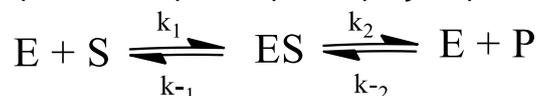


CINÉTICA ENZIMÁTICA DA LACTATO DESIDROGENASE (LDH)

FUNDAMENTO

A Cinética Enzimática estuda a velocidade das reações químicas catalisadas por enzimas. Em 1913, L. Michaelis e M. L. Menten desenvolveram estudos considerando as principais propriedades das enzimas e aplicando as teorias conhecidas de Cinética Química para um modelo simplificado, o qual envolvia a enzima livre (E), o substrato (S), o complexo enzima-substrato (ES) e o produto (P). Esse modelo pode ser expresso pela equação química:



Michaelis e Menten, com essas considerações, desenvolveram a expressão de velocidade para uma reação catalisada enzimaticamente, onde V é função de [S]:

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

A curva de velocidade inicial de reação em função da concentração de substrato para uma enzima que segue o modelo proposto por Michaelis e Menten (enzima michaeliana) tem um formato de hipérbole, como já exposto nas aulas teóricas. Neste tipo de curva pode-se facilmente identificar o efeito de saturação do substrato. Nestas circunstâncias, o sistema tende a adquirir velocidade de reação máxima (V_{\max}), grandeza que é função da concentração inicial da enzima livre (E). Podemos também definir uma concentração de substrato na qual se obtém metade de V_{\max} . Esse valor de [S] é numericamente igual ao K_M , parâmetro que dentro de certos limites mede a afinidade da enzima pelo substrato.

O método mais preciso para determinação gráfica dessas grandezas em um experimento de Cinética Enzimática utiliza o gráfico de duplo-recíproco - Lineweaver-Burk. Para tanto, deve-se plotar $1/V$ em função de $1/[S]$.

A determinação da atividade das enzimas presentes no plasma sanguíneo de pacientes é utilizada na prática médica como uma ferramenta para o diagnóstico clínico. Nesta aula estudaremos a cinética da enzima lactato desidrogenase (LDH, [EC 1.1.1.27](#)). A LDH é uma enzima da classe das oxidoredutases que catalisa a redução reversível do piruvato a lactato, em presença da coenzima NAD^+ no metabolismo de carboidratos.

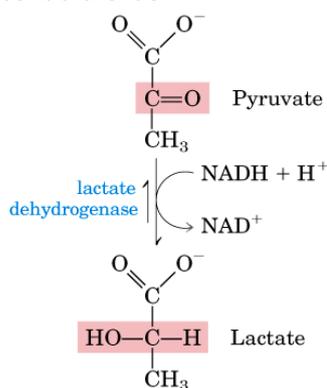
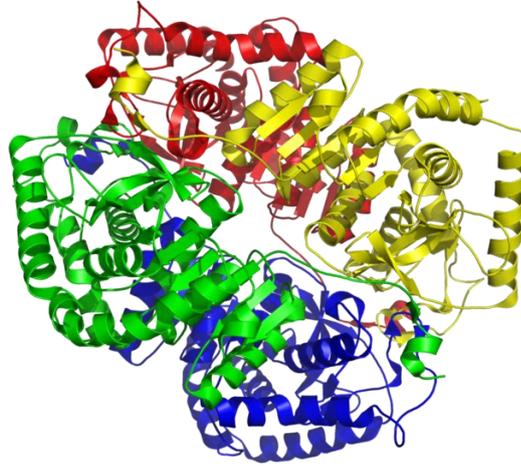


Figura 1

A LDH apresenta duas subunidades, cada uma codificada por um gene diferente e, portanto, com sequências de aminoácidos distintas. Estas subunidades são denominadas M (*muscle*) e H (*heart*). Elas unem-se em tetrâmeros e assim, a LDH apresenta 5 diferentes isoformas ou isoenzimas. Cada isoforma predomina em certos tecidos, refletindo as necessidades metabólicas destes:

ISOFORMA	COMPOSIÇÃO	TECIDO ONDE OCORRE
LDH 1 (H ₄)	4 subunidades H	Coração
LDH 2 (H ₃ M)	3 subunidades H e 1 subunidade M	Sistema reticular endotelial
LDH 3 (H ₂ M ₂)	2 subunidades H e 2 subunidades M	Pulmão e tecido linfático
LDH 4 (HM ₃)	1 subunidade H e 3 subunidades M	Rim, placenta e pâncreas
LDH 5 (M ₄)	4 subunidades M	Músculo esquelético e fígado



Estrutura tridimensional da LDH (EC 1.1.1.27), mostrando cada monômero em uma cor diferente.

