

00544
1
2º

RECIBO
1994
MAY 17 1994



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
FACULTAD DE QUIMICA POSTGRADO

**DETERMINACION DE ANTICUERPOS
ANTICITOPLASMA DE NEUTROFILOS
EN LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO
JUVENIL**

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN BIOQUIMICA CLINICA
P R E S E N T A
ROSARITO ARIAS VELASQUEZ



MEXICO, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1994



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCION	1
1.1. Autoinmunidad	1
1.2. Lupus eritematoso sistémico	15
1.3. Anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos ..	25
2. HIPOTESIS	30
3. OBJETIVOS	30
4. MATERIAL Y METODOS	31
5. RESULTADOS	33
6. DISCUSION	41
7. CONCLUSIONES	47
8. BIBLIOGRAFIA	48

JURADO

DIRECTOR DE TESIS

Dra. María Amparo Faure F.

SINODALES PRINCIPALES

PRESIDENTE

Dr. Fernando García T.

SECRETARIO

Dr. Renato Berrón.

VOCAL

Dr. Fernando Montiel.

SINODALES SUPLENTES

Dr. Jesús Guzmán.

Dra. María Amparo Faure F.

**DEDICO ESTA TESIS A TODOS
LOS AUSENTES QUE ESTAN
PRESENTES EN MI CORAZON.**

1. INTRODUCCION

1.1. AUTOINMUNIDAD

La autoinmunidad se encuentra como un mecanismo fisiológico básico o como epifenómeno en numerosas situaciones patológicas del ser humano. Debido a ello ha sido intensamente estudiado desde que se reconoció su existencia.

Los importantes adelantos efectuados en inmunología celular, biología molecular y genética han influido notablemente en el pensamiento actual acerca de la autoinmunidad.

Hasta 1900, el dogma central de la inmunología había sido que el sistema inmune no reacciona contra lo propio. Este concepto descrito originalmente por Ehrlich, como "horror autotoxicus" puede ser asimilado hoy como la tolerancia inmunológica a los componentes propios(1).

Todos los sistemas biológicos son susceptibles de error, y los mecanismos de autorreconocimiento no constituyen ninguna excepción al respecto. Como consecuencia de ello, se han identificado diversas enfermedades en las que se detectan autoanticuerpos y células T autorreactivas que constituyen la evidencia de un fenómeno autoinmune en ellas(1,2).

Ahora se sabe que las respuestas autoinmunitarias no son tan raras como se pensaba y que no todas las respuestas autoinmunitarias son dañinas. De hecho, los conocimientos actuales enfatizan que algunas formas de respuestas autoinmunitarias como las respuestas antiidiotípicas contra los idiotipos propios, son esenciales para la diversificación y el funcionamiento normal del sistema inmunitario intacto(1). Además, en situaciones fisiológicas como el envejecimiento, se producen autoanticuerpos a títulos bajos como es el caso de los antinucleares.

Una respuesta autoinmunitaria anormal puede ser la causa primaria del daño a los tejidos en una enfermedad, o un fenómeno secundario que es consecuencia de una enfermedad primaria, o un trastorno inespecífico común en varias patologías autoinmunes que aparentemente no se relaciona con la actividad de la enfermedad en cuestión.

ESPECTRO DE LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES

El espectro de las enfermedades autoinmunitarias es bastante amplio y se han clasificado clásicamente en: A. Generales u "Órgano-inespecíficas" y B. Enfermedades "Órgano-específicas". En estas últimas, las respuestas anormales están dirigidas contra un antígeno que es exclusivo de un órgano en particular. Por ejemplo, anticuerpos antitiroglobulina en la tiroiditis crónica.

Los órganos blanco más frecuentes en las enfermedades órgano-específicas suelen ser: el tiroides, suprarrenales, estómago y páncreas. Por otro lado, las enfermedades órgano-inespecíficas, que incluyen los llamados trastornos reumatológicos, afectan a varios órganos a la vez, como la piel, riñones, articulaciones, músculos y otros(2).

Las enfermedades autoinmunes con frecuencia se traslapan, y en un mismo individuo tiende a presentarse más de un trastorno autoinmunitario a la vez. Esto se puede observar especialmente en personas con endocrinopatías autoinmunitarias donde a la presencia inicial de autoanticuerpos órgano específicos dirigidos contra una glándula como por ejemplo el tiroides, se agregan posteriormente otros autoanticuerpos, con frecuencia anti-células parietales gástricas(1,2).

Las enfermedades autoinmunitarias u órgano-inespecíficas se caracterizan por respuestas autoinmunitarias dirigidas contra varios autoantígenos diferentes o contra determinantes antigénicos distribuidos ampliamente. En una enfermedad órgano-inespecífica dada, por lo general intervienen muchos antígenos propios, como sucede en el lupus eritematoso sistémico. Otras enfermedades pueden desarrollarse después de respuestas inmunitarias anormales contra un solo antígeno blanco que es compartido por diferentes órganos. Un ejemplo de antígenos de este tipo son los determinantes de las membranas basales. El caso típico es el síndrome de Goodpasture en que hay afección renal y pulmonar por la presencia de anticuerpos antimembrana basal.

No se sabe qué factores determinan la extensión de las respuestas autoinmunitarias, el número de autoantígenos que las inducen o el órgano blanco. En muchos casos, no está claro si las respuestas autoinmunitarias están dirigidas contra antígenos propios sin modificar o contra antígenos propios que han sido alterados por agente externos como los virus o los grupos hapténicos de sustancias diversas.

Aún no se ha establecido un concepto unánime para explicar el origen y la patogenia de los diversos trastornos autoinmunitarios. Los estudios en animales de laboratorio apoyan la idea de que las enfermedades autoinmunitarias pueden ser la consecuencia de un amplio espectro de anormalidades genéticas e inmunológicas que difieren de un individuo a otro y que pueden presentarse en cualquier momento del transcurso de su vida dependiendo de la presencia de varios factores desencadenantes tanto exógenos (virus, bacterias) como endógenos (hormonas, genes anormales)(1).

MECANISMOS INMUNOPATOLOGICOS EN LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNITARIAS

De los mecanismos inmunopatológicos descritos en la clasificación de Gell y Coombs, son tres los más importantes en la mediación de las enfermedades autoinmunitarias. En un trastorno en particular, pueden operar 1 o más a la vez.

Estos mecanismos varían según la localización de la enfermedad en el espectro de órgano-específicas o inespecíficas. Cuando el antígeno se localiza en un órgano determinado, la hipersensibilidad tipo II y las reacciones mediadas por células adquieren su máxima importancia. En las enfermedades órgano-inespecíficas el depósito de complejos inmunes en los lugares de filtración, tales como pulmones y riñones, es asimismo relevante(2).

1. El primer mecanismo, que corresponde al tipo II de la clasificación de Gell y Coombs, se debe a la actividad del autoanticuerpo sobre un antígeno ubicado en la superficie de la célula. Este último corresponde generalmente a estructuras de la célula, modificadas o sin modificar. En la mayor parte de los casos la destrucción de las células o los tejidos sobreviene a causa de la fijación del complemento sobre el complejo antígeno-anticuerpo formado en la superficie celular. En otras ocasiones, el resultado es una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, en la que el anticuerpo sobre la célula sirve de puente para que un linfocito citotóxico se adhiera a ella y la destruya. Como ejemplo de este mecanismo están las anemias hemolíticas, neutropenias, linfopenias y trombocitopenias autoinmunitarias, enfermedades antimembrana basal causadas por anticuerpos, endocrinopatías autoinmunitarias y enfermedades mediadas por anticuerpos antirreceptores (miastenia grave, enfermedad de Graves). En estos casos, el anticuerpo (generalmente IgG) compete con el neurotransmisor o la hormona por sus sitios de unión en la superficie celular. La fijación del anticuerpo al receptor puede producir:

- A. Bloqueo de la función por degradación acelerada del receptor, como en la miastenia grave
- B. Estimulación de la actividad de un receptor en forma semejante a la normal, como en la enfermedad de Graves y en ciertos casos de acantosis nigricans;
- C. Bloqueo de la unión de la hormona, induciendo de esta forma resistencia a ella, como en el caso de la diabetes(3)

2. El segundo mecanismo consiste en el depósito de complejos inmunes autoantígeno-autoanticuerpo sobre un tejido no relacionado (mecanismo de hipersensibilidad tipo III en la clasificación de Gell y Coombs). Los complejos formados en los líquidos intercelulares o en cualquier sitio del organismo, pasan a la circulación general y, dependiendo de su tamaño (determinado por la proporción entre los 2 reactantes y otros factores), pueden ser eliminados o circular y depositarse en los tejidos. De éstos, los más afectados son aquellos que poseen extensas membranas filtrantes (riñón, pulmón, articulación, plexo coroideo). Los factores del complemento, las células granulocíticas y los monocitos son atraídos a los sitios de depósito de complejos inmunes y su intervención provoca la muerte celular.

3. En el tercer mecanismo, el proceso patológico es causado por linfocitos T sensibilizados contra un tejido propio. Estos linfocitos producen lesiones tisulares por mecanismos que aún no se comprenden completamente, y es probable que en ellos intervenga la liberación de linfocinas destructoras, o que estas sustancias sirvan para atraer otros tipos de células a la lesión, las cuales a su vez producen inflamación destructora(4).

TEORIAS DE INDUCCION DE TOLERANCIA

Los primeros estudios demostraron que la tolerancia a lo propio se adquiere a través de un proceso activo en el que interviene un contacto directo entre los componentes propios y las células reactivas antígeno específicas.

Existen 2 formas de tolerancia: central y periférica. En las formas centrales no se producen anticuerpos después de presentarse el antígeno, ya que los inmunocitos responsables están ausentes (delección clonal) o son silenciados directamente (anergia clonal).

En las formas periféricas, inicialmente se produce una pequeña cantidad de anticuerpos; pero entonces, a causa de la expresión de mecanismos supresores (células T supresora, anticuerpos antiidiotípicos y complejos inmunitarios), la producción de anticuerpos disminuye mucho o cesa del todo(1).

Normalmente las clonas vírgenes de inmunocitos circulan en el organismo esperando el contacto con sus antígenos específicos. Cuando ello sucede, experimentan una transformación blástica y se dividen repetidas veces para producir miles de células descendientes con la misma especificidad, constituyendo así una clona(5).

La teoría de "selección clonal" de Burnet propone que la tolerancia inmunitaria a los antígenos propios es favorecida por un mecanismo que hace que los inmunocitos autorreactivos fetales, en vez de activarse, sean destruidos por contacto con su autoantígeno específico (delección clonal) en esa etapa. Para el desarrollo de la enfermedad autoinmunitaria, Burnet sugirió que los linfocitos precursores comprometidos con antígenos no propios pero semejantes a los antígenos propios, mutan durante su multiplicación y forman accidentalmente linfocitos reactivos a lo propio(1).

Nossal, propuso que en alguna etapa de su diferenciación de células primitivas a células precursoras maduras formadoras de anticuerpos, los linfocitos B atraviesan una fase durante la cual el contacto con un antígeno (endógeno o exógeno) sólo induce tolerancia y no inmunidad. Esta fase se conoce como la "fase sensible a la tolerancia" o "fase paralizante obligatoria"(1).

Otros estudios han demostrado la facilidad para inducir tolerancia en células esplénicas neonatales y células de médula ósea de recién nacidos y adultos con una resistencia concomitante a la inducción de tolerancia en esplenocitos adultos. Los bazoos de animales adultos contienen una subpoblación pequeña de células B inmaduras que pueden hacerse tolerantes con tanta facilidad como las células B neonatales. Este hecho sugiere que la facilidad para inducir tolerancia no es propiedad única de células neonatales sino de células B inmaduras, en general, que se producen de manera continua durante toda la vida(6).

Aunque el aborto o anergia clonal, así como el bloqueo por antígeno, pueden ser medios importantes por los cuales se logra la tolerancia a lo propio, estudios adicionales sugieren que la ausencia de reacciones autoinmunitarias puede ser consecuencia, cuando menos en parte, de una supresión activa y continua ejercida periféricamente por las subpoblaciones de células T llamadas "Células T supresoras". En estos casos, las células T supresoras pueden tener determinantes idiotípicos para interactuar con la célula B que porta el idiotipo complementario y silenciarla, o pueden antagonizar la acción de un linfocito T cooperador(7).

A pesar de que se ha comprobado bien la actividad biológica de las células T supresoras en la inducción de tolerancia y en la regulación de respuestas contra antígenos convencionales, antígenos de trasplantes, etc; aún no se conoce la importancia de estas células en la inducción de tolerancia a autoantígenos y en la prevención de respuestas autoinmunes. Sin embargo, se ha demostrado que el agotamiento de células T supresoras in vitro por exposición a anticuerpos anti I-J(determinantes presentes en las células T supresoras, pero no en las colaboradoras) provoca una respuesta espontánea de autoanticuerpos muy importantes y aumenta la reacción en el cultivo mixto de linfocitos autólogos(1,7).

