

Artículos originales cortos

Determinación de actividad estreptoquinasa utilizando un ensayo cuantitativo

L. HERNÁNDEZ, P. RODRÍGUEZ, A. CASTRO, R. SERRANO, M.P. RODRÍGUEZ; R. RUBIERA, M.P. ESTRADA, A. PÉREZ, J. DE LA FUENTE y L. HERRERA

Agrupación de Genética de Células de Mamíferos, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), Apartado 6162, La Habana 6, Cuba

Recibido en octubre de 1989

Aprobado en noviembre de 1989

RESUMEN

Para determinar la actividad estreptoquinasa (SK) presente en muestras de cultivo y purificación, se desarrolló un método cuantitativo a partir de la formación del complejo estequiométrico estreptoquinasa-plasminógeno (sk-plg).

Las determinaciones fueron realizadas utilizando el método del sustrato cromogénico S-2251. La sk se obtuvo del cultivo de *Streptococcus equisimilis* beta hemolítico (grupo C). El plasminógeno empleado en el ensayo fue purificado a partir de plasma humano en nuestro laboratorio. El método permite la detección de hasta 7 UI de sk / ml. En el trabajo se describen los resultados obtenidos a diferentes concentraciones de sales presentes en las muestras, así como el efecto estimulador del fibrinógeno en la reacción.

SUMMARY

A quantitative method was developed for the determination of streptokinase (SK) in cultive and purified samples. The method is based on the formation of a stoichiometric complex between SK and plasminogen (SK-PLG). The determinations were made by the chromogenic substrate (S-2251) assay. The SK was purified from *Streptococcus equisimilis*, beta-haemolyticum (group c) cultures and the plasminogen used was obtained in our laboratory from human plasma.

The method permits the detection of 7 IU of SK/ml. In the paper, we discuss the results obtained when

different salt concentration were present in the test sample and the stimulatory effect of different fibrinogen concentrations on the reaction was analyzed.

INTRODUCCION

La estreptoquinasa (sk) es una proteína albuminosa, sin cisteínas en su estructura, obtenida del estreptococo beta hemolítico. Su peso molecular oscila entre 40 000 y 50 000 dalton (Taylor y Comp, 1978). Se considera un activador de la fibrinólisis sin actividad enzimática (Markwardt, 1978), porque su acción se efectúa a través de la formación de un complejo estequiométrico plasminógeno estreptoquinasa (Chibber *et al.*, 1986), el cual pasa rápidamente a plasmina-estreptoquinasa. El complejo formado por la estreptoquinasa y la forma activa del plasminógeno fue definido como "activador", pues es capaz de activar eficientemente el plasminógeno (plg) mientras que la sk o la plasmina sola no lo hacen (Taylor *et al.*, 1972).

La aplicación de la sk en clínica, en el tratamiento de trombosis e infartos (Tennant *et al.*, 1984), hace necesario

el desarrollo de métodos simples y seguros para la cuantificación de su actividad.

Las determinaciones de sk se han realizado desde hace algunos años utilizando métodos como la lisis de coágulos (Garner y Tillet, 1934), sustratos sintéticos (Taylor *et al.*, 1972) y determinaciones en placa de caseína (Christensen, 1949).

Aunque estos métodos resultan muy sensibles, no dejan de ser determinaciones semicuantitativas de la actividad.

Este trabajo reporta los resultados obtenidos al utilizar el sustrato cromogénico S-2251 (Kabivitrum, Suecia), (Friberger, 1982) en condiciones establecidas por este laboratorio para la cuantificación a rápida de la actividad sk, al reducir el volumen final de la mezcla de reacción, al menos cinco veces, la concentración de plasminógeno y establecer un tiempo de reacción de 30 minutos para estas condiciones. Todo esto difiere de lo reportado para la utilización del sustrato S-2251 por Friberger (1982).

Se analiza, además, el efecto estimulador del fibrinógeno (Soria, 1983) sobre la reacción y cómo esta es afectada por la presencia de altas concentraciones de sales en la muestra.

MATERIALES Y METODOS

Proteínas, reactivos y enzimas empleadas

Las enzimas de restricción y modificación utilizadas fueron obtenidas de ENZIBIOT (CIGB, Cuba) y se emplearon según las recomendaciones de la casa comercial.

