Volume

9

VALTER T. MOTTA

Bioquímica Clínica: Princípios e Interpretações

Enzimas

ENZIMAS

As enzimas são proteínas com propriedades catalisadoras sobre as reações que ocorrem nos sistemas biológicos. Elas tem um elevado grau de especificidade sobre seus substratos acelerando reações específicas sem serem alteradas ou consumidas durante o processo. O estudo das enzimas tem imensa importância clínica. Em algumas doenças as atividades de certas enzimas são medidas, principalmente, no plasma sangüíneo, eritrócitos ou tecidos. Todas as enzimas presentes no corpo humano são sintetizadas intracelularmente. Três casos se destacam:

Enzimas plasma-específicas. Enzimas ativas no plasma utilizadas no mecanismo de coagulação sangüínea e fibrinólise. Ex.: pró-coagulantes: trombina, fator XII, fator X e outros.

Enzimas secretadas. São secretadas geralmente na forma inativa e após ativação atuam em locais extracelulares. Os exemplos mais óbvios são as proteases ou hidrolases produzidas no sistema digestório. Ex.: lipase, α-amilase, tripsinogênio, fosfatase ácida prostática e antígeno prostático específico. Muitas são encontradas no sangue.

Enzimas celulares. Normalmente apresentam baixos teores séricos, mas os níveis aumentam quando são liberadas a partir de tecidos lesados por alguma doença. Isto permite inferir a localização e a natureza das variações patológicas em alguns órgãos, tais como: fígado, pâncreas e miocárdio. A elevação da atividade sérica depende do conteúdo de enzima do tecido envolvido, da extensão e do tipo de necrose. São exemplos de enzimas celulares as transaminases, lactato desidrogenases etc.

As meias-vidas das enzimas teciduais após liberação no plasma apresentam grande variabilidade – nos casos de enzimas medidas com propósitos diagnósticos e prognósticos, podem variar desde algumas horas até semanas. Em condições normais as atividades enzimáticas permanecem constantes, refletindo o equilíbrio entre estes processos. Modificações nos níveis de atividade enzimática ocorrem em situações onde este balanço é alterado.

As elevações na atividade enzimática são devidas:

Aumento na liberação de enzimas para o plasma é conseqüência de:

- *Lesão celular extensa,* as lesões celulares são geralmente causadas por isquemia ou toxinas celulares, por exemplo: na elevação da atividade da isoenzima CK-MB após infarto do miocárdio.

- *Proliferação celular e aumento na renovação celular,* por exemplo: aumentos na fosfatase alcalina pela elevação da atividade osteoblástica durante o crescimento ou restauração óssea após fraturas.

- *Aumento na síntese enzimática,* por exemplo: marcada elevação na atividade da γ-glutamil transferase após a ingestão de álcool.

- *Obstrução de ductos* – afeta as enzimas normalmente encontradas nas secreções exócrinas, por exemplo: a amilase e a lipase no suco pancreático. Estas enzimas podem regurgitar para a corrente circulatória se o ducto pancreático-biliar estiver bloqueado.

Redução da remoção de enzimas do plasma devido à insuficiência renal. Afeta as enzimas excretadas na urina, por exemplo: a amilase pode estar elevada na insuficiência renal.

A redução nos níveis de atividade enzimática são menos comuns e ocorrem na:

- *Síntese enzimática reduzida*, por exemplo: colinesterase baixa na insuficiência hepática severa pela redução do número de hepatócitos.
- *Deficiência congênita de enzimas*, por exemplo: baixa atividade da enzima fosfatase alcalina plasmática na hipofosfatasemia congênita.
- *Variantes enzimáticas inerentes com baixa atividade biológica*, por exemplo, variantes anormais da colinesterase.

A utilidade diagnóstica da medida das enzimas plasmáticas reside no fato que as alterações em suas atividades fornecem indicadores sensíveis de lesão ou proliferação celular. Estas modificações ajudam a detectar e, em alguns casos, localizar a lesão tecidual, monitorar o tratamento e o progresso da doença. No entanto, muitas vezes falta especificidade, isto é, existem dificuldades em relacionar a atividade enzimática aumentada com os tecidos lesados. Isto porque as enzimas não estão confinadas a tecidos ou orgãos específicos, pois estão grandemente distribuídas e suas atividades podem refletir desordens envolvendo vários tecidos.

Na prática, a falta de especificidade é parcialmente superada pela medida de vários parâmetros (que incluem várias enzimas). Como as concentrações relativas das enzimas variam consideravelmente em diferentes tecidos, é possível, pelo menos em parte, identificar a origem de algumas enzimas. Por exemplo, apesar das enzimas transaminases ALT (GTP) e AST (GOT) serem igualmente abundantes no tecido hepático, a AST (GOT) apresenta concentração 20 vezes maior que a ALT (GTP) no músculo cardíaco. A determinação simultânea das duas enzimas fornece uma clara indicação da provável localização da lesão tecidual. A especificidade enzimática pode também ser aumentada pela análise das formas isoenzimáticas de algumas enzimas como na lactato desidrogenase.

A seleção de quais enzimas medir com propósitos diagnósticos e prognósticos depende de vários fatores. As principais enzimas de uso clínico, juntamente com seus tecidos de origem e aplicações clínicas são listadas na tabela 9.1.

Tabela 9.1 Distribuição de algumas enzimas de importância diagnóstica

Enzima	*Principal fonte*	*Principais aplicações clínicas*
Amilase	Glândulas salivares, pâncreas, ovários	Enfermidade pancreática
Aminotransferases (transaminases)	Fígado, músculo esquelético, coração, rim, eritrócitos	Doenças do parênquima hepático, infarto do miocárdio, doença muscular
Antígeno prostático específico	Próstata	Carcinoma de próstata
Creatina quinase	Músculo esquelético, cérebro, coração, músculo liso	Infarto do miocárdio, enfermidades musculares
Fosfatase ácida	Próstata, eritrócitos	Carcinoma da próstata
Fosfatase alcalina	Fígado, osso, mucosa intestinal, placenta, rim	Doenças ósseas, enfermidades hepáticas
γ-Glutamiltransferase	Fígado, rim	Enfermidade hepatobiliar, alcoolismo
Lactato desidrogenase	Coração, fígado, músculo esquelético, eritrócitos, plaquetas, nódulos linfáticos	Infarto do miocárdio, hemólise, doenças do parênquima hepático
Lipase	Pâncreas	Enfermidade pancreática

AMILASE

A amilase é uma enzima da classe das hidrolases que catalisa o desdobramento do amido e glicogênio ingeridos na dieta. O amido é a forma de armazenamento para a glicose nos vegetais, sendo constituído por uma mistura de amilose (amido não-ramificado) e amilopectina (amido ramificado). A estrutura do glicogênio é similar ao da amilopectina, com maior número de ramificações. A α-amilase catalisa a hidrólise das ligações α-l, 4 da amilose, amilopectina e glicogênio, liberando maltose e isomaltose. Não hidrolisa as ligações α-1,6.

A amilase sérica é secretada, fundamentalmente, pelas glândulas salivares (forma S) e células acinares do pâncreas (forma P). É secretada no trato intestinal por meio do ducto pancreático. As glândulas salivares secretam a amilase que inicia a hidrólise do amido presente nos alimentos na boca e esôfago. Esta ação é desativada pelo conteúdo ácido do estômago. No intestino, a ação da amilase pancreática é favorecida pelo meio alcalino presente no duodeno. A atividade amilásica é também encontrada no sêmem, testículos, ovários, tubos de Fallopio, músculo estriado, pulmões e tecido adiposo. A amilase tem massa molecular entre 40.000 e 50.000 daltons sendo, facilmente, filtrada pelo glomérulo renal.

HIPERAMILASEMIA

Pancreatite aguda. Constitui um distúrbio inflamatório agudo do pâncreas associado a edema, intumescência e quantidades variadas de autodisgestão, necrose e, em alguns casos, hemorragia. Os níveis de amilasemia aumentam após 2-12 h do início do episódio de dor abdominal que é constante, intenso e de localização epigástrica com irradiação posterior para o dorso. A atividade amilásica retorna ao normal entre o terceiro e o quarto dia. Os valores máximos são quatro a seis vezes maiores do que os valores de referência e são atingidos entre 12-72 h. A magnitude da elevação *não* se correlaciona com a severidade do envolvimento pancreático. Por outro lado, 20% de todos os casos de pancreatite apresentam amilase normal (ex.: muitas pancreatites associadas com hiperlipemia). Outros testes laboratoriais, como a medida da amilase urinária, depuração da amilase, avaliação das isoenzimas da amilase e a medida da lipase sérica, quando empregados em conjunto com a avaliação da amilasemia, aumentam consideravelmente a especificidade no diagnóstico da pancreatite aguda. Apesar de menor utilidade no diagnóstico da pancreatite, a amilase urinária está freqüentemente aumentada, atingindo valores mais elevados e que persistem por períodos maiores. Além da determinação da amilasemia outros sinais freqüentes são utilizados para avaliar a pancreatite aguda:

- *No momento do diagnóstico:* contagem de leucócitos >16.000/mm^3; glicemia >200 mg/dL; lactato desidrogenase >2 x normal; ALT (GTP) > 6 x normal.

- *Durante as primeiras 48 horas:* diminuição do hematócrito >10%; cálcio sérico <8 mg/dL; pO_2 arterial <60 mm/Hg.

Outras causas de hiperamilasemia pancreática:

- *Complicações da pancreatite aguda,* tais como: pseudocisto complicadas por hemorragia, ascites e efusão pleural.

- *Lesões traumáticas do pâncreas,* incluindo trauma cirúrgico e investigações radiográficas.

- *Carcinoma de pâncreas,* com obstrução dos ductos pancreáticos.

- *Abscesso pancreático,* onde a amilasemia aumenta ocasionalmente.

Hiperamilasemia não-pancreática:

- *Insuficiência renal* por declínio da depuração. Os aumentos são proporcionais à extensão do comprometimento renal.

- *Neoplasias de pulmão e ovário.*
- *Síndrome de Meigs* (associação de ascite, efusão pleural e fibroma de ovário).
- *Lesões das glândulas salivares,* caxumba ou cirurgia maxilofacial.
- *Macroamilasemia,* encontradas em 1-2% da população como resultado da combinação da molécula de amilase com imunoglobulinas (IgA e IgG) ou outras proteínas plasmáticas normais ou anormais para formar um complexo muito grande para ser filtrado pelo glomérulo; neste evento não ocorre amilasúria aumentada e não indica doença.

Hiperamilasemia por desordens de origem complexa. Com mecanismos desconhecidos ou incertos:

- *Doença do trato biliar* como a colecistite aguda com aumentos de até quatro vezes os valores de referência.
- *Eventos intra-abdominais* (não pancreáticos) tais como: úlcera péptica perfurada, obstrução intestinal, infarto mesentérico, peritonite, apendicite aguda, gravidez ectópica rompida, aneurismas aórticos e oclusão mesentérica.
- *Trauma cerebral,* a causa da elevação é incerta, mas pode estar associada com trauma das glândulas salivares e/ou abdominais; isto é, dependente de outros órgãos atingidos.
- *Queimaduras e choques traumáticos.*
- *Hipermilasemia pós-operatória,* ocorre em 20% dos pacientes submetidos a intervenções cirúrgicas – incluindo procedimentos extra-abdominais.
- *Cetoacidose diabética,*a hiperamilasemia está presente em 80% destes pacientes sendo mais freqüente quando os teores de glicemia são >500 mg/dL (a fonte de amilase é incerta).
- *Transplante renal,* um quinto dos transplantados renais apresentam hiperamilasemia.
- *Alcoolismo agudo.*
- *Pneumonia* e *enfermidades não-neoplásicas.*
- *Drogas* (opiatos, heroína) por constrição do esfíncter de Oddi e ductos pancreáticos, com a conseqüente elevação da pressão intraductal, provocando regurgitação da amilase para o soro.

AMILASE URINÁRIA

A hiperamilasúria reflete as elevações séricas da amilase. A atividade da amilase urinária é determinada em amostras de urina de uma hora (nestes casos o paciente deve esvaziar completamente a bexiga e desprezar esta urina; todas as urinas colhidas na hora seguinte são reservadas) ou de 24 horas. Na pancreatite aguda a reabsorção tubular da amilase está reduzida, provavelmente secundária a competição com outras proteínas de baixa massa molecular. A *hiperamilasúria* ocorre também em quase todas as situações que elevam a amilase sérica.

