

Avaliação do Estado Redox Plasmático na Criança

L. DIOGO ^(1, 2), H. DRAGO ⁽¹⁾, A. FERNANDES ⁽¹⁾, G. CARVALHO ⁽¹⁾, J. CANHA ^(1, 2),
H. C. MOTA ^(1, 2), T. PROENÇA ⁽³⁾, C. OLIVEIRA ^(2, 3, 4)

⁽¹⁾ Hospital Pediátrico de Coimbra

⁽²⁾ Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra

⁽³⁾ Hospitais da Universidade de Coimbra, Laboratório de Neuroquímica

⁽⁴⁾ Centro de Neurociências da Universidade de Coimbra

Resumo

A avaliação do estado redox plasmático, que consiste na determinação simultânea das concentrações plasmáticas de lactato, piruvato, acetoacetato e β -hidroxibutirato, é útil no rastreio das doenças hereditárias do metabolismo por défice energético. O seu doseamento exige rigorosas condições de colheita e processamento das amostras. Fez-se o estudo de 70 crianças sem doença metabólica com idades compreendidas entre 1.5 meses e 15 anos, com o objectivo de determinar os valores normais daqueles parâmetros bioquímicos na nossa população. Encontraram-se os seguintes valores (média e desvio-padrão em mmol/L): lactato - 1.28 ± 0.46 ; piruvato 0.10 ± 0.03 ; corpos cetónicos totais - 0.11 ± 0.09 ; razão β -hidroxibutirato / acetoacetato 2.9 ± 2.2 .

Os valores séricos do lactato em jejum eram significativamente inferiores aos do pós-prandial (1.03 ± 0.26 vs 1.39 ± 0.34 mmol/L).

Palavras-Chave: Lactato, piruvato, corpos cetónicos, valores normais, alteração do metabolismo energético.

Summary

Plasma Redox Evaluation in the Child

Blood redox status evaluation is an important screening test for energy metabolism deficiencies. Accurate determination demands precise sample collection and processing. A control group of 70 children with ages ranging from 15 months to 15 years was studied, so that normal values for the biochemical parameters analysed could be established in our population. The following values were determined (mmol/L): lactate - 1.28 ± 0.46 ; pyruvate - 0.10 ± 0.03 ; ketone bodies - 0.11 ± 0.09 ; β -hydroxybutyrate / acetoacetate ratio was 2.9 ± 2.2 .

Fasting serum lactate values were significantly lower than in the post-prandial period (1.03 ± 0.26 vs 1.39 ± 0.34 mmol/L).

Key-Words: Lactate, pyruvate, ketone bodies, normal values, energy metabolism deficiency.

Introdução

As doenças hereditárias do metabolismo energético (défices da piruvato-desidrogenase, do ciclo de Krebs e da cadeia respiratória mitocondrial) provocam frequentemente acumulação de lactato, piruvato e/ou corpos cetónicos ^(1, 2).

A obtenção de energia a nível celular faz-se através de uma série de reacções (catabolismo) cujo denominador comum é a oxidação, isto é, a transferência de electrões e prótons para substâncias de potencial redox sucessivamente mais elevado até ao oxigénio (respiração celular). As reacções produtoras de energia estão quase sempre ligadas a coenzimas (NAD⁺ e FADH), que são reduzidas nesse processo. A subsequente reoxidação do NADH e do FADH₂ a nível da cadeia respiratória mitocondrial (com consumo de oxigénio e formação de água) permite o armazenamento de energia, sob a forma de ATP (fosforilação oxidativa) ⁽³⁾.

Os quocientes NAD⁺/NADH e FADH/FADH₂ traduzem o estado redox intracelular: a sua determinação é da maior importância na avaliação das alterações do metabolismo energético, hereditárias ou adquiridas. O quociente NAD⁺/NADH pode ser avaliado indirectamente pela determinação das concentrações plasmáticas do lactato, piruvato, β -hidroxibutirato e acetoacetato ⁽⁴⁾.

