

IMPLEMENTACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE CARNITINA EN PLASMA COMO HERRAMIENTA DIAGNÓSTICA DE ENFERMEDADES HEREDITARIAS

JOSÉ HENRY OSÓRIO*, MORTEZA POURFARZAM**

Resumen

Introducción: *el análisis de carnitina mediante espectrometría secuencial de masas usando especímenes de sangre seca en papel dentro del procedimiento descrito para la determinación de acilcarnitinas, aporta resultados variables, los cuales, se correlacionan pobremente con los resultados obtenidos al analizar muestras de plasma de los mismos pacientes a través de otras técnicas.*

Materiales y métodos: *se analizaron muestras de plasma seco en papel de filtro para carnitina libre y total utilizando dilución de isótopos mediante electroespray y su posterior análisis por espectrometría secuencial de masas, comparado con el método radioenzimático tradicional.*

Resultados y discusión: *El presente estudio aporta un nuevo método, efectivo para la medición de carnitina libre y total en plasma, como una buena alternativa para reemplazar el ensayo radioenzimático que consume mucho tiempo y materiales de laboratorio por muestra analizada.*

Palabras clave: *Carnitina, Espectrometría de masas en tandem, enfermedades metabólicas.*

ARCH. MED. (Manizales) 2008; 8 (2): 126-133

* Universidad de Caldas, Laboratorio de Patología Molecular. Departamento de Ciencias Básicas de la Salud, Manizales, Colombia.

** Spence Biochemical Genetics Unit, Royal Victoria Infirmary. Newcastle upon Tyne. England.
Correspondencia: Universidad de Caldas, Departamento de Ciencias Básicas de la Salud. Calle 65 N0. 26-10. Manizales.

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

Remitido para publicación: 15-04-2008. Aprobado para publicación: 15-06-2008

Implementation and standarization of a method for carnitine quantitation in plasma as a diagnostic tool of inherited diseases

Summary

Introduction: the analysis of free carnitine using dried blood specimen and the procedures described for the analysis of acylcarnitines gives variable results which correlate poorly with the results obtained by analysis of the simultaneous plasma samples using other techniques.

Materials and methods: dried plasma samples in filter paper were analyzed for free and total carnitine using stable isotope dilution electrospray tandem mass spectrometry, compared with the traditional radio-enzymatic assay.

Results and discussion: The present work introduce a new effective method, for quantitation of plasma free and total carnitine, as a good alternative for replacing the radio enzymatic assay which consumes many time and laboratory materials for each analyzed sample.

Key words: Carnitine, tandem mass spectrometry, inherited metabolic diseases

ARCH. MED. (Manizales) 2008; 8 (2): 126-133

Introducción

El campo de los errores innatos del metabolismo (*EIM*) crece permanentemente como resultado de muchos reportes relacionados con alteraciones en diferentes vías metabólicas, ayudando el avance en investigación y tecnología desarrollados en esta área.

Los errores innatos del metabolismo usualmente son el resultado de defectos enzimáticos o de cofactores, la mayoría de los cuales son de carácter autosómico recesivo, dando como resultado, la acumulación de metabolitos anormales, pudiendo ser estos detectables en los fluidos biológicos de los pacientes afectados.

El diagnóstico diferencial de los *EIM* puede ser difícil, aun en presencia de la más avanzada tecnología en bioquímica genética, cuyo

objetivo es identificar la causa del *EIM* la cual podría ser temporal (adquirida) o permanente (hereditaria).

La determinación de los niveles de acilcarnitinas por espectrometría secuencial de masas o en tandem (*TMS*), usando sangre seca en papel, para el diagnóstico de los *EIM* de la degradación de ácidos grasos y las acidemias orgánicas, así como el tamizaje selectivo para este tipo de desórdenes ha sido descrito^{1,2,3,4,5}. La alteración en la β -oxidación mitocondrial es seguida por una acumulación de acilcarnitinas representativas del tipo de defecto enzimático en esa vía metabólica. Sin embargo, la producción de estas acilcarnitinas depende de la disponibilidad de carnitina libre en la mitocondria, lo que conlleva a que posibles alteraciones en el perfil de acilcarnitinas no sean detectables, si la célula no cuenta con el aporte suficiente de carnitina.

