

Utilidad clínica de los anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos en lupus eritematoso sistémico juvenil*

Clinical usefulness of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in childhood systemic lupus erythematosus

Utilidade clínica dos anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos no lúpus eritematoso sistêmico juvenil

- Antonio Cardinalli^{1a}, Alejandra Ginaca^{2b}, Graciela Espada^{3c},
María Cristina Pizzimenti^{2a}, María Emilia Rivas^{3b}, Lina Leggire^{3c}, Gloria Griemberg^{4a}

¹ Dr. en Bioquímica.

² Bioquímica.

³ Médica.

⁴ Prof. Bioquímica.

^a Lab. de Inmunología Clínica. Departamento de Bioquímica Clínica. Hospital de Clínicas "José de San Martín". Facultad de Farmacia y Bioquímica (U.B.A.).

^b Lab. de Inmunología. Hospital de Niños "Dr. Ricardo Gutiérrez".

^c Servicio de Reumatología. Hospital de Niños "Dr. Ricardo Gutiérrez".

Lugar donde se realizó el estudio

Lab. de Inmunología Clínica. Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Farmacia y Bioquímica (U.B.A.). Av. Córdoba 2351. (1120). CABA. Argentina. Lab. de Inmunología y Servicio de Reumatología. Hospital de Niños "Dr. Ricardo Gutiérrez". Sánchez de Bustamante 1399. (1425). CABA. Argentina.

* Parte de este trabajo fue premiado por la Asociación Médica del Hospital de Clínicas, Medalla de Oro, bajo el título "Los anticuerpos anti DNA nativo se mimetizan con el patrón perinuclear de los anticuerpos anti citoplasma de neutrófilos (ANCA). ¿Cuál es la prevalencia e importancia clínica de los ANCA en lupus eritematoso sistémico juvenil?"

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

Resumen

En lupus eritematoso sistémico juvenil (LES) no existen suficientes antecedentes como para obtener resultados concluyentes entre la prevalencia de anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA) y la importancia clínica en esta enfermedad. Sumada a la falta de estudios se encuentra la dificultad de detectar ANCA en presencia de anticuerpos anti nucleares (ANA). Este estudio tiene como objetivos determinar: a) la frecuencia de ANCA en LES juvenil, evitando por absorción las imágenes interferentes de ANA, b) las especificidades antigénicas de los ANCA y c) la asociación de ANCA con el grado de actividad de la enfermedad y con las diferentes manifestaciones clínicas. Ingresaron al estudio un grupo de 51 pacientes (media de edad: 14,6 años) con LES juvenil (*American College of Rheumatology*, 1982). La actividad clínica se evaluó utilizando el índice de actividad para LES (SLE-DAI). Los ANCA fueron detectados por inmunofluorescencia indirecta (IFI) y los antígenos asociados a ANCA, por intermedio de un inmunoensayo lineal cualitativo desarrollado (LIA-Blot). La interferencia por ANA y por anti ADN nativo (aADNn) fue eliminada por absorción con absorbentes desarrollados específicamente para este fin. Se verificó la ausencia de ANA y aADNn en los sobrenadantes de los sueros absorbidos realizando IFI sobre sustratos específicos. La prevalencia de pANCA y aANCA fue de 9,8% (5/51) y 5,9% (3/51) respectivamente. La frecuencia detectada por LIA-Blot para antimieloperoxidasa (aMPO) fue 9,8% (5/51) y para antilactoferrina (aLf) 13,7% (7/51). En ningún suero se detectó cANCA, ni anti proteinasa 3 (aPR3) o antielastasa (aHLE). Cuando se evaluó la relación entre las diferentes manifestaciones clínicas y la presencia de ANCA y sus especificidades, sólo se encontró asociación significativa entre glomerulonefritis y alguno de los siguientes anticuerpos: pANCA o aMPO, o pANCA + aMPO ($p < 0,05$) (*chi cuadrado*). No se encontró correlación significativa ($p > 0,05$) entre los ANCA o sus antígenos y el grado de actividad de la enfermedad. Este estudio estableció la prevalencia de ANCA por IFI en 15,7% y por LIA Blot en 25,6% de los pacientes estudiados, porcentajes que son menores a los ya comunicados. Se ha hallado correlación significativa solamente con la presencia

de compromiso renal severo. Se necesitarán otros estudios con mayor número de pacientes para evaluar asociaciones clínicas diferentes a la glomerulonefritis.