O lactato e o piruvato são os produtos finais do metabolismo anaeróbico da glicose. O lactato, que é fundamentalmente a forma circulante, tem de ser convertido em piruvato para ser metalizado. A degradação oxidativa do piruvato através da via da piruvato-desidrogenase e do ciclo de Krebs leva à formação de dióxido de carbono e equivalentes redutores (NADH e FADH₂) que são reoxidados na cadeia respiratória, com produção de energia. No citoplasma, lactato e piruvato são interconvertíveis, através de uma reacção catalizada pela lactatodesidro-

Correspondência: Luísa Diogo

Hospital Pediátrico de Coimbra - Av. Bissaya Barreto
3000 Coimbra - Tel. 48 03 00 / Fax 71 72 16

Entregue para publicação em 19/11/97.

Aceite para publicação em 19/11/98.

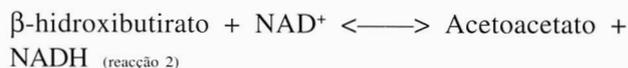
genese (reação 1), estando a sua proporção relativa dependente da relação NAD^+/NADH .



A concentração sanguínea do lactato resulta do equilíbrio entre a produção e o consumo. A produção do lactato ocorre principalmente na pele, glóbulos vermelhos, cérebro, medula renal e músculo. Cerca de dois terços do lactato circulante é substrato da neoglicogênese, enquanto o restante sofre oxidação ⁽²⁾. A utilização do lactato a nível tecidual varia em função do estado nutricional: em jejum transforma-se em glicose no fígado e no rim, enquanto no pos-prandial é oxidado nas mitocôndrias, sobretudo no miocárdio, músculo esquelético e rim. Pode ocorrer acumulação do lactato em resultado de colapso circulatório, hipóxia e outras condições com falência da respiração celular tais como estados de catabolismo, infecções, desidratação, etc. Assim, os níveis de lactato circulante diminuem no jejum e aumentam no pos-prandial, após exercício muscular e em estados de hipóxia ^(2, 4).

Os corpos cetónicos (beta-hidroxibutirato e acetoacetato) são sintetizados no fígado a partir dos ácidos gordos (libertados por lipólise do tecido adiposo) e dos aminoácidos cetogénicos (por exemplo: leucina) libertados pelo catabolismo muscular. São produzidos pelas mitocôndrias hepáticas e oxidados (cetólise) no músculo esquelético, miocárdio, rim e cérebro. O seu principal papel é servir como alternativa à glicose para a produção de energia, poupando-a a favor dos tecidos glicodependentes (cérebro, glóbulos vermelhos e medula supra-renal) nas situações de jejum ou de exercício físico prolongados. Os níveis de corpos cetónicos circulantes aumentam assim nestas circunstâncias ⁽³⁾.

Na mitocôndria o β -hidroxibutirato e o acetoacetato são interconvertíveis, estando a sua proporção relativa dependente da relação NAD^+/NADH .



Dado que a reação 1 é citoplasmática e a 2 mitocondrial, os quocientes lactato/piruvato e beta-hidroxibutirato/acetoacetato traduziriam o estado redox citoplasmático e mitocondrial, respectivamente ⁽⁵⁾.

O doseamento daquelas substâncias nos fluidos biológicos exige condições rigorosas de colheita e análise laboratorial se quisermos ter resultados fiáveis. De facto, os valores normais variam com a idade e são também influenciáveis por factores externos, nomeadamente a hipóxia tecidual local ⁽⁶⁾.

Neste estudo fez-se a avaliação daqueles parâmetros bioquímicos no plasma sanguíneo de um grupo testemunha com o objectivo de determinar os valores normais na nossa população.

