

11244



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

3

205

INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION

"PRESENCIA DE ANTICUERPOS ANTICITOPLASMA DE NEUTROFILO EN TUBERCULOSIS".

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
ESPECIALISTA EN REUMATOLOGIA
P R E S E N T A
LUIS FELIPE FLORES-SUAREZ



ASESOR DE TESIS: DR. JORGE ALCOCER VARELA
CO-ASESOR: DR. JAVIER CABIEDES

1985

MEXICO, D. F.

JULIO DE 1995

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DR. DONATO ALARCON SEGOVIA.



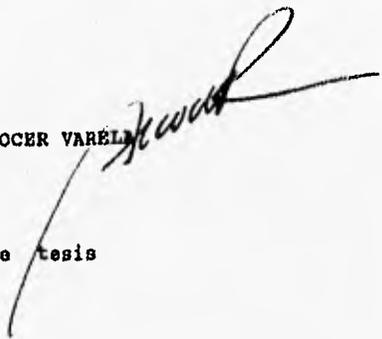
Profesor titular del Curso



INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION
DR. ESPRIN DIAZ ZUBIRAN
SALVADOR ZUBIRAN
SUB-DIRECCION DE ENSEÑANZA
México, D. F.

Jefe de Enseñanza e Investigación

DR. JORGE ALCOCER VARELA



Asesor de tesis

AGRADECIMIENTOS.

A la Q.F.B. Olivia Hernández, sin quien este trabajo no hubiese podido ser comenzado.

Al Dr. Antonio Villa, sin quien este trabajo no hubiese concluido.

Al Instituto Nacional de la Nutrición, sus hombres y paredes, por haberme acogido; hago votos por que mantenga su significación en la vida médica de este país.

A los pacientes, único libro de verdad.

INDICE

	Página
Introducción -----	1
Objetivos -----	5
Hipótesis -----	5
Diseño del estudio -----	5
Definición de la población y criterios -----	6
Material y métodos -----	7
Ética -----	12
Análisis estadístico -----	13
Resultados -----	13
Discusión -----	17
Conclusión -----	24
Bibliografía -----	25
Tablas y figuras	
Apéndice	

PRESENCIA DE ANTICUERPOS ANTICITOPLASMA DE
NEUTROFILO (ANCA) EN TUBERCULOSIS.

I. INTRODUCCION.

La tuberculosis es una infección crónica, que en los últimos años ha tenido un importante resurgimiento, especialmente entre ciertos grupos de población.

La relevancia que este hecho cobra en el momento actual, no puede subestimarse, y de ahí surge la necesidad de continuar con la investigación acerca de los mecanismos fisiopatológicos que intervienen en la enfermedad tuberculosa, la respuesta inmune que sucede en contra del agente infeccioso y la búsqueda de métodos de diagnóstico y de mejores antibióticos que frenen la infección o su diseminación, especialmente en los casos de tuberculosis multiresistente.

La respuesta inmunológica que se establece al inicio de la infección por *Mycobacterium tuberculosis* se caracteriza por vasodilatación, edema, exudado fibrinoso y translocación de leucocitos al sitio de infección, en particular polimorfonucleares (PMN's). En el pulmón, portal de entrada del microorganismo, la presencia de linfocitos se debe probablemente a la secreción de linfocinas provenientes de macrófagos alveolares. Sin embargo, el papel de los PMN's parece ser de

menor importancia, si se le compara con el que tienen los macrófagos y posteriormente, dentro de una respuesta eminentemente celular, los linfocitos T. Sin embargo, es posible identificar en la lesión típica por micobacterias, en el granuloma, la presencia de PMN's, los que anteceden a los monocitos en áreas de inflamación granulomatosa. Es discutible incluso si los PMN's pueden jugar un papel importante en la fagocitosis y muerte de micobacterias libres y/o en la inhibición de su crecimiento mediante mecanismos no oxidativos, lo cual eventualmente influye en la protección en contra de las micobacterias (1).

Los anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo (ANCA), descritos inicialmente en 1985 por Davies et al (2), son un grupo heterogéneo de anticuerpos, dirigidos a diversas proteínas, especialmente enzimas, contenidas en gránulos tanto azurófilos como específicos de los neutrófilos. Algunas de estas enzimas también están contenidas en los gránulos de monocitos, especialmente la mieloperoxidasa (MPO) y la proteinasa-3 (PR3). Se conocen 2 tipos principales de distribución de reactividad de estos anticuerpos, uno de ellos citoplasmático y dirigido sobre todo, aunque no exclusivamente, en contra de proteinasa-3, y otro perinuclear, cuya reactividad más aparente es contra MPO. Otro patrón reconocido con cierta frecuencia, especialmente en otras enfermedades diferentes a las vasculitis, a la glomerulonefritis necrosante y a la enfermedad de Wegener, tiene una distribución no definible y se le denomina atípica (para algunos autores A-ANCA, otros lo denominan X-ANCA) (4,5).

Desde su descripción original en pacientes con glomerulonefritis (2) y enfermedad de Wegener (3), se han reportado numerosas asociaciones con enfermedades diversas. Esto ha motivado interés creciente en identificar a las diversas proteínas contra quienes se dirige esta respuesta, la función de las mismas y las potenciales alteraciones a las que la presencia de estos anticuerpos pueden llevar como parte de la patogenia de las enfermedades en los cuales se encuentran. En cuanto a su función, se ha mencionado por ejemplo que la proteinasa-3, principal antígeno en contra del cual se dirigen los C-ANCA, por ser idéntico a la mieloblastina y por encontrarse presente en monocitos, detiene la maduración de los precursores de monocitos-granulocitos. De esta forma, su inhibición mediante algunos anticuerpos, podría ser responsable de que dicho proceso continuase, permitiendo así la generación de macrófagos y eventualmente de células gigantes multinucleadas, las que son parte esencial de la formación de granulomas (6). En relación a esto último, existen varios posibles mecanismos que ligan la presencia de estos anticuerpos con la adhesión de leucocitos al endotelio vascular, el daño de este último y la subsecuente presencia de estos elementos en los sitios de inflamación celulares (6).

Mecanismos similares pueden operar en etapas iniciales de la primoinfección o reactivación de la infección en tuberculosis. En 1989 apareció el primer y hasta ahora único reporte conocido por nosotros acerca de la presencia de ANCA en una paciente con tuberculosis pulmonar, cuya presentación clínica sugería

fuertemente granulomatosis de Wegener (7). De forma similar nosotros tuvimos un caso semejante, encontrando posteriormente que el paciente tenía tuberculosis pulmonar (observación personal). Estimulados por este hallazgo decidimos estudiar la presencia de estos anticuerpos en tuberculosis.

Varios estados infecciosos se han asociado a la presencia de ANCA, entre ellos, endocarditis y neumonías bacterianas, neumonía atípica, glomerulonefritis postestreptocócica, hepatitis virales. Sin embargo, sólo se conocen reportes de casos, y acerca de tuberculosis, ningún estudio ha tratado de establecer de manera fehaciente la presencia de estos anticuerpos, cuyo posible papel patogénico se ha esbozado, en esta importante enfermedad (5).

