

PATRÓN ELECTROFORÉTICO ANÓMALO DE LA DESHIDROGENASA LÁCTICA POR FIJACIÓN A COMPLEJO CON IgA

Eduardo Brilla*, Marianela Vargas*, Carmen Valiente**

Key Word Index: Lactate dehydrogenase isoenzymes, electrophoresis, polyacrylamide gel, electroforesis, agar gel, immunoelectrophoresis

RESUMEN

Se presenta el caso de un patrón anormal en el isoenzimograma de la deshidrogenasa láctica (DHL), caracterizado por la ausencia de la banda dos y una hiperactividad en la zona de la banda tres; otras zonas mostraron actividad normal (electroforesis en agarosa). La paciente, con artritis psoriática, conforme mejoró la sintomatología reumatológica, reversionó el patrón de isoenzimas D.H.L. hacia la normalidad.

Las isoenzimas de la D.H.L. fueron normales en tejidos (eritrocitos) y se demostró por inmunoprecipitación que la anomalía se originó en complejos circulantes, de unión lábil D.H.L. -IgA. Por electroforesis en gel de poliacrilamida, se presentó un conjunto de cuatro extrabandas en posición catódica. [Rev. Cost. Cienc. Méd. 1986; 7(2):203-207].

INTRODUCCIÓN

Se ha establecido que la deshidrogenasa láctica (DHL; L-lactato: NAD oxidoreductasa; EC 1.1.1.27) está constituida por un tetrámero organizado por asociación entre cadenas de aminoácidos, formando unidades denominadas H y M, que determinan cinco posibilidades de combinación: 4H, 3HM, 2H₂M, H₃M y 4M. Cada uno de los dos tipos de cadenas de polipéptidos son codificados por genes del tipo A ó B (4, 12, 13, 18). El descubrimiento de la DHL X, exclusiva de testículo humano y su codificación por el gene denominado "C", no desarmoniza, teóricamente, con lo establecido sobre la codificación genética de la DHL (3, 10, 12, 20, 21, 23). Un discreto número de reportes se ha referido a patrones anómalos de la DHL debidos a un cambio en la movilidad de fracciones, extra bandas o ambos (1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 14, 15, 16, 18, 19, 22, 24). Estos hallazgos se han reportado

en individuos sanos y pacientes con diversos padecimientos, pero en ningún caso se ha demostrado una correlación fisiopatológica directa entre la enfermedad y el patrón anómalo DHL (1, 8, 11). El hallazgo más común reportado se refiere a los patrones atípicos, como producto de las interacciones entre las fracciones DHL y la inmunoglobulina A (1). También se ha reportado patrones anómalos por interacción de la DHL y la inmunoglobulina G (8,19). El presente estudio correspondió al análisis de un patrón atípico DHL, descubierto en forma Casual en una paciente que sufre de una artritis psoriática y en quien se demostró en un principio, mediante el análisis de las isoenzimas DHL, un marcado predominio de la banda DHL₃ y una ausencia de la banda DHL₂ (electroforesis, agarosa). La investigación pretende la caracterización de un hallazgo infrecuente, para comunicar las características del fenómeno.

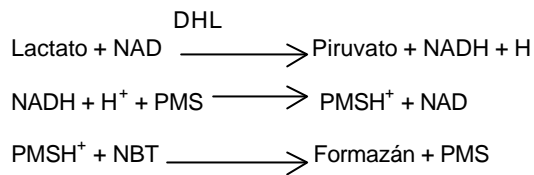
MATERIAL Y MÉTODOS

Los estudios de laboratorio comprendieron análisis hematológicos rutinarios, anticuerpos antinucleares (inmunofluorescencia indirecta), inmunoglobulinas mediante inmunodifusión radial (Hyland Immunoplate, California), inmunoelectroforesis (Arquembourg, P. Ch.), pruebas de inmunoneutralización con antisueros monoespecíficos tipo IgA, IgG e IgM (Behring Institut, Germany), electroforesis en soportes de agarosa, MEE (Sigma Chemical Company, St. Luis, Mo), acetato de celulosa (Gelman Instrument Company, Michigan) y gel de poliacrilamida (Bio Rad Laboratories, California).

