

Elastasa y actividad antielastásica del suero

Su posible relación con la patogenia de la arteriosclerosis. Comparación del inhibidor de la elastasa con el índice C. U. P.

Por los Dres. HECTOR E. CAMMAROTA,* JUAN CUATRECASAS
y LIDIA DE YACONIS

INTRODUCCION

La elastasa, la elastomucoproteinasa y la colagenomucoproteinasa; son enzimas capaces de actuar sobre algunos de los elementos del tejido conectivo. El origen de estas enzimas sería el páncreas, en donde se las encuentra en forma de zimógenos siendo activadas posteriormente.

Según Balo y Banga, la elastomucoproteinasa y la colagenomucoproteinasa, son enzimas mucolíticas que actuarían sobre la membrana de la fibra conjuntiva, liberando los polisacáridos de las mucoproteínas y, posteriormente, la elastasa, que es una enzima proteolítica actuaría sobre la sustancia de cemento del tejido conectivo.

Estos autores fueron los primeros en prever la posible relación de estas enzimas con la arteriosclerosis. Ellos observaron la disminución y hasta la desaparición de la elastasa en el páncreas de los sujetos afectados de arteriosclerosis, en relación con los valores hallados en el páncreas de personas jóvenes muertas en accidentes.

Balo y Banga sugieren que en la arteriosclerosis se producirían primero, cambios estructurales de los polisacáridos y proteínas de la pared arterial y sobre esa pared arterial alterada, actuarían las enzimas elastolíticas, produciendo la elastolisis.

Por otra parte ya a fines del siglo pasado Huchard había observado la relación causal entre diátesis gotosa y arteriosclerosis. También, numerosos trabajos, refieren la asociación

entre hiperuricemia y diabetes, en la que es tan frecuente hallar alteraciones vasculares.

Estos hallazgos hicieron que se estudiara la relación del ácido úrico con la arteriosclerosis.

Se considera que en la arteriosclerosis existen varios factores responsables del depósito del colesterol en la íntima de las arterias: la estabilidad coloidal, el estado de permeabilidad de la íntima, los agentes de tensión superficial como fosfolípidos y ácido úrico, factores todos que serían de importancia para favorecer o evitar el depósito de colesterol, de acuerdo al equilibrio en que se encuentran.

Peter y Mann establecieron en 1943, la existencia de una estrecha relación entre colesterol total y fósforo lipóidico, relación que es una constante y cuya determinación es más importante que la de cada lípido por separado.

La interacción de los fosfolípidos y del ácido úrico, como agentes antagónicos de tensión superficial y su posible efecto sobre la movilización del colesterol ha llevado a Gertler y White a relacionar a estos tres elementos, obteniendo un índice denominado CUP y que consiste en multiplicar el contenido de ácido úrico del suero por la relación colesterol/fósforo lipóidico.

Nosotros hemos querido ver qué relación existe entre el inhibidor de la elastasa y el índice CUP de Gertler y White, para lo cual sobre el mismo grupo de sujetos clínicamente normales y sobre el mismo grupo de pacientes con arteriosclerosis, a los cuales determinamos el inhibidor de la elastasa, efectuamos conjuntamente, la valoración del índice CUP.

Servicio de Cardiología del Hospital Alvear. Jefe: Prof. L. de Soldati.

* A cargo del Laboratorio Clínico.

MATERIAL Y METODO

No se ha podido hasta el momento detectar la elastasa en la sangre circulante y ello sería debido a que la enzima se encuentra en cantidades ínfimas, o a que se fija muy rápidamente en el tejido conectivo o bien a que circula en forma de algún compuesto.

Por otra parte, existe en el suero, un factor que se opone a esa acción elastolítica; factor que sí, puede ser medido y que se ha denominado, factor inhibidor de la elastasa.

El inhibidor de la elastasa del suero humano, es una sustancia macromolecular y termolabil que se destruye por acción del ácido tricloroacético al 2,5 por ciento. Los estudios electroforéticos del suero, efectuados por diversos autores, localizaron al inhibidor entre los picos de la albúmina y de la alfa globulina.

La elastolisis se llevaría a cabo en tres etapas, a saber:

1) Formación del complejo elastasa-sustrato.

2) Formación de la alfa elastina, de alto P.M. a partir de la elastasa soluble.

3) Desintegración de la alfa elastina.

La acción del inhibidor se llevaría a cabo en la primera etapa.