Se sugieren también otros mecanismos de supresión mediada por anticuerpos o por complejos inmunitarios que incluyen:

- A. El antígeno recubierto o enmascarado por el anticuerpo, bloquea el reconocimiento por los linfocitos portadores del receptor para dicho antígeno.
- B. La activación de las células T supresoras que tienen el receptor para Fc de la IgG, con la liberación subsecuente de factores solubles que suprimen a las células T cooperadoras, y
- C. La estimulación directa de las células B con receptores Fc para secretar factores supresores solubles.

De todo lo anterior se puede deducir que existe una diversidad de medios para inducir tolerancia o no respuesta. Algunos inhiben las respuestas inmunitarias por la vía central al paralizar o silenciar a las células respondedoras, otros actúan periféricamente por conducto de anticuerpos o de células supresoras. No obstante, estos mecanismos no deben considerarse como mutuamente excluyentes. En realidad, parece factible que las diferentes formas del estado de tolerancia son el producto de mecanismos distintos y que varios de estos mecanismos pueden operar al mismo tiempo. Así como los antígenos propios existen en diversas formas y concentraciones, es comprensible que lo mismo puede ocurrir con la tolerancia fisiológica a lo propio(1).

Revisando las evidencias disponibles se debe argumentar que las enfermedades autoinmunes espontáneas resultan de un complejo multifactorial. Factores inmunológicos, genéticos, hormonales, virales y otros, que intervienen en forma independiente o de manera sincronizada entre ellos.

FACTORES INMUNOLOGICOS EN LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES

Entre los factores inmunológicos que pueden dar lugar a la autoinmunidad se cuentan:

1. LIBERACION DE ANTIGENOS SECUESTRADOS:

Algunos tejidos, como el cristalino y el testículo tienen poco contacto con la circulación, de manera que sus antígenos se consideran secuestrados dentro del órgano, ya que están apartados del contacto con el sistema linforreticular. Esto permite que se establezca la tolerancia inmunológica a nivel de las células T o B. Sin embargo, cualquier lesión tisular que permita que el antígeno sea expuesto más tarde durante la vida, podría dar oportunidad para la formación de autoanticuerpos. Por ejemplo, la formación de autoanticuerpos contra el esperma después de la vasectomía, contra los cristalinos después de una lesión ocular, etc. En la mayoría de los casos, la respuesta autoinmunitaria es transitoria y es probable que desaparezca antes de manifestar síntomas clínicos. Al parecer, una enfermedad autoinmune progresiva requiere un antígeno persistente que sea presentado en forma inmunógena.

2. DISMINUCION DE LA FUNCION DE LAS CELULAS T SUPRESORAS:

Las respuestas inmunitarias son normalmente reguladas por interacciones complejas de las células cooperadoras y supresoras y sus productos solubles. De lo anterior, se deriva que la pérdida de la actividad de una subpoblación de células T supresoras específicas para un autoantígeno, o la pérdida no específica de esta clase de células podría tener como consecuencia la aparición espontánea de autoanticuerpos. No obstante, la validez de este concepto es discutido por varias razones:

A. Es muy difícil fundamentar la forma en que un defecto generalizado de las células T pueda manifestarse como una enfermedad autoinmunitaria órgano-específica, y

B. Es igualmente difícil fundamentar la forma en que la eliminación, reducción o disfunción de una subpoblación muy pequeña de células T supresoras que disminuye la actividad de clones de linfocitos específicos pueda expresarse en el comportamiento total de las células T supresoras(7).

C. La existencia de las células T supresoras actualmente está sujeta a discusión. Algunos inmunólogos proponen que aunque existe una actividad supresora, ésta no necesariamente se encuentra asociada a una subpoblación celular en particular, sino que la mayor actividad de los linfocitos Th1 o la mayor liberación de sus productos(interferón-gamma e IL-10 principalmente) influyen negativamente sobre la producción de anticuerpos(que son estimulados por las células Th2).

La disminución numérica o funcional de las células T supresoras totales como factor patogénico en las enfermedades autoinmunitarias generalizadas, está aun en discusión.

Algunos estudios hacen dudar que un defecto generalizado de las células T supresoras o la presencia de anticuerpos timocitotóxicos naturales sean causa de la autoinmunidad. Tal vez cuando se disponga de técnicas más sofisticadas que permitan inducir experimentalmente la eliminación específica in vivo de las células T supresoras específicas para un autoantígeno, se logre aclarar la función de las células T supresoras en la autoinmunidad(1).

3. ESCAPE DE TOLERANCIA A NIVEL DE LA CELULA T Y REMEDO ANTIGENICO:

Es un hecho que la mayor parte de las respuestas inmunitarias requieren de la participación de las células T cooperadoras con las células B. Se ha propuesto que la no respuesta a lo propio es mantenida por una autotolerancia a nivel de la célula T cooperadora. En la activación de tales células por antígenos no propios que dan reacción cruzada con los propios, las células B existentes no tolerantes a lo propio pueden ser activadas para producir autoanticuerpos. Este concepto deriva del trabajo de Weigle y cols(8) quienes encontraron que las células T y B tienen diferentes requerimientos en la concentración de antígeno para la inducción de tolerancia y que el escape a partir de un estado tolerante se presenta más rápidamente a nivel de células T.

Es probable que un nuevo determinante acarreador para el cual no se ha establecido tolerancia pase por alto a las células T tolerantes y las induzca a colaborar con las células B no tolerantes a lo propio para producir autoanticuerpos.

Un acarreador nuevo podría surgir de alguna modificación de la molécula propia, por ejemplo, defectos en la síntesis o anormalidades en la degradación lisosómica, lo cual produce un producto fraccionado y expone nuevos grupos; la combinación con un medicamento; la asociación con un antígeno nuevo que los medicamentos o los virus han inducido sobre la célula; o como resultado de la presencia de antígenos exógenos de reactividad cruzada que proporcionan el nuevo acarreador con capacidad para provocar la formación de autoanticuerpos(1).

4. DEFECTOS TIMICOS

El timo, por medio de su microambiente epitelial y de sus células gigantes alimentadoras, así como de la secreción de hormonas (timopoyetina, timosina) es esencial para la diferenciación de las células T y sus subpoblaciones cooperadora, supresora y citotóxica. No está claro si la autoinmunidad generalizada (como la del lupus eritematoso sistémico) puede ser consecuencia de anormalidades timicas intrínsecas, aunque se han descrito una diversidad de anormalidades hormonales del timo relacionadas con patología autoinmune.

Análisis moleculares actuales y futuros del desarrollo ontogénico de este órgano, y de la integridad estructural de los receptores de células T para los antígenos podrán proporcionar mayor información sobre el papel del timo y las células T en la patología autoinmune(1).

5. ACTIVADORES EXÓGENOS POLICLONALES DE CÉLULAS B

La característica fundamental de muchas, sino de todas las enfermedades autoinmunitarias, es la síntesis de anticuerpos por las células B contra antígenos propios. Aunque esta anomalía puede ser secundaria a defectos de la célula T, también debe considerarse la posibilidad alterna de que uno o más defectos de la célula B sean la causa primaria de la autoinmunidad. Las deficiencias de las células B podrían inducir en forma secundaria, anomalías de las células T que también contribuirían a acelerar el proceso patológico. Los defectos de las células B pueden ser intrínsecos y de origen genético. Por ejemplo, la capacidad de ciertas clonas de células B autorreactivas para responder con exageración a diversos estímulos. En otros casos, los activadores pueden ser extrínsecos, por ejemplo, los mitógenos endógenos o exógenos llamados "activadores policlonaes".

La hipótesis de que los activadores policlonaes de las células B pueden inducir la producción de autoanticuerpos se basa en la existencia de células B en el organismo que no son tolerantes a lo propio y en la capacidad de los mitógenos para estimular las células B ya sea directamente o sustituyendo a las células T cooperadoras.

Activadores policlonaes de linfocitos B:

Lipopolisacáridos(LPS)

PPD

Proteína A de *Staphylococcus aureus*

Mitógeno hidrosoluble de *Nocardia*

Lípido A asociado a proteínas

2-Mercaptoetanol (2-ME)

Alfa-Tioglicerol

Linfocinas derivadas de macrófagos y de células T

Fragmento Fc de las inmunoglobulinas

Enzimas proteolíticas como tripsina

Polianiones, por ejemplo, sulfato de dextrán

Antibióticos: nistatina y anfotericina B

Mycoplasma

Algunos virus y componentes virales (EBV, gp70, sarampión)

Parásitos (*Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium malarie*).

6. DEFECTO DE LOS MACROFAGOS

Hay muy poca información sobre el estado funcional de las células fagocíticas mononucleares en los trastornos autoinmunitarios. En los seres humanos con estos trastornos se ha descrito una disminución *in vivo* de la depuración de complejos inmunes, como los eritrocitos sensibilizados con su anticuerpos.

En la actualidad aún no está claro si éste es un defecto primario consecutivo a la disminución del número de receptores Fc y/o su función, o es secundario a la ocupación de los receptores por complejos inmunes circulantes. Además de los receptores Fc, en los últimos años se han descubierto defectos en el número de receptores CR1 que se encuentran en la superficie de eritrocitos de pacientes con enfermedades autoinmunes tales como lupus y artritis reumatoide. Al igual que los defectos en los receptores Fc, no se sabe si es un problema primario, o consecutivo a la enfermedad(1).

7. EXPRESION ABERRANTE DE LOS ANTIGENOS DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD (CMH) CLASE II

Se ha pensado que en la patogenia de las enfermedades autoinmunes participan variaciones genéticas o inducidas de moléculas no modificadas HLA-DR. La expresión aumentada de moléculas DR por células presentadoras de antígeno, puede desencadenar reacciones autólogas intensas de linfocitos cuyas linfocinas pueden inducir la diferenciación de células B activadas por autoantígenos. De manera alterna(9), también se pueden expresar en forma ectópica antígenos CMH clase I o II, permitiendo en consecuencia, que se acumulen en estos sitios células T cooperadoras/inductoras o citotóxicas. Mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) y con anticuerpos monoclonales anti-DR, se encontró que el epitelio normal de la tiroides no expresa antígenos DR. En contraste, en la mayoría de las tiroides de pacientes con enfermedad de Graves se demostró tinción alta de células epiteliales para este antígeno. La producción aberrante de antígenos DR expone los antígenos de histocompatibilidad clase II que requieren los linfocitos cooperadores para reconocer al antígeno. No se conocen los mecanismos que causan la expresión aberrante de antígenos DR. Se ha comprobado que el interferón podría activar la expresión de moléculas DR sobre membranas de células epiteliales y, en consecuencia, permitir el reconocimiento de autoantígenos tiroideos por células T.

8. DEFECTOS EN LA PRODUCCION Y RESPUESTA A SEÑALES ACCESORIAS PARA LA PROLIFERACION Y DIFERENCIACION DE LA CELULA B

Se sabe que al igual que la célula T, una célula B en reposo se transforma en una clona de células que secretan inmunoglobulinas, sólo después de una serie de fenómenos de proliferación y diferenciación.

En general, las células B en reposo necesitan cuando menos 3 diferentes señales para generar clones de células productoras de anticuerpos en respuestas dependientes(TD) o independientes(TI). Para respuestas TD se genera una señal cuando las TH reconocen los determinantes DR junto con el antígeno en la superficie de la célula B; otra se genera cuando la célula B reconoce específicamente al antígeno (hapteno) a través de la inmunoglobulina de superficie. Estas 2 señales se necesitan para activar a las células B en reposo. En ese momento, las células B activadas adquieren receptores para una tercera señal independiente de antígenos derivados de las células TH.

En el caso de los antígenos TI, el requerimiento de la señal TH restringida por CMH es innecesario debido a la actividad policlonal de antígenos TI de clase I (lipopolisacáridos), o por unión cruzada de los receptores de antígenos de las células B por antígenos multivalentes TI clase 2 (ficoll). A pesar de brincar el paso restringido por CMH, se necesitan factores derivados de TH inespecíficos para las respuestas a los antígenos TI. Por consiguiente, se requieren señales inespecíficas de antígenos provenientes de TH como vía común final en la activación de células B por antígenos TD y TI. Algunos estudios sugieren que los factores TH que actúan en las células B pueden clasificarse en 2 grupos:

- A. Factores de crecimiento de células B (como IL-4 e IL-5), que estimulan la proliferación.
 - B. Factores de diferenciación de células B (como IL-6), que estimulan la maduración y secreción de inmunoglobulinas.
- La proliferación y la diferenciación son fenómenos que se controlan en forma independiente.