DEPURAÇÃO DA AMILASE

A relação·entre a depuração renal da amilase e a depuração da creatinina é útil no diagnóstico diferencial da pancreatite aguda. Nesta patologia, a depuração renal da amilase é, geralmente, maior do que a depuração da creatinina causando elevação na relação. O mecanismo responsável por este aumento na depuração é, em parte, atribuído a um distúrbio na reabsorção tubular da amilase (e de outras proteínas de baixa massa molecular) na pancreatite aguda. A fórmula empregada para a depuração é:

$$\frac{\text{Amilase na urina (U/dL)} \times \text{creat. no soro (mg/dL)}}{\text{Amilase no soro} \times \text{creat. na urina (mg/dL)}} \times 100 = \%$$

As determinações de amilase e creatinina séricas são realizadas em amostras obtidas ao mesmo tempo da coleta de urina. A comparação das duas depurações permite corrigir as alterações na velocidade de filtração glomerular, condição esta também encontrada na insuficiência renal severa.

Normalmente, os valores da relação variam entre 1 a 4%, enquanto na pancreatite aguda, freqüentemente, estão entre 7 e 15%. No entanto, esta relação não é específica, pois apresenta elevações na cetoacidose diabética, queimaduras extensas, perfuração duodenal, mieloma, circulação extracorpórea e grandes doses intravenosas de corticoesteróides. A relação é normalizada após a atividade da amilase no sangue e urina voltarem aos valores de referência. O cálculo desta relação permite diferenciar a macroamilasemia de outras causas de hiperamilasemia. Em função do tamanho do complexo de macroamilase sua depuração renal é reduzida, fornecendo em valores abaixo de 1%.

Determinação da amilase

Paciente. Não é exigida preparação especial.

Amostra. *Soro* sem hemólise e não-lipêmico. A atividade amilásica necessita de cálcio e cloretos como cofatores. Assim, anticoagulantes quelantes como o citrato, oxalato e EDTA são impróprios para estas amostras. *Urina* colhida no período de 1 h ou no período de 24 h sem conservantes. A amilase é uma enzima bastante estável. No soro e urina (livre de contaminação bacteriana) a amilase é estável por uma semana em temperatura ambiente ou por vários meses sob refrigeração.

Interferentes. *Resultados falsamente aumentados:* ácido aminossalicílico, ácido etacrínico, grandes quantidades de etanol, aspirina, analgésicos narcóticos, anticoncepcionais orais, colinérgicos, contrastes radiográficos, corticoesteróides, pancreozimina, furosemida, rifampina e tiazídicos. *Resultados falsamente reduzidos:* glicose e fluoretos.

Métodos. A amilase é determinada por diferentes métodos. Os principais são: sacarogênicos, amiloclásticos, cromolíticos e técnicas de monitoração contínua.

Amiloclásticos (Iodométricos). A avaliação amiloclástica (iodométrica) está baseada na capacidade do iodo formar cor azul intensa com o amido. Após a ação da amilase sobre um substrato de amido em tempo determinado, a cor azul é medida fornecendo a quantidade de polissacarídio remanescente. O método de Van Loon modificado por Caraway além de empregar um substrato relativamente estável é eficiente e rápido.

Sacarogênicos. Nestes métodos, o substrato de polissacarídio é hidrolizado pela ação da amilase com formação de monossacarídios e dissacarídios. O dissacarídio (maltose) forma glicose pela ação de uma maltase. A quantidade de glicose produzida indica a atividade amilásica. As unidades Somogyi obtidas neste método expressam o número de mg de glicose liberada após incubação. A quantidade de glicose já existente na amostra deve ser considerada ao empregar estes métodos. É bastante empregado em automação.

Ensaios cromolíticos. Utilizam um substrato de amido ligado a um corante, formando um complexo insolúvel. Após a ação da amilase são produzidos pequenos fragmentos de corante-substrato solúveis em água medidos fotometricamente. Este método é facilmente automatizado.

Monitoração contínua. Sistemas enzimáticos-acoplados são empregados para determinar a atividade enzimática por técnica de monitoração contínua na modificação na absorvância do NAD^+ medida em 340 nm.

Outros métodos. Raramente empregados para este propósito são os métodos turbidimétricos, nefelométricos e de polarização fluorescente.

Valores de referência para a amilase	
Soro de adultos	60 a 160 U/dL (Somogyi)
Urina	1500 a 1800 U/d (Somogyi) ou 70-275 U/h
Líquido duodenal	50.000 a 80.000 Ud/L (Somogyi)

Bibliografia consultada

CARAWAY, W.T. A stable starch substrate for the determination of amylase in serum and other body fluids. **Am. J. Clin. Pathol., 32:**97-9, 1959.

VAN LOON, E.J., LIKINS, M.R., SEGER, A. J. Photometric method for blood amylase by use of starch-iodine color. **Am. J. Clin. Path., 22:**1134-6, 1952.

WONG, E.C.C., BUTCH, A. W., ROSENBLUM, J.L. et al. The clinical chemistry laboratory and acute pancreatitis. **Clin. Chem., 39:**234-43, 1993.

LIPASE E TRIPSINA

A lipase é uma enzima altamente específica que catalisa a hidrólise dos ésteres de glicerol de ácidos graxos de cadeia longa (triglicerídios) em presença de sais biliares e um cofator chamado *colipase*. As ligações éster, nos átomos de carbono 1 e 3 são preferentemente rompidas, produzindo dois mol de ácidos graxos de cadeia longa e um mol de 2-acilmonoglicerídio por mol de triglicerídio hidrolizado. Tanto a lipase como a colipase são sintetizadas pelas células acinares do pâncreas. A lipase também é encontrada na mucosa intestinal, leucócitos, células do tecido adiposo, língua e leite.

HIPERLIPASEMIA

A medida da atividade da lipase no soro, plasma, líquido ascítico e pleural, é usada exclusivamente para o diagnóstico de desordens pancreáticas, geralmente, pancreatite aguda. Os níveis de lipase são normais nos casos de envolvimento de glândulas salivares.

Pancreatite aguda. A atividade da lipase aumenta entre 4 a 8 horas, após o início do quadro atingindo o pico máximo em 24 horas. Os valores voltam ao normal entre 8 e 14 dias. Os aumentos da lipase geralmente são paralelos àqueles da amilase, entretanto, tais aumentos podem ocorrer antes ou após as elevações da amilase. Na pancreatite aguda pode-se encontrar normoamilasemia em 20% dos pacientes (em casos de hiperlipemia) mas com hiperlipasemia. A atividade lipásica não é necessariamente proporcional à severidade do ataque.

Complicações da pancreatite aguda. A pancreatite aguda pode produzir *líquido ascítico* ou *líquido pleural*, ou ambos. Acima de 50% dos pacientes com pancreatite aguda severa desenvolvem *pseudocisto,* cuja presença é supeitada quando não há melhora clínica em uma semana após o ataque. Metade dos pacientes com pseudocisto mostram elevações na lipase sérica.

Pancreatite crônica. A lipase sérica também é utilizada no diagnóstico da pancreatite crônica; apesar da destruição das células acinares nos últimos estágios da enfermidade resulta em diminuição na quantidade da enzima na circulação.

Desordens intra-abdominais agudas. As vezes o diagnóstico da pancreatite é dificultado por outras desordens intra-abdominais com achados clínicos similares: *úlceras duodenais* ou *gástricas perfuradas, obstrução intestinal mesentérica* e *colecistite aguda*.

Enfermidade renal aguda ou crônica. Nestes casos o aumento da atividade lipásica não é tão freqüente nem tão pronunciada como a atividade da amilase.

Obstrução do ducto pancreático. A obstrução do ducto pancreático por cálculo ou carcinoma de pâncreas pode elevar a atividade da lipase sérica, dependendo da localização da obstrução e a quantidade de tecido lesado.

DETERMINAÇÃO DA LIPASE

Paciente. Não é exigido cuidados especiais.

Amostra. *Soro* isento de hemólise. É estável por uma semana no refrigerador ou por vários meses a -20 ^{0}C.

Interferentes. *Resultados falsamente aumentados:* codeína, heparina, morfina, betanecol, colangiopan-creatografia retrógrada endoscópica.

Métodos. Essencial para a compreensão da metodologia usada na avaliação da lipase é o fato desta enzima atuar na interface éster-água. Deste modo, os substratos para o ensaio devem ser emulsões. A velocidade de reação aumenta com a

dispersão da emulsão. O emprego de substratos onde a interface éster-água é inapropriada, permite a ação de outras enzimas, tais como: éster carboxílico hidrolase, aril-éster hidrolase e lipase lipoprotéica. Substratos que empregam triglicerídios de ácidos graxos de cadeia curta, também permitem falsas reações lipásicas.

Titulometria. Os primeiros métodos práticos para a medida da lipase empregavam uma emulsão tamponada de azeite de oliva como substrato. O soro a ser testado era incubado por 24 h com o substrato e os ácidos graxos liberados eram titulados com hidróxido de sódio a 0,05 M, usando a fenolftaleína como indicador.

Turbidimetria ou nefelometria. São métodos simples e rápidos que monitoram a redução da turvação de uma emulsão de azeite de oliva como resultado da ação da lipase sobre o substrato.

Enzimáticos. A lipase hidroliza o substrato contendo triglicerídios produzindo glicerol livre que é quantificado por diferentes métodos.

Valores de referência para a lipase	
Adultos	0,1 a 1,0 Ud Cherry-Crandall ou 28 a 280 U/L (internacionais)

TRIPSINA

A tripsina é uma enzima proteolítica produzida no pâncreas, na forma precursora de tripsinogênio inativo. O tripsinogênio é convertido em tripsina no duodeno pela enteroquinase. A ativação do tripsinogênio no duodeno, em lugar de intra-pancreática, evita a autodisgestão proteolítica do pâncreas. A tripsina está presente nas fezes de crianças pequenas, com redução dos teores em crianças maiores e em adultos, em virtude da destruição da tripsina por bactérias intestinais. A ausência de tripsina nas fezes é encontrada em pacientes com insuficiência pancreática, fibrose cística (avançada), má absorção em crianças, e pancreatite (crônica).

Bibliografia consultada

CALBREATH, Donald F., CIULLA, Anna P. **Clinical chemistry.** 2 ed. Philadelphia : Saunders, 1991. 468 p.

CHERRY, I.S., CRANDALL Jr., L. A. The specificity of pancreatic lipase: Its appearance in the blood after pancreatic injury. **Am. J. Physiol., 100:**266-73, 1932.

CLAVIEN, P. A., BURGAN, S., MOOSSA, A. R. Serum enzymes and other laboratory tests in acute pancreatitis. **Br. J. Surg., 76:**1234-43, 1989.

FASSATI, P., PONTI, M., PARIS, P. et al. Kinetic colorimetric assay of lipase in serum. **Clin. Chem, 38:**211-5, 1992.

KAPLAN, Alex, JACK, Rhona, OPHEIM, Kent E., TOIVOLA, Bert, LYON, Andrew W. **Clinical chemistry: interpretation and technoques.** Baltimore : Williams & Wilkins, 1995. 514 p.

KUROOKA, S., KITAMURA, T. Properties of serum lipase in patients with various pancreatic diseases. **J. Biochem., 84:**1459-66, 1978.

REITZ, B., GUIBAULT, G. G. Fluorometric method for measuring serum lipase activity. **Clin. Chem., 21:**1788-90, 1975.

TIETZ, N. W., ASTLES, J.R., SHUEY, D.F. Lipase activity measurement in serum by a continuos-monitoring pH-stat technique - an– update. **Clin. Chem., 35:**1688-93, 1989.

FOSFATASE ALCALINA

A fosfatase alcalina (FA) pertence a um grupo de enzimas relativamente inespecíficas, que catalisam a hidrólise de vários fosfomonoésteres em pH alcalino. O pH ótimo da reação in vitro está ao redor de 10, mas depende da natureza e concentração do substrato empregado.

A fosfatase alcalina está amplamente distribuída nos tecidos humanos, notadamente na mucosa intestinal, fígado (canalículos biliares), túbulos renais, baço, ossos (osteoblastos) e placenta. A forma predominante no soro em adultos normais origina-se, principalmente, do fígado e esqueleto. Apesar da exata função metabólica da enzima ser desconhecida, parece estar associada com o transporte lipídico no intestino e com processos de calcificação óssea.

