

# Enzimologia clínica - Introdução

## AS ENZIMAS DO PLASMA

- Função fisiológica:
  - renina
  - factores de coagulação
- Libertadas das células resultante:
  - do "turnover" normal da célula (intervalo de referência)
  - da lesão celular

## DIAGNÓSTICO ENZIMOLÓGICO

Determinação da actividade enzimática no soro pode fornecer informações ao diagnóstico em relação ao local e extensão da lesão

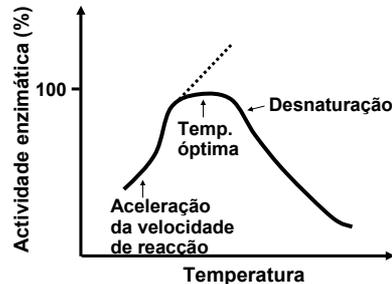
# Enzimologia clínica - Diagnóstico enzimológico

## DIAGNÓSTICO ENZIMOLÓGICO:

▪ Lesão celular isolada	ligeira	grave	grave	grave
▪ Extensão da lesão celular	grande	grande	pequena	pequena
▪ Evolução do processo	rápido	rápido	lento	rápido
▪ Subida da actividade enzimática	alta	alta	moderada	escassa
▪ Deformação	intensa	escassa	moderada	escassa
▪ Exemplo	Hepatite aguda	Intoxicação por fungos	Cirrose	Icterícia obstrutiva

## Enzimologia clínica - Diagnóstico enzimológico

- Quando há lesão patológica celular, há maior libertação de enzimas, havendo um aumento da sua concentração sérica
- Porém o aumento da concentração sérica pode também ser devida:
  - Aumento do “turnover” celular
  - Aumento da quantidade ou actividade da enzima
  - Libertação na corrente sanguínea da enzima devido a haver obstrução dos canais
  - Diminuição da clearance da enzima no soro
    - A maioria das enzimas é, provavelmente, removida pelo retículo endoplasmático
    - Pequenas moléculas (ex.: amilase) são filtradas pelo glomérulo
- As condições do ensaio têm de estar optimizadas e padronizadas de forma a fornecer resultados fiáveis e reprodutíveis
  - os valores de referência dependem das condições do ensaio:
    - temperatura (factor de conversão específico da enzima)
    - variações fisiológicas



## Enzimologia clínica - Diagnóstico enzimológico

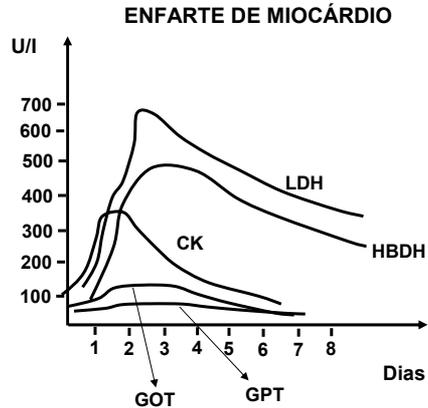
- Uma desvantagem do uso de enzimas no diagnóstico de lesões tecidulares é a **falta de especificidade** para um tecido particular ou tipo de célula
    - Muitas enzimas existem em mais do que um tecido  $\Rightarrow$  aumento pode reflectir lesão de qualquer um dos tecidos
- ↓
- os diferentes tecidos podem conter (e libertar quando lesados) duas ou mais enzimas em proporções diferentes
  - algumas enzimas existem sob a forma de isoenzimas (muitas vezes características de um determinado tecido)
- 
- Após uma lesão do tecido, a actividade da enzima intracelular umenta no soro em proporção à lesão celular, diminuindo a sua concentração proporcionalmente à depuração da enzima  $\Rightarrow$  importante considerar o tempo de **intervalo entre a lesão celular e a colheita**
    - Se a colheita for muito cedo, pode a enzima ainda não ter chegado à corrente sanguínea
    - Se a colheita for muito tarde, pode a enzima já ter sido totalmente eliminada

## Enzimologia clínica - Diagnóstico enzimológico

- Tempos médios de vida no plasma de algumas enzimas de uso corrente no diagnóstico:

GOT	17±5 horas
GPT	47±10 horas
LDH <sub>1</sub> (HBDH)	113 ±60 horas
LDH <sub>5</sub>	10 ±2 horas
CK	Aprox. 15 horas
AP	3-7 dias
γ-GT	3-4 dias
Amilase	3-6 dias
Lipase	3-6 dias

HBDH - LDH<sub>1</sub> tem maior actividade catalítica com o α-hidroxiacetato (como substrato) do que com o lactato (maior actividade com as outras isoenzimas), logo recebe o nome de α-hidroxiacetato desidrogenase (HBDH)



Só o LDH e o HBDH permite diagnosticar após o 5º/6º dia

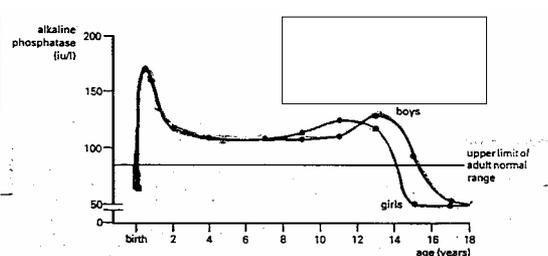
## Enzimologia clínica - Enzimas com valor diagnóstico e seus métodos de análise

### FOSFATASE ALCALINA (ALP)

- Enzima presente em elevadas concentrações no fígado, ossos (osteoblastos), placenta e intestino

- Causas de aumento sérico:
  - Fisiológico:
    - gravidez (último trimestre)
    - infância
  - Patológico:
    - doença de Paget (aumento da actividade osteoblástica)
    - colestase
    - cirrose
    - tumores ósseos
    - doença inflamatória do intestino, ....

Atenção à idade da pessoa

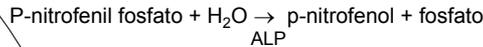


## Enzimologia clínica - Enzimas com valor diagnóstico e seus métodos de análise

### FOSFATASE ALCALINA (ALP) (cont.)

- Determinação da fosfatase alcalina

#### MÉTODO



- determinação cinética a pH alcalino
- p-nitrofenol tem uma absorção máxima a 405 nm
- o aumento da absorvância é directamente proporcional à actividade de ALP na amostra

Intervalo de referência (adulto): 20-70 U/L (30°C)

- Determinação de isoenzimas (permite determinar o tecido de origem da enzima)

Fonte da enzima	%inibição calor
Fígado	60
Ósseo	90
Intestino	60
Placenta	0
Carcinoma	0

Table 59-10 Methods for measurement of alkaline phosphatase (ALP) isoenzymes

Method	Principle	Usage	Comment
1. Electrophoresis	Total charge of various isoenzymes differ, allowing differential migration in electric field	Most frequently used technique	Incomplete separation; bone and liver often not completely resolved
2. Polyacrylamide gel	Separation by both charge and molecular weight	Frequently used	Best separation, difficulty in densitometric scanning; qualitative estimation of isoenzymes
b. Cellulose	Separation by charge	Some usage	Bone and liver not completely resolved
3. Heat inactivation	Heat inactivation rates of isoenzymes differ. Rate of inactivation after incubation at 50° C is suggestive of presence of bone or liver isoenzymes	Frequently used	Calculation is made more difficult by presence of intestinal or other merc heat-stable isoenzyme forms
3. Chemical inactivation	L-Phenylalanine and urea inactivate different isoenzymes at different rates	Some usage; can be automated on a centrifugal analyzer	Regan-like isoenzyme activities differentiated from bone and liver

## Enzimologia clínica - Enzimas com valor diagnóstico e seus métodos de análise

### FOSFATASE ÁCIDA (ACP)

- Enzima presente em elevada concentração na glândula prostática, mas tb nos GV, plaquetas, ossos, fígado e baço

- Causas de aumento sérico:
  - A concentração aumenta em 20% dos doentes com tumores confinados à glândula prostática.
  - A concentração está elevada em 80% dos doentes com metástases, sendo usado como um marcador tumoral
  - Alguns casos de prostatite
  - Hipertrofia prostática benigna
  - Doenças dos ossos
  - trombocitémia

Retirar a amostra para análise antes do exame clínico, visto que o exame é realizado por toque rectal que pode originar libertação de ACP na circulação, produzindo um aumento passageiro da actividade enzimática.