Se hace necesario conocer la ocurrencia y distribución de la carnitina libre y la acilcarnitinas en sangre como un indicador de condiciones metabólicas inusuales. Por lo tanto, el diagnóstico y manejo de estas enfermedades metabólicas requiere el conocimiento de las concentraciones de estos compuestos.

El ensayo radioenzimático (REA)⁶ es conocido como el método estándar para la determinación de carnitina. Este procedimiento determina la carnitina libre enzimáticamente, mediante su conversión a acetilcarnitina radiomarcada. La carnitina total es medida después de realizar hidrólisis alcalina de las acilcarnitinas de la muestra, lo que conlleva a que solo quede carnitina en la misma, es decir, la carnitina total. La concentración de acilcarnitinas es entonces calculada como la diferencia entre la carnitina total y la carnitina libre.

El presente trabajo muestra un método preciso y confiable para la determinación de la carnitina libre y total en muestras de plasma seco en papel de filtro mediante *ESI/MS/MS*.

Materiales y métodos

Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico. La L-carnitina fue obtenida de Sigma UK. El isótopo estable ²H₃-Carnitina fue adquirido de Cambridge isotope laboratories UK.

Métodos

Preparación de tarjetas de papel de filtro para la determinación de carnitina libre y total

Muestras de un adulto voluntario normal fueron obtenidas mediante venopuntura y centrifugadas (2300g x 5 min) para separar el plasma.

Un volumen de estándar interno de 20 µl (300 µmol/l ²H₃-Carnitina en 50 % metanol:

agua) fueron adicionados a 180 µl de plasma. La solución fue mezclada, y se dejó en reposo durante 15 min, para posteriormente dejar caer gotas de la misma sobre papel de filtro ((No. 903, 1.88 mm Schleicher & Schuell). Las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente durante una hora.

Para la determinación de la carnitina total 16 µl de KOH 4 mol/l fueron adicionados a 100 µl de la mezcla plasma-estándar interno, después de mezclar y centrifugar, (3000g x 1 min), las muestras fueron incubadas a 45 °C en un baño con agitación durante 60 min para hidrolizar las acilcarnitinas. Después de mezclar y centrifugar por segunda vez, se dejaron caer gotas sobre papel de filtro y se repitió el proceso de secado.

Preparación de plasma libre de carnitina endógena

Las muestras de plasma normal contienen carnitina endógena, la cual interfiere en la preparación de curvas estándar que comiencen desde un valor de 0 µmol/l. Para obtenerlas se han dializado muestras de plasma.

Bolsas de membrana de diálisis conteniendo 1 ml de plasma fueron colocadas en solución buffer fosfato isotónica (50 mM, pH 7.4) (250 ml PBS / 1 ml muestra) durante 24 horas a 4°C con agitación suave. La solución de PBS fue cambiada cada 6 horas.

Análisis de muestras de plasma mediante espectrometría secuencial de masas en bandejas de 96 pozos (*microtitre plates*)

Las manchas de plasma fueron recortadas del papel de filtro en círculos (6.35 mm o 0.25 pulgadas de diámetro para cada uno, que corresponden a 12 µl de plasma) y se depositó un círculo en cada pozo. A cada uno fue adicionado metanol puro (500 µl). Las bandejas fueron colocadas en agitador orbital (750 rpm) durante 30 min y luego sonicadas durante 15 min. Posteriormente fueron agitadas nuevamente durante dos horas. Se sonicaron por 30 min y el papel de filtro fue removido de cada pozo.

El sobrenadante resultante fue evaporado bajo gas nitrógeno a 45°C hasta secarse y 50µl de HCl butanólico 1 mol/l fueron adicionados a cada muestra (cada pozo) e incubados a 60°C durante 15 min (derivatización). Las muestras fueron evaporadas inmediatamente bajo nitrógeno y redisueltas en 100µl (cada una) de acetonitrilo al 70% en agua para ser inyectadas al espectrómetro de masas. El estándar interno fue usado para la cuantificación de L-carnitina al analizar la relación entre las señales.

Análisis de muestras de plasma por espectrometría secuencial de masas

Todos los análisis fueron realizados en un equipo Quattro II, triple quadrupole tandem mass spectrometer (Micromass UK), equipado con una fuente de ionización en espray (ESI), y un sistema de análisis datos micro mass MassLynx. La introducción de las muestras a la fuente se hizo mediante el dispositivo automático Jasco AS980 acoplado a una bomba Jasco PU980 HPLC.

