

Separación electroforética de las isoenzimas de creatina quinasa

E. PERERA Y C. PASCUAL

Departamento de Bioquímica Clínica, Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CENIC), Apartado 6880, La Habana, Cuba

Recibido en septiembre de 1987

RESUMEN

Se desarrolla un método electroforético en gel de acetato de celulosa que logra una buena separación de las isoenzimas de la creatina quinasa (CK). El empleo de patrones de las isoenzimas, para las cuales se plantea una metodología de obtención, permite que el método pueda ser utilizado en el diagnóstico de distrofia muscular de Duchenne.

SUMMARY

A cellulose acetate gel membrane electrophoretic method for the identification of creatine-kinase isoenzymes was developed which achieves high resolution in the separation of the isoenzymes.

A procedure is described for the preparations of electrophoretic standards of the different creatine-kinase isoenzymes. The method was found useful for the biochemical diagnostic of Duchenne Muscular Dystrophy.

INTRODUCCION

La creatina quinasa (CK, ATP: creatina N-fosfotransferasa, EC 2.7.3.2) es una enzima extremadamente importante en el metabolismo energético del músculo y del cerebro. La enzima es un dímero constituido por dos subunidades M y B (Dawson *et al.*, 1965), que al combinarse dan lugar a tres isoenzimas: la CK-BB, que constituye casi el 100% de la enzima en el cerebro, la CK-MB, que solo se encuentra en cantidades apreciables en el corazón, donde representa del 10 al 40 % de la actividad total de CK, y la CK-MM, abundante en el músculo esquelético y el corazón, que constituye el 96 y el 72 % de la enzima, respectivamente (Wretou y Pfeleiderer, 1975).

Considerando la distribución de estas isoenzimas en los diferentes órganos y tejidos, resulta de gran importancia para el diagnóstico clínico su análisis diferencial en el plasma. Varias han sido las patologías en que se han reportado niveles elevados de una u otra isoenzima en el plasma, dependiendo del tejido dañado. La CK-MM ha sido útil en el diagnóstico de las enfermedades del tejido muscular como las distrofias musculares y la polimiositis (Prellwitz, 1981). La CK-MB se ha señalado como el mejor marcador bioquímico para el diagnóstico y control evolutivo del infarto del miocardio (Galenet *et al.*, 1975; Neumeier *et al.*, 1981; Pesce, 1982), y la CK-BB, que se ha utilizado en el diagnóstico de daños cerebrales (Kaste *et al.*, 1977; Cooper *et al.*, 1983).

Diversas han sido las técnicas desarrolladas para el análisis diferencial de las isoenzimas de la CK. Los métodos más utilizados en la actualidad son la cromatografía de intercambio iónico en microcolumnas con DEAE Sephadex A-50 (Takahashi *et al.*, 1972; Mercer, 1974), la electroforesis en diferentes tipos de soportes (Rosalki, 1965; Roberts *et al.*, 1974; Sirag Elding *et al.*, 1985) y los ensayos inmunológicos (Neumeier, 1981, Wurzburg, 1981).

En este trabajo se describe un método electroforético de elevada resolución en gel de acetato de celulosa que permite visualizar las tres isoenzimas de la CK, con el objetivo de emplearlo en el diagnóstico de algunas patologías. Se describe además el procedimiento para la obtención de los patrones isoenzimáticos.

MATERIALES Y METODOS

Determinación de la actividad enzimática

La actividad total de CK se ensayó cinéticamente a 25 °C, mediante monitoreo continuo de la velocidad de reacción a 340 nm, utilizando un kit "monotest CK-NAC", obtenido de Boehringer Mannheim y basado en el método de Rosalki (1967).

Preparación de los patrones de isoenzimas de CK

Las isoenzimas se prepararon mediante el método de Rosalki (1976), con modificaciones. Se utilizaron tejidos humanos frescos obtenidos de autopsia. Para las isoenzimas CK-MM y CK-MB se utilizó corazón, y para la CK-BB, cerebro. Todo el procedimiento se llevó a cabo a 4 °C.

Se pesó un gramo de tejido y se homogeneizó en 10 ml de tampón tris-HCL 50 mmol/l, pH 8, que contenía 100 mmol/l de NaCl y 10 mmol/l de B-Mercaptoetanol, con un Potter Elvehjem. El material homogeneizado se centrifugó a 10 000 x g durante 30 minutos y se utilizó el sobrenadante.