De todo lo anterior resulta obvio que los defectos en los requerimientos de señales sobre la producción de factores o las respuestas anormales de células B a estos factores pueden ocasionar hipergamaglobulinemia, producción de autoanticuerpos, y por último, enfermedades autoinmunes generalizadas(1).

2. DEFECTOS EN LA RED IDIOTIPO-ANTIIDIOTIPO

Normalmente, los receptores de los linfocitos T y B y, además, los productos solubles de estos últimos, pueden expresar determinantes idiotípicos o antiidiotípicos mediante los cuales se regulan las respuestas autoinmunitarias. Los anticuerpos antiidiotípicos pueden suprimir o amplificar las respuestas inmunitarias.

Un anticuerpo dado, así como un autoanticuerpo, podría observarse como el producto tanto de la estimulación original por el antígeno, como de la estimulación por antiidiotipo que puede imitar la acción del antígeno.

De todo esto es posible deducir que las respuestas autoinmunitarias pueden ser consecuencia de defectos en la inmunorregulación que permiten una subproducción o sobreproducción de anticuerpos antiidiotípicos. Tales deficiencias permitirían una formación no supervisada de autoanticuerpos, o una estimulación cíclica de idiotipo en ausencia del antígeno provocador. Por último, los defectos deben estar en conexión con el circuito célula cooperadora para B, célula T supresora y sus idiotipos y antiidiotipos (1).

En resumen, una diversidad de deficiencias inmunológicas de las células T y B pueden provocar la expresión de manifestaciones autoinmunitarias transitorias o permanentes. Ninguno de estos mecanismos excluye a los otros; de hecho, es probable una acción conjunta, ya que los defectos del componente de la célula T son reflejados por la célula B y viceversa. Algunas de estas anomalías, como las que ocurren en las células supresoras o las cooperadoras pueden ser operativas en la enfermedad autoinmunitaria órgano-específica o en la inespecífica, en tanto que otros, como los activadores policlonales de la célula B y la involución tímica temprana, cuyos efectos no son específicos de órgano, podrían relacionarse con más propiedad a las enfermedades generalizadas(1).

FACTORES GENÉTICOS EN LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES

Los genes que codifican para la magnitud y la naturaleza de las respuestas inmunitarias a los antígenos, son los que podrían determinar la susceptibilidad al desarrollo de autoinmunidad. Son los genes CMH y los genes que codifican para los receptores de antígeno en células T y B. Con respecto a las enfermedades autoinmunitarias, se han descrito asociaciones entre la incidencia de algunas enfermedades autoinmunes y la expresión de ciertos genes del CMH o de alotipos de las inmunoglobulinas. Después de revisar el gran número de estudios disponibles, se debe concluir que la mayoría de los padecimientos autoinmunitarios, por lo menos, en las poblaciones caucásicas, están asociados aunque no en un grado muy alto, con los antígenos DR2, DR3, DR4 y DR5.

Es posible que las asociaciones encontradas para las poblaciones caucásicas no ocurran en otros grupos étnicos y viceversa.

Además, no se han observado asociaciones uniformes entre pacientes clasificados como afectados por "enfermedades autoinmunitarias órgano-inespecíficas" con los afectados por "enfermedades autoinmunitarias generalizadas", lo que sugiere, que cada trastorno autoinmunitario tiene, cuando menos en parte, un fondo genético distinto, aunque con frecuencia puede verse la expresión simultánea de múltiples padecimientos autoinmunitarios órgano-específicos con hallazgos serológicos traslapados en un mismo individuo. No se conocen los factores genéticos, ambientales e inmunológicos que predispongan a estas anomalías combinadas(1).

También es conocido que muchas enfermedades autoinmunitarias afectan más al sexo femenino, lo que sugiere, un posible ligamiento con el cromosoma X, aunque esta relación puede deberse a factores hormonales(1).

Aún no se aclara como podrían participar los genes del CMH en la susceptibilidad a la enfermedad. Las posibilidades a considerar incluyen efectos en la magnitud de las respuestas humoral y celular y en la inmunorregulación (función colaboradora, supresora, de las células T); influencias metabólicas especialmente de hormonas esteroides; y efectos en el manejo de antígenos por células fagocíticas.

Con modelos animales se ha podido comprobar que algunos genes que codifican para las regiones variables(V) y constantes(C) de las inmunoglobulinas, también tienen una asociación clara con algunos trastornos particulares, incluyendo enfermedades autoinmunitarias; por ejemplo, la expresión de factores reumatoides en cruces de ratones 129 y C57BL/6 depende en parte de un gen ligado al locus C(1).

Ya que los determinantes idiotípicos en las membranas de los linfocitos parecen tener funciones muy importantes en la regulación inmunitaria, el desarrollo de técnicas para su valoración, tales como la tecnología de los hibridomas que hacen posible la obtención de idiotipos y antiidiotipos monoclonales, pueden proveer nuevas formas de mejorar el análisis genético de los trastornos autoinmunitarios(1).

FACTORES HORMONALES EN LA AUTOINMUNIDAD

Las hormonas sexuales, así como los genes ligados al cromosoma X o Y pueden influir en la expresión de las enfermedades autoinmunitarias. Es bien conocido que las hormonas de las glándulas hipófisis, tiroides, paratiroides, suprarrenales y gónadas afectan la homeostasis del sistema linfoide y por tanto, también afectan las respuestas a los antígenos.

Están establecidos muchos de los efectos de las gónadas sobre la respuesta inmunitaria y sobre la enfermedad autoinmune. En general, las personas del sexo femenino son mucho más susceptibles a la mayor parte de las enfermedades del tejido conectivo que los del sexo masculino. La explicación para esta diferencia sexual no está clara, pero los estudios experimentales y clínicos tienden a implicar, por lo menos en parte, a las hormonas sexuales femeninas más que a los genes asociados al cromosoma X(1,2)

Los conocimientos actuales sugieren que la estimulación estrogénica crónica interviene de manera importante en la prevalencia del lupus eritematoso generalizado en los individuos del sexo femenino.

FACTORES VIRALES EN LA AUTOINMUNIDAD

Los virus pueden adquirirse por transmisión horizontal o vertical y pueden promover reacciones autoinmunitarias mediante varios mecanismos. Entre ellos, la activación policlonal de células B; la liberación de organelos subcelulares después de un ciclo lítico viral; fenómenos de reconocimiento asociativo (la inserción de antígenos virales en las membranas celulares provoca reacciones contra componentes propios preexistentes); y alteraciones de la inmunoregulación como la función supresora.

Entre los virus humanos, el virus de Epstein-Barr (EBV) es el que se relaciona más frecuentemente con las enfermedades autoinmunitarias debido a su ubicuidad, persistencia y capacidad para actuar sobre el sistema inmunológico. Por ejemplo, el EBV actúa como un activador policlonal de las células B que estimula su mitosis y la secreción de inmunoglobulinas, y favorece la síntesis de autoanticuerpos, especialmente el factor reumatoide durante el curso de la infección primaria.

Se ha implicado a otros virus como agentes causales y/o desencadenantes de enfermedades autoinmunitarias humanas: mixovirus, virus de la hepatitis, citomegalovirus, retrovirus y otros. La mayoría de estos virus inducen producción de autoanticuerpos durante las infecciones naturales, las que también pueden presentar características inmunopatológicas semejantes a las de una enfermedad autoinmunitaria, incluyendo vasculitis y glomerulonefritis. Estas, al parecer son causadas más bien por complejos inmunes virus-anticuerpo viral específico, que por complejos antígeno-autoanticuerpo.

En general, los virus, mediante su potencial como activadores policlonales de células B, su capacidad citolítica, sus posibles tropismos por algunas subpoblaciones de células linfoides y su probable capacidad para asociarse con los autoantígenos y convertirlos en antígenos extraños, pueden inducir respuestas aberrantes y autoagresión, con el desarrollo posterior de manifestaciones autoinmunitarias. Sin embargo, para la expresión de las manifestaciones inmunopatológicas se necesita la presencia de un terreno genético predisponente previo(1).

En el caso de la investigación que nos ocupa, hemos tomado como sujeto de estudio a pacientes con lupus eritematoso sistémico(LES), por ser la enfermedad autoinmune más reconocida, donde se producen autoanticuerpos contra una gran variedad de antígenos propios. Es probable entonces, que en estos pacientes se puedan encontrar los anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos, tan relacionados con las vasculitis como comentaremos más adelante.

1.2. LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO

Se trata de una enfermedad inflamatoria crónica generalizada, con mucha variabilidad en la presentación clínicas de los pacientes, y que sigue un curso de exacerbaciones y remisiones alternadas. La afección de múltiples órganos es característica durante los períodos de actividad de la enfermedad. Aunque es considerada el prototipo de una enfermedad autoinmune y se presume que los mecanismos de daño tisular y de órganos sistémicos es de naturaleza inmunitaria, la verdadera causa de la enfermedad es desconocida(2). Afecta predominantemente a mujeres (8:1) en edad reproductiva, sin embargo, la edad de comienzo fluctúa entre 2 y 90 años. La frecuencia es mayor en individuos no caucásicos (principalmente los de raza negra) que en los sujetos de raza blanca. Un rango ordenado de frecuencia probablemente sería así: Negros-Chinos-Latinos-Asiáticos-Blancos(2).

PATOGENIA

El descubrimiento del fenómeno LE del lupus eritematoso por Hargraves et al. en 1948 marcó el principio de la era moderna en la investigación de la patogenia de la enfermedad; esto condujo al descubrimiento de anticuerpos antinucleares en el suero de enfermos con LES. Estudios posteriores establecieron la importancia de los complejos inmunitarios que contenían antígenos nucleares, especialmente DNA, en la producción de glomerulonefritis(GN) lúpica(1).

La reducción del complemento en el suero y la presencia de anticuerpos anti-DNA de doble hélice(ds) son actualmente correlaciones rutinarias de laboratorio en el LES activo.

En su patogenia, el mecanismo de daño que se considera más importante es la hipersensibilidad tipo III con el depósito de complejos inmunes formados por los autoanticuerpos que conducen a vasculitis y otros procesos inflamatorios(2).

Los anticuerpos linfocitotóxicos (con especificidad predominante para los linfocitos T) ocurren en la mayoría de los pacientes con LES y son capaces de destruir los linfocitos T en presencia de complemento, especialmente cuando pertenecen a la clase IgM. Por otra parte, al recubrir las células T de sangre periférica pueden interferir en la tipificación de los HLA y otras características de membrana, además de alterar actividades funcionales como la respuesta proliferativa a los aloantígenos. Estos anticuerpos tienen especificidad por los antígenos de superficie de las células T y pueden ser liberados de la superficie de los linfocitos en forma de complejos antígeno-anticuerpo específicos; tales complejos pueden a su vez fijarse y bloquear la función de otros linfocitos, o pueden contribuir al depósito general de complejos inmunes de esta enfermedad que conduce a vasculitis y nefritis(1). Se encuentra una gran variedad de otros autoanticuerpos en el LES. Son frecuentes los antieritrocitos, antiplaquetas, y antineutrófilos. Con menor frecuencia, los antimúsculo liso, antimitocondria, antifosfolípidos, contra factores de la coagulación y contra ciertos órganos como riñón, corazón y pulmón.

El estudio de cierto número de familias ha demostrado la existencia de susceptibilidad determinada genéticamente al desarrollo de LES. En parte, la formación de anticuerpos está determinada genéticamente; por ejemplo, es más probable, que los pacientes HLA-DR2 produzcan anticuerpos anti-DNA-ds, en tanto que quienes tienen HLA-DR3 y HLA-DR7 producen anticuerpos anti-SS-A(1).

La disminución de los niveles séricos del complemento es una característica predominante del LES activo, y se debe en gran medida a consumo por parte de los numerosos complejos antígeno-anticuerpo. También está relacionada con una deficiencia genética de algunos componentes del complemento, que se presenta con mayor frecuencia en los pacientes de LES que en la población general. Cerca del 6% de ellos son heterocigotos para la deficiencia de C2, comparado con el 1% de la población normal.

Los receptores de C3b en la superficie de los eritrocitos (CR1) están reducidos en el LES. Inicialmente se pensó que esto se debía a una deficiencia genética, pero estudios posteriores han revelado que es un factor secundario a la enfermedad(2).

También se han reportado deficiencias en la capacidad de aclaramiento de complejos inmunes circulantes en el LES, tanto por su cantidad excesiva como por alteraciones asociadas de la fagocitosis que aún no están bien definidas.

En el laboratorio clínico la anormalidad de la respuesta inmune celular y humoral se evidencia en la linfopenia, hipergamaglobulinemia, disminución de niveles del complemento y presencia de autoanticuerpos múltiples en el suero de los pacientes.