Para el revelado de la actividad isoenzimática DHL se utilizó el procedimiento de Neremberg modificado (2, 17), con reactivos preparados en nuestro laboratorio con sales de la compañía Sigma Chemical Company, según la siguiente secuencia de reacciones:

* Departamento de Análisis Clínicos, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

** Departamento de Microbiología, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.



PMS: Metasulfato de fenacina.
 NAD: Nicotinamida adenina dinucleótico.
 NBT: Azul de tetrazolium.

La electroforesis en gel de poliacrilamida se llevó a cabo según la técnica de Buchler Instruments (New Jersey, USA), utilizando para el revelado de la actividad enzimática, los ingredientes propuestos por Neremberg, diluidos 1:2.

La inactivación térmica para discriminar el predominio de cadenas Tipo "H" de las construidas por cadenas "M" se llevó a cabo mediante el precalentamiento de una alícuota de suero a 56°C por treinta minutos, con la separación posterior electroforética y revelado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se trata de una paciente femenina de 44 años, con una anemia crónica (1981 -1985), con valores de hematocrito que variaron entre 31.5 y 39 por ciento. En 1980 se reportó lesiones psoriáticas, constituidas por placas eritemoescamosas de forma y tamaño variable en el cuero cabelludo, los codos y las rodillas. Paralelamente a estos hallazgos la paciente refirió dolores articulares en los hombros y los codos. Un estudio radiológico mostró un proceso artrítico activo, con osteoporosis de la vecindad articular (rodilla derecha). La historia clínica fue negativa por tabaquismo, alcoholismo y alergias. La electro-

cardiografía fue normal. Una evaluación clínica y estudios radiológicos no mostraron evidencia alguna de trastornos oncológicos.

En 1981, el proceso artrítico evolucionó a una forma francamente incapacitante; los análisis de laboratorio mostraron un factor reumatoide positivo (Rheumanosticon latex, 1:320), anticuerpos antinucleares positivos (1:4), velocidad de eritrosedimentación acelerada, células L.E. y proteína "C" Reactiva negativas. En un líquido articular recolectado en 1980, se reportó células RA positivas. La determinación de electrolitos (sodio, potasio y cloruro), proteínas séricas, inmunoglobulinas, glucosa, urea y creatinina fueron normales. El proteinograma electroforético indicó una zona de ligero aumento anormal en la concentración de proteína en la zona de las gamaglobulinas, del tipo policlonal.

En 1983, se reportó un isoenzimograma de la deshidrogenasa láctica anómalo, caracterizado por ausencia de la DHL₂, franca hiperactividad de la DHL₃ y otras zonas normales. La actividad total DHL sérica mostró una ligera hiperactividad con respecto a los valores normales de referencia.

Considerando el tipo de patrón isoenzimático DHL, caracterizado por una franca hiperactividad en la banda DHL₃, y la banda dos muy deprimida (otras zonas normales) (Fig. 1); se descartó un posible polimorfismo genético mediante el análisis de isoenzimas en tejido: El patrón isoenzimático (DHL) eritrocítico fue normal. (Cuadro 1). Un estudio familiar practicado a tres hermanos de la paciente y uno de sus padres (el otro no la sobrevive), fue normal en cuanto a la DHL (cuantificación colorimétrica y electroforesis).

CUADRO 1

EFFECTOS DE SUERO NORMAL Y HEMOLIZADOS SOBRE EL ZIMOGRAMA DE LA PACIENTE *

	Zimograma D.H.L.
Suero X** + Suero normal (X)	Patrón anómalo + patrón normal; sobrepuestos
Suero X + hemolizado paciente	Patrón anómalo + patrón hemolizado normal; sobrepuestos
Suero X** + hemolizado normal	Patrón anómalo + patrón hemolizado normal; sobrepuestos
Hemolizado X** + hemolizado X	Patrón normal + patrón normal; sobrepuestos

* Electroforesis en gel de agarosa y en gel de poliacrilamida.
 ** Suero paciente.