Por otro lado, es de llamar la atención que ciertas infecciones crónicas como la que nos ocupa, y otras enfermedades autoinmunes en naturaleza, como la granulomatosis de Wegener, tengan como característica histopatológica, la presencia de granulomas, de ahí que la presencia de estos en entidades aparentemente disímolas o no relacionadas, pudiese ayudar a conocer, e incluso, tener origen en mecanismos patogénicos comunes, algunos de los cuales ya se han mencionado en los párrafos precedentes. La presencia de ANCA en ambas enfermedades ayudaría en la investigación de tales fenómenos.

II. OBJETIVOS.

1. Estudiar en el suero de enfermos con tuberculosis definitiva o probable (ver definiciones, sección V), la presencia de anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo (ANCA), y compararlo con lo encontrado en suero de sujetos normales y un grupo de pacientes con otras enfermedades cardiopulmonares.

III. HIPOTESIS.

Los pacientes con tuberculosis tienen ANCA en su suero.

IV. DISEÑO DEL ESTUDIO.

El diseño utilizado fue el de casos y controles, tomando como los primeros a los enfermos con tuberculosis diagnosticada mediante la forma que se describe más adelante y los segundos a partir de sujetos sanos en su mayoría y otros con patologías cardiopulmonares consideradas dentro del diagnóstico diferencial de la tuberculosis. Por tanto el estudio fue observacional, retrospectivo, transversal, descriptivo y comparativo con la población control.

V. DEFINICION DE LA POBLACION OBJETIVO.

Los siguientes criterios fueron los que definieron las poblaciones de estudio.

CRITERIOS DE INCLUSION:

Se establecieron las siguientes categorías dentro de los enfermos con tuberculosis:

TB DEFINITIVA: pacientes con cultivo(s) positivo(s) para *M. tuberculosis*.

TB PROBABLE:

1. con manifestaciones clínico-radiológicas e histopatología (enfermedad granulomatosa compatible) **MAB** baciloscopias positivas o
2. respuesta terapéutica específica.

CRITERIOS DE EXCLUSION:

Tener sólo sospecha o posibilidad de infección tuberculosa a partir de la presencia única de manifestaciones clínico-radiológicas o presencia de granuloma en biopsias tisulares o baciloscopias positivas o PPD positivo.

Presencia de alguna otra enfermedad sistémica en la cual se haya descrito la presencia de ANCA.

UBICACION ESPACIO TEMPORAL:

Se colectaron los sueros de los pacientes con las características antes mencionadas de los servicios de hospitalización y/o consulta externa del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán" y del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, esto último mediante la generosa ayuda de los Dres. Eduardo Sada y Erasmo Martínez Cordero, del periodo comprendido entre diciembre de 1994 y febrero de 1995. La principal determinante para la obtención de los sueros de los enfermos fue la asequibilidad de pacientes en el lapso de 3 meses citado.

VI. MATERIAL Y METODOS.

Se estudiaron pacientes con tuberculosis en cualquier órgano o sistema. Esto se hizo de manera tanto directa al revisar a los enfermos hospitalizados con diagnóstico presuntivo de tuberculosis, como indirecta, mediante la revisión de datos clínicos contenidos en el expediente. Los datos necesarios se recolectaron en una hoja de información que se muestra en el apéndice. Los pacientes recibían tratamiento fundamentalmente a base de isoniazida y rifampicina en aquellos casos con actividad de la enfermedad (n=41), pero 7 de estos pacientes fueron multirresistentes a tratamiento y recibían otros esquemas. Consideramos al tratamiento como una variable independiente de la presencia de ANCA en este momento, apoyándonos en lo descrito

en granulomatosis de Wegener referente a este aspecto (8).

Se obtuvo también suero de sujetos sanos que acudieron al banco de sangre del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán" (INNSZ) y del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) (n=47), el cual se trató de la misma forma para la búsqueda de anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo.

Un segundo grupo control (n=7) estuvo compuesto por enfermos con otras patologías de orden cardiopulmonar como enfermedad pulmonar obstructiva crónica, insuficiencia cardíaca congestiva venosa, tumor mediastinal, alveolitis alérgica extrínseca y silicosis, quienes se encontraban hospitalizados durante el período de estudio, y que presentaban manifestaciones clínicas compatibles con tuberculosis, pero en quienes posteriormente se establecieron los diagnósticos citados. En estos enfermos no existía asociación con infección tuberculosa o de otro tipo, ni constituyeron enfermos dentro de la mayoría de las categorías nosológicas asociadas con mayor frecuencia a ANCA, como síndrome de Felty, hepatopatías, enfermedad inflamatoria intestinal o glomerulonefritis (4). Tuvimos un control con LEG. Estos 7 casos en total, sirvieron como otro tipo de control, en vista de la posibilidad de ser utilizados como controles positivos, debido a reportes previos donde se ha descrito positividad particularmente a P-ANCA (4,5,9). Se obtuvieron en su mayoría del INER.

DETECCION DE ANCA:

La detección de ANCA se efectuó mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI). Para ello se obtuvieron comercialmente laminillas que cuentan con 10 pozos cada una, en las cuales existen neutrófilos humanos fijados en etanol (The Binding Site, Birmingham, UK).

Se efectuaron diluciones de los sueros en estudio iniciando a 1:20 con PBS y continuando con diluciones al doble, es decir 1:40, 1:80, 1:160 y 1:320 como máximo. En cada uno de los pozos se colocaron 10 microlitros de la dilución y se incubaron por 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente. Después de esto, se lavaron por 10 minutos en 2 ocasiones con PBS. Un segundo anticuerpo (anti-Ig humana marcado con fluoresceína) se diluyó en PBS a una dilución 1:50 y se añadió a los pozos. Este 2o. anticuerpo marcado se diluyó además de con PBS con azul de Evans al 6% con la finalidad de eliminar fluorescencia inespecífica. Se incubó igualmente en cámara húmeda a temperatura ambiente por 30 minutos y se volvieron a efectuar 2 lavados en PBS, de 10 minutos cada uno. Se sacaron las laminillas dejándose secar al aire ambiente, para posteriormente añadir a cada pozo una gota de glicerol, cubriendo la laminilla con un cubreobjetos, después de lo cual se procedió a la lectura en microscopio de luz ultravioleta.

Los resultados se expresaron como positivos o negativos. Los primeros bajo una valoración subjetiva en cruces de la siguiente manera:

+ Patrón de tinción leve.

++ Patrón de tinción moderada.

+++ Patrón de tinción intensa.

