

• Enzimologia Clínica Veterinária. Parte I: fatores que interferem na interpretação dos resultados

- *Veterinary clinical enzymology: Part 1 – Factors interfering with results interpretation*
- *Enzimología Clínica Veterinaria: Parte I – Factores que interfieren en la interpretación de los resultados*

* **Karla Conceição Higino de Campos**¹ – CRMV-SP – nº 13579
Aguemi Kohayagawa² – CRMV-SP – nº 674
Nayro Xavier de Alencar³ – CRMV-SP – nº 8213
Nádia Regina Pereira Almosny⁴ – CRMV-RJ – nº 2535

*Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP
Laboratório Clínico Veterinário
Departamento de Clínica Veterinária, Caixa Postal - 560
CEP: 18618-000 – Botucatu – SP
Fone: 14 – 68026115
Email: kchc@bol.com.br

¹ Médica Veterinária Residente do Laboratório Clínico Veterinário – FMVZ – UNESP - Botucatu/SP.

² Professora Titular do Departamento de Clínica Veterinária – FMVZ – UNESP – Botucatu/SP.

³ Doutorando em Medicina Veterinária – FMVZ – UNESP – Botucatu/SP.

⁴ Professor Adjunto do Departamento de Clínica e Patologia Clínica Veterinária – UFF – Niterói/RJ.

RESUMO

A enzimologia clínica veterinária tem assumido um importante papel nos tempos atuais, principalmente no que se refere ao auxílio diagnóstico de diversas enfermidades. Este trabalho teve por objetivo apresentar uma revisão sobre os principais fatores que interferem na determinação das enzimas no soro e no plasma e que podem acarretar uma interpretação inadequada dos resultados.

Palavras-chave: Enzimologia clínica veterinária. Bioquímica. Patologia clínica veterinária. Artefatos.

Introdução

O valor do estudo das enzimas como auxílio diagnóstico foi primeiramente demonstrado em 1900, quando a atividade da lipase sérica foi determinada para ajudar no diagnóstico de doença pancreática. Desde então, a atividade de várias enzimas é determinada na rotina laboratorial com a finalidade diagnóstica, uma vez que inúmeros processos fisiopatológicos, sobretudo nos que há lesão celular, como pode ser observado nas cardiopatias, hepatopatias, miopatias, doenças pancreáticas, doenças ósseas e outras, resultam em um aumento das atividades enzimáticas no plasma.

A distribuição das enzimas varia de acordo com o tecido e uma seleção cuidadosa entre dois ou mais testes deve ser normalmente feita para que a fonte das enzimas séricas seja precisamente definida.

Algumas enzimas tendem a ser predominantes em único órgão, enquanto outras estão presentes em vários órgãos. Aquelas presentes em múltiplos órgãos têm formas moleculares diferentes e são denominadas de “isoenzimas”, as quais possuem formas fisicamente distintas, porém com a mesma atividade catalítica. Essas isoenzimas podem ser mensuradas separadamente por diversas técnicas.

A separação da isoenzima é usualmente feita por eletroforese, entretanto, um desenvolvimento recente de metodologia de imunoprecipitação fornece maior especificidade e velocidade ao teste. Em virtude de certas isoenzimas serem únicas ou em maior concentração num tecido particular, elas oferecem uma maior sensibilidade diagnóstica.

Na prática, uma enzima está presente em quantidade elevada no soro ou plasma se sua liberação a partir dos tecidos está aumentada em função de uma lesão destes. As dosagens enzimáticas no soro devem corresponder a diversas finalidades – avaliar a extensão e a gravidade do comprometimento tissular bem como sua evolução e determinar a natureza do órgão lesado.

Extensão e gravidade das lesões

Uma citólise libera no soro um conjunto de enzimas intracelulares. A quantidade de enzimas liberadas é, a princípio, proporcional à massa de células destruídas e sua distribuição reflete o equipamento enzimático destas células.

Quando lesões celulares discretas conduzem a uma liberação aumentada de enzimas no soro, esta últi-

ma varia de acordo com sua localização celular, como ocorre com as enzimas solúveis no citoplasma, que são liberadas mais facilmente que as das organelas subcelulares.

Enzimas citoplasmáticas são geralmente solúveis, facilmente liberadas e prontamente passam através da membrana celular. Esta propriedade faz com que elas sejam sensíveis marcadores diagnósticos. Enzimas mitocondriais usualmente aparecem no sangue após uma lesão, pois estas estão ligadas e devem atravessar de 2 a 3 membranas até atingirem a corrente sanguínea. Enzimas lisossomais estão ligadas a grânulos intracelulares e aparecem no sangue só após a organela ser danificada. Enzimas de membrana, por sua vez, não são solúveis e estão firmemente ligadas à membrana celular, sendo geralmente liberadas após uma lesão severa, entretanto, podem aparecer no sangue após uma estimulação para o aumento na produção.