Nosotros hemos determinado la actividad anti-elastásica del suero en un grupo de sujetos clínicamente normales, de ambos sexos cuyas edades oscilaron entre los 16 y los 48 años, y similarmente sobre otro grupo de sujetos clínicamente normales con edades entre 57 y 65 años. El total de esta población fue de 35 individuos.

Del mismo modo estudiamos el inhibidor de la elastasa, sobre un lote de 30 pacientes con arteriosclerosis cuyas edades estaban comprendidas entre los 39 y los 75 años.

Para este estudio empleamos el método colorimétrico de Sachar, Winter

y Frankel, basado en los trabajos de Balo y Banga. La enzima elastasa y el sustrato elastina, fueron provistos por el laboratorio Sigma Chem. Co. de Estados Unidos.

El método se basa en comparar el poder solubilizante de la elastasa frente a un sustrato de elastina en un sistema compuesto por: a) elastasa-elastina y b) elastasa-elastina y suero a examinar.

Las determinaciones siempre fueron hechas por duplicado.

El colesterol total fue determinado por la técnica de Abell; el ácido úrico por la técnica de Caraway y el fósforo lipóidico por la técnica de Bloor.

METODO EMPLEADO PARA
DETERMINAR LA ACTIVIDAD
ANTI ELASTASICA DEL SUERO

Hemos adoptado para nuestro trabajo, un método fotométrico empleado por Sachar, Winter, Sicher y Frankel basados en los trabajos de Balo y Banga.

1) **Determinación de la actividad enzimática**

Se define por unidad de elastasa, a la cantidad de enzima requerida para solubilizar 1 mg de sustrato elastina en 20 minutos y a 37° C en las condiciones de trabajo.

La enzima elastasa y el sustrato elastina-orceína fueron provistos por la firma Sigma Chemical Company de St. Louis, Estados Unidos de Norte América.

El frasco original de la firma Sigma indicó que 1 ml de la suspensión de elastasa contenía 20 mg de dicha enzima, y que 1 mg tenía la propiedad de solubilizar 32 mg de elastina es decir que tenía 32 U.E.

Nosotros quisimos comprobar cuál era la mínima cantidad de elastasa capaz de solubilizar a 20 mg de elastina que tomaríamos como sustrato y dijimos:

Para 32 U.E.	1 mg de elastasa	
Para 20 U.E.	X mg.	X: 0,62 mg de elastasa
Para 33 U.E.	1 mg de elastasa	
Para 20 U.E.	X mg.	X: 0,60 mg de elastasa
Para 29 U.E.	1 mg de elastasa	
Para 20 U.E.	X mg.	X: 0,63 mg de elastasa

Es decir que hemos supuesto distintas actividades de la enzima, a partir de las 32 U.E. indicadas en el frasco original, tomando cantidades por encima y por debajo de este título y determinamos cuál era la mínima cantidad de enzima capaz de solubilizar a los 20 mg de elastina.

Teniendo en cuenta 1 mg de la suspensión contenía 20 mg de la enzima, se tomaron las cantidades arrojadas en los ensayos y se llevaron a volumen de 1 ml con Tris Buffer pH 8,8.

PROCEDIMIENTO

Se colocaron porciones de 20 mg de sustrato elastina-orceína en pequeños tubos de ensayo, con 1 ml de Tris buffer pH 8,8; 1 ml de agua destilada y 1 ml de la enzima convenientemente diluida en Buffer Tris pH 8,8; de acuerdo a los cálculos indicados anteriormente. Los tubos se taparon y colocaron horizontalmente en un agitador mecánico sumergidos en baño de agua a 37° C y fueron agitados uniformemente a 46 agitaciones por minuto durante 20 minutos. Se sacaron del agua y se les agregó a cada tubo 2 ml de buffer de fosfato de 0,7 M y pH 6 para detener la reacción enzimática. Los tubos se centrifugaron y se leyó el % de transmisión a 590 mu. Los resultados fueron convertidos en actividad específica: U. de elastasa por mg de preparación enzimática usada. Así vimos que cuando tomamos 29 U.E. por mg de enzima se alcanzó la máxima densidad óptica es decir que 0,68 mg de elastasa solubilizaron completamente los 20 mg de elastina del ensayo.

2) Preparación de la curva standard

Se colocaron en tubos de ensayo, trabajando por duplicado, porciones de elastina de 5 a 25 mg a cada tubo, con 1 ml de Tris buffer, 1 ml de agua y 1 ml de la preparación enzimática correspondiente. Así si para 29 U.E. corresponde 1 mg de enzima, para los 5 mg de elastasa corresponderán 0,17 mg de enzima capaz de solubilizarlos totalmente.