- É uma enzima pouco estável:
  - transportar rapidamente para o laboratório, manter o soro arrefecido até a realização da análise.
  - A pH acima de 6 é inactivada (aconselhável adicionar um estabilizador-ácido)

## Enzimologia clínica - Enzimas com valor diagnóstico e seus métodos de análise

### FOSFATASE ÁCIDA (ACP) (cont.)

- Métodos de determinação da fosfatase ácida

Amostra: Soro e plasma heparinizado. O oxalato e detergente inibe a enzima.

Rejeitar amostras hemolisadas

Intervalo de referência:  
0,5 - 1,9 U/L

Table 59-1 Summary of methods for acid phosphatase (ACP) measurement in body fluids

Source of method	Type of analysis	Principle	Usage	Comments	K <sub>m</sub> for PAP (mmol/L)
Gutman and Gutman <sup>1</sup>	End-point spectrophotometric	Substrate: monophenyl phosphate Liberated phenol measured with Folin-Ciocalteu reagent	Serum, manual	Historical interest only; insensitive substrate	0.09
Jaffé and Bodansky <sup>2</sup>	End-point spectrophotometric	Substrate: β-glycerophosphate Measure liberated phosphate with color reaction	Serum, manual	Historical interest only; long incubation times; high background absorbance	2.0
Hudgin et al. <sup>3</sup>	End-point or kinetic spectrophotometric	Substrate: p-nitrophenol phosphate Measure release of p-nitrophenol (colorless to yellow)	Serum, manual or automated	Sensitive, self-indicating substrate; not specific for PAP	0.31
Huggins and Takaiya <sup>4</sup>	End-point or kinetic spectrophotometric	Substrate: phenolphthalein phosphate Released phenolphthalein measured colorimetrically after addition of base	Serum, manual or automated	Self-indicating but relatively insensitive substrate	n.a.
Seligman et al. <sup>5</sup>	End-point or kinetic spectrophotometric	Substrate: β-naphthyl phosphate Liberated β-naphthol complexed with o-dianisidine to form dye	Serum, manual or automated	Multistep procedure; colored product requires extraction before reading	n.a.
Babson and Bead <sup>6</sup>	End-point or kinetic spectrophotometric	Substrate: o-naphthyl phosphate Liberated o-naphthol complexed with o-dianisidine to form dye	Serum, manual or automated	Multistep procedure; precise timing required; no extraction involved	0.39
Roy et al. <sup>7</sup>	Kinetic spectrophotometric	Substrate: thymolphthalein monophosphate Measure liberated thymolphthalein after addition of base	All body fluids and tissues; manual or automated	Simple procedure; sensitive, self-indicating substrate; high specificity for PAP	1.2
Ewen <sup>8</sup>	End-point or kinetic spectrophotometric	Substrate: thymolphthalein monophosphate Measure liberated thymolphthalein after addition of base	All body fluids and tissues; manual or automated	Modification of Roy et al. <sup>7</sup> ; enhanced sensitivity of substrate; preferred method	n.a.
Rietz and Oudbaak <sup>9</sup>	Fluorometric kinetic	Substrate: 4-methylumbelliferone phosphate Measure rate of appearance of fluorescent 4-methylumbelliferone	All body fluids and semi-solids; manual or automated	Highly sensitive substrate; equipment expense may be limitation	n.a.

\*PAP, Prostatic acid phosphatase; n.a., not applicable.

