +Co ASH

RESULTADOS

O grupo controlo teve os seguintes valores médios ± desvio padrão: para carnitina livre (32,6 ± 4,95 µM), carnitina total (38,48 ± 5,2 µM), acilcarnitina da cadeia curta (4,12 ± 0,95 µM) e acilcarnitina de cadeia longa (1,73 ± 0,15 µM).

Os doentes foram divididos em dois grupos consoante os níveis da carnitina encontrados:

- O primeiro grupo (N=6), teve os valores médios \pm desvio-padrão dentro do padrão de normalidade para a carnitina livre ($31,44 \pm 3,72 \mu\text{M}$), carnitina total ($36,6 \pm 3,86 \mu\text{M}$), acilcarnitina de cadeia curta ($3,52 \pm 1,56 \mu\text{M}$) e acilcarnitina de cadeia longa ($1,68 \pm 0,08 \mu\text{M}$).
- O segundo grupo (N=5), teve os valores médios \pm desvio padrão abaixo dos valores normais: para a carnitina livre ($16,8 \pm 6,3 \mu\text{M}$), carnitina total ($20,88 \pm 6,28 \mu\text{M}$), acilcarnitina de cadeia curta ($2,98 \pm 0,81 \mu\text{M}$), acilcarnitina de cadeia longa ($0,92 \pm 0,41 \mu\text{M}$), respectivamente.

Quadro I - Os valores são expressos em média \pm D.P.

População Estudada	Carnitina Livre	Carnitina Total	Acilcarnitina de cadeia Longa
Controlos (N=11)	$32,6 \pm 4,95 \mu\text{M}$	$38,48 \pm 5,2 \mu\text{M}$	$1,73 \pm 0,75 \mu\text{M}$
Doentes (N=6)	$31,44 \pm 3,72 \mu\text{M}$	$36,66 \pm 3,86 \mu\text{M}$	$1,68 \pm 0,08 \mu\text{M}$
Doentes (N=5)	$16,8 \pm 6,3 \mu\text{M}$	$20,88 \pm 6,28 \mu\text{M}$	$0,98 \pm 0,41 \mu\text{M}$

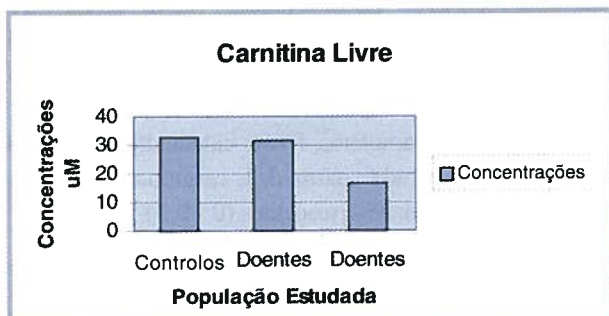


Fig 2 - Controlos (N=11) com valores de $32,66 \pm 4,95 \mu\text{M}$. Doentes (N=6), com valores de $31,44 \pm 3,72 \mu\text{M}$, dentro do padrão de normalidade. Doentes (N=5) com valores $16,8 \pm 6,3 \mu\text{M}$ abaixo dos valores normais. O grupo foi analisado pela análise da variância, para $F_{p,2}=19,93$ (F teste), foi estatisticamente significativo ($p < 0,001$).

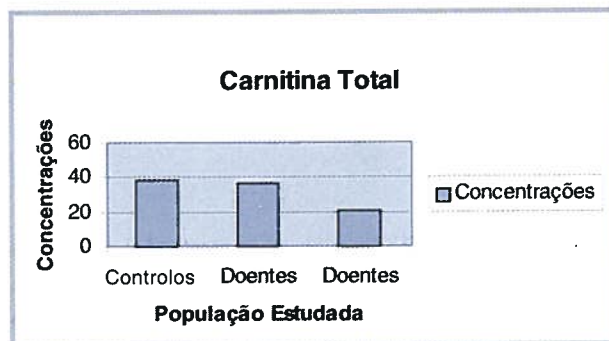


Fig. 3 - controlos (N=11) com valores de $38,48 \pm 5,2 \mu\text{M}$. Doentes (N=6) com valores $36,6 \pm 3,86 \mu\text{M}$, dentro do padrão de normalidade. Doentes (N=5), com valores $20,88 \pm 6,28 \mu\text{M}$, abaixo dos valores normais. O grupo foi analisado pela análise da variância e para $F_{p,2}=22,72$ (F teste), foi estatisticamente significativo ($p < 0,001$).