Palabras clave: anticuerpos anticito plasma de neutrófilos * lupus eritematoso sistémico juvenil * absorbente anticuerpos antinucleares

Summary

Not so many studies evaluating the prevalence and the clinical usefulness of ANCA in childhood systemic lupus erythematosus (SLE) have been published. Furthermore, the interference of anti-nuclear antibodies (ANA) with ANCA detection has been described. This study was designed to detect ANCA prevalence in children with SLE, avoiding ANA interference. In order to differentiate certain groups displaying vasculitis or glomerulonephritis, the antigenic specificity of ANCA and their association with the disease activity. Different clinical features were also assessed. A total of 51 patients (mean age, 14.6 years) were studied. SLE was established following the American College of Rheumatology criteria. Patients were clustered according to the Disease Activity Index (SLE-DAI). ANCA were detected by indirect immunofluorescence (IFI). Antigenic specificity was characterized by a lineal qualitative home-made immunoassay (LIA-Blot). Interference by ANA and native anti-DNA antibodies (aDNAn) was avoided by specific sorbents. Prevalence of pANCA and aANCA was 9.8% (5/51) and 5.9% (3/51), respectively. Anti-myeloperoxidase (aMPO) and anti-lactoferrin (aLf) frequencies were 9.8% (5/51) and 13.7% (7/51), respectively. No cANCA, anti-proteinase 3 or anti-elastase antibodies were detected. Both pANCA and aMPO, alone or associated, proved to be related to the presence of glomerulonephritis ($p=0.02$, chi square), but not to the SLE-DAI. This study asserts the presence of ANCA in children with SLE. In addition, a significant association of pANCA and anti-MPO with glomerulonephritis was found. Further studies including larger number of patients are needed to assess the association of ANCA with other clinical features.

Key words: antineutrophil cytoplasmic autoantibodies * childhood systemic lupus erythematosus * sorbent antinuclear antibody

Resumo

No lúpus eritematoso sistêmico juvenil (LES) não existem antecedentes suficientes como para obter resultados concludentes entre a prevalência de anticorpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA) e a significância clínica nesta doença. Além da ausência de estudos se encontra a dificuldade de detectar ANCA em presença de anticorpos antinucleares (ANA). Este estudo tem como objetivo determinar: a) a frequência de ANCA no LES juvenil, evitando por absorção as imagens interferentes de ANA, b) as especificidades antigênicas dos ANCA e c) a associação de ANCA com o grau de atividade da doença e com as diversas manifestações clínicas. O estudo incluiu um grupo de 51 pacientes (média de idade: 14,6 anos) com LES (American College of Rheumatology, 82) juvenil. A atividade clínica foi avaliada usando o índice de atividade para LES (LES-DAI). Os ANCA foram detectados por imunofluorescência indireta (IFI) e os antígenos associados a ANCA através de um imunoensaio linear qualitativo desenvolvido (LIA-Blot). A interferência POR ANA e por ADN nativo (Adnan) foi eliminado por absorção com absorventes especificamente desenvolvidos para este fim. Foi verificada a ausência de ANA e Adnan em sobrenadantes dos soros absorvidos realizando IFI em substratos específicos. A prevalência de pANCA e aANCA foi de 9,8% (5/51) e 5,9% (3/51), respectivamente. A frequência detectada por LIA-blot para anti-mieloperoxidase (AMPO) foi de 9,8% (5/51) e anti lactoferrina (ALF) 13,7% (7/51). Em nenhum soro foi detectado cANCA nem anti proteinase 3 (APR3) ou anti-elastase (Ahle). Quando foi avaliada a relação entre as diferentes manifestações clínicas e a presença de ANCA e as suas especificidades, só foi achada associação significativa entre a glomerulonefrite e algum dos seguintes anticorpos: pANCA ou AMPO, ou pANCA + AMPO ($p < 0,05$) (chi quadrado). Nenhuma correlação significativa foi encontrada ($p > 0,05$) entre os ANCA ou seus antígenos e o grau de atividade da doença. Este estudo estabelece a prevalência de ANCA por IFI em 15,7% e por LIA Blot em 25,6% dos pacientes estudados, percentuais que são menores aos comunicados. Há correlação significativa apenas na presença de compromisso renal severo. Outros estudos serão necessários, com maior número de pacientes para avaliar associações clínicas diferentes da glomerulonefrite.

