

Determinación del complejo elastasa leucocitaria-inhibidor de α_1 -proteasa en el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide¹

B. Bornstein Sánchez², J. Arenas Barbero², V. Villamandos Nicás², A. Rocés Varela³, E. De la Morena García⁴

Comparamos la concentración del complejo elastasa leucocitaria-inhibidor de α_1 -proteasa (ELIP) en el líquido sinovial de la enfermedad articular inflamatoria con la existente en enfermedades articulares no inflamatorias, para valorar su utilidad como marcador de inflamación. Determinamos la concentración de elastasa leucocitaria mediante cuantificación del complejo ELIP mediante un método enzimoinmunológico (ELISA); así mismo realizamos un recuento de neutrófilos en el líquido sinovial en los pacientes con patología inflamatoria articular.

Encontramos que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$) en la concentración de dicho complejo entre las enfermedades articulares inflamatorias y no inflamatorias. No encontramos correlación, sin embargo, entre el número de neutrófilos presentes en el líquido sinovial y la concentración del complejo ELIP dentro del grupo de las enfermedades inflamatorias.

Concluimos que la determinación del complejo elastasa leucocitaria-inhibidor de α_1 -proteasa no constituye un dato de interés práctico, comparado con las magnitudes biológicas utilizadas habitualmente en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con enfermedad inflamatoria articular.

We compare the concentration of elastase-alpha 1 proteinase inhibitor complex (EIC) in the synovial fluid of inflammatory joint diseases versus non inflammatory joint diseases, trying to make an appraisal of its value as inflammation marker. We detect granulocyte EIC concentration by means of an ELISA. Besides we make a count of granulocytes in synovial fluid of inflammatory joint diseases.

We find a significant difference ($p < 0,01$) of EIC concentration between inflammatory joint diseases and non inflammatory joint diseases. But we fail to find any correlation between the granulocytes count and EIC concentration within inflammatory joint diseases.

We conclude that EIC measurement in synovial fluid is not of a practical value in diagnostic or follow-up for inflammatory joint diseases.

1. Este trabajo fue presentado parcialmente en el primer Congreso Europeo de Enzimología Clínica. San Lorenzo de El Escorial, Madrid. Junio, 1985.
2. Departamento de Bioquímica, Hospital Primero de Octubre, Cta. de Andalucía, Km 5.5, Madrid 28041.
3. Servicio de Reumatología, Hospital Primero de Octubre.
4. Departamento de Bioquímica, Fundación Jiménez Díaz, Madrid.

Introducción

La elastasa leucocitaria (EC 3.4.21.37) es una serina-proteinasa de masa molecular relativa 28000 Daltons (1) que se localiza en los gránulos azurófilos de los leucocitos polimorfonucleares (PMN) (2). La acción de la elastasa leucocitaria liberada desde los neutrófilos al líqui-

do sinovial en procesos inflamatorios articulares puede afectar tanto a las regiones de unión del ácido hialurónico con los glucosaminglucanos (3,4) como a la estructura del colágeno (5,6) que constituyen el soporte molecular del cartilago articular.

En el organismo la actividad de la elastasa leucocitaria en los fluidos extracelulares está modulada por inhibidores de proteínas como son la α_2 -macroglobulina y sobre todo el inhibidor de α_1 -proteasa (α_1 -antitripsina) (7). La medida de la concentración del complejo ELIP en líquido sinovial podría reflejar tanto el proceso inflamatorio en sí como su actividad, lo cual ya ha sido señalado previamente (8, 9). La valoración de la utilidad clínica de dicha magnitud y las implicaciones que se derivan de su medida en la patogénesis del daño articular son los objetivos trazados en el presente trabajo.

Materiales y métodos

Pacientes

El líquido sinovial se obtuvo de dos grupos de individuos: el grupo I incluía 31 pacientes (20 hombres y 11 mujeres, con edades comprendidas entre 13 y 59 años) con enfermedades articulares no inflamatorias (plica sinovial, osteocondritis y meniscopatía) y el grupo II, 25 pacientes (9 hombres y 16 mujeres, con edades comprendidas entre 22 y 72 años) con artritis reumatoide clásica diagnosticada según los criterios de la «American Rheumatism Association» (ARA) (10); el grupo II fue subdividido en artritis reumatoide «seropositiva» (n = 18) y artritis reumatoide «seronegativa» (n = 7). Todos los pacientes del grupo II estaban en tratamiento con drogas antiinflamatorias esteroideas.