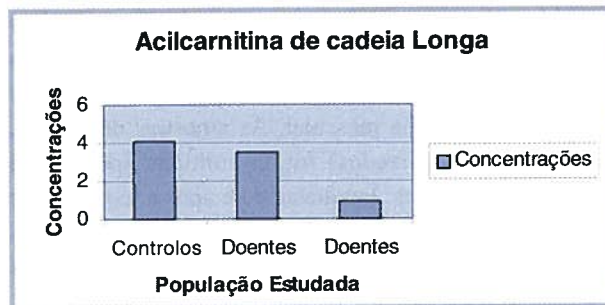


Fig 4 - Controlos (N=11) com valores de $1,73 \pm 0,15 \mu\text{M}$. Doentes (N=6), com valores $1,68 \pm 0,08 \mu\text{M}$, dentro do padrão de normalidade. Doentes (N=5), com valores $0,92 \pm 0,41 \mu\text{M}$, abaixo dos valores normais. O grupo foi analisado pela análise da variância e para $F_{p,2}= 20,49$ (F teste), foi estatisticamente significativo ($p < 0,001$).

DISCUSSÃO

Em relação aos doentes com valores da carnitina baixos ou muito baixos os diagnósticos foram os seguintes: um doente com deficiência em carnitina palmitil transferase com surtos de rabdomiólise e quatro doentes com encefalomiopatias mitocondriais diagnosticadas pela histoenzimologia muscular.

Do ponto de vista clínico estes quatro doentes eram heterogêneos. Dois tinham encefalomiopatias com acidose láctea e episódios *Stroke Like* e dois tinham encefalopatias com baixa audição e mialgias. Torna-se evidente, que com uma população tão pequena, não podemos tirar conclusões definitivas, não obstante parece-nos que o método é rigoroso e reprodutível. O método por nós utilizado no estudo¹³, baseia-se numa técnica radio-enzimática. Existem outros métodos para a determinação da carnitina, mas a vantagem desta técnica está no uso do co-factor a acetil-coenzima A, marcada com o isótopo radioactivo ¹⁴C, o que lhe confere maior sensibilidade e reprodutibilidade, em relação ao enzimático, que é comercializado em Kit. Além disso tem a vantagem de determinar as várias cadeias da acil-carnitina, sendo a mais importante a da cadeia longa.

Estas determinações, permitem o diagnóstico diferencial das doenças metabólicas hereditárias, especialmente, naquelas que apresentam, deficiência na β oxidação dos ácidos gordos na mitocôndria.

Para além dos métodos referidos anteriormente, existe um método novo de espectrometria de massa em tandem, para a separação e identificação das acil-carnitinas no plasma. Este método tem um elevado grau de precisão e resolução, mas é altamente dispendioso, o que não torna acessível o seu uso.

Nos casos em que o problema económico possa ser ultrapassado, é o método ideal para confirmação do diagnóstico nestas patologias¹⁶.

Os valores encontrados na população considerada

normal, estão de acordo com os referidos na literatura¹³⁻¹⁵.

A determinação da carnitina é importante porque permite seleccionar os doentes que podem corrigir a sua deficiência com L-carnitina exógena. É de salientar, que estas terapêuticas são dispendiosas, e que devem ser mantidas durante muito tempo, e nalguns casos indefinidamente, como é o caso do doente nº 1 do segundo grupo, cujos níveis da carnitina foram os seguintes: 7 µM para a carnitina livre, 12,9 µM para a carnitina total e 0,8 µM para a acil-carnitina de cadeia longa, que em comparação com o grupo controle foram muito baixos.

Tratava-se de uma criança de seis anos na altura do diagnóstico, e com uma história de rabdomiólise grave. Nestas circunstâncias foi feita uma biópsia muscular que detectou uma sobrecarga de lípidos nas fibras musculares e que lhe deu um aspecto de *Crivo*. A criança foi estudada em França onde foi confirmada a deficiência em carnitina palmitil transferase. Está por isso medicada com L-carnitina há já alguns anos, não voltando a ter crises de rabdomiólise. Acrescente-se que este doente teve um irmão que faleceu com insuficiência renal aguda, no decurso de uma destas crises. Nos restantes casos de encefalomiopatias mitocondriais que apresentavam níveis baixos da carnitina não foi evidente o efeito terapêutico da L-carnitina exógena nas sintomatologias apresentadas, até agora.

