

Metabolismo del ácido araquidónico y actividad de fosfolipasa A₂ en pacientes con artritis reumatoidea

Hermann González, Duane M. Smith, Robert A. Turner

El metabolismo del ácido araquidónico (AA) y la actividad de la fosfolipasa A₂ (FLA₂), fueron estudiados en neutrófilos segmentados (NS) pertenecientes a diez pacientes con artritis reumatoidea (AR), que recibían distintos antiinflamatorios no esteroides (AINE), diez pacientes con AR sin tratamiento con AINE y diez voluntarios sanos. El porcentaje de AA que se metabolizó a leucotrieno B₄ (LTB₄) fue significativamente mayor en los pacientes sin tratamiento que en el grupo control; en los pacientes en tratamiento con AINE se observó una disminución en LTB₄ que no fue estadísticamente diferente del grupo control. La actividad de la enfermedad, medida por parámetros clínicos, mostró correlación con la generación del LTB₄ y la actividad de la FLA₂. Estos resultados preliminares sugieren que un aumento en la actividad de la FLA₂ es, al menos en parte, responsable del aumento de la generación del LTB₄ y que el tratamiento con AINE puede, eventualmente, modificar esta anomalía.

INTRODUCCION

El AA y sus metabolitos pertenecen a un grupo de sustancias conocidas como "eicosanoides", término que incluye: las prostaglandinas (PG), los tromboxanos (TX), los ácidos hidroxí e hidroperoxieicosatetraenoico (HETE, HPETE) y los leu-

cotrienos (LT); se ha demostrado que estos "eicosanoides" afectan diversas actividades metabólicas (1-3), por tanto, pueden ser un factor contribuyente en la patogénesis de las enfermedades inflamatorias; de hecho, PGE₂, PGF₂, TXB₂ y LTB₄ se han encontrado en alta concentración en el líquido sinovial (4, 5), mientras el ácido 5-HETE lo ha sido en el tejido sinovial de pacientes con AR (5). Se han propuestos varios mecanismos para explicar la liberación del AA de los lípidos de la membrana celular, donde normalmente se halla esterificado en los principales fosfolípidos; aunque una fosfolipasa del tipo C puede llevar a cabo esta función, hay suficiente evidencia de que en el neutrófilo humano, es una FLA₂ la enzima predominante (6); cuyo requerimiento de calcio es absoluto y su pH de máxima actividad es neutro.

La AR representa un proceso inflamatorio de gran complejidad con la participación de numerosos tipos de células, incluyendo plaquetas, neutrófilos, macrófagos, linfocitos, fibroblastos, células endoteliales y sinoviales; sin embargo, la acumulación de neutrófilos segmentados (NS) dentro de la articulación, es considerada como una de las características mayores de esta reacción inflamatoria (7).

El presente informe es parte de un proyecto dirigido a establecer el papel de la FLA₂, el AA y algunos de sus metabolitos en la patogénesis de la AR que eventualmente permitirá un enfoque terapéutico mejor fundamentado.

MATERIAL Y METODOS

Pacientes. Todos los pacientes estudiados tenían AR clásica o definida, de acuerdo con los

Dr. Hermann González Buriticá, Fellow en Reumatología; Dr. Duane M. Smith, Ph. D., Instructor en investigación; Dr. Robert A. Turner, Jefe Sección Reumatología, The Bowman Gray School of Medicine of Wake Forest University. Este estudio ha sido financiado por "The Rheumatoid Disease Foundation". Dr. H. González fue parcialmente financiado por la Asociación Colombiana de Reumatología.

Solicitud de separatas al Dr. Hermann González Buriticá.

criterios de la American Rheumatism Association (8). Los diez pacientes en tratamiento con AINE se discriminan así: cinco con naproxen, uno con indometacina, uno con ácido salicilsalicílico, uno con tolmetín sódico, uno con diflunisal y uno con ácido acetilsalicílico. Los pacientes considerados aquí sin tratamiento habían suspendido todo tipo de AINE durante al menos siete días. Los voluntarios del grupo control no estaban recibiendo ningún tipo de medicación.

Las muestras de sangre fueron obtenidas únicamente de quienes lo autorizaron, después de ser informados del propósito del estudio (protocolo aprobado por el Comité Normativo de Investigación Clínica de la Facultad de Medicina Bowman Gray). Con el fin de calcular un índice de actividad de la AR (9), los siguientes datos clínicos y de laboratorio fueron obtenidos: índice articular, velocidad de sedimentación globular, látex para factor reumatoideo, fuerza de prensión y evaluación subjetiva de actividad de la enfermedad por parte del médico y del paciente.

