

Recomendaciones para la determinación de isoenzimas de la L-lactato deshidrogenasa en suero sanguíneo humano

Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular
Comité Científico
Comisión de Enzimas¹

Documento J, Fase 3, Versión 1

Preparado por A. Galán Ortega, D. Balsells Roselló, R. Ferragut Mas, F.J. Gella Tomás, G. Gubern Olivella, A. Padrós Fluvià, R. Rueda Rúa, F. Canalias Reverter

Índice

- 0 Introducción
- 1 Objeto
- 2 Formas moleculares
- 3 Métodos de determinación de isoenzimas
 - 3.1 Electroforesis
 - 3.2 Cromatografía
 - 3.3 Inactivación química selectiva
 - 3.4 Métodos inmunológicos
- 4 Recomendaciones para el estudio de isoenzimas
- 5 Bibliografía

0 INTRODUCCIÓN

La amplia distribución de la enzima L-lactato deshidrogenasa (EC 1.1.1.27) en los tejidos del organismo humano (tejido adiposo, cerebro, miocardio, eritrocitos, riñones, nódulos linfáticos, pulmones, músculo esquelético, hígado, páncreas, estómago, útero) ha hecho que a esta enzima no se la considere específica de ningún órgano. En efecto, la concentración catalítica de L-lactato deshidrogenasa en suero es una magnitud de alta sensibilidad pero de muy baja especificidad diagnósticas. Por ello, la valoración de sus isoenzimas es de ayuda diagnóstica para la interpretación de una elevación de la concentración catalítica de la enzima en suero, que puede ocurrir en numerosas alteraciones: infarto de miocardio, enfermedades hemolíticas, enfermedades malignas (linfomas, tumores, leucemias), infarto renal, distrofias musculares, enfermedades hepáticas, congestión cardíaca y hepática, entre otras.

Se han propuesto, y de hecho se utilizan, varios procedimientos para valorar las isoenzimas de la L-lactato deshidrogenasa. Unos separan y cuantifican las cinco isoenzimas y otros tan sólo miden la concentración catalítica de la isoenzima 1 por la repercusión clínica que ésta tiene en el diagnóstico del infarto agudo de miocardio.

1 OBJETO

El objeto del presente documento es informar sobre las ventajas e inconvenientes de los diferentes métodos que existen para valorar las isoenzimas de la L-lactato deshidrogenasa.

Esta Comisión ha considerado más conveniente recomendar una estrategia de trabajo que un método concreto, para que sea el propio usuario quien decida en base a sus objetivos, necesidades y situación.

2 FORMAS MOLECULARES

La enzima L-lactato deshidrogenasa es un tetrámero compuesto por dos tipos de subunidades polipeptídicas denominadas M (tipo músculo esquelético) y H (tipo músculo cardíaco) que poseen una masa molar de 34 000 g/mol, aproximadamente (1). Estas cadenas polipeptídicas están codificadas por genes estructuralmente distintos.

De las posibles combinaciones entre los dos monómeros M y H se forman cinco isoenzimas de localización citoplasmática:

- 1, compuesta por cuatro monómeros H
- 2, compuesta por tres monómeros H y un monómero M
- 3, compuesta por dos monómeros H y dos monómeros M
- 4, compuesta por un monómero H y tres monómeros M
- 5, compuesta por cuatro monómeros M.

La denominación de isoenzima 1 a isoenzima 5 proviene de la distinta movilidad electroforética, siendo la isoenzima 1 la que presenta migración más anódica.

Se ha descrito la existencia de otras formas moleculares poco usuales, como los complejos de inmunoglobulinas y L-lactato deshidrogenasa, la L-lactato deshidrogenasa 6 y la L-lactato deshidrogenasa K. Existe un tercer gen que codifica la isoenzima L-lactato deshidrogenasa X, la cual se expresa solamente en semen (2).