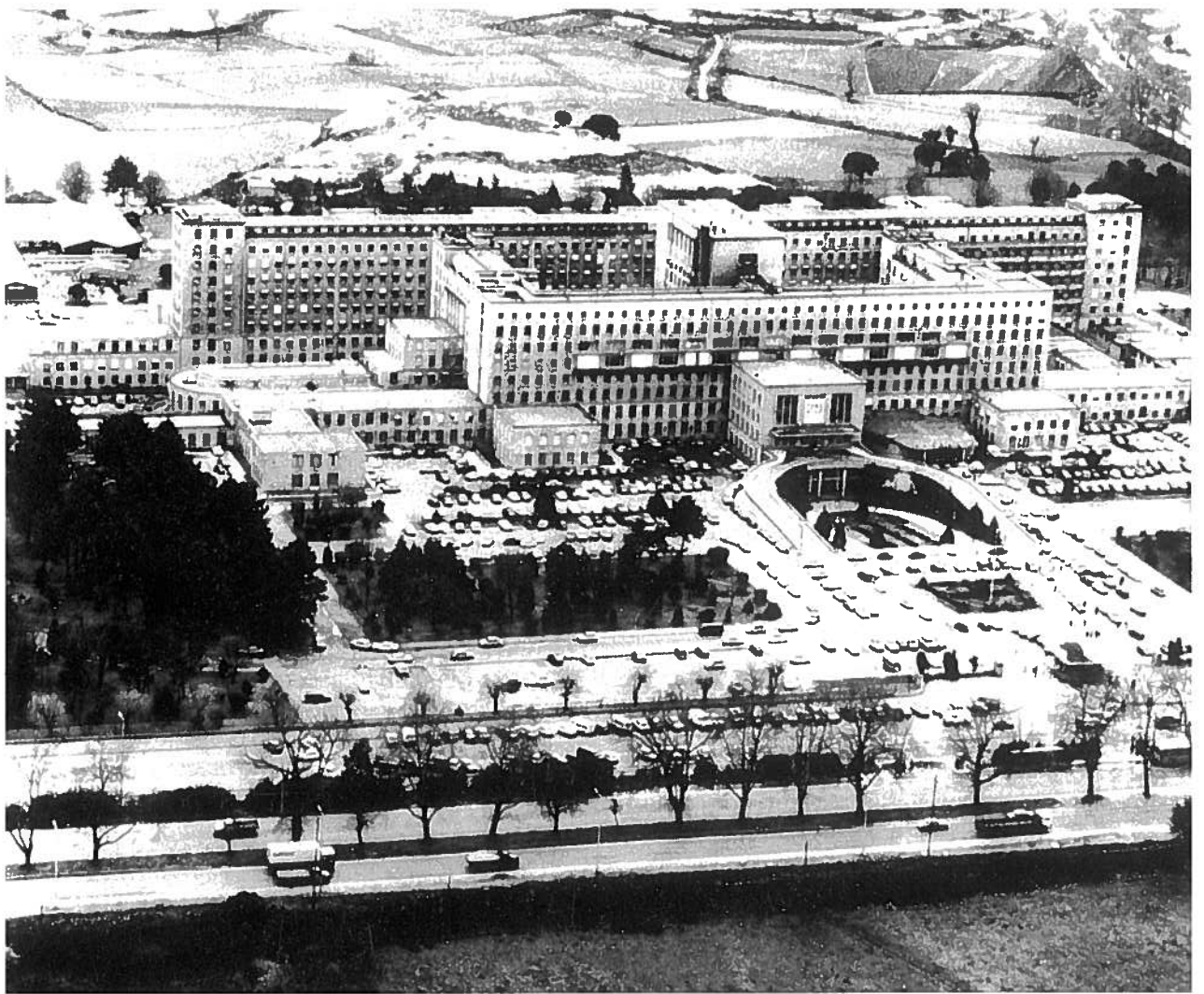
Como foi referido, os quadros de deficiência em carnitina podem ser congénitos^{5,7,9,11} como o que acabamos de descrever, ou adquiridos, como os associados a insuficiência renal e hepática^{11,12,18}. Alguns estão relacionados com certos fármacos, como o valproato de sódio¹⁷⁻¹⁹. Todas estas situações podem vir a beneficiar com a determinação da carnitina e posterior terapêutica de substituição²⁰⁻²².

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem a Maria Isabel Mega e Ana Paula Reis e os restantes voluntários a colaboração prestada, e todo o apoio dado, sem a qual este trabalho não era possível ser executado.

