

# Utilitat de la mesura de la concentració màssica de creatina cinasa 2 (CK MB) i de l'activitat de les isoformes de creatina cinasa 3 (CK MM) com a marcadors bioquímics de la lesió muscular

J. ORDÓÑEZ I LLANOS<sup>1,2</sup>,  
O. JORBA I CASTANY<sup>1</sup>,  
R. ROIG I MARTÍNEZ<sup>1</sup>,  
R. SERRA I GRIMA<sup>3,4</sup>.

<sup>1</sup>Servei de Bioquímica, <sup>2</sup>Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, <sup>3</sup>Departament de Cardiologia. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Universitat Autònoma de Barcelona, <sup>4</sup>CEARE. Secretaria General de l'Esport. Generalitat de Catalunya.

*AGRAÏMENTS.* Aquest treball ha sigut possible gràcies a un ajut per la recerca i investigació del Programa de Docència i Ciències aplicades a l'Esport, Secretaria general de l'Esport. Generalitat de Catalunya, a JOLI.

**ABSTRACT.** Measurement of total activity or isoenzyme 2 (CKMB) of creatin kinase (CK) are most widely used biological markers used with muscular injury. However, athletes present increases in these enzymes which look like myocardial disorders. Measurement of the mass concentration of CKMM and its relation to total CK helps to distinguish between myocardial and muscular-skeletal problems. In the case of the isoforms of the CKMM isoenzyme it has been shown that the relation between the tissue isoform and the modified mass of the plasma (CKMM/CKMM) is a good early indicator of muscular injury. After physical exercise, increased can be detected even without parallel increases in CK. The combined measurement of mass CKMM and the CKMM isoforms allows recent muscular injuries (< 24 hours) to be distinguished from older ones (> 24 hours), something impossible to detect using normal biological markers.

**KEY WORDS:** Athlete, muscular injury, CK, CK isoforms.

**RESUM:** Les mesures de l'activitat total o de l'isoenzim 2 (CKMB) de la creatina cinasa (CK) constitueixen els marcadors biològics més emprats de lesió muscular. Però, en els atletes es poden trobar augments d'aquests enzims que simulen alteracions miocàrdiques. La mesura de la concentració màssica de CKMB i la seva raó sobre CK total ajuden a distingir entre alteracions d'origen miocàrdic o múscul-esquelètic. En el cas de les isoformes de l'isoenzim CKMM s'ha demostrat que la raó entre l'isoforma del teixit i la més modificada del plasma (CKMM3/CKMM1) és un indicador molt precoç de lesió cel·lular, i després de practicar exercici físic, se'n poden detectar augments inclús sense augments paral·lels de CK. La mesura combinada de CKMB màssica i les isoformes CKMM permet distingir lesions musculars recents (<24 h) o tardanes (>24 h), indetectables pels marcadors biològics habituals.

**PARAULES CLAU:** Atleta, lesió muscular, CK, isoformes de CK.

## INTRODUCCIÓ

La pràctica regular de l'exercici físic modifica la morfologia i el metabolisme del múscul esquelètic. Els canvis morfològics<sup>1</sup> varien des del simple canvi de la grandària dels porus de la membrana cel·lular fins a alteracions severes com el trencament del sarcolema muscular i les alteracions del disc Z. Aquestes alteracions es poden associar a disminucions del rendiment atlètic<sup>2</sup>; per això, és necessari conèixer amb exactitud i precocitat la seva existència per evitar l'aparició de lesions musculars.

L'avaluació de la lesió muscular s'ha fet tradicionalment amb exàmens histològics amb observació directa de les cèl·lules o amb tincions histoquímiques de múscul obtingut per punció-biòpsia<sup>3</sup>. Aquesta tècnica, però, és cruenta, la qual cosa ha estimulat la recerca de mètodes alternatius que permetin avaluar igualment la lesió muscular.

La lesió muscular es pot manifestar per l'aparició en el plasma de proteïnes típiques del múscul<sup>4</sup>. Entre elles, cal esmentar les lligades a l'aparell contràctil de la cèl·lula com la miosina i les diferents troponines, les de transport d'oxigen com la mioglobina i, sobre tot, les enzimàtiques. Remmers<sup>5</sup> associà per primera vegada la lesió muscular amb els augments en plasma de l'activitat catalítica de l'enzim aspartat aminotransferasa (AST). Posteriorment, s'han descrit augments, relacionats amb l'exercici físic, de les activitats catalítiques d'aldolasa, alanina aminotransferasa (ALT), anhidrasa carbònica III, malat dehidrogenasa (MDH) o piruvat cinasa (PK). Però els enzims més utilitzats com a marcadors de lesió muscular són la lactat dehidrogenasa (LD) i la creatina cinasa (CK). Ambdós són marcadors sensibles de lesions musculars, però no presenten la mateixa especificitat diagnòstica. Mentre que la LD es troba repartida entre múscul esquelètic i miocàrdic, eritròcits o fetge, la CK es localitza al múscul esquelètic i miocàrdic; lògicament les elevacions de CK assenyalaran amb més especificitat que les de LD la lesió muscular.

