

112401



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACION
SECRETARIA DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA**

**ANTICUERPOS ANTICITOPLASMA DEL
NEUTROFILO EN LA INMUNOPATOGENIA
DE LAS VASCULITIS SISTEMICAS EN
PEDIATRIA**

**TRABAJO DE INVESTIGACION
QUE PRESENTA LA:
DRA. LIZBETH BLANCAS GALICIA
PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
ESPECIALISTA EN
ALERGIA E INMUNOLOGIA CLINICA PEDIATRICA**

Facultad de Medicina



**TUTOR DE LA TESIS:
FRANCISCO J. ESPINOSA ROSALES**

MEXICO, D. F.

2004



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 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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
SECRETARÍA DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

ANTICUERPOS ANTICITOPLASMA DEL NEUTRÓFILO EN LA
INMUNOPATOGENIA DE LAS VASCULITIS SISTÉMICAS EN
PEDIATRÍA

Trabajo de investigación que presenta la:


Dra. Lizbeth Blancas Galicia

Para obtener el diploma de especialista en:
Alergia e Inmunología Clínica Pediátrica

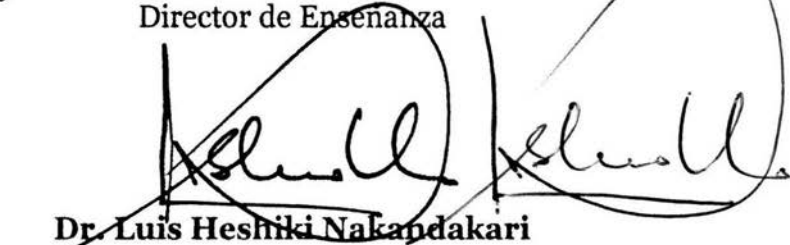
Tutor de la tesis:

Dr. Francisco J. Espinosa Rosales

HOJA APROBACIÓN
ANTICUERPOS ANTICITOPLASMA DEL NEUTRÓFILO EN
LA INMUNOPATOGENIA DE LAS VASCULITIS SISTÉMICAS
EN PEDIATRÍA


Dr. Pedro Sánchez Márquez

Director de Enseñanza


Dr. Luis Heshiki Nakandakari

Jefe del Departamento de Pre y Posgrado



Dr. José G. Huerta López

Profesor titular del curso






Dr. Francisco J. Espinosa Rosales

Tutor del trabajo




SECRETARÍA DE SALUD
DIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
U.N.A.M.

Abstract

Inflammation and necrosis of blood vessel wall occurs in primary vasculitic disorders. An attempt to classify these diverse forms of vasculitis resulted in the Chapel Hill international consensus definitions, which affect many different vessel size as the determinant of classification. Wegener granulomatosis, microscopic polyangiitis and Churg Strauss syndrome are described as a small vasculitis and are acknowledged to be commonly associated with antineutrophil cytoplasm antibodies (ANCA).

Understanding the pathogenesis of ANCA-associated vasculitis is important for the development of novel therapeutic agents, and important advances have been made in recent years. ANCA are thought to contribute to the pathogenesis of the small-vessel vasculitides, activating cytokines-primed neutrophils and monocytes, which express the ANCA antigens, proteinase 3 and myeloperoxidase, on their surface. Neutrophils respond by developing the capability of adhering to cytokine activated endothelial cells, generating a respiratory burst, releasing proteolytic granule contents, and secreting proinflammatory cytokines. ANCA also interfere with the normal processes of resolution of inflammation. Neutrophil apoptosis is dysregulated by ANCA activation of neutrophils, preventing apoptotic cell removal, which in turn allows progression to secondary necrosis, a highly phlogistic event. Electron microscopy studies show the presence of necrotic leucocytes with the intracapillary space.