En consecuencia, cada tubo llevó la cantidad necesaria de elastasa capaz de solubilizar al sustrato en cada tubo. La mezcla se incubó hasta que toda la elastina pasó en solución, apro-

ximadamente 24 hs. Los tubos se centrifugaron previo agregado de 2 ml de buffer fosfato y se leyó la densidad óptica de cada tubo a 590 mu. Se hizo la curva de densidad óptica versus mg de elastina. Los resultados fueron concordantes.

3) Determinación del poder inhibidor del suero para la elastasa

Reactivos:

Buffer Tris (hidroximetilaminometano) 0,2 M.

Buffer Tris preparado según Goumori.

Buffer fosfato 0,7 M pH 6

Elastina: Sigma.

Elastasa: suspensión de Sigma Co. que contiene 20 mg/ml.

Como 1 mg de elastasa tiene 29 unidades de actividad, para 20 mg de elastina corresponden 0,68 mg de elastasa.

Teniendo en cuenta las determinaciones a realizar se calculan la cantidad de elastasa que hay que disolver en Tris buffer 0,2 M, teniendo en cuenta que éstos tienen que estar disueltos en tantos ml de Tris buffer como determinaciones se vayan a realizar.

Por ejemplo: si se van a realizar 10 exámenes, como se hacen siempre por duplicado, el total será de 20 exámenes.

Para 1 determinación:

0,68 mg de elastasa

Para 20 determinaciones:

$0,68 \times 20 = 13,60$ mg de elastasa

1 ml de preparación enzimática contiene 20 mg de elastasa, en consecuencia los 13,60 mg de enzima estarán contenidos en:

1 ml	20 mg	
X	13,60 mg	X: 0,8 ml

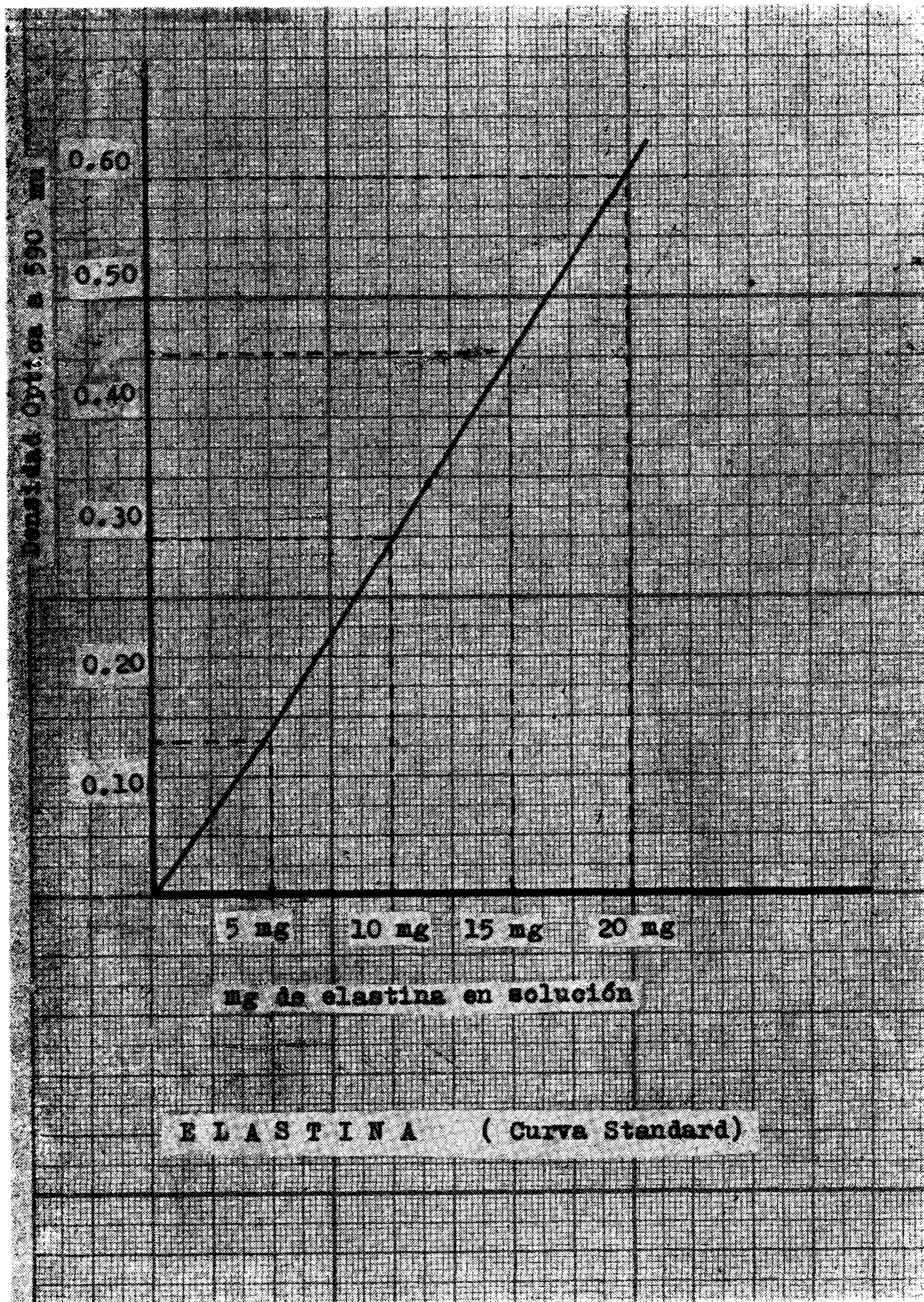
Esos 0,8 ml de suspensión de enzima se llevan a 20 ml con Tris buffer, de tal modo que tendremos:

