

11244
24
①

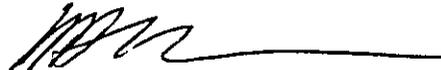
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA
IGNACIO CHAVEZ**

**LA INFLAMACION REUMATOIDE
FERRITINA INTRASINOVIAL
Y LA MODULACION DEL
PROCESO**


Director de Tesis

DR. PEDRO A. REYES


Director del Curso

DR. MANUEL MARTINEZ LAVIN


Jefe de Enseñanza

DR. IGNACIO CHAVEZ RIVERA

TESIS RECEPTACIONAL

Que para obtener el Título de
ESPECIALISTA EN REUMATOLOGIA
Presenta la Dra.

EGLB ALICIA DELGADO VALLEJO

México, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1985



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Temario

1 INTRODUCCION	3
2 INFLAMACION	5
2.1 Patogenia	8
2.2 Superóxidos	12
2.3 Anemia e inflamación	15
3 EL FIERRO Y SUS PROTEINAS TRANSPORTADORAS	18
3.1 Generalidades	18
3.2 Ferritina: Estructura y Función	21
3.2.1 Estructura de la ferritina	22
3.2.2 Almacenamiento y Movilización del Hierro en la Ferritina	29
3.2.3 Biosíntesis y Metabolismo de la Ferritina	34
3.2.4 Ferritina Sérica: Usos Diagnósticos	35
3.3 Sobrecarga de Hierro, Activación de Oxígeno y Daño Tisular	37
4 HIPOTESIS DE TRABAJO	42
5 MATERIAL Y METODOS	47
6 RESULTADOS	50
7 DISCUSION	52

En base a lo anterior, es pertinente revisar los temas de inflamación, y el hierro y sus proteínas transportadoras, con especial énfasis en la ferritina. Después se expondrá la hipótesis de trabajo, el material y métodos, los resultados y por último la discusión.

Este trabajo fue realizado en conjunto y bajo la dirección del Dr. Pedro Reyes López, jefe del departamento de Inmunología del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, y el Dr. Xavier López Karpovitch, del departamento de Hematología del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.

substancias en el sitio de la inflamación que producen dolor. Sin embargo, cada diferente tejido y estímulo puede resultar en una diferente mezcla de estos elementos, tiempo de evolución y resultado.

El proceso inflamatorio también está influido por el estado nutricional y hormonal del individuo, así como por factores genéticos. Aún más, los diferentes procesos que comprende la inflamación representan una extensa red de mecanismos, mediadores y células que interactúan entre sí. Esto provee un mecanismo amplificador y preservador de la respuesta si uno de los componentes está deficiente o inactivo; así también ciertos elementos son esenciales, como por ejemplo, las deficiencias en la función de neutrófilos resultan en respuesta inflamatoria defectuosa, lo que puede ser letal.

Todo esto sugiere que la inflamación es una reacción benéfica de los tejidos contra la lesión; de hecho, normalmente lleva a la erradicación del agente causal y a la reparación del tejido lesionado. Esto puede significar malestar y pérdida de la función temporales, pero finalmente es protector. En otras ocasiones, como en algunas enfermedades humanas, la reacción inflamatoria es continua, descontrolada, como en la artritis reumatoide, o bien produce destrucción tisular permanente (ej.: enfisema), o cicatrización con depósito inadecuado de colágena, como en la cirrosis hepática.

Aunque la inflamación es una respuesta inespecífica, existen grupos de sustancias químicas (mediadores) que son el común denominador, y cuya activación y/o liberación evocan todos los fenómenos que suceden en la inflamación; así, intervienen en el aumento del flujo sanguíneo, la permeabilidad vascular, y emigración de células inflamatorias de la sangre; al llegar estas al sitio de la lesión, las células son estimuladas para fagocitar bacterias y detritus y para secretar muchas de sus enzimas preformadas o sintetizadas en ese momento.

Todas estas reacciones están controladas por sistemas de retroalimentación positivas y negativas a través de mediadores y estos también intervienen en la resolución y cicatrización del proceso inflamatorio. Los mediadores o autacoides, no solo son los producidos por el organismo, sino que hay ciertos productos bacterianos y toxinas que también tienen esta función.

Existen tres sistemas amplificadores plasmáticos que producen mediadores, las cininas, el de la coagulación y el complemento; otros mediadores son productos celulares que pueden estar preformados y almacenados en gránulos (como la histamina en las células cebadas), o son sintetizados de novo (interleucina 1, leucotrienos, mediadores lipídicos como los eicosanoides o derivados del ácido araquidónico). Muchos mediadores producen el mismo efecto, pero es probable que su importancia dependa del tejido lesionado y del agente causal. De la misma forma, algunos mediadores tienen más de un efecto en la inflamación.

3.1. Patogenia

Central en el desarrollo del proceso inflamatorio es la vasodilatación, ya que el flujo sanguíneo local determina en gran parte la cantidad de exudado producido. Son muchos los mediadores que intervienen en la vasodilatación, entre ellos la histamina y varios eicosanoides, aunque los mecanismos no están aún bien entendidos, se sabe que las prostaglandinas PGE2 y PGI2 inducen vasodilatación, y se han detectado en exudados inflamatorios, además se ha observado que a concentraciones fisiológicas pueden potenciar el efecto de histamina y bradicinina. Este último efecto también lo ejercen los quimiotácticos leucotrieno B4 (LTB4), fragmentos de las proteínas del complemento, C5, y la N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP).

Por otro lado, el tromboxano A2, también producto del sistema de la ciclooxigenasa, tiene actividad vasoconstrictora. Sin embargo, el efecto global de estos mediadores es difícil determinarlo ya que las prostaglandinas pueden tener efectos diferentes de acuerdo a su concentración y al tejido en el que estén actuando. Estas dos condiciones pueden determinar si su efecto será pro o antiinflamatorio.

Durante el proceso inflamatorio, hay aumento en la permeabilidad vascular en por lo menos dos fases:

a) una fase temprana, inmediatamente después de la lesión, y b) una fase tardía que inicia después de un periodo latente, variable, pero que dura horas e incluso días.

La histamina es la responsable de la primera fase; su fuente principal son las células cebadas y los basófilos. Las células cebadas tisulares se localizan alrededor de los vasos sanguíneos y esto explica que los efectos sean tan locales. Son varios los estímulos que producen liberación de histamina, como: sustancias de bajo peso molecular, agentes físicos, varias drogas, IgE y otras reacciones inmunológicas, anafilatoxinas (C3a y C5a), y productos del metabolismo del ácido araquidónico. Así por ejemplo, el ácido 5-hidroxi-peroxieicosatetranóico (5-HPETE) en concentraciones diferentes produce o inhibe la liberación de histamina.

La fase tardía es más compleja y se atribuye al efecto de cininas, prostaglandinas, neutrófilos y productos del sistema de lipooxigenasa. La generación de la bradicinina es compleja; primero, el factor de Hageman es activado por contacto con una superficie electronegativa, y también es activado por kalikreína, la cual a su vez rompe el kininógeno para liberar así bradicinina. Las cininas son rápidamente inactivadas en el plasma y tejidos por cininasas, y en la circulación son

inactivadas casi completamente al paso por el pulmón (por acción de la enzima convertidora de la angiotensina). Estos son algunos de los mecanismos de control generales de los mediadores de la inflamación pero algunos estados patológicos pueden alterarlos y perpetuar la lesión (ej.: la hipoxia impide la inactivación de la bradicinina en el pulmón).

Otros mediadores que aumentan la permeabilidad vascular son el factor activador plaquetario (FAP) producido por neutrófilos y células mononucleares, fibrinopéptidos, productos de degradación de la fibrina, linfocinas, las anafilotoxinas C3a y C5a (estas últimas quizás en forma indirecta al producir liberación de histamina y/o quimiotaxis), y productos de neutrófilos como los leucotrienos y los radicales oxígeno tóxicos que ciertamente aumentan la permeabilidad endotelial.

Al aumentar la permeabilidad vascular se produce el exudado inflamatorio del cual el infiltrado celular es muy importante como se verá. Al principio predominan los neutrófilos y después los mononucleares.

Se conocen con actividad quimiotáctica fragmentos de los componentes del complemento (C3a y C5a), linfocinas, fragmentos de fibronectina (atraen monocitos), moléculas eosinofilotácticas de las células cebadas, LTB₄, FAP, así como productos bacterianos. De los quimiotácticos más potentes para los neutrófilos es C5a, generado por acción proteolítica de varias

substancias sobre C5 (C5 convertasa, plasmina, tripsina, kalikreina, proteasas bacterianas y la enzima lisosomal elastasa de neutrófilos y plaquetas). El fragmento C5a, glucoproteína de 73 aminoácidos, al igual que C3a es espasmógeno, liberador de histamina y potente quimiotáctico. Se sabe que los leucocitos polimorfonucleares poseen en promedio 200 000 receptores para C5a en su membrana. La unión de C5a a la membrana produce activación celular y movimiento orientado, seguido de internalización del complejo C5a-receptor y su digestión en los fagolisosomas; así mismo induce generación de radicales libres de oxígeno y exocitosis de los gránulos de los neutrófilos.

C3a y C5a dependen de la presencia de arginina (Arg.) carboxiterminal para su actividad biológica espasmogénica. Una enzima plasmática, la carboxipeptidasa N, rompe la unión de arginina e inactiva C3a y C5a, de tal forma que pierden su capacidad de contraer el músculo liso y de unirse a células cebadas, pero no anula la actividad quimiotáctica de C5a; C5a desArg. estimula la secreción de los fagocitos mononucleares y es más potente quimiotáctico que C5a. Los fragmentos de C5 no solo atraen neutrófilos, sino que también monocitos, eosinófilos y basófilos.