Material e Métodos

Seleccionaram-se 70 crianças com bom estado geral e de nutrição, não sujeitas a terapêutica interferente com o metabolismo energético e submetidas a colheitas de sangue por outro motivo, após obtido o consentimento dos pais. Tinham idades compreendidas entre 1.5 meses e 15 anos, com idade média de 5.5 anos (mediana 4 anos). Cerca de um terço (28 crianças) tinha tomado uma refeição nas 2 horas que precederam a colheita; 26 crianças encontravam-se em jejum (nocturno ou >3 horas, no caso dos lactentes); o terço restante (26) encontrava-se numa situação intermédia no que se refere à relação entre a hora da colheita e a da refeição anterior.

Colheram-se, sem garrote, com o mínimo de «luta», 2.5 ml de sangue a cada criança para tubo com EDTA e fluoreto de sódio. Diluiu-se imediatamente («à cabeceira do doente») 1 ml de sangue com 2 ml de ácido perclórico a 8g/dl, medidos com micropipeta. Os produtos foram imediatamente enviados (em gelo) para o laboratório, de modo a que o plasma fosse separado no mais curto espaço de tempo. As amostras foram analisadas no mesmo dia ou congeladas a -20°C até serem processadas, num intervalo não superior a 72 horas após a colheita.

O lactato, corpos cetónicos e glicémia foram determinados no plasma. O piruvato foi doseado no sobrenadante do sangue desproteinizado. As determinações foram feitas por métodos espectrofotométricos semi-automatizados: os valores de referência para cada parâmetro bioquímico estão reunidos no Quadro I ⁽⁷⁻¹⁰⁾.

QUADRO I

Estudo redox plasmático – valores de referência dos métodos usados no nosso laboratório (ref. 7-10)

	Lactato	Piruvato	3-OH-But	AcetoAcet
(mmol/L)	0,33-1,33	0,03-0,08	0,02-0,29	0,02-0,04

Analisaram-se os resultados no global e segundo três grupos etários: até aos 12 meses de idade, do 1 aos 6 e dos 7 aos 15 anos de idade.

Das 28 crianças cuja colheita foi feita no período pos-prandial, 10 tinham idade inferior a 12 meses, 15 tinha entre 1 e 6 anos de idade e 3, mais de 7 anos. Das 26 crianças que estavam em jejum, 4 pertenciam ao primeiro grupo etário, 9 ao segundo e 13 ao terceiro.

Para análise estatística foi utilizada a prova U de Mann-Whitney.

Resultados

No global (quadros II e III), encontraram-se os seguintes valores (média e desvio-padrão em mmol/L): lactato: 1.28 ± 0.46 ; piruvato - 0.10 ± 0.03 , sendo a razão lactato/piruvato de 13.5 ± 4.2 ; corpos cetônicos totais - 0.11 ± 0.09 e a razão β -hidroxibutirato/acetoacetato - 2.9 ± 2.2 .

QUADRO II
Estudo redox plasmático em 70 crianças testemunho
- valores do lactato e piruvato

	Total (n=70)	< 1 A (n=17)	1 - 6 A (n=29)	7 - 15 A (n=24)
Lactato (mmol/L) Média \pm DP	1.28 ± 0.46	1.61 ± 0.48	1.25 ± 0.35	1.15 ± 0.48
Piruvato (mmol/L) Média \pm DP	0.10 ± 0.03	0.12 ± 0.03	0.09 ± 0.02	0.10 ± 0.04
Lactato/Piruvato Média \pm DP	13.5 ± 4.2	14.3 ± 3.3	13.8 ± 3.5	12.6 ± 5.4

DP - desvio-padrão

QUADRO III
Estudo redox plasmático em 70 crianças testemunho
valores dos corpos cetônicos