No fígado, a fosfatase alcalina está localizada na membrana celular que une a borda sinusoidal das células parenquimais aos canalículos biliares. Nos ossos a atividade da fosfatase alcalina está confinada aos osteoblastos onde ocorre a formação óssea.

HIPERFOSFATASEMIA ALCALINA

Obstrução intrahepática. Como a fosfatase alcalina está localizada nas membranas de revestimento dos canalículos biliares, e enzima está elevada nas desordens do trato biliar. Pelo impedimento do fluxo biliar, a FA sérica atinge 2-3 vezes os valores de referência (podendo chegar a 10-15 vezes), dependendo do grau de estase biliar. Estes aumentos são devidos, fundamentalmente, ao: (a) incremento na síntese da enzima, (b) retenção de ácidos biliares no fígado, que solubilizam a fosfatase alcalina e a removem da membrana plasmática dos hepatócitos, e (c) regurgitação da enzima para a circulação pelo impedimento da excreção. As elevações ocorrem em:

- *Lesões expansivas,* carcinoma hepatocelular primário, metástases, abscessos e granuloma.
- *Hepatite viral e cirrose*, apresentam pequenas elevações nos níveis séricos da FA.
- *Outras desordens*, mononucleose infecciosa, colangite e cirrose portal.

Obstrução extrahepática. A atividade eleva 3 a 10 vezes os valores de referência na obstrução parcial ou total do colédoco. Encontrados nos *cálculos biliares* e *câncer de cabeça de pâncreas.*

Enfermidades ósseas. Aumentos na atividade da FA ocorrem em pacientes com doenças ósseas caracterizadas pela hiperatividade osteoblástica.

- *Doença de Paget (osteíte deformante),* como resultado da ação das células osteoblásticas na tentativa de reconstrução óssea que está sendo reabsorvida pela atividade não-controlada dos osteoclastos. A FA atinge de 10 a 25 vezes o limite superor dos valores de referência.
- *Osteomalácia e raquitismo,* apresentam pequenos aumentos (2 a 4 vezes) de FA, que declinam após terapia com vitamina D.
- *Hiperparatireoidismo primário e secundário,* incrementos pequenos de FA refletem a presença e a extensão do envolvimento ósseo.
- *Tumores ósseos osteoblásticos primários ou secundários,* com valores bastante elevados.
- *Fraturas ósseas,* pequenos aumentos de FA.
- *Outras desordens,* pancreatite aguda e crônica, insuficiência renal crônica, septicemia extrahepática, infecções bacterianas intra-abdominais, síndrome de Fanconi, tirotoxicose e hiperfosfatemia transiente benigna em crianças. Algumas drogas como: cloropromazina, estrogênios e progesterona.

Gravidez. Aumentos da FA de 2-3 vezes são observados no terceiro trimestre de gravidez; a enzima adicional é de origem placentária. Aumentos ou reduções inexplicáveis da FA, predizem complicações na gravidez, tais como, *hipertensão* ou *pré-eclampsia*.

ISOENZIMAS DA FOSFATASE ALCALINA

As principais isoenzimas da fosfatase alcalina encontradas no soro são provenientes do *fígado*, *ossos*, *intestino* e *placenta*. Apresentam considerável heterogeneidade inter e intratecidual, sendo seu estudo um indicativo da origem da elevação. Podem também ser encontradas outras isoenzimas patológicas, como a de Regan e Nagao, presentes em processos neoplásticos. Os métodos empregados na separação estão baseados nas propriedades físicas e químicas das isoenzimas: inibição química, técnicas imunológicas, eletroforese e inativação térmica.

DETERMINAÇÃO DA FOSFATASE ALCALINA

Paciente. Deve permanecer em jejum por 8 h antes da coleta.

Amostra. Soro ou plasma heparinizado. Evitar hemólise, pois os eritrócitos contém, aproximadamente, seis vezes mais fosfatase alcalina que o soro. O ensaio deve ser realizado logo que possível após a coleta; em algumas horas a fosfatase aumenta de 3 a 10% a 25 ^{0}C. Os valores podem estar 25% mais elevados após a ingestão de refeição rica em gorduras.

Interferências. *Resultados falsamente elevados:* são encontrados em pacientes submetidos a tratamento com paracetamol, aspirina, agentes antifúngicos, barbitúricos, difenilhidantoína, morfina, anti-concepcionais orais e tiazidas.

Métodos. Como o substrato natural da fosfatase alcalina é desconhecido, foram propostas várias substâncias que o substituem na avaliação da atividade desta enzima. Deste modo, várias metodologias foram propostas com o emprego de diferentes substratos.

b-Glicerofosfato. Os primeiros ensaios publicados quantificavam a liberação do fosfato inorgânico do substrato β-glicerolfosfato, após a ação da enzima presente na amostra. Estes métodos foram abandonados pela pouca sensibilidade e prolongado período de incubação.

p-Nitrofenilfosfato. A atividade da enzima é medida pela quantidade de fenol liberado do *p*-nitrofenilfosfato após incubação com o soro, posteriormente avaliado por diferentes métodos.

4-Nitrofenilfosfato. É o substrato mais usado atualmente na avaliação da fosfatase alcalina. É medido o produto liberado após a hidrólise, o 4-nitrofenóxido que é proporcional à atividade da fosfatase alcalina. A modificação proposta por Bowers e McComb é a mais empregada atualmente.

a-Naftol monofosfato. Mede a velocidade de formação de α-naftol a 340 nm após incubação.

Valores de referência para a fosfatase alcalina (4-nitrofenilfosfato – Bowers)	
Adultos	20 a 105 U/L
Crianças de 0 a 3 meses	70 a 220 U/L
Crianças de 3 meses a 10 anos	60 a 150 U/L
Jovens de 10 a 15 anos	60 a 260 U/L

Bibliografia consultada

BELFIELD, A., GOLDBERG, D. M. Inhibition of the nucleotidase effect os alkaline phosphatase by β-glycerophosphate. **Nature, 291:**73-5, 1968.

BOWERS Jr., G.N., McCOMB, R.B. Measurement of total alkaline phosphatase activity in human serum. **Clin. Chem., 26:**1988-95, 1975.

KOAY, Evelyn S. C., WALMSLEY, Noel. **A primer of chemical pathology.** Singapore : World Scientific, 1996. 396 p.

POSEN, S., DOHERTY, E. Serum alkaline phosphatase in clinical medicine. **Adv. Clin. Chem., 22:**163-245, 1981.

PRICE, C. P. Multiple forms of human serum alkaline phosphatase: detection and quantitation. **Ann. Clin. Biochem., 30:**355-72, 1993.

FOSFATASE ÁCIDA TOTAL E FRAÇÃO PROSTÁTICA

O termo fosfatase ácida (FAC) designa um grupo heterogênio não-específico de fosfatases que exibem pH ótimo entre 4,5 e 7, e catalisam a hidrólise de monoéster ortofosfórico produzindo um álcool e um grupo fosfato. A fosfatase ácida é amplamente distribuída nos tecidos. A maior atividade é encontrada na glândula prostática (1000 vezes maior que em outros tecidos), células osteoblásticas do osso, fígado, baço, rins, eritrócitos e plaquetas. Em homens adultos, a próstata contribui com quase a metade da enzima presente no soro.

Em indivíduos do sexo masculino, a fração prostática representa em torno de 50% da fosfatase ácida total, sendo o restante proveniente do fígado e de desintegração das plaquetas e eritrócitos. Para o sexo feminino é proveniente do fígado, eritrócitos e plaquetas. Os níveis de fosfatase ácida no soro apresentam importância clínica no diagnóstico e monitorização do câncer prostático, em especial pelo emprego da *fração prostática da fosfatase (FACP).*

HIPERFOSFATESEMIA ÁCIDA

Carcinoma prostático. A principal finalidade da determinação da fosfatase ácida prostática é o diagnóstico e a monitorização do câncer prostático, particularmente, da forma metastisada. O carcinoma prostático atinge principalmente homens acima de 50 anos e é classificado em quatro estágios A, B, C e D (ver tabela 4.2) com relação também as elevações do *antígeno prostático específico* (Ver marcadores tumorais). As elevações da FAC prostática são encontradas ao redor de 60% dos homens com câncer metastático da próstata (estágio D). No entanto, enquando o câncer permanece localizado na glândula são encontrados valores normais ou levemente aumentados da atividade da enzima.

Hipertrofia prostática benigna (HPB). É uma ocorrência relativamente comum em homens acima de 40 anos. O aumento da atividade é possível pela regurgitação da enzima no soro por compressão ou obstrução do sistema ductal prostático como resultado da hipertrofia glandular. O diagnóstico é realizado através de questionários de sintomas, toque retal, dosagem de PSA, fluxometria e estudo de fluxo de pressão. A etiopatogenia da HPB ainda não está adequadamente esclarecida.

Após cirurgia ou terapia anti-androgênica. Os níveis vagarosamente retornam ao normal ou com o subseqüente aumento caso o tratamento não tenha obtido sucesso.

Palpação retal. A fosfatase ácida prostática no soro, raramente eleva após a palpação. Entretanto, elevações transitórias podem ocorrer após biópsia da próstata, cistoscopia, infarto prostático (causado pelo ato de cateterização) e a bastante rara, ruptura de cisto prostático.

Outros aumentos da fosfatase ácida total. Pequenas a moderadas elevações são encontradas, freqüentemente, nas enfermidades ósseas associadas aos osteoclastos: enfermidade de Paget (avançada), hiperparatireoidismo com envolvimento esquelético, invasão maligna do câncer de seio, anemia hemolítica, anemia megaloblástica, mononucleose, prostatite, policitemia vera, leucemia mielocítica (e outras enfermidades hematológicas), mieloma múltiplo, enfermidade de Niemann-Pick e enfermidade de Gaucher (deficiência da enzima glicerocerebrosidase).

DETERMINAÇÃO DA FOSFATASE ÁCIDA

Paciente. Não é exigido preparo especial.

Amostra. *Soro* ou *plasma heparinizado* isento de hemólise e não lipêmicos. Separar o soro ou plasma dos eritrócitos logo que possível. A enzima é estabilizada na amostra por acidificação (pH ao redor de 5,4). Isto é conseguido pela adição de 50 µL de ácido acético 5 mol/L (alternati-

vamente, juntar 10 mg de citrato dissódico monoidrato por mL de soro). Nestas condições a atividade enzimática é mantida por várias horas em temperatura ambiente ou por uma semana no refrigerador.

Interferentes. *Resultados falsamente aumentados:* clofibrato. *Resultados falsamente reduzidos:* etanol e estrogênio-terapia para o carcinoma de próstata.

Métodos. Vários métodos foram desenvolvidos para avaliar a atividade da fosfatase ácida. Devido a importância da detectação do carcinoma prostático antes de metastizar, esforços tem sido realizados no aumento da sensibilidade e especificidade das medidas da enzima.

Primeiros métodos. Historicamente, muitos dos ensaios desenvolvidos para medir a atividade da fosfatase alcalina foram adaptados para a fosfatase ácida utilizando os mesmos substratos mas utilizando um tampão ácido.

O emprego do fenilfosfato em pH 4,9 é uma modificação do método de King-Armstrong para a fosfatase alcalina. Outras adaptações foram realizadas com o β-glicerolfosfato ou 4-nitrofenilfosfato.

Timolftaleína monofosfato. É um substrato auto-indicador com alto grau de especificidade para a FACP. A timolftaleína liberada após a ação da fosfatase, desenvolve cor em meio alcalino. Fosfatases ácidas provenientes de outros tecidos, reagem em grau bem menor com este substrato. Este método é freqüentemente usado.

Inibição pelo L-tartarato. A inibição química diferencia a fração prostática pelo uso de L-tartarato. A fosfatase ácida total é determinada por métodos correntes (são utilizados o 4-nitrofosfato ou α-naftil fosfato como substrato) e, em seguida, a fração prostática é inibida pelo L-tartarato com nova determinação da fosfatase ácida. A fração prostática é calculada pela diferença entre as duas determinações. Esta medida não é totalmente específica para a FACP já que outras isoenzimas mostram diferentes graus de inibição pelo L-tartarato.