Separación celular. Los NS se obtuvieron por centrifugación diferencial en Ficoll-Hypaque, más del 95 por ciento de las células fueron NS con una viabilidad superior al 95 por ciento según exclusión de azul tripano.

Marcación y metabolismo del AA con H^3 . Los NS fueron incubados por dos horas a $37^\circ C$ con 0.5 uCi de AA- H^3 (Amersham, Arlington Heights, IL). La mitad de las células se estimuló con A23187, mientras la otra mitad se incubó en PBS. Los lípidos se extrajeron por el método de Bligh y Dyer (10).

Actividad de fosfolipasa A2. Se determinó en sonificados de NS midiendo la liberación del ácido oleico marcado con C^{14} de la membrana celular de *E. coli* según se ha descrito (11).

Cromatografía en silica. Los lípidos marcados con H^3 se hicieron cromatografiar en placas de silica H, y los marcados con C^{14} en placas F-254.

Los resultados se expresan como la diferencia en los porcentajes de distribución del radioisótopo en los distintos lípidos, entre las células estimuladas con el movilizador de calcio A23187 menos el control (PBS). La actividad de FLA₂ se expresa

como pMol de sustrato hidrolizado por hora por 10^7 células.

Análisis estadístico. Se hicieron comparaciones entre los grupos de pacientes usando análisis de variancia y coeficientes de correlación para la generación de LTB₄ y la actividad de FLA₂; así como análisis de regresión lineal con sus parámetros clínicos.

RESULTADOS

Los NS de pacientes sin tratamiento generaron significativamente más LTB₄, que los normales (4.8 ± 1.6 y 3.1 ± 1.0 , respectivamente); más interesante aún es la observación de que los NS de pacientes en tratamiento con AINE, generaron menor cantidad de LTB₄, que no es estadísticamente diferente de la producción de los normales; en otras palabras, el tratamiento con AINE produjo una tendencia hacia la normalización en el metabolismo del AA (Figura 1). En la Figura 2 se puede apreciar la relación entre la habilidad para generar LTB₄ y la actividad de FLA₂ de los NS. Aunque la corre-

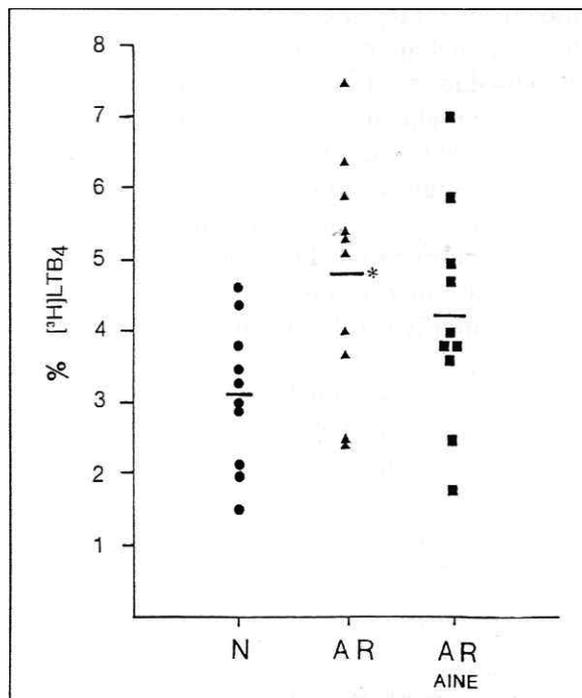


Figura 1. Producción de LTB₄ en el grupo control (N), los pacientes sin tratamiento (AR) y los pacientes en tratamiento (AR-AINE).
* $p < 0.025$

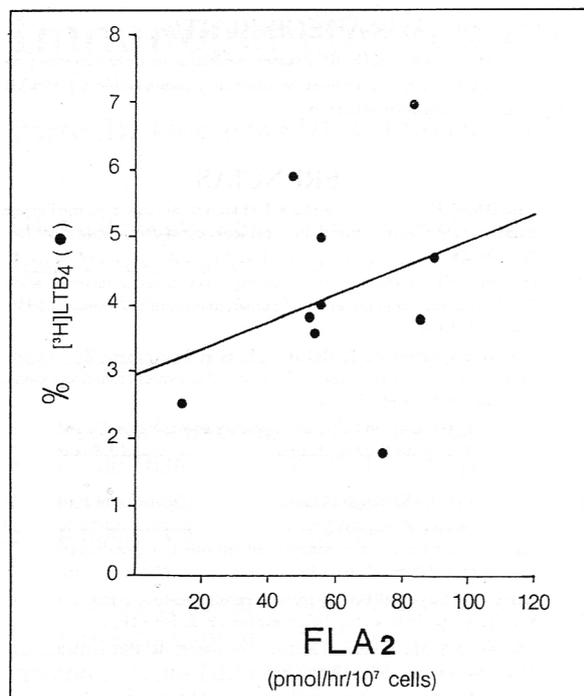


Figura 2. Correlación entre la producción de LTB₄ y la actividad enzimática de FLA₂ ($r:0.31$).