ETIOLOGIA

La verdadera etiología del LES no es conocida con certeza, sin embargo, se han sugerido algunos mecanismos o combinaciones de mecanismos que pueden hacer surgir el lupus en el ser humano:

1. Fallas inmunorregulatorias determinadas genéticamente, por ejemplo, daño en el circuito de supresión para la producción de anticuerpos.
2. Alteración de la capacidad para reparar fragmentos de DNA.
3. Influencias estrogénicas en el reconocimiento de lo propio y quizá, en la regulación de anticuerpos.
4. Factores desencadenantes tales como drogas, agentes infecciosos, estrés y otros.

Existe la impresión de que una infección viral o bacteriana precede a la activación de la enfermedad en una gran parte de los casos. Sin embargo, los síntomas de una infección viral (fiebre, malestar, escalofríos, artralgias) son producidos en gran medida por el interferón-gamma, el cual, es un mediador que podría ser el precursor real de la desestabilización inmunológica y no del proceso infeccioso en sí(2).

CARACTERISTICAS CLINICAS

El Lupus Eritematoso generalizado se presenta con un patrón clínico muy heterogéneo. El comienzo puede ser agudo o insidioso. Los síntomas generales incluyen fiebre, pérdida de peso, malestar y letargo. Cualquier órgano de cualquier sistema puede estar afectado, pero los más frecuentes son:

1. PIEL: La lesión cutánea más común es una erupción eritematosa que afecta zonas del cuerpo expuestas de manera crónica a la luz ultravioleta.

Relativamente pocos pacientes presentan la erupción clásica en "alas de mariposa" sobre las eminencias malares. Son comunes las lesiones vasculíticas, que varían desde la púrpura palpable al infarto digital. Además, se pueden observar una gran variedad de lesiones como vesículas, manchas de púrpura, urticaria, edema angioneurótico, manchas de vitiligo, nódulos subcutáneos y engrosamientos difusos de la piel.

2. ARTICULACIONES Y MUSCULOS: La poliartralgia o artritis es la manifestación más común del LES (90%). La artritis es simétrica y puede afectar casi cualquier articulación del cuerpo. La necrosis avascular ósea es un hallazgo frecuente en el LES, tanto por la enfermedad misma como por la administración de corticosteroides que son los agentes terapéuticos más importantes en estos pacientes. También son comunes las mialgias con o sin miositis franca.

3. MEMBRANAS SEROSAS: El derrame pleural es una manifestación frecuente, de poca monta por lo general. La pericarditis es la forma más común de afección cardíaca y puede ser la primera manifestación de LES. La peritonitis por sí sola resulta rara aunque 5 a 10% de los enfermos con pleuritis y pericarditis tienen peritonitis concomitante.

4. PULMON: La forma más común de afección pulmonar lúpica es la enfermedad pulmonar intersticial restrictiva que puede ser a veces asintomática e identificable sólo mediante pruebas de función pulmonar. Otras manifestaciones pulmonares pueden ser hipertensión pulmonar, hemorragia alveolar, neumotórax, hemotórax y vasculitis.

5. CORAZON: La miocarditis es poco frecuente, pero cuando se presenta puede llevar a la insuficiencia cardíaca congestiva con taquicardia, ritmo de galope y cardiomegalia. Pueden presentarse alteraciones en las válvulas cardíacas, y cada vez se descubren con mayor frecuencia coronariopatías, posiblemente relacionadas con la corticoterapia.

6. RIÑON: La nefritis constituye una característica frecuente y grave de los enfermos con LES. Se ha encontrado que hasta el 75% de los pacientes tienen esta complicación en la necropsia. Hay 4 patrones de lesión renal con características histológicas precisas: la glomerulonefritis mesangial, glomerulonefritis focal, glomerulonefritis proliferativa difusa, y glomerulonefritis membranosa. La mayor parte de estas lesiones llevan al paciente a la insuficiencia renal crónica en algún momento de su vida.

7. SISTEMA NERVIOSO: Los trastornos de conducta, la psicosis o la depresión, constituyen manifestaciones comunes de afección del sistema nervioso central. Pueden presentarse también una variedad de síntomas de daño orgánico como convulsiones, parálisis de los nervios craneales, meningitis aséptica, migraña, neuritis periférica y accidente vascular cerebral, entre otros..

8. APARATO DIGESTIVO: Con poca frecuencia se puede presentar ulceración gastrointestinal debida a la vasculitis, así mismo la pancreatitis y la hepatitis aguda y crónica.

9. SISTEMA VASCULAR: La lesión histológica característica en el LES activo es la vasculitis de pequeños vasos, que puede afectar a cualquier órgano. A nivel de la piel, las manifestaciones de su presencia incluyen hemorragias en astilla, oclusiones periungueales, infartos de la pulpa digital y úlceras atróficas. Las gastrointestinales son dolor abdominal, diarrea, hemorragia, pancreatitis, y colecistitis. La neuropatía periférica en "media y guante" que suele encontrarse en el LES se debe a vasculitis de los vasa nervorum. También hay arteritis de vasos medianos, que incluye arterias de más de 1 mm de diámetro. Las manifestaciones varían desde el infarto (intestinal, pulmonar, cerebral), a las trombosis profundas y accidentes cerebrovasculares.

DIAGNOSTICO INMUNOLOGICO

A nivel de laboratorio clínico inmunológico, como ya se ha mencionado, se encuentra hipergamaglobulinemia, disminución de niveles de factores del complemento, y presencia de autoanticuerpos diversos en el suero (cuadro 1). Entre estos últimos tenemos:

Anticuerpos antinucleares(ANA): Las inmunoglobulinas de todas las clases pueden formar anticuerpos antinucleares. En la inmunofluorescencia se han descrito varios patrones que poseen significado clínico: patrón homogéneo, periférico, moteado y nucleolar. Los anticuerpos antinucleares poseen especificidades contra diferentes antígenos del núcleo. De ellos, los anticuerpos anti-DNA tienen especial importancia, ya que se consideran característicos del LES .

En el suero de pacientes con LES se pueden hallar 3 tipos de anticuerpos anti-DNA: (1) anticuerpos anti-DNA de una sola cadena (anti-DNA-ss). (2) anticuerpos para el DNA de doble cadena o "nativo" (anti-DNA-ds) y (3) anticuerpos que reaccionan con el DNA-ss o el DNA-ds.

Estos anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas de clase IgG o IgM. Los títulos altos de anticuerpos anti-DNA-ds se encuentran sólo en el LES. En contraste, los anticuerpos para el anti-DNA-ss son inespecíficos y pueden hallarse en otras enfermedades autoinmunitarias, por ejemplo, artritis reumatoide, hepatitis crónica activa y cirrosis biliar primaria.

La fijación del complemento y los anticuerpos anti-DNA-ds de elevada avidéz están íntimamente ligados con la aparición de trastorno renal. La cantidad de anticuerpo se correlaciona bien con la actividad de la enfermedad y el título de anticuerpos disminuye cuando los enfermos entran en remisión.

Anticuerpos antieritrocitos: Estos anticuerpos son inmunoglobulinas IgG y/o IgM y pueden ser detectados mediante la prueba de Coombs directa. La frecuencia de estos anticuerpos en los pacientes de LES no se conoce con exactitud, pero fluctúa de 10 a 65%.

Anticoagulantes circulatorios y anticuerpos antiplaquetarios: En el 10 a 15% de los pacientes con LES se produce una sustancia anticoagulante que circula en la sangre y prolonga los tiempos de tromboplastina parcial y de protrombina. Se trata de un anticuerpo dirigido contra un fosfolípido y por esta razón se presenta con más frecuencia en los enfermos con una reacción VDRL positiva falsa. Como hecho interesante, el anticoagulante del lupus puede tener actividad anti-DNA-ds.

También se han descrito anticuerpos específicos para anti-factor VIII; estos anticuerpos son anticoagulantes potentes y pueden asociarse con hemorragias. Los anticuerpos antiplaquetas las plaquetas se encuentran en 75 a 80% de los enfermos con LES; probablemente, inducen trombocitopenia por efecto directo sobre la membrana de la superficie de las plaquetas, o por fijación de complemento.

AUTOANTICUERPOS PRESENTES EN LES

TIPO	ANTIGENO	PATRON EN INMUNO FLUORESCENCIA
ANA	DNA de doble cadena	Periférico
	Complejo DNA-histona	Homogéneo
	Sm	Moteado
	RNP	Moteado
	SS-A/Ro	Moteado
	SS-B/La	Moteado
Anti-DNA	DNA-ss (cadena)	ELISA
	DNA-ds (2 cadenas)	Crytidia
Anti-eritrocitos	Eritrocitos	Prueba de Coombs
Anti-plaquetas	Fosfolípidos	ELISA
Anti-linfocitos	Linfocitos	-----

Cuadro 1. Muestra algunos de los autoanticuerpos producidos en el LES con sus respectivos epitopes antigénicos y patrones de inmunofluorescencia.

Anticuerpos anticitoplásmicos: Se han encontrado numerosos anticuerpos contra antígenos citoplásmicos sobre sustratos de células proliferativas en los enfermos de LES, como los antimitocondriales, antirribosómicos y, antialcohólicos. Los anticuerpos antirribosómicos se encuentran en el suero del 25 a 50% de los enfermos. El determinante antigénico principal es el RNA ribosomal. Los anticuerpos para las mitocondrias son más comunes en otras enfermedades (por ejemplo cirrosis biliar primaria) que en el LES(1).

Anticuerpos de reacción cruzada: Un anticuerpo que puede reaccionar con antígenos propios, no necesariamente es generado inmunogénicamente por un autoantígeno. Ya que es difícil inducir experimentalmente anticuerpos anti-DNA-ds, una reactividad cruzada entre, por ejemplo, carbohidratos de la superficie bacteriana y estructuras de firmeza en las proteínas nucleares, es una explicación más probable para la generación de anticuerpos antinucleares(2).

INMUNOFLUORESCENCIA

La técnica de inmunofluorescencia (IF) fue usada por primera vez por Coons y colaboradores para estudiar la localización de antígenos tisulares utilizando anticuerpos marcados con fluoresceína(10). La tinción fluorescente se utilizó como marcador ligado químicamente al anticuerpo específico y no alteraba la reactividad inmunológica. Los 2 fluorocromos más utilizados actualmente son la fluoresceína y la rodamina o sus derivados estables. El preparado más popular utilizado en el laboratorio clínico es el antisuero conjugado, fluoresceín-isotiocianato. El derivado del isotiocianato es estable y se une a los grupos aminos libres de las proteínas para formar un enlace carbamido.

Los métodos que utilizan anticuerpos marcados por fluorescencia se utilizaron primero para la detección y localización de reacciones de antígeno y anticuerpo. Dicho procedimiento se ha utilizado para el descubrimiento de anticuerpos específicos en el suero de los pacientes; localización de antígenos, anticuerpos, complemento y complejos inmunes en distintas células y tejidos; localización y destino de antígenos extraños inyectados; localización y lugar de multiplicación de agentes infecciosos para su uso en el diagnóstico rápido de infecciones microbianas; localización de diversas hormonas y enzimas en células y tejidos; cuantificación de antígenos y anticuerpos con una sensibilidad comparable a la técnica de radioinmunoanálisis(RIA).

Hay diversos métodos que utilizan anticuerpos marcados con fluoresceína, los más habituales son: el directo, el indirecto, la inhibición y los de tinción del complemento (10).

En el método directo, el anticuerpo fluoresceinado se utiliza para detectar la presencia del antígeno en el tejido fijado en un portaobjeto. Los anticuerpos fluoresceinados en su dilución óptima se añaden al antígeno, se incuban 30 minutos a 37°C o a temperatura ambiente y el portaobjeto se lava para eliminar el exceso de anticuerpos que no reaccionaron. Los frotis son secados y montados con glicerina diluida para su examen en el microscopio fluorescente.

El método indirecto se usa para la detección de antígenos desconocidos en preparados históricos o de anticuerpos no conocidos en el suero de los pacientes. La reacción específica antígeno-anticuerpo (ambos sin marcar) puede ser visualizada mediante la adición de anticuerpos marcados dirigidos contra el anticuerpo en la primera reacción. El método indirecto ofrece la ventaja de utilizar una antimaglobulina marcada para detectar muchas reacciones antígeno-anticuerpo específicas. En la detección del antígeno o anticuerpo desconocidos, los preparados históricos o el frotis se hacen reaccionar durante 30 a 60 minutos a temperatura ambiente o a 37°C. La preparación es cuidadosamente lavada para eliminar anticuerpos no marcados que no se hayan conjugado con el antígeno. El anti-anticuerpo marcado se incuba a continuación con la preparación como en la técnica directa.

El método de la inhibición se utiliza principalmente para probar la especificidad de los anticuerpos en la prueba directa. Se satura el antígeno con anticuerpo no marcado y la siguiente exposición a un anticuerpo específico marcado, no permite detectar fluorescencia antigénica.

