

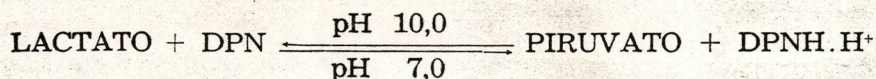
DOSAGEM COLORIMÉTRICA DA LACTODESIDROGENASE

DR. SCYLLA DE CASTRO FRAGOSO
PROF. HUGO DE CASTRO FARIA

(Laboratório do Serviço de Pesquisa e Experimentação
do Instituto Nacional de Câncer)

A desidrogenase láctica, (LDH) é uma enzima que atua de modo reversível na reação:

da, linfomas (inclusive doença de Hodgkin), mononucleose infecciosa (HSICH e BLUMENTHAL). (1)



A oxidação ou redução da Coenzima I (DPN ou difosfo piridina nucleotídeo) ou a tendência de formação de lactato ou piruvato depend^a do pH do meio.

Acha-se difundida por todo o organismo, existindo, no entanto, em grande quantidade no músculo cardíaco, fígado e músculo esquelético, o que também ocorre com outras enzimas do ciclo glicolítico, tais como: hexose isomerase, málico-desidrogenase, succinato-desidrogenase e aldolase. As hemácias também a possuem em teor elevado, embora sejam células de exigências metabólicas mínimas.

Existe normalmente no sangue circulante, em pequenas quantidades.

Nos casos de necrose dos tecidos acima citados passam para o meio circulante elevando sua concentração.

Os valores mais elevados para a LDH têm sido encontrados nos casos de infarto do miocárdio, hepatite agu-

Nos casos de infarto do miocárdio a sua determinação assume real importância, pois as variações de seus valores sanguíneos apresentam um paralelismo perfeito com as transaminases (transaminase glutâmico-oxalacética e glutâmico pirúvica) e a aldolase. Nestes casos, seis horas após a crise, já se encontram valores elevados, e máximos nas 24-48 horas seguintes.

Decresce para voltar à normalidade ao cabo de 4 dias após a crise. Esse aumento rápido dos níveis sanguíneos da LDH, e retorno a taxa normal em 4 a 6 dias, desempenha papel importante no diagnóstico da mortificação do músculo cardíaco, uma vez que é sabido que em muitos casos o eletrocardiograma pode não fornecer elementos precisos para o diagnóstico.

No caso da LDH podemos raciocinar da mesma forma que para a transaminase: "devemos concluir que o aumento da transaminase (no caso presente

LDH) no soro ou plasma não é sintoma de determinada afecção, e sim, significa que está sendo lesada área de tecido rica nesta enzima". (FARIA) (2)

Nas lesões hepáticas teremos também comportamento igual ao da transaminase, isto é, teremos valores elevados nos casos agudos, durante o período de destruição celular extensa, não tendo nenhuma relação com o problema funcional do órgão. Esta elevação persiste por tempo muito maior do que no infarto do miocárdio.

O mesmo fato pode ocorrer nas pancreatites, e doenças renais nos períodos agudos.

DOSAGEM DA LDH COLORIMÉTRICAMENTE

O processo por nós utilizado foi o de transformação do lactato em piruvato. Escolhemo-lo pela maior facilidade de obtenção do DPN (4) e lactato de sódio (em vez de DPNH₂ e piruvato de sódio).

Para controle de nossos resultados colorimétricos repetimos as mesmas dosagens usando o método de J. B. NEILANDS (3) baseado na redução sofrida pelo DPN, medida a 340 mu, no espectrofotômetro de Beckman, modelo DU.

O coeficiente de correlação entre as determinações colorimétricas e as feitas no espectrofotômetro a 340 mu foi de $r = 0,995$, que corresponde a uma boa correlação.

Princípio: baseia-se na transformação do lactato de sódio em piruvato pela ação da LDH mais DPN; o piruvato formado é dosado colorimetricamente depois de reagir com dinitro-fenil-hidrazina e hidróxido de sódio (côr vermelha).

Reativos:

1) Sol. tampão de glicina 0,1 M. pH = 10,0.

Pesar 0,75 g de glicina e dissolver em cerca de 70 ml de água. Ajustar o pH a 10,0 com NaOH 0,2 N e completar o volume a 100 ml com água destilada.

