

ENZIMAS

CREATINAFOSFOKINASA

Objetivos

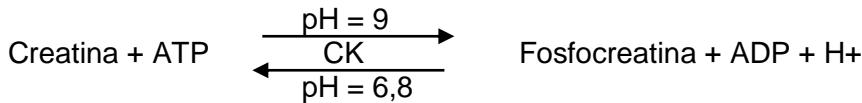
- Determinación de CK por método cinético.
- Interpretación de la información provista por el fabricante de métodos.

INTRODUCCION

Creatinakinasa, CPK, CK, (EC 2.7.3.2)

Es una enzima citoplasmática y mitocondrial cuya distribución en el organismo es relativamente específica ya que se encuentra en mayor proporción en músculo esquelético, cardíaco, liso y en tejido cerebral. También en intestino y útero grávido. La molécula de CK citosólica es un dímero compuesto por 2 subunidades monoméricas: M y B, de 360 aminoácidos cada una, codificadas por diferentes genes formando tres isoenzimas. En tejido muscular esquelético y liso predomina (>95%) la isoenzima CK3 = MM, en tejido muscular cardíaco existe 8-20% de isoenzima CK2 = MB y el resto es CKMM. El tejido cerebral contiene 100% de isoenzima CK1 = BB. El útero grávido y el intestino también contienen isoenzima CKBB. La molécula de CK mitocondrial (CKmm) es otra isoenzima ubicada entre las membranas interna y externa de la mitocondria que actúa en la fosforilación oxidativa de los músculos, cerebro y corazón. En este último aporta un 15% del total de actividad de CK.

Cataliza la fosforilación de creatina para almacenar energía según la reacción:



Como todas las enzimas intracelulares, en condiciones normales los niveles plasmáticos son muy bajos, encontrándose en circulación solamente la fracción en vías de degradación, con una vida media de 15±4 hs. Un aumento en la actividad sérica es por lo tanto índice de lesión celular en esos tejidos. La extensión y gravedad de la lesión y el tipo de tejido dañado determinarán la magnitud del aumento de la actividad enzimática en suero.

ETAPA PREANALITICA

1) Condiciones del paciente:

FUENTES NO PATOLOGICAS DE VARIACION: BIOLOGICAS Y PREANALITICAS

La actividad de CK sérica aumenta en estados de hipertermia, hipotermia y con la administración de drogas como anfotericina B, Diazepam, lidocaína, quinidina, drogas de abuso (anfetaminas, barbitúricos, heroína, etanol), relajantes musculares.

Se observan aumentos significativos en pacientes que han estado recibiendo inyecciones intramusculares, masajes intensos y desfibrilación eléctrica. En pacientes que han sido intervenidos quirúrgicamente se requiere entre 5 y 10 días para volver a los valores basales.

El ejercicio físico intenso eleva notablemente la actividad de CK y es frecuente causa de valores altos en pacientes ambulatorios.

Los recién nacidos presentan mayor actividad debido al trauma del músculo esquelético producido durante el parto (hipoxia transitoria). En lactantes la actividad sérica disminuye llegando a los valores del adulto luego de 6 a 10 semanas.

Varía fisiológicamente con el sexo, siendo mayor en los hombres debido a su mayor masa muscular.

Durante el embarazo disminuye progresivamente hasta llegar durante el tercer trimestre, a valores equivalentes al tercio de los controles.

2) Toma de muestra:

TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACION

Se puede usar suero o plasma con heparina, el plasma con otros anticoagulantes dan valores disminuidos con respecto al suero. Los sueros con hemólisis visible o intensa producen valores

falsamente aumentados debido a la adenilatoquinasa que se encuentra en concentraciones elevadas en los eritrocitos por lo que no se deben utilizar. La bilirrubina y la lipemia no interfieren.

Se recomienda conservar los sueros a 4°C o congelarlos y analizarlos a los pocos días. A -20°C puede conservarse 1 mes. La CK es inactivada por la luz solar directa o la luz fluorescente.

ETAPA ANALITICA

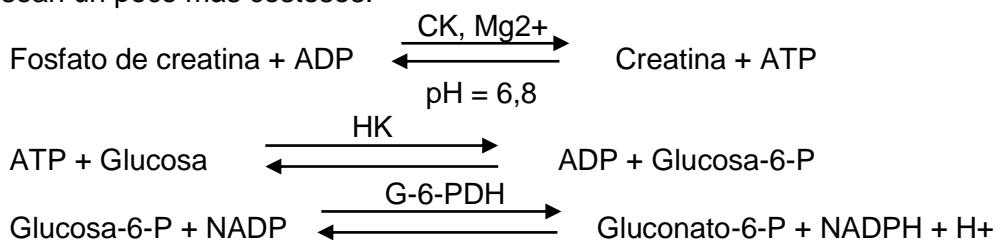
1) Metodología:

Numerosos métodos de fotometría, fluorimetría y cinéticos han sido desarrollados para el análisis de la actividad de CK en suero. Generalmente, para la determinación de CK total sérica se utiliza el método cinético que se basa en el aumento de absorbancia del (compuesto medido según el caso) NADH o NADPH proporcional a la actividad de la enzima.