En 20 ml 0,8 ml (que equivalen a 13,60 miligramos de enzima)

En 1 ml 0,68 mg de enzima

Cada tubo llevará pues los 0,68 mg de elastasa capaz de disolver a los 20 mg de sustrato elastina-orceína que pondremos como sustrato.

GRAFICO 1



Buffer Tris: pH 8,6 según Goumori: Se prepara agregando a 25ml de Tris 0,2 M, 12,5 ml de HCl 0,1 M y llevando a 62,5 ml con agua destilada.

Método: Se colocan 20 mg de sustrato elastina-orceína en los tubos apropiados por duplicado, uno para el ensayo y otro para el control.

Al tubo control: se agrega 1ml de Tris buffer según Goumori, 0,85 ml de agua destilada y 1 ml de la dilución de enzima que contiene 0,68 mg de elastasa. Al tubo problema: se agrega 1 ml de Tris buffer según Goumori, 0,85 ml de agua, 1 ml de la dilución enzimática y 0,15 ml del suero a es-

tudiar. Se agregan los reactivos en ese orden y rápidamente.

Los tubos se colocan en estufa a 37° C durante una hora. Luego se agregan a cada tubo 2 ml del buffer de fosfato para detener la reacción y 0,15 ml de suero al tubo control. Se centrifugan los tubos y la solución

coloreada sobrenadante se lee al fotocolorímetro en una longitud de onda a 590 mμ. Las lecturas de las densidades ópticas se trasladaron a la curva de standard y se calcularon así los mg de elastina disueltos.

Para calcular el porcentaje de inhibición se aplicó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{mg de elastina solubilizada en el control} - \text{mg de elastina solubilizada en el problema}}{\text{mg de elastina solubilizada en el control}} \times 100$$

CUADRO 1

Edad	Nombre	Sexo	Porcentaje de inhibición de la elastasa	C.U.P.
22	P. de G.	F.	48,6	98
18	A. C.	M.	55,1	66
34	R. D.	M.	37,8	94
26	J. C.	M.	39	110
32	I. de F.	F.	41	84
45	C. R.	M.	36	102
23	C. de B.	F.	47	62
40	A. V.	F.	42	54
36	R. P.	M.	50	120
39	L. S.	M.	48,5	104
36	J. A.	M.	42	78
25	A. P.	M.	47	99
18	C. G.	M.	50	132
34	C. C.	M.	46	75
42	A. I.	M.	44	84
19	J. L.	F.	41	43
36	H. A.	M.	50	83
20	J. M.	M.	39	75
16	F. G.	M.	45	54
21	P. P.	M.	50	89
48	R. de S.	F.	40	114
45	M. G.	F.	40	82
15	H. C.	M.	51	44
36	S. S.	M.	42	60
48	P. C.	M.	47	120

T = 1119

X = 44,76

E.S. = 0,99

I₀₅ = 42,71 - 46,81

D.S. = 4,95

T = 2126

X = 85,04

E.S. = 4,90

I₀₅ = 74,93 - 95,15

D.S. = 24,50

CONCLUSIONES

1) En el grupo de sujetos normales con edades entre 16 y 48 años, el inhibidor de la elastasa varió entre el 36 % y el 55,1 % con una media de

44,7; índice de confianza de 42,7 a 46,8 (Cuadro 1).

