

Centro de Investigaciones Biomédicas

DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ELASTASA Y TRIPSINA EN NIÑOS ASMÁTICOS

Lic. Yoani Albuerne, Lic. Yoryana Vicedo, Lic. Dahis Manzanares, Dra. Ela Céspedes, Dr. Agustín Vicedo, Dra. Rafaela Andino y Dra. Dania Fabr 

RESUMEN

El asma bronquial es una de las enfermedades crónicas que ha presentado un aumento de la mortalidad en Cuba durante los últimos años. Las enzimas proteolíticas han sido implicadas en numerosas enfermedades inflamatorias, entre ellas, el asma. Es por ello que se realizó la evaluación de actividad elastasa y tripsina en muestras de niños asmáticos que se dividieron en 3 grupos (asma ligero, asma moderado y asma severo) y se compararon con un grupo control de niños sanos. Se obtuvieron resultados preliminares muy alentadores que muestran un incremento en los niveles de elastasa en el paciente asmático y una deficiencia de inhibidores de ser n proteasas.

Descriptor DeCS: ASMA/enzimología; PEPTIDO HIDROLASAS/ analisis; PANCREATO PEPTIDASA/ analisis; ALFA-1-ANTITRIPSINA/ analisis; NIÑO; DEFICIENCIA DE ALPHA-1-ANTITRIPSINA.

El asma es una enfermedad respiratoria recurrente, de evolución crónica y de distribución universal que se presenta tanto en la población pediátrica como adulta. Puede ser incapacitante por su severidad y en ocasiones causar la muerte.^{1,2}

El asma bronquial es una de las enfermedades que ha generado discusión a la hora de definirla. Se habla en términos de obstrucción de las vías aéreas y de un de-sorden inflamatorio crónico de estas donde muchas células desempeñan un papel importante como son las cebadas, los eosinófilos y los neutrófilos. Estos últimos muy relacionados con la actividad proteolítica.³

Los mecanismos productores de la en-

fermedad continúan siendo desconocidos. La falta de una teoría global que explique las alteraciones fisiopatológicas que se producen durante la enfermedad ha posibilitado el desarrollo de múltiples teorías donde la inflamatoria ha primado.⁴

Durante el tránsito de la enfermedad se produce un aumento de la fluidez y permeabilidad de las membranas que provoca fragilidad celular y lisosomal, y conduce al vertimiento de las enzimas citoplasmáticas y lisosomales al líquido intersticial. Entre estos productos lisosomales aparece la elastasa como parte del proceso inflamatorio que es capaz de

atacar las biomoléculas del parénquima pulmonar. Esta enzima al igual que otras serán proteasas es inhibida por la alfa 1 antitripsina, inhibidor muy sensible al daño oxidativo. La oxidación que provocan las especies reactivas del oxígeno a esta proteína hace que pierda su capacidad de unión a las enzimas proteolíticas.^{5,6}

Desde hace muchos años se sabe que el asmático expectora conglomerados de células epiteliales (cuerpos de Creola) y que en las necropsias o biopsias se encuentra lesión del epitelio como un dato constante. Esta lesión está condicionada principalmente por enzimas proteolíticas liberadas por las células inflamatorias. Así la lesión del epitelio es capaz de provocar hiperreactividad de las vías aéreas y favorecer la inflamación mediante la liberación de factores quimiotácticos, proliferadores o activadores celulares, a la vez que disminuye la influencia inhibitoria del epitelio sobre músculo liso y linfocitos.⁷⁻¹⁰

Es preciso un mayor conocimiento de los mediadores y sus acciones en el asma, para establecer para cada uno de ellos los cambios fisiopatológicos que ejercen en esta enfermedad, y poder cuantificarlos en fluidos biológicos durante esta.

CLASIFICACIÓN

Asma ligero: síntomas breves, menos de 2 crisis en la semana, síntomas nocturnos menos de 2 veces al mes. Asintomático entre las exacerbaciones.

