

CONCENTRACION DE CATEPSINAS EN EL LIQUIDO SINOVIAL DE PACIENTES CON DISTINTOS PADECIMIENTOS ARTICULARES

DR. GÁBOR KÁTONA*

DR. SERGIO R. ULLOA L.**

DESDE QUE DE DUVE y colaboradores identificaron los lisosomas en 1955¹, en base a las propiedades que les confiere su contenido netamente enzimático, numerosos investigadores se dieron a la tarea de dilucidar su participación en el fenómeno inflamatorio, que constituye el elemento de mayor importancia en los procesos patológicos incluidos en el campo de la reumatología. El presente trabajo constituye un intento para determinar el comportamiento de algunas enzimas lisosómicas en el líquido sinovial de diferentes procesos inflamatorios articulares.

Los lisosomas constituyen una familia de organelos intracitoplásmicos que contienen en su interior gran número de hidrolasas ácidas². Se encuentran en todas las células en que se han investigado, a excepción de los eritrocitos³, y en algunas células vegetales⁴. Fell y Thomas en 1960⁵ fueron los pri-

meros en postular la participación de estos elementos en el campo de la reumatología, al suponer que la desnaturalización del cartílago observada en animales de experimentación, sometidos a tratamiento con grandes cantidades de vitamina A, obedecía a la acción de una o varias enzimas, liberadas a partir de lisosomas sensibles a la acción de esta vitamina, hecho que había sido demostrado previamente *in vitro*⁶.

Weissman⁷ logró reproducir las mismas alteraciones sobre cartílago utilizando en lugar de vitamina A, la papaína, una enzima que tiene acción proteolítica igual que la catepsina, aislada de los lisosomas de condrocitos, macrófagos, polimorfonucleares y de las células beta de la membrana sinovial⁸.

La figura No. 1 señala la acción sobre el cartílago de la catepsina y la papaína.

La función de la catepsina se realiza sobre el complejo proteína-condroitinsulfato rompiendo la unión y liberando el sulfato de condroitina, con la pérdida consiguiente de la rigidez del cartílago, como indica en forma esquemática la figura No. 2.

* Del Instituto Nacional de Cardiología, México, D. F.

** Del Laboratorio de Investigaciones Inmunológicas de la S. S. A., México, D. F.

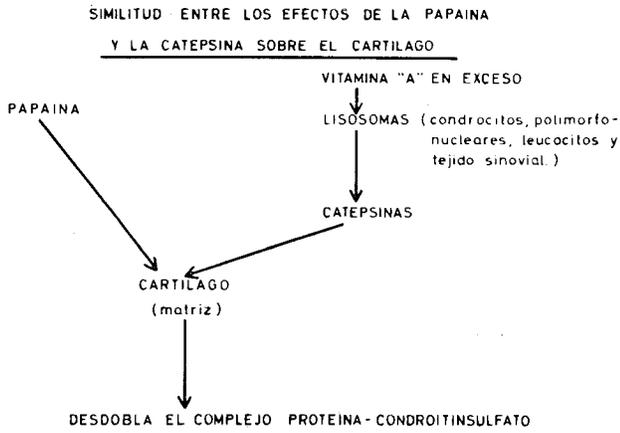


Figura 1

En condiciones normales las catepsinas ejercen además un papel de reguladoras del equilibrio dinámico de las proteínas intracelulares, ya que permiten que se degraden algunas proteínas no necesarias mientras se sintetizan otras⁹.

El propósito del presente trabajo consistió en determinar en forma objetiva la relación que tiene la actividad de las catepsinas del líquido sinovial con el tipo del proceso articular en distintos padecimientos reumáticos.