En el otro grupo de sujetos también normales, con edades entre 57 y 65 años, el inhibidor de la elastasa fue de 36 % y 41 % con una media de

CUADRO 2

Edad	Nombre	Sexo	Porcentaje de inhibición de la elastasa	C.U.P.
57	B. O.	F.	38,2	136
66	F. E.	M.	37	88
65	J. Z.	M.	36	109
68	O. L.	M.	41	74
62	A. de C.	F.	39	98
66	M. R.	M.	40,5	76
60	I. G.	M.	40,3	108
66	C. S.	M.	38	151
62	L. S.	M.	39	78
61	E. R.	M.	39	82

T = 388	T = 1000
X = 38,80	X = 100
E.S. = 0,50	E.S. = 8,33
I ₉₅ = 37,68 - 39,92	I ₉₅ = 81,15 - 118,85
D.S. = 1,58	D.S. = 26,34

38,8; índice de confianza de 37,6 a 39,9 (Cuadro 2).

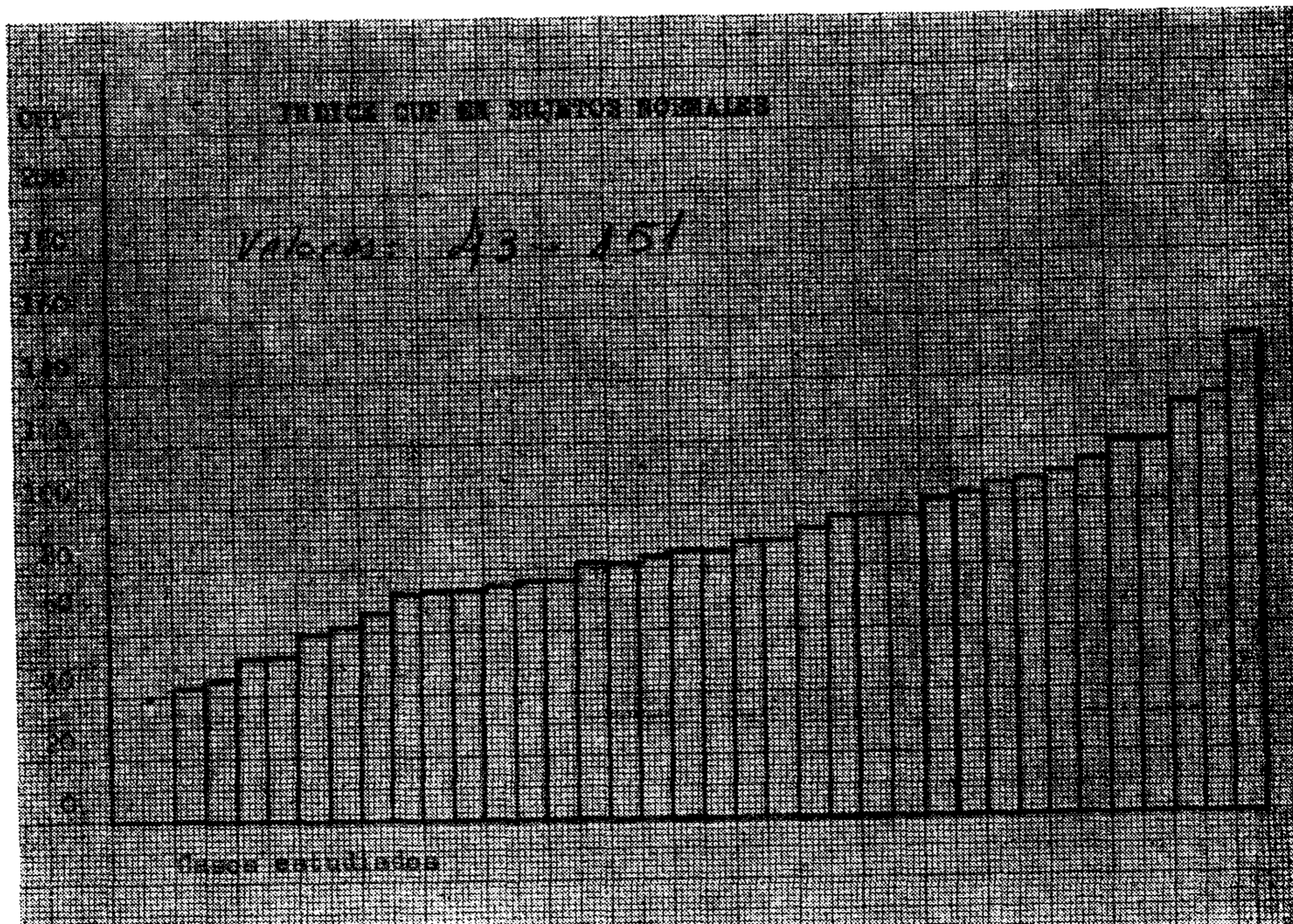
La diferencia entre ambos grupos, fue altamente significativa ($p < 0,001$).