3 MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE ISOENZIMAS

Las cinco isoenzimas poseen diferentes propiedades físicas y químicas. Difieren en su estructura terciaria, carga, afinidad a ciertos sustratos, sensibilidad a algunos inhibidores, resistencia a la inactivación por calor, labilidad al frío y movilidad elec-

¹Composición de la Comisión: D. Balsells Roselló, F. Canalias Reverter (Presidenta), R. Ferragut Mas, A. Galán Ortega, F.J. Gella Tomás, G. Gubern Olivella, A. Padrós Fluvià, R. Rueda Rúa.

troforética. Algunas de estas propiedades han sido utilizadas para la determinación de las isoenzimas. Así, por ejemplo, mediante desnaturalización por calor a 65 °C durante 30 minutos puede medirse de forma indirecta la isoenzima 1, ya que a esta temperatura las otras isoenzimas quedan inactivadas.

Sólo las isoenzimas con porcentaje mayoritario en monómeros H reducen el α -oxoglutarato cuando es utilizado como sustrato. Basándose en ello se ha considerado que la actividad de la hidroxibutirato deshidrogenasa equivale a la de las isoenzimas 1 y 2 de la L-lactato deshidrogenasa.

Sin embargo, los métodos más usados para la determinación de las isoenzimas de la L-lactato deshidrogenasa son la electroforesis y la cromatografía, si se desea separar y cuantificar las cinco isoenzimas, y los métodos inmunológicos y los de inactivación selectiva si el objetivo propuesto es valorar directamente la isoenzima 1.

3.1 Electroforesis

La electroforesis es el único método que permite detectar todas las formas moleculares de la L-lactato deshidrogenasa. Se han utilizado diversos soportes como gel de agarosa, acetato de celulosa, poliacrilamida y gel de almidón. El tipo de soporte afecta la resolución de las isoenzimas. Para cuantificar las cantidades relativas de cada isoenzima se efectúa, sobre el soporte en el que se ha realizado la electroforesis, una reacción específica con L-lactato y NAD⁺. El NADH formado puede cuantificarse por espectrometría de fluorescencia en fase sólida. También puede combinarse con cloruro de idonitrotetrazolio y metasulfato de fenacina. El formazán producido puede cuantificarse por espectrometría de absorción en fase sólida. Hay discrepancias entre utilizar métodos colorimétricos o fluorescentes para la detección de las isoenzimas. Los métodos de detección por fluorescencia son más rápidos, simples y sensibles (3-6) que los de espectrometría visible y éstos poseen como ventaja que la tinción permanece durante tiempo, lo que ofrece la posibilidad de volver a leer la placa tantas veces como se desee y puede visualizarse y fotografiarse sin dificultad.

3.2 Cromatografía

La cromatografía ha sido utilizada para separar y cuantificar las isoenzimas de la L-lactato deshidrogenasa. Las columnas de intercambio aniónico (DEAE) han sido utilizadas por varios autores (7-9). Sin embargo, este método no ha resultado apropiado porque la resolución y precisión analíticas no siempre son buenas. Mejores resultados se han conseguido utilizando cromatografía en fase líquida de alta resolución (10,11). No obstante, se trata de métodos tediosos, complicados y por tanto poco aplicables a un laboratorio clínico de rutina.

3.3 Inactivación química selectiva

Varios productos químicos como el 1,6 hexanodiol (12), el perclorato de sodio (13), el tiocianato de guanidina (14) y el dodecil sulfato de litio (15), han sido utilizados para medir aisladamente la isoenzima 1 de la L-lactato deshidrogenasa. El fundamento de estos métodos radica en que los citados productos son capaces de inactivar selectivamente las isoenzimas 2, 3, 4 y 5 de la L-lactato deshidrogenasa. La actividad residual de la isoenzima 1 es medida por un procedimiento enzimático que utilice L-lactato como sustrato y NAD⁺ como cofactor. La valoración puede hacerse de forma manual o automatizada. Estos métodos ofrecen una buena eficiencia diagnóstica para el infarto agudo de miocardio, correlacionan bien con los métodos inmunológicos y electroforéticos y son más practicables que la electroforesis.