El plg fue purificado a partir de plasma humano, utilizando una columna de afinidad de lisina sefarosa (Pharmacia, Suecia) (Deutsch y Mertz, 1970).

Los otros reactivos empleados fueron: kabikinas clínica (Kabivitrum, Suecia); fibrinógeno bovino (fb) (Sigma, USA) y el sustrato cromogénico (S-2251) (Kabivitrum, Suecia).

Cepas bacterianas.

La cepa de estreptococo utilizada en este trabajo fue cedida gentilmente por el Dr. Suazo, del Hospital Pediátrico de Centro Habana.

Para chequear el fenotipo de esta cepa, se realizó un testaje de fermentación de lactosa, estriando en medio MacConkey (Oxoid, Inglaterra) y se utilizaron como controles *E. coli* k12 w3110 (lac+) y BB4 (lac-).

Extracción del ADN genómico del estreptococo

El microorganismo fue crecido en medio BHI (Brain Heart Infusion, Oxoid, Inglaterra) durante 12 horas; el cultivo se centrifugó a 4 000 rpm durante 10 minutos. El precipitado de células fue tratado con lisozima a 1 mg/ml durante 1 hora, a 37°C, con agitación suave. Posteriormente se le añadió SDS al 1 % (concentración final), EDTA 1mM y pronasa E (Merck, RFA) a una concentración de 500 µg/ml durante 3 horas a 55°C. Después se procedió a tratar la mezcla con fenol, fenol-cloroformo (V:V) y cloroformo, para finalmente precipitar el ADN. Por este método se obtienen aproximadamente, 1 mg de ADN genómico por cada 300 ml de cultivo.

Southern blot

Para caracterizar la cepa productora, esta fue analizada por Southern blot (Southern, 1975). Se aplicaron en un gel de 0,8 % TBE muestras de 5 µg de ADN genómico digeridas con Eco RI, Hind III y Pst I, y se corrieron durante 2 horas a 80 V. Las sondas empleadas en la hibridación fueron los oligonucleótidos 268 (TTAGTTCGAACCGTGG TTATTG) y 281 (AATTCTGTCCAAGCTATTG) marcados con T4 polinucleótido quinasa (Cameron y Unlenbeck, 1977) y con una actividad específica de 5×10^8 cpm/µg.

Cultivo de la cepa y purificación de la sk presente en el sobrenadante

El *Streptococcus equisimilis* fue cultivado en zaranda, con medio BHI durante 14 horas. Cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica a 280 nm entre 0,9 y 1, era centrifugado a durante 1 hora a 3 000 rpm y se determinaban las unidades de sk presentes en el sobrenadante. De esta forma se obtenían alrededor de 250 UI/ml de cultivo.

La estreptoquinasa presente en el sobrenadante fue concentrada con un paso de precipitación con sulfato de amonio (Merck, RFA) al 40 %, y posteriormente se logró purificar parcialmente con dos pasos de cromatografía de intercambio iónico (Rodríguez *et al.*, resultados sin publicar).

Procedimiento para la determinación de la actividad sk

El plg humano fue diluido en solución tampón tris HCl 0,02 M, pH=7,4 a una concentración final de 2,5 µg/ml.

La kabikinasa utilizada como estándar fue diluida en agua destilada, filtrada a concentraciones de 25, 50, 100, 200, 300, y 400 UI/ml. El sustrato cromogénico S2251 fue diluido en agua destilada filtrada, a una concentración de 0,5 mM. El fb fue diluido en solución tampón tris HCl 0,02 M, pH=7,4 a diferentes concentraciones: 0,6; 3 y 6 mg/ml.

La preparación de la reacción se llevó a cabo en microplacas (Nunc, Dinamarca) en el siguiente orden: 50 µl de plg humano y 50 µl de muestra o estándar fueron mezclados por pozo e incubados durante 10 minutos a 37°C para favorecer la formación del complejo sk-plg. Después este se mezcló con 50 µl de sustrato cromogénico y se incubó durante 30 minutos a 37°C. La reacción fue detenida añadiendo 25 µl de ácido acético al 20 %.

Todas las determinaciones fueron acompañadas de un control negativo en el cual la sk fue sustituida por 50 µl de agua destilada estéril. Con este control puede descartarse cualquier actividad tipo plasmina que hidrolice el sustrato y que no sea como resultado de la acción de la sk.