Como se sabe bien, una característica central del proceso inflamatorio es la infiltración celular en los tejidos lesionados. Esto ocasiona daño tisular por medio de liberación de las enzimas lisosomales y de producción de radicales libres de

oxígeno; estos últimos tienen particular interés para el tema de este trabajo, y se hablará de ellos más adelante.

Las células que predominan en el infiltrado temprano son los leucocitos polimorfonucleares, y más tarde los mononucleares; ambos contienen lisosomas con varios mediadores que producen inflamación. Estas enzimas lisosomales y proteasas son secretadas durante la fagocitosis o cuando estas células son estimuladas por superficies muy grandes para ser ingeridas (fagocitosis frustrada); también los mismos quimiotácticos inducen secreción de enzimas y radicales libres de oxígeno. De las enzimas lisosomales, las proteasas neutras actúan a pH neutros u alcalinos, pueden regular la respuesta inflamatoria, contribuyen a la destrucción tisular, y permiten que los leucocitos emigren a la lesión a través de la membrana basal. Entre las proteasas neutras se cuentan a las colagenasas, elastasa serina (de neutrófilos y monocitos), la metalo-elastasa de macrófagos y la catepsina G. Las proteasas ácidas funcionan principalmente en lisosomas para digerir el material fagocitado.

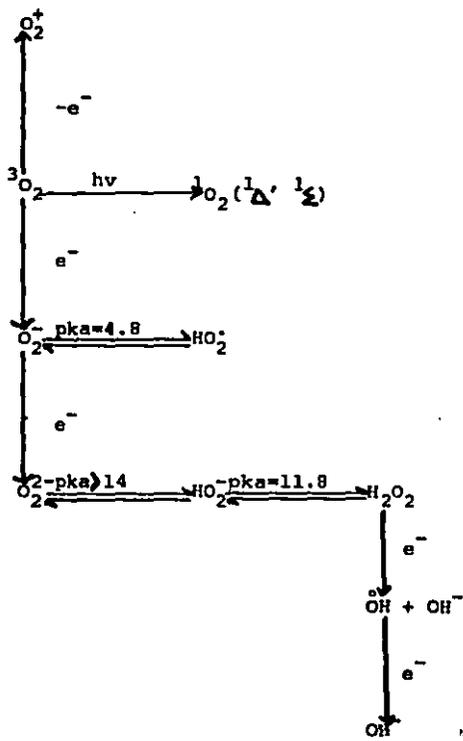
2.2. Superóxido

Como describió el Dr. Irwin Fridovich, como Jano, el oxígeno tiene dos caras, una benéfica y una perjudicial. Sin el O_2 molecular, todos los animales y la mayoría de las plantas

moririan, pero puede ser muy tóxico para los sistemas biológicos a través de sus productos al sufrir reducción; estos últimos, por otro lado, son altamente bactericidas. Los radicales O_2 pueden modificar estructuras protéicas, por ejemplo la de la alfa 1 antitripsina, inhibidora de proteasas. Mucho del daño temprano en la inflamación así como parte del aumento en la permeabilidad vascular se atribuye a estas moléculas.

Es interesante ver porqué los radicales libres de oxígeno son tan tóxicos y eso lo podemos entender si revisamos su estructura molecular.

Los radicales libres de oxígeno son moléculas con electrones no apareados en la órbita terminal; estos electrones tienden a parearse y son reactivos con electrones del ambiente por ejemplo con grupos SH de las proteínas, lo cual resulta en modificación estructural de dicha proteína, o bien con lípidos y forman endoperóxido. Normalmente existe algún grado de reducción biológica del oxígeno por la vía monovalente y necesariamente se producen primero: radicales superóxidos (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y después, si estos no son totalmente eliminados, se producen radicales hidroxilo (OH^\cdot) y oxígeno "singlet" (1O_2).



Todas estas sustancias son reactivas y por lo tanto tóxicas para las células; especialmente el radical OH es sumamente reactivo, y ya que es el tercer intermediario de la vía

monovalente, su producción puede evitarse si se eliminan los primeros dos (O_2 y H_2O_2). El O_2 es eliminado por dismutasas de superóxidos y H_2O_2 por catalasas y peroxidasas. Obviamente el tema es muy extenso y complejo, y desborda los límites de este trabajo, será necesario continuar con otra orientación, remitiendo al lector interesado a referencias específicas (16).

De los elementos que en forma importante pueden participar en la activación del oxígeno molecular se cuentan al fierro (Fe) y al cobre, ya que son los que abundan en los sistemas biológicos. De ellos, el Fe y su papel en la inflamación son de interés central para el tema de esta tesis.

La activación del O_2 por el Fe es un mecanismo fisiológico normal, así por ejemplo, en el caso de la citocromo oxidasa, la enzima terminal de la cadena transportadora de electrones, reduce el oxígeno molecular a agua usando Fe y cobre. En condiciones patológicas asociadas a sobrecarga de hierro, primaria o secundaria, muchos de los efectos observados se deben a reacciones de radicales libres de oxígeno que resultan de alteración en la regulación de la activación del O_2 .

2.3. Anemia e inflamación

La anomalía en el metabolismo del Fe asociada a inflamación está bien documentada. Se caracteriza por un bloqueo en la liberación del Fe de los tejidos, lo cual resulta en disminución del Fe sérico y de la saturación de la transferrina, y por lo tanto hay eritropoyesis deficiente en Fe manifestada por eritrocitos con poca hemoglobina y concentraciones aumentadas de protoporfirina. De la misma manera, está impedida la liberación del Fe proveniente del catabolismo de la hemoglobina en las células del tejido retículo-endotelial.

La supresión de la liberación del hierro de los tejidos es un común denominador de varias entidades clínicas en las que hay inflamación: infecciones, enfermedades del tejido conjuntivo, enfermedades proliferativas y lesiones traumáticas; en todas la consecuencia es *anemia normocítica normocrómica*, con Fe sérico y capacidad de saturación de la ferritina bajos. Es razonable asumir que el efecto de estas enfermedades en el intercambio del Fe es una vía final común que es parte de un patrón general de respuesta sistémica a la inflamación.

El aumento en la síntesis de ferritina (FET) es la responsable de que el Fe "labile" (es decir, el Fe en depósitos accesibles para uso metabólico) sufra un cambio en su metabolismo, se vaya a los depósitos de ferritina y por consiguiente está menos disponible para poder ser liberado por los tejidos al plasma.

Konijn y cols. han demostrado que el aumento en la síntesis de

FET es una respuesta inespecifica primaria que es parte de los efectos sistémicos de la inflamación (reactante de fase aguda); y que este aumento en la síntesis de FET no es el resultado de un bloqueo en la liberación del Fe precedente, como se pensaba antes, sino que es el evento primario y es el responsable de la retención del Fe en los tejidos.

Estos autores estudiaron el mecanismo del aumento de la síntesis de FET en el hígado y bazo de ratas durante las primeras 48 hs. de inflamación producida por turpentina intramuscular. Demostraron que el aumento en la síntesis de FET precede a los cambios en el intercambio del Fe plasmático; así, a las 4 hs. la síntesis de FET era el doble de lo normal y el Fe plasmático no había sufrido cambios. A las 12 hs., encontraron la máxima reducción del hierro plasmático y la síntesis de FET había ya disminuido al nivel normal.

EL FIERRO Y SUS PROTEINAS TRANSPORTADORAS

3.1. Generalidades

QUIMICA DEL FIERRO. En solución acuosa, el Fe tiene acceso a dos estados de oxidación estables: el ferroso (Fe (II)) y el férrico (Fe (III)). Esta propiedad señala la participación del Fe en gran cantidad de reacciones bioquímicas incluyendo las que controlan el flujo de electrones a través de vías bioenergéticas; la activación del O_2 molecular, nitrógeno e hidrógeno; la descomposición de derivados tóxicos del O_2 tales como peróxido y superóxido; la síntesis de DNA; y la incorporación de O_2 a la hemoglobina, mioglobina y hemeritinas.

Neilands ha dicho que *LA VIDA, EN CUALQUIER FORMA, SIN FIERRO ES IMPOSIBLE.*

A pH fisiológico, se favorece la auto-oxidación del Fe(II), y la forma fisiológicamente estable es Fe(III). Sin embargo, la química del Fe(III) libre a pH fisiológico está dominada por la hidrólisis del Fe(III) que da hidróxidos y oxihidróxidos férricos

insolubles.

En vista de la enorme importancia del Fe como componente de varias enzimas y de la toxicidad debida a su potencial para la formación de radicales libres de oxígeno, los sistemas biológicos han desarrollado mecanismos para almacenar y transportar Fe en su estado trivalente soluble, fisiológicamente estable. En la mayoría de los organismos estas funciones las cumplen las transferrinas y la FET, que son las proteínas transportadoras y almacenadora respectivamente del metabolismo del hierro.

TRANSFERRINA. Las transferrinas son un grupo de proteínas de cadena simple que tienen dos sitios específicos para unir hierro; están ampliamente distribuidas en las células y líquidos de los vertebrados. Algo muy característico de las transferrinas es la asociación de que para combinarse con el metal requieren unir aniones.