lación es débil, es positiva, indicando que parte del incremento en producción de LTB₄ puede ser debido a hiperactividad de FLA₂

Cuando analizamos si cualquiera de estas dos anomalías bioquímicas tiene su contraparte en las distintas manifestaciones clínicas de la enfermedad, o en el índice de actividad de AR, encontramos correlación positiva entre el índice modificado de actividad reumatoidea y la producción de LTB₄ y la actividad de FLA₂; sin embargo, estadísticamente no es significativa (Figura 3).

DISCUSION

Con el presente estudio hemos demostrado que los NS de pacientes con AR producen más LTB₄ en respuesta al agente movilizador del calcio A23187; también demostramos que algunos AINE pueden modificar esta anomalía.

Varios estudios han sugerido que la acción de los AINE se hace a través de inhibición de la ciclooxigenasa del AA; sin embargo, recientemente se ha sugerido que algunos AINE actúan como agentes bloqueadores del calcio (12), de suerte que

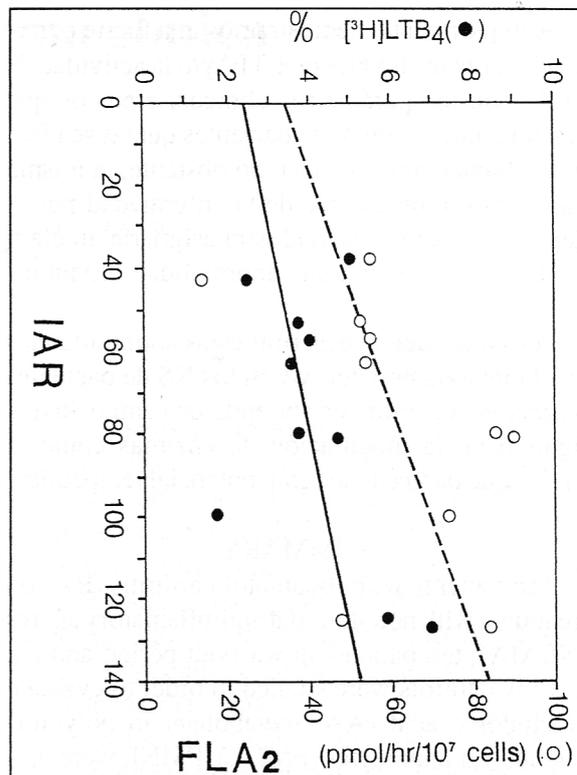


Figura 3. El índice clínico de actividad reumatoidea (IAR) y su correlación con la producción de LTB₄ (—), con la actividad enzimática de FLA₂ (---). ($r:0.49$)

podrían ser inhibidores del metabolismo del AA a un nivel más básico, es decir, bloqueando su liberación de los lípidos de la membrana celular (13, 14); existe todavía la posibilidad de que parte de la acción de estos AINE sea inhibición de la 5-lipoxygenasa, que se sabe es la enzima responsable de la producción de LTB₄.

El NS, como agente efector, parece jugar un papel muy importante en la inmunopatogénesis de la AR, algunas de las acciones que se le han reconocido son las siguientes: capacidad de generar radicales libres de oxígeno, conocidos mediadores de daño tisular y posiblemente de destrucción del cartílago articular (15); producción de los potentes agentes quimioactivos LTB₄ y 5-HETE, responsables de la acumulación de NS en el líquido sinovial reumatoideo (5), y degranulación con liberación de potentes colagenasas y proteasas que "digieren" diferentes componentes de la articulación (2, 3, 16).

Aunque aquí no demostramos una fuerte correlación entre los niveles de LTB₄ y/o la actividad de FLA₂ con los parámetros clínicos, creemos que con un número mayor de pacientes quizás sea factible obtener significancia; no obstante, la misma naturaleza impredecible de la enfermedad puede determinar la incapacidad para asignarle un claro equivalente clínico a una anomalía bioquímica.