## Enzimologia clínica - Enzimas com valor diagnóstico e seus métodos de análise

### ASPARTATO AMINOTRANSFERASE (AST ou GOT) e ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT ou GPT)

- Designadas por transaminases. Ambas amplamente distribuídas pelo organismo. A concentração de GPT é menor em todos os tecidos.
- Causas de aumento sérico da GOT:
  - Hepatite aguda e necrose do fígado
  - Hipoxémia severa dos tecidos
  - Enfarte de miocárdio
  - Doença muscular esquelética
  - Colestasis
  - Fisiológico (neonatal)
  - Outras doenças do fígado
  - Pancreatite
  - Hemólise

A GPT plasmática está aumentada em igual extensão em doenças do fígado (na hepatite a GPT pode ultrapassar a GOT), mas em menor extensão em outras condições. O Índice de Ritis (GPT/GOT) normalmente inferior a 1, torna-se maior que a unidade nesta situação (principalmente hepatite de origem viral).

## **Enzimologia clínica** - Enzimas com valor diagnóstico e seus métodos de análise

### **ASPARTATO AMINOTRANSFERASE (AST ou GOT) e ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT ou GPT)** (cont.)

- Métodos de determinação da GOT (não tem isoenzimas) e GPT

#### Amostra:

GOT - soro (preferido) ou plasma (não usar anticoagulantes com amônia).  
Rejeitar amostras hemolisadas.

GPT - O oxalato, heparina e citrato não inibem a actividade enzimática mas podem introduzir uma pequena turvação.

É estável no soro durante 3 dias à temperatura ambiente e 1 semana a 4°C.

- a urina tem pouca ou nenhuma actividade e não é recomendada

#### Intervalo de referência

GOT: Adulto: 8 - 33 U/L (37°C)

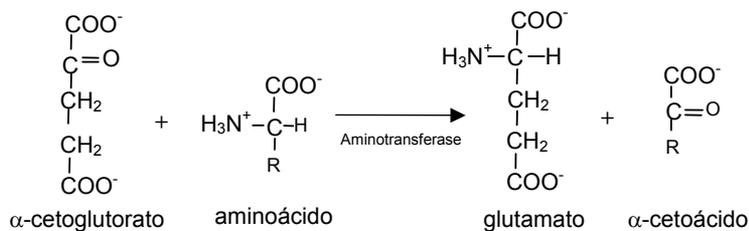
GPT: 4-36 U/L (37°C)

Recém-nascido e crianças: 2x superior ao adulto (normaliza ao fim de 6 meses de vida)

## **Enzimologia clínica** - Enzimas com valor diagnóstico e seus métodos de análise

### **ASPARTATO AMINOTRANSFERASE (AST ou GOT) e ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT ou GPT)** (cont.)

- Métodos de determinação da GOT (não tem isoenzimas) e GPT (cont.)



# Enzimologia clínica - Enzimas com valor diagnóstico e seus métodos de análise

## ASPARTATO AMINOTRANSFERASE (AST ou GOT) e ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT ou GPT) (cont.)

- Métodos de determinação da GOT (não tem isoenzimas) e GPT (cont.)

Table 59-23 Methods of aspartate aminotransferase (AST) analysis *AST*

Method	Type of analysis	Principle*	Usage
1. Dinitrophenylhydrazine coupling (colorimetric) (Reitman and Frankel <sup>1</sup> )	Quantitative	$\text{Asp} + \alpha\text{-KG} \xrightarrow{\text{AST}} \text{G} + \text{Oa}$ <p>Ox: Dinitrophenylhydrazine    Oa-dinitrophenylhydrazone (absorbance at 505 nm)</p>	Serum†
2. Enzymatic (ultraviolet monitoring) (Karmen <sup>2</sup> )	Quantitative	$\text{Asp} + \alpha\text{-KG} \xrightarrow{\text{AST}} \text{G} + \text{Oa}$ <p>Ox: Oxalo-glutarate    Oa: Malic acid</p>	Serum†
3. Diazonium dye coupling (colorimetric)	Quantitative	$\text{Asp} + \alpha\text{-KG} \xrightarrow{\text{AST}} \text{G} + \text{Oa}$ <p>Ox: Oxaloacetate    Oa: Oxalo-diazonium dye</p>	Serum†

\*Asp, Aspartic acid; α-KG, α-ketoglutaric acid; G, glutamic acid; Oa, oxaloacetic acid. †Historical; most frequently used.