El método de tinción del complemento es una modificación de la técnica indirecta para detectar anticuerpos fijadores del complemento. Después de haber aplicado el anticuerpo se añade complemento fresco (generalmente de cobayo) que se fija alrededor del lugar donde se han unido los anticuerpos, y finalmente, el complejo antígeno-anticuerpo se hace reaccionar con anticomplemento marcado dando como resultado la fluorescencia de los complejos fijadores del complemento.

La inmunofluorescencia es una técnica muy útil que se ha empleado durante mucho tiempo como prueba de rastreo, como prueba diagnóstica en algunos casos y como marcador de la actividad de la enfermedad en otros. Además, tiene la ventaja de una gran disponibilidad de reactivos y procedimientos bien caracterizados y estandarizados.

En el LES, la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) es la prueba más utilizada para la identificación de los autoanticuerpos presentes en el suero de los pacientes. El patrón y la concentración obtenidos marcan la actividad de la enfermedad.

Por todo lo anterior, se utiliza en este trabajo la técnica de IFI para la búsqueda de los anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos en el suero de los pacientes con LES.

TRATAMIENTO

El tratamiento médico del LES incluye la administración de glucocorticoides e inmunosupresores (azatioprina, ciclofosfamida). Estas drogas son de uso restringido en la clínica ya que por sí mismas provocan efectos indeseables y peligrosos para el paciente. Es importante entonces encontrar la dosis adecuada para cada paciente, evitando las complicaciones. Esto implica que el tratamiento debe ser monitorizado continuamente, siendo de gran ayuda las pruebas inmunológicas ya mencionadas.

COMPLICACIONES Y PRONOSTICO

La insuficiencia renal y la afección del sistema nervioso central son aún las causas principales de fallecimiento por actividad de la enfermedad. Sin embargo, las complicaciones debidas al tratamiento, como la aterosclerosis inducida por esteroides, la infección y el cáncer inducidos por el uso de citotóxicos están en constante aumento. La tasa de supervivencia a 5 años de los enfermos con LES ha mejorado notoriamente durante la última década y en la actualidad se aproxima a 80 - 90%(1).

1.3. ANTICUERPOS ANTICITOPLASMA DE NEUTROFILOS (ANCA).

Entre los múltiples autoanticuerpos que se pueden determinar en el suero de pacientes con problemas autoinmunes, se encuentran los anticitoplasma de neutrófilos, que han adquirido últimamente importancia diagnóstica en algunas enfermedades.

RESEÑA HISTORICA

Los ANCA fueron descubiertos incidentalmente durante una técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) que utilizó leucocitos de donadores como sustrato celular para una determinación rutinaria de anticuerpos antinucleares (ANA). Una clase de ANCA tipo IgG fue hallado en el suero de una mujer con síntomas de Granulomatosis de Wegeners (WG) (14).

La utilidad de la tinción del citoplasma de granulocitos fue publicada por primera vez en 1982, en un estudio sobre 8 pacientes australianos con glomerulonefritis (GN) necrotizante segmentaria (15,16). Después se publicaron 4 casos más, en Australia, que tenían vasculitis y GN (15-17).

Luego en 1984 van der Woude et al. publicaron un estudio de los sueros de pacientes con WG activa e inactiva comprobada por biopsia, donde encontraron que 9 de 12 pacientes con diagnóstico inicial de WG activa tenían ANCA IgG, mientras que sólo 1 de 7 pacientes con la enfermedad inactiva al momento del estudio tenía estos anticuerpos. Otros 2 de 3 pacientes que presentaban recaída de la enfermedad tenían ANCA de tipo IgG. Se sugirió entonces, que la determinación de ANCA puede ser de ayuda diagnóstica en WG activa y que su presencia puede reflejar la actividad de la enfermedad (14,17).

Los ANCA son autoanticuerpos predominantemente de tipo IgG, específicos para diferentes constituyentes de los gránulos azurófilos de los neutrófilos y los lisosomas de monocitos (15,18). Desde su descubrimiento, los ANCA han sido una ayuda muy útil para el diagnóstico de WG y otras formas de vasculitis como la poliarteritis nodosa.

De acuerdo al primer taller internacional de ANCA (37), estos autoanticuerpos pueden ser determinados por inmunofluorescencia indirecta en células polimorfonucleares normales fijadas con etanol. En este tipo de tinción se pueden distinguir 2 patrones de fluorescencia:

1.- Una tinción granular citoplásmica difusa, que se ha denominado **c-ANCA**, y

2.- Una tinción perinuclear, correspondiente a **p-ANCA**. Esta clase de tinción constituye un artificio de técnica relacionado con la distribución de la mieloperoxidasa (MPO) inducida por la fijación(15,16,19-21).

La explicación del cambio en los patrones de tinción de los neutrófilos con diferentes fijadores se encuentra en que el etanol no previene la migración de MPO hacia el núcleo, donde se une a los ácidos nucleicos cuando la membrana nuclear es permeable. En cambio, la formalina u otros fijan la MPO en los gránulos primarios citoplásmicos(16).

ESPECIFICIDAD ANTIGENICA

Casi desde el principio, se informó que los ANCA tienen especificidad por pequeños polipéptidos de la fosfatasa alcalina(22). Sin embargo, algunos autores(23,24) reportan datos contrarios basados en la demostración de que el marcador antigénico para los ANCA está asociado con los gránulos primarios de los neutrófilos y ya que la fosfatasa alcalina se encuentra localizada exclusivamente en la membrana citoplásmica, es poco probable que sea un epitopo antigénico de estos anticuerpos.

En 1988 Falk et al.(20), establecen que hay como mínimo 2 tipos de ANCA: Uno que produce una tinción perinuclear de neutrófilos fijados con alcohol y que al mismo tiempo reacciona con la MPO en la técnica de ELISA; y otro que produce una tinción citoplásmica difusa de neutrófilos fijados con alcohol y que no reacciona con MPO por ELISA.

En 1989 Harrison DJ y Kharbanda(25) reportan un estudio en el que todos los sueros ANCA positivos reconocen epitopos proteínicos de 45 KD Y 27-29 KD. En otro estudio(23) también se reporta que ANCA reacciona con proteínas de 27-29 KD. En sueros de patrón p-ANCA por IFI se encuentran altos títulos de anticuerpos anti-MPO y anti-elastasa(17,26,27). El patrón c-ANCA es obtenido con anticuerpos dirigidos contra una proteína de 29 KD presente en los gránulos azurófilos de los polimorfonucleares identificada como una proteasa de serina mioide lisosomal(16,17,27-29).

Los resultados presentados durante el tercer taller de ANCA permitieron una mejor definición de la especificidad antigénica de los ANCA (cuadro 2); se confirmó el predominio de 2 antígenos: **proteínasa 3 (PR3)** y **mieloperoxidasa (MPO)**. Están presentes en los gránulos azurófilos de los neutrófilos y tienen la capacidad de interactuar con los ANCA después de la activación inicial de los neutrófilos(18,19,30,31).

Está demostrada también la presencia de autoanticuerpos que se unen a otros componentes de los gránulos azurófilos diferentes de PR3, elastasa y MPO; a la catepsina G(32). Igualmente hay autoanticuerpos que reaccionan con la lactoferrina de los gránulos específicos(33).

La respuesta de anticuerpos en vasculitis ANCA positivas no está restringida a proteínas granulares de los neutrófilos (34): Aunque muchos sueros dan títulos elevados de p-ANCA y c-ANCA por IFI, una pequeña minoría no reacciona con las proteínas clásicas (PR3, MPO, elastasa), si no con un amplio rango de proteínas citosólicas entre las que está la enolasa. Sin embargo, dichos anticuerpos sólo reaccionan con el isómero alfa de la enolasa, sugiriendo que estos anticuerpos reconocen un único epítipo en dicha proteína.

ESPECIFICIDAD ANTIGENICA DE LOS ANCA

c-ANCA	p-ANCA	NO ESPECIFICO
Proteinasa 3 (PR3)	Mieloperoxidasa (MPO)	Alfa-enolasa
	Elastasa	Lactoferrina
	Catepsina G	CAP 57

Cuadro 2. Los principales epítopos de los ANCA son: PR3 para el patrón c-ANCA y MPO para el patrón p-ANCA. También se han demostrado ANCA con especificidad por elastasa, catepsina G y otros.

PAPEL PATOGENICO DE LOS ANCA

¿Cómo pueden los autoanticuerpos presentes en la vasculitis inducir daño tisular?. Una posibilidad es la combinación con el antígeno en la circulación, formando complejos inmunes solubles que si no son removidos rápidamente por el sistema fagocítico mononuclear, se depositan en los tejidos constituyendo el mecanismo tipo III de Gell y Coombs para la producción de daño tisular(22).

Es posible que los ANCA estén directamente involucrados en la patogenia de la vasculitis y la GN ya que ellos pueden ser capaces de activar los neutrófilos aumentando las enzimas líticas, los radicales de oxígeno, y metabolitos lipídicos que pueden dañar los vasos. La presencia de ANCA en enfermedades clínicamente diferentes puede constituir un marcador serológico de patogenia relacionada con el daño vascular; y la presentación clínica puede variar con la distribución de los vasos involucrados(20).

Jennette et al.(15) y Fleur DLM et al.(34) postulan que en los pacientes ANCA positivos habría un evento desencadenante, como por ejemplo una infección viral, que prepara los neutrófilos circulantes permitiendo, por inducción de los ANCA, la activación de los neutrófilos con la subsecuente lesión vascular.

La localización de la lesión vascular puede estar determinada por la concentración local de citocinas o por la funcionalidad de los leucocitos que están circulando a través del vaso. Existen evidencias de que p-ANCA y c-ANCA pueden ejercer un efecto patogénico directo por la unión a neutrófilos activados por citocinas. Desencadenan de esta manera la degranulación y liberación de radicales libres de oxígeno posiblemente vía activación del segundo mensajero proteína cinasa C. Además la liberación local de enzimas lisosómicas resulta en un daño del tejido perivascular(35).

El hecho de que la respuesta de anticuerpos no esté restringida a proteínas granulares y sea heterogénea en su especificidad, contradice la idea de una respuesta inmune restringida a antígenos presentes en los neutrófilos y sugiere que los autoanticuerpos en vasculitis pueden tener otras especificidades(34).

Finalmente, si la respuesta de autoanticuerpos es patogénica o no, depende de muchos factores incluyendo la accesibilidad del antígeno por el inicio del mecanismo efector, y las características de los autoanticuerpos producidos tales como especificidad de epítopo, avidéz, subclases e idiotipo(34).

ASOCIACION DE ANCA A ENFERMEDADES

Desde los primeros trabajos publicados que informan la presencia de ANCA se encontró su asociación con diversas enfermedades, principalmente GN necrotizante segmental, WG y otras vasculitis(14).

En muchos estudios se ha comprobado la aparición del patrón de tinción c-ANCA de neutrófilos fijados con alcohol en el suero de pacientes con WG(14,17,18,20-23,28,31,37-43). Se discute su papel en la patogenia de la enfermedad(18,22,31,35,36) y su concentración en el suero se ha correlacionado con la actividad de ella(14,18,24,34,36,40). Igualmente, está bien establecida la presencia de ANCA en sueros de pacientes con GN rápidamente progresiva o necrotizante segmental (15,17,19,24,28,41,44,45). La frecuencia de los patrones p-ANCA y c-ANCA correlaciona aparentemente con la localización de la enfermedad, p-ANCA es más frecuente en enfermedades al riñón y c-ANCA es más frecuente cuando hay afección pulmonar(15).

Los ANCA en general se han asociado con enfermedades que tienen como característica común, un proceso vasculítico (22,28,29,44,46,47) y en algunos casos, como WG y poliarteritis nodosa, son útiles para esclarecer su diagnóstico y la actividad de la enfermedad.

Jayne W et al.(44) encuentran la asociación de hemorragia pulmonar severa con ANCA circulantes de tipo IgM en 3 pacientes con vasculitis sistémica. La administración de terapia inmunosupresora se acompañó de un cambio de isotipo a ANCA IgG en los 3 pacientes.

Los ANCA también se asocian a otras enfermedades no vasculíticas, pero que en algún momento desarrollan vasculitis, como la mielodisplasia(48).

En la colitis ulcerosa, la enfermedad de Crohns y la colangitis primaria(32,49) los ANCA tienen como blanco antigénico a la catepsina G (una proteasa de 26 KD contenida en los gránulos primarios de los neutrófilos), lo que sugiere que estas enfermedades pueden tener un mecanismo patogénico común.

En la enfermedad intestinal inflamatoria los anticuerpos anti neutrófilo no reaccionan con MPO, elastasa, o PR3, por lo tanto, dichos anticuerpos son diferentes de los ANCA asociados a vasculitis(15).