El líquido sinovial se obtuvo en el grupo I mediante artroscopia o menisectomía y en el grupo II en el curso de una artrocentesis terapéutica. Todas las muestras se extrajeron de las articulaciones de la rodilla. Se recogieron dos muestras por cada paciente: una en tubo con heparina para el recuento de neutrófilos (sólo en las enfermedades inflamatorias) y otra sin anticoagulante para la determinación del complejo ELIP, con el fin de evitar posibles interferencias (9). Esta última se centrifugó a 1500 G durante 15 min. para eliminar todos los elementos celulares. El sobrenadante se distribuyó en alícuotas y se mantuvo congelado a -20°C hasta su posterior análisis. Las muestras contaminadas con sangre fueron eliminadas.

Métodos y aparatos

El conteo total de leucocitos se realizó en un Coulter Counter S Jr. (Coulter Electronics LTD. Luton Beds, England). La determinación de elastasa leucocitaria en líquido sinovial se llevó a cabo por cuantificación del complejo ELIP mediante un ELISA (PMN Elastase, Merck Immunoassay 15689) (Figura 1). Los tubos de plástico provistos en el equipo están revestidos con anticuerpos específicos contra la elastasa leucocitaria. El complejo ELIP presente en la muestra se une a dichos anticuerpos por medio de la elastasa leucocitaria. Después de una incubación y de una etapa de lavado (para eliminar el resto de los componentes de la muestra) se

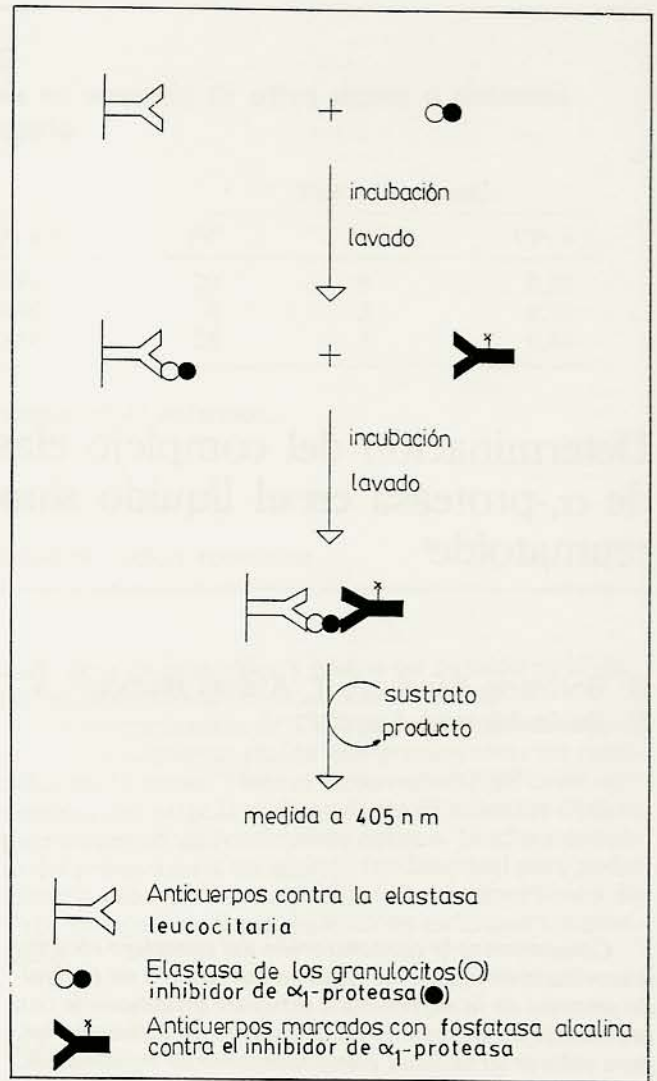


Figura 1. Esquema representativo del método enzimoimmunológico utilizado para la determinación del complejo elastasa leucocitaria-inhibidor de α_1 -proteasa (ELIP) en nuestro estudio.

añaden una segunda clase de anticuerpos específicos contra el inhibidor de α_1 -proteasa, marcados con una enzima. El exceso de anticuerpos marcados se elimina mediante una segunda etapa de lavado; a continuación se mide la actividad enzimática del complejo anticuerpo-enzima (11), en un espectrofotómetro Gilford SIII (Oberlín, Ohio, USA) (Figura 1).