Dos columnas de 1,5 x 8 cm se empaquetaron con DEAE Sephadex A-50 (Pharmacia) y se equilibraron con tampón tris-HCL 50 mmol/l, pH 8, que contenía 100 mmol/l de NaCl y 1 mmol/l de B-Mercaptoetanol. Un volumen de 5 ml de sobrenadante de corazón y cerebro se aplicó a las columnas, y las isoenzimas se eluyeron con el mismo tampón, conteniendo diferentes concentraciones de NaCl. La CK-MM eluye con el tampón inicial y la CK-MB, aumentando la concentración de NaCl en el tampón a 250 mmol/l. Para obtener la CK-BB, primero se lavó la columna con tres volúmenes del tampón inicial para eliminar los restos de CK-MM presentes en el tejido cerebral y después se eluyó la isoenzima con el tampón conteniendo 300 mmol/l de NaCl.

La elución de las isoenzimas se monitoreó, ensayando la actividad enzimática del eluato.

Las fracciones obtenidas, con las diferentes isoenzimas, se concentraron por ultrafiltración utilizando una membrana PM-10 (Amicon) y se dializaron contra tampón tris-HCL 100 mmol/l, pH 7,4 conteniendo 1 mmol/l de B-Mercaptoetanol. A las fracciones dializadas se les aumentó a 50 mmol/l la concentración de B-Mercaptoetanol; se les añadió un volumen de glicerol y se conservan a 4 °C.

Electroforesis

Las electroforesis se llevaron a cabo en tiras de gel de acetato de celulosa (de 5,7 x 14 cm -Chemetron). Se utilizó como tampón Veronal sódico - Veronal (10,3 g + 1,34 g/l), pH 8,6. La corrida se llevó a cabo durante 30 minutos a 300 volts y 8 °C.

Para visualizar las isoenzimas, se colocaron las tiras de acetato de celulosa en una cámara húmeda; se cubrieron con un papel de filtro empapado con el reactivo de la CK y se incubó durante 20 minutos a 37 °C. La fluorescencia del NADPH formado en los sitios correspondientes a cada isoenzima, pudo observarse colocando la tira bajo la luz UV.

Para conocer el límite de detección del método se utilizaron sueros conteniendo 5, 10, 20, 30, 40, 50 U/l de actividad de CK-MM.

El suero patológico estudiado fue el de un niño de ocho años con distrofia muscular de Duchenne, con una actividad de CK de 1 500 U/l, y se utilizó como control un suero normal con una actividad de CK dentro del rango normal.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la figura 1 se muestra la electroforesis de los patrones isoenzimáticos de CK obtenidos. Como puede apreciarse, las isoenzimas se separan claramente y no se observa contaminación de unas por otras. Esto demuestra que la metodología empleada para la obtención de los patrones isoenzimáticos es adecuada, además de ser sencilla y rápida.

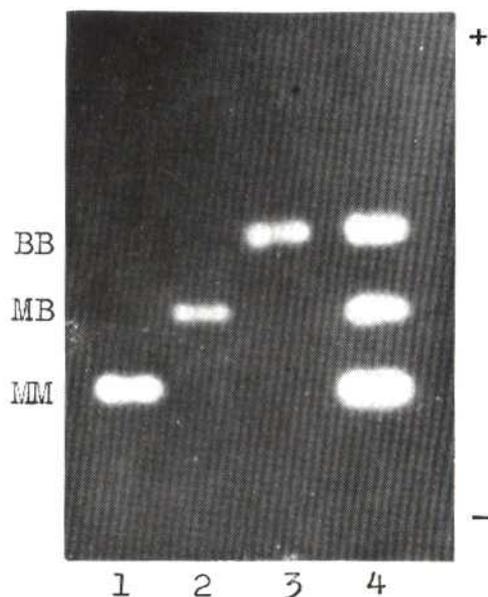


FIG.1. Separación electroforética en gel de acetato de celulosa de los patrones de isoenzimas de CK. Se aplicaron 2 μ l de cada isoenzima y 5 μ l de una mezcla de las tres isoenzimas: 1) CK-MM (952 μ l); 2) CK-MB (216 μ l); 3) CK-BB (μ l); 4) isoenzimas mezcladas.