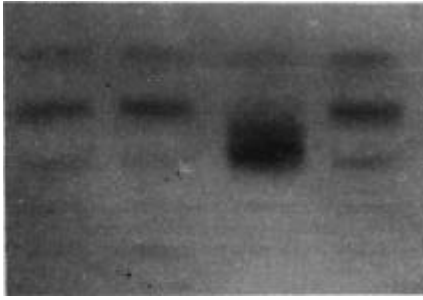


FIG. 1: Zimograma de suero, agarosa
Posición 1, 3 y 4: sueros control de referencia normal
Posición 2: suero de la paciente

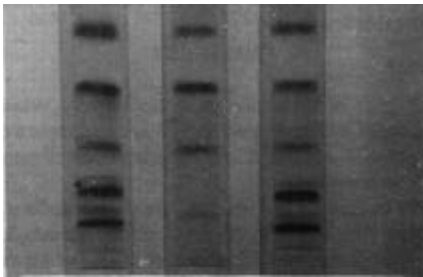


FIG. 2: Zimograma de suero, agarosa
1 y 2: suero referencia normal
3 y 4: suero paciente tratado con Anti IgA
Nótese complejo IgA-anti IgA-DHL en el origen

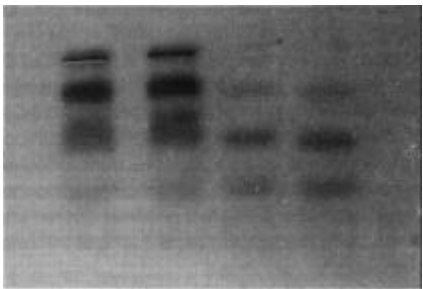


FIG. 3: Zimograma de suero, gel de poliacrilamida
Suero control normal en posición central, laterales: paciente

De haberse tratado de un problema de codificación genética, siendo las cadenas "H" codificadas por el mismo gene, el fenómeno habría comprometido también la banda DHL₁, compuesta exclusivamente por subunidades 'H' (4,6, 13).

Al mezclarse suero de la paciente con sueros y hemolizados, se obtuvo el isoenzimograma anómalo de la paciente con sobreposición de patrones normales, lo que demuestra que el fenómeno es inducido in vivo y no se modifica por sueros o hemolizados normales (Cuadro 1).

El tratamiento del suero con anticuerpos anti IgA y la electroforesis posterior, mostró la formación de un complejo con DHL adsorbida, ubicado en el punto de aplicación de la muestra, lo que significa que el fenómeno en sangre periférica se debe a un complejo, en el cual se asocian al menos la DHL y la inmunoglobulina A. Lo anterior no ocurrió cuando se trató el suero con Anti IgG y Anti IgM. (Cuadro 2, Fig. 2).

La separación electroforética del suero de la paciente en gel de poliacrilamida, reveló que se trata de complejos heterogéneos, pues en este soporte, más discriminativo que la agarosa, se presentó cuatro "extrabandas", todas ellas ubicadas en posición catódica (Fig. 3).

Dos de las extrabandas se localizaron adelante de la banda cuatro y las otras dos entre las bandas cuatro y cinco (la más catódica).

La inactivación térmica de la muestra (56° C por treinta minutos), y revelado posterior de la actividad por zonas (electroforesis), mostró que la fracción DHL involucrada en el fenómeno es un tetrámero constituido predominantemente por cadenas "H" (confieren termoestabilidad), lo que es congruente con la posición en soporte de agarosa y no con la ubicación en que se disponen en el gel de poliacrilamida, que discrimina no solamente por carga eléctrica sino también en virtud del tamaño y forma de las partículas. El tratamiento del suero con anti IgA y la subsecuente determinación del factor reumatoide, no mostró variaciones significativas del título, por lo que no parece estar directamente involucrado en el complejo al que se integra la enzima.

El patrón anómalo revertió hacia lo normal durante el desarrollo de la investigación y paralelamente a la mejoría clínica de la paciente (evaluación a través de dos años), lo que puede significar que la patología reumatológica está asociada-al fenómeno que ocurre en sangre periférica cuando la DHL se integra al complejo. El suero de la paciente, cuando fue mezclado con suero normal e hiperactivo, no mostró un efecto activador o inhibitor sobre la DHL, lo que sugiere que el fenómeno o no es de inducción

CUADRO 2

TRATAMIENTO DEL SUERO "PACIENTE" CON INMUNOGLOBULINAS Y ZIMOGRAMAS D.H.L. RESULTANTES*

	Patrón D.H.L.	Formación complejo** Ac-Ig-Enzima
"Paciente" (X)	Zimograma anómalo	---
X + Anti-IgG	Zimograma anómalo original	Negativo
X + Anti-IgM	Zimograma anómalo original	Negativo
X + Anti-IgA	Zimograma anómalo modificado	Positivo

* Electroforesis en gel de agarosa y en gel de poliacrilamida.

