

TERMOATIVAÇÃO DA TRANSAMINASE GLUTÂMICO OXALOACÉTICA ¹

HÉLION PÓVOA JR. *, **PAULO CESAR CARVALHO DE ALMEIDA ****,
ORLANDO O. ALVES ** e **NEUSA MARCONDES *****

Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Guanabara
(Com 2 figuras)

SUMÁRIO: Estudou-se a atividade da transaminase glutâmico oxaloacética (TGO) em diferentes tecidos (fígado, músculo, rim, pulmão, baço e soro sanguíneo) de ratos e de soro humano. Verificou-se que a atividade da enzima proveniente de qualquer um destes tecidos é aumentada cerca de três vezes quando a incubação se faz a 60°C, ao invés de 37°C. São feitas considerações acerca da importância deste fato.

TÊM surgido ultimamente artigos concernentes à transaminação, à sua importância no metabolismo de aminoácidos, elucidação dos sistemas catalíticos envolvidos, assim como ao papel do Piridoxal como coenzima (2) (7) (12).

Embora exista transaminação não enzimática, a mais importante é a transaminação enzimática, a qual é fundamental ao desdobramento dos aminoácidos, assim como à sua síntese a partir de fontes não protéicas. Trata-se de um processo essencialmente dinâmico e de importância preponderante no anabolismo e catabolismo das proteínas.

As duas transaminases mais conhecidas são a glutâmico oxaloacética (TGO) e glutâmico pirúvica (TGP), de grande importância clínica. Hoje, está demonstrada a existência de transaminases para a quase totalidade dos aminoácidos (4).

Há três tipos de métodos para a dosagem das transaminases: cromatográficos, espectrofotométricos e colorimétricos.

Os primeiros determinam o ácido glutâmico produzido e são muito sensíveis, precisos, mas pouco adaptáveis ao laboratório clínico, já que complicados e de execução demorada (5) (12).

1 Entregue para publicação em 1 de agosto de 1973.
Trabalho realizado na Cadeira de Bioquímica, Departamento de Ciências Fisiológicas, Escola Médica do Rio de Janeiro, Universidade Gama Filho e Laboratório de Bioquímica do Departamento de Química e Terapêutica Experimental do Instituto Oswaldo Cruz - GB - Brasil.

* Pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz.

** Acadêmicos da Esc. Med. R. J., Univ. Gama Filho.

*** Farmacêutica do Instituto Oswaldo Cruz.

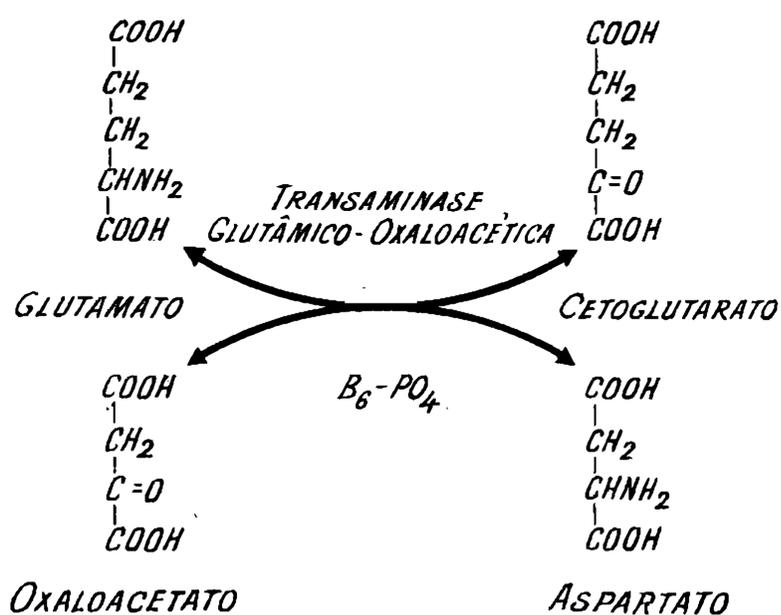
As transaminases podem ser medidas espectrofotometricamente, em especial a glutâmico oxaloacética (TGO). Utiliza-se para tanto a elevada absorção do ácido oxaloacético em 280 nm. Isto se faz, medindo-se a mudança em densidade óptica, à medida que ele é produzido ou consumido. Todavia, a baixa atividade da transaminase e alto conteúdo de proteínas do soro, juntamente com a instabilidade do ácido oxaloacético, fazem com que este método seja pouco usado na clínica. Existe um outro método espectrofotométrico, no qual esta reação de transaminação se acha acoplada à oxidação do NADH₂ pelo oxaloacético, em presença de um excesso de desidrogenase málica purificada. A oxidação do NADH₂ é seguida pela queda de densidade óptica em 340 nm, onde o NADH₂ tem um pique de absorção (uma unidade é igual ao decréscimo de 0,001 em densidade óptica por minuto, a 23°C). No soro sanguíneo de homens normais adultos a atividade da enzima, oscila entre nove e trinta e duas unidades por ml de soro por minuto, com valor médio de 20 ± 7 .