El método que utiliza dodecil sulfato de litio denota un especial interés ya que el procedimiento puede ser automatizado en su globalidad con un tiempo de respuesta analítica de tan sólo siete minutos (16).

3.4 Métodos inmunológicos

Se ha desarrollado un método por inmunoinhibición para medir la isoenzima 1 de la L-lactato deshidrogenasa basado en el uso de anticuerpos específicos contra la subunidad M de la enzima (17,18). El objetivo es inhibir las subunidades M de las isoenzimas 2, 3, 4 y 5 mediante una reacción de dos anticuerpos en fase sólida. La actividad residual correspondiente a la isoenzima 1 se valora por un procedimiento enzimático.

Como alternativa existe un método por inmunoprecipitación en el que se une covalentemente el complejo inmunoglobulina anti M con la subunidad M a un segundo anticuerpo unido a una partícula insoluble y así las subunidades M fijadas se separan por centrifugación (19).

La ventaja de estos métodos, además de su elevada sensibilidad diagnóstica para el infarto agudo de miocardio (20,21), es la simplicidad y rapidez de manejo, ya que parte del proceso puede ser automatizable. Uno de los mayores inconvenientes es la falta de especificidad diagnóstica, ya que puede ocasionar falsos positivos en caso de enfermedad hemolítica, traumatismo muscular y cirugía.

4 RECOMENDACIONES PARA EL ESTUDIO DE ISOENZIMAS

Para el estudio de las isoenzimas de la L-lactato deshidrogenasa y cuando se tenga por objetivo identificar las distintas formas de la enzima, la electroforesis en agarosa es el método de elección (3,22).

En el caso concreto de que se necesite apoyar un diagnóstico enzimático de infarto agudo de miocardio, el método electroforético puede ser sustituido por la valoración aislada de la isoenzima 1 de la L-lactato deshidrogenasa. En tal caso, se recomienda un método inmunológico o un método de inactivación química selectiva que posea suficiente eficiencia diagnóstica, sea totalmente automatizable y ofrezca un tiempo de respuesta que sea compatible con una determinación de urgencias (16).

El interés clínico de la determinación aislada de la isoenzima 1 de la L-lactato deshidrogenasa está sobradamente justificado (23,24). La sensibilidad diagnóstica de esta magnitud, después de 24-48 horas del dolor precordial, es incluso superior a la relación isoenzima 1/isoenzima 2 que se obtiene con la electroforesis. Sin embargo, la especificidad diagnóstica es menor ya que puede ocasionar falsos positivos en caso de enfermedad hemolítica y alteraciones musculares, entre otras. La valoración de la isoenzima 1 de la L-lactato deshidrogenasa apoya el valor predictivo positivo de la creatina quinasa 2 para el diagnóstico del infarto agudo de miocardio. Con la valoración conjunta de ambos constituyentes se refleja la evolución del infarto desde las 6 primeras horas hasta después de las 72 horas del inicio del cuadro clínico.

5 BIBLIOGRAFÍA

1. Markert CL. The molecular basis for isoenzymes. *Ann NY Acad Sci* 1968;151:14-40
2. Eliasson R, Haggmann K, Wiklund B. Lactate dehydrogenase in human seminal plasma. *Scand J Lab Invest* 1967;20:353
3. McKenzie D, Clark PI, Hendersen AR. How accurate are lactate dehydrogenase isoenzyme estimations by thin-layer agarose fluorescent technique? *Clin Chem* 1976;22:1995-8
4. McKenzie D, Henderson AR. Electrophoresis of lactate dehydrogenase isoenzymes. *Clin Chem* 1983;29:189-95
5. Moses GC, Ross ML, Henderson AR. Ten electrophoretic methods compared with a selected method for quantifying lactate dehydrogenase isoenzymes in serum. *Clin Chem* 1988;39:1885-90
6. Pridgar EM, Leung FY, Henderson AR. Accuracy of lactate dehydrogenase isoenzyme estimations by a thin-layer agarose fluorescent