Se han descrito tres tipos de transferrinas, y cada una fue descubierta antes de que se reconociera que tienen características en común. Así, la transferrina sérica es la mejor conocida de este grupo y se le llama también serotransferrina o siderofilina. La lactoferrina es la proteína transportadora de Fe en la leche, lágrimas y leucocitos, también se conoce como lactotransferrina; y la ovotransferrina, también llamada conalbúmina.

La transferrina puede unirse a un máximo de 2 átomos g. de Fe

por molécula. Los átomos de Fe de la transferrina son captados por receptores de membrana en las células eritroides inmaduras, y presumiblemente en otros tejidos.

La transferrina con 1-2 átomos g. de hierro por molécula, con un peso molecular de 80000, se une a receptores específicos en la membrana plasmática de las células. El siguiente paso es discutible pero puede ser explicado por la interiorización de una porción de la membrana plasmática, que contiene a la transferrina unida, por medio de endocitosis, seguida por la fusión de la vacuola endocítica con un lisosoma para formar un fagosoma.

El pH ácido (aproximadamente de 4.5) en el interior del fagosoma debe facilitar la liberación del Fe de la transferrina y el Fe podría ser asimilado por un agente quelante de bajo peso molecular (como el citrato) o por FET lisosomal. La apoferritina entonces sería regresada a la membrana plasmática asociada a su receptor y liberada para usarse de nuevo. El Fe después es almacenado en la célula en la FET.

El contenido corporal total de Fe de un adulto humano es aproximadamente 3 g., siendo un poco mayor en el sexo masculino. Un 65% se encuentra en la hemoglobina circulante y 10% en los tejidos, principalmente en forma de mioglobina, pequeñas cantidades en los citocromos de las mitocondrias y en enzimas que contienen Fe como la catalasa. El resto del Fe, 20%, está almacenado en dos formas: una forma soluble en agua (ferritina) y

una insoluble (hemosiderina).

Se calcula que el promedio de los depósitos de Fe son 1000 mg. en el sexo masculino y 400 mg. en el femenino. Esta diferencia con respecto al sexo se refleja en la cantidad de FET circulante en el plasma, lo que confirma la utilidad de la FET sérica como medida de los depósitos de hierro en el organismo.

En la mayoría de las células la FET tiene dos funciones:

1) Como un medio de mantener una reserva de FE almacenado en la célula para uso en la síntesis de enzimas que contienen FE, y

2) Como un mecanismo detoxificador que permite mantener al Fe en una forma soluble dentro de la célula.

Esto junto con las observaciones de que la FET forma parte de las proteínas llamadas reactantes de fase aguda en la inflamación, indican el interés del estudio de la ferritina.

3.2. Ferritinas Estructura y Función

Laufberger en 1937 describió a la ferritina como una entidad química, la principal proteína almacenadora de hierro.

La capacidad de las células para sintetizar FET parece ser que

se desarrolló temprano en la evolución de las especies. La FET aparece primero como una entidad característica identificable en los hongos (microferritina). La FET es un componente de las células de las plantas (fitoferritina). Entre los animales se ha identificado FET en los tejidos de lombrices, anélidos, crustáceos, insectos, pescados, anfibios y mamíferos.

En los mamíferos, son especialmente ricos en FET el hígado, el bazo y la médula ósea, aunque puede encontrarse en todos los tejidos, incluyendo células tumorales, en el suero y células sanguíneas circulantes.

Es probable que la capacidad de sintetizar FET sea universal, como parte del equipo biológico de las células para utilizar el Fe sin estar expuestas a los efectos tóxicos del Fe en forma iónica. Así, la célula acumula una reserva de Fe almacenado en forma de FET que no inactiva las proteínas intracelulares y conserva el Fe(III) en forma soluble y accesible.

3.2.1 Estructura de la ferritina

La ferritina mejor estudiada es la del bazo del caballo. Consiste de un "armazón" protéico hueco casi esférico (apoferritina) y del corazón o centro férrico.

La apoferritina tiene un peso molecular de 430 000 a 490 000 daltons. Hoare y cols., usando el método de difracción de rayos X han podido estudiar la estructura general y las dimensiones de

la apoferritina. De este modo, este esqueleto proteico está compuesto de 24 subunidades dispuestas en forma simétrica; tiene una cavidad central con diámetro de 70-80 Å y el diámetro externo es de 120-130 Å.

La movilización del Fe se da a través de 6 canales de 10 Å de diámetro que atraviezan la molécula. La estructura es muy compacta, lo cual puede explicar su gran termoestabilidad.

Cada subunidad está compuesta de cuatro alfa-hélices largas dispuestas en 2 pares antiparalelos y una hélice corta, algo perpendicular a estas y bordeando los canales. Tienen un asa expuesta que conecta a los 2 pares de cilindros helicoidales y que puede ser el sitio susceptible al ataque proteolítico (Figura 2).

Así, la subunidad es casi un cilindro con un peso molecular de 19 000 daltons, un diámetro de 27 Å y longitud de 55 Å, con alfa-hélices paralelas a la longitud.

Las 24 subunidades se encuentran dispuestas de tal forma que el esqueleto proteico contiene dos capas de alfa-hélices perpendiculares al vector radial. Casi 2/3 partes de la cadena polipeptídica tienen una conformación alfa-helicoidal y esta es mayor en la apoferritina que en la holoferritina (apoferritina + Fe), lo cual sugiere que hay cambios en la conformación de la FET al incorporar esta Fe.

Las 24 subunidades están dispuestas simétricamente formando una molécula casi esférica.

Hay tres aminoácidos (Leu, Gli, Ala), que son básicos en la conformación alfa-helicoidal, que comprenden casi el 40% de los aminoácidos de la mayoría de las FET. Además, la FET tiene un alto contenido de aminoácidos no polares; esto explica su solubilidad en solventes de baja constante dieléctrica y la disposición aparente de gran número de residuos en el interior de la molécula con varios contactos a través de los ejes dobles.

Crichton y cols. han propuesto características detalladas de la estructura de la subunidad. La mayoría de la tirosina y el triptófano se encuentran en la interfase hidrofóbica entre las subunidades, junto con lisina y arginina, en donde forman uniones sal con los grupos carboxilo de los aminoácidos dicarboxílicos presentes en la superficie opuesta de la subunidad. Las cadenas laterales carboxilo en la superficie interna son esenciales para la capacidad catalítica de la FET para oxidar el Fe, no así las cadenas laterales de lisina y cisteína.

Varios estudios indican que la FET puede contener carbohidratos; esto lo sugiere también el hecho que la FET sérica se une a sefaroza de concanavalina A. Las propiedades inmunológicas y metabólicas de esta proteína pueden estar influenciadas por su contenido de carbohidratos.

EL CENTRO FERRICO. En la cavidad central de la FET puede

almacenarse el Fe inorgánico. Cada molécula de FET puede acomodar por lo menos 2500 átomos de hierro. Se ha sugerido que en la FET llena de Fe, la forma de la micela de Fe es dada por la forma de la cavidad de la proteína.

El Fe se encuentra como fosfato óxido férrico hidratado polinuclear alrededor de los centros de Fe de la FET y de los complejos de Fe-dextran. Los centros de oxihidróxido férrico que carecen de las moléculas de fosfato pueden ser liberados por desnaturalización proteica con cloruro de guanidinio, álcali, ácido acético o con sulfato dodecil sódico, y estos centro tienen propiedades similares a los de la hemosiderina.

El centro férrico de la FET ha sido estudiado por varios métodos físicos incluyendo difracción electrónica y de rayos X, medidas de susceptibilidad magnética, análisis estructural fino por absorción de rayos X, resonancia electrónica, espectroscopia de Mossbauer y dispersión de neutrones, entre otros. Los centros férricos de la FET se ven estructuralmente diferentes de algunos de los óxidos u oxihidróxidos férricos más comunes, pero son similares a las moléculas de Fe de la hemosiderina.

Los centros de óxido férrico hidratado de la FET están dispuestos en celdillas hexagonales simples de un tamaño aproximado de 2.9 Å y sus múltiplos.

PREPARACION DE LA FERRITINA. La gran estabilidad de la FET a temperaturas elevadas y a substancias desnaturizadoras permite

que la proteína se aisle con cierta facilidad para su estudio. En los métodos de purificación de FET, se calienta la muestra a 70-75 °F para desnaturalizar otras proteínas e inactivar proteasas endógenas. Más adelante, en el capítulo de Material y Métodos hablaremos de una de las formas de analizar FET.

ESPECIFICIDAD TISULAR Y ESPECIES. ISO-FERRITINAS. La mayoría de las FET aisladas son una mezcla de dos componentes: la *apoferritina natural* y *moléculas que contienen cantidades variables de Fe.* El contenido de Fe varía con el estado metabólico del tejido del que se aísla.

Características constantes en casi todas las FET son: contenido de aminoácidos, tamaño, distribución de las subunidades y su estructura cuaternaria, morfología en micrografía electrónica, reactividad de las cadenas laterales, estabilidad de la estructura secundaria y dominios de las interacciones subunidad-subunidad.

Las FET de diferentes tejidos y de algunas especies diferentes muestran reactividad inmunológica cruzada.

Las FET de diferentes tejidos en una misma especie pueden tener diferencias en su contenido de aminoácidos y en su mapa peptídico. Sin embargo, pueden encontrarse muchas secuencias peptídicas comunes en ellas y aún más hay conservación de algunas secuencias en diferentes especies.