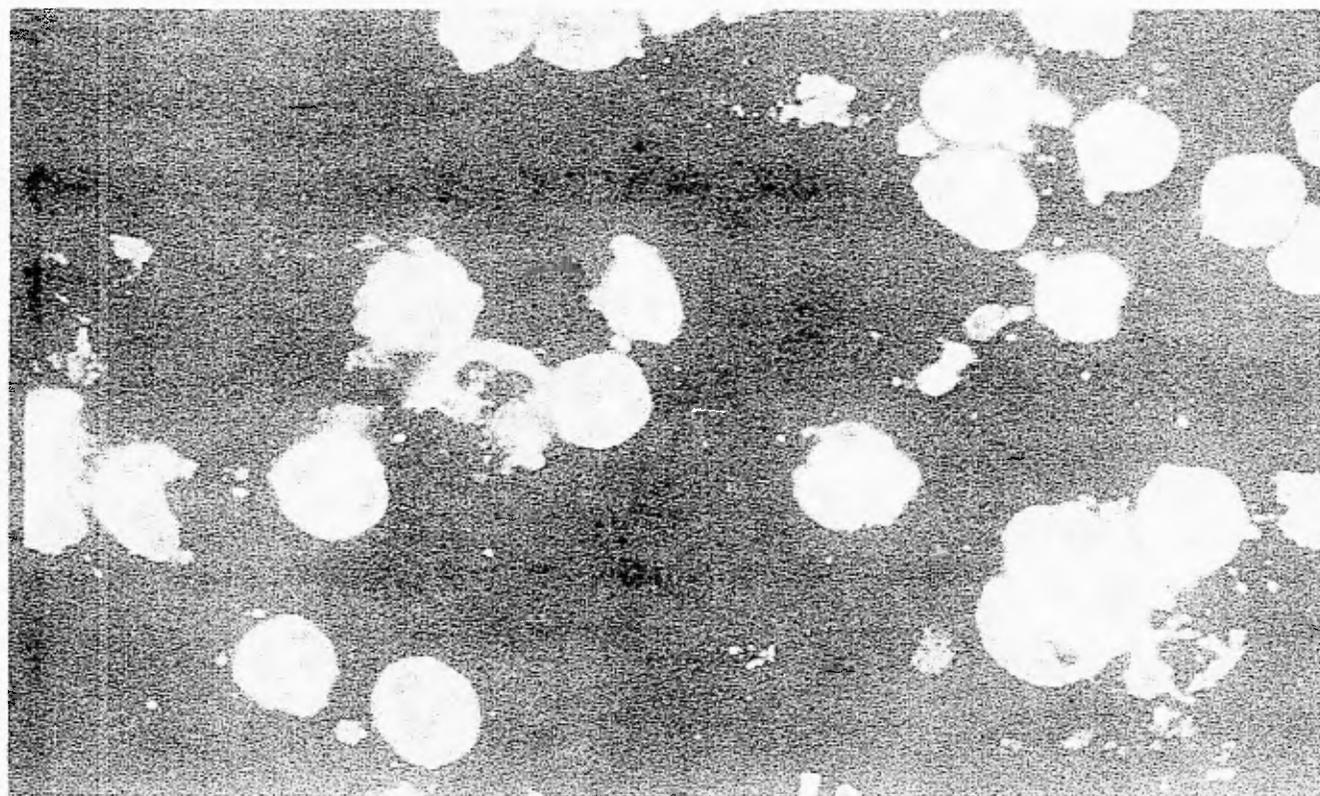
Además, se correlacionó esto con la dilución conocida y el resultado positivo máximo de acuerdo a la dilución efectuada que aún resultó ser positiva.

La distribución de la fluorescencia determinó el patrón de los ANCA, es decir, con una distribución periférica y en contigüidad al núcleo (P-ANCA), o bien disperso en todo el citoplasma de la célula (C-ANCA) (ver fotos).

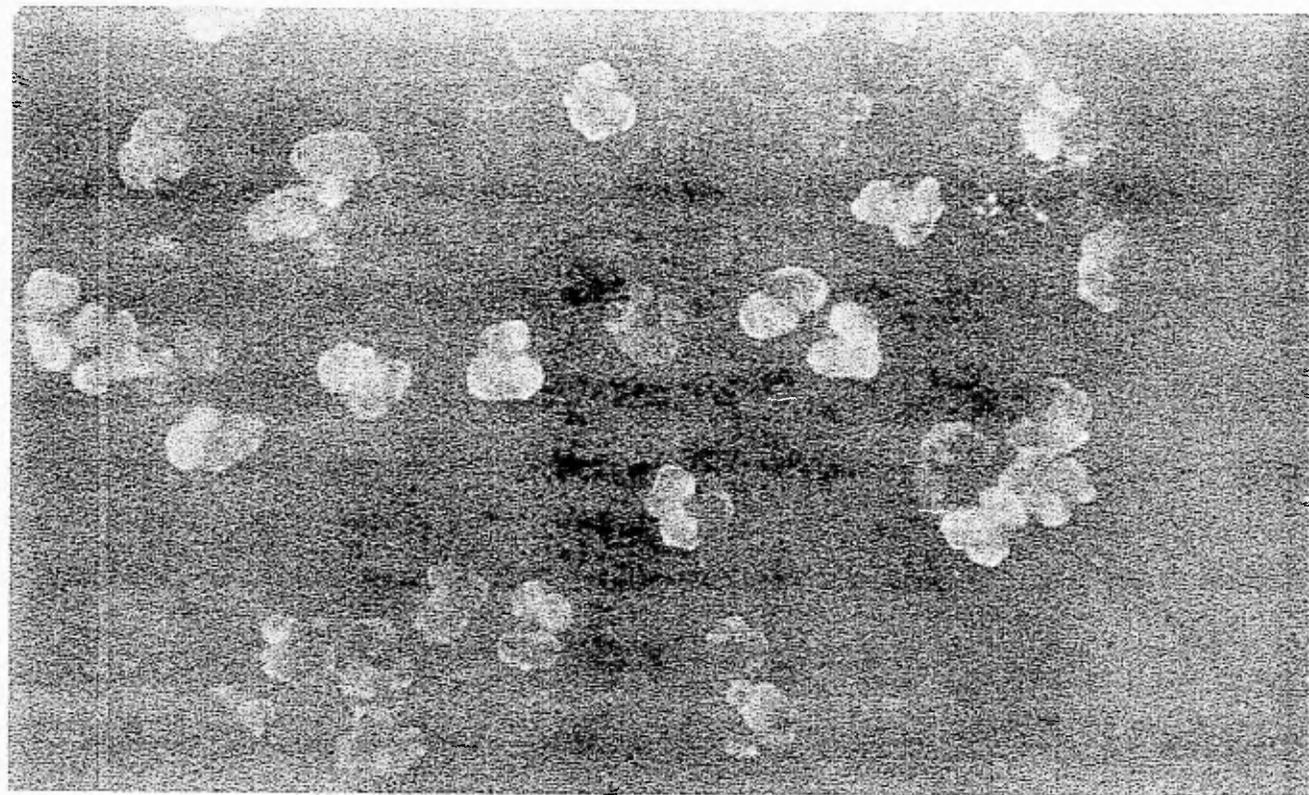
En aquellos casos donde se obtuvo un patrón P-ANCA positivo, se repitió la prueba en neutrófilos fijados con formaldehído, debido al fenómeno conocido donde los antígenos que reconocen estos anticuerpos mediante esta técnica pueden ser anticuerpos antinucleares (AAN) y no estar realmente dirigidos en contra de los componentes de los gránulos azurófilos (4). Al ser la prueba positiva y tener la fluorescencia un patrón de distribución citoplásmico en estas laminillas, se consideraron los resultados como realmente positivos a P-ANCA. El método en este caso fue el siguiente.