Em todos os casos, para uma mesma quantidade de enzimas liberadas, a saída das células de ativadores ou de inibidores é igualmente capaz de modificar a atividade das enzimas no soro, por isso não há sempre uma estrita proporcionalidade entre a atividade enzimática sérica e a extensão da zona afetada.

Evolução das lesões e origem tissular

As diversas enzimas liberadas por um tecido lesado têm diferentes meias-vidas diferentes no soro. Suas taxas respectivas variam, portanto, no curso da evolução de uma afecção. Por exemplo, durante a reparação hepática as aminotransferases séricas diminuem lentamente, enquanto a atividade sérica da fosfatase alcalina (FA) na maioria das vezes aumenta até que a colestase local seja resolvida. Conseqüentemente a FA é usualmente a última enzima hepática a retornar ao normal nos animais em resolução de uma lesão aguda.

O interesse semiológico da variação de uma atividade enzimática no soro baseia-se em grande parte na possibilidade de, a partir disso, deduzir a natureza do órgão ou do tecido lesado. Diversos critérios devem ser considerados na escolha das enzimas a dosar quando se suspeita da afecção de um órgão: a especificidade tissular da enzima, a sensibilidade de suas variações e a confiabilidade da dosagem.

Diversos métodos permitem obter uma especificidade de órgão satisfatória, como por exemplo: a escolha de enzimas específicas de um tecido, o estudo de enzimas múltiplas e o estudo das isoenzimas.

O ideal seria dispor, para cada órgão, de uma enzima específica, mas como esta situação é raramente

encontrada, a dosagem da atividade das enzimas mais abundantes em um tecido, pode fornecer resultados precisos sobre a origem da afecção, assim como nos casos de falta de especificidade para um órgão, uma segunda enzima pode ser combinada com a primeira para aumentar o valor diagnóstico. Um exemplo que pode ser citado é o caso da fosfatase alcalina (FA) sérica que pode encontrar-se aumentada em doenças ósseas e hepáticas. Para confirmar que seu aumento é de origem hepática, a alanina aminotransferase (ALT) ou a gama glutamiltransferase (GGT) são incluídas no perfil hepático. Além disso, a variação das atividades enzimáticas não são necessariamente paralelas no tempo, podendo-se aproveitá-las para o estudo da evolução da doença. No que se refere às isoenzimas, sua determinação permite melhorar consideravelmente a especificidade do órgão de uma dosagem enzimática, mas alonga geralmente o prazo de obtenção dos resultados, sem falar que estes não são rotineiramente determinados no laboratório.

Desenvolvimento do teste enzimático clínico

Uma enzima para ser valiosa como um auxílio ao diagnóstico deve ser dosada de forma rápida e econômica e refletir razoavelmente uma alteração patológica em um tecido, órgão ou grupo de órgãos.

A sensibilidade e especificidade diagnóstica clínica de uma enzima para uma determinada doença ou lesão devem ser criticamente avaliadas, pois são de extrema importância para que uma nova metodologia enzimática tenha credibilidade.

Uma vez que as enzimas citoplasmáticas estejam livres na célula e no fluido extracelular, plasma, fluido cerebrospinal, urina ou leite, suas atividades podem ser mensuradas como um índice de integridade celular. Entretanto, esta afirmação não é verdadeira para as enzimas ligadas à membrana, tais como a GGT e FA, cujas atividades plasmáticas podem estar alteradas sem uma perda de integridade da célula.

Para ser de valor diagnóstico, a enzima sérica deve ter mais do que alta especificidade tissular. Variáveis a serem consideradas quando determinado o valor diagnóstico de uma enzima são o limite de referência da atividade individual dentro da população referencial, a localização anatômica da célula, a localização da enzima na célula, a massa total do tecido ou tipo celular e a meia-vida plasmática. Um amplo limite na referência da atividade enzimática plasmática ou sérica de uma população, tal como a FA sérica em ruminantes, torna di-

ficil determinar quando um valor do indivíduo torna-se anormal, diminuindo, assim, a sensibilidade do teste.

Fatores que afetam a atividade enzimática

A atividade enzimática intracelular é usualmente 1000 vezes maior que no soro. A atividade sérica normal provavelmente reflete um balanço entre a morte celular fisiológica (liberação) e a degradação/inativação pelo sistema monofagocítico ou, menos comumente, a excreção. A regeneração celular pode também contribuir para a atividade enzimática no soro.

