

DOCUMENTO

Método recomendado para la determinación en rutina de la concentración catalítica de lactato deshidrogenasa en suero sanguíneo humano

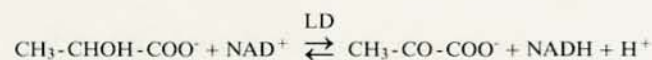
Sociedad Española de Química Clínica, Comité Científico, Comisión de Enzimas

Manel Guardiola, Rosa López y F. Javier Gella^a

Documento F, Fase 3, Versión 1

1. Introducción

La lactato deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.27; L-lactato: NAD oxidoreductasa; LD) es una enzima citosólica, de masa molecular relativa aproximada de 140 000, que cataliza la oxidación de L-lactato a piruvato, actuando como aceptor de hidrogeniones la coenzima nicotinamida-adenina dinucleótido (NAD⁺)¹.



La reacción es reversible estando el equilibrio fuertemente desplazado hacia la formación de L-lactato (pH 7,2-7,8).

La lactato deshidrogenasa no es específica para piruvato ni para el L-lactato, pudiendo reaccionar con α -oxo y α,β -dioxoácidos (en lugar de piruvato) y con α -hidroxi o α -hidroxi- γ -oxoácidos en lugar de lactato².

La lactato deshidrogenasa reacciona únicamente con el anómero L del lactato y sólo utiliza como coenzima el sistema NAD⁺/NADH.

La molécula de lactato deshidrogenasa está formada por 4 cadenas polipeptídicas. Cada cadena puede ser de 2 tipos: H o M, lo que determina la existencia de 5 isoenzimas³, que según su velocidad de desplazamiento electroforético con respecto al ánodo a un pH débilmente alcalino, se denominan:

LD1: la más rápida, formada por 4 cadenas del tipo H.

LD2: formada por 3 cadenas H y 1 M.

LD3: formada por 2 cadenas H y 2 M.

LD4: formada por 1 cadena H y 3 M.

LD5: la más lenta, formada por 4 cadenas M.

Existe una sexta isoenzima compuesta por 4 cadenas polipeptídicas que no corresponden a los tipos anteriormente indicados denominada LDX, y que se localiza exclusivamente en los testículos postpuberales⁴.

La LD1 y la LD2 se localizan preferentemente en el músculo cardíaco, riñón y eritrocitos; la LD4 y LD5, en hígado, músculo esquelético y diversos tejidos neoplásicos, y la LD3 posee múltiples localizaciones: bazo, pulmón, nódulos linfáticos, plaquetas, musculatura uterina y glándulas endocrinas, entre otros.

La concentración catalítica de lactato deshidrogenasa en suero está aumentada en diversas situaciones patológicas: infarto agudo de miocardio, miocarditis, anemias megaloblásticas y hemolíticas, inflamaciones hepáticas, necrosis tubular renal, pielonefritis, leucemias y diversas enfermedades tumorales, con o sin metástasis hepática, entre otras.

La selección de las condiciones óptimas para la medida de la concentración catalítica de la lactato deshidrogenasa resulta difícil debido a la presencia en el espécimen de una mezcla variable de isoenzimas, cada una de

a. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad Autónoma de Barcelona. Unidad Docente del Hospital de la Sta. Creu i Sant Pau. Avda. S. Antonio M. Claret 167, 08025 Barcelona

las cuales tiene unas condiciones óptimas diferentes.

Los métodos espectrométricos continuos son los más indicados para la determinación de la concentración catalítica de la lactato deshidrogenasa, y de entre ellos, los que monitorizan la reacción de piruvato a lactato son los que gozan actualmente de mayor aceptación entre diversas sociedades de química clínica: alemana⁵, escandinava⁶ y francesa⁷. La Federación Internacional de Química Clínica (IFCC) no ha recomendado hasta la fecha ningún método de referencia.

Las ventajas de los métodos que utilizan el sentido de la reacción de piruvato a lactato sobre los que utilizan el sentido contrario son: a) un cambio de absorbancia mayor por unidad de tiempo, lo cual representa mayor sensibilidad espectrométrica; b) se requieren menores concentraciones de reactivo, lo cual disminuye el coste de la determinación; c) pueden prepararse reactivos en estado sólido; d) las soluciones de los reactivos son más estables y e) el equilibrio de la reacción favorece la formación de L-lactato⁸.