# Enzimologia clínica - Enzimas com valor diagnóstico e seus métodos de análise

## ASPARTATO AMINOTRANSFERASE (AST ou GOT) e ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT ou GPT) (cont.)

- Métodos de determinação da GOT (não tem isoenzimas) e GPT (cont.)

Table 59-5 Methods of alanine aminotransferase (ALT) analysis *GPT*

Method	Type of analysis	Principle*	Usage
1. Dinitrophenylhydrazine (DNPH) coupling (colorimetric) (Reitman and Frankel <sup>1</sup> )	Quantitative	<i>End-point absorbance measurement at 505 nm:</i> $\text{Ala} + \alpha\text{-KG} \rightarrow \text{G} + \text{Pyr}$ $\text{Pyr} + \text{DNPH} \rightarrow \text{Pyr-DNP-hydrazone}$	Serum, rarely performed assay
2. Enzymatic (ultraviolet monitoring) (Wróblewski and LaDue <sup>2</sup> )	Quantitative	<i>UV monitoring of NADH disappearance at 340 nm:</i> $\text{Ala} + \alpha\text{-KG} \rightarrow \text{G} + \text{Pyr}$ $\text{Pyr} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{LD}} \text{Lac} + \text{NAD}^+$	Serum, most frequently employed procedure
3. Enzymatic (fluorescence)	Quantitative	<i>Fluorescence monitoring of NADH disappearance:</i> Same reactions as above	Serum, rarely used (high sensitivity)

\*Ala, Alanine; α-KG, α-ketoglutarate; DNP, dinitrophenyl; DNPH, dinitrophenylhydrazine; G, glutamate; Lac, lactate; NAD<sup>+</sup>, nicotinamide adenine dinucleotide; NADH, reduced nicotinamide adenine dinucleotide; Pyr, pyruvate.

## Enzimologia clínica - Enzimas com valor diagnóstico e seus métodos de análise

### $\gamma$ -GLUTAMIL TRANSPEPTIDASE ( $\gamma$ -GT)

- Encontra-se em concentrações elevadas:
  - Fígado
  - Rins
  - Pâncreas
- Causas de aumento sérico da  $\gamma$ -GT:
  - Colestase
  - Doença hepática de origem alcoólica
  - Hepatite
  - Cirrose
  - Pancreatite
- Ingestão excessiva de álcool (pode manter-se até 3 a 4 semanas após a suspensão da ingestão, mesmo na ausência de lesão hepática) - existem exceções

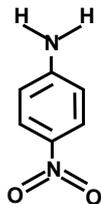
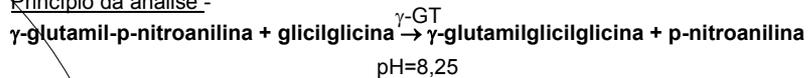
Importante indicador da disfunção hepática, podendo apresentar valores elevados em colestases, antes dos valores da fosfatase alcalina estarem elevados.

## Enzimologia clínica - Enzimas com valor diagnóstico e seus métodos de análise

### $\gamma$ -GLUTAMIL TRANSPEPTIDASE ( $\gamma$ -GT)

- Determinação da  $\gamma$ -GT:

Princípio da análise -



p-nitroanilina (405 nm)

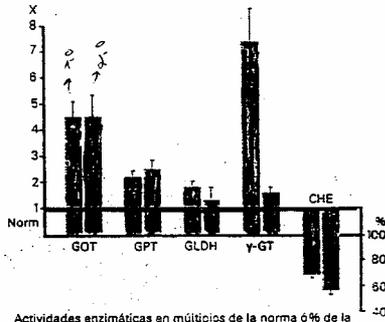
Intervalo de referência:

Mulher: 1-24 U/L (37°C)

Homem: 2-30 U/L (37°C)

## Enzimologia clínica - Enzimas com valor diagnóstico e seus métodos de análise

### Patrones enzimáticos en cirrosis hepáticas de etiología diversa

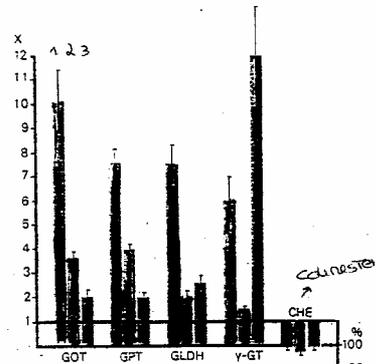


Actividades enzimáticas en múltiplos de la norma ó% de la misma

Valores medios  $\pm$  SEM (desviación standard del valor medio)

■ cirrosis alcohólica      ■ cirrosis hepática (y criptog.)