** Presencia de complejo anticuerpo-Inmunoglobulina-D.H.L., demostrable por actividad D.H.L. en punto de aplicación de la muestra

in vitro o no modifica la actividad enzimática. El tratamiento del suero con anti IgA y la inmunoelectroforesis posterior, muestra la presencia de bandas de proteínas que no aparecen en la muestra original, lo cual es compatible con un complejo enzima-IgA-Ac, al que se asocian otras proteínas.

El hallazgo descrito corresponde a una frecuencia dentro de la población analizada en nuestro laboratorio hasta el presente, de aproximadamente 1 -:8000 muestras analizadas.

El hallazgo común más característico descrito para la formación de complejos DHL-IgA, es su ubicación en la zona de la DHL₃, determinando una banda ancha, difusa e hiperactiva (1, 11, 15, 21). El comportamiento de la enzima ha sido normal, en todos los casos descritos, y la inmunoglobulina A es para algunos autores "anómala".

La hiperactividad total DHL del suero puede explicarse como una tasa baja de rompimiento de complejos en la sangre periférica y/o a su incapacidad de escapar por filtración glomerular.

Se han encontrado patrones enzimáticos atípicos, producto de las interacciones como la descrita, asociados a diversas patologías, como el infarto del miocardio, la úlcera duodenal, el lupus eritematoso, la gastritis crónica, la urticaria solaris, la enfermedad de Hodgkin, la hepatatitis B, la cirrosis alcohólica, el asma, y otras., tanto en individuos jóvenes como en viejos, y aún en personas sanas. En ninguno de los casos descritos, el fenómeno de la asociación DHL-IgA se ha podido asociar fisiopatológicamente con la enfermedad del paciente.

En nuestro caso de estudio, conforme la paciente mejoró clínicamente, el patrón tendió a

revertir a lo normal, aunque siempre conservando una anomalía de discreta apreciación.

Algunos autores han planteado la posibilidad de que la IgA integrada a este tipo de complejos sea anómala y por lo tanto, la principal mediadora en el fenómeno (1). Los hallazgos clínicos y de laboratorio en esta paciente, nunca mostraron evidencia alguna de una deficiencia inmunológica asociable a la IgA, a pesar de que en una etapa de la medicación recibió terapia inmunosupresora.

Si bien no se ha podido descartar las anomalías de esta inmunoglobulina que no comprometen su función biológica, se ha planteado que el fenómeno podría desencadenarse por un agente inductor de complejos, que en situaciones no determinadas aún, provoque la formación de este tipo de agregados macromoleculares. El patrón anómalo aquí descrito corresponde al tipo I sugerido por Podlasek (18): la producción de macrocomplejos por la interacción con inmunoglobulinas.

ABSTRACT

A case of an abnormal lactic dehydrogenase pattern, characterized mainly by the absence of activities of band 2 and hyperactivities of band 3, is presented. Other zones were normal. The patient suffering from psoriasis arthritis evolved towards amelioration of rheumatoid symptoms, during which the pattern reverted to normal.

The isoenzyme pattern was normal in tissue (erythrocytes) and it was shown by immunoprecipitation that the anomalies originated in circulating blood from a labile complex of a LDH with IgA.