Quando há uma lesão tecidual ocorre um aumento na liberação de algumas enzimas. A magnitude deste aumento está na dependência de vários fatores como por exemplo: a concentração tecidual da enzima (que varia com o tipo de tecido e entre as espécies), a localização celular da enzima, a amplitude do dano tecidual, o tipo de lesão e a taxa de remoção enzimática pelo soro.

A lesão pode variar desde uma morte celular completa (dano às membranas e organelas) até distúrbios metabólicos sem alterações celulares visíveis microscopicamente. Por exemplo, em caso de anemia aguda ou falência cardíaca, a anóxia pode causar exocitose ou formação, na membrana, de vesículas, cujas enzimas citosólicas são lançadas no plasma circunvizinho, o que mantém a célula viável.

A maioria das elevações das enzimas no soro parecem ser resultado de um aumento da liberação, da concentração enzimática tecidual, seguido por um aumento na produção durante um processo reparativo, contribuindo para a elevação da atividade enzimática. Entretanto, certas enzimas como a FA hepática e a GGT estão presentes em muito baixas concentrações teciduais. A elevação destas enzimas no soro está associada com um aumento da síntese secundária a um estímulo. Existem dois estímulos mais comumente envolvidos na indução da síntese enzimática: o desequilíbrio do fluxo biliar e algumas substâncias como hormônios e drogas.

As reações enzimáticas podem ainda ser afetadas por inúmeros fatores como temperatura, pH, concentração do substrato, cofatores, inibidores e estabilidade do reagente. Conseqüentemente, o valor da atividade enzimática no soro pode variar entre testes laboratoriais da mesma amostra.

A determinação dos valores de referência para cada enzima deve ser feito por todo laboratório. Eventualmente, o valor de referência deve ser avaliado periodicamente, porque o laboratório pode mudar a metodologia.

Substâncias	ALT	AST	Fosfatase alcalina	GGT	Amilase	Lipase	CPK	Substâncias (cont.)	ALT	AST	Fosfatase alcalina	GGT	Amilase	Lipase	CPK
Costicosteróides	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↑	Hormônios							
Esteróides anabólicos	↑		↑					Estrógeno					↑		
Antiinfla.não esteróides								Ácido ascórbico		V					
Acetaminofen	↑							Asparginase	↑				↑	↑	
Aspirina	↑							Azatioprina	↑		↑		↑	↑	
Dipirona							↓	Barbituratos	↑		↑				
Ibuprofen	↑							Cimetidina	↑				↑		
Fenilbutazona	↑							Furosemda					↑		
Antibióticos								Heparina						↑	
Sulfonamidas	↑		↑		↑	↑		Metimazol			↑				
Tetraciclina					↑	↑		Metronidazol		↓			↑		
Anticonvulsivantes								Fenotiazinas			↑				
Fenobarbital	↑		↑	↑				Salicilatos	↑	↑					
Fenitoína	↑		↑					Teofilina			↓				
Primidona	↑		↑					Tiacetarsamida	↑						

Fonte: reproduzido em parte de Meyer & Harvey (1998)
 ↑, valor aumentado devido a alterações fisiológicas; ↓, valor diminuído devido a alterações fisiológicas; ↓, valor diminuído devido à interferência, com alterações na metodologia ou coleta; v, mudança variável, dependendo da metodologia.

Quadro 1 - Efeito de drogas e hormônios na determinação de enzimas no soro e plasma.

Uma história clínica completa é essencial para interpretar os valores do laboratório porque muitas drogas (Quadro 1) são causas de alterações na atividade da enzima.

Cuidados com a colheita e metodologias empregadas

A colheita deve ser tão estéril quanto possível para evitar uma eventual contaminação das amostras por microorganismos. A dosagem deve ser efetuada o mais rapidamente, para evitar a perda de atividade por desnaturação no curso da conservação. A presença de ativadores ou de inibidores pode influenciar fortemente as atividades enzimáticas, por isso é indispensável utilizar materiais de vidro muito limpos. As dosagens enzimáticas podem ser realizadas no soro ou no plasma, de acordo com a enzima requerida.

Os frascos de colheita de plástico e vidro devem ser bem limpos. Detergentes interferem em muitos testes e só uma perfeita lavagem pode diminuir-lhes o resíduo de maneira que não venha a interferir com o teste. Sempre que possível frascos de colheita acessíveis comercialmente são recomendados.