α-Naftol fosfato. Os métodos que empregam o α-naftol fosfato como substrato liberam o naftol – pela ação da fosfastase ácida – que reage com o Fast Red TR para formar um produto colorido. Pouco usado atualmente.

Enzima imunoensaio. Os métodos imunológicos estão ganhando força, principalmente na automação, por sua especificidade para a FACP. Um anticorpo monoclonal ligado a um suporte sólido une-se a FAC prostática. Um segundo anticorpo conjugado a uma enzima (ALP ou peroxidase) liga-se a fosfatase ácida prostática; a atividade da enzima ligada é proporcional aos teores de FACP.

Outros métodos. Radioimunoensaio, cinética fluoremétrica.

Valores de referência para a fosfastase ácida prostática (Roy)	
Adultos	0,5 a 1,9 U/L

Bibliografia consultada

BODANSKY, O. Acid phosphatase. **Adv. Clin. Chem., 15:**44-136, 1972.

CATALONA, W. J., SMITH, D. S., RATLIFF, T. L. et al. Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. **N. Engl. J. Med., 324:**1156-61, 1991.

CHAN, D. W. AND SOKOLL L. J. **Prostate-specific Antigen: Advances and Challenges.** Clin Chem. **45:**755-756, 1999.

EWEN, L. M., SPITZER, R. W. Improved determination of prostatic acid phosphatase (sodium thymolphthalein monophsopahte substrate). **Clin. Chem., 22:**627-32, 1976.

MAYNE, Philip D., DAY, Andrew P. **Workbook of clinical chemistry: case presentation and data interpretation.** New York : Oxford University Press, 1994. 208 p.

ROY, A. V., BROWER, M.E. HAYDEN, J.E. Sodium thymolphthalein monophosphato: A new acid phosphatase substrate with greater specificity for the prostatic anzyme in serum. **Clin. Chem., 17:**1093-102, 1971.

TOWNSEND, R. M. Enzyme tests in disease of the prostate. **Ann. Clin. Lab. Sci., 7:**254-61, 1977.

Tabela 9.2. Classificação clínica do câncer prostático

Grau clínico	*Descrição, histologia e resultados do exame digital retal e outros exames*	*Freqüência da elevação da fosfatase ácida prostática*	*Freqüência de elevação do PSA*
A_1	Microscópico, não palpável clinicamente com focos menores do que 5% do tecido examinado	11%	67%
A_2	Microscópico, não palpável clinicamente; com muitas áreas de mais de5%		
B_1	Palpável, tumor macroscópico ≤1,5 cm de diâmetro em um único lobo	22%	73%
B_2	Palpável, tumor macroscópico >1,5 cm de diâmetro ou vários nódulos em ambos os lobos		
C_1	Tumor com extensão extracapsular mas ainda clinicamente localizado, palpável, estendendo-se até a vesícula seminal mas ainda não fixado à parede pélvica	39%	80%
C_2	Tumor com extensão extracapsular mas ainda clinicamente localizado, palpável estendendo-se na vesícula seminal mas fixado na parede pélvica		
D_1	Tumor metastático demonstrável limitado três nódulos pélvicos ou menos	58%	88%
D_2	Tumor metastático demonstrável com nódulos mais extensos ou metástase extrapélvica (ex.: aos ossos)		

AMINOTRANSFERASES (TRANSAMINASES)

As enzimas aspartato aminotransferase, AST (transaminase glutâmica-oxalacética, GOT) e alanina aminotransferase, ALT (transaminase glutâmica-pinúvica, GPT) catalisam a transferência reversível dos grupos amino de um aminoácido para o α-cetoglutarato, formando cetoácido e ácido glutâmico. Estas reações requerem piridoxal fosfato como coenzima:

Aspartato + α-cetoglutarato ⇆ oxalacetato + ácido glutâmico
Alanina + α-cetoglutarato ⇆ piruvato + ácido glutâmico

As reações catalisadas pelas aminotransferases (transaminases) exercem papéis centrais tanto na síntese como na degradação de aminoácidos. Além disso, como estas reações envolvem a interconversão dos aminoácidos a piruvato ou ácidos dicarboxílicos, atuam como uma ponte entre o metabolismo dos aminoácidos e carboidratos.

As aminotransferases estão amplamente distribuídas nos tecidos humanos. As atividades mais elevadas de AST (GOT) encontram-se no miocárdio, fígado, músculo esquelético, com pequenas quantidades nos rins, pâncreas, baço, cérebro, pulmões e eritrócitos.

AUMENTOS DAS AMINOTRANSFERASES

Desordens hepatocelulares. A AST (GOT) e a ALT (TGP) são enzimas intracelulares presentes em grandes quantidades no citoplasma dos hepatócitos. Lesões ou destruição das células hepáticas liberam estas enzimas para a circulação. A ALT (GPT) é encontrada principalmente no citoplasma do hepatócito, enquanto 80% da AST(GOT) está presente na mitocôndria. Esta diferença tem auxiliado no diagnóstico e prognóstico de doenças hepáticas. Em dano hepatocelular leve a forma predominante no soro é citoplasmática, enquanto em lesões graves há liberação da enzima mitocondrial, elevando a relação AST/ALT.

- *Hepatite aguda.* Os níveis de aminotransferases séricas elevam-se uma a duas semanas antes do início dos sintomas. Os aumentos podem atingir até 100 vezes os limites superiores dos valores de referência, apesar de níveis entre 20 e 50 vezes, serem os mais encontrados. As atividades máximas ocorrem entre o 7 e 12^0 dia; declinando entre a terceira e quinta semana, logo após o desaparecimento dos sintomas. Na fase aguda da hepatite viral ou tóxica, a ALT (GPT), geralmente, apresenta atividade maior que a AST (GOT). A relação AST/ALT é menor que 1. Geralmente, se encontram hiperbilirrubinemia e bilirrubinúria com pequena elevação dos teores séricos da fosfatase alcalina.

- *Cirrose hepática.* São detectados níveis até cinco vezes os limites superiores dos valores de referência, dependendo das condições do progresso da destruição celular; nestes casos, a atividade da AST (GOT) é maior que a ALT (GTP). A disfunção hepatocelular provoca a síntese prejudicada da albumina, além do prolongamento do tempo de protrombina, hiperbilirrubinemia, teores de amônia elevadas e uremia baixa. Aumentos das aminotransferases semelhantes aos encontrados na cirrose, são freqüentes na colestase extrahepática, carcinoma de fígado, após ingestão de álcool, durante o "delirium tremens" e após administração de certas drogas, tais como, opiatos, salicilatos ou ampicilina. A relação AST/ALT freqüentemente é maior que 1.

- *Mononucleose infecciosa.* Pode ocorrer elevações de até 20 vezes os valores de referência, com o envolvimento hepático.

- *Colestase extra-hepática aguda.* Entre as várias causas estão: retenção de cálculos biliares, carcinoma de cabeça de pâncreas e tumor dos ductos biliares.

Infarto do miocárdio. Ao redor de 6 a 8 horas após o infarto do miocárdio, a atividade sérica da AST (GOT) começa a elevar, atingindo o pico

máximo (20 a 200 U/mL) entre 18 e 24 horas e, progressivamente, retornando aos valores de referência ao redor do 5^0 dia. A AST (GOT) *não* altera na angina pectoris, pericardite e enfermidade vascular miocárdica.

Distrofia muscular progressiva e dermatomiosite. Elevações de 4-8 vezes da AST (GOT) e, ocasionalmente, da ALT (GPT), são encontrados. Em geral, estão normais em outras enfermidades musculares, especialmente as de origem neurogênica.

Embolia pulmonar. Aumento de 2-3 vezes o normal.

Pancreatite aguda. Provoca aumentos moderados de duas a cinco vezes o normal.

Insuficiência cardíaca congestiva. Os níveis de AST podem estar aumentados em graus de leve a moderado, provavelmente, refletindo a necrose hepática secundária ao suprimento sangüíneo inadequado do fígado.

Outras desordens. A AST (GOT) apresenta pequenos aumentos na gangrena, esmagamento muscular, enfermidade hemolíticas, distrofia muscular progressiva, dermatomiosite, colangite (inflamação dos ductos biliares) e infecção por parasitas.

DETERMINAÇÃO DAS TRANSAMINASES

Paciente: Não necessita cuidados especiais.

Amostra. *Soro* isento de hemólise, pois a atividade das aminotransferases é maior nos eritrócitos. A atividade da enzima permanece inalterada por 24 horas em temperatura ambiente e mais de uma semana sob refrigeração.

Interferentes. *Valores falsamente aumentados:* paracetamol, ampicilina, agentes anestésicos, cloranfenicol, codeína, cumarínicos, difenilhidantoína, etanol, isoniazida, morfina, anticoncepcionais orais, sulfonamidas e tiazidas.

Métodos. Alguns métodos utilizados para a determinação da atividade das aminotransferases baseiam-se na formação de cor entre o piruvato ou oxaloacetato e a dinitrofenilhidrazina para formar as hidrazonas correspondentes. A alcalinização da mistura desenvolve cor proporcional à conversão dos cetoácidos à hidroxiácidos. A dinitrofenilhidrazina também reage com o α-cetoglutarato provocando interferências. Estes métodos são obsoletos.

Monitorização contínua. O piruvato ou oxaloacetato formados pela ação das aminotransferases são acoplados a uma segunda reação onde o piruvato (pela ação da ALT) ou oxaloacetato (pela ação da AST) são reduzidos pela NADH em reação catalisada pela lactato desidrogenase (para a ALT) ou malato desidrogenase (para a AST). A transformação da NADH por oxidação à NAD^+ é monitorada em 340 nm. É adicionado piridoxal 5'-fosfato para suplementar o teor de coenzima no soro e assim desenvolver atividade máxima. Este princípio é utilizado na tecnologia de química seca (*DT Vitros*).

Valores de referência a 37 °C (U/L)	
AST (GOT):	5 a 34
ALT (GTP):	6 a 37

Bibliografia consultada

BRUNS, D., SAVORY, J., TITHERADGE, A. et al. Evaluation of the IFCC-recommended procedure for serum aspartate aminotransferase as modified for use with the centrifugal analyzer. **Clin. Chem., 27:**156-9, 1981.

COHEN, J. A., KAPLAN, M. M. The SGOT/SGPT ratio na indicador of alcoholic liver disease. **Dig. Dis. Sci., 24:**835-8, 1979.

KARMEN, S. A note on the spectrophotometric assay of glutamic-oxalacetic transaminase in human bloodserum. **J. Clin. Invest., 34:**131-3, 1955.

REITMAN, S., FRANKEL, S.A. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic piruvic transaminases. **Am. J. Clin. Path., 28:**57-63, 1957.

GAMA-GLUTAMILTRANSFERASE

A γ-glutamiltransferase (γ-GT) catalisa a transferência de um grupo γ-glutamil de um peptídio para outro peptídio ou para um aminoácido produzindo aminoácidos γ-glutamil e cistenilglicina. Está envolvida no transporte de aminoácidos e peptídios através das membranas celulares, na síntese protéica e na regulação dos níveis de glutatião tecidual. A γ-GT é encontrada no fígado, rim, intestino, próstata, pâncreas, cérebro e coração.

AUMENTOS NA ATIVIDADE DA γ-GT

Apesar da atividade enzimática ser maior no rim, a enzima presente no soro é de origem, principalmente, do sistema hepatobiliar. No fígado, a γ-GT está localizada nos canalículos das células hepáticas e, particularmente, nas células epiteliais que revestem os ductos biliares. Deste modo, o principal valor clínico na avaliação da γ-GT é no estudo das desordens hepatobiliares. O grau de elevação é útil no diagnóstico diferencial entre as desordens hepáticas e do trato biliar.

Obstrução intra-hepática e extra-hepática. São observados os maiores aumentos (5-30 vezes os limites superiores dos valores de referência) nas colestases do trato biliar – processo patológico primário da cirrose biliar, colestase intra-hepática e obstrução biliar extra-hepática. A γ-GT é mais sensível e duradoura que a fosfatase alcalina, as transaminases e a nucleotidase, na detectação de *icterícia obstrutiva*, *colangite* e *colecistite*. Além disso, a γ-GT é útil na diferenciação da fonte de elevação da fosfatase alcalina – a γ-GT apresenta valores normais nas desordens ósseas e durante a gravidez. A γ-GT é particularmente importante na avaliação do envolvimento hepatobiliar em adolescentes, pois a atividade da fosfatase alcalina está elevada durante o crescimento ósseo.