BIBLIOGRAFÍA

1. Biewenga, J. Serum Lactate Dehydrogenase Isoenzymes Linked to Immunoglobulin A. *Clin. Chim. Acta*, 1972;40:407-414.
2. Brilla, E., Brilla, A., Quirós, F., Visoná, C. Estudio Enzimático en el Infarto Agudo del Miocardió. *Act. Med. Cost.* 1978; 21:339-345.
3. Butrimovitz, G.P.; Farina, F. y Sharlip, I. Micromethod for Determination of Lactate Dehydrogenase Isoenzyme C₄ Activity in Human Seminal Plasma. *Clin. Chem.* 1983;29:1518-1521.
4. Feldman, H.A. The P_M distribution: a model for interpreting LD isoenzyme patterns. *Clin. Chim. Acta* 1983;135:109-134.
5. Gorus, F.; Aelbrecht, W. y Van Camp, V. Circulating IgG-LD Complex, Dissociable by Addition of NAD⁺. *Clin. Chem.* 1982; 28:236-239.
6. Kanno, T., Sudo, K., Kitamura, M., Miwa, S., Ichiyama, Ay, Nishimura, Y. Lactate Dehydrogenase A-Subunit and B-Subunit Deficiencies: Comparison of the Physiological Roles of LDH Isoenzymes. In: *Molecular Structure and Regulation*. Alan R. Liss, Inc., N.Y., USA. 1983; 7:131-150.
7. Ketchum, C.H., Robinson, C.A., Hall, L.M., Grizzle, W.E., MacLaren, N.K., Riley, W.J. y Trost, C. Clinical Significance and Partial Biochemical Characterization of Lactate Dehydrogenase Isoenzyme 6. *Clin Chem* 1984; 30:46-49.
8. Kindmark, C.O. Atypical Lactate Dehydrogenase Isoenzyme Pattern Caused by Immunoglobulin G interaction. *Sand J. Clin. Lab. Inv.* 1969; 24:49-53.
9. Liv, T.Z., Qawasmeh, A. y Mazbar, R.A. A new variant of lactate dehydrogenase isoenzyme in human saliva. *Enzyme* 1984; 32:232-234.
10. Markel, S.F. y Janich, S.L. Complexing of Lactate Dehydrogenase Isoenzymes with Immunoglobulin A of the Kappa Class. *Am J. Clin. Path.* 1973; 61:328-332.
11. Market, C.L. Isoenzymes: Conceptual History and Biological Significance In: *Molecular Structure and Regulation*. Alan R. Liss, Inc., N.Y., USA. 1983; 7:1-17.
12. Market, C.L., Shaklee, J.B. y Whitt, G.S. Evaluation of a Gene. *Science* 1975; 189:102-114.
13. Moses, G.C. y Henderson, R. Biological Variance of Total Lactate Dehydrogenase and its Isoenzymes in Human-Serum. *Clin. Chem.* 1984; 30:1737-1741.
14. Nagamine, M. Lactate Dehydrogenase Isoenzymes Linked to Immunoglobulin A in Two Cases. *Clin. Chim. Acta* 1972; 36:139-144.
15. Nagamine, M.; Okochi, K. Occurrence of two forms of H^{FM} isoenzyme of lactate dehydrogenase. *Clin. Chim. Acta* 1984; 140:47-58.
16. Neremberg, ST. *Diagnóstico Electroforético: Técnicas de Laboratorio y su Aplicación Clínica*. Buenos Aires: Editorial Panamericana 1975; 237:124-127.
17. Podlasek, S.J., McPherson, R.A. y Threatte, G.A. Characterization of Apparent Lactate Dehydrogenase Isoenzyme 6: A Lactate Independent Dehydrogenase. *Clin. Chem.* 1984;30:266-270.
18. Podlasek, S. J., McPherson, R.A. y Threatte, G.A. Specificity of Autoantibodies to Lactate Dehydrogenase Isoenzyme Subunits. *Clin. Chem.* 1985; 31:527-532.
19. Skude, G., Von Eyben, F.E. y Kristiansen, P. Additional Lactate Dehydrogenase (LDH) isoenzymes in normal testies and spermatozoa of adult man. *Mol. Gen Genet.* 1984; 198:172-174.
20. Thomas, D.W. Macromolecular Lactic Acid Dehydrogenase: A Cause of increased Serum Lactate Dehydrogenase Activity. *Ann Intern Med.* 1974; 81:434-438.
21. Weijers, R.N.M., Mulder, J. y Kruijswijk, H. Partial Characterization Properties, and Clinical Significance of a Lactate Dehydrogenase-Immunoglobulin A^k Complex in serum. *Clin. Chem.* 1983; 29:272-278.
22. Wheat, T.E. y Goldberg, E. Sperm-Specific Lactate Dehydrogenase C^k: Antigenic Structure and Immunosuppression of Fertility. In: *Molecular Structure and Regulation*. Alan R. Liss, Inc., N.Y., U.S.A. 1983; 7:113-130.
23. Wichus, G.G. y Smith, M.J. Rapid Loss of Lactate Dehydrogenase Isoenzyme Activity in Serum by Cold-Induced Formation of Immunoglobulin G-Lactate Dehydrogenase Complex. *Clin. Chem.* 1984; 30:11-17.