Asma moderado: 2 ó más crisis en la semana. Síntomas nocturnos más de 2 veces al mes. Requerimientos de agonistas β_2 inhalados casi a diario.

Asma severo: Exacerbaciones frecuentes. Síntomas continuos, asma nocturna fre-

cuente. Actividad física limitada. Hospitalización en el año anterior. Exacerbaciones previas en las que peligró la vida.¹¹

MÉTODOS

La determinación de la actividad elastasa es una modificación al método referido por Perlmann en 1970.¹² Se basa en la determinación colorimétrica de la digestión de la elastasa sobre el sustrato de elastina coloreada. Para este propósito como sustrato y como medida general de actividad proteolítica se utilizó la elastina rojo congo.

La reacción transcurre en *buffer* borato a pH = 8,8 donde es estable la enzima. La absorbancia fue medida a 492 nm en un sistema ultramicroanalítico de ensayo (SUMA).

La determinación de actividad inhibitoria de tripsina es una modificación a la técnica de *Barnett y Kirschke* en 1981.¹³ La azocaseína ha sido usada como sustrato. Después de la incubación de la proteasa con azocaseína, el sustrato no degradado es precipitado con TCA y la absorbancia del cromóforo que contiene péptidos en el sobrenadante de TCA a 450 nm brinda una medida de la degradación del sustrato por la proteína. La reacción ocurre en mayor o menor medida en dependencia de los inhibidores presentes en la muestra de suero.

RESULTADOS

El paciente asmático presenta un incremento en los niveles de elastasa (fig. 1) y una deficiencia de inhibidores de serín proteasas como la alfa 1 proteasa inhibidor (fig. 2).

DISCUSIÓN

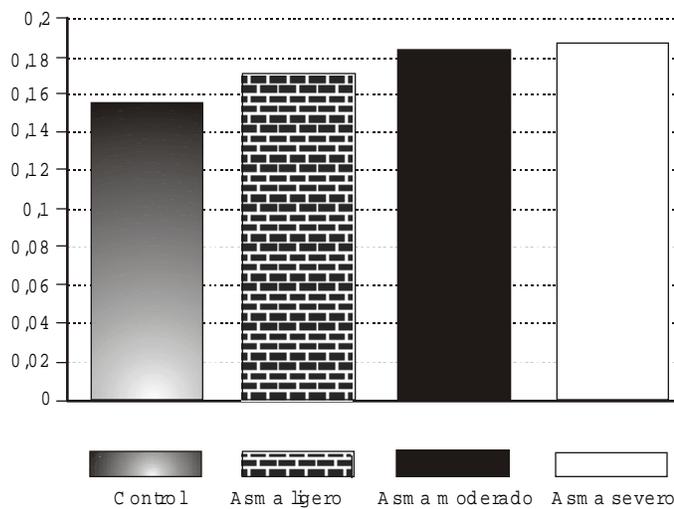


Fig. 1. Actividad elastasa en niños asmáticos.

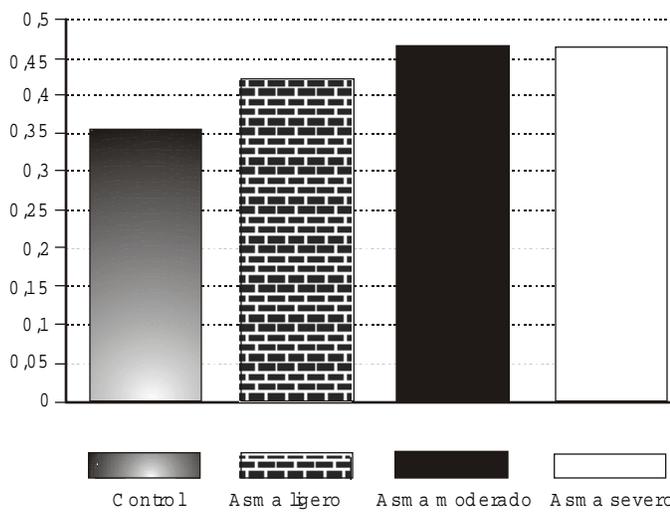


Fig. 2. Actividad tripsina en niños asmáticos.