Métodos estadísticos

Utilizamos la prueba de Mann Whitney y el análisis de regresión para evaluar los resultados (12).

Resultados

Hemos apreciado diferencia estadísticamente significativa en la concentración del complejo ELIP entre el grupo II (enfermedad articular inflamatoria) y el grupo I (enfermedad articular no inflamatoria) ($p < 0,01$). Los intervalos de la concentración del complejo se reflejan en la figura 2 como la media más/menos el error es-

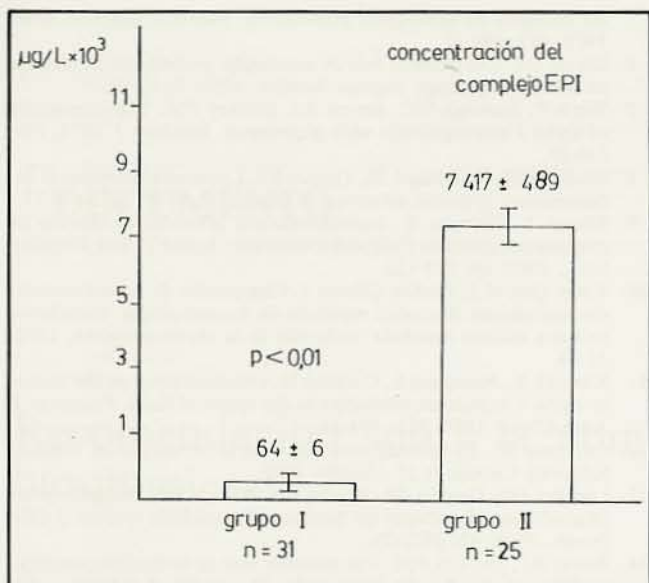


Figura 2. Concentración del complejo ELIP en el grupo I (patología no inflamatoria) y en el grupo II (patología inflamatoria). Los resultados se expresan como $\bar{x} \pm \text{ESM}$.

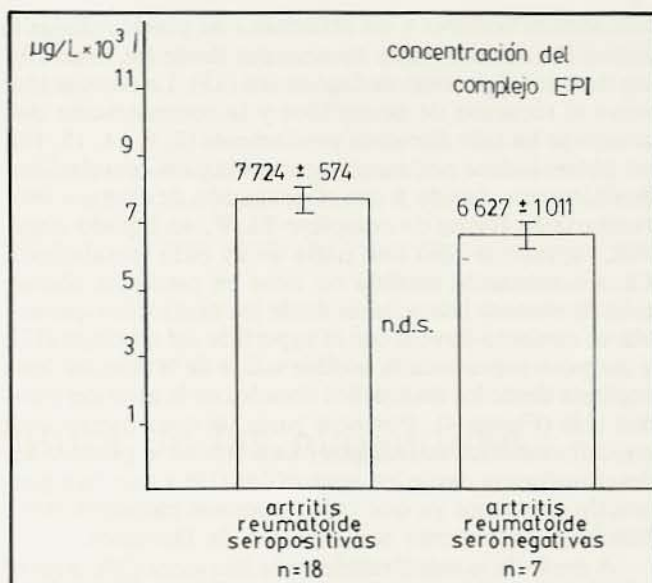


Figura 3. Concentración del complejo ELIP en pacientes con artritis reumatoide seropositiva y en pacientes con artritis reumatoide seronegativa. Los resultados se expresan como $\bar{x} \pm \text{ESM}$.

n.d.s. = no diferencia significativa entre la concentración del complejo en ambos subgrupos.

tándar de la media ($\bar{x} \pm \text{ESM}$).

Sin embargo, dentro del grupo II no encontramos diferencia significativa en la concentración del complejo ELIP entre el subgrupo de pacientes con artritis reumatoide «seropositiva» y «seronegativa» (Figura 3).

No hubo correlación entre la concentración de neutrófilos (intervalo $0,66 \times 10^9 / \text{L} - 31,6 \times 10^9 / \text{L}$, $12,3 \times 10^9 \pm 1,8 \times 10^9 / \text{L}$ expresado como $\bar{x} \pm \text{ESM}$) y la concentración del complejo ELIP en las artritis reumatoides tanto «seropositivas» ($r = 0,28$) como en las «seronegativas» ($r = 0,26$).

Discusión y conclusiones

La elastasa leucocitaria puede ser liberada a partir de los gránulos azurófilos de los PMN que se encuentran en el líquido sinovial de los pacientes con enfermedades inflamatorias articulares y ejercer una función degradativa de las estructuras moleculares del cartilago articular.