La mesura de l'activitat catalítica de la CK assenyalava amb molta precocitat la lesió muscular. Canvis de permeabilitat de la membrana cel·lular provocats per hipòxia que acompanya alguns exercicis, ja induïxen l'aparició de CK a la circulació. Com que la seva mesura està a l'abast de qualsevol laboratori que disposi d'un equipament mínim s'utilitza rutinàriament com a indicador bioquímic del dany muscular produït per l'exercici. Però, la mesura de CK pot interferir-se metodològicament per altres enzims plasmàtics de tipus cinas<sup>6</sup>, això provoca una disminució de la seva eficiència diagnòstica.

Més específica resulta la determinació dels isoenzims de la CK. Tant la CK3 (CKMM), per la seva localització predo-

minant al múscul esquelètic, com la CK2 (CKMB), que augmenta la seva concentració catalítica en el múscul entrenat en resistència<sup>7</sup>, serien indicadors més específics de lesió muscular que la mateixa CK. Malgrat aquest plantejament teòric, en la pràctica la mesura de l'activitat catalítica dels isoenzims de la CK no resulta de gran utilitat per les nombroses interferències que presenten els seus mètodes de mesura<sup>8</sup>. En el cas de CKMB, per obviar aquestes interferències s'han desenvolupat mètodes immunològics que permeten mesurar la seva concentració, no l'activitat catalítica. Amb aquests mètodes s'han pogut diferenciar millor, encara que no absolutament, aquells augments de CKMB deguts a traumatismes esquelètics d'aquells deguts a infarts de miocardi, aquesta circumstància és una causa molt important d'inespecificitat de la CKMB com a detectora del dany muscular esquelètic). Molt recentment, diferents treballs<sup>10,11</sup> han demostrat que la mesura de les concentracions plasmàtiques de Troponina T (TnT) o Troponina I cardíques, resulta absolutament específica per distingir les alteracions miocàrdiques de les múscul-esquelètiques. Alguns autors<sup>12</sup>, han demostrat que en atletes es poden trobar valors augmentats de TnT, malgrat que això seria atribuïble a reaccions inespecífiques dels mètodes d'immunoassaig usats per la seva mesura. Molt recentment, s'han descrit dos nous immunoassais per TnT que semblen obviar aquest problema de les reaccions inespecífiques<sup>13,14</sup>. Malgrat això, no es disposa de suficient experiència en el valor semiològic de la mesura de TnT en els atletes, igual que passa amb la utilitat diagnòstica de la mesura de la concentració de massa de CKMB.

L'eficiència diagnòstica de la mesura de l'isoenzim CKMM pot millorar-se mesurant les seves isoformes, modificacions posttransduccionals de l'isoenzim. La isoforma dels teixits CKMM3 apareix augmentada en plasma després de qualsevol lesió, com per exemple la provocada per l'exercici. Fins ara tan sols un treball ha aplicat la mesura de les isoformes de CKMM, les més abundants en plasma, com a marcadors de lesió muscular esquelètica<sup>15</sup>. Els autors demostraren durant un exercici excèntric localitzat a una extremitat superior, que no augmentava l'activitat catalítica de la CK total, que les isoformes de CKMM constituïen el marcador bioquímic més precoç de lesió muscular. Aquesta conclusió cal refermar-la estudiant més atletes i altres esportistes amb intervenció de més masses musculars que les del treball citat.

L'objectiu del present treball és l'estudi de la utilitat de les noves mesures de proteïnes enzimàtiques i contràctils del múscul esquelètic, com a marcadors de les alteracions que en el mateix pugui induir la pràctica de l'exercici físic. El grup objecte de l'estudi estava format per un ampli grup d'atletes,

predominantment corredors de fons i gran fons; l'homogeneïtat dels quals s'assegurà obtenint les mostres per analitzar, a intervals fixos de temps després dels entrenaments i/o les competicions i mitjançant la valoració d'un marcador bioquímic de l'esforç muscular: l'osteocalcina.

## MATERIAL I MÈTODES

### Mostres analítiques

S'han obtingut un total de 187 mostres per anàlisi en 155 atletes, 58 dones i 95 homes, majorment corredors de fons en carretera i pista i de mig fons; un 13% de les mostres procediren d'atletes corredors de velocitat. Les mostres en situació basal s'han obtingut un mínim de 12 hores després de la darrera sessió d'entrenament, s'han exclòs les mostres obtingudes després d'entrenament amb sobrecàrregues de pes (peses), sèries ràpides en pista o llargues distàncies en circuits amb fortes pujades i baixades. Les mostres obtingudes després de competicions s'obtingueren després d'un període de descans de 24 a 48 hores. Els corredors de llarga distància es van classificar com d'alt i mig rendiment depenent de les marques atlètiques que acreditaven en les seves respectives proves. Totes les mostres van ser obtingudes durant períodes d'activitat atlètica representativa de l'habitualment desenvolupada, segons consideració del propi atleta i/o els seus entrenadors. No s'establí cap subgrup amb les mostres obtingudes en els /les atletes velocistes.