Nas doenças hepatocelulares incluem também a elevação das transaminases, bilirrubinas, tempo de protrombina prolongado e hipoalbuminemia.

Enfermidades hepáticas induzidas pelo álcool. A liberação da γ-GT no soro reflete os efeitos tóxicos do álcool e drogas (ex.: fenitoína) sobre as estruturas microssomiais das células hepáticas. A γ-GT é um indicador do alcoolismo, particularmente, da forma oculta. Em geral, as elevações enzimáticas nos alcoólatras variam entre 2-3 vezes os valores de referência. Por outro lado, a ingestão de álcool em ocasiões sociais não aumenta, significativamente, a γ-GT. Estes ensaios são úteis no acompanhamento dos efeitos da abstenção do álcool. Nestes casos, os níveis voltam aos valores de referência em duas ou três semanas, mas podem elevar novamente se o uso do álcool é retomado. Em vista da susceptibilidade da indução enzimática, a interpretação da γ-GT em qualquer caso, deve ser realizada à luz dos efeitos de drogas e álcool. O diagnóstico do uso de álcool pode ser complementado pelos seguintes testes:

- *Volume celular médio (VCM) dos eritrócitos*. O valor diagnóstico da γ-GT é aumentado quando a macrocitose é encontrada pela medida do VCM.

- *Tranferrina deficiente em carboidratos (CDT)*. Em pacientes com doença induzida pelo álcool, a transferrina plasmática tem um reduzido conteúdo de carboidratos (ácido siálico). O teor de CDT plasmático está aumentado em, aproximadamente, 90% dos pacientes que ingerem mais de 60 g de álcool por dia.

- *Etanol sangüíneo*.

Hepatite infeciosa. Aumentos de 2 a 5 vezes os valores de referência; nestes casos a determinação das aminotranferases (transaminases) é de maior utilidade.

Neoplasmas. Primários ou secundários apresentam atividade da γ-GT mais intensa e mais precoce que outras enzimas hepáticas.

Esteatose hepática (fígado gorduroso). É a mais comum das hepatopatias alcoólicas, mas também é descrita em outros quadros, como: hepatites medicamentosas, gestação, nutrição parenteral, corticoterapia, diabetes e nas desnutrições protéicas. Pequenos aumentos (2 a 5 vezes o valor superior de referência) ocorrem pela indução das enzimas microssomiais pelo álcool. Nas outras condições os aumentos são menores.

Drogas. A γ-GT está presente em grandes quantidades no retículo endoplasmático liso e, portanto, susceptível a indução de aumento da sua atividade por drogas, tais como a fenitoína, warfarina e fenobarbital. Nestes casos, as elevações atingem níveis 4 vezes maiores que os limites superiores dos valores de referência.

Fibrose cística (mucoviscidose). Elevam a γ-GT por complicações hepáticas decorrentes.

Câncer prostático. São encontrados níveis moderadamente elevados. Outros tipos de câncer com metástase hepática também provocam aumentos da enzima.

Outras condições. Lupus eritematoso sistêmico e hipertireoidismo.

Atividade normal da enzima é encontrada em enfermidades ósseas (enfermidade de Paget, neoplasma ósseo), em crianças acima de um ano e em mulheres grávidas saudáveis – condições em que a fosfatase alcalina está aumentada. Apesar da γ-GT ser encontrada no pâncreas e rins, a enzima não eleva em desordens nestes órgãos a menos que exista envolvimento hepático.

Determinação da g-GT

Paciente. Deve permanecer em jejum por 8 horas, à exceção da ingestão de água. Além disso, não deve ingerir álcool durante 24 horas antes da prova.

Amostra. *Soro sangüíneo.* Estável por uma semana em temperatura ambiente. Quando congelada é estável por 3 meses.

Métodos. Os primerios métodos de análise da γ-GT empregavam o glutatião como substrato. O desaparecimento do substrato ou a formação de produto era detectada por cromatografia, manometria ou absorvância em UV.

g-Glutamil-p-nitroanilina. O substrato mais usado para a análise da γ-GT é a γ-glutamil-*p*-nitroanilida. O resíduo γ-glutamil do substrato doador é transferido para a glicilglicina, liberando a *p*-nitroanilina, um produto cromogênico com absorvância em 405-420 nm. Esta reação tanto pode ser usada como método de monitorização contínua como de ponto final. Em química seca (*DT Vitros*) a alteração de reflexo é empregada para calcular a atividade da enzima.

Interferências. *Resultados falsamente elevados:* fenitoína, fenobarbital, glutemidina e metaqualona.

Valores de referência (U/L)	
Homens:	5 a 25
Mulheres	8 a 40

Bibliografia consultada

BERTELLI, M. S., CONCI, F. M. **Álcool e fígado.** Caxias do Sul : EDUCS, 1997. 219 p.

Committtee on Enzymes of the Scandinavian Society for Clinical Chemistry and Clinical Physiology: Recommended method for the determination of γ-glutamyl transferase in blood. **Scand. J. Clin. Lab. Invest., 36:**119-25, 1976.

IFCC Expert Panel on Enzymes: IFCC methods for the measurement of the catalytic concentration of enzymes. IV: IFCC method for γ-glutamil transferase. **J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 21:**633-46, 1983.

LONDON, J. W., SHAW, L. M., THEODORSEN, L., STROME, J. H. Application of response surface methodology to the assay of gamma-glutamyltransferase. **Clin. Chem., 28:**1140-3, 1982.

ROSALKI, S. B. Gamma-glutamyl transpeptidase. **Adv. Clin. Chem., 17:**53-107, 1975.

SMITH, A. F., BECKETT, G. J., WALKER, S. W., ERA, P. W. H. **Clinical biochemistry.** 6 ed. London : Blackwell Science, 1998. p. 110-123.

SZASZ, G. A kinetic photometric method for serum gamma-glutamyl transpeptidase. **Clin. Chem., 15:**124-36, 1969.

LACTATO DESIDROGENASE

A lactato desidrogenase (LD) é uma enzima da classe das *oxidorredutases* que catalisa a oxidação reversível do lactato a piruvato, em presença da coenzima NAD^+ que atua como doador ou aceptor de hidrogênio.

$$\text{Lactato} + NAD^+ + \leftrightarrows \text{Piruvato} + NADH^+ + H^+$$

A LD está presente no citoplasma de todas as células do organismo. Sendo rica no miocárdio, fígado, músculo esquelético, rim e eritrócitos. Os níveis teciduais de LD são, aproximadamente, 500 vezes maiores do que os encontrados no soro e lesões naqueles tecidos provocam elevações plasmáticas significantes desta enzima.

ISOENZIMAS DA LACTATO DESIDROGENASE

Devido a presença da lactato desidrogenase em vários tecidos, aumentos dos teores séricos da mesma é um achado inespecífico. É possível obter informações de maior significado clínico pela separação da LD em suas cinco frações isoenzimáticas. As isoenzimas de LD são designadas de acordo com sua mobilidade eletroforética. Cada isoenzima é um tetrâmero formado por quatro subunidades chamadas H para a cadeia polipeptídica cardíaca e M para a cadeia polipeptídica muscular esquelética. As cinco isoenzimas encontrados no soro são:

Tipo	Percentagem	Localização
LD-1 (HHHH)	14-26	Miocárdio e eritrócitos
LD-2 (HHHM)	29-39	Miocárdio e eritrócitos
LD-3 (HHMM)	20-26	Pulmão, linfócitos, baço, pâncreas
LD-4 (HMMM)	8-16	Fígado, músc. esquelético
LD-5 (MMMM)	6-16	Fígado, músc. esquelético

A hemólise produzida durante a coleta e/ou manipulação de sangue, eleva as frações LD-1 e LD-2.

AUMENTOS NA ATIVIDADE DA LD

Infarto agudo do miocárdio. A LD no soro aumenta 8 a 12 horas após o infarto do miocárdio, atingindo o pico máximo entre 24-48 horas; estes valores permanecem aumentados por 7 a 12 dias (v. adiante).

Insuficiência cardíaca congestiva, miocardite, choque ou insuficiência circulatória. A LD eleva mais do que 5 vezes os valores de referência.

Anemia megaloblástica. A deficiência de folato ou vitamina B_{12} provoca destruição das células precursoras dos eritrócitos na medula óssea e aumenta, em até 50 vezes, a atividade da enzima sérica por conta das isoenzimas LD-1 e LD-2 que voltam ao normal após o tratamento.

Válvula cardíaca artificial. É uma causa de hemólise que eleva as frações LD-1 e LD-2.

Enfermidade hepática. Os aumentos não são tão efetivos como os das transaminases (aminotransferases):

- *Hepatite infecciosa tóxica com icterícia*, provoca aumento de até 10 vezes os valores de referência.
- *Hepatite viral, cirrose e icterícia obstrutiva*, apresentam níveis levemente aumentados: uma ou duas vezes os valores superiores de referência.

Mononucleose infeciosa. Os teores séricos da LD são geralmente altos, talvez porque a LD seja liberada dos agregados das células mononucleares imaturas do organismo.

Enfermidade renal. Especialmente *necrose tubular* e *pielonefrite*. Entretanto estes aumentos

não estão correlacionados com a proteinúria e outros parâmetros da enfermidade renal.

Doenças malignas. Mostram incrementos da LD no soro, especialmente aquelas com metástases hepáticas. Elevações importantes são encontradas na *enfermidade de Hodgkin*, *câncer abdominal* e *pulmonar*.

Distrofia muscular progressiva. Aumentos moderados especialmente nos estágios iniciais e médios da doença: eleva a fração LD-5.

Trauma muscular e exercícios muito intensos. Eleva principalmente a LD-5, dependendo da extensão do trauma.

Embolia pulmonar. A isoenzima LD-3 está elevada provavelmente pela grande destruição de plaquetas após a formação do êmbolo.

Pneumocistose. Em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência adquirida. Esta suspeita deve ser confirmada através dos caracteres clínicos e dos níveis de hipoxemia dos gases arteriais.

CORRELAÇÃO CLÍNICA DAS ISOENZIMAS DA LD

As isoenzimas apresentam alterações em várias enfermidades que refletem a natureza dos tecidos envolvidos.

Aumentos da LD-3 ocorrem com freqüência em pacientes com vários tipos de carcinomas.

As isoenzimas LD-4 e LD-5 são encontradas, fundamentalmente, no fígado e músculo esquelético, com o predomínio da fração LD-5. Assim sendo, os níveis LD-5 são úteis na detectação de desordens hepáticas – particularmente, distúrbios intra-hepáticos – e desordens do músculo esquelético, como a distrofia muscular. Na suspeita de enfermidade hepática, com LD total muito aumentada e quadro isoenzimático não-específico, existe grande possibilidade da presença de câncer.

A LD pode formar complexos com imunoglobulinas e revelar bandas atípicas na eletroforese. O complexo com a IgA e IgG, geralmente migra entre a LD-3 e LD-4. Este complexo macromolecular não está associado a nenhuma anormalidade clínica específica.

No infarto do miocárdio tem-se os níveis da fração LD-1 e LD-2 aumentados, as isoenzimas das quais o miocárdio é particularmente rico (ver adiante).

Além do lactato, a LD pode atuar sobre outros substratos, tais como o α-hidroxibutirato. A subunidade H tem afinidade maior pelo α-hidroxibutirato do que as subunidades M. Isto permite o uso deste substrato na medida da atividade da LD-l e LD-2, que consistem quase inteiramente de subunidades H. Este ensaio é conhecido como a medida da atividade da *α-hidroxibutirato desidrogenase* (α-HBD).

A α-HBD não é uma enzima distinta, é, isto sim, representante da atividade da LD-1 e LD-2. A atividade da α-HDB está aumentada naquelas condições em que as frações LD-1 e LD-2 estão elevadas. No infarto do miocárdio, a atividade da α-HBD é muito similar aquela da LD-l.

Foi proposto o cálculo da relação LD/α-HBD que, em adultos varia entre 1,2 a 1,6. Nas *enfermidades hepáticas parenquimais*, a relação se situa entre 1,6 a 2,5. No *infarto do miocárdio*, com aumento da LD-1 e LD-2 a relação diminui para 0,8 a 1,2.