Las diferencias encontradas en la concentración del complejo ELIP entre pacientes con enfermedades infla-

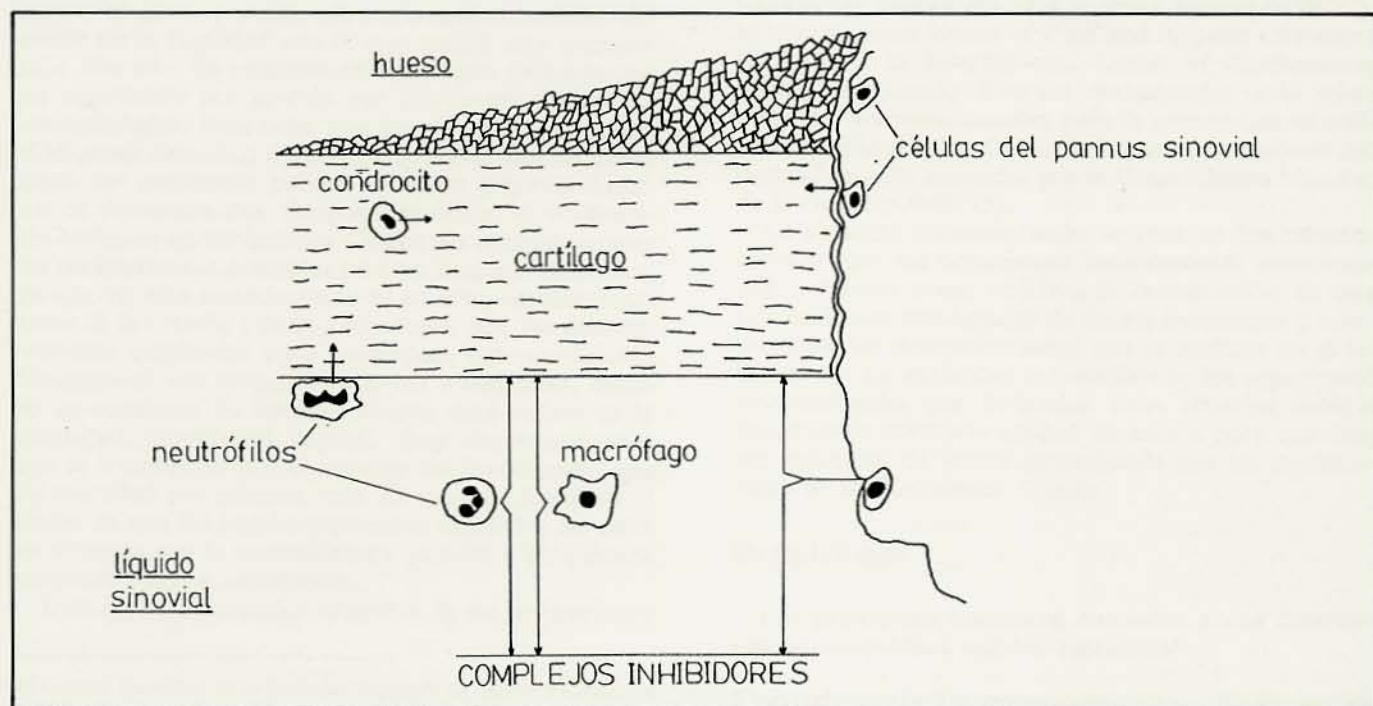


Figura 4. Las enzimas degradativas del cartilago articular pueden ser liberadas a partir de las distintas células esquematizadas en este dibujo (que es lo que representan las fehas). Para su interpretación ver el texto.

matorias articulares y no inflamatorias puede reflejar la liberación de hidrolasas lisosomales desde los neutrófilos durante el proceso de fagocitosis (13). La correlación entre el recuento de neutrófilos y la concentración del complejo ha sido discutida previamente (8, 9, 14, 15, 16) no obteniéndose por nuestra parte ninguna correlación, posiblemente debido a que el contenido de elastasa leucocitaria en forma de complejo ELIP, en líquido sinovial, representa sólo una parte de su ciclo metabólico. La concentración medida no tiene en cuenta la liberación de elastasa leucocitaria desde los neutrófilos que están en contacto directo con la superficie del cartilago (17) y tampoco representa la posible salida de la elastasa leucocitaria desde los neutrófilos situados en la zona del pannus (18) (Figura 4). Por otra parte, el tratamiento con antiinflamatorios esteroideos puede inhibir el proceso de desgranulación desde los neutrófilos (19) y ésto hay que tenerlo en cuenta ya que todos nuestros pacientes estaban bajo tratamiento con este tipo de fármacos.