MATERIAL Y MÉTODO

Se tomaron 100 muestras de líquido sinovial de rodillas de 46 pacientes con distintas artropatías; los líquidos fueron congelados hasta el momento del

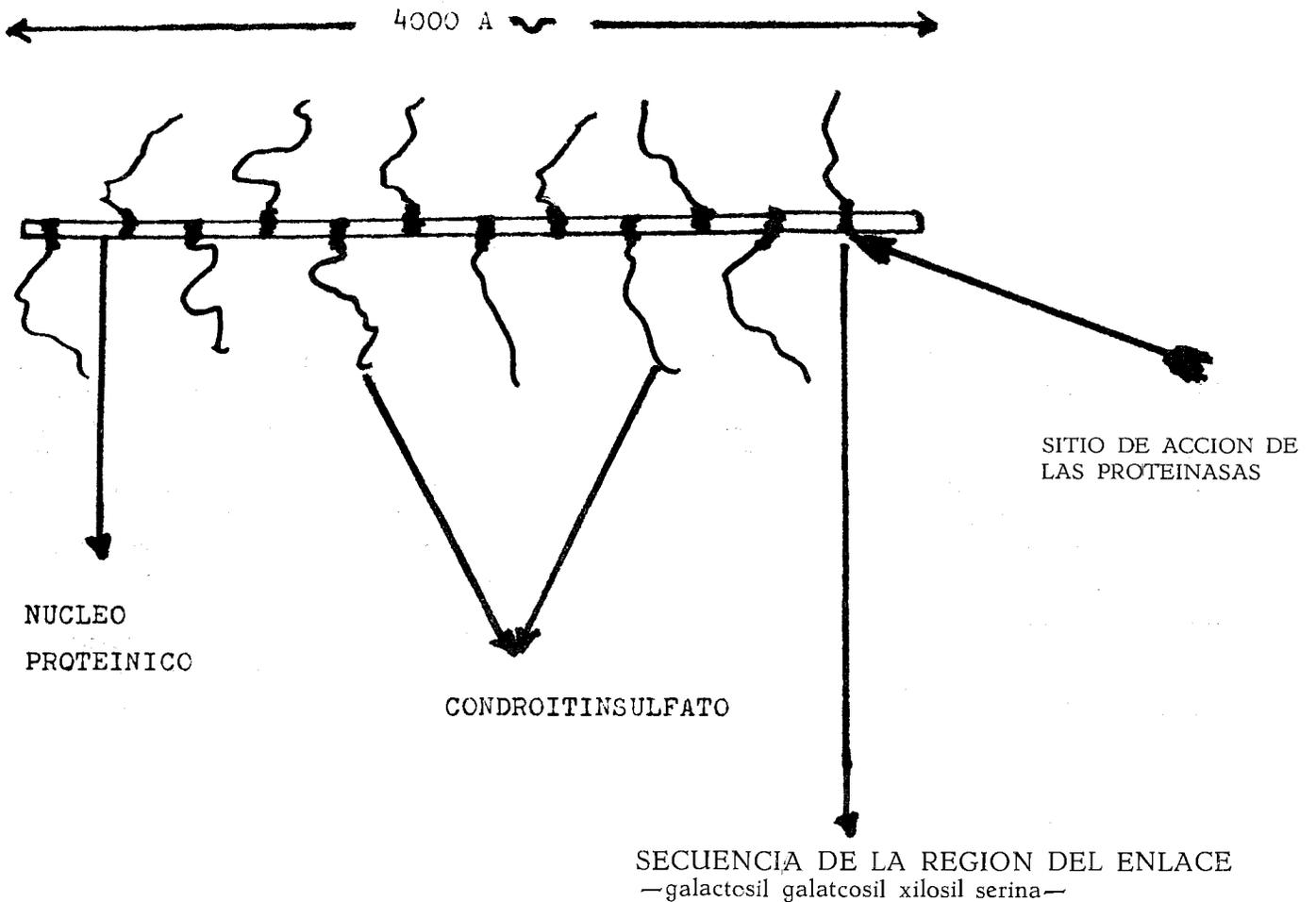


Fig. 2. Reresentación esquemática de una unidad básica de macromoléculas de proteína-condroitin-sulfato. Sólo se representan una quinta parte de las cadenas laterales de mucopolisacáridos. Está formado por un núcleo proteínico, al cual se hallan adheridas 60 unidades de condroitín sulfato de peso molecular aproximado de 50 000, la macromolécula pasa alrededor de 4 000 000.