Los estudios de Richter y Munro han comunicado diferencias electroforéticas entre las FET de tejidos normales y las de células tumorales, así como entre las FET de diferentes tejidos de la misma especie. Por ejemplo: las FET del corazón y de la médula ósea tienen 2 componentes electroforéticos. Aunque la especificidad de especie es real, es dudoso el hecho de que en la misma especie haya una FET diferente en cada tejido, y también de la existencia de una FET específica de tumores.

Uno de los hechos más controversiales en cuanto a la bioquímica de la FET es la microheterogeneidad. El interés surgió cuando por medio de métodos isoelectrónicos se observó que una preparación pura de FET de un tejido podía consistir de una familia de *isoferritinas*. Esto sigue siendo tema de investigación.

Los estudios del contenido de aminoácidos en ferritinas de diferentes tejidos de mamíferos así como de pescados, anfibios, hongos y plantas muestran varias similitudes y hablan de la conservación de la estructura de la FET a través de la evolución. El 25% lo constituyen aspartato, glutamato y sus amidas; 11-13% lisina y arginina; alto contenido en leucina y bajo en isoleucina. Sin embargo algunos aminoácidos varían con más facilidad como serina, prolina, glicina, leucina, tirosina, fenilalanina y arginina; y como ya se mencionó, hay diferencias en el contenido de aminoácidos en las FET de diferentes especies y tejidos.

Esto apoya la conclusión de que hay múltiples formas de FET (isoferritinas) en diferentes tejidos de la misma especie.

El término *isoferritina* denota una diferencia molecular entre dos FET, de la misma forma que las isoenzimas son distintas formas moleculares con la misma propiedad catalítica. La interrogante es si un solo gen estructural codifica el péptido de la subunidad o si más de un cistron existe en el genoma del organismo.

Drysdale y cols. han concluido que existen más de 20 isoferritinas con punto isoeléctrico que varía entre 4.8 y 5.8 en los diferentes tejidos humanos.

Hasta ahora se ha propuesto que las isoferritinas tienen diferentes proporciones de dos tipos de subunidades que difieren en tamaño, contenido de carbohidratos y propiedades inmunológicas. Por medio de electroforesis se han encontrado en los depósitos celulares cantidades similares de dos tipos de subunidades: una con peso molecular de 20 000 -21 000 designada H ("heavy" o tipo "heart") y una de 19 000 daltons llamada L ("light" o tipo "liver"); las dos han sido aisladas y tienen diferente mapa peptídico.

También se han observado algunas características generales sobre la distribución de las subunidades, por ejemplo: en el humano las FET del corazón, riñón y placenta y las de tejidos pobres en Fe o de células cancerosas, generalmente son ricas en

subunidades tipo H, en comparación con las de hígado, bazo o tejidos con alto contenido en Fe que tienen gran cantidad de tipo L.

No está claro aún si las subunidades H y L son productos primarios de genes o se generan de un solo precursor por proceso post-transcripcional.

También se ha intentado correlacionar patrones de isoferritinas o diferencias en contenido de subunidades con propiedades funcionales. Las isoferritinas humanas más ácidas (H) tienen mayor contenido de Fe y mayor capacidad de captar Fe. La cinética de la captación de Fe por cada una de las isoferritinas también depende de pI y de la especie. En el humano la FET con componentes más ácidos captan el Fe más rápidamente y en el caballo son las más básicas las que son más eficientes en esta función.

3.2.2 Almacenamiento y Movilización del Hierro en la Ferritina

No se conocen a ciencia cierta los procesos fisiológicos que llevan al depósito del Fe o a su liberación de la FET.

La incorporación del Fe a la FET ha sido estudiada *in vitro* e *in vivo* y es muy probable que incluya un mecanismo oxidativo. Hay estudios hechos con leucina y Fe marcados (leucina-C¹⁴ y

Fe) que muestran que la apoferritina gradualmente incorpora el Fe durante su vida en la célula. Si la cantidad de Fe administrada es muy baja para inducir síntesis de FET, se deposita en moléculas de FET pre-existentes.

Las moléculas que tienen centros parcialmente llenos (aproximadamente 1500 átomos de Fe por molécula) captan el Fe más fácilmente que la apoferritina. Esta diferencia en la captación del Fe puede deberse a un cambio en su localización intracelular al ir acumulando Fe o puede reflejar diferencias intrínsecas en sus estructuras; también puede relacionarse en parte a que al existir ya micelas de Fe, éstas a su vez exponen más superficie para que se deposite más Fe.

Los primeros estudios sobre el depósito de Fe en la FET indicaban que el Fe(II) era rápidamente captado por la apoferritina en presencia de un oxidante adecuado, y convertido a su forma oxihidróxido (hidrolizado) de Fe(III). La naturaleza del producto formado estaba determinada por la apoferritina y se decía que la apoferritina juega un papel catalítico en la oxidación y depósito del Fe para formar FET. En base a estos experimentos, fueron propuestos varios modelos para el depósito del FE en la FET.

Un modelo supone que el Fe(II) es oxidado a Fe(III) en sitios catalíticos de la proteína, después migra al interior de ella en donde es hidrolizado y precipitado formando así una micela de

oxihidróxido férrico (Fe(III)) en cuya superficie ocurre oxidación, hidrólisis y depósito de Fe subsecuentes.

Otro modelo asume que existen sitios catalíticos que unen y oxidan Fe(II). El Fe(III) formado migra al interior de la proteína en donde es hidrolizado y adherido en sitios de heteronucleación que actúan como focos para formación subsecuente de micelas de oxihidróxido férrico. La diferencia esencial entre este mecanismo y el modelo anterior es que la apoferritina participa en el proceso del depósito de Fe independientemente de la cantidad de hierro almacenado en su interior. En contraste, el primer modelo predice que una vez iniciado el depósito de la micela de Fe, el resto del Fe se depositará en la superficie de dicha micela creciente.

Crichton R.R. (1979) propone un mecanismo molecular de oxidación del Fe por la FET que incluye activación de oxígeno molecular, y depósito del Fe(III) en ella. Para la elaboración de su modelo, las siguientes observaciones fueron importantes:

si el oxígeno molecular es el aceptor de electrones en la oxidación del Fe, entonces el mecanismo debe reducir el O_2 molecular al nivel de oxidación del agua, así, debemos asumir que 4 átomos de Fe son oxidados por cada molécula de dióxígeno consumida. El depósito de Fe en la FET consume 0.24 mol de dióxígeno/átomo g. de Fe depositado en la FET. La segunda observación es que el Fe(II) se libera de la FET al incubarse con

alfa,alfa -bipiridil.

El modelo de Crichton puede resumirse en cuatro etapas:

1) El Fe(II) se adhiere a los sitios de unión específicos de cadenas polipeptídicas adyacentes. Estos sitios tienen mayor afinidad para el Fe(II) que para el Fe(III).

2) Una molécula de dioxígeno se une entre 2 átomos de Fe(II).

3) Esta molécula de dioxígeno es reducida para formar un complejo peroxo-terminal en el que el O está en coordinación con los 2 átomos de Fe. La valencia formal de los átomos de Fe ahora es Fe(III) y el complejo peroxo está estable o al menos en equilibrio con los intermediarios hidrolizados subsecuentemente.

4) En las etapas finales se supone que se hidroliza el complejo peroxo.

Como se puede ver, (Figura 3), aquí no se libera ningún átomo de O, pero ya hay evidencia de que el mecanismo para que esto suceda es que lleguen 2 átomos más de Fe(II), se oxiden por medio del intermediario peroxo y luego sean hidrolizados:



Por lo tanto no se han identificado superóxidos libres como intermediarios en el depósito de Fe pero si se ha visto que se oxidan 4 átomos de Fe por cada molécula de dioxígeno que es reducida.

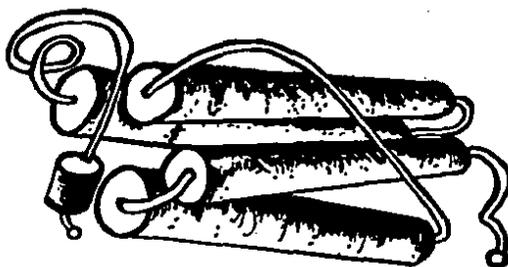


Figura 2. Modelo de una subunidad de apoferritina (Banyard y cols., 1978): la subunidad está compuesta de 4 hélices casi paralelas de 3,4-4,2 nm. de largo y una hélice corta colocada casi en ángulo recto a ellas. Cuatro de las hélices cortas limitan los canales entre las subunidades en la estructura cuaternaria, y las hélices largas se encuentran a lo largo de las superficies moleculares. (Crichton, p. 61).

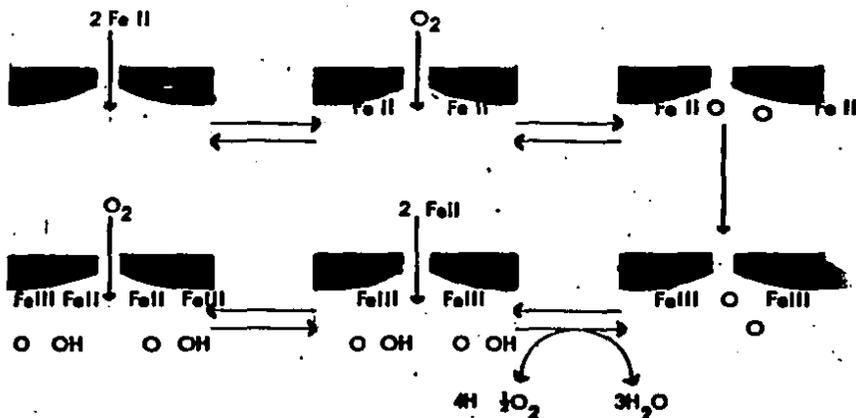
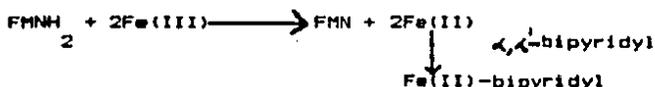


Figura 3. Modelo propuesto por Crichton y Roman en 1978 para la oxidación y depósito del Fe en la FET. (Crichton, p.64)

Los mecanismos moleculares de la hidrólisis del Fe(III) y su migración subsecuente a los sitios de heteronucleación en el interior de la FET no serán expuestos en esta revisión.