### Patrones enzimáticos en inflamaciones hepáticas crónicas de etiología diversa



Actividades enzimáticas en múltiplos de la norma ó% de la misma

Valores medios  $\pm$  SEM (desviación standard del valor medio)

■ hepatitis crón.-agr.      ■ hepatitis crón.-pers.      ■ hepatitis crón.-alcoh.

## Enzimologia clínica - Enzimas com valor diagnóstico e seus métodos de análise

### LACTATO DESIDROGENASE (LD)

- Esta enzima existe nos tecidos do corpo sob a forma de um tetramero
- Existem dois monómeros: H e M que se podem combinar em diferentes proporções originando cinco isoenzimas.

#### ISOENZIMAS DA LACTATO DESIDROGENASE E SUA DISTRIBUIÇÃO

Isoenzima	1	2	3	4	5
Subunidades	H <sub>4</sub>	H <sub>3</sub> M	H <sub>2</sub> M <sub>2</sub>	HM <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>
Soro normal	+	++	+	vestigios	vestigios
Músculo cardíaco	+++	+++	Vestigios	-	-
Eritrócito	+	+	+/-	vestigios	vestigios
Fígado	-	-	-	+	+++
Músculo esquelético	-	-	-	+	+++
Rim	++	++	+	vestigios	vestigios

+ = presente;  
- = ausente

Determina-se a concentração da LD quando se suspeita de enfarte de miocárdio e no diagnóstico de crise hemolítica na anemia falsiforme.

## Enzimologia clínica - Enzimas com valor diagnóstico e seus métodos de análise

### LACTATO DESIDROGENASE (LD)

#### ▪ Aumento da actividade da LDH

##### ▪ Lesão grave:

- fígado
- rins
- músculos

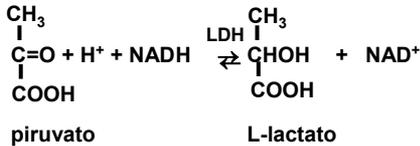
##### ▪ Anemias:

- megaloblásticas
- hemolíticas

#### ▪ Determinação da LD:

**Amostra** - soro (preferido) ou plasma (alguns anticoagulantes como o oxalato interferem com a reacção). Rejeitar amostras hemolisadas. A estabilidade enzimática varia com a temperatura (varia com as isoenzimas). A congelação resulta em perda de actividade.

#### Princípio da análise -



## Enzimologia clínica - Enzimas com valor diagnóstico e seus métodos de análise

### LACTATO DESIDROGENASE (LD) (cont.)

#### ▪ Determinação da LD :

Table 59-23 Methods of lactate dehydrogenase (LD) analysis

Method	Type of analysis	Principle	Usage	Comments
→ 1. Lactate to pyruvate (L → P)	End-point or kinetic spectrophotometric	Reaction buffered at alkaline pH to favor equilibrium to pyruvate	All body fluids Automated	Kinetic Suggested reference method
→ 2. Pyruvate to lactate (P → L)	End-point or kinetic spectrophotometric	Reaction buffered at physiological pH	All body fluids Automated	Claimed to be less linear than method 1; however, faster rate than 1
3. Dinitrophenylhydrazine	End-point spectrophotometric	Pyruvate → Lactate Unreacted pyruvate forms colored product with reagent	Manual	For laboratories without ultraviolet spectrophotometer; imprecise
4. Tetrazolium	End-point spectrophotometric	Lactate → Pyruvate + NADH Reduced NADH forms colored product by reduction of tetrazolium dye	Manual	For laboratories without ultraviolet spectrophotometer Most often used for electrophoretic isoenzyme detection