2) Lactato de sódio 0,16 M.

Preparo: diluir 5 ml de ácido láctico a 85% com o mesmo volume de água e juntar porções de 2 ml de NaOH 5 N até obter reação alcalina, usando fenolftaleína como indicador externo. Aquecer a solução a 80° C para hidrolizar os ésteres internos formados. Continuar o aquecimento e a adição cuidadosa de NaOH até a solução dar reação neutra. Diluir com água a 94 ml. O lactato assim obtido será 0,5 M. Para obter o 0,16 M, bastará tomar 32 ml do 0,5 M e diluir com água a 100 ml.

3) Dinitrofenilhidrazina a 1 g/litro

Dinitrofenilhidrazina ... 100 mg
HCl a N q.s. 100 ml

4) DPN (difosfopiridino nucleotídeo oxidado ou coenzima I oxidada).

DPN 20 mg
NaOH 0,01 N 1 ml

5) Sol. de NaOH 0,75 N.

6) Sol. padrão de piruvato de sódio:

a) Sol. "stock" de piruvato de sódio a 22 mg % (aquosa).

b) Sol. de uso: diluir a solução "stock" na proporção de 1:10 (2,2 mg %).

7) Sol. padrão artificial: salicilato de sódio + FeCl₃:

- a) Sol. "stock" de salicilato de sódio a 100 mg %.
- b) Sol. de uso: diluir a solução "stock" a 2:100 (2 mg %).
- c) Sol. de cloreto férrico a 500 mg %. Feita na hora ou a partir de solução mais concentrada (5 a 10 g %). Na hora da dosagem juntar:

Sol. de salicilato de Na
a 2 mg % 5 ml

Sol. de cloreto férrico a
500 mg % 1 ml

Técnica: tomar dois tubos de ensaio e marcar E (ensaio) e B (branco). Colocar em cada um deles 0,75 ml do tampão de glicina, 0,5 ml de lactato de sódio, 0,16 M e 0,15 ml de solução de DPN.

Misturar bem.

Ao tubo E juntar 0,1 ml de soro, misturar e deixar em repouso a temperatura ambiente durante 15 minutos.

Findo esse tempo juntar 0,5 ml de sol. de dinitrofenilhidrazina aos dois tubos (E e B).

Adicionar agora ao tubo B 0,1 ml do mesmo soro.

Deixar em repouso durante 20 minutos a temperatura ambiente (fase de produção da ozazona).

Juntar aos dois tubos 10 ml de solução de NaOH 0,75 N.

Esperar 5 minutos e efetuar a leitura no fotômetro a 430 mu (filtro azul), estabilizando o aparelho com água destilada.

A diferença de cor entre os tubos E e B mede a atividade da LDH.

Padrões: poderemos usar o piruvato de sódio a 2,2 mg % (sol. de uso) da seguinte forma: tomar três tubos de ensaio marcando PI, PII e B, juntando respectivamente 0,5 ml e 1 ml de sol. de piruvato e 1,5 ml de água destilada. Adicionar agora 1,0 ml de água destilada ao PI e 0,5 ml ao PII para igualar os volumes. A todos os tubos juntar 0,5 ml de sol. de dinitrofenilhidrazina a 1 g % e daí por diante seguir a mesma técnica usada para o soro, isto é: 20 minutos a temperatura ambiente, depois 10 ml de NaOH 0,75 N em cada tubo. Esperar 5 minutos e efetuar a leitura ao fotômetro (430 mu).

As diferenças entre os tubos PI, PII e o tubo B, representam as D. O. correspondentes respectivamente a 0,011 mg e 0,022 mg de piruvato de sódio.

Padrão artificial: dada a dificuldade de obtenção de piruvato de sódio quimicamente puro e seco, adotamos para este método o padrão utilizado para a dosagem da aldolase (⁴). A densidade óptica a 430 mu, obtida na reação de 5 ml de salicilato de sódio mais 1 ml de cloreto férrico é igual a que se obtém no PII (1 ml de padrão) de 2,2 mg de piruvato de sódio.