LACTATO DESIDROGENASE NA URINA

Elevações da atividade da LD na urina de três a seis vezes os valores de referência estão associadas com *glomerulonefrite crônica, lupus eritematoso sistêmico, nefroesclerose diabética* e *câncer de bexiga e rim*. A determinação da LD na urina é afetada pela presença de inibidores como a uréia e pequenos peptídios e de possíveis inativações da enzima sob condições de pH adversos na urina.

LACTATO DESIDROGENASE NO LCR

Em condições normais a atividade da LD no líquido cefalorraquidiano (LCR) é bem menor do que a encontrada no soro sangüíneo. A distribuição isoenzimática é $LD_1 > LD_3 > LD_2 > LD_4 > LD_5$. No entanto, estes valores podem aumentar e/ou modi-

ficar em presença de hemorragia ou lesão na barreira cerebral sangüínea provocada por enfermidades que adicionam LD de origem sistêmica ao LCR. Além disso, as isoenzimas da LD são liberadas das células que se infiltram no LCR. Por exemplo, na *meningite bacteriana*, a granulocitose resultante produz elevações da LD-4 e LD-5, enquanto a *meningite viral* causa linfocitose que provoca elevações da LD-1 e LD-3.

Alguns autores observaram aumentos na fração LD-5 no LCR em presença de tumores metastatizados, enquanto em tumores cerebrais primários mostram aumento em todas as frações. Em neonatais, elevações da LD são observadas em hemorragias intracraneanas e estão de forma significativa associadas com distúrbios neurológicos com convulsões e hidroencefalia.

Determinação da lactato desidrogenase

Paciente. Não é exigido preparo especial.

Amostra. *Soro* ou *plasma heparinizado* ou LCR. O soro e plasma devem estar completamente isentos de hemólise, pois os eritrócitos contém 100-150 vezes mais LD. Estável por 24 h em temperatura ambiente. Não refrigerar.

Interferentes. *Resultados falsamente elevados:* ácido ascórbico, anfotericina B, barbitúricos, carbonato de lítio, clofibrato, carbutamina, cefalotina, clonidina, cloridrato de clorpromazina, cloridrato de procainamida, codeína, dextran, floxuridina, hormônio tireóideo, lorazepam, meperidina, mitramicina, morfina, niacina, nifedipina, propranolol e metildopa. *Resultados falsamente reduzidos:* esteróides anabólicos, androgênios oxalatos e tiazidas.

Métodos. A atividade da lactato desidrogenase pode ser avaliada em termos da velocidade de transformação do piruvato a lactato. Após incubação, a quantidade de piruvato consumida é determinada pela adição de *dinitrofenilhidrazina* para formar um composto colorido (hidrazona) medido fotometricamente. Esta metodologia está sendo abandonada em detrimento aos ensaios "cinéticos". Em outro método colorimétrico, a NADH formada reage com sais tetrazólicos para produzir um composto colorido.

Piruvato à lactato. Muitos métodos medem a interconversão de lactato/piruvato utilizando a coenzima NAD^+ e NADH medida em 340 nm. As reações procedem do lactato → piruvato, ou de modo inverso, piruvato → lactato. A velocidade da reação reversa é três vezes mais rápida, permitindo o emprego de reagentes mais baratos, amostras pequenas e menor tempo de incubação. Entretanto, a reação reversa é mais susceptível a exaustão do substrato e a perda de linearidade. O filme usado em química seca (*DT Vitros*) contêm os reagentes para o emprego da conversão do piruvato e NADH, em lactato e NAD^+.

Valores de referência para a lactato desidrogenase (U/L)	
Soro	95 a 225
Urina	42 a 98
Líquido cefalorraquidiano	7 a 30

Bibliografia consultada

CABAUD, P. G., WRÓBLEWSKI, F. Colorimetric measurement of lactic dehydrogenase activity of body fluids. **Am. J. Clin. Path., 30:**234-6, 1981.

CHATTERLY, S, SUN, T., LIEN, Y. Diagnostic value of lactate dehydrogenase isoenzymes in cerebrospinal fluid. **J. Clin. Lab. Anal., 5:**168-74, 1991.

STURK, A., SANDERS, G. T. B. Macro enzymes: prevalence, composition, detection and clinical relevance. **J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 28:**65-81, 1990.

Working Group on Enzymes of the German Siciety for Clinical Chemistry: Proposal for standard methods for the determination of enzyme concentrations in serum and plasma at 37 °C. **Clin. Chem. Clin. Biochem., 28:**805-8, 1990.

CREATINA QUINASE

A enzima creatina quinase (CK) catalisa a fosforilação reversível da creatina pela adenosina trifosfato (ATP) com a formação de creatina fosfato. A CK está associada com a geração de ATP nos sistemas contráteis ou de transporte. A função fisiológica predominante desta enzima ocorre nas células musculares, onde está envolvida no armazenamento de creatina fosfato (composto rico em energia). Cada ciclo de contração muscular promove o consumo de ATP com formação de ADP.

A creatina quinase está amplamente distribuída nos tecidos, com atividades mais elevadas no músculo esquelético, cérebro e tecido cardíaco. Quantidades menores são encontradas no rim, diafragma, tireóide, placenta, bexiga, útero, pulmão, próstata, baço, reto, cólon, estômago e pâncreas. O fígado e eritrócitos são essencialmente desprovidos desta enzima.

ISOENZIMAS DA CREATINA QUINASE

A creatina quinase consiste de um dímero composto de duas subunidades (B ou cérebro e M ou muscular) que são separadas em três formas moleculares distintas:

- *CK-BB ou CK-1*, encontrada predominantemente no cérebro. Raramente está presente no sangue.
- *CK-MB ou CK-2*, forma híbrida, predominante no miocárdio.
- *CK-MM ou CK-3*, predominante no músculo esquelético.

Estas três isoenzimas são encontradas no citosol ou associadas à estruturas miofibrilares. O músculo esquelético contém quase inteiramente CK-MM, com pequenas quantidades de CK-MB. A maior atividade da CK no músculo cardíaco é também atribuída a CK-MM com, aproximadamente, 20% de CK-MB. O soro normal contém ao redor de 94-100% de CK-MM. A CK-MB está confinada quase exclusivamente no tecido cardíaco. Níveis elevados de CK-MB são de grande significado diagnóstico no infarto agudo do miocárdio. Existe uma quarta forma que difere das frações anteriores, chamada CK-Mt, localizada no espaço entre as membranas internas e externas das mitocôndrias e corresponde a 15% da atividade da CK total cardíaca.

A macro-CK está associada à imunoglobulinas representando 0,8-1,6% da atividade da CK e não está relacionada a nenhuma enfermidade específica. Nas lesões teciduais extensas com ruptura das mitocôndrias, a CK-Mt pode ser detectada no soro. Sua presença também não está relacionada a nenhuma enfermidade especifíca, mas parece indicar doenças severas, como tumores malignos e anormalidades cardíacas.

CORRELAÇÃO CLÍNICA DA CK

A atividade sérica da CK está sujeita a variações fisiológicas que interagem e afetam a atividade da enzima, tais como: sexo, idade, massa muscular, atividade física e raça.

Enfermidades do músculo esquelético. Como uma das principais localizações da creatina quinase é o músculo esquelético, os níveis séricos estão freqüentemente elevados nas lesões destes tecidos.

- *Distrofia muscular progressiva*, particularmente a de *Duchene* (distúrbio recessivo ligado ao cromossomo X) apresenta atividade de CK 50 a 100 vezes os limites superiores dos valores de referência. Apesar da CK total ser de grande utilidade nestas desordens, não é uma avaliação inteiramente específica já que elevações também são encontradas em outras anormalidades do músculo cardíaco e esquelético. Em distrofias como a de *Becker* e a de *Dreifuss*

os níveis de CK sérica são normais ou levemente aumentados.

- *Miosite viral* e *polimiosite* apresentam valores bastante elevados de CK; no entanto, doenças musculares neurogênicas, como: *miastenia gravis*, *esclerose múltipla*, *poliomielite* e *parkinsonismo* a atividade enzimática é normal.

- *Hipertermia maligna*, uma enfermidade familiar rara mas severa caracterizada por febres altas, convulsões e choque e desencadeada pela administração de anestesia geral. Muitos destes pacientes apresentam evidências de miopatia. Atividades bastante elevadas da CK são encontradas no estágio agudo pós-anestesia. Pequenos aumentos muitas vezes persistem e podem também ser detectados em parentes dos pacientes afetados.

- *Polimiopatia necrosante*, onde existe destruição do músculo devido ao infarto ou necrose muscular, lesões por esmagamento, alcoolismo, hipertermia maligna, exercícios intensos, mioglobinúria recorrente, certas enfermidades metabólicas hereditárias do músculo, viroses, injeções intramusculares (os aumentos da CK podem persistir por mais de 48 h) e intervenções cirúrgicas.

- *Drogas*, elevações em doses farmacológicas: ácido aminocapróico, anfotericina B, carbenoxolone, clofibrato, ciclopropano, danazol, éter dietílico, dietilstilbrestol, halotano, labetalol, lidocaína, D-penicilina, pindolol, stanozol, quinidina e succinilcolina. Nos casos de abuso ou "overdose" como a amitriptylina, anfetaminas, barbitúricos, etanol, glutetimida, heroína, imipramina e fenciclidina podem aumentar a atividade da enzima dramaticamente.

- *Estados psicóticos agudos*, os incrementos são, provavelmente, provocados por anormalidades do músculo esquelético.

Enfermidades cardíacas. São comuns os aumentos da atividade da CK em situações que envolvem o coração, apesar de nem todos os aumentos indicarem o envolvimento miocárdico.

- *Infarto do miocárdio*, ver discussão das enzimas no infarto do miocárdio (v. adiante).

- *Condições e procedimentos cardíacos*, tais como: angina pectoris, choque cardiogênico, cirurgia cardíaca incluindo transplante, taquicardia, cateterização cardíaca, arteriografia coronária, insuficiência cardíaca congestiva e angioplastia coronária percutânea transluminal elevam em níveis moderados a CK total ou a CK-2 (CK-MB), ou ambas; estas elevações podem mascarar subsequentes infartos do miocárdio.

- *Miocardite*, promove aumentos marcantes da CK-2 (CK-MB).

Enfermidades do sistema nervoso central. Apesar da alta concentração de CK no tecido cerebral, o soro raramente contém CK-1 (CK-BB). Devido ao seu tamanho molecular (80.000), a passagem através da membrana sangue-cérebro é impedida.

- *Lesões no crânio com dano cerebral*, nestes casos, quantidades significantes de CK-1 (CK-BB) podem ser detectadas no soro; a extensão destes aumentos estão correlacionadas com a severidade do dano e também com o prognóstico.

- *Enfermidade cardiovascular*, *neurocirurgia* e *isquemia cerebral* aumentam a fração CK-3 (CK-MM). A isoenzima CK-1 não eleva.

- *Hemorragia subaracnóidea*, paradoxalmente a isoenzima CK-2 (CK-MB) pode ser detectada freqüentemente nestes pacientes. Este achado sugere comprometimento do miocárdio após acidente cerebral.

- *Síndrome de Reye*, (desordem da infância caracterizada pelo inchamento agudo do cérebro com infiltração gordurosa e disfunção hepática sem icterícia), a CK total está aumentada em

até 70 vezes, principalmente a isoenzima CK-1; a extensão total da elevação da CK parece ser um indicador da severidade da encefalopatia.

Enfermidades da tireóide. A atividade da CK sérica demonstra uma relação inversa com a atividade da tireóide.

- *Hipotireoidismo*, a atividade da CK eleva em 5 vezes os limites superiores de referência, mas os aumentos chegar a 50 vezes e são devidos ao envolvimento do tecido muscular (incremento na permeabilidade da membrana) provavelmente, na redução da depuração de CK como efeito do hipometabolismo; a principal isoenzima presente é a CK-3 (CK-MM), apesar de 13% da atividade da CK ser devida à fração CK-2 (CK-MB), sugerindo um possível envolvimento do miocárdio (de qualquer modo, o hipotireoidismo predispõe à enfermidade cardíaca isquêmica).

- *Hipertireoidismo*, os aumentos da atividade da CK tendem estar nos limites inferiores de valores de referência.