CONCENTRACION DE CATEPSINAS EN EL LIQUIDO SINOVIAL, SEGUN LOS DISTINTOS PADECIMIENTOS REUMATICOS.
(VALORES BASALES)

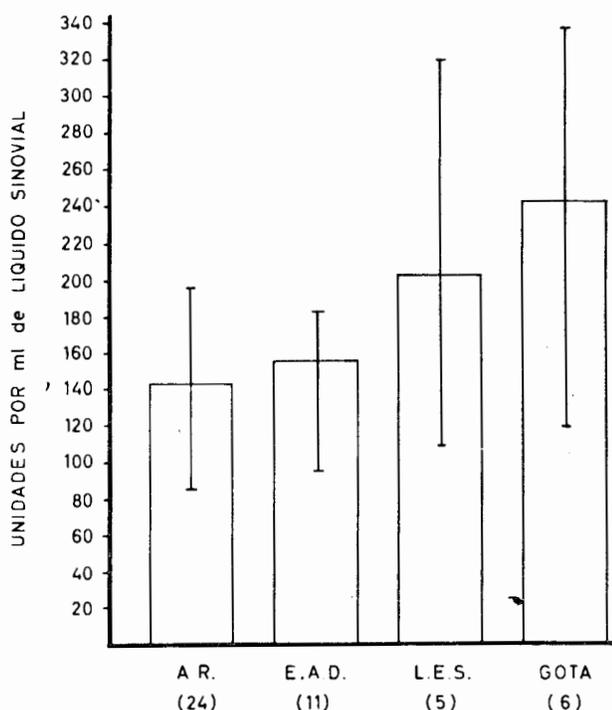


Figura 3

análisis. En ocasiones se tomaron muestras seriadas de una misma articulación con objeto de observar el efecto del tratamiento local, esteroideo, permitiendo así que el objetivo del presente trabajo fuese doble. La imposibilidad técnica de obtener líquido sinovial en cantidades suficientes para realizar la determinación de las enzimas de articulaciones normales, no nos permitió un grupo testigo para estudio comparativo.

Se determinó la catepsina por el método de Anson¹⁰, modificado por Gianetto y De Duve¹¹, que utiliza un substrato de hemoglobina de buey, 0.00026 M en una solución amortiguadora de acetatos 0.17 M a pH 5. Se detiene la reacción a los 10 minutos de incubación con ácido tricloroacético 0.3 m. Se filtran y se determinan los productos de degradación mediante el reactivo de Folin Ciocalteu, utilizando tirosina como patrón. Una unidad es equivalente a una de Tirosina liberado durante la reacción. En al-

gunos casos se hicieron determinaciones de fosfatasa ácida mediante el método de Andersch y Col.¹² y de beta-glucuronidasa por el método de Talalay y Fishman¹³ modificado por Kerr y Levy.

RESULTADOS

Los 46 casos estudiados se dividieron de acuerdo al diagnóstico en los siguientes grupos: 24 casos de artritis reumatoide (A.R.).

- 19 " " enfermedad articular degenerativa (E.A.D.).
- 3 " " artropatía gotosa (Gota)
- 2 " " lupus eritematoso sistémico (L.E.S.).

El promedio de unidades de catepsina por mililitro de líquido sinovial en cada uno de los grupos fueron los siguientes: (Figura 3).

	<i>Unidades/ml.</i>
Artritis reumatoide	139.0
Enfermedad articular degenerativa	144.0
Artropatía gotosa	229.0
Lupus eritematoso sistémico	215.0

Una vez obtenidos los valores de la actividad de catepsinas en el líquido sinovial en diferentes artropatías, cuyo denominador común fue el derrame sinovial en las rodillas, nos interesaba saber si la alteración en la actividad de dicha enzima dependía del incremento en la actividad de los lisosomas como elementos importantes en el proceso inflamatorio (A.R., LES, Gota) o simplemente del aumento en el grado de labilidad de la membrana de los lisosomas bajo el efecto de algún agente disgregante. Con este objeto se decidió determinar algunas otras enzimas de origen lisosómico indudable, como la fosfatasa ácida y la beta-glucuronidasa en el líquido sinovial de 10 pacientes de artritis reumatoide y 10 de enfermedad articular degenerativa.