El único inconveniente que presentan estos métodos es la presencia de sustancias inhibidoras de la actividad catalítica de la lactato deshidrogenasa en algunas preparaciones comerciales de NADH⁹, aunque en la actualidad existen preparaciones de NADH con pureza suficiente.

Esta comisión ha estudiado los diferentes métodos recomendados por las sociedades anteriormente citadas y ha optado por el método propuesto por la Société Française de Biologie Clinique para ser utilizado como método de rutina. Se ha modificado la temperatura de reacción a 37 °C, comprobando que no existen diferencias significativas entre los incrementos en las velocidades de conversión de las diferentes isoenzimas de la lactato deshidrogenasa al variar la temperatura de 30 °C (utilizada por la sociedad francesa) a 37 °C (ver Anexo II). El método recomendado puede ser fácilmente automatizado o adaptado a las condiciones de trabajo de rutina de cualquier laboratorio.

2. Fundamento

El método recomendado para la determinación de lactato deshidrogenasa en suero, se basa en la siguiente reacción:



La concentración catalítica se determina por la medición, en forma continua a 340 nm, de la velocidad de conversión del NADH en NAD⁺ en el medio de reacción a 37 °C.

La inclusión de NaCl en la mezcla de reacción, reduce notablemente la inhibición por exceso de sustrato de las isoenzimas cardíacas, lo que permite aumentar la concentración de sustrato y obtener velocidades más cercanas a la $V_{\text{máx}}$ para todas las isoenzimas⁷.

3. Condiciones recomendadas para la medición

Las condiciones recomendadas para la determinación en suero son las siguientes:

Temperatura	37,0 °C
pH	7,2
Tris(hidroximetil)aminometano	80 mmol/L
Piruvato	1,6 mmol/L
NADH	0,20 mmol/L
NaCl	200 mmol/L
Fración de volumen de muestra	0,0166 (1:60)

Las concentraciones indicadas corresponden a la mezcla final de reacción.

4. Obtención, transporte y conservación de los especímenes

La sangre debe extraerse con la mínima estasis venosa posible. El suero es el sistema preferido para las mediciones de todas las actividades catalíticas enzimáticas, incluyendo la lactato deshidrogenasa. Pueden encontrarse concentraciones elevadas de lactato deshidrogenasa cuando la muestra analizada procede de sangre capilar¹¹. El plasma, debido a su contenido en plaquetas, presenta una concentración de lactato deshidrogenasa mayor que el suero¹²⁻¹³.

Varios anticoagulantes inhiben la actividad catalítica de la lactato deshidrogenasa, tales como los oxalatos y los fluoruros. Existen opiniones divergentes con respecto a la influencia de la heparina sobre la actividad catalítica de la lactato deshidrogenasa. No es conveniente la utilización de suero recogido con iodoacetato de litio¹⁴.

Debido a la alta concentración de LD1 en los eritrocitos una separación del suero demasiado tardía, así como la hemólisis darán resultados elevados.

La LD5 es una isoenzima termolábil, por ello no se recomienda congelar los sueros para una determinación posterior. La concentración catalítica de lactato deshidrogenasa total se mantiene estable durante 24 horas a 0-25 °C. A partir de las 24 horas se detectan pérdidas significativas de la concentración catalítica, tanto conservando la enzima en refrigerador como a temperatura ambiente¹⁵.

5. Reactivos

Los reactivos empleados deben cumplir las especificaciones generales establecidas por la IFCC¹⁰. El NADH debe ser de una pureza superior al 98% y estar libre de inhibidores de la lactato deshidrogenasa.

Composición del reactivo de trabajo

Tris(hidroximetil)aminometano 81,3 mmol/L, piruvato 1,6 mmol/L, NADH 0,2 mmol/L, cloruro de sodio 203,3 mmol/L, pH 7,20.

6. Procedimiento analítico

Condiciones operatorias

Longitud de onda: 340 nm (± 1 nm)

Paso de luz: 1,00 cm

Volumen final de la mezcla de reacción: 3,05 mL

Temperatura: 37,0 °C (± 0,1 °C).