Resumen

La inflamación y necrosis de la pared de los vasos sanguíneos ocurre en enfermedades vasculares primarias. En un intento de clasificar las diversas formas de vasculitis se hizo la clasificación de Chapel Hill basadas en el tamaño del vaso afectado. La granulomatosis de Wegener, la poliangeitis microscópica y el síndrome de Churg-Stauss son descritos como vasculitis de pequeños vasos y son comúnmente asociadas a anticuerpos contra el citoplasma del neutrófilo.

El entender la patogénesis de las vasculitis asociadas a ANCA facilita el desarrollo de nuevas terapéuticas. Los ANCA contribuyen a la patogénesis de las vasculitis de pequeños vasos, activando los neutrófilos y monocitos que expresan los antígenos de ANCA, proteinasa 3 y mieloperoxidasa, sobre su superficie. Los neutrófilos responden adhiriéndose a la superficie de las células endoteliales activadas, generando el estallido respiratorio, liberando el contenido de gránulos proteolíticos y secretando citocinas proinflamatorias. Los ANCA interfieren además con el proceso normal de resolución de inflamación. La apoptosis de los neutrófilos es desregulada por la activación de los neutrófilos por los ANCA, evitando la remoción de cuerpos apoptóticos, lo cual lleva a una progresión de necrosis. Los estudios de microscopia electrónica muestran la presencia de leucocitos necróticos dentro del espacio intracapilar.

Vasculitis

Bajo el termino de vasculitis se incluye un grupo altamente heterogéneo de enfermedades cuyo nexo común radica en su sustrato histopatológico: inflamación de los vasos sanguíneos de forma aguda o crónica que puede llevar a la necrosis, fibrosis o trombosis (Cassidy 2002).

El tipo de inflamación vascular depende de el tamaño del vaso afectado, la localización y el numero de vasos involucrados. Se pueden afectar prácticamente todos los tramos del árbol vascular incluyendo arterias, venas, capilares y venulas post capilares (Kamesh, 2003).

Las vasculitis son mediadas por mecanismos inmunológicos y se agrupan en primarias cuando no existen factores desencadenantes definidos, o secundarias cuando están dentro del contexto de una patología bien determinada como infección, neoplasia o enfermedad de tejido conectivo (artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico).

La clasificación de las vasculitis primarias o sistémicas se han basado en el calibre de los vasos afectados. Grande: arteritis de Takayasu, arteritis de células gigantes; mediano: poliarteritis nodosa, enfermedad de Kawasaki; pequeño vasculitis por hipersensibilidad, vasculitis de Churg-Stauss, granulomatosis de Weneger y poliangeítis microscópica. Todas las vasculitis comparten características patológicas, sin embargo existen hallazgos microscópicos distintivos que permiten el reconocimiento de categorías específicas de vasculitis (Cassidy 2002).

Las arterias musculares pueden presentar lesiones focales o segmentarias. Estas últimas (afectan toda la circunferencia del vaso) llevando a oclusión o estenosis con infarto distal en órganos. Las lesiones focales podrían llevar a la formación de aneurismas. La hemorragia o el infarto en órganos vitales internos son las complicaciones más serias de la vasculitis (Cassidy 2002).

El espectro clínico de las vasculitis es amplio, puede ser asintomático y limitarse a un órgano o vaso, o bien ser sistémico y fulminante, por ejemplo las vasculitis que afectan los vasos pequeños tales como venulas, capilares y arteriolas causan púrpura en la piel, mononeuritis múltiple en nervios periféricos, mialgias en músculo esquelético, hemorragia de mucosa en intestino, glomerulonefritis en riñón y hemorragia alveolar en pulmón. Las vasculitis que afectan arterias viscerales por ejemplo hígado, riñón, intestino, páncreas y bazo causan infarto y hemorragia que resultan en dolor, disfunción y liberación de enzimas intracelulares hacia la circulación. La vasculitis que afecta la aorta y sus grandes ramas causa isquemia y se manifiesta con disminución de los pulsos, claudicación, gangrena digital e hipertensión renovascular (Cassidy 2002).