Nos métodos colorimétricos, as transaminases glutâmico oxaloacética (TGO) e glutâmico pirúvica (TGP) são medidas pela dosagem do ácido oxaloacético ou pirúvico formados, os quais, reagindo com a 2-4 Di nitro fenil hidrazina, formam uma hidrazona, que pode ser dosada diretamente, extraída em meio alcalino ⁽¹⁾ ⁽⁶⁾ ⁽⁹⁾ ou previamente extraída por Toluol ⁽⁹⁾. A curva padrão pode ser feita, usando-se padrões determinados por métodos espectrofotométricos, sendo o resultado também dado em unidades por ml ⁽⁶⁾. Podemos utilizar um pa-

drão artificial, contendo salicilato de sódio e cloreto férrico ⁽⁴⁾. Uma unidade colorimétrica de transaminase glutâmico oxaloacética (TGO) é equivalente a uma unidade espectrofotométrica na faixa da normalidade. Na faixa anormal, contudo, de atividade transaminásica no soro sanguíneo, uma unidade colorimétrica equivale a 1,5 - 2,0 unidades espectrofotométricas. Em indivíduos normais, a atividade da transaminase glutâmico oxaloacética (TGO) no soro é de 16 ± 8 unidades colorimétricas. As principais vantagens do método colorimétrico para a transaminase glutâmico oxaloacética (TGO) são: utilização de reagentes relativamente estáveis e fáceis de obtenção e medida da cor em 500 nm, dispensando espectrofotometria no ultravioleta. Contudo, o método colorimétrico é mais demorado que o espectrofotométrico e menos preciso, embora seja indicado para uso clínico rotineiro.

A estabilidade da transaminase glutâmico oxaloacética (TGO) é bastante grande. O congelamento ou liofilização do soro não alteram a atividade da transaminase. A permanência à temperatura ambiente por 24 horas ou a 4°C por 5 dias não altera a transaminase glutâmico oxaloacética (TGO). Esta também pode ser determinada após alimentação. O soro e o plasma têm atividades equivalentes.

A transaminase glutâmico oxaloacética (TGO) se encontra, principalmente, na fração solúvel do citoplasma, embora as mitocôndrias também a contenham em menor proporção (40%). A meia vida da transaminase glutâmico oxaloacética (TGO) é em torno de 46 a 58 horas ⁽¹⁰⁾.



No sêmen, ELIASSON observou que a transaminase glutâmico oxaloacética (TGO) resistia a uma temperatura de 60°C (3).

Observamos que homogenatos de tecidos de rato, assim como soros humanos, não só apresentavam também esta propriedade, como havia uma intensificação de cor a esta temperatura. Como não encontramos na literatura dados referentes a isto, achamos interessante relatar as nossas observações.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizamos em nosso trabalho amostras de oitenta e um ratos e seis homens. A técnica usada foi a de REITMAN e FRANKEL (6), modificada por King.

Reagentes:

a) Fosfato dissódico M/15: dissolver 11,876g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em água e completar a um litro.

b) Fosfato monopotássico M/15: dissolver 9,078g de KH_2PO_4 em água e completar a um litro.

c) Tampão (pH = 7.45): Misturar 825 ml de a) com 125 ml de b).

d) Substrato:

TGO: dissolver 2,66g de ácido d-1 aspártico e 30 mg de ácido alfacetoglutárico em 20,5 ml de soda N, com aquecimento

ligeiro, se necessário; transferir, quantitativamente, para um balão graduado de 100 ml, completando até o traço com tampão.

e) 2,4-dinitrofenilhidrazina: dissolver 200 mg em ácido clorídrico N e completar a um litro com este ácido.

f) Hidróxido de sódio 0,4N.

Técnica:

Em dois tubos ("blank" e "test"), pipetam-se 0,5 ml de substrato e deixam-se tomar a temperatura de um banho-maria, a 37°C., durante alguns minutos. Adicionam-se ao tubo "test" 0,1 ml de homogeneizado ou soro, agita-se, e incubam-se os dois a diferentes temperaturas; uma hora após se adicionar o homogeneizado ou soro, colocam-se, nos dois tubos 0,5 ml de 2,4-dinitrofenilhidrazina. Imediatamente, após termos adicionado 2,4-dinitrofenilhidrazina aos tubos, juntamos ao "blank" 0,1 ml de homogeneizado ou soro. A incubação com este reagente corado é de 20 minutos, a 37°C. Findo este prazo, adicionam-se aos tubos 5 ml de soda 0.4N e lê-se entre 30 segundos e 2 horas, em filtro verde, contra o "blank". Para valores acima de 200 unidades, convém diluir-se o homogeneizado a 1/3 ou 1/5 em tampão e repetir-se a dosagem. A adição do reagente corado fortemente ácido (pH=1,05) cessa toda a atividade enzimática.