Esquema analítico

Preincubar a 37,0 °C el espécimen y el reactivo de trabajo. Pipetear:

Reactivo de trabajo	3,00 ml
Suero	0,05 ml

Mezclar e incubar inmediatamente a 37,0 °C. A los 30 segundos de iniciada la reacción, seguir de forma continua el cambio de absorbancia durante 3 minutos.

7. Cálculos

Calcular el $\Delta A/\text{minuto}$ obtenido para el intervalo de mediciones del período lineal de la reacción.

Teniendo en cuenta que el coeficiente de absorción molar del NADH a 340 nm es de $630 \text{ m}^2 \text{ mol}^{-1}$, se deducen las siguientes ecuaciones:

$$\begin{aligned}\Delta A/\text{min} \times 161,4 &= \mu\text{kat/L} \\ \Delta A/\text{min} \times 9683 &= \text{U/L}\end{aligned}$$

8. Intervalo analítico

La concentración catalítica de la lactato deshidrogenasa es proporcional a la velocidad de transformación hasta $25 \mu\text{kat/L}$ (1500 U/L). Rebasado este límite es aconsejable efectuar una dilución del suero con una solución de NaCl 154 mmol/L .

9. Valores usuales

Los valores usuales que se encuentran en el suero de personas presuntamente sanas son los siguientes:

	$\mu\text{kat/L}$	U/L
Adultos	3,40 - 6,80	207 - 414
Niños (0 a 6 meses)	10,2 - 17,0	613 - 1020

Los valores usuales han sido determinados a 30 °C⁷ y transformados en sus valores equivalentes a 37 °C mediante uso de un factor de corrección.

Los valores usuales son más elevados en lactantes y disminuyen progresivamente con la edad hasta alcanzar los de adulto sobre los 15 años.

10. Interferencias

Diversos medicamentos pueden producir interferencias en la determinación de lactato deshidrogenasas¹⁶. Se desconoce en muchos de ellos que tipo de interferencia producen: analítica o biológica.

Bibliografía

1. Moss DW, Henderon AR, Kachmar JF. Enzymes: Lactate dehydrogenase. En: Tietz NW, dir. Textbook of Clinical Chemistry, Philadelphia: Saunders, 1986: 691-703.

2. Demetriou JA, Drewers PA, Gin JB. Enzimas: Deshidrogenasa láctica. En: Henry RJ, Cannon DC, Winkelman JW, dirs. Química Clínica, vol II. Barcelona: Jims, 1983: 823-839.
3. Everse J, Kaplan NO. Lactate dehydrogenases: Structure and function. *Avd Enzymol* 1973; 37: 61-197.
4. Henderson AR. Isoenzymes of lactate dehydrogenase. En: Bergmeyer HU, dir. Methods of enzymatic analysis. Vol III. Weinheim: Verlag Chemie, 1983: 138-139.
5. Deutsche Gessellschaft fur Klinische Chemie Standardization of methods for the estimation of enzyme activities in biological fluids. Experimental basis for the optimized standard conditions. *Z Klin Chem Klin Biochem* 1972; 10: 281-301.
6. Committee on Enzymes of Scandinavian Society for Clinical Chemistry and Clinical Physiology. Recommended methods for the determination of four enzymes in blood. *Scand J Clin Lab Invest* 1974; 33: 291-306.
7. Mathieu M, Artur Y, Aubry C et al. Recommendations pour la mesure de la concentration catalytique de la lactate deshidrogenase dans le sérum humain a + 30 °C. *Ann Biol Clin* 1982; 40: 87-164.
8. Vanderlinde RE. Measurement of total Lactate Dehydrogenase Activity. *Ann Clin Lab Scien* 1985; 15: 13-31.
9. Loshon CA, McComb RB, Bond LW et al. Formation and properties of Lactate Dehydrogenase inhibitors in NADH. *Clin Chem* 1977; 23: 1576-1580.
10. Bowers GN, Bergmeyer HU, Moss DW. Approved recommendation (1978) on IFCC Methods for measurement of catalytic concentrations of enzymes Part 1. General considerations concerning the determination of the catalytic concentration of an enzyme in the blood serum or plasma of man. *Clin Chim Acta* 1979; 98: 163F-174F.
11. Haymond RE, Knight JA. Venous serum, capillary serum and capillary plasma compared for use in determination of lactate dehydrogenase and aspartate aminotransferase activities. *Clin Chem* 1975; 21: 896-897.
12. Rothwell DJ, Jendrejczak B, Becker M et al. Lactate dehydrogenase activities in serum and plasma. *Clin Chem* 1976; 22: 1024-1026.
13. Bails R, Prior MP, Edwards JB. Plasma lactate dehydrogenase activities will be increased if detergent and platelets are present. *Clin Chem* 1977; 23: 1056-1058.
14. Robertson EA, Chesler RA, Elin RJ. Serum Collected with lithium iodoacetate is unsuitable for electrolyte and lactate dehydrogenase measurements. *Clin Chem* 1980; 26: 1228-1229.
15. Schmidt E, Schmidt FW. Brief Guide to Practical Enzyme Diagnosis. 2nd revised ed. Mannheim: Boehringer Mannheim GmbH, 1976.
16. Young DS, Pestaner LC, Gibberman V. Effects of drugs on clinical laboratory tests. *Clin Chem* 1975; 21: 1D-432D.