Pensamos que al describir estas anomalías en el metabolismo del AA en los NS de pacientes reumatoideos, estamos abriendo un campo investigativo en la modulación de enzimas como la FLA₂, que parece tener gran potencial terapéutico.

SUMMARY

Ten patients with rheumatoid arthritis (RA) on treatment with non steroidal antiinflammatory agents (NSAIA), ten patients in washout period and ten healthy controls were studied in order to evaluate arachidonic acid (AA) metabolism in polymorphonuclear leukocytes (PMNL). PMNL were preincubated in the presence or absence of the Ca ionophore A23187, and the products were separated by thin layer chromatography. The percentage of AA metabolized to Leukotriene B₄ (LTB₄) was significantly higher in RA patients in washout than in controls. LTB₄ in patients on NSAIA was decreased and not significantly different from controls. The activity of RA as evaluated by a modified index, correlated with LTB₄ generation and phospholipase A₂ (PLA₂) activity. These preliminary data suggest that increased PLA₂ activity may, in part, account for the higher generation of LTB₄ by rheumatoid-PMNL and that NSAIA may be capable of modulating this abnormality.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al Dr. RC Franson la realización de los ensayos para FLA₂, a Ms JA Johnson su asistencia en sistemas y computación y a Mrs MJ Strauss la preparación del manuscrito.

REFERENCIAS

1. **Bass DA, O'Flaherty JT, Goetzl EJ, et al.** Arachidonic acid and hexose transport in human polymorphonuclear leukocytes. *Prog Lipid Res* 1981; **20**:735-738.
2. **Stenson WF, Parker CW.** Monohydroxy -eicosatetraenoic acids (HETEs) induce degranulation of human neutrophils. *J Immunol* 1980; **124**:2100-2104.
3. **Hafstrom I, Palmblad J, Malsten CL, et al.** Leukotriene B₄ - a stereospecific stimulator for release of lysosomal enzymes from neutrophils. *FEBS Lett* 1981; **130**:146-148.
4. **Trang LE, Granstrom L.** Levels of prostaglandins F₂ and E₂ and thromboxane B₂ in joint fluid in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheum* 1977; **6**:151-154.
5. **Klickstein LB, Shapleigh C, Goetzl E J.** Lipoxy generation of arachidonic acid as a source of polymorphonuclear leukocyte chemotactic factors in synovial fluid and tissue in rheumatoid arthritis and spondylarthritis. *J Clin Invest* 1980; **66**:1166-1170.
6. **Zurier RB, Sayadoff DM.** Release of prostaglandins from human polymorphonuclear leukocytes. *Inflammation* 1975; **1**:93-101.
7. **Abramson S.** Mechanism of action of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Adv Inflam* 1985; **10**:111-116.
8. **Ropes MW, Bennett GA, Cobb S, et al.** 1958 Revision of diagnostic criteria for rheumatoid arthritis. *Bull Rheum Dis* 1958; **9**:175-176.
9. **Davis JD, Turner RA, Collins RL, et al.** Fenoprofen, aspirin and gold induction in rheumatoid arthritis. *Clin Pharm Therp* 1977; **21**:52-61.
10. **Bligh EG, Dyer WJ.** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959; **37**:911-917.
11. **Franson R, Beckerdite P, Wang M, et al.** Some properties of phospholipases of alveolar macrophages. *Biochem Biophys Acta* 1973; **296**:365-373.
12. **Franson RC, Eisen D, Jesse R, Lanni C.** Inhibition of highly purified mammalian phospholipases A₂ by non-steroidal antiinflammatory agents. Modulation by calcium ions. *Biochem J* 1980; **186**:633-636.
13. **Bomalasky JS, Hirata F, Clark MA.** Aspirin inhibits phospholipase C. *Arthritis Rheum* 1987; **30**:S-37.
14. **González H, Smith DM, Turner RA, Franson RC.** Arachidonic acid metabolism by polymorphonuclear leukocytes in rheumatoid arthritis: effects of NSAIA. *Arthritis Rheum* 1987; **30**:S-37.
15. **Lunec J, Halloran SP, White A, Dormandy TL.** Free radical oxidation (Peroxidation) products in serum and synovial fluid in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1981; **8**:233-245.
16. **Abramson S, Edelson H, Kaplan H, et al.** The neutrophil in rheumatoid arthritis: Its role and the inhibition of its activation by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Semin Arthritis Rheum* 1983; **13**:148-153.