2) En el grupo de sujetos normales con edades entre 16 y 48 años, el valor del índice CUP varió entre 43 y 132, con una media de 85,04 y con un índice de confianza de 74,9 a 95,1.

Sobre el otro grupo de sujetos normales, pero cuyas edades estaban entre los 57 y los 65 años, el valor del índice CUP osciló entre 74 y 151, con una media de 100; índice de confianza de 81,15 a 118,85.

La diferencia entre ambos grupos no ha sido estadísticamente significativa. $p > 0,10$
 $< 0,20$ (figura 1).

FIGURA 1

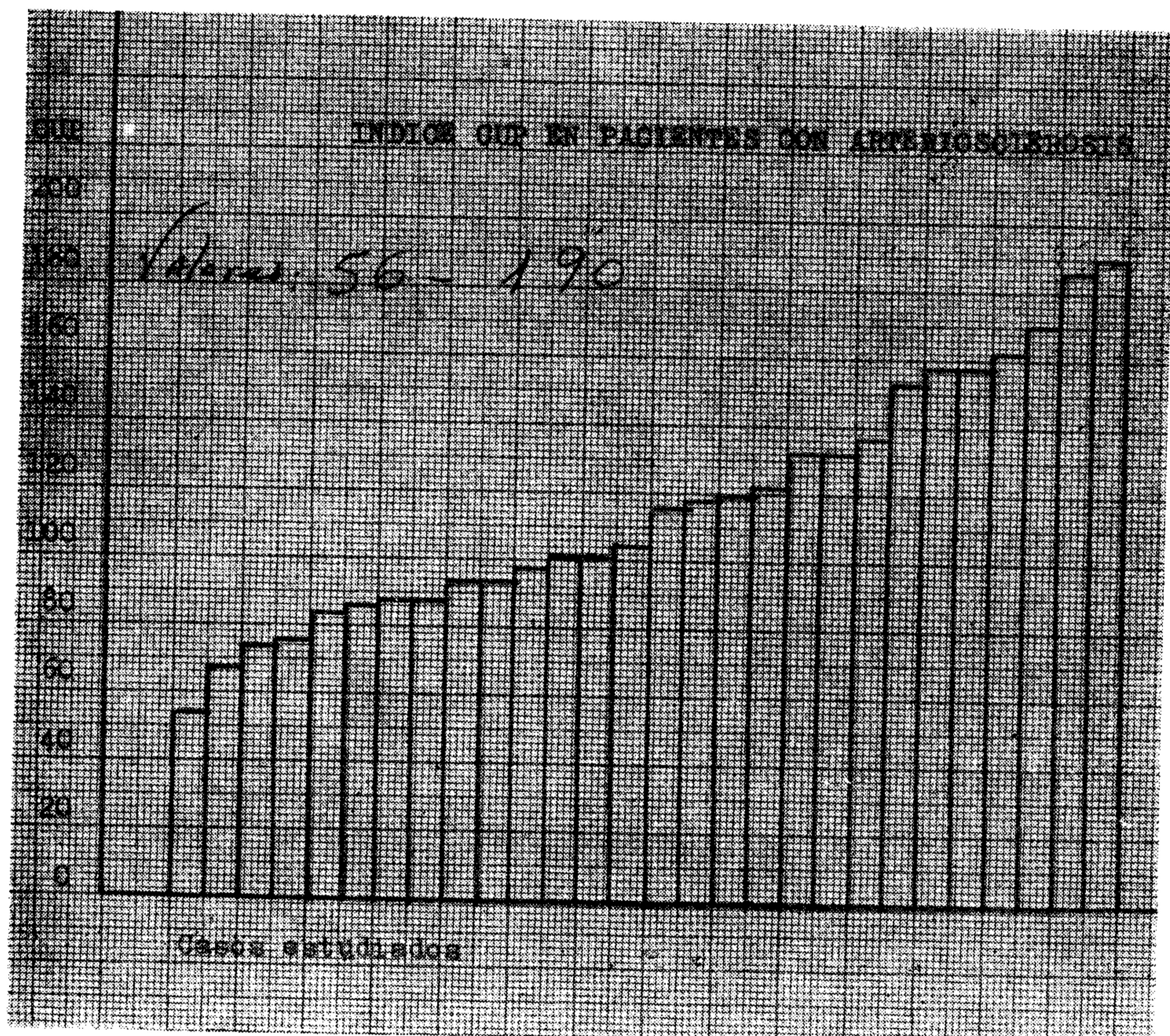


3) Sobre el lote de 30 pacientes con arteriosclerosis clínica, se encontró que el 56 % de los mismos, presentaba una disminución para el inhibidor de la elastasa sérica y que el 32 %

de ese mismo lote de pacientes, mostraba un aumento del índice CUP (Cuadros 3 y 4; fig. 2).