### MÈTODES ANALÍTICS

L'activitat catalítica de CK s'ha mesurat per mètodes estàndard, a 37 °C, en un analitzador automàtic Hitachi 747 (Boehringer Mannheim GmbH, Germany); els valors de referència són menys de 180 UI/L per als homes i menys de 150 UI/L per a les dones. La concentració de massa de CKMB per fluoroimmunoanàlisi de partició radial (Dade Baxter, Miami, FL, USA), amb aquest mètode els valors de referència són inferiors a 6 µg/L tant per homes com dones, amb aquestes dues mesures s'ha calculat la raó CKMB/CK total com  $[\text{CK MB } (\mu\text{g/L})/\text{CK total (UI/L)}] \times 100$ ; els valors de referència calculats al nostre laboratori per grups nombrosos d'atletes són de fins a 3.3<sup>16</sup>. L'activitat de les isoformes de creatina cinasa s'ha detectat amb un sistema d'electroforesi d'alt voltatge (Helena Laboratories, Beaumont, TX, USA), utilitzant plaques d'agarosa per a la separació; amb els resultats obtinguts s'ha calculat la raó CKMM3/CKMM1, els seus valors de referència són inferiors a 0.3<sup>17</sup>. La Troponina T es valorà per un mètode d'enzimimmunoanàlisi en fase sòlida, emprant com a marcatge de la reacció

immunològica estreptavidina-biotina; l'anàlisi es desenvolupà en un sistema d'immunoanàlisi automatitzat ES-300 (Boehringer Mannheim GmbH, Germany); els valors de referència són inferiors a 0.1 µg/L. L'osteocalcina es valorà per radioimmunoassaig (CIS, Italia).

L'índex de massa corporal es calculà com la raó existent entre el pes, expressat en quilograms, i el quadrat de l'alçada, expressada en metres.

Les anàlisis corresponents als exàmens bàsics de salut, incloent la mesura de l'activitat catalítica de lactat dehidrogenasa (LD), es van realitzar per metodologies estàndards aplicades a multianalitzadors automatitzats.

### MÈTODES ESTADÍSTICS

Per tots els resultats de les anàlisis estadístiques es va acceptar com a significativa una probabilitat igual o inferior a 0.05. Les diferències entre poblacions es van analitzar amb la prova de Kolmogorov-Smirnov per a dues mostres, les associacions es van analitzar amb el coeficient ordinal de Spearman. Les associacions entre diferents variables es van analitzar mitjançant l'anàlisi de regressió múltiple, les influències que sobre cadascun dels paràmetres exercien les altres es van estudiar per mitjà de l'anàlisi de variància. Les diferències estadístiques entre proporcions es van comparar amb prova estadística de comparació de percentatges observats en mostres amb gran número d'efectius<sup>18</sup>.

**Taula 1**

Nivells de concentració de massa d'osteocalcina observats en la població d'atletes avaluats (resultats expressats com a mitjana ± desviació estàndard).

	µg/L
Homes alt rendiment	6.30 ± 3.40
Homes rendiment mig	5.75 ± 4.04
Dones alt rendiment	7.21 ± 3.71
Dones rendiment mig	6.57 ± 3.64

### RESULTATS

Els nivells de concentració massica d'osteocalcina (Taula 1) no es van diferenciar entre els homes de nivell alt o mig de rendiment, igual que passava en les dones, així, doncs, s'interpretà que el nivell d'exercici alt i mig es podia assumir com similar a efectes de la seva classificació biològica. No es van observar diferències en els nivells d'osteocalcina del subgrup de mostres dels/les atletes velocistes en referència als/les atletes de mig fons i fons (resultats no mostrats).

**Taula 2** Valors mitjans trobats en una subpoblació dels atletes de l'estudi.

	Grup total	Homes	Dones
CK TOTAL (UI/L)	206 ± 143	265 ± 161	134 ± 71 <sup>a</sup>
CKMB (µg/L)	3.7 ± 3.1	4.8 ± 3.3	2.4 ± 2.2 <sup>a</sup>
RAÓ CKMB / CK TOTAL	1.87 ± 1.04	1.95 ± 1.05	1.76 ± 1.06
LD (UI/L)	340 ± 67	360 ± 74	316 ± 50 <sup>b</sup>
Índex de massa corporal	20.5 ± 1.65	20.9 ± 1.63	20.0 ± 1.58
Qm semanal	93.9 ± 40	108.8 ± 39.9	76.6 ± 33.2 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>p < 0.001 i <sup>b</sup>p < 0,01 respecte als valors dels homes

En una primera subpoblació de 58 mostres analítiques, procedents únicament dels atletes corredors de mig fons i fons, es valorà la relació dels paràmetres biològics i les variables com l'índex de massa corporal o el quilometratge setmanal corregut. Els resultats es recullen a la Taula 2.

Es va observar que tant la CK total, com la concentració de massa de CKMB, la lactat dehidrogenasa (LD) i el quilometratge setmanal eren significativament superiors (p < 0.01 fins a p < 0.001) en els homes que en les dones. L'única variable que no mostrà diferències entre homes i dones va ésser la raó entre la massa de CKMB i la CK total.