Patogenia de la vasculitis

A finales de los años sesenta y principios de los setenta, modelos experimentales del fenómeno de Arthus y la enfermedad del suero proporcionaron una información muy interesante sobre el potencial

lesivo de los complejos inmunes sobre el árbol vascular, y durante casi veinte años se sabía que estos eran el único mecanismo patogénico capaz de lesionar los vasos. Recientemente se ha producido un avance considerable en la identificación de nuevos mecanismos patogénicos diferentes (Hoffman, 2002).

Las vasculitis son enfermedades inflamatorias en las cuales las paredes de los vasos sanguíneos son el blanco de una agresión inmunológica. La inmunopatogenesis de las vasculopatías inflamatorias se ha centrado en el hecho de que el daño endotelial es consecuencia de la infiltración de células inflamatorias dentro y alrededor del vaso sanguíneo. Los fenómenos autoinmunes desempeñan un papel primario en el desencadenamiento de la vasculitis, sin embargo se desconoce que mecanismos determinan el inicio de autoreactividad. Distintos agentes etiológicos entre los que cabe considerar virus, fármacos y otros agentes ambientales no bien identificados tienen mimetismo molecular con proteínas humanas, lo cual da lugar a la generación de autoanticuerpos que inician o forman parte de una respuesta inmunopatológica a nivel vascular (Noel,1998).

Una característica de las vasculitis es su preferencia por determinados lechos vasculares definidos. Se cree que esta selectividad se da por el microambiente del vaso afectado, específicamente la composición celular y molecular de la vasculatura (Noel,1998).

Vasculitis asociadas a ANCA

Aunque las enfermedades asociadas a ANCA son variables en su expresión clínica, debido principalmente a la diferente localización de la vasculitis en los órganos, existe una lesión vascular patológica básica que es compartida entre los pacientes con diferentes síndromes y entre diferentes tipos de vasos en un paciente. Esta lesión se caracteriza por necrosis mural fibrinoide con cariorrexis e infiltrado de leucocitos. Los neutrófilos predominan en las lesiones tempranas, y los leucocitos mononucleares en las lesiones tardías. Por microscopía de inmunofluorescencia, todas las lesiones vasculares de ANCA se caracterizan por ausencia o mínimo depósito de inmunoglobulinas en las pared de los vasos, lo cual es una evidencia en contra del papel patogénico del depósito complejos inmunes o de su formación *in situ*. Las vasculitis con autoanticuerpos anti-citoplasma del neutrófilo tienen tres principales expresiones clínicopatológicas: Granulomatosis de Wegener, síndrome de Churg-Strauss y poliangeitis microscópica (Cassidy, 2002).

Detección de anca en suero

Los métodos de laboratorio que se han utilizado para la detección de anca incluyen la inmunofluorescencia indirecta (IFI), el radioinmunoensayo (RIA), el inmunoensayo enzimático (ELISA), ELISA por captura, el Western Blot, el Dot blot y la inmunoprecipitación. Sin embargo, a excepción de la IFI y ELISA, las otras técnicas se han usado

esporádicamente y básicamente de manera experimental. (Arranz, 2001)

La inmunofluorescencia fue el primer método introducido, su confiabilidad depende del sustrato celular usado, del proceso de fijación, del almacenamiento de las laminillas, de los tiempos de incubación y de lavado. Con neutrófilos fijados con alcohol se pueden diferenciar los dos patrones de tinción: el patrón citoplásmico (c-ANCA) y el perinuclear (p-ANCA). La interpretación de los patrones de IFI requiere de gran experiencia.

La inconsistencia encontrada en la interpretación de los patrones de ANCA entre los diferentes laboratorios impulso para la realización de ensayos en fase sólida de antígeno-anticuerpo como ELISA para mieloperoxidasa, lactoferrina y proteinasa 3 (Arranza, 2001).

