

**LES LACTO-DESHIDROGENASES (LDH)  
I LA CÈL·LULA NEOPLÀSTICA**

Comunicació presentada el dia 17 de maig de 1973  
pels doctors

**J. M. PUIGDOLLERS  
A. VIDAL i RIBAS**

**i**

**F. SALA**

De l'Hospital del Sagrat Cor de Barcelona

## INTRODUCCIÓ

Els enzims de l'organisme poden ésser classificats en tres grups: 1) els que tenen activitat en el mateix sèrum sanguini, com és ara els factors de coagulació; 2) els fabricats per cèl·lules exocrines i que participen en processos tals com la digestió; i 3) els enzims endocel·lulars, que tenen activitats vitals per a la cèl·lula, com és ara els processos de transport, síntesi, catabolisme, etc.

Els enzims d'aquest tercer grup són particularment interessants en el problema que ens ocupa.

En primer lloc, hem de considerar que la biotopografia dels diversos enzims dins la ultraestructura microscòpica cel·lular és diversa segons l'activitat específica que tenen: així, els enzims energètics en medi aerobi se situen a les mitocòndries (màlico-deshidrogenasa, transaminasa glutàmico-oxalacètica, succino-deshidrogenasa). Els enzims que intervenen en la glicòlisi a través de la via d'Emden-Meyerhof se situen en el citoplasma (aldolasa, transaminasa glutàmico-pirúvica, lacto-deshidrogenasa).

Tenint en compte aquests fets, és natural que una alteració de la biologia de la cèl·lula neoplàstica pugui tenir una repercusió en els enzims intracel·lulars. Hom va demostrar que era precisament la lacto-deshidrogenasa la que més aviat descarrilava cap al sèrum en els malalts neoplàstics.

La primera dada en aquest sentit fou aportada per HILL i LEVY (1954), que observaren un augment de la taxa de lacto-deshidrogenasa en sang en malalts neoplàstics. Posteriorment hom ha publicat a la literatura especialitzada nombrosos treballs en què hom constata aquest augment en leucosis, carcinomatosis difuses, malaltia de Hodgkin, carcinoma bronquial amb metàstasi, etc.

Un pas més endavant correspongué a l'estudi dels isoenzims de la lacto-deshidrogenasa.

En efecte, és prou conegut el fet que diverses espècies d'enzims, encara que actuin sobre el mateix substrat i catalitzin la mateixa reacció, poden diferir en altres propietats. L'any 1950 hom demostrà la possibilitat de se-

parar, mitjançant diverses tècniques, les diferents fraccions o isoenzims característics d'una reacció.

En el cas de les LDH, sabem que totes aquestes subfraccions activen el pas de lactat a piruvat. Però químicament i estructuralment són diferents. És més, llur densitat en els diversos teixits és també diversa, de tal manera que cadascuna adquireix un valor organospecífic. En altres paraules, unes són més presents en el múscul que no pas en el fetge, mentre altres són més freqüents en el cor o en la pell. Llur augment en el sèrum ens indica la procedència orgànica sense precisar el tipus de lesió.

Això té un gran interès, fins i tot de tipus genètic, perquè el fet que cèl·lules diferents tinguin enzims diferents pot ésser relacionat amb conceptes de diferenciació cel·lular que no és ara el moment d'aclarir.

Resumint, podem dir que quan hi ha lesió cel·lular (que pot ésser purament bioquímica i no pas forçosament morfològica i histològica), augmenta la permeabilitat de la membrana i els isoenzims es desvien cap al plasma.

Així, en les hepatitis i cremades augmenta la LDH<sub>5</sub>, conseqüència del patró isoenzimàtic de tipus M. En l'infart intestinal, pancreatitis, embòlia i infart de pulmó o infart de melsa, predominen les fraccions intermèdies corresponents al patró tipus HM. En les miopaties augmenten les LDH<sub>1</sub> i LDH<sub>2</sub>.

Però ens interessa de comentar aquí allò que s'esdevé en els teixits neoplàstics. En efecte, en aquests casos trobem en el sèrum un augment de les fraccions intermèdies, conseqüència del fet que en els teixits tumorals la distribució de les iso-LDH perd caràcter d'organospecificitat i adquireix característiques monòtones, que les fan semblants al teixit fetal, que podríem dir que és un teixit tumoral fisiològic.