Per mitjà de l'anàlisi de variància (Taula 3), es va objectivar que els valors de la CK total eren dependents tant del sexe, l'índex de massa corporal i el quilometratge setmanal; la CKMB fou dependent del sexe i el quilometratge i la LD sols del sexe. L'únic marcador independent de les variables analitzades fou la raó CKMB/CK total. L'anàlisi de regressió múltiple posà de manifest que la variable més dependent del quilometratge setmanal fou la CKMB (p < 0.002), demostrant la coneguda relació de l'isoenzim CKMB i les càrregues d'exercici de resistència. En la regressió múltiple, la raó de CKMB/CK total aparegué com el paràmetre més independent de les variables analitzades.

Les anàlisis d'isoformes de CKMM, concentració massissa de CKMB, activitat catalítica de CK i càlcul de la raó

CKMB/CK total, s'aplicaren a la població total de 187 mostres analítiques. Com en el cas de la subpoblació abans considerada s'observaren diferències entre sexes per la CK total (p < 0.001), CKMB (p < 0.001), raó d'isoformes de CKMM (p < 0.01); mentre que la raó CKMB/CK total aparegué com independent del sexe dels individus analitzats.

La raó d'isoformes de CKMM es mostrà com un paràmetre independent, no associat significativament a la resta de marcadors bioquímics del múscul esquelètic. Els seus coeficients de correlació ordinal de Spearman foren de 0.0949 amb la CK total, 0.1512 amb la CKMB i 0.2205 amb la raó CKMB/CK total.

Quan s'explorà la proporció de resultats anormalment augmentats en relació als respectius límits de referència, s'observà (Taula 4) que tant la CK total (p < 0.02) com la raó d'isoformes de CKMM (p < 0.05) mostraren una proporció de valors anormals superiors en els homes que en les dones.

Com en el cas de l'anterior subpoblació, la raó CKMB/CK total és la que presentà un menor número de resultats anormals i sense diferències significatives per sexe, mentre que tant la CK total com la raó d'isoformes de CKMM mostraren un elevat nombre (més del 45% de casos) de valors per sobre dels respectius límits de referència, éssent aquests casos significativament més freqüents en els homes

**Taula 3** Resultats de l'anàlisi de variància dels paràmetres estudiats

	Sexe	Índex de massa corporal	Qm setmanal
CK Total	0.0003	0.004	0.011
CKMB	0.003	n.s.	0.0004
Raó CKMB / CK Total	n.s.	n.s.	n.s.
LD	0.02	n.s.	n.s.

Es representen les significacions dels coeficients de correlació entre els diferents paràmetres; n.s. indica manca de significació estadística de l'associació.

**Taula 4** Proporció de valors per damunt del límit de referència\* [180 UI/L i 150 UI/L per a la CK total en homes i dones, respectivament; 6 µg/L per a la CKMB, 3,3 per a la raó de CKMB total i 0,29 per a la raó CKMM3/ CKMM1 i <0.1 µg/L per Troponina T].

	Grup total	Homes	Dones
CK TOTAL	0.0003	0.004	0.011
CKMB	0.003	n.s.	0.0004
Raó CKMB / CK TOTAL	n.s.	n.s.	n.s.
Raó CKMM3/CKMM1	0.02	n.s.	n.s.
Troponina T cardíaca	0.0	0.0	0.0

\*<sup>a</sup> p < 0.02 i <sup>b</sup> p < 0.05 respecte a la proporció observada en homes.

que en les dones. La procedència múscul-esquelètica d'aquests resultats per damunt del límit de referència, s'assegurà en no existir cap valor detectable de troponina T cardíaca en les mostres analitzades.

Donat que la CK total i la raó d'isoformes CKMM aparegueren com els marcadors amb més elevat nombre d'anormalitats, s'estudià quin era el grau de concordança dels resultats entre un i altre marcador, estudiant aquesta concordança per sexes. Els resultats es recullen a la Taula 5. Es podé observar que existia una major proporció d'homes (37,9%) mostrant valors augmentats de CK i raó d'isoformes de CKMM que de dones (5,6%); aquesta diferència fou estadísticament significativa (p < 0.001). No existiren altres diferències significatives per sexes entre la resta de proporcions analitzades.

## DISCUSSIÓ

És conegut que l'exercici físic induïx modificacions metabòliques<sup>19</sup> i morfològiques dels músculs que intervenen en la seva pràctica. Les modificacions morfològiques poden ser des de lleugeres, provocant únicament canvis de permeabilitat de la membrana cel·lular, fins a severes com ruptures del sarcolema<sup>20</sup>. Aquestes modificacions morfològiques poden disminuir el rendiment atlètic, predisposar a les lesions musculars més importants, i en casos extrems, provocar miopa-

ties severes<sup>21</sup>. Això justifica la necessitat de disposar de marcadors de la lesió muscular.

Aquestes lesions es poden detectar per mètodes cruentos com la biòpsia, però és recomanable la recerca de marcadors biològics amb la mateixa eficiència que la biòpsia, però sense els seus inconvenients. El múscul conté nombroses proteïnes implicades en la contracció que, per efecte de l'exercici, arriben amb facilitat al plasma; els canvis de concentració plasmàtica d'aquestes proteïnes són útils per valorar la lesió muscular. Inclús, es pot graduar l'abast d'aquesta lesió. Les proteïnes dissoltes al citoplasma cel·lular (mioglobina i algunes enzimàtiques) arriben al plasma en resposta a canvis reversibles de la permeabilitat de la membrana, les proteïnes estructurals (miosina, troponines) tan sols ho fan en resposta a danys severes i necrosi cel·lular.