RESULTADOS

Acham-se expostos nas figs. 1 e 2 e Tab. 1.

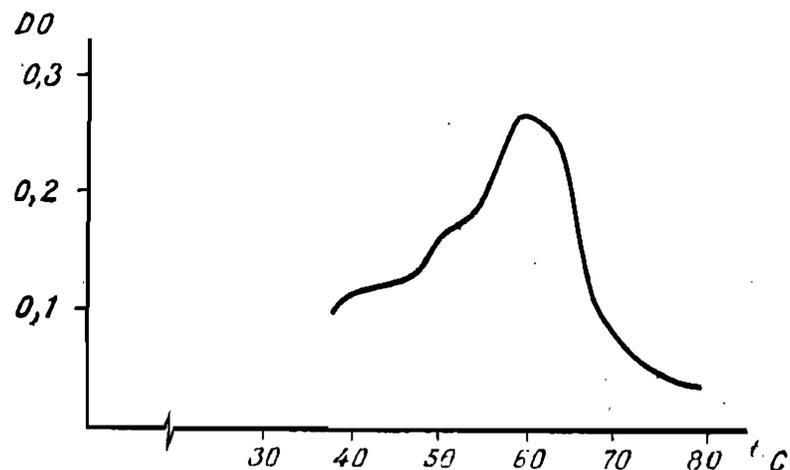


Fig. 1 — Curva de atividade da TGO em relação a temperatura de incubação.

Analisando-se a figura 1, observamos que a transaminase glutâmico oxaloacética (TGO) apresenta um ótimo de absorção em 60°C. A cor obtida a esta temperatura é cerca de três vezes maior que em 37°C. Esta curva é a média de determinações enzimáticas em diferentes temperaturas: 37, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 80°C. Utilizamos como material seis amostras de soro humano normal.

Como haveria a possibilidade de existência de algum isozima termoativável, dosamos a transaminase glutâmico oxaloacética (TGO) em diferen-

tes tecidos de rato, incubando-se a 37°C e 60°C respectivamente. Os resultados acham-se expostos na figura 2 e tabela 1.

Analisando-se estas duas, observamos que foram encontrados, como era de se esperar, valores mais elevados no fígado e músculos cardíaco e esquelético. A termoativação também se apresentou flagrante em todos os tecidos estudados. Os fatores de ativação oscilaram entre 2,47-2,88, apresentando valores equivalentes aos encontrados no soro humano (2,87). Isto vem provar que esta ativação parece ser da enzima.

TABELA 1

TGO EM TECIDOS DE RATO

Tecidos	TGO (unidades/g ^(a))	N.º animais	Fator ativação (Leitura 60°C/37°C)
Fígado	111.605,0 ± 71.201,1	10	2,88
Músculo estriado	64.880,0 ± 26.511,0	12	2,53
Pulmão	46.601,0 ± 19.791,0	10	2,58
Rim	57.360,0 ± 17.360,2	11	2,87
Músculo cardíaco	58.880,0 ± 24.941,0	14	2,81
Baço	6.360,0 ± 2.521,0	12	2,64
Soro sanguíneo	231,3 ± 19,4	12	2,47

(a) — Média Aritmética ± Desvio padrão.

DISCUSSÃO

No presente trabalho expusemos resultados de dosagens colorimétricas da transaminase glutâmico oxaloacética (TGO) em soros humanos e homogenatos de tecidos de rato (fígado, músculo estriado e cardíaco, pulmão, rim, baço e soro). Observamos que a transaminase glutâmico oxaloacética

(TGO) apresenta um ótimo de atividade catalítica a 60°C.

Este fato se nos afigura de real interesse, já que se trata de um comportamento *sui generis* de uma enzima de importância clínica reconhecida. Tanto mais é interessante, porque é sabida a pequena sensibilidade dos métodos colorimétricos utilizados para a dosagem desta enzima.