Palavras-chave: anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos * lúpus eritematosos sistêmico juvenil * absorvente anticorpos antinucleares

Introducción

Los anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA) son un grupo de autoanticuerpos dirigidos contra constituyentes de los gránulos primarios y secundarios de neutrófilos y constituyentes de los lisosomas de monocitos (1). Se establecieron como los antígenos más fuertemente asociados a estos autoanticuerpos: la proteinasa 3 (PR3), la mieloperoxidasa (MPO), la catepsina G (Cat G), la lactoferrina (Lf) y la elastasa (HLE). Por inmunofluorescencia indirecta (IFI) y utilizando como sustrato neutrófilos humanos se pueden distinguir tres patrones: citoplasmático (cANCA) que está asociado a anti PR3 (aPR3), perinuclear (pANCA) relacionado principalmente con anti MPO (aMPO) y un patrón denominado atípico (aANCA) relacionado antigénicamente con un grupo heterogéneo de antígenos como Cat G, Lf, HLE (1) (2).

El patrón cANCA se asocia específicamente a granulomatosis de Wegener (GW) (3). En cambio, el patrón pANCA se asocia fundamentalmente con poliangeitis microscópica y glomerulonefritis crescética idiopática (4). Tanto el patrón pANCA como el aANCA se han detectado en otras enfermedades inflamatorias crónicas y en particular la imagen pANCA se ha observado en lupus eritematoso sistémico (LES). Las evidencias de ANCA en LES en pacientes adultos así como su asociación con antígenos y su correlación clínica es dispar (5-9). En lo que respecta a LES juvenil no existen suficientes antecedentes como para obtener resultados concluyentes en este tema (10). Sumada a la falta de estudios en este tipo de patología, se encuentra la dificultad para detectar ANCA en presencia de anticuerpos antinucleares (ANA) (11-13). Si bien existe la posibilidad de inhibición de imágenes de ANA sobre neutrófilos humanos cuando se estudia el suero incógnita sobre improntas fijadas con formaldehído o formaldehído acetona, la eliminación de la imagen de ANA no siempre se verifica, lo que se traduce en una dificultad en la interpretación de los resultados (13) (14). Este estudio tiene como objetivos determinar: a) la frecuencia de ANCA en LES juvenil, evitando por absorción las imágenes interferentes de ANA, b) las especificidades antigénicas de los ANCA y c) la correlación de ANCA con el grado de actividad de la enfermedad y las diferentes manifestaciones clínicas.

Materiales y Métodos

PACIENTES

Se analizó un grupo de 51 pacientes con LES juvenil (45 mujeres, 6 varones), el que fue diagnosticado según los criterios del Colegio Americano de Reumatología (15), con un promedio de edad de $14,6 \pm 3$ años (me-

dia ± 2 DE), edad de comienzo $11,5 \pm 2,3$ años, mediana de tiempo de seguimiento 24 (P₂₅: 12/P₇₅: 48) meses y tiempo de evolución 31,4 (P₂₅: 12/P₇₅: 54) meses.

El grado de actividad de la enfermedad se estableció con el Índice de Actividad para LES (SLE-DAI) (16), agrupando los pacientes en inactivos, SLE-DAI = 0, con actividad leve o moderada, SLE-DAI 1-10 y severos SLE-DAI >10.

DETECCIÓN DE ANA

La detección de ANA y anti ADN nativo (aADNn) se realizó por IFI utilizando células HEp-2 (dilución inicial: 1/40) (Kallestad, Austin, Texas, EE.UU) y *Crithidia luciliae* (Inova, San Diego, CA, EE.UU) (dilución inicial: 1/20) respectivamente. Los anticuerpos anti Ro (aRo), La (aLa), Sm (aSm) y RNP (aRNP) fueron determinados por Western blot (GULL, Limal, Bélgica).

CUANTIFICACIÓN DE FRACCIONES DEL COMPLEMENTO

La cuantificación de las fracciones C₃ y C₄ del suero se realizó por nefelometría (QM 300 Nefelómetro, Sanofi-Pasteur, Caska, MN, EE.UU).