Western-blot es una técnica que a diferencia de radioinmunoanálisis y el análisis inmunoabsorbente unido a enzima no cuantifica los niveles de ciertos antígenos o anticuerpos, sino que con esta se puede identificar y caracterizar bioquímicamente a los antígenos contenidos en una mezcla compleja.

Inmunopatogenia de los anticuerpos anticitoplasma del neutrófilo en la vasculitis

Los autoanticuerpos con especificidad para componentes citoplasmáticos del neutrófilo se denominan anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo (ANCA del inglés anti-neutrophil

cytoplasmic antibodies). Este término se acuñó en 1989 en el segundo taller internacional de ANCA (Russell k, 2001).

Los ANCA fueron descritos inicialmente a principios de 1960 en pacientes con artritis reumatoide, neutropenia autoinmune y colitis ulcerativa (Wiik,2000). Sin embargo la identificación fue en 1982 por Davies y cols. en Australia, al observar que los anticuerpos del suero de una pequeña cohorte de pacientes con glomerulonefritis necrotizante se unían a neutrófilos humanos (Vivete d Agati J. 2002).

Sin embargo, fue hasta 1985 cuando un grupo de investigadores alemanes y daneses encontraron una fuerte asociación entre los anticuerpos anticitoplasma del neutrófilo y la granulomatosis de Weneger activa (Hellmich, 2003).

El siguiente paso fue la determinación de los blancos antigénicos de los anticuerpos anticitoplasma del neutrófilo (ANCA). Se observaron dos patrones de tinción, el perinuclear y el citoplasmático, por inmunofluorescencia, después de la aplicación de suero de un paciente sobre un substrato de neutrófilos fijados con alcohol. El patrón perinuclear (p) corresponde a ANCA con especificidad para mieloperoxidasa, mientras que el patrón citoplasmático (c) corresponde a ANCA con especificidad para proteinasa-3 (c-ANCA). Ambos blancos antigénicos son citoplasmáticos y residen en gránulos azurófilos y lisosomas de los neutrófilos y monocitos, pero debido a que la mieloperoxidasa se distribuye en la membrana nuclear durante la fijación de la muestra con alcohol da un patrón perinuclear en el neutrófilo. Sin embargo esto no sucede al fijar con formaldehído (Vivete d Agati j,2002 y Hellmich b, 2003).

El patrón citoplasmático (c) se ha asociado a proteinasa 3, y en menor porcentaje a elastasa y catepsina. (Witko, 2000). El patrón perinuclear (p) se ha asociado a MPO y lactoferrina (Rarok, 2003).

A principios de los noventa los investigadores dirigieron sus esfuerzos a correlacionar el tipo de patrón y especificidad antigénica de los ANCA con distintos síndromes clínico-patológicos. Los c-ANCA fueron detectados en pacientes con granulomatosis de Wegener, mientras que los p-ANCA predominan en pacientes con poliangeitis microscópica, glomerulonefritis creciente y síndrome de Churg-Strauss (Vivete d Agati, 2002). Zweiman y cols describen que los ANCA determinados en suero de pacientes con artritis reumatoide son predominantemente antielastasa (Zweiman b. 1999).

El isotipo predominante de ANCA es IgG, sin embargo se han descrito IgM o IgA. No se han determinado las subclases de ANCA para cada tipo de vasculitis (Clayton, 2000, Arranz, 2001 y Peen, 2000).

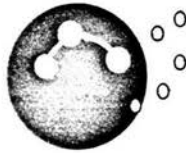
Los antígenos blanco de los ANCA están dirigidos contra moléculas almacenadas en los diferentes gránulos citoplasmáticos del neutrófilo.



Los gránulos azurófilos son los primeros que se forman en el estadio de promielocito, contienen *mieloperoxidasa* y *proteinasa 3 (PR3)*. Más tardíamente, en el metamielocito, se forman los gránulos secundarios

que contienen *lactoferrina* y *colagenasa*, seguido por los gránulos terciarios que contienen *gelatinasa*.