La creatina cinasa (CK) i els seus isoenzims són els marcadors bioquímics més utilitzats per valorar la lesió muscular. La mesura de la activitat catalítica de CK és un indicador sensible, però poc específic de l'origen de la lesió muscular (esquelètic o miocàrdic); la mesura de l'activitat del seu isoenzim 2 (CKMB) és més específica per detectar l'origen dels augments en plasma. Però, en els atletes aquesta especificitat queda menyscabada perquè la degeneració-regeneració de fibres musculars típiques de l'exercici induïx un augment del contingut de CKMB en el múscul esquelètic<sup>22</sup> i, després de

**Taula 5** Correspondència entre valors normals i anormals de CK total i de la raó d'isoformes CKMM en la població d'atletes estudiats (resultats expressats com % de casos observats sobre el total de casos avaluats).

	Homes		Dones	
	CK total normal	CK total anormal	CK total normal	CK total anormal
Raó MM3/MM1 normal	17,7%	26,6%	40,7%	22,2%
Raó MM3/MM1 anormal	17,7%	37,9%	31,5%	5,6% <sup>a</sup>

<sup>a</sup> < 0.001 respecte de la mateixa proporció observada en homes.

l'exercici físic, es poden trobar grans augments de CKMB en el plasma, sense que es detectin alteracions miocàrdiques que ho expliquin<sup>23,24</sup>. Per aquest motiu, i per les nombroses interferències que presenta la mesura de l'activitat de CKMB<sup>25</sup>, continua la recerca de marcadors bioquímics més sensibles i específics de la lesió muscular.

En el present treball s'han valorat l'eficiència diagnòstica de diferents marcadors bioquímics per a la detecció de la lesió muscular associada a l'exercici. La població d'atletes avaluada ha estat heterogènia, consistent en corredors de resistència de diferent nivell atlètic (alt i mig) i alguns velocistes, en els que s'han obtingut mostres en situació d'entrenament actiu i/o durant els períodes de recuperació de competicions. El coneixement de la dinàmica plasmàtica de la CK i els seus isoenzims i isoformes permet afirmar que les mostres obtingudes 12 hores després d'entrenament o entre 24 i 48 hores després de competició han de representar xifres normals d'aquests marcadors en el cas de que existeixi un procés normal de recuperació muscular post-exercici. Com que és un fet demostrat que els marcadors bioquímics de la lesió muscular es relacionen amb el nivell atlètic dels subjectes<sup>26</sup> s'ha utilitzat un paràmetre que permetés homogeneïtzar els diferents grups d'atletes avaluats. Per això s'ha escollit l'osteocalcina, que és un marcador metabòlic ossi conegut per augmentar directament en relació al grau d'esforç físic practicat<sup>27</sup>. S'ha pogut observar que no existien diferències d'osteocalcina entre els diferents nivells d'entrenament tant en homes com en dones. Les diferències existents entre sexes per a alguns dels marcadors avaluats, queden corregides en utilitzar valors de referència diferents per a cada sexe.

Una primera subpoblació obtinguda únicament en els atletes de fons i mig fons, ha permès conèixer l'efecte del sexe, índex de massa corporal i quantitat d'entrenament en aquells marcadors bioquímics que s'han descrit com relacionats amb aquestes variables<sup>28</sup>. Com ja ha estat descrit, s'observaren diferències per sexe entre CK total i LD, però s'apreciaren valors més baixos de concentració de CKMB en les dones, la qual cosa no estava descrita per la literatura fins ara<sup>29,30</sup>. Aquesta diferència s'explica en observar que la CKMB apareixia com la variable més significativament relacionada al quilometratge setmanal corregut pels atletes. Com que els atletes (homes) recorrien un promig de 109 Qm/setmana per 77 les atletes (dones), i és conegut l'augment del contingut muscular de CKMB quant més trencament-reparació de fibres provoqui l'exercici, resulta fàcil deduir que al CKMB apareix com un paràmetre indicador de la "quantitat" d'entrenament i que és esperable que quant més alt sigui el nivell d'entrenament, més alta sigui la xifra de concentració màssi-

ca de CKMB. Aquesta conclusió confirma resultats obtinguts en valorar l'activitat catalítica de CKMB<sup>7</sup>.