4) En el 24 % de los pacientes estudiados se demostró la existencia de

FIGURA 2



CUADRO 3

Edad	Nombre	Sexo	Porcentaje de inhibición de la elastasa	C.U.P.
49	A. L.	M.	31,2	102
50	C. C.	M.	24	138
46	A. de M.	F.	46	88
50	F. G.	F.	19	190
39	S. R.	M.	32	75
42	S. G.	M.	29,5	159
44	A. F.	F.	34	102
49	C. B.	M.	60	114

$$T = 275,7$$

$$X = 34,46$$

$$E.S. = 4,58$$

$$I_{05} = 23,63 - 45,29$$

$$D.S. = 12,95$$

$$T = 968$$

$$X = 121$$

$$E.S. = 13,67$$

$$I_{05} = 88,67 - 153,33$$

$$D.S. = 38,66$$

CUADRO 4

Edad	Nombre	Sexo	Porcentaje de inhibición de la elastasa	C.U.P.
57	B. H.	M.	30	154
64	S. B.	M.	46	184
72	S. K.	M.	25	170
68	H. E.	F.	22	110
72	F. G.	M.	19,5	162
59	H. de B.	F.	50	89
75	J. T.	M.	46	74
60	B. M.	M.	22,4	119
52	N. R.	M.	30	123
51	G. G.	M.	30	69
55	R. de K.	F.	22	56
72	C. P.	F.	20	134
54	R. J.	M.	49	116
62	W. T.	M.	30	95
70	D. B.	M.	69,5	132
80	A. A.	M.	40,2	120
56	N. S.	F.	42	84
75	L. H.	F.	39	96
59	N. M.	M.	72	99
60	M. G.	M.	48	105
70	S. R.	M.	69,5	159
51	B. C.	M.	32	86

T = 854,1	T = 2536
X = 38,82	X = 115,27
E.S. = 3,46	E.S. = 7,37
I ₉₅ = 31,63 - 46,01	I ₉₅ = 99,94 - 130,60
D.S. = 16,23	D.S. = 34,57

correlación entre la disminución del inhibidor y el aumento del índice CUP (cuadro 5).

El 8 % de estos pacientes mostró elevación del índice CUP con inhibidor de la elastasa normal; mientras que el 32 % mostró disminución del inhibidor con índice CUP normal.

5) Nuestros valores para el inhibidor de la elastasa en los sujetos normales fueron algo inferiores a los encontrados por Balo y Banga pero, de cualquier modo confirman que en un alto porcentaje de pacientes con arteriosclerosis el inhibidor de la elastasa, está efectivamente disminuido.

6) Los individuos normales con edades entre 57 y 65 años muestran un poder de inhibición algo menor en relación con sujetos normales de menor edad.

7) Según nuestra experiencia, la

valoración del inhibidor de la elastasa, parece ser un indicador más sensible de alteración vascular, que el índice CUP.

8) Las diferencias de los valores encontrados para el inhibidor de la elastasa para pacientes de hasta 50 años y de más de 50 años de edad, no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,40$)
< 0,50

Las diferencias de los valores encontrados para el índice CUP, en los pacientes de hasta 50 años y mayores de 50 años de edad, tampoco fueron estadísticamente significativas.

($p > 0,70$)
< 0,80

Podemos pensar que la disminución del inhibidor de la elastasa está relacionada con la elastosis de la pared arterial y que por lo tanto, la elasta-

CUADRO 5

Normales	Inhibidor de la elastasa	Indice Cup
16 a 48 años	36 % a 55,1 % tasa media: 44,7 i.c.: 42,7 a 46,8	43 a 132 tasa media: 85,04 i.c.: 74,9 a 95,1
57 a 65 años	36 % a 41 % tasa media: 38,8 i.c.: 37,6 a 39,9	74 a 151 tasa media: 100 i.c.: 81 a 118,8
Sujetos con arteriosclerosis	Inhibidor de la elastasa	Indice Cup
hasta 50 años	19 % a 60 % tasa media: 34,4 i.c.: 23,6 a 45,2	75 a 190 tasa media: 121 i.c.: 88,6 a 153,3
más de 50 años	19,5 % a 72 % tasa media: 38,8 i.c.: 31,63 a 46,01	56 % a 184 % tasa media: 115,2 i.c.: 99,9 a 131

sa y su inhibidor, jugarían un importante papel en la patogenia de la arteriosclerosis.