Recientemente se ha encontrado el patrón p-ANCA asociado a varias enfermedades y con especificidad antigénica variada. Los anticuerpos antilactoferrina se encuentran en pacientes con colangitis esclerosante primaria, colitis ulcerosa y artritis reumatoide(33,50,52).

Los p-ANCA también han sido encontrados en pacientes con enfermedades autoinmunes del hígado (hepatitis crónica activa, colangitis esclerosante primaria, y cirrosis biliar primaria) (52).

Con base en la revisión de los estudios anteriormente citados y en el hecho conocido de que en el lupus eritematoso sistémico la lesión histológica principal es la vasculitis, el presente estudio pretende evaluar la presencia de ANCA en una población de pacientes con LES juvenil. La determinación de ANCA se llevará a cabo por técnica de IFI en neutrófilos normales fijados con etanol .

2. HIPOTESIS

Entre los numerosos autoanticuerpos que se producen en el lupus eritematoso sistémico, se pueden encontrar los anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA).

3. OBJETIVOS

1.- Estandarizar la prueba de inmunofluorescencia indirecta para la determinación de anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos.

2.- Determinar la incidencia de anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos en los pacientes con lupus eritematoso sistémico juvenil.

3.- Correlacionar los hallazgos clínicos en los pacientes de lupus eritematoso sistémico juvenil con la presencia de anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos en su suero.

4.- Correlacionar las pruebas usuales de control de laboratorio para la actividad del lupus eritematoso sistémico, con la presencia de anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos.

4. MATERIAL Y METODOS

Pacientes: Fueron seleccionados 50 niños en edad pediátrica a los cuales se les realizó el diagnóstico de LES de acuerdo a los criterios de la Asociación Americana de Reumatología (ARA) (2). Los pacientes son controlados en la clínica del CEDI (Clínica de Enfermedades por Daño Inmunológico) del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Grupo control: Un grupo de 30 individuos normales en edad pediátrica y otro de 20 niños con otras enfermedades como dermatomiositis juvenil, fiebre reumática, diabetes mellitus juvenil, hemosiderosis pulmonar, neumopatía crónica y 2 pacientes con diagnóstico de poliarteritis nodosa que sirvieron como control positivo para la presencia de ANCA

Muestras: Suero no descomplementado, a partir de sangre obtenida por punción venosa periférica en condiciones estériles. La separación inmediata de las muestras es seguida por almacenamiento de los sueros en refrigeración a -70°C .

Se revisan los expedientes clínicos de los pacientes que resultaron positivos y se analiza su condición clínica en el momento de la muestra. Se registran datos como: actividad de la enfermedad, presencia de complicaciones y datos del laboratorio clínico.

PREPARACION DEL SUSTRATO: Para la técnica de IFI se preparan laminillas con una monocapa de neutrófilos humanos provenientes de un pool de sangre de individuos normales.

SEPARACION DE NEUTROFILOS

Se obtienen 5 ml de sangre total, heparinizada, de voluntarios sanos(12,13) sin considerar el grupo sanguíneo(12). Son sometidos a un gradiente de Ficoll-Hypaque y centrifugados a 1500 rpm por 30 minutos(11) para extraer la capa de mononucleares de la interfase. Al botón celular que contiene eritrocitos y polimorfonucleares se le añade Dextrán 520000 al 3%(Sigma) en solución salina, y se incuba 1 hora a 37°C para la separación de polimorfonucleares del sobrenadante.

El exceso de eritrocitos es eliminado con solución de lisis en base a cloruro de amonio. El sedimento de polimorfonucleares se lava 3 veces con PBS pH 7.2 conteniendo BSA 1%(12). Las células así obtenidas se ajustan a una concentración de 8×10^5 células/ml en PBS.

PREPARACION DE FROTIS DE POLIMORFONUCLEARES

Se toman 100 μ l de la suspensión anterior de polimorfonucleares y son citocentrifugados a 500 rpm por 3 minutos para obtener un extendido celular homogéneo y bien distribuido, el cual es secado al aire(12,13). Las laminillas ya preparadas, son fijadas con alcohol al 96% durante 5 minutos a 4°C de acuerdo al primer Taller Internacional de ANCA(12) y secadas al aire.

Los frotis ya fijados se pueden almacenar protegidos de la humedad a -80°C durante 4 semanas sin sufrir ningún daño (12,13).

INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA PARA LA DETECCION DE ANCA

Se depositan 40 μ l de los sueros problema y de los controles diluido 1:20 en PBS (12,13) sobre las laminillas, dejándose incuban en cámara húmeda durante 30 minutos para posteriormente lavar. Se toman 40 μ l de conjugado policlonal antigamaglobulina humana FITC (Hoechst-Behring) que ha sido previamente titulado a una concentración óptima de 1:640 y se incuba otros 30 minutos. Es importante evitar el secado total de las láminas después de los lavados(12). Finalmente las láminas son recubiertas con glicerol 2:1 en PBS y con el cubreobjetos correspondiente(12).

La lectura se lleva a cabo en un microscopio con lámpara de fluorescencia de marca Olympus con objetivo de 100X. La preparación se considera positiva cuando se encuentra una fluorescencia clara del citoplasma de los neutrófilos en el caso del patrón c-ANCA o un aumento en la intensidad de dicha fluorescencia en la periferia del núcleo correspondiente al patrón p-ANCA.

Se usan como controles positivos para este ensayo los reactivos positivos para p-ANCA y c-ANCA provenientes de un kit comercial (INOVA-Diagnostic) y como controles negativos suero normal y PBS.

5. RESULTADOS

FROTIS DE POLIMORFONUCLEARES

Para la obtención de una concentración adecuada de polimorfonucleares que permita un extendido celular bien distribuido y homogéneo se citocentrifugaron diferentes volúmenes y concentraciones de células hasta establecer que el volumen de 100 μ l de una concentración de 8×10^7 células/ml dio las condiciones óptimas requeridas para una buena lectura (Fig 1)



Fig 1. Frotis de polimorfonucleares normales fijados con etanol al 96% 5 minutos a 4°C , utilizados como sustrato para la búsqueda de ANCA por IFI

ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE IFI

Después de varios ensayos en los cuales se probaron diferentes diluciones del conjugado policlonal antigamaglobulina humana FITC (Hoechst-Behring) se llegó a la conclusión de que la dilución que permitía la observación de una fluorescencia clara en los casos positivos y que no daba fluorescencia inespecífica que diera lugar a interpretaciones falsas positivas era la dilución 1:640.

Se tomó como referencia para considerar una muestra positiva, una intensidad de fluorescencia igual o mayor a la autofluorescencia que presentan los eosinófilos normales de sangre periférica (fig 2a - 2b) (40).

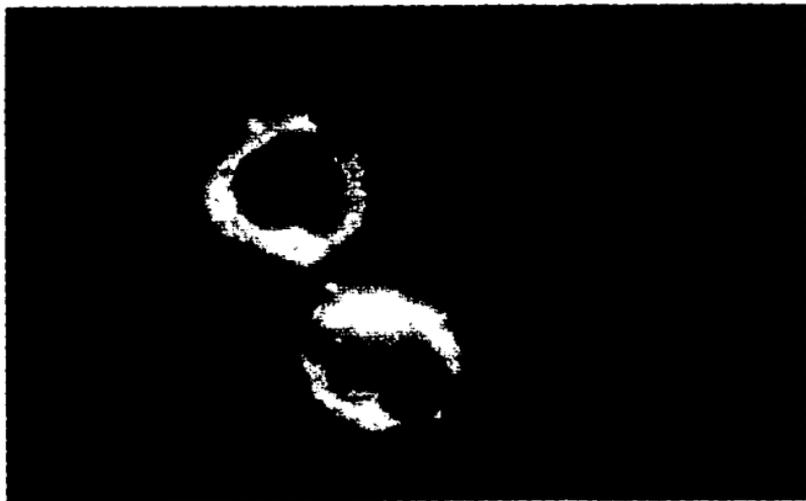


Fig 2a. Patrón c-ANCA observado en el suero de un paciente con LES mediante la prueba de IFI en polimorfonucleares fijados con etanol.

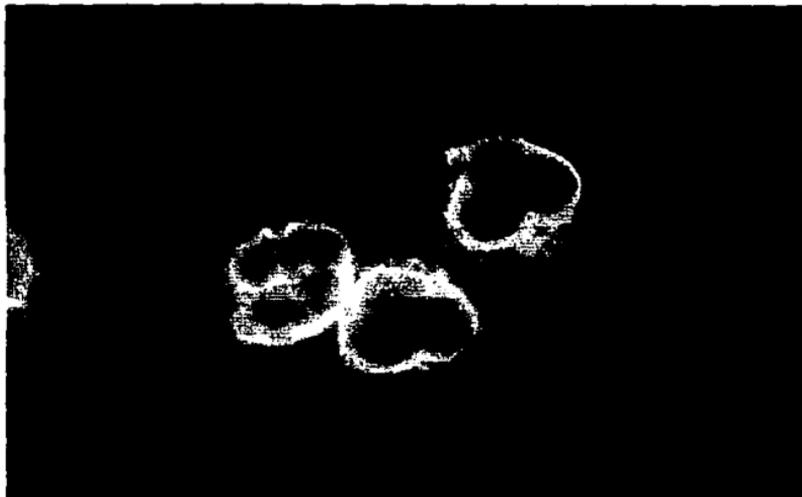


Fig 2b. Patrón p-ANCA observado en el suero de un paciente con LES mediante la prueba de IFI en polimorfonucleares fijados con etanol

ANCA EN LES

Posterior a una adecuada preparación de los frotis de polimorfonucleares se llevó a cabo la técnica de IFI (previamente estandarizada) en 50 muestras de suero de pacientes con diagnóstico confirmado de LES por criterios de la ARA, obteniéndose como resultado la presencia de anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos en 7 de las 50 muestras, esto equivale a un 14 % .

De las 7 muestras que resultaron positivas, 1 dio patrón de tinción c-ANCA (14%), y 6 patrón p-ANCA (86%) (Fig 3).

PATRONES DE ANCA

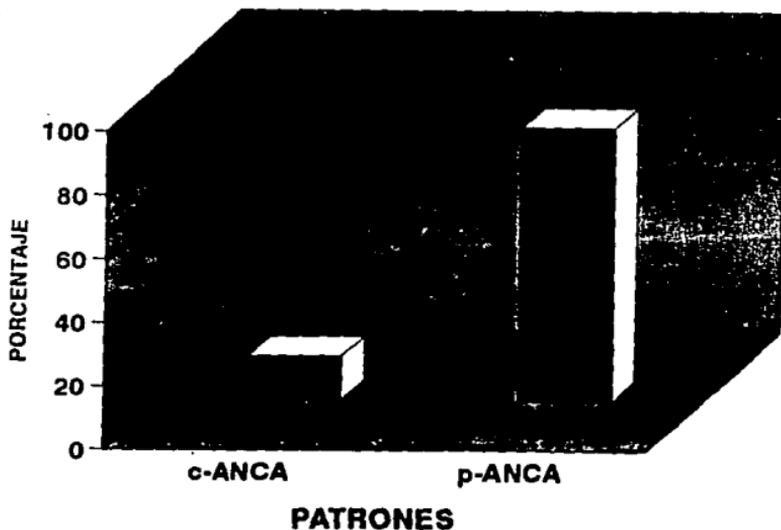


Fig 3. En la prueba de IFI de polimorfonucleares fijados con etanol se encontraron 7 pacientes de LES positivos para ANCA, de los cuales el 86% mostró patrón p-ANCA y el 14% patrón c-ANCA.

ANCA RELACIONADOS CON LAS CARACTERISTICAS CLINICAS DE LA ENFERMEDAD

Todos los pacientes ANCA positivos tienen características clínicas propias de la enfermedad de LES (cuadro 3)

CARACTERISTICAS CLINICAS DE PACIENTES DE LES ANCA POSITIVOS

PACIENTE	1	2	3	4	5	6	7
TIEMPO DE EVOLUCION (meses)	12	0.5	8	48	3	72	ND
DAÑO RENAL	+	-	-	-	+	+	ND
ERITEMA MALAR	+	+	+	+	-	-	ND
VASCULITIS	+	-	+	+	-	-	ND
MIALGIAS ARTRALGIAS	+	+	+	-	-	-	ND
FOTOSENSIBILIDAD	-	+	+	+	-	-	ND
PERICARDITIS	+	-	-	-	+	+	ND
EDEMA	+	-	-	-	-	+	ND
OTROS	PL	-	-	DA	AB	HTA	ND

Cuadro 3: Características clínicas de los 7 pacientes lúpicos ANCA positivos. ND:No determinado, AB:Amaurosis bilateral, PL:Pleuritis, HTA:Hipertensión arterial, DA:Dolor abdominal.