Bajo ciertos estímulos los neutrófilos liberan sus gránulos que contiene enzimas (Witko, 2000).



Después de la degranulación las enzimas son inhibidas, la proteínasa 3 por α -1 antitripsina y mieloperoxidasa por ceruloplasmina (Esnault, 2002).

Se sabe que las enzimas de los gránulos se pueden encontrar fuera de estos. La proteínasa 3, una serin proteasa de los gránulos azurófilos, se ha determinado en la membrana de estos (Witko, 2000).

Witko y Schönermarck han estudiado en neutrófilos circulantes no activados de diferentes grupos de individuos sanos que, unos expresan PR3 sobre la membrana y otros no, PR3 + o PR3- (Witko, 2000; Schönermarck, 2001).

In vitro la expresión MPO en la membrana citoplasmática de los neutrófilos se ve incrementada por TNF- α (Falk, 1990).

La expresión antígenos (enzimas) en la membrana citoplasmática y de los gránulos podría explicar la accesibilidad de los ANCA.

Aún no se ha dilucidado como se alcanzan los otros antígenos secuestrados a nivel intra-citoplásmico.



Se desconoce cuales son los mecanismos que generan la producción de ANCA. Sin embargo algunos hallazgos explican parcialmente este proceso.

Los neutrófilos son activados por citocinas, como el factor de necrosis tumoral alfa(TNF- α), factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β 1), secretadas durante episodios de enfermedad inflamatoria o infecciosa, induciendo translocación de antígenos blancos (PR3 y MPO) del citoplasma a hacia la superficie extracelular en donde son accesibles al sistema inmune, incluyendo linfocitos autoreactivos con potencial para desarrollar una respuesta autoinmune (Ben-Smith,2001 y Zweiman, 1999). Se han determinado niveles elevados de TNF- α en pacientes con vasculitis sistémica, los cuales se han asociado al inicio o reactivación de la vasculitis con fenómenos infecciosos (Rarok, 2003).

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso a través del cual la célula es eliminada por fagocitosis sin producir reacciones inflamatorias nocivas. Se caracteriza por ruptura del DNA, condensación y fragmentación nuclear, cambios en la distribución de lípidos en la membrana plasmática y separación de las células de la

matriz extracelular. Los cuerpos apoptóticos son fagocitados rápidamente. Este tipo de muerte fisiológica contrasta con la necrosis, en la cual la integridad de la membrana plasmática se pierde y el contenido celular es degradado por enzimas y liberado, resultando en una inflamación patológica (Esnault, 2002).

La falta de aclaramiento de los cuerpos apoptóticos se ha asociado a autoinmunidad. En pacientes con vasculitis renal asociada a ANCA se han demostrado alteraciones en la fagocitosis de cuerpos apoptóticos. La ingesta y degradación de los cuerpos apoptóticos por los fagocitos es un proceso rápido lo cual hace difícil encontrarlos en cortes tisulares, sin embargo, en este grupo de pacientes hay macrófagos con cuerpos apoptóticos. Los antígenos blanco para ANCA son expresados sobre la superficie de las células en apoptosis (Esnault, 2002).

De forma experimental se indujo pérdida la tolerancia inmunológica a los neutrófilos, se generaron ANCA al inyectar cuerpos apoptóticos singénicos a ratas. Se desconoce cuáles fueron las señales de daño que llevaron a la producción de estos autoanticuerpos (Esnault, 2002).

En un estudio realizado por Cohavy y cols. encontraron reactividad cruzada de ANCA de suero de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, con epítopes de antígenos proteicos de *bacteriodes caccae* y *escherichia coli* por inmunoblot. Este hallazgo podría explicar la generación de ANCA por mimetismo molecular (Cohavy, 2000).

El único desencadenante externo de vasculitis identificado, es el medicamento antitiroideo propiltiouracilo, sin embargo se desconoce a través de que mecanismo ocurre (Savag y cols, 2002).