Anexo I. Método recomendado por la Société Française de Biologie Clinique (SFBC)

El método que se describe a continuación es un resumen del publicado por la Commission Enzymologie de la SFBC en 1982⁷, basado en los mismos principios enunciados en la descripción del método de rutina recomendado por la Sociedad Española de Química Clínica en este documento.

Reactivos

REACTIVO 1: Tris(hidroximetil)aminometano/HCl $81,3 \text{ mmol/L}$, NaCl $203,3 \text{ mmol/L}$ (pH 7,2).

REACTIVO 2: NADH $0,244 \text{ mmol/L}$ en Reactivo 1.

REACTIVO 3: Piruvato $9,76 \text{ mmol/L}$ en Reactivo 1.

Procedimiento de medida

Condiciones operatorias

Longitud de onda: 340 nm ($\pm 1 \text{ nm}$)

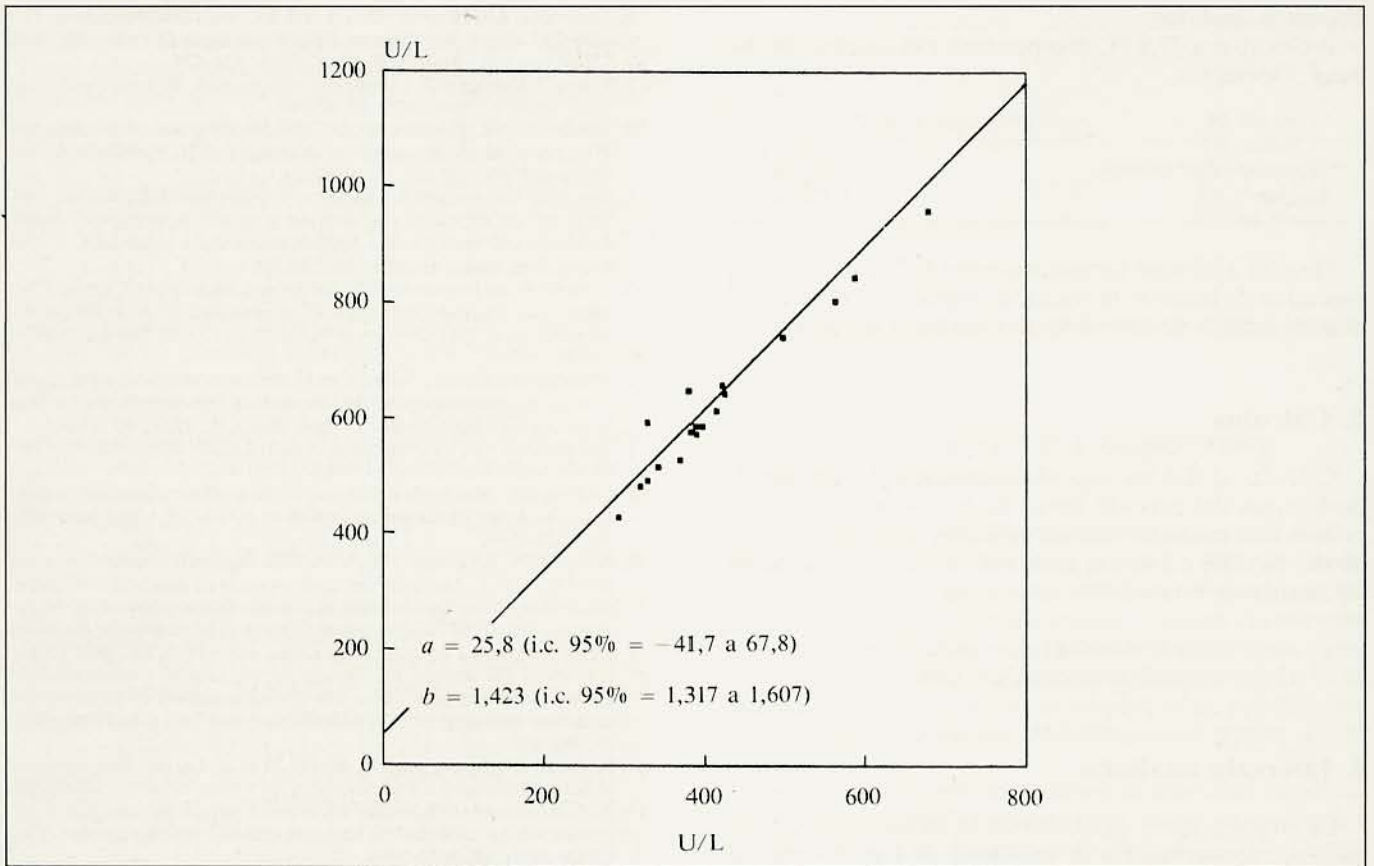


Figura 1. Pacientes con infarto agudo de miocardio. (a = ordenada en el origen; b = pendiente; i.c. = intervalo de confianza)