Las muestras de crudos llevan un blanco para restar el valor de absorbancia producido por el propio color del medio. Este blanco lleva agua destilada, plg humano, medio BHI y sustrato cromogénico.

En las reacciones en que se analizó el efecto del fb, se adicionaron a la mezcla total 25 µl de fibrinógeno por pozo, incluidos el control negativo y los blancos de las muestras de cultivo.

RESULTADOS Y DISCUSION

Caracterización de la cepa de estreptococo

La caracterización de la cepa de estreptococo se realizó con ensayo de fermentación de lactosa. Al estriar la cepa de estreptococo y controles de *E. coli* w3110 y BB4 en agar MacConkey, se comprobó por coloración rojiza que el estreptococo analizado era de la especie *Equisimilis* y no *Equis*, única diferencia entre estas dos especies del grupo C de Lanfield.

El *Southern blot* mostrado en la figura 1 evidencia que la cepa de estreptococo empleada presenta el gen que codifica para la sk. Los oligonucleótidos 281 y 268 hibridan en los extremos 5' y 3' del gen de la sk respectivamente, teniendo en cuenta el análisis de restricción y secuencia publicados (Malke y Ferreti, 1984).

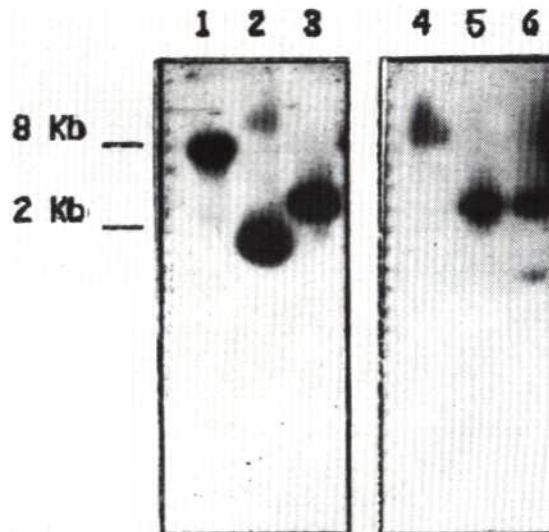


FIG. 1. Caracterización por *Southern blot* de la cepa productora de sk. Cinco microgramos de ADN de la cepa de estreptococo sea digirieron con EcoRI (líneas 1 y 4), Hind III (líneas 2 y 5) o PstI (líneas 3 y 6) y se hibridó con los oligonucleótidos 281 (líneas 1-3) o 268 (líneas 4-6). Los pesos moleculares están dados en kilobases.

Al digerir el ADN del estreptococo con EcoRI, se demostró la hibridación de ambos oligonucleótidos con una banda mayor de 8 kb, y al digerirlo con Hind III se verificó la presencia interna de este sitio en el gen, al variar de 2,65 kb la banda hibridada con el oligonucleótido 268 a 1,9 kb la hibridada con el 281. Además, se confirmó el restricto de 2,5 kb con ambos oligonucleótidos en la digestión Pst I.

Determinación de la actividad sk

El procedimiento utilizado para determinar la actividad sk nos permitió analizar la velocidad de reacción, de acuerdo con las unidades de sk presentes en la muestra (figura 2a). La velocidad de reacción no tiene un comportamiento lineal con el incremento de la sk, sino que se establece una cinética exponencial.

La velocidad máxima de la reacción se alcanza aproximadamente a partir de las 350 UI/ml.

El ploteo de la recta de regresión que se obtiene de los valores de absorbancia obtenidos a 405 nm para cada valor de sk (figura 2b) y su coeficiente de regresión demuestran que existe una correspondencia lineal entre los puntos y una exactitud satisfactoria, que permiten la estimación correcta del valor de las muestras. Con otros métodos descritos para la determinación de la actividad sk solo es posible obtener estimaciones groseras y semicuantitativas de la actividad, que además varían de un ensayo a otro (Garner y Tillet, 1934; Christensen, 1949).