En lo que respecta a la liberación del Fe de la FET, los estudios sugieren que implica reducción del hierro a Fe(II) y combinación de éste con algún agente aún no identificado. La liberación más rápida de Fe de la FET se observa en condiciones anaeróbicas por la forma reducida de FMN en presencia de un agente quelante del Fe(II) como es la alfa,alfa -bipyridyl, de acuerdo a la reacción:



FMNH puede obtenerse rápidamente de FMN y piridin-nucleótidos reducidos (NADPH y NADH):



En condiciones aeróbicas, el Fe es liberado de la FET por medio de este sistema después de una fase de retraso que depende de la concentración de los reactantes usados. Esta fase de retraso corresponde a la autooxidación del FMNH por el O₂ disuelto; en cuanto la concentración de O₂ disminuye abajo de 2-3 $\mu\text{mol/l}$., hay reducción y liberación de Fe que eventualmente alcanza un plateau

que corresponde la movilización del 70% del Fe de la FET.

Es claro que la liberación del Fe de la FET depende de la concentración de NADH y FMN; la flavina juega un papel de coenzima y se reduce y se oxida en forma alterna.

Esto sugiere que la liberación del Fe de la FET implica un mecanismo reductor en el que la flavina es el mediador para transferir los electrones de los piridin-nucleótidos reducidos al Fe, con reducción concomitante del Fe a Fe(II) seguido de su liberación por un quelante de bajo peso molecular.

3.2.3 Biosíntesis y Metabolismo de la Ferritina

El metabolismo de la FET responde a la concentración de Fe tanto en el organismo como un todo, como en tejidos individuales. La administración de Fe induce síntesis de FET en muchos tejidos de nímales, en células de cultivo y en sistemas libres de células. El grado de inducción de síntesis es proporcional a la cantidad de Fe administrada, hasta que se obtienen niveles de saturación en la célula. El primer producto sintetizado es la apoferritina, que va acumulando Fe progresivamente. Al parecer, al incorporar el Fe la proteína se estabiliza, ya que la apoferritina es más fácilmente degradada in vivo que la FET, la cual es también menos susceptible que la apoferritina a la degradación proteolítica in vitro.

La síntesis de FET ocurre principalmente en los polisomas libres aunque también en los adheridos a la membrana. Munro y cols. sugirieron que las subunidades de apoferritina no unidas inhiben la traducción del RNAm de FET uniéndose a él por lo tanto lo hacen inaccesible para que se incorpore a la síntesis de proteínas. Cuando el Fe interactúa con estas subunidades, las disocia del RNAm y estimula su unión para formar moléculas de FET; así, queda libre el RNAm para traducción y por lo tanto para síntesis de más subunidades. Desde luego que aún existen varios aspectos por esclarecer en cuanto a la síntesis y degradación de la FET y es un campo abierto a la investigación.

3.2.4 Ferritina Sérica: Usos Diagnósticos

En 1950, Mazur y Shorr demostraron que la ferritina no es exclusivamente intracelular y que podía detectarse en el suero de pacientes con ciertas enfermedades. Se creyó por un tiempo que la ferritinemia solo sucedía en enfermedades hepáticas. Se sabe ahora que la FET es un componente normal del suero e incluso refleja la reserva de hierro del organismo.

Los valores normales de FET sérica en el adulto normal son de 60-140 ng/ml para el sexo masculino, y 35 ng/ml para el femenino, pero los valores varían de 10-200 ng/ml.

Los pacientes con anemia ferropénica generalmente tienen menos de 12 ng/ml., y aquellos con sobrecarga de Fe pueden tener hasta 10000 ng/ml. Se calcula que en sujetos normales hay 1 ng/ml de FET en suero por cada 8 mg. de Fe almacenado.

Los valores séricos de FET son inversamente proporcionales a la capacidad de fijación del Fe a la transferrina y a la absorción intestinal del Fe. Esta última aumenta cuando los depósitos de Fe están depletados.

Como ya se mencionó, la anemia ferropénica se asocia a niveles bajos de FET. En la anemia perniciosa hay niveles altos de FET debido a que no se están utilizando los depósitos de Fe; esta combinación de niveles bajos de hemoglobina y altos de FET también se ve en la anemia secundaria a artritis reumatoide u otras enfermedades inflamatorias crónicas o neoplásicas. Hay evidencia de que la FET es una de las proteínas llamadas reactantes de fase aguda, como se comentó antes. Elin y cols. demostraron que un solo episodio de fiebre inducida experimentalmente por endotoxina bacteriana produce elevación en la FET sérica y disminución en el Fe sérico que persiste por varios días.

Por otro lado, cual es la relación del Fe y la FET con los superóxidos y el daño tisular?

3.3 Sobrecarga de Hierro. Activación de Oxígeno y Daño Tisular

La sobrecarga de Fe puede suceder por varias causas, pero como el organismo solo puede eliminar 1 mg./día, no puede compensar esta sobrecarga aumentando la excreción del Fe. Entonces lo que sucede es que aumenta la FET hepática que luego es transformada a hemosiderina.

En esta situación, el Fe puede ser liberado, se producen radicales libres de oxígeno, los cuales dan daño tisular; de estos, el mejor estudiado es la *peroxidación de los lípidos* de la membrana. El Fe también puede aumentar el índice de oxidación de lípidos catalizando la descomposición de hidroxiperóxidos lípidos.

Como señaló Graziano (1976), el hierro en su forma Fe(II) es el generador más potente de radicales libres de oxígeno, y por lo tanto el potencial del Fe para oxidar los lípidos es mayor cuando está presente el ácido ascórbico. La razón es que este ácido puede regenerar Fe(II) a partir de Fe(III). Se ha observado que uno de los productos poliméricos terminales de la oxidación de los lípidos, la lipofuscina, está presente en altas concentraciones en los tejidos de los pacientes con talasemia o hemocromatosis primaria.

La peroxidación de los lípidos (una rancificación oxidativa) representa una forma de daño tisular. Puede ser iniciada por O_2 , radicales libres de oxígeno y por peróxido de hidrógeno. Una vez iniciada, el proceso toma la forma de una reacción en cadena de radicales libres que lleva a la formación de peróxidos orgánicos y otros productos de ácidos grasos insaturados.

El acúmulo de peróxidos orgánicos y la oxidación de los lípidos de la membrana pone en peligro la vida de la célula.

Mecanismos protectores contra la peroxidación de los lípidos incluyen enzimas que eliminan H_2O_2 , peróxidos orgánicos y radicales oxígeno, y la presencia de antioxidantes lípidos naturales tales como el alfa-tocoferol (vitamina E).

La formación controlada de los endoperóxidos orgánicos a partir del ácido araquidónico puede jugar un papel benéfico en la síntesis de prostaglandinas.

El consenso general es que la peroxidación de los lípidos de la membrana es una forma importante de daño tisular que caracteriza a las alteraciones tisulares que se ven en la deficiencia de Vit. E experimental. Se cree que la peroxidación de los lípidos juega un papel en el proceso de envejecimiento celular y en el daño celular inducido en órganos blanco por diferentes agentes tóxicos (como tetracloruro de carbono, y paraquat).

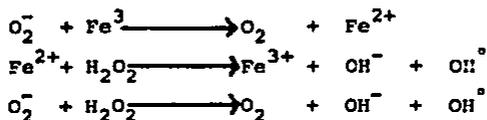
Hay tres productos de la peroxidación de los lípidos de la

membrana celular que pueden producir daño intracelular: radicales libres de oxígeno,, hidroxiperóxidos de ácidos grasos y productos carbonil-terminales (como el malonaldehído).

Este daño puede ser de tal importancia que tanto los radicales libres de oxígeno como los productos carbonil terminales se les ha demostrado capacidad mutagénica celular, lo cual tiene que ver con la carcinogénesis.

Por otro lado las prostaglandinas son generadas por oxidación de ácidos grasos poliinsaturados como el ácido araquidónico. Son sintetizadas en respuesta a lesión celular, por lo que representan un índice de lesión celular y son agentes importantes en la producción de signos y síntomas clínicos de la inflamación.