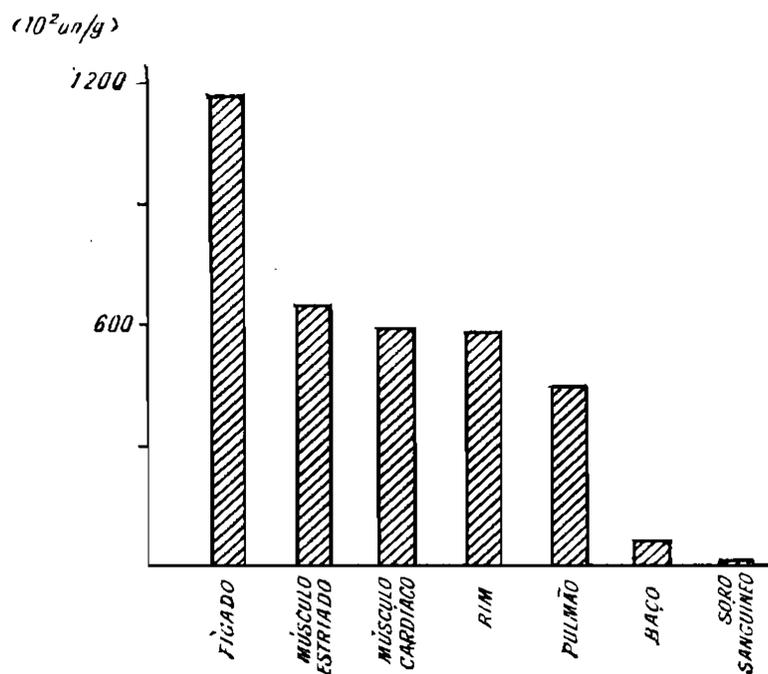


Fig. 2 — Atividade da TGO em tecidos de rato (10^2 un/g).

A incubação a 60°C , ao invés de a 37°C , viria aumentar extraordinariamente a possibilidade do método colorimétrico de dosagem da transaminase glutâmico oxaloacética (TGO). O mecanismo desta ativação térmica será estudado num trabalho posterior.

Conclusões: Realizamos dosagens de transaminase glutâmico oxaloacética (TGO), utilizando diferentes temperaturas de incubação.

Usamos, como material, amostras de soro sanguíneo humano, assim co-

mo homogeneizados de tecidos de rato. As seguintes conclusões podem ser extraídas:

1. A transaminase glutâmico oxaloacética (TGO) apresenta um ótimo de atividade catalítica em 60°C (soro humano).
2. A atividade neste ótimo é cerca de três vezes maior que a 37°C , temperatura usualmente utilizada para a dosagem da enzima.
3. Em diferentes tecidos, a termoativação foi aproximadamente a mesma, o que parece afastar a possibilidade da existência de alguma isozima termoativável, proveniente de um órgão específico.

SUMMARY

Glutamic Oxalacetic transaminase is thermoactivated. Its optimum of catalytical activity is at 60°C . At this temperature, colour is approximately three times more intense than at 37°C , temperature usually utilized for determination of enzyme activity.

This phenomenon is observed in human blood serum and several rat tissues (liver, heart, striated muscle, spleen, lung, kidney and blood serum).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 — ANTEBI, R. & KING, E. J., (1958) — "Serum transaminase activity" — *Lancet*, 1, 1133.
- 2 — COHEN, P. P., (1951) — Transaminases. In *The Enzymes* (J. B. Sumner and K. Myrback, eds), vol I, Part. II, pp. 1040, Academic Press, New York.
- 3 — ELIASSON, R., (1967) — "Transaminase in Human Semen", *J. Reprod. Fert.* 14, 387.
- 4 — FARIA, H. C., (1959) — Transaminase, "*O Hospital*", 56, 445.
- 5 — KARMEN, A., WROBLEWSKI, F. & LA DUE, C. S. (1955) — "Transaminase activity in human blood" — *J. Clin. Invest.* 34, 126.
- 6 — KING, E. J., (1958) — "Routine methods for the estimation of serum transaminase" — *J. Med. Lab. Technol.* 15, 17.

- 7 — MEISTER, A. (1955) — "Transamination". *Advances in Enzimol.* 16, 185.
- 8 — PÓVOA Jr., H., (1964) — "Acth e enzimas da Supra-renal do rato" — *Arq. Bras. Endocrin. Metab.*, 13, 81.
- 9 — REITMAN, S. & FRANKEL, S., (1957) — "Glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases in serum" — *Amer. J. Clin. Path.*, 28, 56.
- 10 — SCHMIDT, E., SCHMIDT, F., (1967) — "Guide to Practical Enzyme Diagnosis" — C. F. Boehringer and GmbH. Mannheim (Germany) — *Biochem. Depart.*
- 11 — TONHAZI, N. WHITE, N. & UMBREIT, W., (1950) — "Rapid method for estimation of glutamic oxaloacetic transaminase in tissues and its application to radiation sickness" — *Arch. Biochem.*, 26, 36.
- 12 — WROBLEWSKI, F., (1958) — "The clinical significance of alterations in transaminase activities of serum and other body fluids" — from *Advances of Clinical Biochemistry* — edited by H. Sobotka and C. P. Stewart, Vol. I — pp. 313, Academic Press.