- technique: Experience with ternary and quaternary mixtures of purified human lactate dehydrogenase isoenzymes. *Clin Chem* 1983; 29:2096-9
7. Mercer DS. Improved column method for separating lactate dehydrogenase isoenzymes 1 and 2. *Clin Chem* 1978;24:480-2
 8. Hsu M-Y, Kohler MM, Barolia L. Separation of five isoenzymes of serum lactate dehydrogenase by discontinuous gradient elution from a miniature ion-exchange column. *Clin Chem* 1979;25:1453-8
 9. Menon MP, Anderson G, Namblar GK. Determination of human serum lactate dehydrogenase isoenzymes by anion exchange chromatography. *Anal Chem* 1983;55:1385-90
 10. Schlabach TD, Fulton JA, Mockridge PB. Determination of serum isoenzyme activity profiles by high performance liquid chromatography. *Anal Chem* 1980;52:729-33
 11. Kawaguchi S, Marui Y, Arisue K, Koda K, Hayashi C, Miyai K. Automatic analysis of serum lactate dehydrogenase isoenzymes by high-performance ion-exchange chromatography. *J Chromatogr* 1986;374:45-50
 12. Raymond J, Shamberger RJ. Lactate dehydrogenase isoenzyme 1 determined by inhibition with 1,6-hexanediol. *Clin Chem* 1987; 33:992
 13. Abbott WA, Byrne RS. A new method for the selective determination of lactate dehydrogenase isoenzyme 1 (LD-1) using sodium perchlorate. *Clin Chem* 1987;33:991
 14. Onigbinde TA, Wu AHB, Jhonson M, Wu Y-S, Collinsworth WL, Simmons MJ. Clinical evaluation of an automated chemical inhibition assay for lactate dehydrogenase isoenzyme 1. *Clin Chem* 1990;36:1819-22
 15. Sanford KJ, Meyer DJ, Mathiason JJ. Selective inactivation of lactate dehydrogenase with ionic surfactants. *Biochem* 1981;20:3207-14
 16. Painter PC, Meter SV, Dabbs RL, Clement GE. Analytical evaluation and comparison of DuPont aca lactate dehydrogenase-1 (LD1) isoenzyme assay diagnostic efficiency for acute myocardial infarction detection with other methods and aca CK-MB. A two-site study. *Angiology* 1994;45:585-95
 17. Usategui-Gómez M, Wicks RW, Warshaw M. Immunochemical determinations of the heart isoenzyme of lactate dehydrogenase (LDH-1) in human serum. *Clin Chem* 1979;25:729-34
 18. Raabo E, Ingwersen SH. Immunochemical assay of lactate dehydrogenase isoenzyme 1. *Clin Chem* 1984;30:154-5
 19. Usategui M, Del Vecchio PJ Jr. Use of the Isomune-LD Kit in diagnosis of myocardial infarction. *Clin Chem* 1981;27:773-5
 20. Belding RC, Reynoso G. An evaluation of the immunochemical LD-1 method in routine clinical practice. *Clin Chem* 1983;16:296-8
 21. Adan J, Berstein LH, Babb J. Lactate dehydrogenase isoenzyme-1/total ratio: accurate for determining the existence of myocardial infarction. *Clin Chem* 1986;32:624-8
 22. Bondar RJJ, Grisley DW, Nealon DA. NCCLS proposed guideline C5-P2. Methodological principles for selected analytes: enzymes. Villanova, National Committee for Clinical Laboratory Standards 1987:279-87
 23. Rotenberg Z, Davidson E, Weinberger I. The efficiency of lactate dehydrogenase isoenzyme determination for the diagnosis of acute myocardial infarction. *Arch Pathol Lab Med* 1988;112:895-7
 24. Jensen AE, Reikvam A, Asburg A. Diagnostic efficiency of lactate dehydrogenase isoenzymes in serum after acute myocardial infarction. *Scand J Clin Lab Invest* 1990;50:285-9.

Correspondencia:
Sociedad Española de Bioquímica Clínica
y Patología Molecular
Comisión de Enzimas
C/ Padilla, 323-325 entl. 4ª
08025 Barcelona