OBTENCION DE NEUTROFILOS:

Se tomaron 20 cc. de sangre periférica en jeringa desechable con 5 a 10 U de heparina. Posteriormente se diluyó la sangre en 15 ml. de solución de Hanks, mezclándola con 15 ml. de PlasmaGel (Cellular Products, Buffalo, NY, EUA) mediante inversión suave. Se dejó sedimentar la mezcla por 60' en tubo Falcon de polipropileno, después de lo cual se aspiraron los 25 cc. de la



C-ANCA 40X



P-ANCA 40x

capa superior, rediluyendo la mezcla a 50 cc. totales con solución de Hanks, después de lo cual se centrifugó por 5' a 400g en 2 ocasiones. Se resuspendió el botón celular en 20 cc. de sol. de Hanks que contenía .1% de albúmina bovina. Se tomaron alícuotas de 5 cc., decantándolas suavemente en 4 gradientes discontinuos de Ficoll-Hypaque (F-H).

La capa superior consistió de 3 cc de 1.076 gr/ml de F-H y la inferior de 1.15 gr/ml de F-H. Se centrifugaron los gradientes por 40' a 265g a temperatura ambiente. La interfase superior se desechó (contiene células mononucleares) y la inferior se aspiró cuidadosamente lavándola 2 veces en sol. de Hanks con .1% de albúmina sérica bovina por 10' a 100g. Las células obtenidas se resuspendieron en 1×10^6 /ml en medio 199 suplementado con 25mM de amortiguador de HEPES y 5% de suero bovino fetal. Esta suspensión celular sirvió para la preparación de frotis sobre portaobjetos revestidos con una capa de 22% de albúmina bovina. Se secaron los portaobjetos al aire, fijándolos en formaldehído al 4% por 5' a 4°C, dejándolos secar de nuevo para usarse de inmediato o almacenarlos a -20°C para uso posterior.

Los resultados se expresaron como negativos o positivos, caso este último en el cual se informó inicial y temporalmente mediante cruces (+, ++ o +++) y posteriormente a la dilución máxima a la cual se obtuvo fluorescencia, como se reporta en los resultados.

VII. ETICA.

Este estudio al tener por objeto buscar la presencia de ANCA en pacientes con tuberculosis limitó los riesgos que sobre el paciente tuvo la elaboración de este protocolo, puesto que nos ceñimos a recabar información clínica y una muestra biológica de los pacientes (suero). No fue necesario obtener tal muestra en más de una ocasión, y esta no excedió los 10 cc. Si el paciente decidía no ser puncionado para la obtención de sangre venosa para obtener el material biológico, esto no se efectuó.

Por otro lado no existió en ningún momento y de ninguna manera modificación de las decisiones diagnósticas o terapéuticas que sobre el paciente se tomaron a partir de los resultados, o bien, para obtener las muestras.

Los riesgos para quienes laboramos en el proyecto fueron los siguientes:

Contagio: lo cual se evitó mediante el uso continuo de mascarilla o cubrebocas dado el portal de entrada del microorganismo. Además el contacto con el enfermo fue el mínimo requerido para obtener sangre.

El otro riesgo es el inherente al manejo de suero de los enfermos, el cual se limitó con su manejo cuidadoso y rutinario mediante uso de guantes y la disposición adecuada de los materiales punzocortantes (jeringas, agujas) que se utilizaron.

VIII. ANALISIS ESTADISTICO.

La información recabada incluyó en un primer nivel de análisis la descripción de la población estudiada tanto de casos como de controles, por medio de medidas de tendencia central (media) y dispersión (desviación estándar). En un segundo nivel de análisis se establecieron las asociaciones entre la positividad a ANCA en forma global y por tipo (C-ANCA y P-ANCA) como variables binarias comparadas con la variable dependiente: caso-control (analizando en forma independiente el grupo control de sujetos clínicamente sanos y el grupo control de enfermos). La medida de asociación calculada fue la razón de momios (RM). La significancia estadística de esta medida se estimó mediante prueba exacta de Fisher (dos colas) o chi-cuadrada con corrección de Yates. Asimismo, para las RM calculadas se presentan los intervalos de confianza al 95 por ciento. Todo el análisis anterior fue procesado en el paquete estadístico SPSS/PC v5.02.

IX. RESULTADOS.

Se estudiaron 47 pacientes con tuberculosis, la mayoría de ellos, con tuberculosis pulmonar; solamente se tuvo un paciente con empiema tuberculoso y otro más con tuberculosis en músculo psoas derecho, aunque este enfermo previamente había presentado tuberculosis a nivel cutáneo, renal, ganglionar e intestinal. Siete pacientes cubrieron nuestros criterios para ser catalogados

como definitivos, y los restantes 40, en su mayoría mediante baciloscopia en expectoración con cuadro clínico compatible más respuesta terapéutica específica, se catalogaron como probables (Fig.1). En esta categoría, sólo 2 de los enfermos presentaron además histopatología compatible. Al momento del estudio, 41 enfermos tenían actividad clínica y 6 estaban inactivos. Estos últimos todos con tuberculosis pulmonar, mientras que en el grupo de activos quedaron incluidos los 2 con enfermedad extrapulmonar.

Hubo 16 mujeres, 24 hombres y de 7 pacientes no se tuvo este dato, pues fueron muestras obtenidas de la seroteca del departamento de Microbiología del INER. Las edades estuvieron en un rango de 17-78 años para los pacientes, con una media aritmética de 42.5 años, y una desviación estándar de 15.8.

En cuanto a las enfermedades concomitantes en el grupo de tuberculosis tuvimos 14 pacientes; las más frecuentes fueron: en 4 pacientes, cor pulmonale crónico, atribuible al proceso fímico crónico, mismo número visto para diabetes mellitus (DM), seguido de procesos bronquiales agudos y giardiasis en 2 casos, y con uno estuvieron hepatopatía por drogas antifímicas, ascaridiasis, amibiasis y nefropatía diabética.

En cuanto a los datos de los controles sanos (n=40), 8 fueron del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y 32 del Instituto Nacional de Nutrición; los restantes 7 controles (6 del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y 1 del Instituto de Nutrición) con las patologías descritas anteriormente, se dividieron de la siguiente forma: en un caso

tumor mediastinal, en otro alveolitis alérgica extrínseca, en otro insuficiencia cardíaca congestiva, otro más con silicosis, 2 con enfermedad pulmonar obstructiva crónica y una paciente tenía lupus eritematoso generalizado. Veintiocho fueron del sexo masculino y 17 del femenino, desconociéndose este dato en 9 enfermos cuyo suero se obtuvo de la seroteca del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. En cuanto al rango de edad en este grupo esta fue de los 18 a los 67 años, con una media aritmética de 38.8 años y una desviación estándar de 12.5 años.

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE ANCA:

Los resultados tanto para C-ANCA como para P-ANCA y su titulación en los grupos de estudio se encuentran descritos en las tablas 1 y 2, así como en la fig. 4.