En tanto que la liberación del Fe puede generar radicales libres de oxígeno y daño tisular, la interacción entre el metabolismo del Fe y las reacciones oxidantes de los radicales libres es evidente. El Fe cataliza las reacciones que constituyen la reacción de Haber y Weiss:



Ya que el depósito y liberación del Fe en la FET incluyen cambios en el estado redox del hierro, activación del oxígeno a estado peroxo, cuya reactividad como oxidante puede al parecer ser

potenciada o incrementada por flavinas, están empezando a tomar forma la relación entre la activación del oxígeno y su toxicidad y el metabolismo normal y patológico del hierro. En síntesis:

La existencia de FET en todas las formas de vida eucariotes (hongos, plantas y animales) sugiere una función fundamental de esta proteína almacenadora de hierro en el metabolismo del mismo de todas las células nucleadas. Parece haber un equilibrio entre la FET y alguna forma de Fe libre en el citosol. Así, la FET es un depósito que mantiene la concentración intracelular de hierro libre dentro de ciertos límites. Si el nivel de hierro libre baja, se libera Fe de la FET, mientras que si aumenta el hierro se induce su almacenamiento. El nivel intracelular del Fe libre regula la tasa de biosíntesis de apoferritina al variar la cantidad de RNAm disponible para traducción. De esta manera, la FET tiene las funciones de protección contra los efectos tóxicos del exceso de Fe libre y al mismo tiempo es un gran depósito del metal. La FET prevé un medio por el cual la célula puede disponer del exceso de Fe, convirtiéndolo en hemosiderina que puede ser encapsulada en gránulos de siderosoma.

Munro propone que es posible que la diferencia del papel que juegan los diferentes tejidos en el metabolismo del Fe sea dependiente del tipo de receptores en sus componentes celulares. Así por ejemplo, los fagocitos tales como las células de Kupffer en el hígado están programadas para ingerir eritrocitos y para obtener el Fe de su hemoglobina para que sea utilizable; los

hepatocitos tienen receptores en sus membranas plasmáticas para heme y hemoglobina libres unidos a proteínas transportadoras y para FET sérica. Las células de la mucosa intestinal tienen receptores para Fe iónico, y la mayoría de las células del organismo tienen receptores para transferrina unida a hierro. Pero la FET en todos los tejidos tiene las mismas funciones de almacén y detoxificación.

De los 3.5 g de hierro en el organismo de un adulto hombre, 2.1g. se encuentran en la hemoglobina circulante. Del resto, 1.4g., la mayoría está almacenado en forma de FET y hemosiderina. Estos depósitos permiten tolerar por largos periodos la deficiencia de Fe antes de que se impida la síntesis de compuestos esenciales que contienen hierro como la hemoglobina. Esto habla de una gran capacidad amortiguadora que es adecuada para la gran utilización ciclica del hierro (35 mg./dia) y contrasta con la pequeña cantidad que se absorbe diariamente (1 mg. Fe/dia).

A todos los niveles quedan muchas interrogantes acerca del papel de la FET a'n por esclarecer. Uno de estos aspectos, su papel en el proceso de la inflamación es el que nos interesa en este estudio, en particular en la sinovitis (inflamación de la membrana sinovial).

HIPOTESIS DE TRABAJO

Como ya se mencionó en la introducción, en la sinovitis existen alteraciones locales y sistémicas en el metabolismo del hierro. Con fines de referencia, tomamos a la artritis reumatoide como ejemplo de sinovitis crónica.

La artritis reumatoide se caracteriza por exacerbaciones y remisiones que ocurren espontáneamente por razones aún desconocidas; es principalmente una sinovitis, aunque tiene daño sistémico, los problemas centrales están en las articulaciones y en el tejido sinovial. Hay destrucción de tejidos blandos, cartilago y hueso.

El estudio del tejido sinovial de los pacientes con artritis reumatoide provee información valiosa acerca de la patogénesis de esta enfermedad. Así pues, en una revisión reciente de este tema, Decker J.L. y cols. presentan un modelo patogénico de la sinovitis reumatoide, y que es interesante en los objetivos de este trabajo, pues en alguno de los pasos del daño tisular podría incluirse la participación de la FET y el metabolismo del Fe, y nos sirve como modelo de destrucción tisular mediada por células

en la sinovitis crónica. (Figura 3).

En este modelo, las células T cooperadoras en la articulación son primeramente expuestas a un antígeno. Después de mayor estimulación por macrófagos HLA-DR compatibles y por interleucina 1, estas T cooperadoras proliferan, secretan linfocinas y esto amplifica y perpetúa la respuesta inflamatoria. Muchas de estas linfocinas (Tabla I) actúan sobre el macrófago y aumentan su actividad fagocítica y la secreción de mediadores activos. Además, estas linfocinas pueden estimular a los macrófagos a liberar enzimas, tales como el activador de plasminógeno y colagenasa que contribuyen al daño tisular. Las linfocinas y monocinas pueden modular el crecimiento celular y la función del tejido conjuntivo.

La hiperplasia de las células sinoviales y de fibroblastos que ocurre en asociación a la aparición y persistencia de linfocitos es un hecho temprano en la sinovitis reumatoide. Las células mononucleares del tejido sinovial generan mediadores de crecimiento de fibroblastos.

De esta forma las interacciones celulares participan en la formación y función del pannus, compuesto de fibroblastos proliferando, numerosos vasos sanguíneos, colágena y células inflamatorias. Las células inflamatorias a través de la liberación de factores solubles pueden mediar esta proliferación sinovial que posiblemente contribuye a los niveles excesivos de

colagenasa y prostaglandinas generadas en la sinovitis, que a su vez contribuyen a la destrucción tisular. La erosión del hueso, cartilago y tejido conjuntivo ocurre en Areas adyacentes a estas células.

Un producto de monocitos, el factor celular mononuclear (MCF) aumenta la secreción de prostaglandinas y colagenasa por las células sinoviales y fibroblastos. Otra monocina, el activador sinovial estimula al activador del plasminógeno de los fibroblastos sinoviales y se genera plasmina que daña al tejido conjuntivo.

Los monocitos también secretan colagenasa y prostaglandinas cuando están activados.

La destrucción del cartilago puede ser mediada por células del pannus o por enzimas proteolíticas de los condrocitos; esta última explica la deplocción de matriz en las Areas de cartilago que no tienen pannus.

Por lo tanto, la hiperplasia sinovial así como la producción y liberación de enzimas degradantes que contribuyen a la perpetuación y destrucción tisular pueden ser moduladas por señales de células mononucleares.

Como ya se ha planteado, en la sinovitis reumatoide se encuentran en forma constante depósitos de hierro. El Fe deriva predominantemente de hemorragias intraarticulares intermitentes y

se almacena en la FET intracelular. Blake y cols. informaron que el nivel de FET en el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide está aumentado y correlaciona con la presencia de complejos inmunes y consumo local de complemento.

Por otro lado, se sabe que los macrófagos son capaces de sintetizar FET. Blake y cols. han sugerido que los niveles de FET sinovial y sérica son indicadores de inflamación articular, mientras que la cantidad de Fe en la membrana sinovial está asociada con el grado de daño erosivo.

Una relación causa-efecto se apoya por la observación in vitro de que el Fe estimula a los fibroblastos a liberar colagenasa y prostaglandina E mientras que la quelación del Fe influye en la evolución de modelos animales de inflamación tanto aguda como crónica.

Se ha propuesto un mecanismo patogénico en el que la carga de Fe induce la síntesis de FET por macrófagos y que la producción de radicales libres de oxígeno durante la incorporación del Fe a la FET lesiona a la célula reduciendo su función, lo que indirectamente perpetúa la inflamación. Es posible que el estudio de la FET in situ refleje algunas características de la sinovitis, en especial en el caso de la artritis reumatoide.

En base a esto, estudiamos los niveles de la ferritina en sangre, líquido sinovial y tejido sinovial en pacientes con sinovitis de diferente origen para demostrar que esta

ferroproteína es producto de síntesis local y probablemente
guarda relación con la patogenia de la inflamación crónica.

MATERIAL Y METODOS

Se estudiaron 41 enfermos consecutivos que acuden a la clinica de Reumatologia del Instituto Nacional de Cardiologia Ignacio Chávez, en quienes se estableció diagnóstico de acuerdo a criterios aceptados (37). En 24 casos se trató de mujeres 17 casos correspondieron a hombres. La edad osciló entre 5 y 76 años con un promedio de 39.

Los diagnósticos establecidos fueron: artritis reumatoide (17 casos), gota (7 casos) y enfermedad por depósito de cristales de pirofosfato de calcio (1 caso), osteoartritis (4 casos), lupus eritematoso sistémico (3 casos), síndrome de artritis-pericarditis y camptodactilia familiar (2 casos), monoartritis (2 casos), y uno de cada uno de las siguientes enfermedades: fiebre reumática, endocarditis bacteriana subaguda, psoriasis, osteocondritis y sinovitis villonodular pigmentada. En todos los casos habia sinovitis activa al momento del estudio y se practicó artrocentesis con la técnica habitual.

El líquido sinovial fue estudiado en sus aspectos citoquímico y bacteriológico con métodos establecidos. En ning'n caso, excepto

en el de sinovitis villonodular pigmentada se estudió líquido sinovial hemorrágico. En forma simultánea a la hora de la toma del líquido sinovial, en 9 pacientes se tomó muestra de sangre periférica para medir ferritina sérica.

En 5 pacientes que requerían cirugía articular se obtuvo además de suero y líquido sinovial, tejido sinovial durante el acto quirúrgico.

Las muestras obtenidas se conservaron congeladas a -40°C hasta que se midió ferritina.