Los butilesteres de carnitina pasan el analizador 1, chocan con nitrógeno (se fragmentan), y uno de los fragmentos característicos ($m/z = 103$), pasa al analizador 2 el cual es programado para detectar $m/z = 103$. Este es registrado por el detector mientras el m/z que ha pasado el analizador 1 es grabado.

Análisis estadístico

La prueba t-student fue usada para buscar diferencias estadísticas, y para buscar la similitud entre los dos métodos finales de medición clínica comparados, una prueba de Bland-Altman fue utilizada ⁷.

Linealidad para concentraciones ascendentes de carnitina libre y análisis de la función de scan para medir carnitina libre y total

Para evaluar la linealidad de la intensidad del ión con relación a la concentración de carnitina, muestras de plasma dializadas durante de 24 horas fueron enriquecidas con

L-carnitina a concentraciones de 5, 10, 20, 40, 60, 80, y 100 µmol/l, preparando luego tarjetas en papel de filtro, y haciendo la extracción y análisis como se indicó anteriormente, utilizando un programa para análisis de los iones precursores de m/z 85 y m/z 103 derivatizando y sin derivatizar.

Resultados

Los valores del coeficiente de relación de las curvas estándar de 0 a 100 µmol/l de carnitina libre usando dos funciones de scan con y sin derivatización fueron todos cercanos a un valor de 1 y la mejor correlación observada fue para m/z 85 en muestras derivatizadas. Para analizar una posible diferencia entre ellas, los resultados de esta función fueron comparados con las otras utilizadas mediante la prueba t-student. No se encontró diferencia significativa entre ellas.

Elección de una función de scan para medir carnitina libre y total

La precisión de la medida de carnitina libre fue evaluada mediante el procesamiento de 95 muestras almacenadas y comparando sus valores con los establecidos mediante REA. Los especímenes fueron analizados con y sin derivatización usando dos funciones de scan (precursores de m/z 85 y m/z 103). Algunos cambios fueron detectados trabajando con estas muestras reales cuando se analizaron sin derivatizar. Fue difícil obtener un espectro claro debido al alto nivel de ruido químico e interferencias de picos desconocidos (por ejemplo m/z 167). Esto se redujo considerablemente después de derivatizar las muestras (figura 1). Cuando se compararon con los valores obtenidos por REA, se obtuvo un Pearson de 0.55 en muestras sin derivatizar y un valor de 0.89 en las derivatizadas. El análisis de las relaciones 218/promedio de ruido y 221/promedio de ruido fue realizado. El valor promedio más alto fue