DETECCIÓN DE ANCA

Inmunofluorescencia indirecta para ANCA

Los sueros fueron evaluados por IFI según el método propuesto por A. Wiik (17) y avalado por el Grupo Europeo de Estudio de Normatización Metodológica para ANCA (18) (19). Las improntas preparadas con neutrófilos purificados, luego de fijadas con etanol absoluto o formaldehído al 5% en *buffer* fosfato salino pH 7,4 (PBS), fueron secadas al aire e incubadas con las muestras de suero diluido 1/20 en PBS. Para evidenciar la unión de los autoanticuerpos se utilizó antisuero de cabra F(ab')₂ anti IgG humana (Kallestad, Austin, Texas, EE.UU).

Las muestras en las que se observó imagen sugestiva de ANA conjuntamente con la de pANCA en la IFI, utilizando como sustrato neutrófilos humanos fijados con etanol, se consideraron reactivas cuando al evaluar la misma muestra frente a improntas con neutrófilos humanos fijadas con formaldehído se observó el cambio de imagen desde la periferia del núcleo hacia el citoplasma con negativización de la imagen nuclear (4) (14). Para evitar esta dificultad en la interpretación de los resultados por la presencia de ANA, se trató el total de los sueros con un absorbente específico de los ANA desarrollado a partir de timo de ternera (13). Para eliminar los anticuerpos aADNn las muestras fueron diluidas en un absorbente preparado con 5 mg/mL de ADN altamente polimerizado de timo de ternera (ADNn) (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU) disuelto en *buffer* Mc Ilvaine

(0,1 M ácido cítrico, 0,2 M PO_4HNa_2 , pH 4,9), que posteriormente se equilibró por diálisis contra *buffer* PBS pH 7,4 durante 24 h.

Para la eliminación de ANA y de aADNn se diluyeron los sueros 1/20 en el absorbente respectivo. Se incubó la mezcla 24 h a 37 °C; pasado el tiempo de incubación se centrifugó 10 min a 500 g. El sobrenadante obtenido se utilizó para la IFI realizada sobre neutrófilos humanos fijados con etanol, considerando la dilución ya efectuada en el absorbente.

En todas las evaluaciones se incluyeron controles reactivos y no reactivos. Todas las muestras fueron evaluadas independientemente por dos observadores.

Inmunoanálisis cuantitativo para la detección de anticuerpos aPR3

La especificidad antigénica aPR3 se determinó por ELISA (Inova, San Diego, CA, EE.UU.).

Inmunoensayo lineal (LIA-Blot) cualitativo para la detección de anticuerpos anti MPO, anti HLE (aHLE), anti Lf (aLf), anti Cat G (aCat G).

Para la detección de anticuerpos con especificidad hacia antígenos relacionados con ANCA, se desarrolló un inmunoensayo lineal al que se denominó LIA-Blot (Fig. 1).

Para la preparación de las tiras reactivas del inmunoensayo también se desarrolló un prototipo en acrílico que por vacío permitió concentrar el antígeno en forma lineal sobre membranas de nitrocelulosa. A este prototipo se le dio el nombre de Concentrador Lineal de Antígenos (CLA) (Fig. 2).

Los antígenos fueron disueltos en *buffer* Tris (TBS) (ClNa 150 mM/L, Tris-ClH 50 mM/L) en las concentraciones siguientes: MPO (5 µg/mL), HLE (2,7 µg/mL), Lf (5 µg/mL), Cat G (2,5 µg/mL) (Sigma). Como soporte de la reacción inmunoquímica se utilizó membrana de nitrocelulosa (Sigma). La membrana que contenía los antígenos, obtenida del concentrador lineal, se cortó en tiras y se bloqueó con caseína (Sigma) al 2% en TBS, agitando durante 1 h para eliminar fijaciones inespecíficas. Posteriormente se incubaron los controles y las muestras a analizar en dilución 1/40 en TBS con las tiras que contenían los antígenos, agitando durante 1 hora. Se lavaron tres veces con abundante TBS. Luego se hizo interaccionar el sistema con antisuero de cabra anti IgG (Sigma) marcado con fosfatasa alcalina durante 1 hora y con agitación constante. Para poner en evidencia la unión antígeno-anticuerpo se utilizó como sustrato 0,333 mg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) y 0,2 mg/mL de azul de tetrazolium (NBT), diluidos ambos en 0,15 M ClNa, 50 mM ClMg, 0,2 M Tris ClH (pH 9,6).