Determinação da creatina quinase

Paciente. Se a dosagem tiver por objetivo a avaliação de distúrbios da musculatura esquelética, o paciente deve evitar exercícios vigorosos durante 24 h. Não ingerir álcool no dia anterior ao teste. Suspender as drogas que afetam os resultados das dosagens durante 24 h.

Amostra. *Soro, plasma* (heparinizado) isentos de hemólise, *LCR* e *líquido amniótico*. Icterícia e lipemia podem interferir em leituras de absorvâncias. Em refrigerador e no escuro, as amostras são estáveis por uma semana. A $-20\,^{o}C$ conservam-se por mais de um mês.

Interferências. *Falsos resultados aumentados:* procedimentos invasivos e outros: cateterismo cardíaco (com lesão do miocárdio), choque elétrico, eletrocauterização, eletromiografia, injeções intramusculares e massagem muscular recente. Drogas: acetato de dexametasona, ácido aminocapróico, carbonato de lítio, clofibrato, cloreto de succinilcolina, cloridrato de meperidina, codeína, digoxina, etanol, fenobarbital, furosemida, glutetimida, guanetidina, halotano, heroína, imipramina e sulfato de morfina.

Métodos para a CK total. A determinação da atividade da creatina quinase emprega produtos formados na reação direta (creatina fosfato + ADP) ou inversa (creatina + ATP). Tanto o ATP como o ADP são medidos por reações específicas.

Método de Oliver-Rosalki. Os métodos mais empregados utilizam a reação reversa, onde em condições ótimas se desenvolve seis vezes mais rapidamente que a reação direta. Olivier descreveu uma seqüência de reações onde a transformação de creatina fosfato em creatina e ATP, catalisada pela creatina quinase é acoplada ao sistema hexo-quinase/glicose 6-fosfato desidrogenase/NADH. A variação na absorvância em 340 nm é medida na avaliação de CK. Rosalki incluiu um tiol ao reagente para aumentar a atividade da CK mantendo os grupos sulfidrílicos na forma reduzida. A modificação proposta por Szasz é sensível e apresenta boa precisão e está livre da interferência exercida pela adenilato quinase. Em química seca (*DT Vitros*) o ativador *N*- acetilcisteína restaura a atividade de CK que inicia a seqüência de reações que culminam com a união da H_2O_2 e o corante leuco.

Valores de referência para a creatina quinase (U/L)	
Homens	15 a 160
Mulheres	15 a 130

Determinação das isoenzimas da CK

A separação eletroforética das isoenzimas da CK, foi um dos métodos mais empregados até recentemente. Os monômeros M e B possuem diferentes cargas, o que permite a separação das diferentes frações. Baseados na carga, também foram desenvolvidos métodos que utilizam a cromatografia trocadora de íons. Esta técnica está em desuso.

Principalemnte para a CK-MB, foram desenvolvidos vários métodos imunológicos, dentre os quais, o de *imunoinibição* que utiliza anticorpos CK-M anti-humano para inibir a CK-MM (atividade muscular). A atividade CK restante, que é proporcional à atividade da CK-MB, catalisa a formação da creatina e ATP a partir da creatina fosfato e ADP. Estas reações são empregadas em química seca (*DT Vitros*).

Ensaios de massa também são usados na determinação da atividade da CK-MB. Anticorpos contra a CK-MB são covalentemente ligados a uma superfície sólida. A CK-MB da amostra reage com o anticorpo formando um complexo antígeno-anticorpo. Um segundo anticorpo conjugado com outra enzima (ex.: fosfatase alcalina) é, então, adicionado. Assim, forma-se um complexo anticorpo-CK-MB-anticorpo. Após a remoção de anticorpos não-ligados, um substrato é adicionado para reagir com a enzima conjugada ao anticorpo para formar um produto detectável, proporcional a atividade da CK-MB presente na amostra.

Bibliografia consultada

GRIFFITHS, P. D. CK-MB: A valuable test? **Ann. Clin. Biochem., 23:**238-42, 1986.

HORDER, M., ELSER, R. C., GERHARDT, W et al. Approved recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes: Part 7. IFCC method for creatine kinase. **Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 29:**435-56, 1991.

JONES, M. G. SWAMINATHAN, R. The clinical biochemistry of creatine kinase. **J. Int. Fed. Clin. Chem., 2:**108-14, 1990.

LANG, H., WURZBURG, U. Creatine kinase, na enzyme of many forms. **Clin. Chem., 28:**1439-47, 1982.

ROSALKI, S. B. An improved procedure for serum creatine phosphokinase determination. **J. Lab. Clin. Med., 69:**696-705, 1967.

ROSALKI, S. B. Low Serum Creatine Kinase Activity. **Clin. Chem., 44:**905. 1998.

SZASZ, G., GRUPER, W., BERNT, E. Creatine kinase in serum. I. Determination of optimum reaction conditions. **Clin. Chem., 22:**650-6, 1976.

WU, A. H. B. Creatine kinase isoforms in schemic heart disease. **Clin. Chem., 35:**7-13, 1989.

OUTRAS ENZIMAS

ALDOLASE

A aldolase (ALD) pertence a classe das liases encontradas em todas as células do organismo, mas presente em concentrações mais elevadas no músculo esquelético, fígado e cérebro. Em virtude da elevação da aldolase durante a doença ativa do músculo esquelético, sua avaliação ajuda no acompanhamento e evolução de certas doenças, como a distrofia muscular progressiva.

É necessário pelo menos 30 minutos de repouso antes da coleta da amostra para evitar a interferência da atividade muscular. As amostras devem ser livres de hemólise (os eritrócitos apresentam 100 vezes mais atividade que o soro).

Valores de referência: recém-nascidos: <32 U/L; crianças: <16 U/L; adultos: 1,0 a 7,5 U/L (30 ^{0}C).

Valores elevados. Doença do músculo esquelético, principalmente, na distrofia muscular de Duchenne, dermatomiosite, polimiosite (no entanto são encontrados valores normais na polimielite, miastenia grave, esclerose múltipla e enfermidades musculares de origem neurogênica), infarto do miocárdio, hepatite viral aguda, triquinose, gangrena, tumores prostáticos, algumas metástases hepáticas, leucemia granulocítica, anemia megaloblástica, "delirium tremens" e drogas (acetato de cortisona, e corticotrofina).

Valores reduzidos. clinicamente insignificantes.

ISOCITRATO DESIDROGENASE

A isocitrato desidrogenase (ICD) é uma enzima que catalisa a descarboxilação oxidativa do isocitrato a oxalossucinato e α-cetoglutarato no ciclo de Krebs. É um indicador sensível de doença hepática parenquimatosa.

Valores de referência: 2 a 13 U/L (37 ^{0}C).

Valores elevados. Cirrose, hepatite (crônica), infarto pulmonar grave, kwashiorkor, lesões hepáticas infectadas por bactérias, metástases hepáticas, mononucleose infecciosa, síndrome de Reye e inflamação aguda do trato biliar.

Valores reduzidos. Necrose hepatocelular (maciça).

5'-NUCLEOTIDASE

Enzima da membrana plasmática que catalisa a hidrólise da maioria dos ribonucleosídios 5'-monofosfato e desoxinucleosídios 5'-monofosfato em nucleosídios correspondentes e ortofosfatos. Trata-se de uma isoenzima da fosfatase alcalina encontrada no parênquima hepático e nas células do ductos biliares. Sua atividade sérica aumenta de 2 a 6 vezes em doenças hepáticas que interferem com a secreção biliar (cálculo, cirrose biliar etc.). A sua avaliação ajuda a estabelecer o diagnóstico diferencial entre câncer ósseo e hepático, visto que a 5'-nucleotidase raramente está elevada no câncer ósseo. Quando acoplados com elevação da fosfatase alcalina, os níveis de 5'-nucleotidase indicam metástase hepática.

Valores de referência: 2 a 17 U/L;

Valores elevados. Alcoolismo, cirrose, cirurgia, colestase fármaco-induzida, disfunção hepática, metástase hepática e obstrução extra-hepática;

Valores reduzidos. Hepatite.

COLINESTERASE

Duas enzimas tem a capacidade de hidrolizar acetilcolina para formar colina e o ácido correspondente. Uma é a *acetilcolinesterase* ou *colinesterase I* encontrada nos eritrócitos, pulmões e baço, terminações nervosas e na matéria cinza do cérebro, mas não no plasma. É responsável pela rápida hidrólise da acetilcolina liberada nas terminações nervosas para mediar a transmissão do impulso nervoso através da sinapse.

A outra colinesterase é a acilcolina acilhidrolase usualmente denominada *pseudocolinesterase* ou *colinesterase II* encontrada no fígado, matéria branca do cérebro e soro; sua função biológica não é conhecida.

A pseudocolinesterase é uma colinesterase específica que hidrolisa tanto ésteres não-colina como a acetilcolina. É encontrada em várias formas e atua em inativar a acetilcolina. É sintetizada no fígado e encontrada no plasma. A atividade de enzima é inibida reversivelmente por inseticidas contendo carbamato e irreversivelmente por inseticidas organofosforados.

Alguns pacientes exibem apnéia prolongada após administração de succinilcolina, um relaxante muscular. Esta droga é normalmente hidrolizada pela colinesterase plasmática. Entretanto, ocasionalmente, a droga é ativa por períodos mais longos, causando apnéia que perdura por várias horas. Isto é ocasionado em razão do desequilíbrio eletrolítico e desidratação. Mais de 50% dos pacientes sensíveis à succinilcolina tem anormalidades geneticamente determinadas na enzima que levam a atividades reduzidas no plasma.

Valores de referência: 3.500 a 8.500 U/L.

Valores aumentados. Alcoolismo, câncer de mama, síndrome nefrótica, obesidade, hiperlipoproteinemia do tipo IV e psicose.

Valores reduzidos. Anemias, dermatomiosite, desnutrição, doença renal crônica, embolia pulmonar, gravidez tardia, infarto do miocárdio, infecções agudas, intoxicação por inseticidas organofosforados, anticoncepcionais orais, estrogênios e doenças hepáticas parenquimatosas.

Bibliografia consultada

BODANSKY, O., SCHWARTZ, M. K. 5'-Nucleotidase. **Adv. Clin. Chem., 15:**44-136, 1972.

BROWN, S. S., KALOW, W., PILZ, W. et al. The plasma cholinesterases: A new perspective. **Adv. Clin. Chem., 22:**1-123, 1981.

ELLIS, G., GOLDBERG, D. M., SPOONER, R. J., WARD, A. M. Serum enzyme tests in diseases of the liver and biliary tree. **Am. J. Clin. Path., 70:**248-58, 1978.

INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO (IAM)

O infarto do miocárdio consiste em necrose irreversível do miocárdio, que resulta em geral de trombose numa lesão pré-existente da parede vascular ou rotura de uma placa aterosclerótica em uma artéria coronária importante. A princípio ocorre isquemia, e se esta for grave e prolongada, segue-se o infarto do miocárdio, cuja extensão depende da artéria coronária obstruída, do grau de circulação colateral e das exigências de oxigênio do tecido suprido pela artéria.

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a tríade clássica para a confirmação diagnóstica é formada por:

- Dor no peito: pré-cordial.
- Alterações eletrocardiográficas: em especial com elevações do segmento ST e onda Q.
- Elevações das enzimas cardioespecíficas.

A avaliação enzimática é uma rotina nos pacientes suspeitos de terem desenvolvido infarto agudo do miocárdio. O infarto deve ser diferenciado da angina pectóris, embolia pulmonar e insuficiência cardíaca congestiva. Além disso, nem todos os pacientes manifestam os mesmos sintomas. De fato, os infartos silenciosos ocorrem em aproximadamente 20% dos casos. Some-se a isto, que as alterações eletrocardiográficas podem estar ausentes ou serem inespecíficas. As enzimas mais utilizadas na investigação do infarto agudo do miocárdio são: a *creatina quinase* (CK) e a *lactato desidrogenase* (LD), também como suas isoenzimas. A *transaminase oxalacética* (TGO) apresenta menor uso. Para aumentar esta especificidade são avaliadas também as isoenzimas da CK e LD.

Nesta seção, considera-se as alterações enzimáticas e algumas provas não-enzimáticas utilizadas para o diagnóstico do infarto do miocárdio e as vantagens e desvantagens de cada tipo de medida.