	Total (n=70)	< 1 A (n=17)	1 - 6 A (n=29)	7 - 15 A (n=24)
Corpos cetônicos Média \pm DP	0.11 ± 0.09	0.15 ± 0.10	0.12 ± 0.09	0.08 ± 0.06
Hidroxibutirato Média \pm DP	0.08 ± 0.08	0.12 ± 0.09	0.09 ± 0.08	0.06 ± 0.06
Acetoacetato Média \pm DP	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.02	0.04 ± 0.03	0.02 ± 0.01
HB / AA* Média \pm DP	2.9 ± 2.2	3.2 ± 1.9	2.4 ± 1.6	3.1 ± 2.8

DP - desvio-padrão

* Hidroxibutirato / Acetoacetato

Os níveis plasmáticos médios de lactato (mmol/L) variaram inversamente com a idade (quadro II): 1.61 no grupo dos lactentes, 1.25 no grupo das crianças dos 1-6 anos e 1.15 no dos 7 aos 15 anos. Para o piruvato encontraram-se os seguintes valores médios: 0.12, 0.09 e 0.10 (mmol/L), respectivamente para os primeiro, segundo e terceiro grupos etários. Tanto para os valores do lactato como para os do piruvato verificou-se diferença com significado estatístico entre o primeiro e o segundo grupo

etário ($Z = -2.8/-2.9$; $p < 0.01$), mas não entre o segundo e o terceiro.

O quociente lactato/piruvato mostrou valores médios de 14.3, 13.8 e 12.6, respectivamente para os primeiro, segundo e terceiro grupos, não se tendo verificado diferenças com significado estatístico entre eles.

Tanto o somatório dos corpos cetônicos (0.15, 0.12 e 0.08 mmol/L) como o quociente β -hidroxibutirato/acetoacetato (3.2, 2.4 e 3.1) não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os vários grupos etários.

A influência da refeição está representada no quadro IV, que reúne os valores obtidos nas 54 crianças que tinham tido a última refeição nas 2 horas anteriores à colheita (n=28) ou se encontravam em jejum quando da mesma (n=26). Compararam-se os resultados obtidos em 24 crianças do grupo etário dos 1-6 anos, 9 das quais fizeram a colheita de sangue em jejum e 15 no período pós-prandial. O valor do lactato em jejum (1.03 ± 0.26 mmol/L) é significativamente inferior ao do pós-prandial (1.39 ± 0.34 mmol/L) ($p < 0.02$), enquanto que o do piruvato é tendencialmente inferior (0.08 ± 0.02 vs 0.10 ± 0.02) ($p = 0.1$) e o dos corpos cetônicos não apresentou diferença estatisticamente significativa (0.17 ± 0.15 vs 0.10 ± 0.03).

QUADRO IV
Estudo redox plasmático em 54 crianças testemunho.
Influência da refeição. (Os valores do jejum e do pós-prandial não se referem aos mesmos indivíduos)

	Total (n=54)		1 - 6 A (n=24)	
	JJ (n=26)	PP (n=28)	JJ (n=9)	PP (n=15)
Jejum / Pos-prandial				
Idade (Média - Anos)	6,9	3,2	4,1	3,3
Lactato (mmol/L) Média	1,24	1,48	1,03	1,39
Piruvato (mmol/L) Média	0,09	0,11	0,08	0,10
Lactato / Piruvato Média	14,2	13,1	12,7	13,5
Corpos Cetônicos Média	0,13	0,12	0,17	0,10
HB / AA* Média	3,6	3,0	2,9	2,5

* Hidroxibutirato / Acetoacetato

Discussão

A avaliação do estado redox plasmático através do doseamento dos níveis sanguíneos do lactato, piruvato e corpos cetônicos, tem, pois, sido considerado um método de rastreio das doenças do metabolismo energético ⁽¹⁻⁵⁾.