BIBLIOGRAFIA

1. BOWYER BA, FLEMING CR, HAYMOND MW, MILES JM: L-carnitine; effect of intravenous administration on fuel homeostasis in normal subjects and home-parenteral nutrition patients with low plasma carnitine concentrations. *Am J Clin Nutri* 1989;49:18-23
2. ROSSLE G, PICHARD C, ROULET M, BERGSTROM J, FURST: Muscle carnitine pools in cancer patients. *Clin Nutri* 1989;8:341-346
3. BOHMER T, RYDNING A, ERICK H SOLBERG: Carnitine levels in human serum in health and disease. *Clinica Chimica Acta* 1974;54: 55-61
4. SANDSTEDT S, LARSSON J, CEDERBLAD G: Carnitine levels in skeletal muscle of malnourished patients before and after total parenteral nutrition. *Clinical Nutrition* 1986;5:227-229
5. BOWYER B A, MILES JM, HAYMOND MW, RICBARD FLEMING C: L-carnitine therapy in home, parenteral nutrition patients with abnormal liver tests and low plasma carnitine concentrations. *Gastroenterol* 1988;94:434-8
6. SACHAN DS, RHEW TH, RUARK RA: Ameliorating effects of carnitine and its precursors on alcohol-induced fatty liver. *Am J Clin Nutrition* 1984;39:738-744
7. DENIS J, GARRY MC, FOSTER DW: Systemic carnitine deficiency. *Engl J Med* 1980;303:1413-1415
8. ADAMS R: Principals of Neurology sixth edition chap 51.1997;1433-1448
9. CHAPOY PR, ANGELINE C, BROWN WJ et al: Systemic carnitine deficiency- A treatable inherited lipid-storage disease presenting as Reye's Syndrome. *Engl J Med* 1980;303:1389-1393
10. EIRIS J; RIBES-A; FERNANDEZ PRIETO R; RODRIGUEZ GARCIA J; RODRIGUEZ SEGADE S; CASTRO GAGO M: [3-hydroxy-3- methylglutaric aciduria and recurrent Reye's-like syndrome]. *Rev Neurol* 1998;26(154):11-4
11. MAURO SD, Di MAURO PMM: Muscle carnitine palmithyltransferase deficiency and myoglobinuria. *Science* 1973;182:929-930
12. FULLER RK, HOPPEL CL: Elevated plasma carnitine in hepatic cirrhosis. *Hepatology* 1983;3:554-558
13. ROSSLE C, KOHSE KP, FRANZHE, FURST P: An improved method for the determination of free and esterified carnitine. *Clinica Chimica Acta*.1985;149:263-268
14. DENIS J, GARRY Mc, FOSTER DW: An improved and simplified radioisotope assay for the determination of free and esterified carnitine. *Journal of Lipid Research*.1976;17:277-281
15. CEDERBLAD G, LINDSTEDT S: A method for the determination of carnitine in the picomole range. *Clinica Chimica Acta* 1972;37:235-243
16. DELOLME F, VIANEY SABAN C, GUFFON N, FAVRE-BONVIN J, GUIBAUD P, BECCHI M, MATHIEU M, DIVRY-P: [study of plasma acylcarnitines using tandem mass spectrometry. Application to the diagnosis of metabolism hereditary diseases]. *Arch-Pediatr* 1997;44(9):819-26
17. COUTER DL: Carnitine valproate and toxicity. *J Child Neurol* 1991;6:7-14
18. GOBEL R, GORTZEN A, BRAUNIG P: Encephalopathies caused by valproate. *Fortschr Neurol Psychiatr* 1999;67(1):7-11
19. STADLER DD, BALE JF Jr, CHENARD CA, REBOUCHE CJ: Effect of long-term valproic acid administration on the efficiency of carnitine reabsorption in humans. *Metabolism* 1999;48(1):74-9.
20. CAMPOS Y, HUERTAS R, BAUTISTA J, GUTIERREZ E, APARICIO M, LORENZO G, SEGURA D, VILLANUEVA M, CABELLO A, ALESSO L et al: Muscle carnitine deficiency and lipid storage myopathy in patients with mitochondrial myopathy. *Muscle Nerve* 1993, 16(17): 778-81
21. MORRIS AA, TURNBULL DM: Fatty acid oxidation defects in muscle. *Curr Opin Neurol* 1988;11(5):485-90
22. LOFBERG M; JANKALA H; PAETAU A; HARKONEN M; SOMER H: Metabolic causes of recurrent rhabdomyolysis. *Acta Neurol Scand* 1998;98(4):268-75



Hospital de São João. Porto