Após a instalação dos sintomas do infarto agudo do miocárdio se observa, na maioria dos pacientes, um período durante o qual é possível detectar a elevação das enzimas liberadas pelo tecido miocárdico lesado. Esta relação temporal é particular para cada enzima e varia de um paciente para outro, ainda que exista um modelo típico (Figura 4.1). De modo geral, estas enzimas devem estar elevadas na ocorrência do infarto agudo do miocárdio (especificidade) e dentro dos valores normais na ausência de infarto (sensibilidade).

Geralmente, a diferenciação do infarto pulmonar é realizada prontamente, sendo a mesma caracterizada pelos níveis elevados da LD e, usualmente, pelos valores normais de TGO(AST) e CK. Em alguns pacientes com embolia pulmonar, ocorrem valores discretamente aumentados da TGO(AST) pulmonar ao redor do terceiro ou quarto dia após o acesso de dor no peito.

CK-MB

O miocárdio contém expressivas quantidades de CK-MB. Em outros tecidos, a CK-MB é encontrada em pequenos teores. No miocárdio esta fração pode ser liberada para o soro em quantidades significantes. A elevação da atividade plasmática da CK-MB (igual ou maiores que 6% da CK total) é o indicador mais específico de lesão miocárdica (98-100% dos casos), particularmente, de infarto agudo do miocárdio. A CK-MB começa a elevar-se em 4-8 horas a partir da dor precordial, atingindo o máximo em 12-24 horas, retornando ao normal, nos casos não complicados, em 48-72 horas. Pacientes que atingem o pico máximo rapidamente (8-12 h), tem melhor prognóstico do que aqueles que demoram para alcançar o pico (24 h).

Atividade aumentada de CK-MB é também encontrada em outras desordens cardíacas. Portanto, aumentos desta fração não são inteiramente específicos para o infarto agudo do miocárdio mas, provavelmente, refletem algum grau de lesão isquêmica cardíaca. A especificidade para o infarto pode ser aumentada se os resultados forem interpretados em associação com as isoenzimas da lactato desidrogenase e se medida, seqüencial-

mente, por períodos superiores a 48 horas para detectar os aumentos e as reduções típicas das enzimas encontradas nestes distúrbios. A angina pectoris, choque cardiogênico, taquicardia, miocardite e insuficiência cardíaco-congestiva, geralmente, não elevam a CK total nem a CK-MB. Outras situações como: injeções intramusculares, traumatismos, cirurgias não-cardíacas e cateterismos cardíacos a CK-MB permanece normal. Ocorrem elevações nos níveis séricos da CK-MB em estados patológicos descritos na tabela 9.2.

Tabela 9.2. Elevação da atividade sérica da CK-MB em diversos estados patológicos

Infarto agudo do miocárdio
Angina severa (em alguns casos)
Fibrilação auricular crônica
Insuficiência coronária
Síndrome de aplastamento
Pericardite
Desfibrilação
Colocação de marcapasso
Angiografia coronária
Cirurgia cardíaca de peito aberto
Massagem cardíaca externa ou ressuscitação cardiopulmonar
Intoxicação por monóxido de carbono
Hipertermia maligna
Distrofia muscular como a de Duchenne
Polimiosite
Cirurgia ou infarto prostático
Dermatomiosite
Síndrome de Reye
Processos malignos

A fração CK-BB pode se transformar na CK-MB, o que explica o aparecimento desta isoenzima em pacientes com câncer de pulmão, desordens cerebrais agudas e outros distúrbios.

LACTATO DESIDROGENASE

A atividade da LD total aumenta 8 a 12 h a partir da dor precordial, atinge o máximo em 24 a 48 h e permanece elevada por 7 ou mais dias. As elevações são três a quatro vezes o valor de referência superior, mas pode atingir até 10 vezes. A fração LD-1 apresenta uma trajetória semelhante à LD total, no entanto, devido a sua especificidade tecidual, a isoenzima tem maior utilidade diagnóstica. Nos infartos com alterações eletrocardiográficas evolutivas, com desenvolvimento de ondas Q (transmural) a LD-1 excede 45% da atividade da LD total, enquanto o infarto não-Q (subendocárdico) geralmente apresenta valores menores do que 45%. Uma causa comum de falsos-positivos com LD-1 elevada é a presença de hemólise, tanto por dificuldades na coleta, transporte ou separação da amostra, como também em presença de válvula cardíaca prostética.

O valor da relação LD-1/LD-2 depende do fato que a LD-2 não aumenta após o infarto do miocárdio enquanto a LD-1 o faz. Além disso, a atividade da LD-1 é geralmente menor do que a LD-2, sendo que os aumentos da atividade eleva consideravelmente após o infarto, com isso a LD-1 excede a LD-2. Ao redor de 80% de todos os infartos do miocárdio mostram este tipo de relação. Uma relação maior que 0,7 tem uma sensibilidade diagnóstica de 99%. Deve ser enfatizado que o infarto do miocárdio e a hemólise produzem exatamente o mesmo efeito sobre a LD-1 e também sobre os valores da relação LD-1/LD-2. Algumas causas de aumentos destas frações são mostradas na tabela 9.3.

Tabela 9.3. Causas de aumento da relação LD-1/LD-2

Infarto agudo do miocárdio
Infarto renal agudo
Hemólise causada por
Válvulas cardíacas prostéticas
Anemias hemolíticas
Anemias megaloblásticas
Manipulação da amostra de sangue
Processos malignos

AMINOTRANSFERASES (TRANSAMINASES)

A TGO (AST) aumenta 6-8 h após a dor, atingindo o pico 18-24 h, retornando aos níveis normais em 4 ou 5 dias. A TGO não é específica do tecido cardíaco e também aumenta em enfermidades do

fígado, pulmão e músculo esquelético. Os valores do pico máximo são 5 a 10 vezes maiores que o limite superior de referência.

No entanto, a sensibilidade combinada com a especificidade tem mostrado que a TGO (AST) é uma enzima cardíaca diagnosticamente redundante. Deste modo, esta enzima está sendo gradativamente abandonada no diagnóstico laboratorial do infarto do miocárdio.

TESTES NÃO-ENZIMÁTICOS PARA O IAM

Mioglobina. É uma heme-proteína de ligação do oxigênio presente no músculo esquelético e cardíaco. Constitui cerca de 2% da proteína total do músculo e está localizada no citoplasma. Lesões celulares durante o infarto agudo do miocárdio liberam mioglobina na circulação sangüínea.

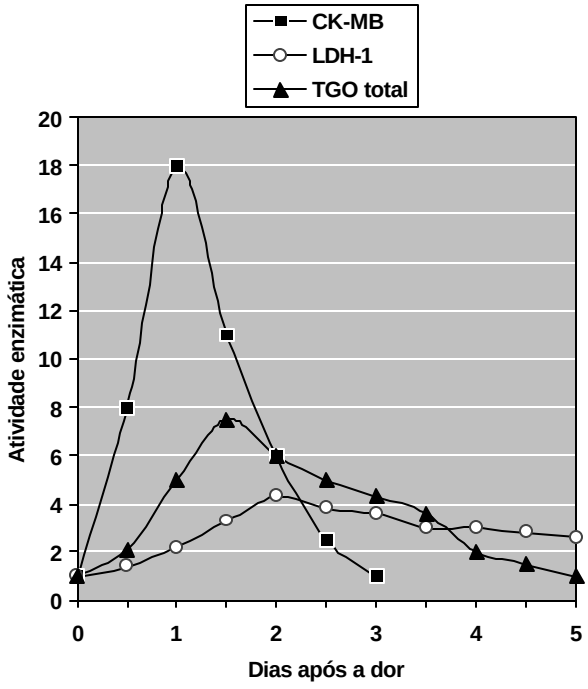


Figura 4.1. Modelo típico de alterações na atividade enzimática após infarto do miocárdio não-complicado.

Os níveis de mioglobina em pacientes com IAM elevam em torno de 2 horas após a dor precordial e seus picos são atingidos dentro de 6-9 h retornando ao normal em 24-36 h após o infarto. O pequeno tamanho da molécula permite que a mioglobina se desloque rapidamente na circulação sangüínea sem utilizar o sistema linfático. Os teores de mioglobina sofrem elevação nos seguintes casos:

- Infarto agudo do miocárdio.
- Cirurgia com coração aberto.
- Exercício intenso.
- Lesão do músculo esquelético.
- Pacientes portadores genéticos ou com atrofia muscular progressiva.
- Deficiência renal grave.
- Aplicação de injeção intramuscular (variável).

A mioglobina é dosada em 2-12 h após o IAM e apresenta alta sensibilidade e especificidade clínica. Entretanto, resultados falso-positivos podem ocorrer como resultado de lesões no músculo esquelético ou por insuficiência renal.

Troponinas. São proteínas contidas nas células musculares do aparelho miofibrilar das células que constituem o sarcômero, que é o núcleo básico do aparato contrátil da fibra muscular esquelética e cardíaca. São compostas de múltiplas subunidades: *troponina I* (subunidade inibidora da actina), *troponina C* (subunidade ligada ao cálcio e reguladora da contração) e *troponina T* (subunidade ligada a miosina – tropomiosina). A subunidade troponina I existe em três isoformas: duas no músculo esquelético e uma no músculo cardíaco.

As isoformas mais promissoras para o diagnóstico do IAM são: a troponina T (cTnT) e a troponina I (cTnI). Dados clínicos mostraram que as troponinas são marcadores precoces do IAM, sendo liberadas praticamente ao mesmo tempo que a CK-MB, permanecendo elevadas por mais de uma semana após o infarto.

A troponina I cardíaca aparece no plasma 4-6 h após o ataque do IAM, atingindo picos de concentração em 12-18 h após o infarto.

Na fase precoce que sobrevem o ataque cardíaco, a cinética da liberação da troponina I é próxima a da CK-MB. Todavia, as taxas de troponina I no soro permanecem elevadas durante um período mais longo (4 a 7 dias). Com isso o acompanhamento do IAM é bem melhor através da troponina I.

A troponina T permanece anormal por 6 a 10 dias após o IAM, apresentando as outras características semelhantes à troponina I.

TESTES ENZIMÁTICOS E O ELETROCARDIOGRAMA

Em todos os indivíduos suspeitos de IAM são recomendadas as medidas das atividades das enzimas cardioespecíficas e de testes não-enzimáticos (quando disponíveis) nas primeiras 48 h após o infarto. Em muitos pacientes o eletrocardiograma (ECG) fornece evidências inequívocas do infarto. Entretanto, muitas vezes é possível encontrar dificuldades em interpretá-los, especificamente na presença de arritmias, além do que, o ECG não se apresenta sempre anormal em pacientes enfartados recentemente. Por outro lado, a avaliação enzimática pode estabelecer uma indicação da extensão do infarto e, assim, estabelecer prognósticos.

As enzimas plasmáticas e o ECG são complementares na investigação de pacientes suspeitos de IAM. A cuidadosa análise das enzimas e do ECG (juntamente com a história do paciente) reduzem sensivelmente os erros cometidos neste diagnóstico. O valor dos testes enzimáticos *versus* o ECG no IAM são comparados a seguir:

	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
Eletrocardiograma	70	100
Enzimas séricas	95	90

Bibliografia consultada

ANDREOLI, T. E., CARPENTER, C. C. J., BENNETT, J. C., PLUM, F. **Cecil: medicina interna básica. 4 ed.** Rio de Janeiro : Guanabara-Koogan, 1997. 965 p.

GOTO, I. Serum creatine phosphoquinase isoenzymes in hipothyroidim, convulsions, myocardial ischaemia and necrosis. **Clin. Chem. Acta, 52:**27-30, 1974.

HENRY, John Bernard. **Diagnósticos clínicos & tratamento por métodos laboratoriais.** São Paulo : Manole, 1995. 1678 p.

MERCATELLI, Claucus, PICCIARELLI, Fábio José, LAUDARI, Humberto, AMOEDO, Telma Veiga. Laboratório clínico: Tecnologia objetivando diretrizes para o futuro diagnóstico. **LAES, 105:**50-64, 1997.

VUORI, J. SYRJALA, H., VAANANEN, H. K. Myoglobin/carbonic anhydrase III ratio: highly specific and sensitive early indicator for myocardial damage in acute myocardial infarction. **Clin. Chem., 42:**107-9, 1996.