Los resultados se expresan para la fosfatasa ácida en microgramos de planitrofenol liberado de la reacción por hora de incubación, como unidad y en microgramos de fenoltaleína por 24 horas de incubación en el caso de la beta-glucuronidasa, como unidad.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes: (expresados en Unidades por mililitro de líquido sinovial). (Figura 4).

VALORES COMPARATIVOS DE 3 ENZIMAS LISOSOMICAS EN EL LIQUIDO SINOVIAL DE PACIENTES CON A.R. y E.A.D.

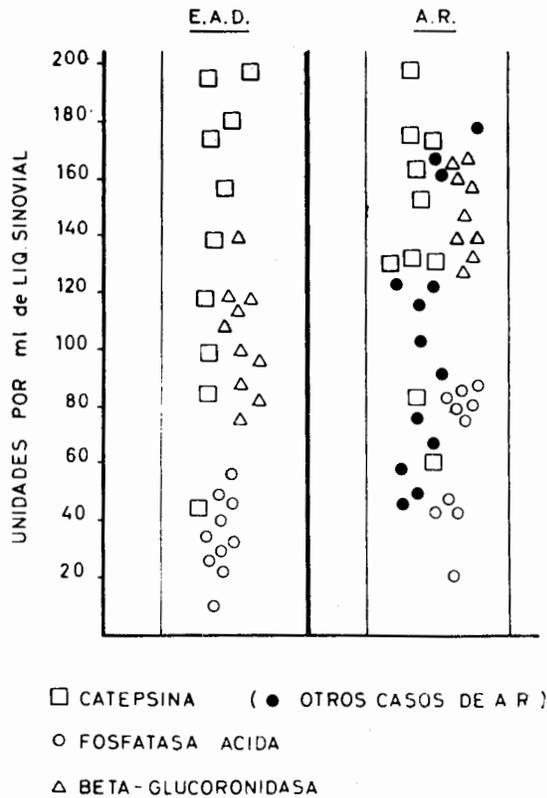


Figura 4

DISMINUCION DE LOS NIVELES DE LAS CATEPSINAS EN EL LIQ. SINOVIAL BAJO EL EFECTO DE CORTICOTERAPIA LOCAL EN LAS DIFERENTES ENFERMEDADES REUMATICAS.

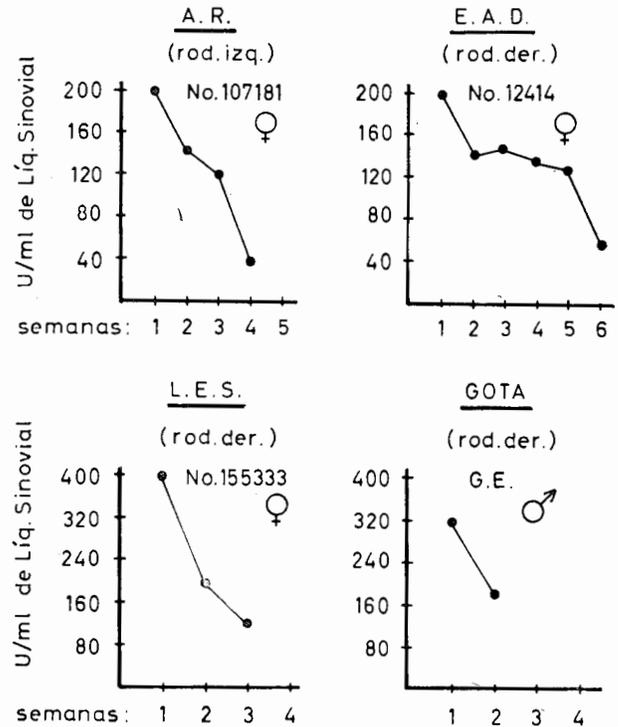


Figura 5

Enfermedad	Catepsinas Unidades/ml.	Fosfat. ácida Unidades/ml.	Beta-glucor. Unidades/ml.
articular degenerativa Artritis reumatoide	138.5	36.0	107.0
	146.2	64.2	149.6

Por otra parte en enfermos con tratamiento anti-inflamatorio local, con corticosteroides de acción tópica, nos interesaba ver las probables modificaciones en los niveles de las carepsinas bajo el efecto de este tratamiento. Para esto se tomaron en forma seriada, con intervalos de una semana, muestras de liquido sinovial de rodillas del mismo enfermo, antes y durante la administración intra-articular del corticosteroide, en nuestros casos concretamente del acetato de parametasona a la dosis de 10 mg. por cada inyección. Los resultados se observan en la figura

No. 5, donde se aprecia un descenso evidente en los niveles de las catepsinas en todos los casos, fenómeno sumamente interesante si tomamos en cuenta la importancia de las catepsinas en la degradación del cartilago.