En el grupo de enfermos con tuberculosis se tuvieron 26 resultados negativos y 21 positivos, 17 para C-ANCA y 4 para P-ANCA (Fig.2). En el grupo de controles tuvimos 47 resultados negativos y 7 positivos, 3 para C-ANCA y 4 para P-ANCA (Fig.3). Debe de hacerse notar que de estos 7 resultados positivos, 5 son del grupo de pacientes con otras patologías y solamente dos de los controles sanos fueron positivos, ambos para P-ANCA. Los controles positivos con enfermedad tuvieron la siguiente distribución en cuanto a tipo de ANCA: 3 C-ANCA positivos (uno con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, uno con alveolitis alérgica extrínseca y uno con insuficiencia cardíaca congestiva, todos a títulos bajos), 2 con P-ANCA (la enferma lúpica y la

paciente con tumor mediastinal). Ambos sanos fueron P-ANCA positivos.

Al considerar la categoría de tuberculosis (definitiva o probable), 3 de los enfermos en la primera fueron C-ANCA positivos, mientras los restantes 4 tuvieron negativo el resultado de esta prueba. De los probables, 22 fueron negativos para el examen, mientras 14 fueron C-ANCA positivo y todos los positivos para P-ANCA se encontraron en esta categoría. Ambos enfermos con tuberculosis extrapulmonar fueron ANCA-negativos.

Se encontró diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control en forma global (sanos y enfermos con otras patologías) y el de tuberculosos en cuanto a la positividad para ANCA (C- o P-ANCA) (RR 5.42, IC 95% 2.03-14.45, $p=.0038$). Separando ambos tipos de ANCA esto mostró ser aún mayor para C-ANCA (RR 7.08, IC 95% 2.17-23.04, $p=.0038$), mientras que para P-ANCA no hubo diferencias.

Al considerar sólo a los controles sanos, las diferencias fueron aún más marcadas, encontrando para todo el grupo de positivos una correlación mayor con la presencia de tuberculosis (RR 18.17, IC 95% 3.94-83.81, $p=.00001$). Al igual que con el grupo control completo, existió la misma diferencia entre C-ANCA y P-ANCA, siendo la primera estadísticamente significativa para positividad en los enfermos tuberculosos, mientras que la 2a. sin diferencia en relación a los controles.

Otras asociaciones tales como diferencias entre la probabilidad de tener la prueba positiva de acuerdo a la

categoría de tuberculosis (definitiva o probable) o la resistencia a tratamiento en el grupo de enfermos (7 casos), no pudo establecerse, ni tampoco entre la probabilidad de positividad de acuerdo a la actividad de la tuberculosis, esto último debido a lo pequeño de la muestra.

En todos los casos P-ANCA positivos, la confirmación mediante el uso de neutrófilos fijados en formaldehído, resultó también positiva, por lo que podemos afirmar que los resultados de P-ANCA son realmente positivos mediante la técnica usada.

IX. DISCUSION

Desde su descripción en granulomatosis de Wegener (3) los anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo, en particular, en su variedad C-ANCA se han considerado como un elemento importante para establecer el diagnóstico de esta patología rara, polimorfa y no siempre fácil de identificar, aunque la presencia de estos anticuerpos no se encuentran considerados como un elemento de clasificación dentro de los criterios del Colegio Estadounidense de Reumatología (ACR) (11). Esto es sin embargo discutible dados los datos que apoyan una importante sensibilidad y especificidad de esta prueba. En forma general, la especificidad de la prueba va en los mejores casos de 96-99% y la sensibilidad también se aproxima a esas cifras (8,12,13). El método más común y originalmente descrito fue el aquí usado, es decir, inmunofluorescencia indirecta (IFI). Esto se debió, en un

principio al desconocimiento de los antígenos en contra de quienes se dirigían los anticuerpos. En los últimos años ha sido posible identificar la naturaleza de los mismos, aunque debe aclararse que no todos han sido identificados y probablemente no sean únicamente los hasta ahora descritos.

A pesar de ello, y puesto que ninguna prueba diagnóstica ofrece un 100% de sensibilidad y especificidad, se ha postulado que la presencia de cuadro clínico compatible y positividad para C-ANCA justifican pensar en el diagnóstico de Wegener en los pacientes en esta situación, especialmente en aquellos en quienes el diagnóstico histopatológico no se puede establecer por diversas razones.

La mayoría de los anticuerpos que dan el patrón citoplasmático de ANCA (C-ANCA) reconocen a la proteinasa 3 o mieloblastina (14), una de las proteasas de serina la cual se localiza en los gránulos azurófilos tanto de PMN's como de monocitos según se ha descrito por Csernok et al (15) y cuya función parece ser la de participar en la remodelación tisular granulomatosa debido a su similitud funcional con la elastasa. Además, se conoce que esta proteinasa interviene en la formación de enfisema en un modelo experimental (16). Por otro lado, los principales antígenos reconocidos por P-ANCA son la mieloperoxidasa y la lactoferrina, y estos son los anticuerpos más heterogéneos en cuanto a su presencia en diversas enfermedades según se ha descrito.

Es importante comentar que en casi todos los trabajos en los que se han utilizado controles con otras patologías, los números

son pequeños. En el caso de la tuberculosis, enfermedad granulomatosa crónica, con características clínicas en ocasiones indistinguibles de la granulomatosis de Wegener, especialmente con respecto a las manifestaciones pulmonares, el estudio inicial de van der Woude (3), es el que más controles tuberculosos tiene (n=15). A pesar de ello, la muestra es limitada y no se describen más datos de esos enfermos. Dado el antecedente citado en la sección correspondiente (7), decidimos abordar nuevamente este aspecto.

Varios son los puntos además de los solamente clínicos, que en común ofrecen las lesiones patológicas, así como los actores celulares y sus productos, que permiten establecer similitudes en ambas enfermedades. Esto nos lleva a considerar algunos aspectos fisiopatológicos.

Se conoce en tuberculosis una respuesta sumamente compleja, mediada por PMN's, macrófagos y linfocitos T. Recientemente la red de citocinas se ha implicado en el reclutamiento de efectores celulares en sitios de infección mediante la intervención de IL-1, IL-2, TNF-alfa, y más recientemente IL-8. Todos ellos son producidos una vez que *Mycobacterium tuberculosis* es ingerido por PMN's o macrófagos, amplificando la respuesta en contra de este agente y permitiendo así el inicio de una respuesta inmune que pretende limitar la diseminación de la enfermedad (17). Se sabe que IL-1 y TNF-alfa son importantes en fomentar la presencia de linfocitos T y la diferenciación de células fagocíticas hacia células epitelioides que intervienen en la formación de granulomas. En cuanto a IL-8, su producción se ve incrementada

por los macrófagos alveolares de pacientes con tuberculosis pulmonar y puede a su vez participar en el reclutamiento mayor de neutrófilos al sitio de infección (18); además este último factor funciona también como angiogénico, de tal manera que se puede establecer una presencia eventual de células endoteliales en zonas afectadas por la micobacteria y/o que se encuentran en regeneración.