Método "UV CK-NAC"

FUNDAMENTO

Es el método recomendado por la Sociedad de Química Clínica escandinava, francesa y alemana, mundialmente más aceptado. Se basa en el siguiente esquema reaccionante desarrollado por Oliver y Rosalski. Se prefiere la reacción inversa porque procede seis veces más rápida, aunque los reactivos sean un poco más costosos.



La velocidad con que se produce NADPH es proporcional a la velocidad de la primera reacción ya que las reacciones acopladas son mucho más rápidas y por ende no limitantes, dado que la concentración de las enzimas hexoquinasa (HK) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa es muy elevada, unas 100 veces más que los niveles normales de CK.

CONDICIONES DE REACCION

- Temperatura: 30 o 37 °C. A mayor temperatura se obtiene mayor sensibilidad pero menor rango de linealidad.
- Volumen de muestra y reactivo: Vol. M = 20 o 50 ul. Si el volumen de lectura del espectrofotómetro lo permite, se pueden reducir proporcionalmente sin que varíe el factor de cálculo.
- Longitud de onda: 340 nm, con ancho de banda < 10 nm.
- Estabilidad y almacenamiento del sustrato reconstituido: En el refrigerador (2-8°C) es estable 15 días desde su reconstitución. Cuando el espectrofotómetro ha sido llevado a cero con agua destilada y se observan lecturas de absorbancia del sustrato reconstituido superiores a 0,800 D.O. son índice de deterioro del mismo.

PROCEDIMIENTO

Reconstituir el Reactivo liofilizado. Preincubar 0,5 ml 5 min. Agregar 50 ul de muestra, mezclar por agitación y verter en la cubeta. Disparar el cronómetro. Leer la absorbancia cada 30 segundos. Determinar las diferencias de absorbancia (ΔA), desechar los bajos o altos, calcular el ΔA promedio y utilizarlo para los cálculos.

ACTIVIDAD de CK (U/l) = $\Delta A/\text{min.} \times \text{factor}$

Factor = (vol. reacción / vol. muestra) $\times 1 / \text{coef. ext. NADPH}$

Coeficiente de extinción del NADPH a 340 nm = $6,22 \times 10^3 \text{ l/cm-mol}$

RENDIMIENTO ANALITICO DEL METODO

REPRODUCIBILIDAD: Este método tiene una precisión interdías aceptable, C.V. de 4,5 % en niveles normales y 2,5 % en niveles altos.

LINEALIDAD: La reacción es lineal hasta una actividad de 1000 U/l, con leves diferencias según el instrumental utilizado. Con actividades superiores, repetir diluyendo el suero 1/2 a 1/10 con solución fisiológica. Hacer siempre la menor dilución posible.

SENSIBILIDAD: a 340 nm y a 25 °C el mínimo cambio de actividad detectable es de 5 U/l.

VALORES DE REFERENCIA (U/l)

Temperatura	30°C	37°C
Adultos varones	15-130	hasta 190
Mujeres	15-110	hasta 160
Neonatos	116-209	

(percentilos 5 y 95 a las 144 hs. de vida)

ETAPA POSTANALITICA

1) Interpretación y validación del resultado

La CK sérica puede ser normal o levemente aumentada en miopatías neurógenas (miastenia gravis, esclerosis múltiple, poliomielitis y Parkinson).

Las enfermedades del músculo esquelético elevan la actividad de CK marcadamente en las distrofias musculares, especialmente Duchenne, hipertermia maligna y miopatía alcohólica, brotes agudos de polimiositis, miositis virales, hemoglobinuria paroxística y toda otra afección que provoque rabdomiolisis. La hipoxia muscular por shock (cardiogénico o hipovolémico) provoca agudos y marcados aumentos de CK sérica.

En el caso de infarto agudo de miocardio (IAM), la actividad de CK comienza a aumentar 2 y 6 hs. después de producido el episodio y alcanza un máximo luego de 12 a 24 hs. que puede llegar a ser 20 veces el límite superior normal, lo cual significa una prueba sensible para el diagnóstico de IAM.

Comparar esta guía con la guía del inserto provisto por Wiener del método a usar en el trabajo práctico y anotar las coincidencias o diferencias.

Buscar Valores de Referencia y citar la bibliografía.

BIBLIOGRAFIA

Kaplan-Pesce "Química Clínica". Edición 1984. Editorial Panamericana.

Henry, John Bernard "Diagnóstico y Tratamiento Clínico" 9^a edición. Ed. Salvat.

Balcells, Alfonso "La Clínica y el Laboratorio" 16^a edición. Editorial Masson S.A. Barcelona (España)

Gradwohl- Sonnerwirth- Jaret "Métodos y Diagnósticos del Laboratorio Clínico" 8^a edición 1983.

Capítulos 9 y 12. Editorial Panamericana.

Pesce - Kaplan "Química Clínica. Métodos". Edición 1990. Capítulos 12 y 17. Editorial Panamericana.

Todd - Sanford "Diagnóstico clínico por el laboratorio" I. Davidson y J. B. Henry. Editorial Salvat.

Agregar bibliografía utilizada para estudiar el tema.