DISCUSIÓN

Los trabajos de Fell y Thomas^{5, 6} y ⁷ nos marcaron la ruta a seguir en la presente investigación, pues de acuerdo con ellos resultaba evidente que los lisosomas y su contenido enzimático, tenían un papel relevante en la patogenia de los procesos articulares cualquiera que fuese su etiología. Si consideramos la lesión del cartilago como elemento patológico común y que la misma depende de la acción de una proteinasa, se comprende el interés de medir en qué grado la catepsina altera la arquitectura del cartilago normal.

Nuestros resultados nos sorprendieron un poco, puesto que la enfermedad articular degenerativa en la cual domina el proceso degenerativo del cartilago, en nuestra casuística presentó una concentración de catepsina en el líquido sinovial inferior a los otros procesos estudiados. La aparente paradoja se podría explicar quizás en función del tiempo de evolución de cada proceso. En la enfermedad articular degenerativa la evolución es muy lenta y clínicamente se observa que la sintomatología aparece cuando ya la lesión condral se encuentra muy avanzada. El proceso inflamatorio primario tampoco es componente esencial del cuadro, pero precisamente debido a las presentes experiencias no se puede descartar su importancia aunque sea secundaria.

Mientras que en los casos de artritis reumatoide en fase activa, el proceso inflamatorio es mucho más agudo y afecta mayor número de estructuras tisulares, todas ricas en lisosomas que evidentemente están descargando enzimas en la cavidad articular. Por otra parte, de acuerdo a la reciente hipótesis de Hollander¹⁴ sobre la participación del fagocito (fagocito, con inclusiones de complejos de matoglobulina-factor reumatoide-gamma globulina agregada) como elemento desencadenante del proceso inflamatorio, activando su contenido enzimático por acción del proceso fagocitario activo de los complejos antígeno-anticuerpo, induce la destrucción posterior de la célula, con la liberación consiguiente de enzimas. Resulta así evidente que en este proceso patológico tenemos otro elemento agregado que no se observa en la enfermedad articular degenerativa y que por sí solo puede intervenir en la mayor elaboración de enzimas lisosómicas (Figura No. 4). En los casos de artropatía gotosa podemos pensar también en un mecanismo en cierta forma similar al de la artritis reumatoide^{15, 16, 17, 18}. En la gota los depósitos de cristales de ácido úrico en la membrana sinovial y su presencia en la cavidad articular produce una migración activa de polimorfonucleares para fagocitar dichos cristales. Este proceso fagocítico activa las enzimas lisosómicas las que a su vez van a hidrolizar primero la célula que las contiene y quedan así libres y activas para actuar posteriormente sobre las estructuras adyacentes en la articulación.

En el caso de lupus eritematoso sistémico tenemos la acción de varios elementos. Por un lado participa en el proceso de manera indudable la fagocitosis de complejos antígeno-anticuerpo, y por otra parte un proceso inflamatorio vascular de tipo vasculitis; dos procesos que pueden inducir necrosis ti-

sular, que a su vez activa los lisosomas tanto de las células destruidas como de las fagocitarias, encargadas de eliminar el tejido afectado, para restablecer la continuidad anatómica.

Nuestros resultados apoyan las teorías mencionadas al principio del texto, y podemos aseverar que las proteínas (catepsinas) realmente pueden ser las probables causantes en gran parte de las lesiones sobre cartilago articular y estructuras adyacentes y se encuentran efectivamente aumentadas en el líquido sinovial de los diferentes procesos patológicos articulares. La función de estas enzimas ha sido estudiada, en parte directamente y en ocasiones extrapolando la función de proteinasas similares tales como papaína y tripsina. Todas estas enzimas en conjunto producen las siguientes alteraciones: a) la disminución de la concentración de mucopolisacáridos ácidos; b) la pérdida de la rigidez del cartilago; c) el aumento en la concentración de glucoproteínas hasta tres a cinco veces el valor inicial y 10 veces en la concentración sérica de mucopolisacáridos ácidos, lo que demuestra que se liberan a partir de hidrólisis por las proteinasas.