Uma vez que participa do metabolismo dos carboidratos, a LDH está constitutivamente expressa no citosol das células e será liberada em altas concentrações para o plasma após um dano tecidual. Por exemplo, no infarto agudo do miocárdio, a LDH torna-se elevada dentro de 24-48 horas após o infarto, atingindo um valor máximo entre 48-72 horas. Situações de hemólise como em anemias hemolíticas, anemia megaloblástica, embolia pulmonar, neoplasias, leucemia, hepatite, cirrose hepática ou trauma muscular podem alterar os níveis séricos de LDH.

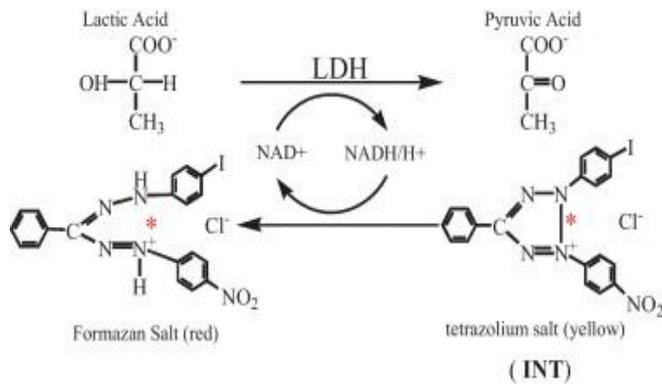
As diferentes isoformas de LDH reagem com seus substratos com afinidades e eficiências catalíticas distintas. Desta forma, ao avaliar os dados de cinética enzimática de uma amostra de paciente podemos identificar a isoforma de LDH predominante neste fluido. Por exemplo, a LDH 1 apresenta maior afinidade pelo lactato e menor afinidade pelo piruvato que a LDH 5; isto faz com que a reação da LDH 1 tenda a acontecer no sentido lactato → piruvato no músculo cardíaco, evitando o acúmulo de lactato neste tecido e permitindo que o piruvato seja desviado para o metabolismo aeróbico. No caso da LDH 5, uma maior afinidade pelo piruvato e menor afinidade pelo lactato favorece a reação no sentido piruvato → lactato, exatamente o sentido em que esta reação precisa ocorrer no metabolismo anaeróbico para manter o suprimento de ATP durante atividades físicas, quando o aporte de oxigênio torna-se insuficiente no músculo esquelético.

OBJETIVOS DA AULA

- Identificar os parâmetros cinéticos, K_M e V_{max} , das isoformas LDH 1 e 5

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Nesta aula prática realizaremos a reação da LDH no sentido lactato → piruvato, pois é tecnicamente mais fácil monitorar a reação neste sentido. Forneceremos à enzima lactato e NAD^+ como substratos e realizaremos a detecção da reação através de um método colorimétrico indireto, uma vez que o produto da reação, piruvato, não possui cor. Neste procedimento, nós conjugaremos a reação da LDH com uma reação química na qual a coenzima NADH, reduzida durante a oxidação do lactato a piruvato, reagirá, alterando a cor da substância indicadora, veja o exemplo abaixo:



De maneira resumida, a enzima catalisará a transferência dos elétrons do lactato para a coenzima NAD^+ , liberando como produto o piruvato e gerando NADH . A seguir, o NADH transferirá os elétrons para um sal de tetrazólio denominado INT (cloreto de 2-*p*-iodofenil-3-*p*-nitrofenil-5-fenil tetrazólio), normalmente amarelo. Com a redução do INT é gerado o formazan, que possui cor castanho avermelhado e que pode ser quantificado através de análise espectrofotométrica em 503 nm, utilizando-se a lei de Lambert-Beer:

$$A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot l$$

Onde :

A é a absorvância da amostra em 503 nm;

ϵ é o coeficiente de extinção molar do formazan em 503 nm = $19.200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$;

c é a concentração a ser determinada

l é a distância percorrida pelo feixe luminoso através da amostra (1 cm neste caso), atenção, este valor pode ser ajustado conforme a distância em que o feixe de luz deve atravessar na amostra, no caso do leitor de placa, para um volume de 200 μL será 0,45 cm.