Totes aquestes consideracions ens han estimulat a verificar estadísticament les taxes de LDH i d'iso-LDH en els malalts neoplàstics mitjançant anàlisis de sang, líquids pleurals, orines, etc.

Un de nosaltres féu la tesi doctoral sobre aquest tema, i el treball que comuniquem és una ampliació d'alguns aspectes d'aquesta mateixa tesi inicial.

Si estadísticament era significatiu l'augment de LDH, podríem dir almenys que la cèl·lula neoplàstica alterava la permeabilitat de la membrana a aquest enzim, i començàvem un camí d'investigació en el camp de l'oncologia humoral i citològica, que havia d'ésser prosseguit per altres investigacions amb tècniques més detallades i especialitzades.



*Procediment*

- Prepareu una dilució 1:6 del sèrum (0,2 ml de sèrum en 1 ml d'aigua destil·lada).
- Amb una pipeta, introduïu 1 ml de substrat piruvat dins un flascó on hi hagi 1 ml de B eta-DPNH. Poseu-ho al bany maria a 37 °C durant 5 minuts.
- Prepareu un testimoni amb 0,4 ml del substrat i 0,7 ml d'aigua destil·lada.
- Després d'haver-lo remenat de forma suau, poseu el testimoni a bany maria a 37 °C, durant 30 minuts exactes.
- Afegiu 1 ml de 2,4 dinitrofenilhidrazina, tant a la solució problema com al testimoni; barregeu-ho bé, mitjançant moviments giratoris, i deixeu ambdues solucions a temperatura ambient durant 20 minuts.
- Afegiu després 10 ml de NaOH 0,4 N a tots dos flascons; barregeu-ho bé.
- Abans que hagin transcorregut 30 minuts després d'haver-hi afegit la sosa, llegiu la densitat òptica al fotocolorímetre, a una longitud d'ona de 505 m $\mu$ . Com a blanc feu servir l'aigua.
- Interpoleu els resultats a una corba de calibració prèviament obtinguda, per tal de saber la xifra d'unitats Wroblewski de lacto-deshidrogenasa/ml del sèrum.
- En el cas que el valor obtingut fos superior a les 2000 UW, diluïu el sèrum ja prèviament diluït, a l'1:5. El resultat obtingut ha d'ésser multiplicat per 5.

El resultat serà donat, doncs, en unitats Wroblewski, però si, seguint les directius de l'*International Union of Pure and Applied Chemistry* donades el 1959, i les del Congrés Internacional de Química Clínica del 1960, volem donar el resultat en unitats internacionals, haurem de fer servir la fórmula següent per tal d'obtenir una equivalència:

$$\text{LDH UW. } 0,482 = \text{LDH micromols/mn/1}^*$$

\* Hom defineix les unitats internacionals com el nombre de micromols de substrat transformat o de producte format en condicions específiques per minut, per ml.

### Teoria del mètode

L'àcid pirúvic reacciona amb 2,4 dinitrofenilhidrazina formant una hidrazona d'un color fort soluble en medi alcalí i amb una alta absorció a una longitud d'ona compresa entre 400-550 mil·limicres.

L'àcid làctic NAD i NADH no interfereix aquesta absorció en aquesta longitud d'ona.

Així doncs, la densitat òptica serà directament proporcional a la conversió d'àcid pirúvic a làctic.

D'aquesta reacció dependrà l'activitat LDH; per tal que es produeixi, caldrà deixar un temps d'incubació a pH 7,8-8,0 o fer la comparació amb un testimoni. D'aquesta manera podem dir que la quantitat d'àcid pirúvic existent després del temps d'incubació és inversament proporcional a l'activitat LDH, i, en conseqüència, com més densitat òptica, menys activitat LDH.

Mitjançant una corba de calibració en què hom indiqui a les ordenades la densitat òptica, i a les abscisses les unitats d'activitat LDH, tindrem els resultats expressats en unitats Wroblewski.

#### b) Determinació dels isoenzims sobre acetat de cel·lulosa.

Fem servir un tampó de Veronal sòdic 8,24/1, pH 8,6, amb el qual rentem les tires d'acetat de cel·lulosa, que forneix Chemetron Milan. Fem servir aquest mateix tampó per a la cubeta d'electroforesi.