Cálculo:

O processo de NEILANDS (³) não especifica uma unidade, porém, podemos exprimir o resultado em relação à quantidade de DPN reduzida, da mesma forma que no método de KARMEN-WROBLEWSKY-LA DUE (⁵), para transaminase glutâmico-oxalacética, no qual uma unidade de GOT corresponde à baixa de 0,001 de densidade óptica a 340 mu com cuba de 1,0 cm de espessura. No caso presente uma unidade de lactodesidrogenase corresponde

ao acréscimo de 0,001 de densidade óptica a 340 mu, produzido por ml de sôro por minuto.

Por êste método realizamos diversas dosagens (35 ao todo) simultâneamente com o método colorimétrico, estabelecendo-se assim a correlação dos dois. A análise estatística dos resultados revelou a validade do método colorimétrico, pois obtivemos para "r", (coeficiente de correlação

$$r = \frac{S(X \times Y)}{\sqrt{S(X) S(Y)}}, \text{ um valor de } 0,995.$$

Para efetuar o cálculo final bastará determinar a quantidade de piruvato formada na reação, o que pode ser feito utilizando-se o padrão de piruvato ou o artificial, e aplicando a equação geral da fotocolorimetria:

$$\frac{LE - LB}{LP} \times 0,022 \text{ (mg de piruvato existente no tubo padrão)} = \text{mg de piruvato formado por 0,1 ml de sôro.}$$

Exemplo: diferença entre LE e LB (densidades ópticas) = .110

$$\text{D.O. do PII} = .100$$

$$\text{Mg de piruvato em PII} = 0,022.$$

$$\text{Aplicando a equação teremos: } \frac{.110}{.100} \times 0,022 = 0,024 \text{ mg de piruvato formado.}$$

Isto feito, bastará multiplicar o resultado obtido pelo fator $F = 5\,924$, fator de transformação entre o método espectrofotométrico e o colorimétrico. Teremos assim o resultado expresso

em unidades de LDH por ml de sôro por minuto, isto é, $0,024 \times 5\,924 = 143$ unidades.

Valores normais: os valores normais por nós encontrados variaram entre 50 a 110 unidades.

Alguns cuidados especiais em relação ao material para as dosagens devem ser assinalados, tais como:

a) a solução de DPN deve ser preparada na hora da dosagem;

b) as soluções de lactato, o tampão de glicina e o padrão de piruvato devem ser guardados no congelador a -10°C .

Quanto ao sangue, uma vez obtida a coagulação e a retração do coágulo, deve se proceder à separação do sôro o mais breve possível, pois, segundo HSICH e BLUMENTHAL (1) os sangues deixados a temperatura ambiente por tempo superior a 1 hora, deram resultados elevados, cêrca de 25 % a mais do que os mantidos a 4°C , ou os mantidos a temperatura ambiente por menos tempo.

Sangues oxalatados ou heparinizados deram valores maiores, na ordem de 40 a 60 %.

A hemólise terá que ser totalmente evitada, pois as hemácias possuem LDH em concentração muito maior do que o sôro, fazendo com que o menor vestígio da mesma inutilize o material. Determinações por nós realizadas em glóbulos e plasma de coelhos normais mostraram que nos glóbulos existe uma quantidade de LDH cêrca de 25 000 superior à do sôro.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — K.M. HSICH e H.T. BLUMENTHAL — Serum lactic dehydrogenase levels in various diseases states. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 91:626, 1956.
- 2 — FARIA, HUGO DE CASTRO — Transaminase — Processo de determinação colorimétrica de TGO. O Hospital, Vol. 56, nº 3 (445-452), 1959.
- 3 — COLLOWICK, KAPLAN — Methods in enzymology, Vol. I:449, 1955.
- 4 — FARIA, H. DE CASTRO — Contribuição ao estudo da aldolase. Tese de concurso para a Cátedra de Química Fisiológica apresentada em 1959 à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade da Guanabara.
- 5 — WROBLEWSKY F., LA DUE J.S. — Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 90:210, 1955.

SUMMARY

The author recommend a coloritric method for measuring the lactic dehydrogenase (LDH) activity in 0,1 ml of serum based on the reation lactate + DPN → pyruvate + DPNH² at pH 10 glicina buffer. The pyruvate formed mesearred by dinitro-phenil-hidrazine in alkaline medium. As standart color they use pyruvate solution or artificial standart — Natrium salicilate + Iron chloride solution.