Medición de Ferritina:

Se midió ferritina usando el método inmunoradiométrico descrito por Miles y modificado por Alvarez y Loria. En breve: se pusieron 175 μl . de suero diluido con PBS en tubos de poliestireno cubiertos previamente con albúmina bovina antiferritina fría, e incubada por 24 horas a 4°C . Los tubos fueron lavados 3 veces con PBS 0.1 M a pH 7.4. Después, se agregaron 200 μl . de antiferritina radiactiva (30,000 cpm, actividad de anticuerpo específico 2.65 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$), e incubados 24 horas a 4°C . Los tubos fueron lavados 3 veces con PBS y colocados en un contador gamma. Cada muestra fue probada por cuadruplicado y los datos fueron interpolados en una curva standard hecha por quintuplicado. Para evitar variación entre los lotes, todas las muestras fueron probadas en una sola ocasión (variación del coeficiente entre lotes: $\sigma < 7\%$).

Los anticuerpos antiferitina para el análisis fueron producidos en conejos inmunizados con ferritina de hígado humano normal, purificada. Los valores normales de ferritina en nuestro laboratorio oscilan en hombres de 37-317 ug/L. y en mujeres de 20-203 ug/L. en suero.

Medición de ferritina tisular:

La FET presente en tejido sinovial se extrajo por desnaturalización al calor (70-80 °C) por 10 minutos seguida de precipitación con sulfato de amonio; el sobrenadante fue suspendido de nuevo con solución salina balanceada con fosfato (PBSS), dializada contra PBSS para eliminar el sulfato de amonio, y en este dializado se midió FET.

Estadística: los resultados se analizaron con la prueba U de Mann-Whitney para valores no paramétricos y con correlación lineal simple. Los valores de FET en líquido sinovial se correlacionaron con los de suero, con pleocitosis sinovial, y con FET tisular.

RESULTADOS

Se analizó en forma simultánea FET en líquido sinovial y en suero en 9 casos. Los valores de FET sérica fueron de 18 a 115 ug/L (promedio 58 ug/L) y en suero fueron de 12 a 2384 ug/L (promedio 387 ug/L). No hubo correlación entre estos dos parámetros ($r=0.25$, $p=0.78$). La FET sinovial tiende a tener niveles superiores a los del suero.

Basados en estos datos, decidimos analizar la relación entre los niveles de FET sinovial y el número de células en el líquido sinovial. Se encontró que a mayor número de células los niveles de FET aumentan en el líquido sinovial. La correlación lineal de estos dos parámetros mostró significado estadístico ($r= 0.5429$, $p<0.005$). (Figura 5).

Con el fin de determinar el posible origen de la FET en tejido sinovial en 5 pacientes en quienes se practicó tratamiento quirúrgico articular. Se observó una clara tendencia a que el nivel de FET extraíble del tejido sinovial correlacione con el nivel de FET presente en el líquido articular. El valor de r fue de 0.775 con una $p>0.05$ y <0.1 . Es posible que si se estudian más

casos se alcance significado estadístico. (Tabla II).

DISCUSION

Este estudio muestra que la FET aparece en el liquido sinovial en el curso de artropatias inflamatorias como resultado de sintesis local, afirmación que se apoya en el hecho de que no hay correlación entre la FET circulante y la sinovial, ésta última tiene valores muy superiores en ocasiones a los que se encuentran en una toma simultánea en el suero.

Por otro lado, hay una definida asociación entre la magnitud de la sinovitis medida como pleocitosis sinovial y la cantidad de FET inmunoreactiva in situ; además de que hay cierta relación con una tendencia franca a la asociación con significado estadístico de la FET extraíble del tejido sinovial y la FET presente en éste fluido.

Este trabajo confirma los hallazgos de Blake y cols., y encuentra apoyo en trabajos previos de uno de nosotros (López-Karpovitch, 13 y 21) que mostraron correlación entre los niveles de FET elevados y el número de leucocitos en el líquido céfalo-raquídeo y en el suero.

El hallazgo de que los niveles de FET extraíble del tejido sinovial tienden a correlacionar con los del líquido sinovial, junto con la falta de relación entre estos últimos y los del suero, apoyan el concepto de que la FET en el líquido sinovial es resultado de síntesis in situ.

La posibilidad de que no solo el número total de células, sino la composición de la población celular tenga influencia sobre los niveles de FET sinovial es sugerido por la observación de cantidades mayores de FET inmunoreactiva en los casos de sinovitis crónica por artritis reumatoide, en donde además de fagocitos polimorfonucleares en el líquido sinovial, existe un proceso infiltrativo crónico en el seno de la membrana con predominio de células inmunocompetentes capaces de sintetizar FET; en otras sinovitis la fisiopatogenia es distinta y hay solo exudado transitorio de polimorfonucleares al líquido sinovial.

Es posible que los niveles de FET en artritis reumatoide reflejen la naturaleza crónica de la sinovitis y la síntesis continua de la ferroproteína con difusión al líquido sinovial y acumulación dada la ausencia de drenaje linfático en las articulaciones.

Hasta donde sabemos, este estudio representa la primera evidencia en lo que a cuantificación de FET en tejido sinovial se refiere. El significado biológico de estos datos se ilustra con el hecho de que existen depósitos de hierro en la membrana

sinovial desde etapas tempranas en las sinovitis activas, proceso que a su vez está influenciado por las células fagociticas.

La FET se sintetiza en varias células, incluyendo a los macrófagos. Muirden y cols. (1967) demostraron que los macrófagos sinoviales o sinoviocitos A sintetizan FET al ponerlos en contacto con hemoglobina, de la cual liberan el Fe. Este autor detectó la FET por su centro electrodenso de Fe. En un estudio similar, Blake y cols. (1984) encontraron los mismos resultados. Además, estos últimos autores, encontraron Fe libre en algunos macrófagos sinoviales de pacientes con artritis reumatoide, en ausencia de FET de lo cual infieren que o no se sintetizó FET o que se había saturado y degradado el material Perl's positivo que no reaccionó con anticuerpos con anticuerpos anti-FET. De esta forma, sugieren que es posible que en situaciones no inflamatorias la producción de apoferritina en el macrófago parece ser inducida por el fierro que entra a la célula; y en situaciones inflamatorias hay cada vez mas evidencia de que otros factores influyen en la producción de FET (como ya se mencionó antes con los estudios de Konijn y Harshko).

Por otro lado, Blake y cols. encuentran una asociación significativa entre la cantidad de FET en los macrófagos sinoviales y la actividad de la sinovitis reumatoide temprana desde el punto de vista clinico e histológico; no encontraron tal relación entre la cantidad de FET y el pronóstico o persistencia de la enfermedad un año después. La cantidad de Fe en tejido

sinovial no tuvo relación con la actividad de la enfermedad pero si se asoció a pronóstico pobre.

Un mecanismo posible que puede explicar la toxicidad del Fe cuando éste no está incorporado en la FET es el que se mencionó anteriormente con respecto a la generación de superóxidos. Se ha demostrado que el Fe(III) puede ser reducido a su forma ferrosa (Fe(II)) intracelularmente y éste cataliza la formación de radicales libres de oxígeno y de peróxidos lipídicos, por medio de la reacción de Haber y Weiss; esto resulta en ruptura de membranas lisosomales y liberación de enzimas hidrolíticas. El daño así producido en los macrófagos y polimorfonucleares puede impedir su capacidad para eliminar a los complejos inmunes y así puede perpetuar la inflamación sinovial.

McCord y Wong expusieron in vitro líquido sinovial de bovino a superóxidos y encontraron gran degradación de ácido hialurónico en 30 minutos, con pérdida de la viscosidad de dicho líquido. Estos cambios in vitro son los que se encuentran in vivo en la artritis reumatoide. Concluyan con esto y otros experimentos, que el papel de los superóxidos es muy importante en la formación de edema que se ve en la respuesta inflamatoria aguda y que estos son generados en los fagocitos probablemente por medio de la reacción de Haber y Weiss.

Por lo tanto el Fe sinovial puede influenciar adversamente a la evolución de la artritis reumatoide y otras sinovitis. Son

necesarios estudios mas amplios sobre indicadores de actividad inflamatoria in situ, ferroproteinas y ferrocinética para definir el papel del hierro y sus proteínas reguladoras en la sinovitis.

Tabla I

Productos de Linfocitos y Monocitos Encontrados en Líquido Sinovial, Tejido Sinovial y Cultivo de Células Sinoviales de pacientes con Artritis Reumatoide (Decker, et.al., 1984)

Productos de Linfocinas.