Intervalo de referência: os valores da actividade da LD no soro depende da reacção, tipo de método e parâmetros experimentais  
120-240 U/mL (adulto a 25°C) (método usado nas aulas práticas)

## Enzimologia clínica - Enzimas com valor diagnóstico e seus métodos de análise

### LACTATO DESIDROGENASE (LD) (cont.)

- Determinação das isoenzimas da LD:

Table 59-25 Methods of lactate dehydrogenase (LD) isoenzyme analysis

Method	Principle	Usage	Comments
1. Electrophoresis	At pH 8.6, major isoenzymes have different mobilities in 1% agarose; LD activity quantitatively determined by coupled dye reaction (utilizando reações coradas)	Most frequently used	Separates all five major isoenzymes
2. Anion-exchange chromatography	At pH 8.0, LD <sub>1</sub> and LD <sub>2</sub> are absorbed to a diethylaminoethyl (DEAE) type of ion-exchange resin column LD <sub>2</sub> is eluted initially, with LD <sub>1</sub> being eluted at highest salt concentrations Either stepwise reactions or gradients elute isoenzyme fractions Fractions are quantitated by standard assay	Rare	Rapid and relatively simple Separation of all isoenzymes not readily accomplished
3. Immunoprecipitation	M subunits of H <sub>3</sub> M, H <sub>2</sub> M <sub>2</sub> , HM <sub>3</sub> , and M <sub>4</sub> (LD <sub>2-5</sub> ) removed by double-antibody, solid-phase capture reaction (duplo)	Frequently used	Gives only LD <sub>1</sub> activity; rapid and relatively simple

## Enzimologia clínica - Enzimas com valor diagnóstico e seus métodos de análise

### CREATINA CINASE (CK)

- A molécula activa de CK é constituída por um dímero de dois distintos monómeros (M e B)
- Estão descritas 3 isoenzimas:
  - BB - existem principalmente no cérebro e tíróide. A sua concentração sérica normal é baixa e a subida é pequena mesmo em casos de acidente vascular cerebral.
  - MM - é a isoenzima que normalmente está presente em maior quantidade no soro, tendo como origem o músculo esquelético.
  - MB - esta isoenzima encontra-se fundamentalmente no músculo cardíaco.
    - CK-MB: 1% CKtotal no m. esq. e 45% do CKtotal no m. card.
    - CK-MM: 99% CKtotal no m. esq. e 55% do CKtotal no m. card.
- Causas de aumento da creatina cinase
  - Enfarte de miocardio
  - Após uma cirurgia
  - Trauma a nível do músculo esquelético
  - Exercício severo
  - Fisiológico (neonatal)

## Enzimologia clínica - Enzimas com valor diagnóstico e seus métodos de análise

### CREATINA CINASE (CK) (cont.)

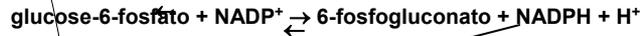
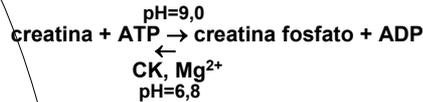
- Determinação da creatina cinase

**Amostra** - soro (preferido) que deve ser separado rapidamente, plasma (com heparina, devido a que outros inibem a enzima), fluido cerebrospinal e líquido amniótico.

O soro deve ser armazenado no escuro a 4°C ou -20°C se a análise não for realizada de imediato.

#### Princípio da análise -

Oliver (método cinético) - pH=6,8



A taxa de aumento na absorvância a 340 nm é a medida da actividade da CK presente na amostra.