Sobre una penetrable de la tira dipositem una quantitat de sèrum que tingui una activitat global LDH de 1.500 UW. Si fem servir un sèrum normal (200 a 400 UW) farem 3 o 4 dipòsits de tres lambdes. Si es tracta d'un sèrum corresponent a un malalt amb infart de miocardi (1.000 a 2.000 UW), farem un dipòsit de tres lambdes. Als extrems tissulars, els dipòsits es fan segons l'activitat LDH global. Hom procedeix a una electroforesi a 200 volts durant 60-75 minuts.

Hom prepara un substrat amb 0,45 ml de lactat sòdic sigma; 3 ml de tampó veronal (pH 8,6), una dissolució de 14 mg de NAD en 2 ml de tampó, 16 mg de MTT dissolts en 2 ml de tampó i 1,2 mg de metosulfat de fenacina (PMS) dissolts en 1 ml de tampó.

Un cop fet el recorregut electroforètic, hom sembla el substrat sobre la tira, repetides vegades, de manera que quedi uniformement repartit; seguidament, per mitjà d'un paper de filtre, hom treu l'excés de substrat que hi ha a la tira i és incubat a la cambra humida a 37 °C durant 30 minuts.

Les zones on hi ha una activitat LDH més gran es tornen d'un color

púrpura. Els isoenzims es fixen per mitjà d'una solució aquosa al 5 % d'àcid acètic.

Les tires fixades poden ésser transparentades per lectura densitomètrica o eluïdes per tal de llegir-les al fotocolorímetre.

#### ANÀLISI ESTADÍSTICA SOBRE LA VALORACIÓ DE LDH

El propòsit d'aquesta anàlisi estadística és de saber si les diferències observades a la valoració colorimètrica de les LDH totals del sèrum entre una població seleccionada i com més homogènia millor, fent servir la mateixa tècnica analítica al Laboratori i el mateix equip investigador, són

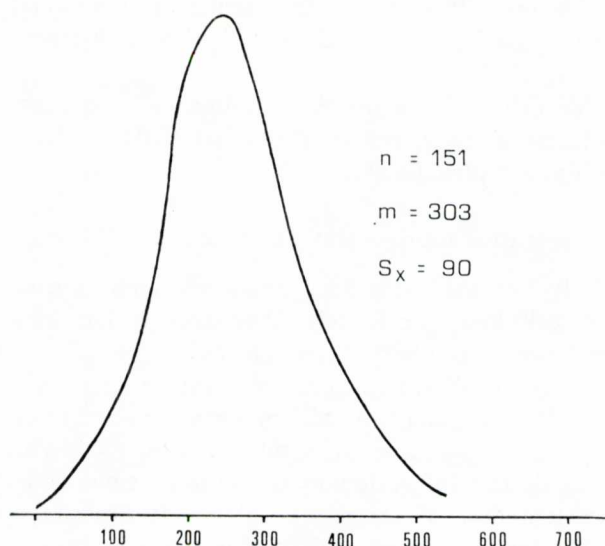


FIG. 1. — Histograma casos normals

significatives o no. Per aquest motiu, i com a control, hom ha dut a terme determinacions de les LDH totals del sèrum de persones normals.

D'acord amb les dades originals de la tècnica, hom pressuposa com a valors normals els compresos entre 200 i 500 unitats, definits a partir de la duplicació de la desviació standard del valor mitjà. Hom ha mesurat els valors de LDH sobre 151 casos normals, que donen una corba de distribució (fig. 1) a la qual correspon un valor mitjà:

$$m = \frac{\sum X_i}{n} = 303 \quad n = 151$$

i una desviació standard

$$S_x = \frac{\sum (x - x_i)^2}{n - 1} = 90$$

o sigui que els valors normals de Laboratori per a probabilitat del 95 % seran els compresos entre 123 i 483 unitats.

$$\text{Valor normal} = M \pm 2 S_x = \begin{matrix} < 483 \\ > 123 \end{matrix}$$

Tot tenint present aquests valors com a punt de partida, hom ha fet els estudis de distribució amb els malalts classificats en 3 grups:

Neos . . . . .	amb 174 casos
Malalts de via digestiva . . . . .	amb 77 casos
Malalts de fetge i melsa . . . . .	amb 111 casos