Aunque se sabe que la destrucción de micobacterias por PMN's y macrófagos parece ser independiente de radicales oxígeno o hidroxilo, la liberación de productos de estas células, en especial las enzimas de los gránulos azurófilos, en el microambiente donde se llevan al cabo estos procesos, podrían ser responsables en parte de la generación de ANCA en pacientes con tuberculosis. Una vez formados los ANCA, podrían participar mediante aquellos mecanismos postulados con anterioridad, en la formación de granulomas, la inducción de mayores interacciones entre células endoteliales y neutrófilos, o el reclutamiento de linfocitos T al sitio correspondiente.

Los mecanismos propuestos en mediar el daño tisular por parte de los ANCA son varios. Algunos autores han demostrado que la actividad elastinolítica de los ANCA sobre proteínasa-3 no siempre está presente, y pueden por el contrario conferirle un papel protector frente a otras enzimas con capacidad elastinolítica al unirse a la proteína y permitirle continuar con su degradación de matriz extracelular y daño vascular (6). Esto a su vez, podría a partir de células endoteliales, perpetuar la generación de ANCA mediante la liberación de moléculas de

adhesion por parte del endotelio. De hecho, Gross et al (6) han demostrado que la presencia de TNF-alfa e IL-8 genera activación de PMN's y translocación de proteinasa-3 desde sitios intracelulares a la superficie celular, donde podrían interactuar con los ANCA. Además, esta enzima (PR3) también se ha demostrado en las células endoteliales y su superficie (19). Así, se establece un vínculo entre estos mecanismos y aquellos descritos anteriormente, donde la producción de IL-8 parece intervenir también en la patogenia de la tuberculosis.

Los ANCA estimulan la degranulación de PMN's mediante mecanismos que promueven la fosforilación de ciertas proteínas que actúan en tal proceso, incrementando las concentraciones de calcio intracelular (20). De forma directa también se ha visto que las células endoteliales pueden ser dañadas directamente por los PMN's al través de ANCA, especialmente aquellos dirigidos en contra de MPO in vitro (6).

El método empleado (IFI) deja, a la luz de contar ahora con mejores métodos de detección y con antígenos identificados como los blancos de los ANCA, cierto cuestionamiento acerca de si los anticuerpos detectados corresponden a ANCA. En el laboratorio estamos estandarizando el método de ELISA en contra de mieloperoxidasa y proteinasa-3. Sin embargo, un punto a favor lo constituye el que este método sigue siendo empleado como primer paso para detectar ANCA, y que cuenta con una alta sensibilidad mediante la técnica usada por nosotros, apegada a los estándares internacionales. Asimismo, la presencia de sólo 2 controles positivos a títulos bajos apoyan esta noción.

En cuanto a los hallazgos de C- y P-ANCA en 5 de 7 controles con otras patologías, es de especial interés que C-ANCA estuvo presente en un paciente con alveolitis alérgica extrínseca y en otro con enfermedad pulmonar obstructiva crónica con predominio de enfisema, como se ha visto en otros reportes (3,10). Asimismo, el hallazgo de P-ANCA en nuestra paciente con LEG no difiere de lo citado (9). Hasta el momento no tenemos una explicación satisfactoria para la presencia de C-ANCA en el paciente con insuficiencia cardíaca congestiva.

Cabe la posibilidad de que en estos casos, la presencia de ANCA constituyan casos falso positivos, especialmente si se toma en cuenta que no excedieron una dilución 1:40; sin embargo, tampoco se puede afirmar, especialmente en los casos con patología pulmonar, que estos anticuerpos puedan ser tomados como realmente falsos, y menos aún, descartar que su presencia en algunas de estas patologías tengan un vínculo con los mecanismos fisiopatológicos que operan en vasculitis, enfermedad de Wegener o quizá, tuberculosis.

De hecho, Kao (16) ha mostrado que la proteinasa-3 interviene en la generación de enfisema en hamsters, e invocando uno de los potenciales mecanismos patogénéticos de los ANCA, la evasión de proteinasa-3 a la destrucción por enzimas mediado por ANCA, puede brindar la oportunidad de un continuo proceso elastinolítico a nivel alveolar.

De esta forma, la presencia de ANCA en tuberculosis como se demuestra en este trabajo, tiene una explicación razonablemente aceptable. Desde luego, varios puntos deben considerarse: por un

lado, ante la prevalencia de tuberculosis, la muestra parece aún pequeña, pero los resultados vistos en este grupo de 47 pacientes son significativos con respecto a la presencia de ANCA. De hecho, la mayoría de los C-ANCA observados fueron en el grupo de enfermos, y los títulos a los cuales se observó positividad llegaron en 4 de los casos a ser superiores a una dilución 1:80, mientras que para P-ANCA solamente en uno de los 4 casos positivos, el título fue superior a 1:40 (fig. 4). Con estos datos no es posible afirmar por ahora que mayores títulos signifiquen mayor posibilidad de tener tuberculosis o actividad de la misma como se expresó en la sección de resultados. Otras asociaciones tales como relación entre títulos positivos o altos con la categoría (definitiva o probable) o presencia de enfermedades concomitantes tampoco permite efectuar inferencias al momento.

El diagnóstico de tuberculosis no siempre es fácil y a excepción de la demostración en cultivo del agente causal, ningún otro método diagnóstico ofrece certeza plena de su existencia. No siempre es sencillo obtener cultivos positivos de muestras tisulares o secreciones, y otros métodos como serología o baciloscopias no han mostrado incrementar la sensibilidad diagnóstica de la enfermedad en forma confiable. Los ANCA podrían ofrecer una posibilidad más dentro del estudio diagnóstico en quienes se sospecha esta enfermedad, pero desde luego, no pueden obtenerse conclusiones a este respecto derivadas de las observaciones de este estudio y se requiere diseñar a partir de los datos obtenidos, un estudio que busque establecer en forma

prospectiva el potencial diagnóstico de la prueba de ANCA en tuberculosis. Por otro lado, solamente se realizó la determinación de ANCA en un momento a lo largo de la evolución de los enfermos, dentro de los cuales, como ya se ha descrito en la sección donde se define la población, existe cierta heterogeneidad en cuanto a actividad de la enfermedad, resistencia a tratamiento y sobre todo, puede cuestionarse el diagnóstico ateniéndose a que lo ideal sería tener cultivos positivos de todos los pacientes. Es posible afirmar sin embargo, que todos estos sujetos eran portadores de tuberculosis de acuerdo a los métodos empleados y el conjunto de estos con la presentación clínica, así como su respuesta al tratamiento.

X. CONCLUSION.

Con la evidencia presentada es posible afirmar que los ANCA están presentes en tuberculosis pulmonar. Por el momento no podemos demostrar un vínculo entre este hecho y la patogénesis de la tuberculosis, pero si ampliar la lista de padecimientos asociados a ANCA.

Debido a que la asociación más fuerte existió con C-ANCA podemos establecer que la presencia de estos no deben llevar a concluir, en presencia de manifestaciones clínicas sugerentes de enfermedad de Wegener, que esta enfermedad existe sin haber antes descartado tuberculosis, especialmente dadas las implicaciones terapéuticas que esto tiene. Con ello, los C-ANCA al igual que

otra serie de anticuerpos, no son específicos o patognomónicos de enfermedad alguna.