**Intervalo de referência:** Homem - até 160 U/L

Mulher - até 130 U/L

Recém-nascidos - 2 a 3 vezes o valor do adulto

## Enzimologia clínica - Enzimas com valor diagnóstico e seus métodos de análise

### CREATINA CINASE (CK) (cont.)

- Determinação das isoenzimas da creatina cinase

Table 59-21 Methods for creatinine kinase (CK) isoenzyme analysis

Method	Principle	Usage	Comments
1. Agarose gel electrophoresis <i>Os meios do suporte variam de caso para caso.</i>	At pH 8.6, major isoenzymes have different mobilities in 1% agarose; CK activities detected by coupled enzymatic assay (fluorescent or visible).	Most frequently used technique	Separates all three major isoenzymes Rapid, relatively simple Minute sample volume Unusual isoenzyme forms such as macro-CK; easily detectable
2. Ion-exchange chromatography	At pH 6.7, CK-MM isoenzyme does not absorb onto column and elutes; CK-MB is eluted from column with buffer of different ionic strength.	Historical usage; was most frequently used method for CK-MB activity quantitation	Reference method for quantitation of CK-MB activity Requires rigorous control of assay parameters for accurate performance
3. Immunoinhibition	M subunits of CK-MM and CK-MB are inactivated by reaction with anti-M antibody; measure remaining B subunit activity.	Frequently used	Can be subject to interference by CK-BB
4. Radioimmunoassay	Competitive binding assay for B or M subunits	Rarely used	Clinical utility of this assay not yet proved
5. Two-site (sandwich) immunoassay	Anti-M or -B Ab binds MM and MB or MB and BB. Labeled second Ab, anti-B or -M, used to detect MB.	Increased use	Requires dedicated analyzer



## Enzimologia clínica - Enzimas com valor diagnóstico e seus métodos de análise

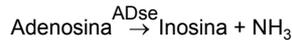
### 5'-NUCLEOTIDASE (5'-NT)

- Causas de aumento da 5'-NT
  - Doenças hepato-biliares
  - Malignidades

- Determinação da 5'-NT

Amostra - soro

Princípio da análise -



Não existe método de referência (fosfatases ácidas e alcalinas hidrolisam os fosfatos de estér):



(usar Ni<sup>+</sup> → inibe a acção da 5'-NT)

Table 59-28 Methods of 5'-nucleotidase analysis

Method	Type of analysis	Principle	Comments
1. Colorimetric	a. Phosphate release	Phosphate produced as product of substrate hydrolysis	Cannot be used when enzyme diversion methods used
	b. Ammonia formation	5'-AMP forms inosine, which can be determined to form NH <sub>3</sub>	High serum ammonia causes increased values
	c. Inosine release	5'-AMP forms inosine, which can be converted to hypoxanthine and/or uric acid and H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	High absorbance
2. Spectrophotometric	a. Xanthine oxidase	Monitors hypoxanthine reaction but using 293 absorbency	High serum absorbance
	b. NADPH linked	As in Equations 59-4 to 59-6, but reaction of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> coupled to NADP formation (Equations 59-7 and 59-8)	—

Intervalo de referência: 0-11 U/L (37°C)

## Enzimologia clínica - Enzimas com valor diagnóstico e seus métodos de análise

### LIPASE (LPS)

- Util no diagnóstico de pancreatite. No entanto os métodos de determinação não a determinam de forma exacta e reprodutível.

- Determinação da LPS

Amostra - soro ou fluido duodenal (armazenados a 4°C até serem analisados).

Evitar estar sempre a refrigerar e a degelar.

- normalmente não é encontrado na urina.

Princípio da análise



A lipase actua apenas sobre a interface estér-água. Logo os substractos devem estar sob a forma de emulsões. Uma emulsão não adequada permitirá a actuação de enzimas não lipases.

Method	Principle	Usage	Comments
1. Titration of released fatty acids	Reaction A: Triglyceride $\xrightarrow{\text{LPS}}$ Monoglyceride + 2 fatty acids		
	(a) Reaction A with fatty acid + NaOH titration to neutrality using phenolphthalein indicator	Used	Cherry-Crandall method
	(b) Reaction A with titration of released acids using pH meter to assess end point	Rarely used	Requires a pH meter accurate to $\pm 0.01$ units
2. Colorimetric	(a) Reaction A with released fatty acids reacting with Spectru Cationic Blue dye to form blue complex	Rarely used	
	(b) Reaction A with released fatty acids reacting with Cu <sup>2+</sup> ions	Rarely used	
	(c) Reaction A with released fatty acids changing the color of pH indicator, methyl red	Rarely used	

Intervalo de referência: 2-7,5 U/mL (após 60 anos aumenta em cerca de 20%)