Os métodos de doseamento habitualmente utilizados baseiam-se na medição espectrofotométrica da oxidação do NADH (para o piruvato ou o acetoacetato) e da redução do NAD⁺ (para o lactato e o hidroxibutirato). Diferem na natureza e volume da amostra usada (sangue total, sangue após desproteinização, soro ou plasma) e no grau e natureza da automatização ⁽⁶⁻¹⁰⁾. A avaliação das respectivas especificidade e sensibilidade no rastreio clínico-laboratorial não é simples. Há que eliminar condições de hipóxia aquando da colheita (por exemplo: garrotagem do membro, exercício muscular intenso não controlado), de modo a evitar falsas hiperlactacidémias ⁽⁴⁾. No caso particular da criança, sobretudo na mais jovem, a dificuldade em conseguir a colaboração para a colheita sem garrote é um factor a ter em conta, pelo que o recurso à veia jugular externa ou a catéter intravenoso (nas colheitas seriadas) é uma boa alternativa, como temos verificado na nossa prática clínica. Por outro lado, é conhecido que o piruvato e o acetoacetato são muito instáveis, transformando-se respectivamente em lactato e acetona, e elevando falsamente os quocientes lactato/piruvato e beta-hidroxibutirato/acetoacetato. Para minimizar estes efeitos, usámos um inibidor da glicólise (fluoreto de sódio) e a desproteinização e/ou separação do plasma imediatamente após a colheita da amostra de sangue e o seu transporte em gelo ⁽⁶⁻¹⁰⁾.

Os limites da normalidade dos parâmetros em discussão variam segundo os diferentes autores ^(2, 4, 11). É assim de primordial importância estabelecer os valores normais para cada grupo de trabalho.

A selecção de testemunhos nem sempre é fácil, já que a colheita de sangue a crianças saudáveis levanta questões éticas, nem sempre ultrapassáveis. Por isso optámos pela subtração de um pequeno volume extra de sangue a crianças submetidas a colheita por outras razões, após concordância esclarecida dos pais. Saudubray considerou como testemunhos doentes suspeitos de doença metabólica que foram submetidos por isso a prova de jejum de 24 horas e em quem foi excluída doença do metabolismo energético ⁽⁴⁾.

Os nossos resultados são ligeiramente diferentes dos valores de referência representados no quadro I, nomeadamente no que se refere aos valores do lactato e piruvato. Estes aproximam-se mais do do grupo etário dos 7-15 anos.

Fizemos a análise dos resultados segundo os 3 grupos etários publicados pelo grupo francês ⁽⁴⁾. A comparação deve ser feita com algumas reservas, já que estes fazem o doseamento dos quatro parâmetros no sobrenadante do desproteinizado ⁽⁶⁾. A diferença de metodologia pode explicar o quociente hidroxibutirato/acetoacetato muito mais elevado no nosso grupo do que no francês, onde

foi sempre inferior a 1 no pos-prandial e não ultrapassou 3,3 no jejum de 15 a 24 horas ^(4, 6).

Tal como o grupo francês, encontramos valores de lactato mais altos nas crianças mais jovens. Quanto à relação lactato/piruvato, podemos assumir como valor normal para a nossa população o de 10-20, considerando-a anormalmente elevada a partir dos 25, como tem sido descrito por outros autores ⁽²⁾.

É conhecido que a refeição constitui uma verdadeira «prova de sobrecarga» fisiológica para a maquinaria celular produtora de energia. Inversamente, no jejum há consumo do piruvato na neoglicogénese, sendo activada a cetogénese de modo a fornecer combustível alternativo aos tecidos periféricos. Estes efeitos são tanto mais óbvios quanto mais rica em hidratos de carbono for a refeição ou mais prolongado o jejum ⁽¹²⁾. Em face do pequeno número de alguns grupos-testemunha em condições de jejum ou pos-prandial, optámos por analisar o efeito do jejum apenas no de 1-6 anos. Como seria de esperar os valores médios do lactato (e do piruvato) no período pos-prandial são significativamente mais elevados que em jejum.

O jejum a que as nossas crianças foram submetidas raramente foi prolongado (geralmente inferior a 12 horas), o que poderá ter contribuído para que os valores em jejum não fossem muito diferentes dos do pós-prandial: – em jejum os do piruvato, foram inferiores e os dos corpos cetónicos superiores aos do pós-prandial, embora essa diferença não tenha atingido significado estatístico.