Asimismo, existe la posibilidad de que mecanismos fisiopatogénicos similares operen en enfermedades donde la inflamación granulomatosa sea la expresión de diversos estímulos, especialmente de orden infeccioso.

XII. BIBLIOGRAFÍA.

1. Dunlap NE & Briles DE: Immunology of tuberculosis. Medical Clin North Am 1993; 77 (6): 1235-51.
2. Davies DJ, Moran JE, Niall JF et al: Segmental necrotising glomerulonephritis with antineutrophil antibody: Possible arbovirus aetiology? Br Med J (Clin Res) 1982; 285: 606.
3. van der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S, Wiik A et al: Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. Lancet 1985; 1: 425-9.
4. Hagen EC, Ballieux BEPB, van Es LA, Daha MR et al: Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies: a review of the antigens involved, the assays, and the clinical and possible pathogenetic consequences. Blood 1993; 81 (8): 1996-2002.
5. Lesavre P, Noël LH, Gayno S, Nusbaum P et al: Atypical autoantigen targets of perinuclear antineutrophil cytoplasm antibodies (P-ANCA): specificity and clinical associations. J Autoimmun 1993; 6: 185-95.

6. Gross WL, Csernok E & Flesch BK: "Classic" anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (cANCA), "Wegener's autoantigen" and their immunopathogenic role in Wegener's granulomatosis. *J Autoimmun* 1993; 6: 171-84.
7. De Clerck LS, van Offel JF, Smolders WA, Empsten FA et al: Pitfalls with anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *Clin Rheumatol* 1989; 8 (4): 512-6.
8. Specks U, Wheatley CL, McDonald TJ et al: Anticytoplasmic autoantibodies in the diagnosis and follow-up of Wegener's granulomatosis. *Mayo Clin Proc* 1989; 64: 28-36.
9. Schnabel A, Csernok E, Isenberg DA et al: Antineutrophil cytoplasmic antibodies in systemic lupus erythematosus. *Arth Rheum* 1995; 38 (5): 633-7.
10. Davenport A, Lock RJ & Wallington TB: Clinical relevance of testing for antineutrophil cytoplasm antibodies (ANCA) with a standard indirect immunofluorescence ANCA test in patients with upper or lower respiratory tract symptoms. *Thorax* 1994; 49 (3): 213-7.
11. Leavitt RY, Fauci AS, Bloch DA & the ACR Subcommittee on classification of vasculitis: The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Wegener's granulomatosis. *Arth Rheum* 1990; 33 (8): 1101-7.
12. Nölle B, Specks U, Lüdemann J et al: Anticytoplasmic autoantibodies: their immunodiagnostic value in Wegener's granulomatosis. *Ann Intern Med* 1989; 111: 28-40.
13. Cohen Tervaert JW, van der Woude FJ, Fauci AS et al: Association between active Wegener's granulomatosis and

- anticytoplasmic antibodies. Arch Intern Med 1989; 149: 2461-65.
14. Lüdemann J, Utecht B, Flesch BK et al: Proteinase-3, the main target antigen of ACPA/C-ANCA is identical to myeloblastin and AGP7. Am J Kidney Dis 1991; 18 (2): 196.
 15. Csernok E, Lüdemann J, Gross WL et al: Ultrastructural localization of proteinase 3, the target antigen of anti-cytoplasmic antibodies circulating in Wegener's granulomatosis. Am J Pathol 1990; 137: 1113-20.
 16. Kao RC, Wehner NG, Skubitz KN et al: Proteinase 3: a distinct human polymorphonuclear leukocyte proteinase that produces emphysema in hamsters. J Clin Invest 1988; 82: 1963-73.
 17. Rom WN & Zhang Y: The rising tide of tuberculosis and the human host response to Mycobacterium tuberculosis. J Lab Clin Med 1993; 121 (6): 737-41.
 18. Zhang Y, Broser M, Cohen H et al: Enhanced interleukin-8 release and gene expression in macrophages after exposure to Mycobacterium tuberculosis and its components. J Clin Invest 1995; 95: 586-92.
 19. Mayet WJ, Csernok E, Szymkowiak C et al: Human endothelial cells express proteinase 3, the target antigen of anticytoplasmic antibodies in Wegener's granulomatosis. Blood 1993; 82 (4): 1221-29.
 20. Ewert BH, Jennette JC, Falk RJ: The pathogenic role of antineutrophil cytoplasmic autoantibodies. Am J Kidney Dis 1991; 18 (2): 188-95.
 21. Gross WL, Schmit WH & Csernok E: Antineutrophil cytoplasmic

autoantibody-associated diseases: a rheumatologist's
perspective. *Ibidem*; Pp: 175-9.

TABLA 1.

RELACION DE TIPO Y TITULO DE ANCA
EN CONTROLES SANOS.

	1:40	1:80
P-ANCA n=2	1	1

RELACION DE TIPO Y TITULO DE ANCA
EN CONTROLES CON OTRAS PATOLOGIAS.

	C-ANCA 1:20	P-ANCA	
		1:20	1:40
EPOC	1		
ICCV	1		
ALVEOLITIS ALERGICA EXTRINSECA	1		
LEG		1	
TUMOR MEDIASTINAL			1

RELACION DE TIPO Y TITULO DE ANCA
EN PACIENTES TUBERCULOSOS.

C-ANCA N=17	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320
	6	2	5	2	2
P-ANCA N=4	2	1		1	

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

RELACION ENTRE TIPO Y TITULO DE ANCA
 CON LA CATEGORIA DE TUBERCULOSIS
 (DEFINITIVA O PROBABLE)

		Definitiva	Probable	
	1:20	1	5	
	1:40		2	
C-ANCA	1:80	1	4	
	1:160	1	1	
	1:320		2	
	1:20		1	
P-ANCA	1:40		2	
	1:80		1	
negativo		4 definitivos	(2 extrapulmonares)	

CATEGORIAS DE TB. (DEFINITIVA O PROBABLE)