Uma boa técnica deve ser tão simples quanto possível, no que se refere à economia de tempo e de pessoal. Ela deve ser precisa, a fim de que, em primeiro lugar, a técnica escolhida ofereça o mínimo de erros e, em segundo lugar, leve em conta, na interpretação do resultado, a margem de erro. Ela deve ser sensível, isto é, se for aplicada várias vezes na mesma amostra, eventualmente em diversos dias consecutivos, deve fornecer um resultado senão idêntico, pelo menos compreendido dentro de certos limites definidos. O método deve ser exato, isto é, o resultado encontrado em um laboratório deve ser idêntico (nos limites do desvio-

padrão) aos resultados encontrados em outros laboratórios. Enfim, o método deve ser específico, ou seja, ele deve permitir dosar somente o composto visado, sem interferência de outras moléculas.

Qualidade da amostra

Muitas enzimas requerem íons metálicos para sua atividade máxima, por isso o plasma contendo anticoagulantes quelantes como o EDTA, o citrato ou o oxalato são inadequados para estes testes. Em alguns procedimentos o plasma heparinizado pode ser usado, entretanto, recomenda-se, em caso de dúvida, a utilização do soro sanguíneo.

Algumas enzimas são muito estáveis à temperatura ambiente. A refrigeração e o congelamento preservam muitas enzimas, mas outras deterioram quando congeladas, pois este procedimento resulta em uma concentração de sais e enzimas e desagregação de algumas ligações peptídicas fracas. Vale ressaltar que a estabilidade de uma enzima em uma espécie não significa necessariamente sua estabilidade em outra espécie.

A hemólise, a lipemia, além de outros compostos, podem interferir com a dosagem enzimática, resultando em elevação ou diminuição de sua atividade (Quadro 2). Em alguns casos, a hemólise resulta em liberação de enzimas eritrocitárias no soro. Leucócitos e hemácias devem ser separados do soro tão rapidamente quanto possível, em razão destas células, quando hipoglicêmicas, liberarem lactato desidrogenase (LDH) e aspartato aminotransferase (AST) no soro, mesmo antes de hemólise aparente. A lipemia pode causar uma falsa diminuição ou aumento na atividade enzimática como resultado de uma interferência com o método utilizado, uma vez que este composto compromete a refração natural da luz.

Controle de qualidade dos exames

O controle de qualidade e segurança na enzimologia clínica são parte dos planos de administração de qualidade total e procedimentos de um laboratório e difere pouco de outras partes do laboratório.

Os responsáveis pelo laboratório devem considerar todos os fatores que determinam a qualidade do serviço. Dentre os fatores que fa-

Variáveis paciente/colheita	ALT	AST	Fosfatase alcalina	GGT	Amilase	Lípase	CPK	SDH
Lipemia	↑	↑	↑	V	↓			
Hemólise	↑	↑	↓		↑	↑	↑	
Icterícia			↑			V		
Cetonemia		↑						
Animais imaturos			↑	↑*				
Envelhecimento (3-12 anos)				↓				
Anticoagulantes								
EDTA			↓		↓	↓	↓	↓
Oxalato			↓		↓	↓	↓	↓
Citrato			↓		↓	↓	↓	↓
Fluoreto			↓		↓			
Luz UV							↓	

Fonte: reproduzido em parte de Meyer & Harvey (1998) ↑, valor aumentado devido a alterações fisiológicas; ↓, valor diminuído devido a alterações fisiológicas; ↑, valor aumentado devido à interferência com alterações na metodologia ou coleta; ↓, valor diminuído devido à interferência com alterações na metodologia ou coleta; v, mudança variável, dependendo da metodologia; * se lactente

Quadro 2 - Efeitos de vários fatores na determinação das enzimas no soro e plasma.

zem a qualidade dos exames laboratoriais, destacam-se: a pureza dos reagentes, a exatidão dos padrões, a precisão da aparelhagem, a limpeza do material, a calibração dos aparelhos, a perícia técnica dos analistas e a utilização de cálculos apropriados.

ENZIMA	ESTOCAGEM	TEMPO (DIAS)	ATIVIDADE (%)
α-Amilase	Temperatura ambiente	8	100
Creatina-quinase	Temperatura ambiente	1	25
	0-4°C	1	32-65
Glutamato desidrogenase	Congelada	8	25
	Temperatura ambiente	2	60
Aspartato aminotransferase	0-4°C	2	60-100
	Congelada	2	60
Alanina aminotransferase	Temperatura ambiente	4	90
		8	87
		2	90
L- Lactato desidrogenase	Temperatura ambiente	4	75
		8	78
		8	31
Fosfatase alcalina	Temperatura ambiente	8	74-88
		8	81
		8	81
Sorbitol desidrogenase	Temperatura ambiente	8	71
		8	71
		8	68
Sorbitol desidrogenase	Espécie dependente	-	-
		0-4°C	8

Fonte: Kaneko et al. (1997)

Quadro 3 - Estabilidade das enzimas no soro.