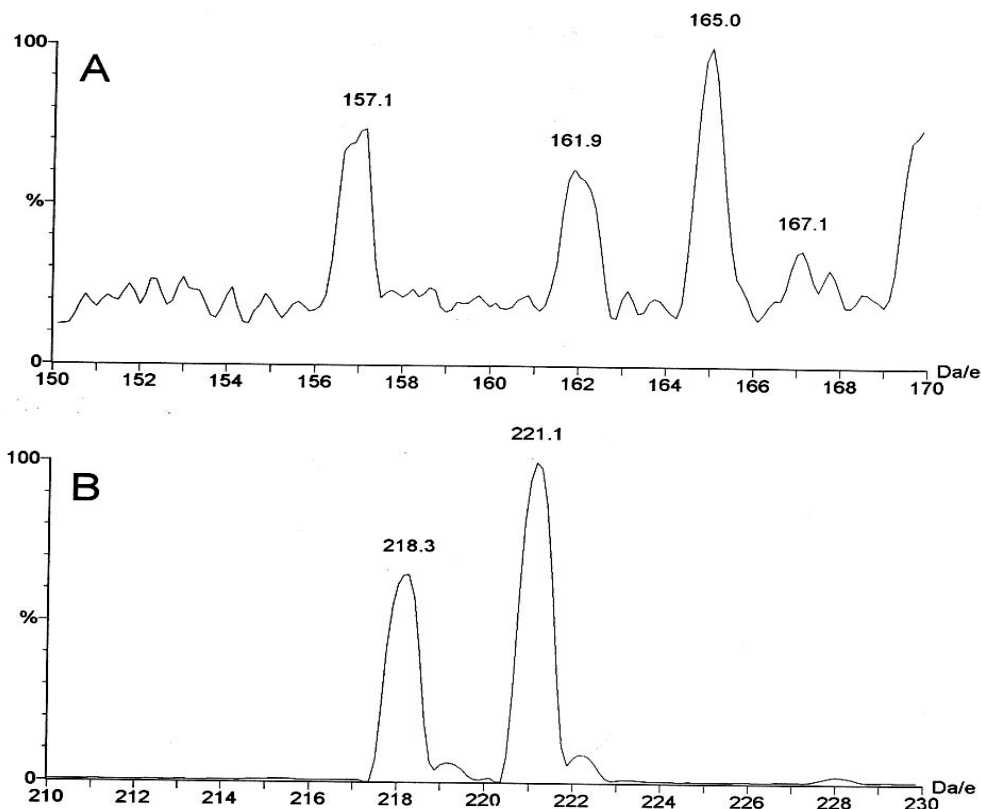


Figura 1. Espectro de masas de los precursores de m/z 85 para carnitina libre. Los picos de carnitina libre y carnitina marcada corresponden a m/z 161.9 y 165 en el espectro A sin derivatización, y a m/z 218.3 y 221.1 en el espectro B con derivatización respectivamente.

obtenido usando precursores de m/z 103 con derivatización y el mas bajo, con precursores de m/z 85 sin derivatizar. Para ahondar en el análisis de la precisión al medir carnitina libre y total mediante este nuevo método, 312 muestras de plasma recibidas para análisis de rutina fueron procesadas en paralelo para carnitina libre y total mediante REA y TMS (precursores de m/z 103 con derivatización). Los análisis de estos resultados mostraron una correlación entre los dos métodos para carnitina libre y total de $y = 0.96x + 0.45$ and $y = 0.95x - 0.69$ respectivamente.

La distribución de la media versus la diferencia de valores pareados (análisis de Bland-Altman) se muestra en las figuras 2 y 3 para carnitina libre y total respectivamente. Estos datos muestran una buena correlación entre los dos métodos para carnitina libre y total con relación a los rangos de concentración estudiados.

Un ensayo intra-día e interdía para el nuevo método fue practicado, usando una muestra de plasma con un valor de carnitina libre obtenido por REA de $41.8 \mu\text{mol/l}$ y los datos se muestran en la tabla 1.

Discusión

La importancia de *ESI/MS/MS* para el diagnóstico de los errores congénitos del metabolismo y sus utilidades en la confirmación de errores diagnósticos, ha sido demostrada previamente⁸. El presente trabajo fue realizado tratando de evaluar y mejorar la reproducibilidad, sensibilidad, y especificidad para medir carnitina en plasma mediante esta técnica.

La literatura científica reporta diferentes métodos para medir L-carnitina, pero el ensayo radio-enzimático ha sido considerado como el