El coeficiente de variación (CV) obteniendo a partir de las unidades estimadas a 30 determinaciones realizadas en diferentes días a una muestra control fue de 9,8%, mientras que el CV de muestras a las que se les estimó su actividad en un mismo ensayo, a partir de varias réplicas, o de diluciones de la misma muestra, fue de 7,5 %. Estos valores nos indican que las determinaciones por este método son repetibles.

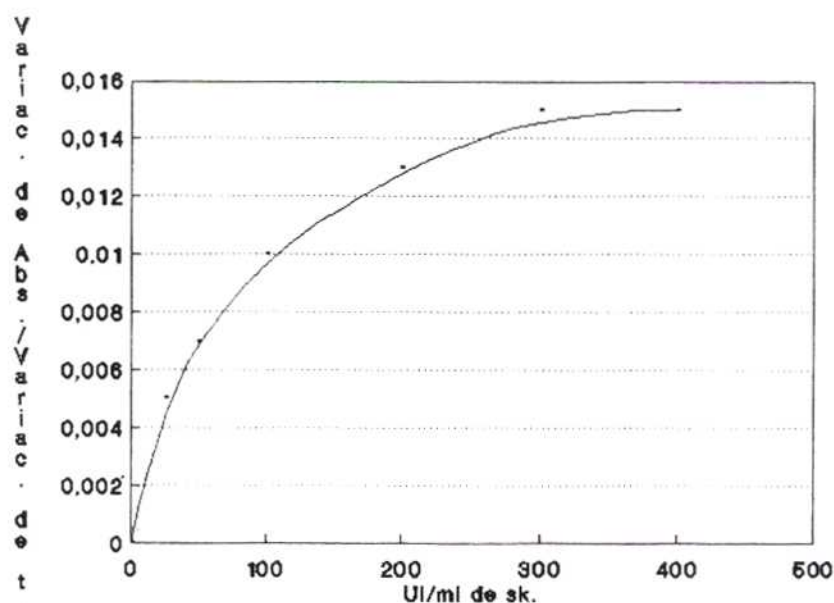


FIG. 2a. Variación de la velocidad de reacción contra la concentración de sk.

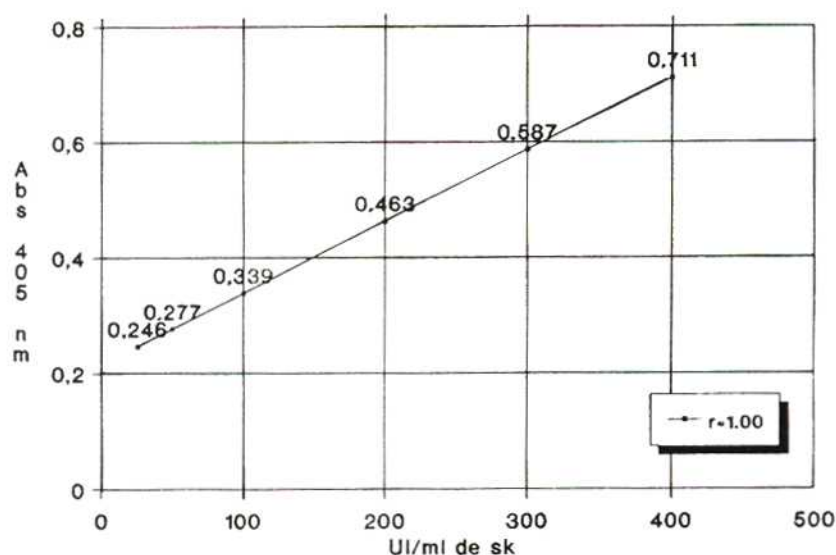


FIG 2b. Ploteo de la absorción contra la concentración de sk. (r = coeficiente de regresión).

Efecto de la concentración de sales sobre la estimación de las unidades de sk

En la figura 3 se muestra cómo afecta la concentración de sales presente en la muestra la estimación del valor real de la actividad

sk. Existe una inhibición de la actividad sk a medida que se incrementa la concentración de sales en la muestra.

Un incremento del NaCl en la muestra de 0 a 2 M, produce una caída del valor real de la actividad de hasta 145 veces (725 UI/ml a 5 UI/ml).