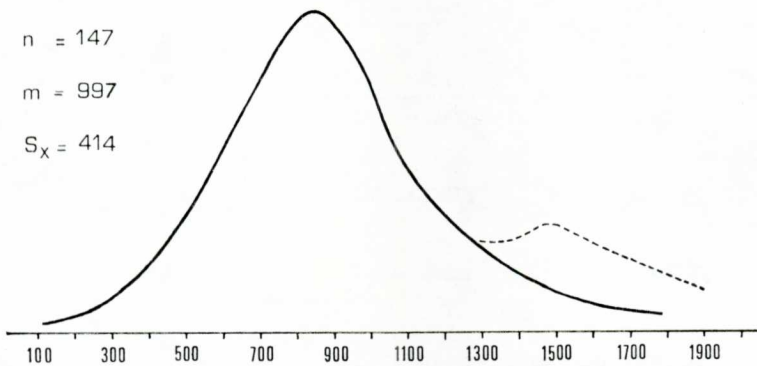


FIG. 2. — Histograma neos

als quals corresponen les figures 2, 3 i 4, respectivament, i els valors:

NEOS

Valor mitjà:  $m = \frac{\sum X_i}{n} = 997$

Nombre de casos :  $n = 174$

Desviació standard :  $S_x = \sqrt{\frac{\sum (x_i - x)^2}{n - 1}} = 414$

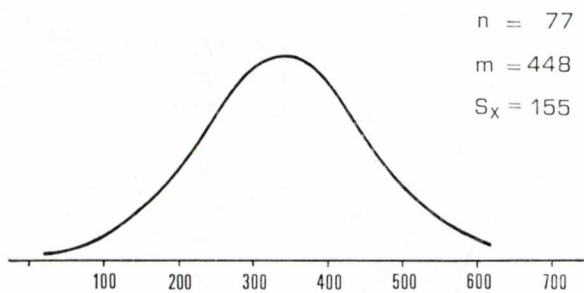


## VIA DIGESTIVA

$$\text{Valor mitjà: } m = \frac{\sum X_i}{n} = 448$$

$$\text{Nombre de casos : } n = 77$$

$$\text{Desviació standard : } S_x = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{x})^2}{n - 1}} = 155$$



$$n = 77$$

$$m = 448$$

$$S_x = 155$$

FIG. 3. — Histograma malalts vies digestives

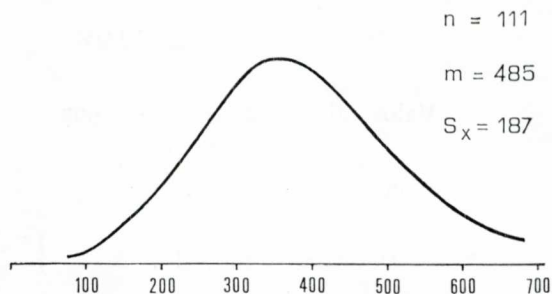
## FETGE, MELSA

$$\text{Valor mitjà: } m = \frac{\sum X_i}{n} = 485$$

$$\text{Nombre de casos : } n = 111$$

$$\text{Desviació standard : } S_x = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{x})^2}{n - 1}} = 187$$

FIG. 4. — Histograma malalts de fetge i mel·la



$$n = 111$$

$$m = 485$$

$$S_x = 187$$

## COMPARACIÓ DE TÈCNiques

Per a l'estudi comparatiu, hom utilitza la tècnica de l'estudi de la corba de distribució entre mides, basant-se en les taules d'A. A. Fisher, cercant la probabilitat de significació, per a un sol recobriment, entre la corba de distribució normal i les corbes de distribució corresponents a cada subgrup.

Comparació entre neos i normals:

$$\text{Es. dif.} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{S_{x_1}^2 - S_{x_2}^2}} = 1,64$$

que, sobre una corba de Gauss normalitzada, correspon a una probabilitat de certesa del 94,7 %. Aquest resultat és significatiu, bé que ens cal dir que alguns dels casos valorats són tan extrems que fan perillar l'homogeneïtat de la mostra. Els valors més alts corresponen a casos ja desesperats i diagnosticats fa temps.

Comparació entre malalts de fetge i normals:

$$\text{Es. dif.} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{S_{x_1}^2 - S_{x_2}^2}} = 0,879$$

que correspon a un 70 % de probabilitat i per tant no és un resultat significatiu.