De los 7 pacientes con LES ANCA positivos, 3 presentaron compromiso renal comprobado por biopsia, 3 no tenían afección renal y de 1 no hay datos por no encontrarse el expediente clínico. De igual forma, 4 presentaron eritema malar en una o ambas mejillas en algún momento de su enfermedad y problemas vasculíticos en 3 casos. Compromiso músculo esquelético caracterizado principalmente por mialgias y artralgias al momento de la muestra, se encontró en 3 de los pacientes ANCA positivos. En 3 de los 6 pacientes de los que se tienen datos clínicos se encontró compromiso cardíaco principalmente pericarditis o derrame pericárdico. Así mismo, 3 presentaron fotosensibilidad al comienzo de la enfermedad. En un paciente, al momento de la toma de la muestra, se encontró amaurosis bilateral probablemente secundaria a una neuritis óptica infecciosa. Otras características observadas en diferentes pacientes fueron pleuritis (pac.1), dolor abdominal (pac.4) e hipertensión arterial (pac.6).

ANCA EN EL GRUPO CONTROL

De las 20 muestras provenientes del grupo control con otras enfermedades, se encontró p-ANCA en la muestra de una niña con diagnóstico de lepra y c-ANCA en 2 niños con diagnóstico de poliarteritis nodosa uno comprobado clínicamente y otro por biopsia.

Del grupo control de individuos sanos en edad pediátrica no encontramos en ninguno de sus sueros la presencia de ANCA.

DATOS DE LABORATORIO

Los resultados de las pruebas inmunológicas de los sueros que resultaron ser ANCA positivos se muestran en el cuadro 4.

Las 7 muestras presentan títulos de anticuerpos antinucleares(ANA) elevados en células HEP-2 con diferentes patrones(fig 4). El 29% (2/7) son positivos para DNA. En 3 pacientes se encontró hipocomplementemia, la cual, desde el punto de vista de laboratorio, se puede calificar como debida a la actividad de la enfermedad. Los niveles de inmunoglobulinas varían de un individuo a otro por ejemplo, los pacientes 5 y 6 presentaron una hipogamaglobulinemia marcada de IgG.

**PRUEBAS DE LABORATORIO EN SUEROS
DE LES ANCA POSITIVOS**

PACIENTE	1	2	3	4	5	6	7
ANA Dil. Pat.	2560 MF	640 MF	2560 C	2560 MF	160 MF	1280 H	1280 H
DNA	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Pos
C3 mg/dl	86.9	55.8	43.6	68.6	88.8	104	109
C4 mg/dl	24,8	9.24	5.9	11.5	15.7	18	23.8
IgG mg/dl	---	2110	1720	1900	< 640	300	1830
IgA mg/dl	---	425	226	213	215	404	230
IgM mg/dl	---	304	204	247	166	94.2	98.5
ANCA	p	p	p	p	p	p	c

Cuadro 4. Pruebas inmunológicas de control de actividad de la enfermedad efectuadas en el suero de los pacientes de LES que resultaron ser ANCA positivos. Dil:Dilución, Pat:Patrón, MF:Moteado fino, C:citoplásmico, H:Homogéneo, Pos:Positivo, Neg:negativo, c:Patrón citoplásmico(c-ANCA) y, p:Patrón periférico(p-ANCA).

PATRONES DE ANA EN SUEROS ANCA POSITIVOS



Fig 4. Todos los sueros de los pacientes lúpicos que fueron ANCA positivos tenían anticuerpos antinucleares con diferentes patrones. El 57% (4/7) tenía patrón moteado fino, el 29% (2/7) patrón homogéneo y el 14% (1/7) tenía patrón citoplásmico.

6. DISCUSION

Los anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA) han sido estudiados en un amplio espectro de enfermedades, principalmente las vasculitis entre las que se incluyen granulomatosis de Wegener(14,17,18,20,23,28,31,37-43), poliarteritis nodosa(PAN)(15,16,20,28), glomerulonefritis crescética necrotizante(GNCN)(15,17,19,24,28,41,44,45), y el síndrome de Churg Strauss. De ellas, la más importante en este sentido es la granulomatosis de Wegener ya que la presencia de ANCA en ella es altamente específica (98%) para la enfermedad activa. También se han descrito en otras enfermedades no relacionadas como glomerulonefritis inducida por hidralazina, enfermedad antimembrana basal glomerular, enfermedad de Chron, colitis ulcerosa(32,49), enfermedad inflamatoria del intestino(15), colitis ulcerosa(32,49), hepatitis crónica activa, cirrosis biliar primaria, artritis reumatoide(AR)(33,50,52) y algunos pacientes con lupus eritematoso sistémico.

Pocos autores han tomado a pacientes con LES como grupo muestra en sus investigaciones(20,21,26), la mayoría los incluye como grupo control para el estudio de otras enfermedades. Esto posiblemente se debe a la interferencia en la técnica de inmunofluorescencia, que resulta de la presencia simultánea de anticuerpos antinucleares en los sueros de dichos pacientes. Además, no hemos encontrado en la literatura, trabajos que estudien los ANCA en pacientes pediátricos de LES.

Falk RD et al.(20) estudiaron 117 pacientes adultos con enfermedades renales de los cuales 11 tenían diagnóstico de LES. Utilizando las técnicas de IFI sobre neutrófilos fijados con etanol, ELISA para citoplasma de neutrófilos y ELISA específico para MPO encontraron que 5 de los 11 sueros lúpicos eran positivos para ANCA por IFI, 8 eran positivos por ELISA para citoplasma de neutrófilos y 2 eran positivos por la ELISA anti-MPO. La conclusión de los autores fue que los autoanticuerpos que reaccionan con los neutrófilos en pacientes con LES tienen una especificidad diferente de la que tienen los ANCA de pacientes con GNCN.

En otro estudio, Less et al.(21) comparan 2 técnicas de fijación del sustrato, etanol y vapores de formaldehído, en un grupo de 32 pacientes adultos con LES para diferenciar los ANA del patrón p-ANCA. Sus resultados indicaron que por la técnica de fijación con etanol, 10 de los 32 pacientes son positivos para ANCA con un patrón indistinguible del ANA perinuclear, y con la fijación de vapores de formaldehído la inmunofluorescencia perinuclear producida por anticuerpos anti-MPO puede ser convertida a patrón citoplásmico.

Los autores concluyen que el método de fijación con vapores de formaldehído puede ser una prueba de rastreo útil para la búsqueda de anticuerpos anti MPO y para diferenciar p-ANCA de ANA en los casos de LES.

Galicchio MC et al.(26) estudian la detección de anticuerpos anti-MPO y anti-elastasa en casos de vasculitis e infección. Utilizan una pequeña población de adultos con LES como parte del grupo control y encuentran que de 6 pacientes lúpicos con daño renal, solo 1 tiene anticuerpos anti-MPO y de 14 lúpicos sin compromiso renal, 2 tienen anticuerpos anti-MPO, 2 tienen anticuerpos anti-elastasa y 1 tiene ambos anticuerpos. Ellos concluyen que no todos los sueros que contienen p-ANCA son positivos para los ensayos de anti-MPO o anti-elastasa, sugiriendo que hay otras moléculas no identificadas aún que también pueden ser marcadores para p-ANCA. Sin embargo, como no tienen un número significativo de sueros de LES no pueden demostrar ninguna correlación entre la presencia de anticuerpos anti-MPO o anti-elastasa y la vasculitis sistémica o cutánea o la glomerulonefritis necrotizante segmental.

Ya que la vasculitis se asocia en forma importante con ANCA en los padecimientos antes mencionados, es lícito suponer que otras vasculitis sistémicas, como la del LES, pudieran también tener alguna relación con estos autoanticuerpos. En el presente estudio se escogió al lupus eritematoso sistémico juvenil como blanco para la búsqueda de ANCA. Se utilizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) sobre el sustrato de neutrófilos fijados con etanol, estandarizada por Wiik et al.(12) como prueba básica para la búsqueda de dichos autoanticuerpos.

Esta técnica permite la distinción de 2 patrones de IFI: el patrón c-ANCA con una inmunofluorescencia citoplasmática granular cuya especificidad antigénica reside en PR3 (16,17,27-29) y que se asocia en un 90% de los casos con WG; y

un patrón perinuclear(p-ANCA) cuya especificidad antigénica es más amplia, y reside principalmente en la MPO(18,19,30,31), elastasa(17,26,27), lactoferrina(33), catepsina G(32). Su asociación con diferentes entidades clínicas es igualmente variada. Dicho patrón se ha comprobado que es un artificio de técnica, ya que durante la fijación de los polimorfonucleares con etanol, las moléculas de MPO cargadas positivamente (catiónicas) migran hacia la periferia del núcleo que tiene carga negativa(15,16,19-21).

Utilizando otras técnicas de fijación como paraformaldehído(52), y formalín-acetona(13) se logra evitar la migración de la MPO hacia el núcleo, obteniendo un patrón citoplásmico homogéneo en todos los casos positivos.

Igualmente, usando líneas celulares como la HL-60, promielocítica(12), o células de leucemia mielocítica crónica(13) como sustrato para la búsqueda de ANCA se logra homogenizar los patrones a un solo patrón citoplásmico granular. Sin embargo, pensamos que al usar dichas líneas celulares posiblemente cambien los epitopes antigénicos, ya que se trata de células transformadas, y los resultados obtenidos puedan ser falsos positivos o falsos negativos para ANCA.

Al ensayar diferentes tipos de fijación en nuestro trabajo, como paraformaldehído y formalín-acetona, no hubo resultados consistentes ya que en la mayoría de los casos la inmunofluorescencia fue negativa, tanto en los sueros problema como en los controles. Por esta razón, se usó solamente la técnica de fijación con etanol al 96% durante 5 minutos a 4°C para la realización del experimento.

Esta técnica de fijación tiene el inconveniente de dar lugar a errores en la interpretación ya que la presencia simultánea de ANA y GS-ANA(41,52) en los sueros de pacientes lúpicos, puede confundir la lectura en los casos de p-ANCA positivos. Este problema lo soslayamos al efectuar diluciones seriadas de los sueros, basándonos en que la gran mayoría de las veces, los anticuerpos mencionados tienen diferente concentración. En los 50 pacientes hubo 7 ANCA positivos, de los cuales 6 tuvieron patrón P-ANCA. A pesar de que todos tenían antinucleares, no hubo dificultades en la interpretación porque los patrones de antinucleares no incluyeron ningún perinuclear en la inmunofluorescencia sobre células HEp-2. Los patrones de IF para antinucleares en los sueros ANCA positivos fueron: moteado fino en el 57%, homogéneo 29% y citoplásmico 14%.

El porcentaje total de ANCA positivos fue de 14% en nuestros pacientes. En caso de error por este motivo, se habría obtenido porcentajes más elevados, cosa que aparentemente no sucedió.

Como dato curioso nosotros hallamos que aunque todos los pacientes que resultaron ser ANCA positivos también tenían títulos de ANA positivos en células HEp-2, solo 2(29%) mostraron una fluorescencia clara del núcleo de los polimorfonucleares usados como sustrato para la búsqueda de ANCA. Esto nos hace pensar que posiblemente esos 2 sueros contenían además anticuerpos antinucleares específicos de los granulocitos(GS-ANA), que fueron fácilmente distinguidos al efectuar las diluciones correspondientes.

Es de conocimiento general que en un pequeño porcentaje de la población normal se encuentran autoanticuerpos sin ningún significado clínico, por lo que no es de extrañar que en un pequeño porcentaje de sujetos normales también se encuentren ANCA en sus sueros.

En nuestra población de sujetos normales (30 niños en edad escolar) no se encontró ANCA en ningún caso (0%), en contraste con lo reportado por otros estudios como el de Kallenberg CGM et al(52), donde se encontró un 5% de p-ANCA en individuos normales de edad adulta (promedio 49 años) donadores de banco de sangre.

En el grupo de control positivo para ANCA, se utilizó el suero de 2 pacientes con diagnóstico de poliarteritis nodosa(PAN), uno comprobado por biopsia y otro por clínica. El patrón obtenido fue el de c-ANCA. En la literatura se reporta que el patrón más común en dicha entidad es el p-ANCA(15,16) cuando se cuenta con un número mayor de estos pacientes. También se encontró ANCA en un suero proveniente del grupo control de otras enfermedades no relacionadas con vasculitis, que perteneció a una niña con diagnóstico de lepra.

En el LES, al igual que en otras enfermedades reumáticas, la vasculitis es una característica que puede estar o no asociada con la presencia de ANCA. La baja incidencia de ANCA encontrada en los pacientes de este trabajo, podría deberse a que estos anticuerpos en el LES juvenil tengan una especificidad antigénica diferente, aún no caracterizada.