A pesar de lo manifestado en la literatura (20), a favor de la mayor desgranulación de los neutrófilos en presencia de factor reumatoide, no hemos encontrado en el presente estudio diferencia significativa en la concentración de elastasa leucocitaria entre el grupo de pacientes con artritis reumatoide seropositiva y seronegativa.

Bibliografía

1. Starkey PM, Barret AJ. Neutral proteinase of human spleen. Purification and criteria for homogeneity of elastase and cathepsin G. *Biochem J.* 1976; 155: 255-63.
2. Janoff A. Human granulocyte elastase. *Am J Path.* 1972; 68: 579-91.
3. Roughley PJ, Barret AJ. The degradation of cartilage proteoglycans by tissue proteinases. Proteoglycan structure and its susceptibility to proteolysis. *Biochem J.* 1977; 167: 629-37.
4. Roughley PJ. The degradation of cartilage proteoglycans by tissue proteinases. Proteoglycan heterogeneity and the pathway of proteolytic degradation. *Biochem J.* 1977; 167: 639-46.
5. Starkey PM, Barret AJ, Burleigh MC. The degradation of articular collagen by neutrophil proteinases. *Biochim Biophys Acta.* 1977; 483: 386-97.
6. Barret AJ. The possible role of neutrophil proteinases in damage to articular cartilage. *Agents Actions.* 1978; 8: 11-18.
7. Werb Z, Burleigh MC, Barret AJ, Starkey PM. The interaction of alpha 2 macroglobulin with proteinases. *Biochem J.* 1974; 139: 359-68.
8. Hadler NM, Spitznagel JK, Quinet RJ. Lysosomal enzymes in inflammatory synovial effusions. *J Immunol.* 1979; 123: 572-77.
9. Ekerot L, Ohlsson K. Immunoreactive granulocyte elastase in rheumatoid synovial fluid and membrane. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1982; 16: 117-122.
10. Rotes Querol J, Muñoz Gómez J. Compendio de las enfermedades reumáticas. Sociedad española de Reumatología. Barcelona, primera edición española traducida de la séptima inglesa. 1973: 33-39.
11. Kleesiek K, Neumann S, Greiling H. Determination of the elastase alpha 1 proteinase inhibitors in the synovial fluid. *Fresenius Z Anal Chem.* 1982; 311: 434-35.
12. Carrasco JL. El método estadístico en la investigación médica. Editorial Ciencia 3; 2ª edición. 1983.
13. Lazarus GS, Daniels JR, Brown RS, Bladen HA, Fullmer MM. Degradation of collagen by human collagenolytic system. *J Clin Invest.* 1968; 47: 2622-29.
14. Barret AJ, Starkey PM. The possible role of leukocyte proteinases in the tissue damage of rheumatoid arthritis. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1977: 211-21.
15. Neumann S, Hemrich N, Gunzer G, Lang H. Enzyme-linked immunoassay for human granulocyte elastase in complex with alpha 1 proteinase inhibitor. In: Horl WH, Heidland, eds. *Proteases: Potential role in health and diseases.* New York, London: Plenum Publishing Corp, 1984: 379-90.
16. Farr M, Kendall MJ, Young DW, Meynell MJ, Hawkins CF. Assessment of rheumatoid activity based on clinical features and blood and synovial fluid analysis. *Ann Rheum Dis.* 1976; 35: 163-67.
17. Kimure H, Tateishi H, Ziff M. Surface ultrastructure of rheumatoid articular cartilage. *Arthritis rheum.* 1977; 20: 1085-98.
18. Mohr W, Wesinghage D. The relationship between polymorphonuclear granulocytes and cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Z Rheumatol.* 1978; 37: 81-6.
19. Perper RJ, Oronsky AL. Enzyme release from human leukocytes and degradation of cartilage matrix. Effects of antirheumatic drugs. *Arthritis Rheum.* 1974; 17: 47-55.
20. Zucker-Franklin D. The phagosomes in rheumatoid synovial fluid leukocytes. A light fluorescence and electron microscope study. *Arthritis Rheum.* 1966; 9: 24-35.