Los resultados fueron interpretados comparando la intensidad de coloración de las muestras incógnitas con la de los sueros controles utilizados.

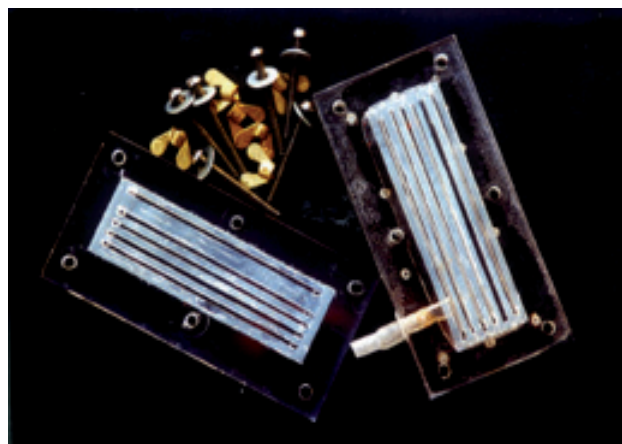


Fig. 1. Concentrador Lineal de Antígenos (CLA) por vacío, prototipo en material acrílico. La membrana de nitrocelulosa se coloca entre las placas de acrílico. Para evitar filtraciones entre líneas se utiliza una junta de material siliconado moldeado y la presión que se ejerce por un conjunto de tornillos en la periferia del sistema. El mismo posee cinco líneas donde se pueden colocar diferentes antígenos y/o controles internos de la reacción.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico en todos los casos se utilizó el *test* de *chi* cuadrado y el *test* exacto de Fisher.

Resultados

Se detectó ANA en el 100% de los pacientes con LES juvenil (51/51) y aADNn, en el 70,6% (36/51). Los anticuerpos aRo, aLa, aSm, aRNP presentaron las siguientes frecuencias respectivas 39,2% (20/51), 17,6% (9/51), 37,3% (19/51), 21,6% (11/51). El 76,5% (39/51) de los pacientes presentó concentraciones de C_3 (VR: 90-150 mg/dL) y/o C_4 (VR: 20-40 mg/dL) por debajo del límite inferior de referencia.

Dieciséis muestras de pacientes sin absorción fueron pANCA reactivos, 13 de ellas presentaban anticuerpos aADNn. Luego de la absorción de los ANA y los anticuerpos aADNn con sus absorbentes específicos, sólo una muestra persistió siendo pANCA reactiva (Fig. 3), pero a ella se sumaron 4 muestras más con la misma imagen (3 aADNn reactivas y 1 aADNn no reactiva) que no se habían puesto en evidencia previamente. De las 3 muestras aANCA reactivas (Fig. 4), todas ellas aADNn reactivas, luego de la absorción 2 mostraron imagen pANCA y una no reactiva. Por otra parte, una de las muestras que sin absorber fue considerada no reactiva, luego de la absorción mostró una imagen aANCA (Tabla I). La prevalencia de pANCA y aANCA fue de 9,8% (5/51) y 5,9% (3/51) respectivamente. En ningún suero se detectó cANCA. Se verificó la ausencia de ANA y