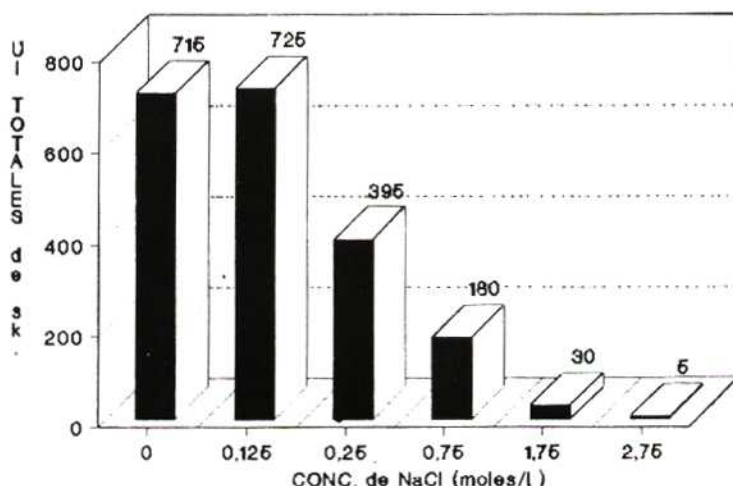


FIG. 3. Efecto de las concentración de sales en la estimación de las unidades sk presentes en una muestra.

Esto se debe a que la reacción de activación del plg es inhibida por altas concentraciones de algunos aniones tales como el SCN y el Cl (Lee *et al.*, 1988).

Efecto de la concentración de fb en la reacción

Cuando la reacción transcurre en presencia de concentraciones variables de fb, como aparece en la figura 4a, podemos observar que para 3 y 6 mg/ml de fb la velocidad inicial de la reacción es mayor que para la reacción en presencia de 0,6 mg de fb y en ausencia de éste, donde la velocidad sigue una cinética exponencial.

Para las concentraciones altas de fb, la velocidad disminuye ligeramente (Soria, 1983) con el transcurso de la reacción; esto puede obedecer a varias causas: 1) que el fb compita con el sustrato cromogénico por el centro activo de la plasmina, observándose una liberación menor de

paranitroanilina, y por tanto, un valor de absorbancia menor; 2) que los productos de degradación del fb inhiban la actividad catalítica de la plasmina (Dudley *et al.*, 1982; Lee *et al.*, 1988); 3) o que ambos fenómenos ocurran a la vez.

Cuando se plotearon las rectas de regresión para cada concentración de fb (figura 4b) no se observaron diferencias marcadas entre las pendientes de estas y el valor del coeficiente de correlación calculado en cada caso (con excepción del valor obtenido para 0,6 mg de fb) resulta satisfactorio para la estimación de las unidades, utilizando esas condiciones de ensayo.

Se realizó también el análisis de las desviaciones estándares apareadas entre las diferentes concentraciones, calculando la "t" de Student para un límite de confianza de 0,05 y 10 grados de libertad. Como se refleja en la tabla 1, no existen diferencias significativas entre las rectas trazadas,