Hay un punto interesante en nuestro estudio y es la disminución de la concentración de catepsinas en el líquido sinovial observada después de la administración de corticoesteroides por vía intra-articular, acompañada de una mejoría clínica franca. Tal efecto probablemente se debe a la acción protectora de estas sustancias sobre la membrana lisosómica. La acción de los esteroides sobre los lisosomas fue demostrada por Thomas, McCluskey, Li y Weissmann¹⁹, quienes lograron bloquear la acción lítica de la catepsina sobre el cartilago de animales de experimentación, inducida por dosis en exceso de vitamina A, al administrar hidrocortisona. Pero como la acción de los esteroides sobre la enzima que nos ocupa es indirecta, pensamos que debemos incrementar nuestras investigaciones en la búsqueda de otros agentes con propiedades de inhibidores de proteinasas, teniendo esperanza en algunos ya conocidos como los inhibidores de kalikreína (Trasyol) y el ácido epsiloaminocaproico (EACA).

Por el número limitado de los casos estudiados es difícil llegar, naturalmente, a alguna conclusión definitiva. La finalidad del presente informe fue simplemente el deseo de comunicar algunos datos indiscutiblemente interesantes y llamativos, y las conclusiones quedan para una publicación posterior a base de una experiencia más amplia.

RESUMEN

1. Se determinó la concentración de catepsinas, en 100 muestras de líquido sinovial de rodillas de 46 pacientes con distintas artropatías.

2. Se encontró que la concentración máxima correspondía a los líquidos de pacientes con lupus eritematoso sistémico, seguida por los de artropatía gotosa, y concentraciones mucho menores en los pacientes de enfermedad articular degenerativa y artritis reumatoide.

3. Se intenta explicar el aumento en la concentración de catepsinas en cada grupo de pacientes de acuerdo a su proceso patológico.

4. Se observó una disminución evidente de la concentración de catepsinas en el líquido sinovial de las articulaciones tratadas con corticoesteroides (10 mg. de acetato de parametasona por semana).

5. Se experimentará el efecto terapéutico satisfactorio de substancias potencialmente inhibitoras de proteinasas, tales como: ácido epsiloaminocaproico (EACA) e inhibidores de kailkreína como el Trasylol.

SUMMARY

The concentration of cathepsins, was determined in 100 synovial fluids taken from 46 patients having various arthropaties.

The highest level of concentration, was found in the fluids taken from patients having lupus erythematosus systemic. The concentration level in fluids from patients having gouty arthritis, followed lower on the scale. The smallest concentration was found in the fluids taken from patients having degenerative joint disease and rheumatoid arthritis.

The point was to explain the reason for the increased concentration of cathepsins in the synovial fluid of each group of patients depending on the pathological process.

When the joints were treated with corticosteroids (10 mg. of paramethasone acetate weekly); the concentration of cathepsins in the synovial fluid definitely decreased.

Experiments were carried out concerning the beneficial therapeutic effect in the use of substances to inhibit proteinases, such as epsiloaminocaproic acid (EACA) and kallikrein inhibitors (Trasylol).

RESUMÉ

On a déterminé la concentration de catepsines dans 100 échantillons du liquide synovial du genou chez 46 malades avec diferentes arthropaties.

On a trouvé que la concentration maximale correspondait au liquides des malades avec lupus érythemateux, suivis par ceux d'arthropatie gouteuse, étant tres diminuées chez la maladie articulaire dégénérative et l'arthrite rheumatoide.

On a essayé d'expliquer les augmentations trouvées dans chaque groupe des malades, d'accord au proces pathologiques.

On a trouvé une diminution évidente des catepsines dans les articulations traitées avec corticoïdes (10 mg. acétate de paramétazone).