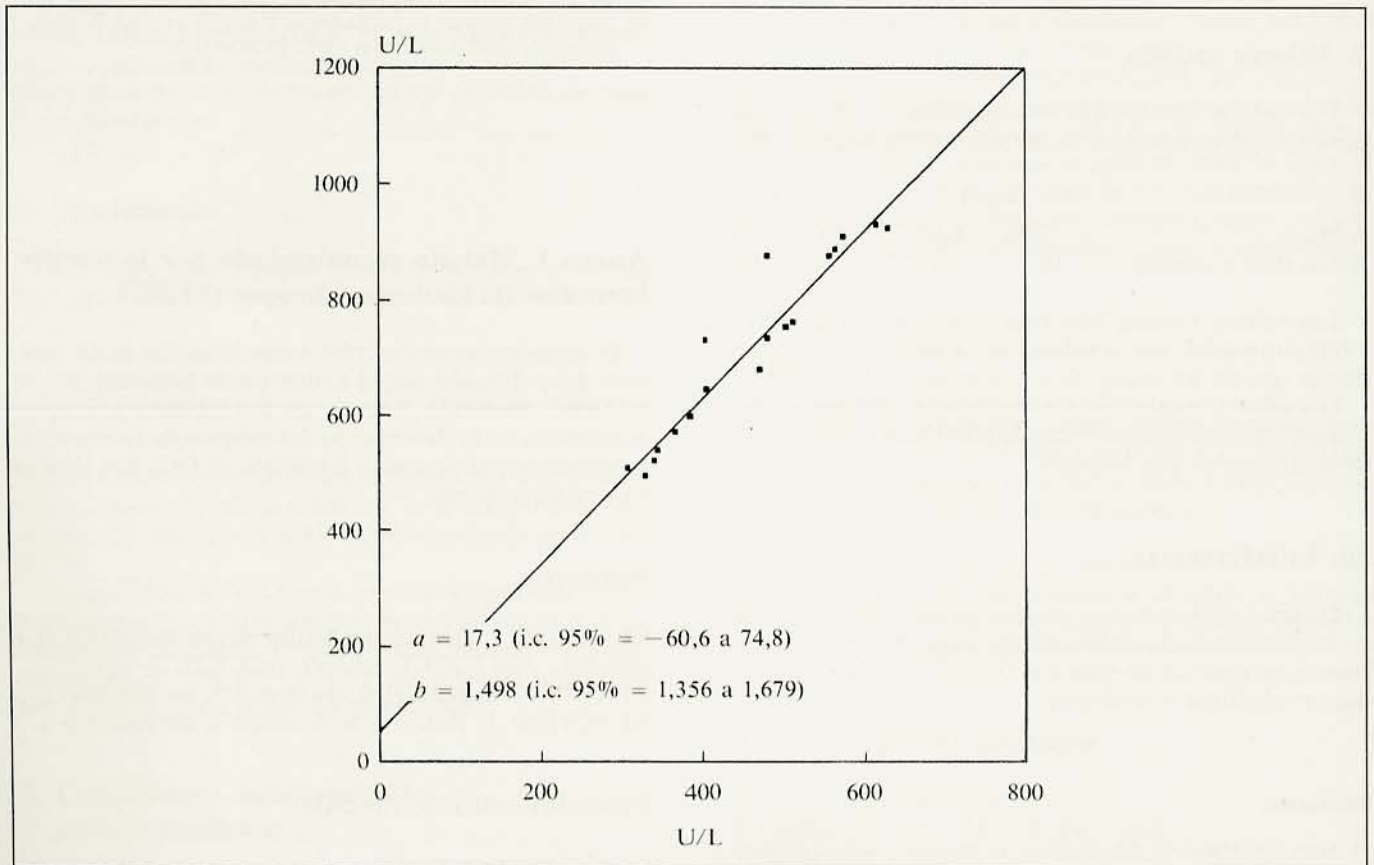


Figura 2. Pacientes sin infarto agudo de miocardio. (a = ordenada en el origen; b = pendiente; i.c. = intervalo de confianza)

Paso de luz: 1 cm
Volúmen final de la mezcla de reacción: 3,05 mL
Temperatura: 30,0 °C

Esquema analítico

Preincubar a 30,0 °C el espécimen y los Reactivos 2 y 3. Pipetear:

Reactivo 2	2,5 mL
Espécimen	0,05 mL
Reactivo 3	0,5 mL

Mezclar e incubar inmediatamente a 30,0 °C. A los 30 segundos de iniciada la reacción, seguir de forma continua el cambio de absorbancia durante 2 minutos.

Cálculos

Calcular el $\Delta A/\text{minuto}$ obtenido para el intervalo de mediciones del período lineal de la reacción.

La concentración catalítica se calcula utilizando los factores siguientes:

$$\Delta A/\text{min} \times 161,4 = \mu\text{kat/L}$$
$$\Delta A/\text{min} \times 9683 = \text{U/L}$$

Anexo II. Comparación entre el método de rutina recomendado por la SEQC y el método de la SFBC

La única diferencia en las condiciones de reacción entre el método recomendado por la SEQC y el método de la SFBC es la temperatura de incubación. El cambio de temperatura podría afectar en distinto grado a las diferentes isoenzimas de la lactato deshidrogenasas, lo que aconsejó realizar un estudio en el que se compararon ambos métodos en dos grupos de enfermos: El primer grupo estaba constituido por pacientes afectados de infarto agudo de miocardio, con elevación de las isoenzimas cardíacas. El segundo grupo incluía pacientes con diversas enfermedades (musculares, hepáticas, neoplásicas, etc.) con elevación de las isoenzimas del músculo esquelético.

Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 1 y 2. Se aplicó el procedimiento *Passing-Bablok* de comparación de métodos, a los valores obtenidos a 30 °C (eje de abscisas) frente a los obtenidos a 37 °C (eje de ordenadas), en el primer y segundo grupo. El intervalo de confianza del 95% de las 2 pendientes se sobreponía y lo mismo ocurría con el de las ordenadas en el origen. También se realizó una prueba de paralelismo de las pendientes obtenidas con ambos grupos, no observándose diferencias significativas. Esto indica que no existen diferencias significativas entre ambas rectas, es decir, que al utilizar el método de la SFBC a 37 °C no se observan incrementos significativamente diferentes en muestras con distinta composición de isoenzimas.