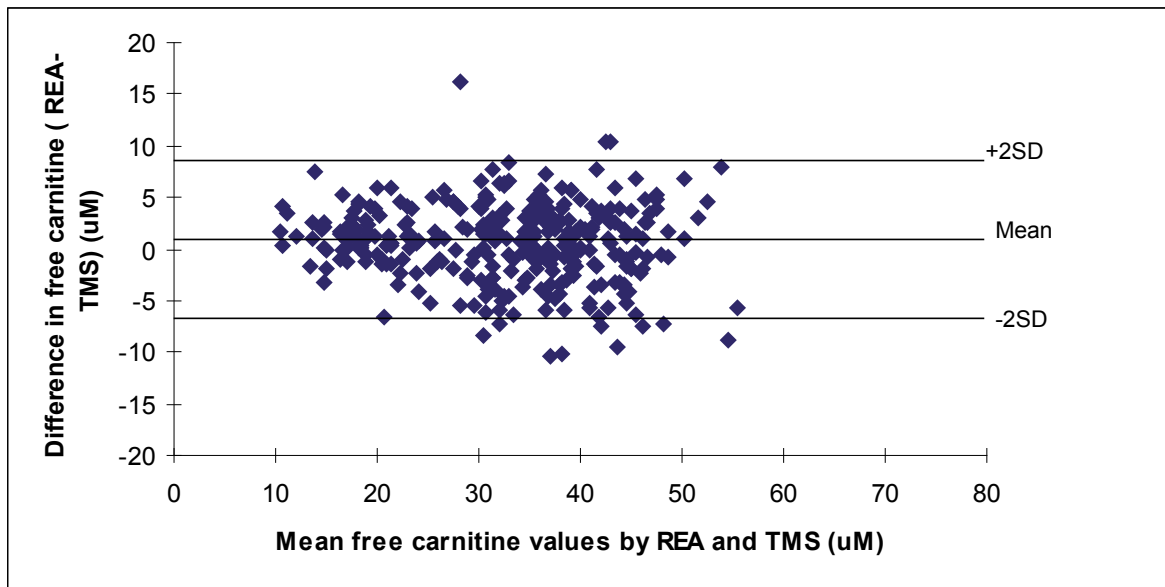


Figura 2. Bland-Altman de la diferencia vs el promedio de valores pareados para los valores de carnitina libre, comparando los métodos REA y ESI/MS/MS ($n = 312$, Promedio= Mean (M) = 0.6, $SD = 3.7$).

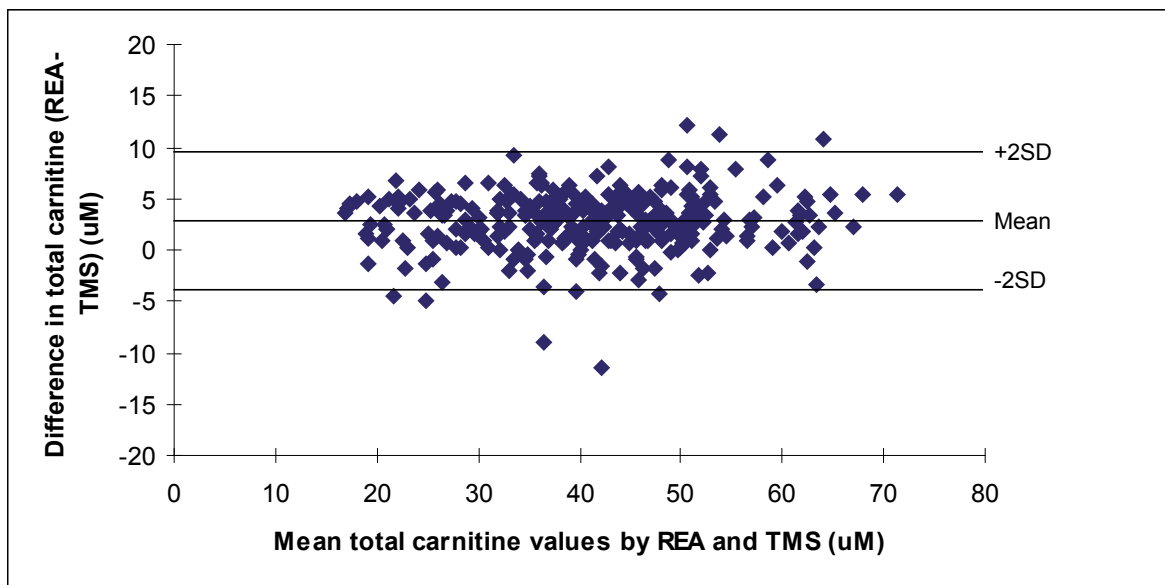


Figura 3. Bland-Altman de la diferencia vs el promedio de valores pareados para los valores de carnitina total, comparando los métodos REA y ESI/MS/MS ($n = 312$, Promedio=Mean (M) = 2.8, $SD = 2.8$).

método estándar para tal fin. Previamente se describió un método para medir este parámetro mediante FAB/MS/MS⁹, pero fue encontrado limitado para su uso con muestras de plasma

debido a problemas de calibración del estándar interno, siendo recomendado para su uso con muestra de orina. Otros reportes usando ESI/MS/MS para la determinación de carnitina

Tabla 1. Medidas de carnitina libre usando ESI/MS/MS. Ensayo intradía e Interdías ($\mu\text{mol/l}$)

Ensayo	Min	Max	Promedio	SD	CV
Intradía (n=20)	40	44.4	43.1	1.0	2.3
Interdías (entredías) (n=20)	41	45	44	1.9	4.3

Abreviaturas: SD, desviación estándar; CV, coeficiente de variación.

libre y acilcarnitinas en plasma y suero han sido publicados.^{10, 11}

Estos autores han usado diferentes métodos de extracción, por ejemplo, una mezcla de metanol, agua, y 6mol/l HCl (400:100:0.5 v/v/v), en vez del metanol puro que usamos nosotros. Sin embargo, ellos han analizado las muestras de carnitina sin derivatización, utilizando el precursor m/z 85 en un rango de m/z 160-210, y haciendo la comparación de su método con el método espectrofotométrico, basado en reacciones enzimáticas, obteniendo buena correlación entre ellos.