Resulta significatiu que en valorar la raó de la concentració de massa de CKMB sobre el total d'activitat CK no s'observin diferències per sexes ni que aquesta raó aparegui relacionada amb el sexe, l'índex de massa corporal o el quilometratge recorregut. Ja ha sigut mencionat que la CKMB i la CK total augmenten en els atletes després de practicar exercici. Malgrat que no s'hagi demostrat que això s'acompanyi d'alteracions miocàrdiques<sup>23,24</sup>, en els atletes i, especialment en els veterans, poden existir fenòmens d'isquèmia i/o necrosi miocàrdica que quedin emmascarats bioquímicament pels augments dels marcadors bioquímics originats en el múscul esquelètic. La raó de la massa de CKMB sobre CK total s'ha demostrat capaç de distingir específicament l'origen miocàrdic o múscul-esquelètic dels augments de CKMB en atletes, ja sigui en repòs o post-competició<sup>31</sup> i inclús durant competicions atlètiques de llarga durada<sup>32,33</sup>. Com també hem descrit, aquesta especificitat s'aconsegueix amb l'ús d'un límit de referència superior al descrit a la literatura<sup>16</sup>. Els presents resultats ajuden a confirmar aquestes afirmacions. En aquest context, el valor de la raó CKMB/CK total com a marcadora de lesions musculars quedaria reservat a detectar casos de gran afectació muscular i en els que hi haguessin importants processos de trencament-regeneració muscular amb un gran augment de la proporció de CKMB múscul-esquelètica.

En una població més nombrosa (187 mostres) que l'anterior s'avaluà el paper de les isoformes de l'isoenzim CK 3 (CKMM) com a marcadors de la lesió muscular. Les isoformes dels isoenzims de la CK són modificacions proteolítiques al plasma dels enzims dels teixits (els productes "purs" produïts pel gen que els codifica)<sup>34</sup>. En el cas de la CKMM existeixen 3 isoformes: la dels teixits (CKMM3) i dos típiques del plasma (CKMM2 i CKMM1). S'ha demostrat que la raó entre la isoforma del teixit i la més modificada del plasma (CKMM3/CKMM1) és un indicador molt fiable de lesió cel·lular<sup>17</sup>. Igualment s'ha demostrat que, després de practicar exercici físic, es poden detectar augments de la raó MM3/MM1 sense augments paral·lels de CK, indicatius de lesió cel·lular no detectada pels marcadors bioquímics "clàssics"<sup>15</sup>.

El present treball ha deixat la sensibilitat diagnòstica de les isoformes de CKMM en detectar lesions musculars esquelètiques. Per assegurar que en els atletes avaluats no existís cap lesió miocàrdica que pogués alterar els valors d'isoformes de CKMM, es determinà la Troponina T cardíaca (TnT) que és reconeguda com una de les molècules més car-

dioespecífiques de les actualment disponibles<sup>11</sup>. Però, s'han descrit que la Troponina T cardíaca s'expressa durant el desenvolupament embrionari en el múscul esquelètic i que es pot re-expressar en l'edat adulta quan existeixen miopaties degeneratives de l'esmentat múscul esquelètic o en músculs molt actius en la contracció, com el diafragma<sup>35</sup>. Així, doncs, detectar Troponina T cardíaca en atletes podria confondre sobre l'existència de lesió múscul-esquelètica o miocàrdica. Estudis posteriors a l'inici del present treball han demostrat que la mesura de troponina I cardíaca satisfà totalment els requeriments d'especificitat necessaris per diferenciar entre lesions múscul-esquelètiques i miocàrdiques<sup>36</sup>. Però, cap atleta presentava valors detectables (anormals) de TnT cardíaca. Això assegurava que els increments d'isoformes al plasma eren deguts únicament a les isoformes provinents del múscul-esquelètic. Un 48.5% d'atletes presentaven augments de CK total i un 45.6% d'isoformes de CKMM; en ambdós casos existien més homes (62.3% i 51.8% respectivament) que dones (26.4% i 35.8% respectivament) amb valors alterats. Aquesta diferència per sexes s'ha descrit pel cas de la CK i s'ha atribuït, entre d'altres, a un efecte protector dels estrògens sobre les fibres musculars de les dones<sup>37</sup>. Totes les mostres analítiques dels atletes es van obtenir al menys 12 hores després de la darrera sessió de treball físic; transcorregut aquest temps es pot assegurar que les isoformes segregades al plasma per efecte del darrer exercici practicat ja han hagut de ser eliminades<sup>17</sup>. Per això, una raó d'isoformes de CKMM anormal en els atletes de l'estudi resulta indicativa d'un mecanisme continuat de lesió muscular.

En el 17.7% dels atletes homes i en el 40.7% de les dones, els resultats de CK total i isoformes CKMM mostraren

concordància dins la normalitat; en el 37.9% dels homes i el 5.6% de les dones la concordança fou en l'anormalitat. La resta de casos un 44.3% dels homes i un 53.7% de les dones mostraven resultats de CK i isoformes de CKMM discordants. Quan la CK total aparegué anormal i les isoformes de CKMM normals, l'explicació fou la diferent dinàmica d'alliberament d'aquestes dues formes enzimàtiques; la CK roman augmentada en plasma fins a 24-36 hores del seu alliberament des de les cèl·lules, mentres que les isoformes no més de 12 hores. Així, doncs, la discordança és temporal i aquests atletes no presenten un mecanisme actiu de lesió cel·lular muscular, sinó que reflexen el més lent aclariment plasmàtic de la CK. La gran utilitat de les isoformes de CKMM en els atletes es féu evident en el 17.7% dels homes i el 31.5% de les dones en els que les isoformes foren anormals i la CK total normal. En aquest cas, l'augment de les isoformes al plasma només es pot explicar pel seu alliberament continuat des del teixit muscular esquelètic, indicant graus variables de lesió muscular no reconeguda pels marcadors clàssics. Així, d'entre els avaluats, les isoformes de CKMM apareixen com el marcador bioquímic més sensible de la lesió múscul-esquelètica, i aquesta és la conclusió més important del present estudi. En el futur s'hauria de correlacionar aquesta troballa bioquímica amb exploracions directes de l'estat funcional de la musculatura com les obreses per ressonància magnètica i/o biòpsia, així com avaluar l'efecte sobre aquests nous marcadors bioquímics d'altres tipus d'exercici físic diferents als avaluats en aquest treball, i finalment, estudiar el valor predictiu de futures lesions musculars que té la detecció d'alteració d'isoformes de CKMM al plasma d'individus practicants d'exercici físic.