Las condiciones y el tipo de soporte seleccionado para la electroforesis, logran una buena separación de las tres isoenzimas en corto tiempo (figura 1), pudiendo obtenerse el perfil de isoenzimas de CK del suero en menos de una hora.

Con el fin de probar el método en algún caso patológico, se realizó la electroforesis al suero de un paciente con distrofia muscular de Duchenne.

Como se observa en la figura 2, aparece una banda muy intensa en el suero del paciente, que corresponde a la CK-MM al compararlo con el patrón isoenzimas. Si lo comparamos con el suero control de un sujeto normal, vemos que la diferencia en intensidad de la banda es bastante marcada, de manera que puede diferenciarse muy bien entre el caso patológico y el normal. Esta enfermedad conduce a la destrucción del tejido muscular, lo cual explica la aparición de una banda intensa de CK-MM. Este resultado demuestra que el método puede emplearse en el diagnóstico de la distrofia muscular de Duchenne, y quizás en otras patologías que conducen a la alteración del perfil isoenzimático de la CK en el suero.

Al realizar la electroforesis a 10 μ l de suero con diferentes actividades de CK-MM en un rango de 5 a 50 U/l, se determinó que el límite de detección del método en las condiciones establecidas es de 10 U/l, lo cual coincide con el valor reportado por Hennrich (1981) para este tipo de soporte, siendo comparable con el de los métodos de este tipo distribuidos comercialmente.

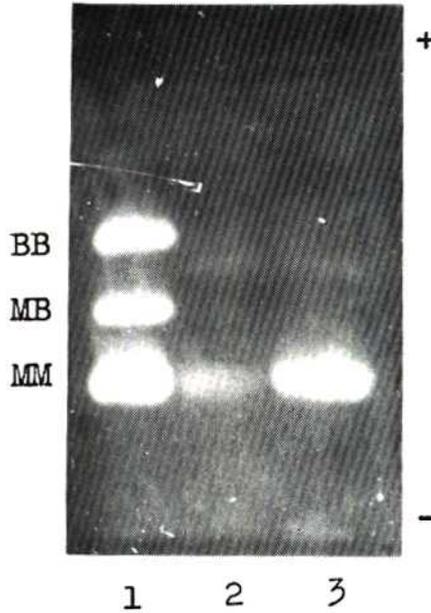


FIG. 2. Análisis electroforético en gel de acetato de celulosa del suero de un paciente con distrofia muscular de Duchenne. Se aplicaron 5 U/I del patrón de isoenzimas (CK-MM = 2 000 U/I; CK-MB = 750 U/I; CK-BB = 860 U/I) y de los sueros control y patológico: 1) patrón de isoenzimas; 2) suero control (10 U/I); 3) suero patológico (1 500 U/I).

El método propuesto es más sencillo que otros métodos electroforéticos (agarosa, almidón, poliacrilamida), ya que estos requieren mayor tiempo para la preparación del soporte y una manipulación más cuidadosa.

Por otra parte, el método electroforético es el único capaz de identificar las isoenzimas atípicas de la CK, las cuales han aumentado su interés clínico en los últimos años al relacionarse con algunas patologías (Mifflin y Bruns, 1985; Nagashima *et al.*, 1985; Kanemitsu, 1986). Además, con excepción de los métodos cromatográficos, los cuales resultan laboriosos, solamente los métodos electroforéticos permiten separar las isoenzimas BB y MB (Albert *et al.*, 1983).

REFERENCIAS

- ALBERT, P. M.; C. DEBROUX; P. DE NAYER y F. ZECH (1983). *Methods for assay of creatine kinase isoenzyme MB compared.* Clin. Chem. **29**: 21-24.
- COOPER, P. R.; A. CHALIF; J. F. RAMSEY y R. J. MOORE (1983). *Radioimmunoassay of the brain type isoenzyme of creatine phosphokinase (CK-BB); a new diagnostic tool in the evaluation of patients with head injury.* Neurosurgery **12**: 536-541.
- DAWSON, D. M.; H. M. EPPENBERGER y N. V. KAPLAN (1965). *Creatine kinase. Evidence for a dimeric structure.* Biochem. Biophys. Res. Commun. **21**: 346-353.
- GALEN, R. S.; J. A. REIFFEL y R. GAMBINO (1975). *Diagnosis of acute myocardial infarction: relative efficiency of serum enzyme and isoenzyme measurements.* J. Am. Med. Assoc. **232**: 145-147.
- HENNRICH, N. (1981). "Differentiation of Isoenzymes by Non Immunological Methods". En: *Creatine Kinase Isoenzymes.* (Ed. H. Lang) pp. 41-48. Springer - Verlag Berlin Heidelberg, New York.
- KANEMITSU, F. (1986). *Clinical significance and characteristics of creatine kinase-immunoglobulin complexes in sera from patients with malignant tumors.* Clin. Chim. Acta **160**: 19-26.