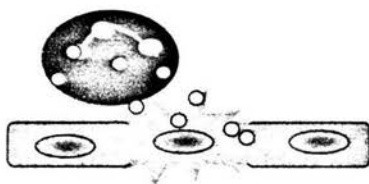
La activación del neutrófilo por ANCA puede ser a través de las regiones F(ab)₂ o Fc. Los F(ab)₂ se unen a MPO o PR3 de la membrana, como estas proteínas no poseen dominios intramembranales para la señalización se cree que están unidas a β 2 integrinas, a través de las cuales se inicia la señalización (Rarok, 2003).

El complejo MPO ó PR3-anca interacciona a través de su Fc con los Fc γ Rs de la superficie del neutrófilo. Los neutrófilos expresan predominantemente fc γ rRIIa (CD32) y Fc γ IIR (CD16), que son proteínas transmembrana tipo I (Rarok, 2003). El entrecruzamiento de los receptores Fc γ *in vitro*, ya sea usando agregados de IgG como complejos inmunes o anticuerpos monoclonales específicos, produce fagocitosis del neutrófilo, degranulación y estallido respiratorio (Ben-Smith, 2001).

Las vías de señalización para la activación de los neutrófilos se conocen parcialmente. Se sabe que la activación de fosfolipasa C es dependiente de la tirosin cinasa e independiente de proteína G, con la consiguiente elevación del nivel calcio intracelular e iniciación del estallido respiratorio (Rarok, 2003; Ben-Smith, 2001). Los mediadores proinflamatorios liberados por los neutrófilos son el oxido nítrico, metabolitos reactivos de oxígeno y enzimas proteolíticas (Kamesh, 2002).

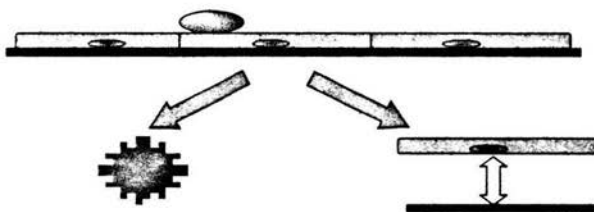
Los ANCA están implicados en la iniciación del daño endotelial y vascular en las vasculitis en las que están presentes (Ben-Smith, 2001) Las célula endotelial desarrollan un fenotipo de activación en las vasculitis asociadas a ANCA con incremento de la expresión de moléculas de adhesión, promoviendo su interacción con células

inflamatorias circulantes como los neutrófilos. Una vez que se adhieren a las células endoteliales las dañan a través de sus enzimas (Kamesh, 2002).

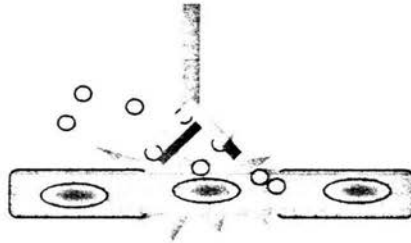


Se ha descrito la presencia de PR3 en células no mieloides, incluyendo células endoteliales. Se ha demostrado su presencia sobre las células endoteliales después de la estimulación con enzimas proinflamatorias o por unión después de haber sido liberadas de neutrófilos en degranulación a través de fuerzas electrostáticas (Rarok, 2003).

La proteínasa 3 y la mieloperoxidasa unida directamente a la célula endotelial provocan que la célula endotelial se separe de la membrana basal y sufra apoptosis (Rarok, 2003 y Kamesh, 2002).



Además los ANCA se pueden unir PR3, MPO y elastasa a las células endoteliales e inducir citotoxicidad mediada por anticuerpos de las células endoteliales (Kamesh, 2002).



No existe evidencia de que la patogénesis de los anca sea a través de complejos inmunes circulantes (Witko, 2000).