Como se muestra en la figura 1 de la actividad elastasa, esta aparece incrementada en los pacientes asmáticos con respecto a los controles y depende de la gravedad de la enfermedad, pues las diferencias mayores entre control y enfermo se aprecian en los asmáticos severos. Esto

reafirma lo reportado por la literatura en cuanto a un incremento de la liberación de dicha enzima durante el tránsito de la enfermedad, ya sea porque se vierte mayor cantidad al líquido intersticial o por deficiencia de alfa 1 inhibidor. La deficiencia de alfa 1 proteasa inhibidor se puede comprobar al observar los resultados obtenidos

en la técnica de inhibición de tripsina, donde la actividad de tripsina es superior en los enfermos que en los controles; esto indica deficiencias de inhibidores en los pacientes asmáticos, pues ellos son los encar-

gados de regular la actividad proteolítica tanto de la elastasa como de la tripsina, por lo que los resultados obtenidos se relacionan entre sí.

SUMMARY

Bronchial asthma is one of the chronic diseases, whose mortality has increased in Cuba during the last years. The proteolytic enzymes have been involved in numerous inflammatory diseases as asthma, among them. That's why the elastase and trypsin activity was evaluated in samples of asthmatic children, who were divided into 3 groups (mild asthma, moderate asthma and severe asthma) and compared with a control group of sound children. Very encouraging preliminary results were obtained that showed an increase in the levels of elastase in the asthmatic patient and a deficiency of serine proteases inhibitors.

Subject headings: ASTHMA/enzimology; PEPTIDE HYDROLASES/analysis: PANCREATOPEPTIDASE/analysis; ALPHA 1-ANTITRYPSIN DEFICIENCY.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sheffer AL. International consensus report on the diagnosis and management of asthma. *Rev Alergia Mex* 1995;94:1-4.
2. Barnes PJ. Air pollution and asthma: molecular mechanisms. *Molecular Medicine Today* 1995;1(3):149-55.
3. CIBA Foundation Study Group 38: Identification of Asthma. Birch J, Curchill L. eds Porter R, London: Churencill L. 1971:1-5.
4. Barnes PJ. Reactive oxygen species and airway inflammtion. *Free Radic Biol Med* 1990; 9:235-43.
5. Woolsock AJ. asthma- what are the important experiments. *State of the Art. Am Rev Respir Dis* 1988;138:730-44.
6. Barnes PJ. New Concepts in the pathogenesis of bronchial hyperresponseveness and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1989;83:1013-26.
7. Beasley R, Roche W, Holgate ST. Inflammatory processes in bronchial asthma. *Drugs* 1989;37:117-22.
8. Kalimer M. Asthma and most cell activation. *J Allergy Clin Immunol* 1989;83:510-20.
9. Flenley DC. What should and ideal antioxidant do (and not do). *Bull Eur Physiopatol Respir* 1987;28:279-85.
10. Cartin A, Crystal RG. Oxidants, antioxidants and the pathogenesis of emphysema. *Eur J Respir Dis* 1985;66:7- 17.
11. Consenso Latinoamericano sobre diagnóstico y tratamiento del asma. *Rev Alergia Mex* 1994;4:2-12.
12. Perlmann GE, Lorend L. *Methods Enzymology*. Vol XIX. En JK, eds *Proteolitic Enzymes*. London: Academic Press, 1970:665-73.
13. Barnett AJ, Kirschkett H. *Methods Enzymology Vol II in Proteolitic Enzymes*. London: Academic Press. 1981:26-36.

Recibido: 3 de abril del 2000. Aprobado: 21 de junio del 2000.

Lic. *Yóani Albuerne*. Centro de Investigaciones Biomédicas. Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón". Avenida 146 No. 3102 esquina a 31, reparto Cubanacán, municipio Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. CP 11600.