Conclusão

O estabelecimento de valores normais dos níveis sanguíneos de lactato, piruvato e corpos cetónicos numa determinada população clínico-laboratorial, quer em jejum quer no período pós-prandial, é fundamental para um eficiente rastreio das doenças do metabolismo energético.

BIBLIOGRAFIA

1. Kerr D. S., Zinn A. B.. The pyruvate dehydrogenase complex and tricarboxylic acid cycle. In: Fernandes J., Saudubray J. M., Van Den Beghe G., eds. Inborn metabolic diseases. Diagnosis and treatment. 2nd. Berlin Springer 1996: 109-19.
2. Robinson B. H. Lactic acidemia (disorders of pyruvate carboxylase, pyruvate dehydrogenase) In: Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D., eds. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 7th ed. New York: McGraw-Hill, Inc. 1995: 1479-99.
3. Mayes P. A. Biologic Oxidation. In: Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell VW, eds. Harper's Biochemistry. 23th ed. London: Prentice-Hall International Inc., 1993: 112-8.
4. Bonnefont J. P., Saudubray J. M., Vassault A.. Dosage des acides lactique, pyruvique et des corps cétoniques. Application au

- diagnostic des hyperlactacidémies et des états d'acidocétose chez l'enfant. In: Saudubray J. M., ed. *Maladies métaboliques. Progrès en Pédiatrie* 8. Paris: Doin Éditeurs, 1991: 29-40.
5. Poggi-Travert F., Martin D., Billette de Villemeur T. et al. Metabolic intermediates in lactic acidosis: compounds, samples and interpretation. *J Inher Metab Dis* 1996; 19: 478-88.
6. Vassault A., Bonnefont J. P., Specola N., Saudubray J. M.. Lactate, Pyruvate and Ketone Bodies. In: Hommes F. A., ed. *Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics: A Laboratory Manual*. New York: Wiley-Liss Inc, 1991: 285-308.
7. Noll F. L. (+) Lactate. In: Bergmeyer H. U., ed. *Methods of Enzymatic Analysis*. 3rd ed. Verlag Chemie, RFA, 1984; VI: 582-8.
8. Czok R., Lamprecht W.. Pyruvate, phosphoenolpyruvate and D-glycerate-2-phosphate. In: Bergmeyer H. U., ed. *Methods of Enzymatic Analysis*. 2nd ed. New York: Academic Press, 1974: 1446-51.
9. Williamson D. H., Mellanby J., Krebs H. A.. Enzymatic determination of D(-)-beta-hydroxybutyric acid and acetoacetic acid in blood. *Biochem J* 1962; 82: 90-6.
10. Williamson D. H., Mellanby J. D(-)-beta-hydroxybutyrate. In: Bergmeyer H. U., ed. *Methods of Enzymatic Analysis*. 2nd ed. New York: Academic Press: 1837-8.
11. Ruitenbeek W., Wendel U., Trijbels F., Sengers R.. Mitochondrial energy metabolism. In: Blau N., Duran M., Blaskovics M. E., eds. *Physician's guide to the laboratory diagnosis of metabolic diseases*. 1st ed. London: Chapman & Hall Medical 1996: 391-406.
12. Chi C. S., Mak S. C., Shian W. J., Chen C. H., Oral glucose lactate stimulation test in mitochondrial diseases. *Pediatr Neurol* 1992; 8: 445-9.

Agradecimento: às sr.^{as} Enfermeiras e Técnicos do Laboratório de Bioquímica do Hospital Pediátrico pela sua imprescindível colaboração neste estudo.

Trabalho subsidiado pela Comissão de Fomento da Investigação em Cuidados de Saúde, do Ministério da Saúde pelo P. I. n.º 143/95 e aprovado pela Comissão de Ética do Hospital Pediátrico.