Las células T podrían participar en la patogénesis de la vasculitis asociada a ANCA. La respuesta proliferativa *in vitro* de los linfocitos T periféricos a PR3 purificado fue positiva en pacientes con vasculitis activa, y negativa en pacientes con enfermedad controlada o sujetos sanos. (Clayton, 2000 y Christensson, 2000).

BIBLIOGRAFÍA

Arranz O, Ara J, Rodríguez R, Quinto L, Font J, Mirapeix E and Darnell A (2001) Comparison of anti-PR3 capture and anti-PR3 direct ELISA for detection of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in long-term clinical follow-up of PR-3 ANCA-associated vasculitis patients *Clin Nephrol* 56:295-301.

Bakkaloglu A, Ozen S, Saatci U, Erguven S, Topaloglu R, Bassoy Y, Besbas N (1999) Antineutrophil cytoplasmic antibodies in juvenile chronic arthritis *Clin rheumatol* 18:304-7.

Ben-Smith A, Dove S, Martin A, Wakelam M, and Savage O (2001) Antineutrophil cytoplasm autoantibodies from patients with systemic vasculitis activate neutrophils through distinct signaling cascades: comparison with conventional Fc γ receptor ligation *Blood* 98:1448-55.

Cassidy JT, Petty RE. Textbook of pediatric rheumatology, fourth edition ed. Saunders company, Philadelphia, USA, 2002.

Choy E, Panayi S (2001) Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis *N Engl J Med* 344:907-916.

Christensson M, Pettersson E, Sundqvist K.-G, and Christensson (2000) T cell activation in patients with ANCA-associated vasculitis:

inefficient immune suppression by therapy *Clinical Nephrol* 54:435-442.

Clayton A and Savage C (2000) What you should Know about PR3-ANCA. Evidence for the role of T cell in the pathogenesis of systemic vasculitis. *Arthritis Res* 2: 260-262.

Cohavy O, Bruckner D, Gordon K, Misra R, Wei B, Eggena M, Targan S, and Braun J (2000) Colonic bacteria express an ulcerative colitis p ANCA-related protein epitope *Infect. immun* 68: 1542-1548.

D'Agati Vivette (2002) Antineutrophil cytoplasmic antibody and vasculitis: much more than a disease marker. *J. clin Invest.* 110:919-921.

Duarte C, Ruperto N, Goycochea M, Maldonado R, Beristain R, De Inocencio J, Burgos-Vargas (2001) The Mexican version of the Childhood Health Assessment Questionnaire (CHAQ) and the Child Health Questionnaire (CHQ) *Clin Exp Rheumatol* 19(Suppl 23):S106-S110.

Esnault V.(2002) Apoptosis: the central actor in the three hits that trigger anti-neutrophil cytoplasmic antibody –related systemic vasculitis *Nephrol Dial Transplant* 17:1725-1728.

Falk R, Terrell R, Charles L, and Charles J (1990) Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro *Proc. Natl Acad Sci* 87:4115-19.

Goycochea R, Garduño E, Vilchis G, Ortiz A, Burgos V (1997) Validation of a Spanish Version of the Childhood Health Assessment Questionnaire *J Rheumatol* 24:2242-5.

Helmich B, Csernok E, and Gross W(2003) 20 years with ANCA (antineutrophil cytoplasmic autoantibodies): from seromarker to a major pathogenic player in vasculitis. *J. Leukoc. Biol.* 74:1-3.

Hoffman G, and Weyand C. Inflammatory disease of blood vessels, first edition, ed. Dekker, New York, 2002.

John Morrow, Lee Nelson, Richard Watts, David Isenberg. Autoimmune rheumatic disease, second edition, editorial Oxford, Oxford New York, 1999.

Kamesh L, Harper L, and Savage C (2002) ANCA-positive vasculitis *J Am Soc Nephrol* 13:1953-1960.

Mulder AH, Horst G, van Leeuwen MA, Limburg PC, Kallenberg CG (1993) Antineutrophil cytoplasmic antibodies in rheumatoid arthritis. Characterization and clinical correlations. *Arthritis Rheuma* 36:1054-60.