On fait des expériences sur l'effet therapeutique de certains substances que potentiellment inhibent les proteinases acide epsiloamino-caproïque (EACA) et des inhibiteurs du système kallikreine, comme le Trasylol.

REFERENCIAS

1. DE DUVE, C. LYSOSOMES, *New group of cytoplasmic particles. In subcellular particles: A Symposium held during the meeting of the Society of General Physiologist at the Marine Biological Laboratory Woods, Hole, Mass. June 9-11.* Editado por T. Hayashi, 213, New York, Ronald, 1959: 128.
2. ZEYA, H. I. y SPITZNAGEL, J. K. *Antibacterial and enzymatic basic proteins from leucocytes lysosomes; Separation and identificación.* Science, 142: 1085, 1963.
3. WEISSMANN, G., *Medical progress: Lysosomes.* New Eng. J. of Med. 273: 1084, 1965.
4. ALLISON, A. *Lysosomes and disease.* Scientific American, 217: 62, 1967.
5. FELL, H. B. y THOMAS, I. *Comparison of the effects of papain and vitamin A, on cartilage. II. The effect in organ cultures of embryonic skeletal tissue.* J. Exper. Med. 111: 719, 1960.
6. THOMAS, L. *Reversible collapse of rabbit ears, after intravenous papain and prevention of recovery by cortisone.* J. Exper. Med. 104: 245-251, 1956.
7. THOMAS, L., McCLUSKEY, R. T., POTTER, J. L.,

- and WEISSMANN, G. *Comparison of the effects of papain and vitamin A on cartilage. I. The effect in rabbits.* J. Exper. Med. 111: 705, 1960.
8. WEISSMANN, G. *Medical Progress: Lysosomes.* New. Eng. J. of Med. 273: 1084, 1965.
 9. WEISSMANN, G. *Medical Progress: Lysosomes (Concluded) Lysosomes and disease.* New. Eng. J. of Med. 273: 1143, 1965.
 10. HOLT, S. J. *Esterases in Lysosomes.* 1963. In "Lysosomes" Ciba Foundation Symposium. (A. V. S. de Reuck and M. P. Cameron Eds.) 117-118, Churchill, London.
 11. GIANETTO, R. y DE DUVE, C. *Tissue fractionation studies. 4. Comparative study of the binding of acid phosphatase, betagluconidase and cathepsine by rat-liver particles.* Biochem. J. 59: 433, 1955.
 12. ANDERSON y COL. *Use of Paranitrophenyl phosphate as the substrate in determination of serum acid phosphatase.* Am. J. of Clinical Pathology 17: 571, 1947.
 13. KERR, L. M. y LEVVY, G. A. *Biochem. J.* 48: 209, 1951. Citado por Gianetto, y De Duve. *Tissue Fractionation studies.* Biochem. J. 59: 433, 1955.
 14. HOLLANDER, J. L. McCARTHY, D. J., ASTORGA, G. y CASTRO MURILLO, E. *Studies on the pathogenesis of rheumatoid joint inflammation. I. The "R. A. Cell" and working hypothesis.* Ann. of Int. Med. 62: 271, 1965.
 15. HOWELL, R. R. y SEEGMILLER, J. E.: *A mechanism of action of colchicine.* Arth. and Rheum. 51: 303, 1962.
 16. PHELPS, P. y McCARTY, D. J.: *The absolute Requirement of polymorphonuclear leukocytes in the genesis of acute arthritis induced by crystals injected into canine joints.* Arth. and Rheum. 7: 746, 1964.
 17. SEEGMILLER, J. E., HOWELL, R. R. *The old and new concepts of acute gouty arthritis.* Arth. and Rheum. 6: 616, 1962.
 18. SEEGMILLER, J. E., HOWELL, R. R. y MALAWISITA, S. E. *A mechanism of action of colchicine in acute gouty arthritis.* J. Clin. Invest. 41: 1329, 1962.
 19. THOMAS, L. Mc. CLUSKEY, R. T., LI, J. y WEISSMANN, G. *Prevention by cortisones of the changes in cartilage induced by an excess of vitamin A in rabbits.* Amer. J. Path. 42: 271, 1963.