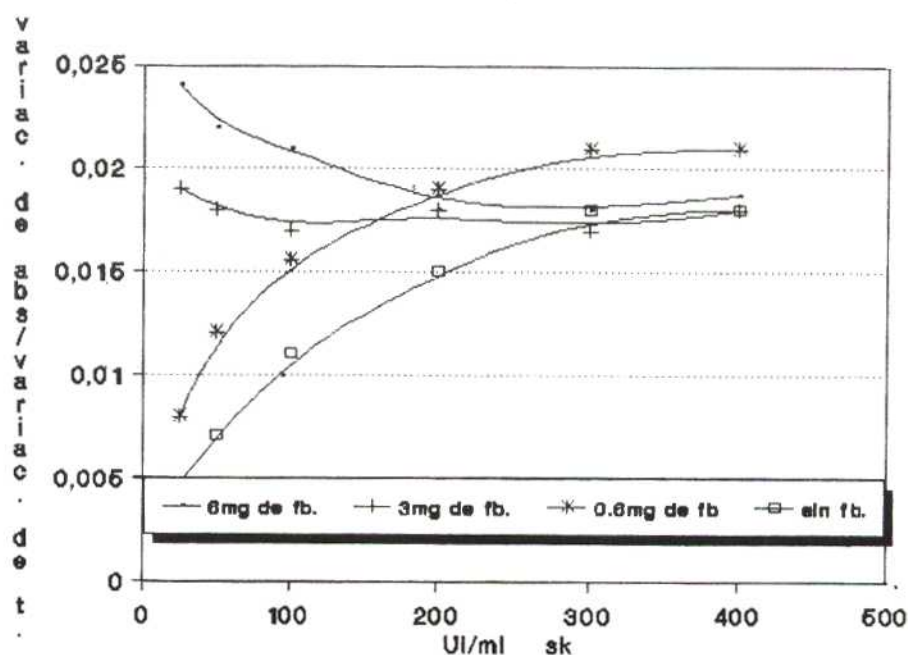


FIG 4a. Variación de la velocidad de reacción en presencia de diferentes concentraciones de fibrinógeno.

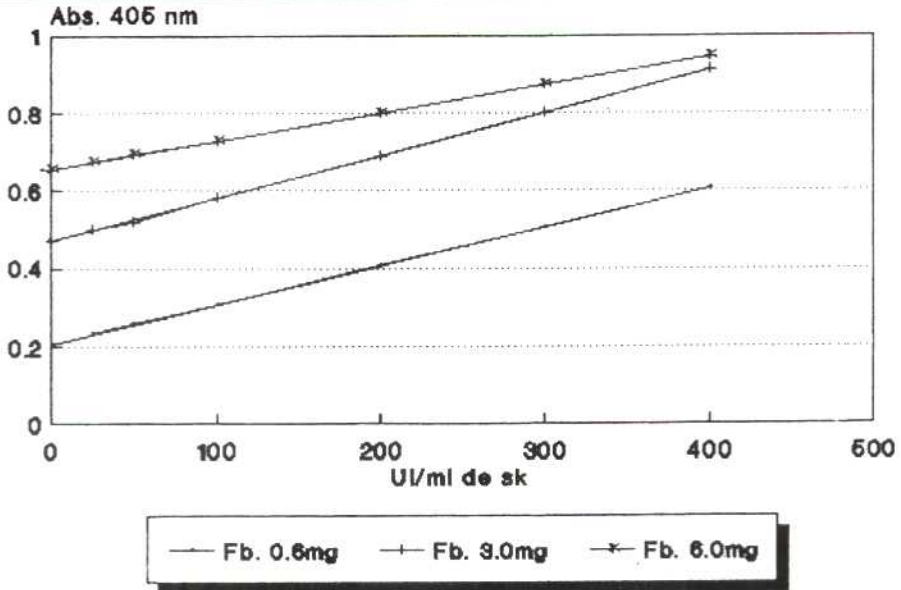


FIG 4b. Ploteo de la absorbancia contra la velocidad de reacción a las diferentes concentraciones de fibrinógeno analizadas.

lo que permite estimar la actividad utilizando cualquiera de las tres concentraciones estudiadas. Esto

permitiría reducir el tiempo de reacción y obtener de forma rápida el valor de las unidades de sk presentes en una muestra.

Tabla 1
PARAMETROS ESTADISTICOS CALCULADOS PARA EL ANALISIS
DEL EFECTO DEL FB SOBRE LA REACCION

Parámetro	Concentración de fibrinógeno (mg/ml)		
	0.6	3.0	6.0
Pendiente de la recta	0.001	0.001	0.007
Intercepto de la recta	0.206	0.472	0.658
Coefficiente de correlación	0.894	1.0	1.0
Desviación estándar	0.148	0.323	0.106
Comparación entre las concentraciones de fb empleadas sobre los resultados obtenidos			
Concentraciones de fb comparadas	0.06/3.0 mg	3.0 / 6.0 mg	0.6 / 6.0 mg
Valor de t de student	0.7	1.77	0.62
n = No. de ensayos	n = 6	n = 6	n = 6

Límite de confianza 0,05 y 10 grados de libertad. (t = 2.22)

El análisis estadístico de los resultados fue apoyado con el programa Harvard Graphics Copyright 1987. Software Publishing Corp. Versión 2.10.

CONCLUSIONES

EL presente trabajo no pretende profundizar en consideraciones teóricas, sino aportar un procedimiento apropiado para la determinación de la actividad sk presente en muestras de cultivos, así como tener un método que permita seguir el análisis del proceso de purificación de esta proteína.