Mulder L, van Rossum M, Horst G, Limburg P, de Graeff-Meeder ER, Kuis W, Kallenberg C (1997) *J Rheumatol* 24:568-75.

Noel R, Rose Ian R, Mackay. The autoimmune disease, third edition, ed. academic press, San Diego California USA, 1998.

Peen E and Williams R (2000) What you should know about PR3-ANCA. Structural aspects of antibodies to proteinase 3 (PR3) *Arthritis Res* 2:255-259.

Quarni M, Kohan D (2000) pauci-immune necrotizing glomerulonephritis complicating rheumatoid arthritis *Clin nephrol* 54:54-8

Rarok A, Limburg P, and Kallenberg C (2003) Neutrophil-activating potential of antineutrophil cytoplasm autoantibodies. *J. Leukoc. Biol.* 74:3-15.

Russell K and Specks U. (2001) Are antineutrophil cytoplasmic antibodies pathogenic. *Rheumatic disease clinics of North America.* 27(4):815-832.

Savage CO, Harper L, Holland M (2002) New findings in pathogenesis of antineutrophil cytoplasm antibody associated vasculitis *Curr Opin Rheumatol* 14:15-22.

Schaller Jane (1997) Juvenile Rheumatoid arthritis *Pediatrics in review* 18:337-349

Schneider R, Paso MH (2002) Juvenil rheumatoid arthritis *Rheuma Dis Clin North Am* 28:503-30.

Schönermarck U, Lamprecht P, Csernok E, and Gross L (2001) Prevalence and spectrum of rheumatic diseases associated with proteinase 3-antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) and myeloperoxidase-ANCA *Rheumatol* 40:178-184.

Sediva A, Hoza J, Nemcova D, Pospisilova D, Bartunkova J, Vencovsky J (2001) immunological investigation in children with juvenile chronic arthritis *Med sci Monit* 7:99-104.

Speckmaier M, Rother E, Terreri T, Reiff A, Metzger D, Schuchmann L, Forster J, Peter HH, Brandis M (1996) Prevalence of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in juvenile chronic arthritis *Clin Exp rheumatol* 14:211-216

Sterlig G. West. Rheumatology secrets, first edition, ed. Hanley and Belfus, Philadelphia, Pennsylvania, 1997.

Stewart O, Simmons I, Martin M, Morrell A (2001) Bilateral facial nerve palsy associated with p-ANCA positive in a patient with rheumatoid arthritis *Br J Ophthalmol* 2001 85:1266-7

Tsokos G.C. Principles of molecular rheumatology, first edition, ed Human press. Totowa, New Jersey, 2000.

Wiik Allan (2000) What you should Know about PR3-ANCA, an introduction. *Arthritis Res* 2:252-254.

Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P and Halbwachs-Mecarelli (2000) neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Laboratory Investigation* 80:617-650.

Witko-Sarsat V, Lesavre P, López S, Bessou G, Hieblot C, Prum B, Noel L, Guillevin L, Ravaud P, Sermet-Gaudelus I, Timsit J, Grünfield JP, and Halbwachs-Mecarelli (1999) A Large subset of Neutrophils expressing Membrane Proteinase 3 is a risk factor for vasculitis and rheumatoid arthritis *J Am Soc Nephrol* 10:1224-1233.

Woo P, Wedderburn R (1998) Juvenile Chronic arthritis. *Lancet* 351:969-73.

Zamarripa Torres M. Tesis: Anticuerpos anticitoplasma de neutrofilo en pacientes con enfermedades que cursan con vasculitis y gromerulonefritis. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, INP. Agosto 1997. México D.F.

Zweiman B and Allmen C(1999) Comparative effects of antilactoferrin antibodies and tumor necrosis factor on neutrophil adherence to matrix proteins. *Clin Diagn lab immunol* 6:364-368.