## Bibliografia

1. ARMSTRONG, R.B.; OGILVIE, R.W.; SCHWANE, J.A. "Excentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle". *J. Appl. Physiol.*, 1983; 54:80-93.
2. HOWELL, J.N.; CHILA, A. G.; FORD, G.; DAVID, D.; GATES, T. "An electromyographic study of elbow motion during postexercise muscle soreness". *J. Appl. Physiol.*, 1985; 58:1713-8.
3. BÈRGSTROMM J. "Muscle electrolytes in man". *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1963; Suppl. 14:1-11.
4. NOAKES, T.D. "Effect of exercise on serum enzyme activities in humans". *Sports Medicine*, 1987; 4:245-67.
5. REMMERS, A.R.; KALJOT, V. "Serum transaminase levels". *J. Am. Med. Assoc.*, 1963; 185:148-50.
6. SZASZ, G.; GERHARDT, W.; GRUBER, W.; BERNT, E. "Creatine kinase in serum: 2. Interference of adenylate kinase with the assay". *Clin. Chem.*, 1976; 22:1806-11.
7. APPLE, F.S.; ROGERS, M.A.; CASAL, D.C.; SHERMAN, W.M.; IVY, J.L. "Creatine kinase-MB isoenzyme adaptation in stressed human skeletal muscle of marathon runners". *J. Appl. Physiol.*, 1985; 59:149-53.
8. SCHWARTZ, J.G.; BROWN, R.V.; MCMAHAN, C.A.; CAGE, C.L.; HERBER, S.A. "Clinical and analytical evaluation of different methods for measurement of creatine kinase MB". *Clin. Chem.*, 1989; 35:130-4.
9. EL ALLAF, M.; CHAPELLE, J.P.; EL ALLAF, D. ET AL. "Differentiating muscle damage from myocardial injury by