Como puede apreciarse en nuestro caso, para la carnitina y su estándar interno, la derivatización incrementa sus masas moleculares relativas mediante la selección de un derivado que adiciona una masa considerable a las muestras, pero no a las impurezas, siendo removidos por lo tanto, de la región que contiene compuestos que interfieren con el análisis, lo que se manifiesta en un aumento en la especificidad del mismo. La comparación que hacemos

entre el ensayo radio-enzimático y ESI/MS/MS utilizando la prueba de Bland-Altman hace énfasis en la búsqueda de una posible diferencia significativa entre los métodos, en vez de analizar sus similitudes, ya que esto último podría dar interpretaciones erróneas.

Para el método que desarrollamos, la diferencia no es significativa y la mayoría de los valores pueden ser encontrados dentro de límites aceptables para la prueba estadística, mostrando un buen acuerdo entre estos dos métodos de medición clínica.

Los resultados obtenidos por nosotros muestran una nueva técnica, efectiva para la medición de carnitina libre y total en plasma, como una buena alternativa para reemplazar una técnica tradicional que consume mucho tiempo y materiales de laboratorio, y por lo tanto puede ser valiosa en el diagnóstico de alteraciones en el ciclo de la carnitina, en especial en el caso de las alteraciones de la B-oxidación mitocondrial de los ácidos grasos.

Literatura citada

1. MILLINGTON DS, KODO N, NORWOOD DL, ROE CR. Tandem Mass Spectrometry: A New Method for Acylcarnitine Profiling with Potential for Neonatal Screening for Inborn Errors of Metabolism. *J Inher Metab Dis.* 1990; 13:321-324.
2. VAN HOVE JL, ZHANG W, KAHLER SG, ROE CR, CHEN YT, TERADA N, CHACE DH, IAFOLLA AK, DING JH, MILLINGTON DS. Medium chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency: diagnosis by acylcarnitine analysis in Blood. *Am J Hum Gen.* 1993;52;5:958-966.
3. RASHED MS, OZAND PT, BENNET MJ, BARNARD JJ, GOVINDARAZA DR, RINALDO P. Inborn errors of metabolism diagnosed in sudden death cases by acylcarnitine analysis of postmortem bile. *Clinical Chemistry*, 1995;4:1109-1114.
4. RASHED MS, BUCKNALL MP, LITTLE D. Screening blood spots for inborn errors of metabolism by electrospray tandem mass spectrometry with a microplate batch process and a computer algorithm for automated flagging of abnormal profiles. *Clin Chem.* 1997;43:1129-1141.
5. CHACE H, HILLMAN SL, VANHOVE JLK & NAYLOR EW. Rapid diagnosis of MCAD deficiency: Quantitative analysis of octanoylcarnitine and other acylcarnitine in newborn blood spots by tandem mass spectrometry. *Clin Chem.* 1997;43:2106-2113
6. CEDERBLAND G, LINDSTEDT S. A method for the determination of carnitine in the picomole range. *Clin Chem Acta*, 1972;37:235-243.
7. BLAND JM, ALTMAN DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet.* 1986;1:307-310.
8. OSORIO-OROZCO JH & POURFARZAM M. Diagnostic error of mental retardation of neurometabolic origin confirmed by mass sequential spectrometry. *Rev Neurol.* 2000; 30:728-730.
9. KODO N, MILLINGTON DS, NORWOOD DL, ROE CR. Quantative assay of free and total carnitine using tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta.* 1989;186:383-390.
10. VREKEN P, VAN LINT AEM, BOOTSMAN AH, OVERMARS H, WANDERS RJA, VAN GENNIP AH. Quantitative plasma acylcarnitine analysis using electrospray tandem mass spectrometry for the diagnosis of organic acidaemias and fatty acid oxidation defects. *J Inher Metab Dis.* 1999; 22:302-306.
11. STEVENS RD, HILLMAN SL, WORTHY S, SANDERS D, MILLINGTON DS. Assay for free and total carnitine in human plasma using tandem mass spectrometry. *Clin Chem.* 2000; 46:727-729.