- KASTE, M.; H. SOMER y A. KONTTINEN (1977). *Brain type creatine kinase isoenzyme. Occurrence in serum in acute cerebral disorders.* Arch. Neurol. **34**: 142-144.
- MERCER, D. W. (1974). *Separation of tissue and serum creatine kinase isoenzymes by ion-exchange column chromatography.* Clin. Chem. **20**: 36-40.
- MIFFLIN, T. E. y D. F. BRUNS (1985). *Macroamylase, macrocreatinase, and other macroenzymes.* Clin. Chem. **31**: 1743-1748.
- NAGASHIMA, T.; K. M. KAMEGAI, K. HIROSE; K. YAMADA; M. VONO; T. TSUBAKI y K. NAGASHIMA (1985). *Creatine kinase (CK)-Linked IgA in Isaac's Syndrome.* J. Neurol. Sci. **67**: 269-276.
- NEUMEIER, D. (1981). "Measurement of Isoenzyme Concentration by Immunoassay". En: *Creatine Kinase Isoenzymes.* (Ed. H. Lang) pp. 75-84. Springer - Verlag Berlin Heidelberg, New York.
- NEUMEIER, D., W. PRELLWITZ y M. KNEDEL (1981). "Myocardial Infarction". En: *Creatine Kinase Isoenzymes.* (Ed. H. Lang) pp. 132-154. Springer - Verlag Berlin Heidelberg, New York.
- PESCH, M. A. (1982). *The CK Isoenzymes: Findings and their meaning.* Lab. Manage **10**: 25-37.
- PRELLWITZ, W. (1981). "Creatine kinase isoenzymes in various muscular disease". En: *Creatine Kinase Isoenzymes.* (Ed. H. Lang) pp. 186-189. Springer - Verlag Berlin Heidelberg, New York.
- ROBERTS, R.; P. D. HENRY; B. F. WITTEVEEN y B. E. SOBEL (1974). *Quantification of serum creatine phosphokinase (CPK) isoenzyme activity.* Am. J. Cardiol. **33**: 650-654.
- ROSALKI, S. B. (1965). *Creatine phosphokinase isoenzymes.* Nature. **207**: 414.
- ROSALKI, S. B. (1967). *An improved procedure for serum creatine phosphokinase determination.* J. Lab. Clin. Med. **69**: 696-705.
- ROSALKI, S. B. (1976). *Preparation of stable creatine kinase isoenzyme controls.* Clin. Chem. **22**: 1753-1754.
- SIGAR ELDING, E., G. GERCHEN; K. HARM Y K. D. VOIGT (1985). *Cellulose Acetate and Electroendosmosis - Low Agarose Electrophoresis: Advanced Methods for the Separation and Quantitative Determination of Serum Creatine Kinase Isoenzyme Levels.* J. Clin. Chem. Clin. Biochem. **23**: 241-248.
- TAKAHASKI, K.; S. OSHIKUBO; M. DIMOMI y T. SHINKO (1972). *Creatine phosphokinase isoenzyme of human heart muscle and skeletal muscle.* Clin. Chim. Acta **38**: 285-290.
- WRETOU, A. J. y G. PELEIDERER (1975). *Quantitation of creatine kinase isoenzymes in human tissues and sera by an immunological method.* Clin. Chim. Acta **58**: 223-232.
- WURZBURG, U. (1981). "Measurement of Isoenzyme Activity by Immunological Methods". En: *Creatine Kinase Isoenzymes.* (Ed. H. Lang) pp. 49-67. Springer - Verlag Berlin Heidelberg, New York.