- means of the serum creatine (CK) isoenzyme MB mass measurement/total CK activity ratio". *Clin. Chem.*, 1986; 32:291-5.
10. ADAMS, J.E. III; BODOR, G.S.; DÁVILA-ROMÁN, V.G.; DELMEZ, J.A.; APPLE, F.S.; LADENSON, J.H. ET AL. "Cardiac troponin I: a marker with high specificity for cardiac injury". *Circulation*, 1993; 88:101-6.
  11. KATUS, H.A.; SCHOEPPENTHAU, M.; TANZEEM, A.; BAUER, H.G.; SAGAAN, W.; DIEDERICH, K.W. ET AL. "Non-invasive assessment of perioperative myocardial cell damage by circulating cardiac troponin T". *Br. Heart J.*, 1991; 65:259-64.
  12. MAIR, J.; WOHLFARTER, T.; KOLLER, A.; MAYR, M.; ARTNER-DWORZAK, E.; PUSCHENDORF, B. "Serum cardiac troponin T after extraordinary endurance exercise". *Lancet*, 1992; 340:1048 [Letter].
  13. MUELLER-BARDOFF, M.; HALLERMAYER, K.; SCHRÖDER, A. ET AL. "Improved troponin T ELISA specific for cardiac troponin T isoform: assay development and analytical and clinical validation". *Clin. Chem.*, 1997; 43:458-66.
  14. KAMPMANN, M.; RAUSCHER, T.; MUELLER-BARDOFF, M. ET AL. "Clinical evaluation of the cardiac markers troponin T and CK-MB in the Elecsys® 2010 system". *Clin. Chem.*, 1997; 43:S159-60 [Abstract].
  15. APPLE, F.S.; HELLSTEN, Y.; CLARKSON, P.M. "Early detection of skeletal muscle injury by assay of creatine kinase MM isoforms after acute exercise". *Clin. Chem.*, 1988; 34:1102-4.
  16. ORDÓÑEZ-LLANOS, J.; SERRA-GRIMA, R.; GONZÁLEZ-SASTRE, F. "Diagnostic specificity of creatine kinase MB isoenzyme (CKMB) in physically active subjects". *Circulation*, 1994; 89:1447-8 [Letter].
  17. WU, AHB.; GORNET, T.G.; WU, VH.; BROCKIE, R.E.; NISHIKAWA, A. "Early diagnosis of acute myocardial infarction by rapid analysis of creatine kinase isoenzyme-3 (CKMM) sub-types". *Clin. Chem.*, 1987; 33:358-62.
  18. SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. *Eds. Biometría, 1ª edición española*. H. Blume ediciones. Madrid, 1979; 663.
  19. IRINTCHEV, A.; WERNIG, A. "Muscle damage and repair in voluntary running mice: strain and muscle differences". *Cell Tissue Res*, 1987; 249:509-21.
  20. EBBELLING, C.B.; CLARKSON, P.M. "Exercise-induced muscle damage and adaptation". *Sports Med.*, 1989; 7:207-34.
  21. LONKA, P.; PEDERSEN, A. "Fatal rhabdomyolysis in marathon runners". *Lancet*, 1987; i:85 [Letter].
  22. APPLE, F.S.; ROGERS, M.A.; SHERMAN, W.M. "Profile of creatine kinase isoenzymes in skeletal muscle of marathon runners". *Clin. Chem.*, 1984; 30:413-6.
  23. SIEGEL, A.J.; SILVERMAN, L.M.; HOLMAN, B.L. "Normal results of post-race thallium-201 myocardial perfusing imaging in marathon runners with elevated serum creatine kinase levels". *Am. J. Med.*, 1985; 79:431-4.
  24. CARRIÓ, I.; SERRA-GRIMA, J.R.; BERN, L.; ESTORCH, M.; MARTÍNEZ-DUNCKER, C.; ORDÓÑEZ, J. "Transient alterations in cardiac performance after a six-hour race". *Am. J. Cardiol.*, 1990; 65:1471-4.
  25. ORDÓÑEZ, J.; JORBA, O.; MERCÉ, J.; GONZÁLEZ, S.F. "Utilidad de la medida de la concentración de masa de creatin kinasa 2". *Medicina Clínica (Barc.)*, 1992; 99:397-8 [Carta].
  26. KIELBLOCH, A.J.; MANJOO, M.; BOOYENS, J.; KATZEFF, I.E. "Creatine phosphokinase and lactate dehydrogenase levels after ultra-long distance running". *S. Afr. Med. J.*, 1979; 5:1061-5.
  27. NISHIYAMA, S.; TOMOEDA, S.; OHTA, T.; HIGUCHI, A.; MATSUDA, I. "Differences in basal and postexercise osteocalcin levels in athletic and nonathletic humans". *Calcif. Tissue Int.*, 1988; 43:150-4.
  28. HORTOBÁGYI, T.; DENAHAN, T. "Variability in creatine kinase: Methodological, exercise and clinically related factors". *Int. J. Sports Med.*, 1989; 10:69-80.
  29. CHAPELLE, J.P.; EL ALLAF, M. "Automated quantification of creatine kinase MB isoenzyme in serum by radial partition immunoassay with the use of the Stratus analyzer". *Clin. Chem.*, 1990; 36:99-101.
  30. JORGESSEN, P.L.; HORDER, M.; SELMER, J.; BOTKER, H.E. "Analytical evaluation of a sensitive enzyme immunoassay for determinations of creatine kinase isoenzyme MB". *Clin. Chem.*, 1990; 36:1502-5.
  31. ORDÓÑEZ-LLANOS, J.; SERRA-GRIMA, J.R.; MERCÉ-MUNTAÑOLA, J.; GONZÁLEZ-SASTRE, F. "Ratio of creatine kinase 2 mass concentration to total creatine kinase activity not altered by heavy physical exercise". *Clin. Chem.*, 1992; 38:2224-7.
  32. ORDÓÑEZ, J.; WU, AHB.; GORNET, T.G.; JORBA, O.; MERCÉ, J.; SERRA, J.R. "MB2/MB1 isoforms ratio is elevated during heavy physical exercise". *Clin. Chem.*, 1993; 39:1160 [Abstract].
  33. WU, AHB.; XUE-MING WANG, GORNET, T.G.; ORDÓÑEZ-LLANOS, J. "Creatine kinase MB isoforms in patients with skeletal muscle injury: Ramifications for early detection of acute myocardial infarction". *Clin. Chem.*, 1992; 38:2396-400.
  34. PERRYCAM, B.M.; KNELL, J.D.; ROBERTS, R. "Carboxypeptidase-catalyzed hydrolysis of C-terminal lysine: Mechanism for in vivo production of multiple forms of creatine kinase in plasma". *Clin. Chem.*, 1984; 30:662-4.
  35. BODOR, G.S.; SURVANT, L.; VOSS, E.M. ET AL. "Cardiac troponin T composition in normal and regenerating human skeletal muscle". *Clin. Chem.*, 1997; 43:476-84.
  36. MCLAURIN, M.D.; APPLE, F.S.; VOSS, E.M. ET AL. "Cardiac troponin I, cardiac troponin T, and creatine kinase MB in dialysis patients without ischemic heart disease: evidence of cardiac troponin T expression in skeletal muscle". *Clin. Chem.*, 1997; 43:976-82.
  37. SHUMATE, J.B.; BROOKE, M.H.; CARROLL, J.E.; DAVIS, J.E. "Increased creatine kinase after exercise: A sex-linked phenomenon". *Neurology*, 1979; 29:902-4.