La sola determinación del inhibidor de la elastasa o del índice CUP, no nos permite efectuar el diagnóstico humoral de arteriosclerosis. El conocimiento de estos hallazgos es sin embargo interesante para el estudio de la fisiopatología de la enfermedad.

Una disminución del inhibidor de la elastasa, como así también una franca elevación del índice CUP orientan hacia el diagnóstico de arteriosclerosis, pero valores normales no descartan la afección.

Creemos así mismo, que deben ampliarse estos estudios en cuanto se refiere al inhibidor de la elastasa, no solamente en los pacientes vasculares, sino también en otras entidades que cursan con alteración del tejido conectivo.

Otros autores han encontrado aumento del inhibidor, en los últimos meses del embarazo. La disminución del inhibidor en las embarazadas de más de 40 años de edad, se asociaría

a la aparición de los aneurismas disecantes de aorta, que se suelen ver en esos casos.

SUMARIO

Según Balo y Banga, la elastasa es la enzima que actuaría sobre la sustancia de cemento del tejido conectivo. En el suero humano no ha sido posible determinar la elastasa, pero sí su inhibidor. Balo y Banga fueron los primeros en preveer la posible relación entre elastasa y arteriosclerosis.

Nosotros efectuamos la determinación del inhibidor de la elastasa, conjuntamente con el índice CUP en un grupo de personas normales y en otro grupo de pacientes con arteriosclerosis confirmada.

Sobre el grupo de pacientes con arteriosclerosis, nosotros observamos que el 56 % de los mismos presentaban el inhibidor de la elastasa disminuido. Sólo el 24 % de estos pacientes presentaban correlación entre en índice CUP y el inhibidor de la elastasa.

Nuestros valores para el inhibidor

de la elastasa en los sujetos normales fueron menores a los observador por Balo y Banga. Los individuos normales con edades entre 57 y 65 años mostraron un poder de inhibición algo menor en relación a los individuos normales de menor edad.

SUMMARY

For Balo and Banga the elastase is an enzyme that would attach the cement of the connective tissue. In the human serum nobody can measure the elastase levels.

Balo and Banga was the first to think in the possible relation between elastase and arteriosclerosis.

We determined the elastase-inhibitor and the CUP index the same time in a group of normal subjects and a group of arteriosclerotic patients. In the last group we observed that 56 % of them had the elastase-inhibitor diminished. Only 24 % of the arteriosclerotic group had correlation between the CUP index and

with the elastase inhibitor. Our values for the elastase inhibitor in the normal subjects was lower than Balo and Banga's. Normal fellows to 57 from 65 years old, have an inhibitor power a little smaller than the young normal people studied.

BIBLIOGRAFIA

1. Banga Ilona: Determination of elastase and elastase inhibitor by means of orcein-elastin. *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* 24, 1-9, 1963.

2. Banga Ilona: Signification biologique des Enzymes Elastolytiques *Expose's ann. de Biochemie Med.* 24, 156-164, 1963.

3. Hall A. David: Elastase and its Inhibitors. *Expose's ann de Biochemie Med.* 24, 165-180, 1963.

4. Sachard, L. A.; Winter, K.; Sicher, N. and Frankel, S.: Photometric Method for Estimation of Elastase Activity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 90, 323-326, 1955.

5. Walford, R. and Schneider, R.: Serum elastase Inhibitor Levels in animal and Human Sera, including Selected Disease States. *Proc. Sci. Exp. Biol. Med.* 101, 31-34, 1959.

cardiogoxin

DIGOXINA PURISIMA RECRISTALIZADA

AMPOLLAS: 0,5 mg de digoxina en 2 cm³ indistintamente por vía endovenosa e intramuscular.
No requiere dilución previa.

SUPOSITORIOS: 0,5 mg de digoxina y 0,5 g de diprofilina. El agregado de diprofilina, por su acción diurética y cardio-respiratoria, complementa la acción digoxínica.

TABLETAS: 0,25 mg de digoxina.

SIEMPRE

DISPONIBLE

EN

FARMACIAS

LABORATORIOS RIOPLATENSE S. A. C. I. I.