Comparació entre malalts de via digestiva i normals:

$$\text{Es. dif.} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{S_{x_1}^2 - S_{x_2}^2}} = 0,805$$

que correspon a un 72 % de probabilitat, resultat que tampoc no pot ésser considerat significatiu.

## CONCLUSIONS

1. Després de l'estudi estadístic de la nostra casuística de LDH i d'iso-LDH en neoplàstics, resta demostrat que l'augment de LDH és significatiu en aquests malalts:

$$\text{Es.} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{S_{x_1}^2 - S_{x_2}^2}} = 1,64$$

- que sobre una corba de Gauss normalitzada correspon a una probabilitat de certesa del 94,7 %; això és significatiu.
2. En un 95 % dels casos, els valors de LDH són més o menys alts; bé que, en la revisió (que hem fet en arribar a les 3000 determinacions), aquest percentatge ha restat reduït a un 65 % aproximadament.
  3. Creiem que l'estudi de les LDH del malalt sospitós de tenir una neoplàsia, és un valor més que pot ajudar el metge en el diagnòstic etiològic.
  4. Encara que no hi hagi cap valor humoral patognòmic per al diagnòstic de les neoplàsies, considerem que l'estudi de les LDH és el més útil i significatiu.
  5. La tècnica és suficientment simple per a ésser feta a qualsevol laboratori.
  6. L'estudi de les LDH no permet d'intuir cap dada sobre l'etiopatogènia, bé que indica sens dubte una alteració del metabolisme endocel·lular de la cèl·lula cancerosa, la qual cosa és confirmada per la xifra de LDH als exsudats dels malalts neoplàstics.
  7. Dels isoenzims LDH i de llur estudi en els malalts neoplàstics, hom dedueix que hi ha un augment de les fraccions intermèdies, especialment de LDH<sub>2</sub> i LDH<sub>3</sub>.

## BIBLIOGRAFIA

1. BARNETT, H.: *Electrophoretic separation of lactate dehydrogenase isoenzymes on cellulose acetate*. «Biochem. J.», 84: 83 (1962).
2. BRODY, L.: *Isozyme histochemistry: a new method for the display of selective lactate dehydrogenase isozymes on an electrophoretic pattern*. «Nature», 201: 685 (1964).
3. CAHN, R. D., KAPLAN, N. O., LEVINE, L. i ZWILING, E.: *Nature and development of lactic dehydrogenase*. «Science», 136: 962 (1962).
4. FARRIAUX, J. P., HAN, K., FONTAINE, G. i HAVEZ, R.: *Lactatic-dehydrogenase*. *Revue critique*. «Path. Biol.», 15: 299 (1967).
5. LATNER, A. L. i SKILLER, A. V.: *Clinical applications of dehydrogenase isoenzymes, a simple method for their detection*. «Lancet», 2: 12-86 (1961).
6. MARKERT, C. L.: *Lactate dehydrogenase isozymes dissociation and recombination of subunit*. «Science», 140: 1329 (1963).
7. RESSLER, N., SCHULZ, J. C. i JOSEPH, R.: *Factors influencing the electrophoretic migration of lactic dehydrogenase isozymes*. «J. Lab. Clin. Med.», 62: 571 (1965).
8. RESSLER, N., SCHULZ, J. C. i JOSEPH, R.: *Validity of electrophoretic determination of lactic dehydrogenase isozymes*. «Nature», 198: 888 (1963).
9. VAN DER HELM, H. J.: *Simple method of demonstrating lactic acid dehydrogenase isoenzymes*. «Lancet», 2: 108 (1961).
10. VESELL, E. S.: *pH dependence of lactate dehydrogenase isozyme inhibition by substrate*. «Nature», 210: 421 (1966).

11. VESELL, E. S. i BEARN, A. G.: *Isozymes of lactic dehydrogenases in human tissues*. «J. Clin. Invest.», 40: 586 (1961).
12. WARBURG, O.: *On the origin of cancer cells*. «Science», 123: 309 (1956).
13. WIEME, R. J.: *Nomenclature of so called isozymes*. «Lancet», 1: 270 (1962).
14. WILKINSON, J. H.: *Introducción al diagnóstico enzimático*. Ed. Toray, Barcelona (1965).
15. WROBLEWSKI, F. i LA DUE, J. S.: *Lactic dehydrogenase activity in blood*. «Proc. Soc. Exper. Biol. Med.», 90: 210 (1955).