Falk RJ et al.(20) sugieren esta posibilidad, ya que sus datos indican que los anticuerpos que reaccionan con los neutrófilos en pacientes con LES tienen una especificidad diferente de los ANCA en pacientes con glomerulonefritis necrotizante y crescántica de su estudio. Ellos encuentran que sus sueros de LES reaccionan con neutrófilos completos y fracciones crudas de ellos, pero no dan reacción con antígenos específicos como la MPO.

Es importante discutir la especificidad de isotipo de los ANCA. La gran mayoría de los estudios revisados no hacen hincapié en este punto, y se reporta la presencia de anticuerpos tipo IgG. Solo un trabajo reporta la presencia de ANCA tipo IgM donde después hay un cambio de isotipo a IgG (44). Gracias a estas observaciones se decidió en el presente estudio la utilización de un conjugado policlonal que permitiera evidenciar cualquier isotipo de inmunoglobulinas, ya sea IgG, IgM o IgA puesto que muchos de los pacientes, si no todos, a los que se les realizó la prueba estuvieron en algún momento bajo la administración de terapia inmunosupresora.

Uno de los objetivos de este trabajo fue buscar alguna correlación entre las características clínicas propias del LES y la presencia de ANCA en su suero. Como se puede ver en el cuadro 3 no encontramos ninguna asociación entre las características clínicas y la presencia de ANCA.

La única manifestación destacada al respecto fue el eritema malar que se encontró en 4 de los 7 pacientes(57%) ANCA positivos. Sin embargo, no establece una asociación ya que una gran proporción de pacientes ANCA negativos han presentado eritema malar en el curso de su evolución.

Los datos de laboratorio de los pacientes ANCA positivos tampoco establecieron asociaciones significativas. Se presentó hipocomplementemia en 3 de los 7 pacientes, lo cual no correlaciona con la presencia de ANCA ya que la mayoría de los pacientes tenían la enfermedad activa y por lo tanto la hipocomplementemia habitualmente asociada.

En muchos estudios se ha discutido el papel patogénico de los ANCA(15,20,22,34,35), y aunque su presencia pueda constituir un marcador serológico relacionado con el daño vascular en algunas entidades clínicas como la WG(15,16,20), no podemos concluir que los ANCA sean causa de patogenicidad, porque no se ha establecido una relación directa con el daño a los vasos.

Se necesitan estudios más completos y específicos sobre los ANCA en LES para llegar a establecer su verdadera importancia. Sin embargo, este trabajo estimula la inquietud sobre el papel patogénico de dichos autoanticuerpos en esta enfermedad y la necesidad de realizar estudios complementarios al respecto.

Finalmente, hasta que se establezcan métodos más específicos para la detección de ANCA, la prueba de IFI sobre neutrófilos fijados con etanol, continua siendo un método de rastreo útil para uso clínico. Los casos positivos en esta prueba, deben ser confirmados por una prueba antígeno-específico, especialmente cuando el patrón obtenido es p-ANCA.

7. CONCLUSIONES

- 1.- Los anticuerpos Anticitoplasma de Neutrófilos (ANCA), se encuentran presentes en algunos casos de LES juvenil.
- 2.- La incidencia de ANCA en un grupo de 50 niños con diagnóstico de lupus eritematoso sistémico fue del 14%.
- 3.- De los casos positivos en el grupo de estudio, el 86% (6/7) mostró un patrón de inmunofluorescencia correspondiente al patrón p-ANCA, y el restante 14% (1/7) un patrón c-ANCA.
- 4.- La técnica de inmunofluorescencia indirecta es una prueba de rastreo útil para la búsqueda de los ANCA en pacientes de enfermedades diversas.
- 5.- No se encontró ninguna correlación importante entre las características clínicas de la enfermedad y la presencia de ANCA en sus sueros.
- 6.- No hubo correlación entre las pruebas de laboratorio habituales y la presencia de ANCA en la misma muestra de suero.
- 7.- Los ANCA no constituyen una prueba útil para el diagnóstico en el LES juvenil, ni para el seguimiento de la actividad de la enfermedad.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Stites DP, Stobo JD, Wells JV: *Inmunología básica y clínica*. Ed. El manual moderno, 6a edición. México 1988: Pp 122,354.
2. Brostoff J, Scadding GK, Male D, Roitt IM: *Clinical immunology*. Ed. Gower medical publishing, 1a edición. London 1992: Pp 4.1, 6.1.
3. Eisenbarth GS: Type I diabetes mellitus: A Chronic autoimmune disease. *N. Engl J Med* 1986; 314:1360.
4. Goverman J, Hunkapiller T, Hood L: A speculative view of the multicomponent nature of T cell antigen recognition. *Cell* 1986; 45:475.
5. Cantor H, Gershon RK: Immunological circuits: Cellular composition. *Fed. Proc* 1979; 38:2058.
6. Goodman MG, Weigle WO: Role of polyclonal B-cell activation in self/non-self discrimination. *Immunol Today* 1981; 2:54.
7. Gibson J et al: A role for suppressor T cells in induction of self-tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:5150.
8. Weigle WO: Analysis of autoimmunity through experimental models of thyroiditis and allergic encephalomyelitis. *Adv Immunol* 1980; 30:159.
9. Bottazzo GF et al: Role of aberrant HLA-DR expression and antigen presentation in induction of endocrine autoimmunity. *Lancet* 1983; 2:1115.

10. Todd-Sanford-Davidsohn: Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio. Salvat Editores, 7 edición. Mexico 1985 Pp 1187.

11. Boyun A: Separation of leucocytes from blood and bone marrow. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation 1968; 21,suppl.97

12. Wiik A: Delineation of a standard procedure for indirect immunofluorescence detection of ANCA. APMIS 97 1989; suppl 697:12

13. Chevailler A, Noel LH et al: Determination of anti-neutrophil cytoplasm antibodies(ANCA) specificity by immunofluorescence on chronic myelocytic leukemia cells. Journal of Immunological Methods 1992; 147:101

14. Wiik A, van der Woude F: Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA): A historic review. APMIS 1989; 697:8 (suppl)

15. Jennette JC, Wilkam AS, Falk RJ: Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody associated glomerulonephritis and vasculitis. American Journal of Pathology 1989; 135(5):921

16. Goeken JA: Antineutrophil cytoplasmic antibody - A useful serological marker for vasculitis. Journal of Clinical Immunology 1991; 11(4):161

17. Wieslander J: How are antineutrophil cytoplasmic antibodies detected?. American Journal of Kidney Diseases 1991; 23(2):154

18. Bosch X, Asherson RA: The antigenic significance and methods of detection of the anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA). Postgrad Med J 1992; 68:707

ESTRADA DE LA BIODIVERSIDAD
ESTRADA DE LA BIODIVERSIDAD

19. Kallenberg CGM, Cohen Tervaert JW, et al: Towards standar sera for the determination of anti-neutrophil cytoplasmic (ANCA) and anti-myeloperoxidase (aMPO) antibodies. APMIS 697:14 (suppl)
20. Falk RJ, Jennette JC: Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for mieloperoxidase in patients with systemic and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. The New England Journal of Medicine 1988; 318(25):1651
21. Lee SS, Lawton JWM, Chak W: Distinction between antinuclear antibody and P-ANCA. Journal Clinical Pathology 1991; 44:962
22. Lockwood CM, Bakes D, et al: Association of alkaline phosphatase with an autoantigen recognised by circulating anti-neutrophil antibodies in systemic vasculitis. The Lancet 1987; 1:716
23. Rasmussen N, Borregaard N, Wiik A: Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in Wegeners granulomatosis are not directed against alkaline phosphatase. The Lancet 1987; 1:1488
24. Gross WL, Ludemann J, Schroder JM: Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in Wegeners Granulomatosis are not directed against alkaline phosphatase. The Lancet 1987; 1:1489
25. Harrison DJ, Kharbanda R: Autoantibodies to neutrophil cytoplasmic antigens in systemic vasculitis have the same target specificity. Journal of Pathology 1989; 158:233
26. Gallicchio MC, Savige JA: Detection of anti-myeloperoxidase and anti-elastase antibodies in vasculitides and infections. Clinical Experimental Immunology 1991; 84:232
27. Gueirard P, Delpech A, et al: Anti-myeloperoxidase antibodies: Immunological characteristic and clinical associations. Journal of Autoimmunity 1991; 4:517

28. Cohen Tervaert JW, Goldschmeding R, et al: Association of autoantibodies to myeloperoxidase with different forms of vasculitis. *Arthritis and Rheumatism* 1990; 33(8):1264

29. Gross LW, Wilhelm H, et al: Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies - Associated diseases: A rheumatologists perspective. *American Journal of Kidney Diseases* 1991; 23(2):175

30. Lesavre P: Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies antigen specificity. *American Journal of Kidney Diseases* 1991; 23(2):159

31. van der Wiel BA, Dolman KM, et al: Interference of Wegeners granulomatosis autoantibodies neutrophil proteinase 3 activity. *Clinical Experimental Immunology* 1992; 90:409

32. Halbwachs-Mecarelli L, Nusbaum P, et al: Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) directed against cathepsin G in ulcerative colitis, Crohns disease and primary sclerosing cholangitis. *Clinical Experimental Immunology* 1992; 90:79

33. Coremans IEM, Hagen EC, et al: Antilactoferrin antibodies in patients with rheumatoid arthritis are associated with vasculitis. *Arthritis and Rheumatism* 1992; 35(12):1466

34. Fleur DLM, Leaker B, et al: Alpha-enolase: A novel cytosolic autoantigen in ANCA positive vasculitis. *Kidney International* 1993; 43:675

35. Field M: Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA): Their role in diagnosis and pathogenesis of vasculitis. *British Journal of Rheumatology* 1991; 30(3):229

36. van der Woude JF, Rasmussen N, et al: Autoantibodies against neutrophils and monocytes: Tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegeners Granulomatosis. *The Lancet* 1985; 1:425

37. Rasmussen N, Wiik A: Indirect immunofluorescence examination for IgG - ANCA in sera submitted for the 1st international workshop on ANCA,1988. APMIS 1989; 697:16 (suppl)

38. Andrassy K, Koderisch J, et al: Diagnostic significance of anticytoplasmic antibodies (ACPA/ANCA) in detection of Wegeners Granulomatosis and other forms of vasculitis. Nephron 1988; 49:257

39. Andrassy K, Koderisch J, et al: Detection and clinical implication of antineutrophil cytoplasm antibodies in Wegeners Granulomatosis and rapidly progressive glomerulonephritis. Clinical Nephrology 1989; 32(4):159

40. Chng HH, Ganz T, et al: The utility of detecting of autoantibodies against neutrophil cytoplasmic components in Wegeners Granulomatosis. Annals of Allergy 1989; 63:411

41. Nassberger L, Sjöholm AG, et al: Circulating anti-neutrophil cytoplasm antibodies in patients with rapidly progressive glomerulonephritis and extracapillary proliferation. Journal of Internal Medicine 1989; 225:191

42. Soukiasian SH, Foster CH, et al: Diagnostic value of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in scleritis associated with Wegeners Granulomatosis. Ophthalmology 1992; 99(1):125

43. Greenbaun L, DeRemee RA, Niles JL: Wegener Granulomatosis. Annals of Internal Medicine 1992; 117(7):619

44. Jayne DRW, Jones SJ, et al: Severe pulmonary hemorrhage and systemic vasculitis in association with circulating anti-neutrophil cytoplasmic antibodies of IgM class only. Clinical Nephrology 1989; 32(3):101

45. Gaber LW, Wall BM, et al: Coexistence of anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated glomerulonephritis and membranous glomerulopathy. American Journal of Clinical Pathology 1993; 99(2):211
46. Savige JA, Yeung SP, et al: Two ELISAs to detect anti-neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA) in various vasculitides. Pathology 1989; 21:282
47. Jennette JC, Falk RJ: Diagnostic classification of antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitides. American Journal of Kidney Diseases 1991; 23(2):184
48. Savige JA, Smith C, et al: Anti-neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA) in patient with the vasculitis of myelodysplasia. British Journal of Haematology 1991; 78:583
49. Zauli D, Baffoni L, et al: Antineutrophil cytoplasmic antibodies in primary sclerosing cholangitis, ulcerative colitis, and autoimmune diseases. Gastroenterology 1992; 102:1088
50. Mulder AHL, Horst G, et al: Antineutrophil cytoplasmic antibodies in rheumatoid arthritis. Arthritis and Rheumatism 1993; 36(8):1054
51. Cambridge G, Rampton DS, et al: Anti-neutrophil antibodies in inflammatory bowel disease: prevalence and diagnostic role. Gut 1992

52. Kallenberg CGM, Mulder AHL: Antineutrophil cytoplasmic antibodies: A still-growing class of autoantibodies in inflammatory disorders. The American Journal of Medicine 1992; 93:675