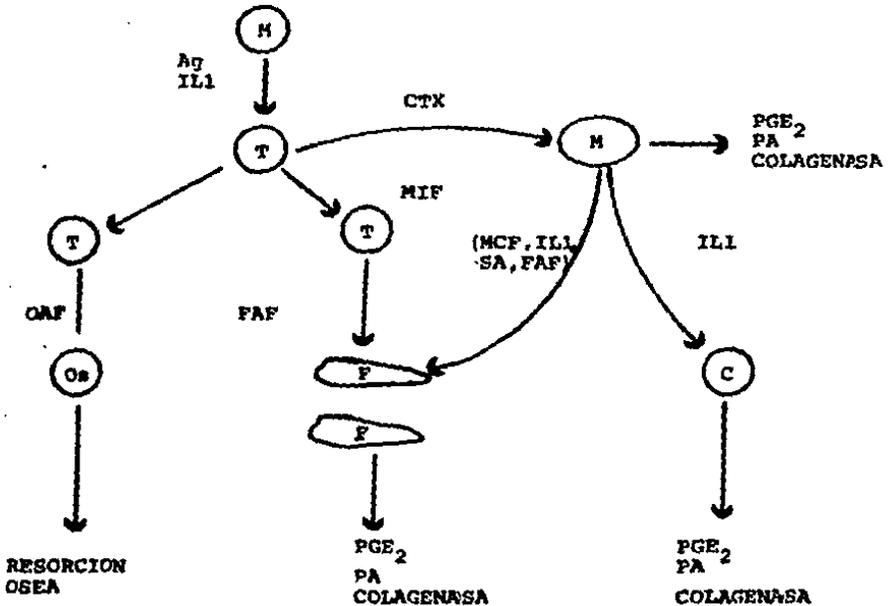
Factor quimiotáctico de monocitos
Factor inhibidor de la migración
Factor inhibidor de la migración leucocitaria
Factor mitogénico de linfocitos
Factor activador de fibroblastos

Productos de Monocitos

Interleucina I
Activador celular mononuclear
Factor activador de fibroblastos
Activador sinovial
Activador de plasminógeno
Colagenasa
Prostaglandinas
Enzimas lisosomales

Figura 4

Destrucción Tissular Mediada Por células en la Sinovitis Crónica



M=macrófago; T= linfocitos T; IL1= interleucina 1; CTX= factor quimiotáctico de monocitos; MIF= factor inhibidor de macrófagos; PA= activador de plasminógeno; C= condrocitos; SA= activador sinovial; FAF= factor activador de fibroblastos; F= fibroblastos; OAF= factor activador de osteoclastos; Os= osteoclastos; MCP= factor celular mononuclear. (Decker et.al., 1984).

Tabla II. Cuantificación de Ferritina en Tejido y
Líquido Sinovial

DIAGNOSTICO	FERRITINA SINOVIAL	
	Tejido (ug/g)	líquido (ug/L)
Osteocondritis	1.5	158
Lupus Eritematoso Sistémico	5.8	170
Sinovitis Villonodular Pigmentada	28.7	779
Artritis Reumatoide	53.5	19851
Artritis Reumatoide	101.5	13560

BIBLIOGRAFIA

1. Aisen P, & Listowsky I: Iron transport and storage proteins. *Ann Rev Biochem* 49: 357-93, 1980.
2. Alvarez-Hernández X, Loria A: Antiferritin labeled with the Bolton & Hunter reagent. *Clin Chem* 26:1916, 1980.
3. Alvarez X, Piedras J, Córdova MS, López-Karpovitch X, Cano R: Ferritina sérica en mujeres y varones. Valores de referencia. *Rev Invest Clin(Mex)* 33: 13-6, 1981.
4. Aungst CW: Ferritin in body fluids. *J Lab & Clin Med* 71:517-22, 1967.
5. Blake DR, Bacon PA: Ferritin, RE cell dysfunction, and systemic rheumatoid arthritis. *Ann Rheum* 39:598, 1980.
6. Blake DR, Bacon PA: Synovial fluid ferritin in rheumatoid arthritis. An index or cause of inflammation? *Br Med J* 282:189, 1981.
7. Blake DR, et.al. Ferritin: a role in the pathogenesis of inflammatory joint disease. *Ann Rheum Dis* 40:615-27, 1981.
8. Blake DR, Waterworth RF, Bacon PA: Assessment of iron stores in inflammation by assay of serum ferritin concentrations. *Br Med J* 283:1147-8, 1981.

9. Blake DR, Gallagher PJ, Potter AR, Bell MJ & Bacon PA: The effect of synovial iron on the progression of rheumatoid disease. *Arthritis Rheum* 27:495-501, 1984.
10. Cohen G: lipid peroxidation: detection in vivo and in vitro through the formation of saturated hydrocarbon gases. *Ciba Fdn Symposium*, 65 new series. Amsterdam Excerpta Medica, 1979, pp 177-185.
11. Crichton RR: Interactions between iron metabolism and oxygen activation. *Ciba Fdn Symposium*, 65 new series. Amsterdam Excerpta Medica, 1979, pp 57-76.
12. Decker JL, Malone DG, Haraoui B, et al: Rheumatoid arthritis: Evolving concepts of pathogenesis and treatment. *Ann Int Med* 101:810-24, 1984.
13. Dillmann E, López-Karpovitch X, Alvarez-Hernández X, Hurtado R, Córdova MS, González-Llaven J, Diaz-Maqueo JC: Ferritin and malignant hemopathies. I. Ferritin in cerebrospinal fluid as an indicator of central nervous system leukemic involvement. *Rev Invest Clin (Mex)* 34: 95-B, 1982.
14. Dorner MH, Silverstone A, Nishiya K, De Sostoa A, Munn G, De Sousa M: Ferritin synthesis by human T lymphocytes. *Science* 209: 1019-21, 1980.

15. Fishman P, Skutelski E, Djaldetti M: Ferritin phagocytosis. Arch Pathol Lab Med 101:100-1, 1977.
16. Hill HAO: The chemistry of dioxygen and its reduction products. Ciba Fdn Symposium, 65 new series, Amsterdam Excerpta Medica, 1979, pp 5-17.
17. Konijn AM & Hershko C: Ferritin synthesis in inflammation: I. Pathogenesis of Impaired iron release. Br J Haematol 37:17-16, 1977.
18. Konijn AM, Carmel N, Lvy R, & Hershko C: Ferritin synthesis in inflammation: II. Metabolism of increased ferritin synthesis. Br J Haematol 49: 361-70, 1981.
19. Larsen BL & Henson PM: Mediators of Inflammation. Ann Rev Immunol 1: 335-59, 1983.
20. Lawson AAH, Owen ET & Mowat AB: Nature of Anaemia in rheumatoid arthritis: VII. Storage of iron in rheumatoid disease. Ann Rheum Dis 26: 552-9, 1967.
21. López-Karpovitch X, Piedras J, Sosa A, Alvarez-Hernández X, Cano R, Gómez-Almaguer D, Córdova MS: Ferritin and malignant hemopathies. II. Serum Ferritin in adults with acute lymphocytic leukemia at presentation and in remission. Rev Invest Clin (Mex) 35: 225-9, 1983.
22. López-Karpovitch X, Padrós-Semorile MR, Alvarez-Hernández

- X: Ferritin in normal human peripheral blood T-lymphocyte subpopulations. Cell Immunol 85: (in press), 1984.
23. McCord JM, Wong K: Phagocyte-produced free radicals: roles in cytotoxicity and inflammation. Ciba Fdn Symposium, 65 new series. Amsterdam Excerpta Medica, 1979, pp 343-60.
24. Mason DY & Taylor CR: Distribution of transferrin, ferritin and lactoferrin in human tissues. J Clin Pathol 31: 316-27, 1978.
25. Meyer CJLM, de Graaff-Retisma CB, Lafeber GJJM, Cats A: In situ localization of lymphocyte subsets in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis with monoclonal antibodies. J Rheumat 9: 359-65, 1982.
26. Miles LEM, Lipschitz DA, Bieber CP, Cook JD: Measurement of serum ferritin by 2-site immunoradiometric assay. Annal Biochem 61: 209-24, 1974.
27. Mowat AB & Hotheresall TE: Nature of anaemia in rheumatoid arthritis: VIII.: Iron content of synovial tissue in patients with rheumatoid arthritis and in normal individuals. Ann Rheum Dis 27:345-51, 1968.
28. Muirden KD: The anemia of rheumatoid arthritis: the significance of iron deposits in the synovial membrane. Aust Ann Med 2: 97-104, 1970.

29. Muirden KD: Ferritin in synovial cells in patients with rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 25: 387-401, 1966.
30. Muirden KD, Frasser JRE & Clarris B: Ferritin Formation by synovial cells exposed to haemoglobin in vitro. Ann Rheum Dis 26: 251-9, 1967.
31. Muirden KD & Senator GB: Iron in the synovial membrane in rheumatoid arthritis and other joint diseases. Ann Rheum Dis 27: 38-48, 1968.
32. Munro HN & Linder MC: Ferritin structure, biosynthesis and role in iron metabolism. Physiol Rev 58: 317-96, 1978.
33. Ohno Osamu, Tateishi H & Cooke TD: Pathogenesis of chronic inflammation in experimental ferritin-induced arthritis. Arthritis Rheum 21: 81-91, 1978.
34. Omer A, Mowat AB: Nature of anaemia in rheumatoid arthritis: IX. Folate metabolism in patients with rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 27: 414-24, 1968.
35. Owen ET & Lawson AA: Nature of anemia in rheumatoid arthritis: VI. Metabolism of endogenous iron. Ann Rheum Dis 25: 547-52, 1966.
36. Raymond FD, Bowie MA, Dugan A: Iron metabolism in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 8: 233, 1965.
37. Rodnan GP, Schumacher RH, Zvaifler MJ: Primer on the

Rheumatic Diseases. 8 th Edition , Atlanta, Ga, Arthritis foundation, 1983, pp 207-12.

38. Senator GB & Muirden KD: Concentration of iron in synovial membrane, synovial fluid and serum in rheumatoid arthritis and other joint diseases. Ann Rheum Dis 27: 49-54, 1968.
39. Summers M, White G, Jacobs A: Ferritin synthesis in lymphocytes, polymorphs and monocytes. Br J Haematol 30: 425-34, 1975.
40. Willson RL: Hydroxyl radicals and biological damage in vitro: what relevance in vivo? Ciba Fdn Symposium, 65 new series. Amsterdam Excerpta Medica, 1979, pp 19-42.
41. Young CL, Adamson TC, Vaughan JH, Fox RI: Immunohistologic characterization of synovial membrane lymphocytes in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 27: 32-9, 1984.