A negligência de qualquer um destes fatores afetará a marcha da análise e o resultado final. A fidedignidade da informação que o laboratório fornece ao clínico depende ainda de outra série de fatores que in-

cluem as manipulações, a capacidade profissional do pessoal, as condições de colheita, a estocagem (Quadro 3) e estabilização das amostras, o seu transporte, o preparo do material, dentre outros.

SUMMARY

The veterinary clinical enzymology has become an important tool for clinicians, aiding in the diagnosis of several diseases. The objective of this paper was to review the main factors affecting plasma or serum enzyme determinations which could lead to results misinterpretation.

Key words: Veterinary clinical enzymology. Chemistry profile. Veterinary clinical pathology. Artifacts.

RESUMEN

La enzimología clínica veterinaria ha adoptado un importante papel en los tiempos actuales, principalmente en lo que se refiere al auxilio diagnóstico de diversas enfermedades. Este trabajo tuvo por objeto presentar una revisión sobre los principales factores que interfieren en las determinaciones de las enzimas en el suero y en el plasma y que pueden acarrear una interpretación inadecuada de los resultados.

Palabras clave: Enzimología clínica veterinaria. Bioquímica. Patología clínica veterinaria. Artefactos.

REFERÊNCIAS

- ANDREASEN, C. B.; ANDREASEN, J. R.; THOMAS, J. S. Effects of hemolysis on serum chemistry analytes in ratites. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 26, n. 4, p. 165-171, 1997.
- BOREL, J. et al. **Como preservar e interpretar um exame laboratorial** - Bioquímica Médica. São Paulo: Organização Andrei, 1984. 671 p.
- HORNEY, B. S. et al. Stability of sorbitol dehydrogenase activity in bovine and equine sera. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 22, n. 1, p. 5-9, 1993.
- HUXTABLE, C. R. R. The liver and exocrine pancreas. In: ROBINSON, W. F.; HUXTABLE, C. R. R. **Clinicopathologic principles for veterinary medicine**. Cambridge: Cambridge University Press, 1988. p. 194-215.
- JACOBS, R. M.; LUMSDEN, J. H.; GRIFT, E. Effects of bilirubinemia, hemolysis, and lipemia on clinical chemistry analytes in bovine, canine, equine, and feline sera. **Canadian Veterinary Journal**, v. 33, n. 9, p. 605-608, Sept. 1992.
- KRAMER, J. W.; HOFFMANN, W. E. Clinical enzymology. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. New York: Academic Press, 1997. p. 303-326.
- LEHNINGER, A. L. **Princípios da bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1988. 725 p.
- MEYER, D. J.; HARVEY, J. W. **Veterinary laboratory medicine - Interpretation and diagnosis**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1998. 373 p.

MOURA, R. A. A. Enzimologia clínica. In: _____. **Técnicas de laboratório**. São Paulo: Atheneu, 1982. p. 211-256.

O'NEILL, S. L.; FELDMAN, B. F. Hemolysis as a factor in clinical chemistry and hematology of the dog. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 18, n. 3, p. 58-67, 1989.

PINCUS, M. R.; ZIMMERMAN, M. D.; HENRY, J. B. Clinical enzymology. In: HENRY, J. B. **Clinical diagnosis management by laboratory methods**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1991. p. 250-284.

SILVA, V. L. G. et al. Efeitos da glicólise na dosagem de glicose. **Jornal Brasileiro de Patologia**, v. 34, n. 3, p. 203, 1998.

THORESEN, S. I. et al. Effects of storage time on chemistry

results from canine whole blood, heparinized, plasma. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 21, n. 3, p. 88-94, 1992.

TVEDTEN, H. Referral, and In-office laboratories. In: WILLARD, M. D.; TVEDTEN, H.; TURNWALD, G. H. **Small animal clinical diagnosis by laboratory methods**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1989. p. 1-13.

WANER, T.; NYSKA, A. The influence of fasting on blood glucose, triglycerides, cholesterol, and alkaline phosphatase in rats. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 23, n. 3, p. 78-80, 1994.

WILLARD, M. D. Gastrointestinal, pancreatic, and hepatic disorders. In: WILLARD, M. D.; TVEDTEN, H.; TURNWALD, G. H. **Small animal clinical diagnosis by laboratory methods**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1989. p. 189-228.