1. Determinação da Cinética da LDH 1

1.1. Reagentes:

- Tampão Tris 20mM pH 8,2
- Reagente de cor (INT)
- Solução de enzima LDH1 (coração) 10 U/ml diluída em solução de albumina 1 mg/ml
- Soluções de lactato de sódio em diferentes concentrações, em tampão Tris 20 mM pH 8,2
- HCl 2N

1.2. Procedimento:

- Identificar os tubos conforme os números da tabela abaixo
- Pipetar os reagentes nos volumes indicados na **Tabela 1** (abaixo) e na ordem em que eles aparecem: tampão, enzima, reagente de cor. **NÃO ADICIONAR O LACTATO** (pois a reação iniciará imediatamente à adição do mesmo).
- Adicionar o substrato (lactato), agitar o tubo usando o vórtex e rapidamente colocar em banho-maria 30°C. **ATENÇÃO:** no momento de pipetar o lactato dê um intervalo de 30 segundos entre cada tubo. Isso permitirá que você controle o tempo exato para o início da reação.
- A reação deverá permanecer em banho-maria por 10 min. Ao final deste tempo você deve adicionar 100 μL de HCl 2N, para parar a reação;
- Ler em espectrofotômetro (503 nm), zerar o aparelho com o branco

Tabela 1

Tubo	Tampão Tris (μL)	Enzima (μL)	Reagente cor (μL)	Lactato (μL)	Solução estoque de lactato (mM)
branco	780	20	200	-	0
1	680	20	200	100	0,5
2	680	20	200	100	0,7
3	680	20	200	100	1
4	680	20	200	100	2
5	680	20	200	100	5
6	680	20	200	100	7
7	680	20	200	100	10
8	680	20	200	100	15
9	680	20	200	100	20

- a) Anotar as absorvâncias na tabela abaixo e encontrar a velocidade da reação em cada ponto. Lembre-se que você precisa usar a equação de Lambert-Beer para converter absorvância em concentração de produto.

Tubo	Absorvância	Concentração de produto formado (M)	Velocidade da reação (mM/min)	1/V	Concentração de lactato na reação (mM)	1/[S]
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						

- b) Desenhar o gráfico $[S]$ versus Velocidade
c) Encontrar o valor de K_M e V_{max} através do gráfico de Lineweaver-Burk:

2. Determinação da Cinética da LDH 5

2.1. Reagentes:

- Tampão Tris 20mM pH 8,2
- Reagente de cor (INT)
- Solução de enzima LDH5 (músculo esquelético) 10 U/ml diluída em solução de albumina 1 mg/ml
- Soluções de lactato de sódio em diferentes concentrações, em tampão Tris 20 mM pH 8,2
- HCl 2N

2.2. Procedimento:

- Identificar os tubos conforme os números da tabela abaixo
- Pipetar os reagentes nos volumes indicados na **Tabela 1** (abaixo) e na ordem em que eles aparecem: tampão, enzima, reagente de cor. **NÃO ADICIONAR O LACTATO** (pois a reação iniciará imediatamente à adição do mesmo).
- Adicionar o substrato (lactato), agitar o tubo usando o vórtex e rapidamente colocar em banho-maria 30°C. ATENÇÃO: no momento de pipetar o lactato dê um intervalo de 30 segundos entre cada tubo. Isso permitirá que você controle o tempo exato para o início da reação.
- A reação deverá permanecer em banho-maria por 10 min. Ao final deste tempo você deve adicionar 100 µL de HCl 2N, para parar a reação;
- Ler em espectrofotômetro (503 nm), zerar o aparelho com o branco

Tabela 2

Tubo	Tampão Tris (µL)	Enzima (µL)	Reagente cor (µL)	Lactato (µL)	Concentração lactato (mM)
branco	780	20	200	-	0
1	680	20	200	100	5
2	680	20	200	100	10
3	680	20	200	100	20
4	680	20	200	100	40
5	680	20	200	100	70
6	680	20	200	100	100
7	680	20	200	100	120
8	680	20	200	100	150

a) Anotar as absorbâncias na tabela abaixo e encontrar a velocidade da reação em cada ponto. Lembre-se que você precisa usar a equação de Lambert-Beer para converter absorbância em concentração de produto.

Tubo	Absorbância	Concentração de produto formado (M)	Velocidade da reação (mM/min)	1/V	Concentração de lactato na reação (mM)	1/[S]
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						

b) Desenhar o gráfico [S] versus Velocidade

c) Encontrar o valor de K_M e V_{max} através do gráfico de Lineweaver-Burk:

INSTRUÇÕES PARA CONFEÇÃO DO RELATÓRIO:

No relatório deverá ser apresentado:

- As tabelas com os valores de absorbância, velocidade de reação e concentração de substrato correspondente;

- Os gráficos de [S] *versus* Velocidade;

- Os gráficos duplo-recíprocos e os valores de K_M e V_{max} encontrados;

FAÇA CADA UM DOS ITENS SEPARADAMENTE PARA AS DUAS ISOFORMAS DA ENZIMA

- Faça uma conclusão comparativa para os parâmetros cinéticos das duas isoenzimas.