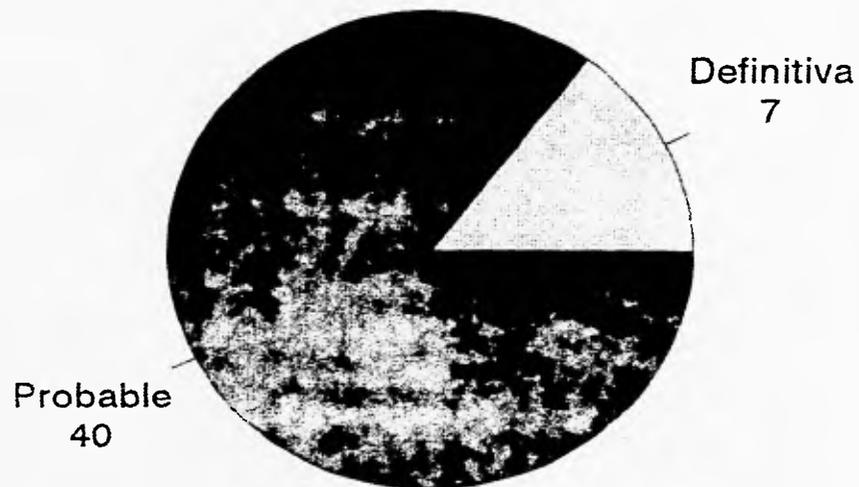


Figura 1

RESULTADOS DE ANCA EN TUBERCULOSOS

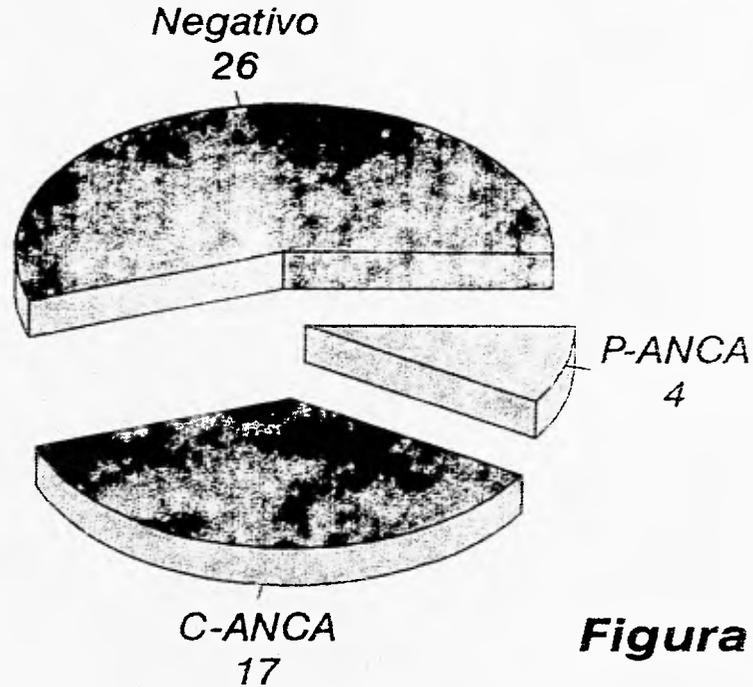


Figura 2

RESULTADOS DE ANCA EN CONTROLES (sanos y enfermos)

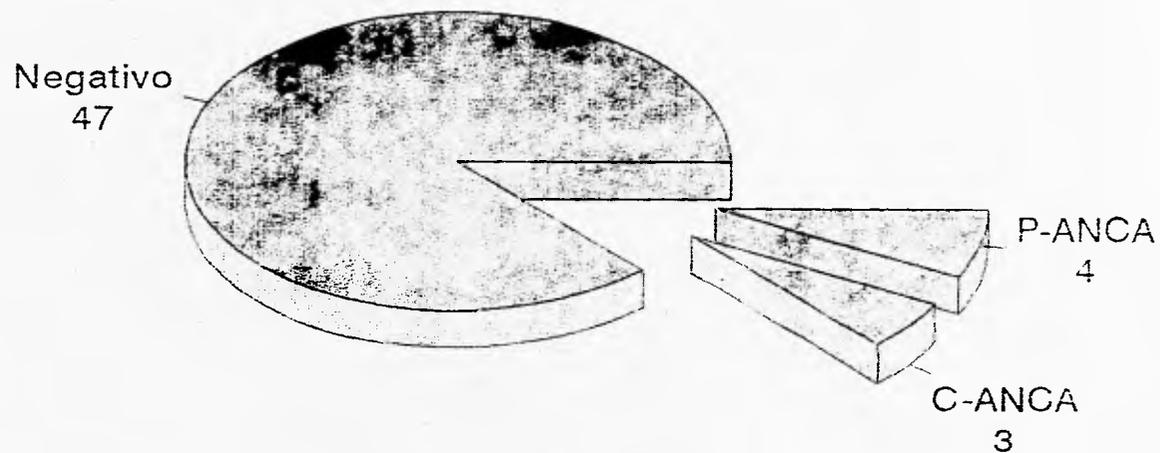


Figura 3

RELACION ENTRE TITULO DE ANCA Y ACTIVIDAD DE LA TB

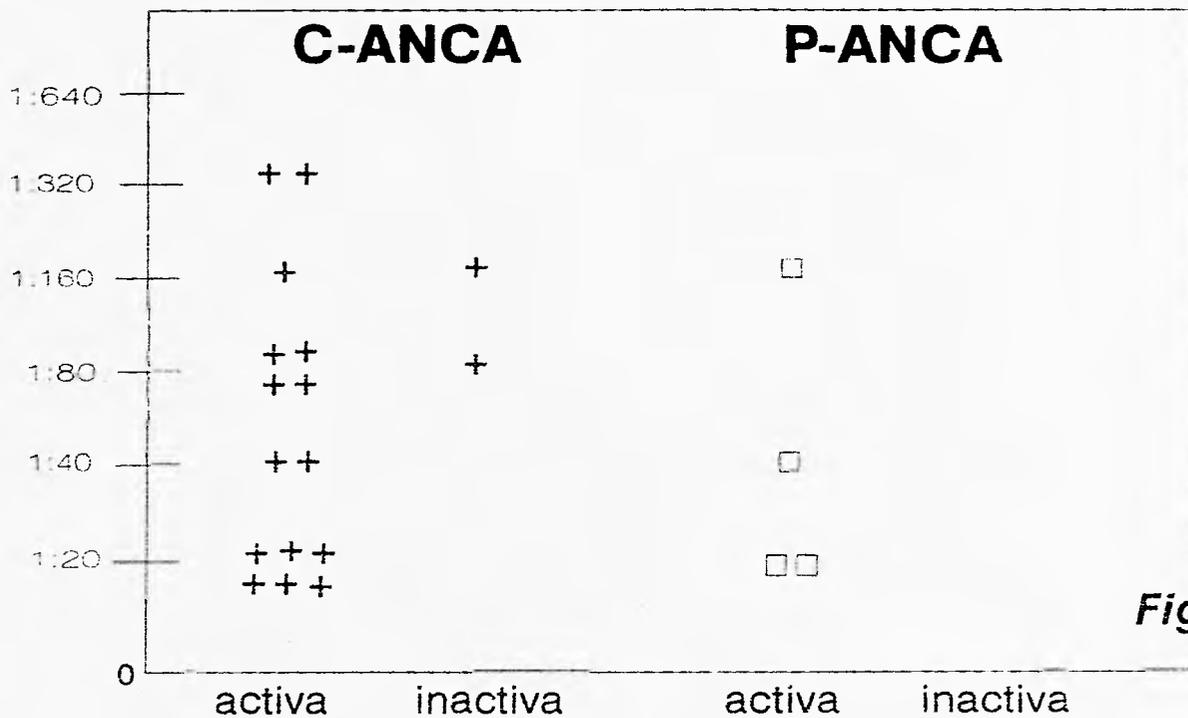


Fig.4

TB Y ANCA

NOMBRE

EDAD

REGISTRO

INSTITUCION

FECHA DE RECOLECCION MUESTRA

DIAGNOSTICO

CONFIRMACION

Histopatológica

Baciloscopia

Cultivo

¿Dónde?

OTRAS SEROLOGIAS POSITIVAS

ENF. CONCOMITANTES

TRATAMIENTO

¿RESISTENCIA?

SI

NO

ANCA (con titulo)

Negativo

pANCA

cANCA