Este método resulta de gran exactitud y repetibilidad, y es más sensible que aquellos basados en la determinación de la zona de lisis producida en placas de caseína (Christensen, 1949) permitiendo la detección de hasta 7 UI de sk/ml.

Se señala también en el trabajo el efecto del fb. Cuando este se introduce en el ensayo, como estimulador, es posible reducir el tiempo de la reacción sin afectar la determinación de las unidades sk presentes en la muestra.

Se recomienda realizar este método en soluciones tampón con concentraciones por debajo de 0,15 M para evitar el efecto negativo que pueden introducir algunos aniones en la reacción de activación del plg.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer al doctor Suazo, del Hospital Pediátrico de Centro Habana, el haber donado la cepa *Chester* de estreptococo utilizada en el trabajo.

REFERENCIAS

CAMERON, V. y O. UNLENBECK (1977). Phosphatase activity in T4 Polynucleotide kinase. *Biochemistry* 16: 5120-5126.

CHIBBER, B.A.K.; J.T. RADEK y F.J. CASTELLINO (1986). Rapid formation of anion-sensitive active site in stoichiometric complexes of streptokinase and human [GLU] plasminogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 1237-1241.

CHRISTENSEN, L.R. (1949). Methods for measuring the activity of components on the streptococcal fibrinolytic system and streptococcal desoxyribonuclease. *J. Clin. Invest.* 28: 163-167.

DEUTSCH, D.G. y E.T. MERTZ (1970). Plasminogen: purification from human plasma by affinity chromatography. *Science* 170: 1095-1096.

DUDDLEY, K.S.; J.P. MORRIS y F.J. CASTELLINO (1982). Enhancement of the streptokinase-catalyzed activation of human plasminogen by human fibrinogen and its plasminolysis products. *Biochemistry*, 21: 721-728.

FRIBERGER, P. (1982). Chromogenic peptide substrates. Their use for the assay of factors in the fibrinolytic and plasma kallikrein-kinin systems. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 42: Suppl. 162: 49-54.

GARNER, R.L. y W.S. TILLET (1934). Biochemical studies on the fibrinolytic activity of hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* 60: 239-245.

LEE, P.P.; R.C. WOHL; I.G. BOREISHA y K.C. ROBBINS (1988). Kinetic analysis of covalent hybrid plasminogen activators: effect of CNBr-degraded fibrinogen on kinetic parameters of Glu1-plasminogen activation. *Biochemistry* 27: 7506-7513.

MALKE, H. y J.J. FERRETI (1984). Streptokinase: cloning, expression, and excretion by *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3557-3561.

MARKWARDT, F. (1978). "Naturally occurring inhibitors of fibrinolysis", in Markwardt, F. (ed.): *Fibrinolysis and Antifibrinolysis*. New York, Springer-Verlag. pp. 487-496.

SOUTHERN, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-518.

SORIA, C. (1983). Comparison of the potentiating effect of fibrinogen, fibrinogen degradation products and fibrin degradation products on the amidolytic activity of the plasminogen-sk complex. Improvement of plasminogen determination in biological samples by decreasing the influence of fibrin degradation products. *Thromb. Haemostasis* 50: 56-60.

TAYLOR, J.C.; D.W. HILL y M. ROGOLSKY (1972). Detection of caseinolytic and fibrinolytic activities of BHK-21 cell strains. *Exp. Cell. Res.* 73: 422-428.

TAYLOR, B.F. y P.C. COMP (1978). "Biochemistry of streptokinase", in Markwardt, F. (ed.): *Fibrinolysis and Antifibrinolysis*. New York, Springer-Verlag. pp. 137-148.

TAYLOR, B.F. y R.H. TOMARA (1972). Streptokinase. *Methods in Enzymology* 19: 811-821.

TENNANT, S.N.; J. DIXON; T.C. VENABLE; H.L. J.R. PAGE; A.B. KAISER; R. FREDERICKSEN; L. TACOQUE; P. KAPLAN; N.S. BABU; E.E. ANDERSON; E. WOOTEN; H.S. JENNINGS, J. BREINING y W.B. CAMPBELL (1984). Intracoronary thrombolysis in patients with acute myocardial infarction: comparison of the efficacy of urokinase with streptokinase. *Circulation* 69: 756-761.