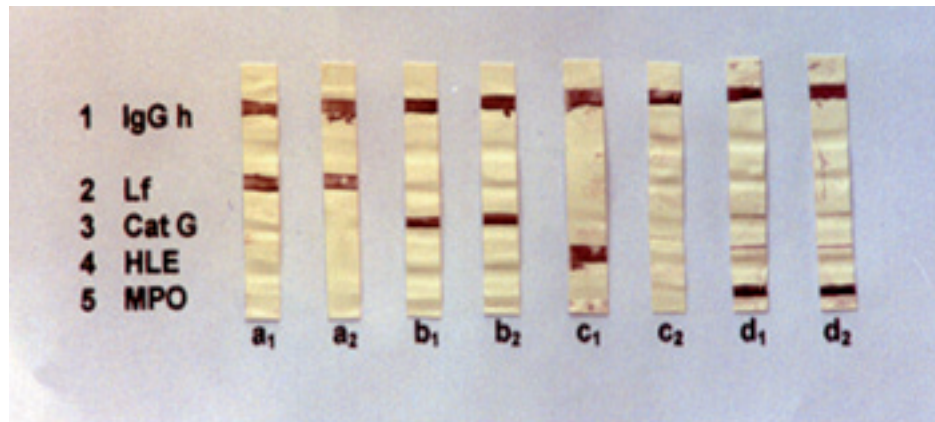


Fig. 2. LIA-Blot. (IgGh) IgG humana, control interno de la reacción, Antígenos: (Lf) lactoferrina, (Cat G) Catepsina G, (HLE) elastasa, (MPO) mieloperoxidasa. Líneas 1a₁ - 1d₂; control interno de la reacción. Líneas 2a₁, 3b₁, 4c₁, 5d₁; sueros controles reactivos para los antígenos respectivos. Líneas 2a₂, 3b₂, 5d₂; sueros incógnitas reactivos contra los antígenos respectivos. Línea 4c₂; suero no reactivo para el antígeno correspondiente.

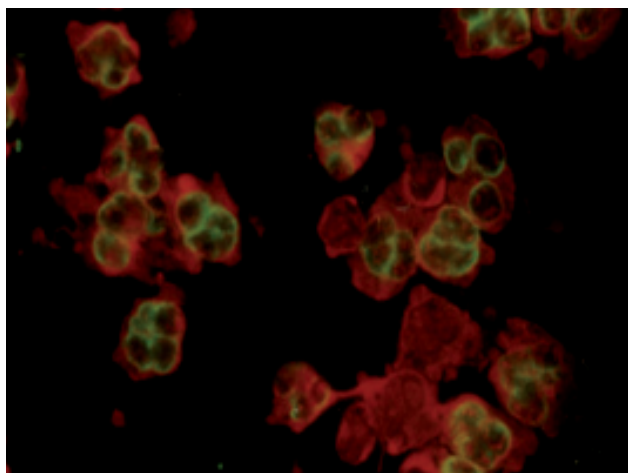


Fig. 3. Muestra correspondiente a un suero ANA reactivo, pANCA reactivo (aMPO: reactiva) (400 X), luego de la absorción con absorbente de ANA (Timo de ternera).

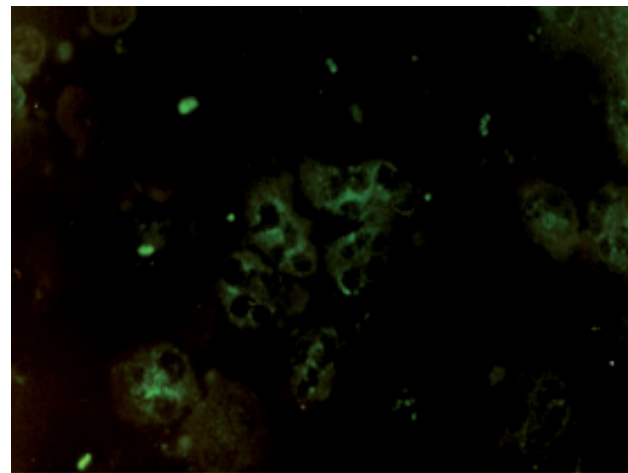


Fig. 4. Muestra correspondiente a un suero ANA reactivo, aANCA reactivo (aLf: reactiva) (400 X), luego de la absorción con absorbente de ANA (Timo de ternera).

aADNn en los sobrenadantes de los sueros absorbidos realizando IFI sobre los sustratos específicos.

La frecuencia detectada por LIA-Blot (Fig. 2) para aMPO fue 9,8% (5/51) y para aLf 13,7% (7/51).

No se encontró asociación significativa entre la presencia de ANCA o sus especificidades y los parámetros

bioquímicos de actividad para el LES (aADNn reactivo y disminución de C₃ y/o C₄).

En lo que respecta a la frecuencia de asociación de imágenes de ANCA en relación a los antígenos detectados por LIA-Blot, el 62,5% evidenció la presencia de imagen concordante con el anticuerpo específico en la IFI.

Tabla I. Imágenes de ANCA por IFI

IMAGEN	MUESTRAS SIN TRATAR Y CON TRATAMIENTO ABSORBENTE DE ANA (n: 51)	
	Sin absorción de ANA n (%)	Con absorción de ANA n (%)
cANCA	0	0
pANCA	16 (31,4)	5 (9,8)
aANCA	3 (6,0) (x)	3 (5,9)

(x) dos imágenes de aANCA se asociaron a pANCA

Tabla II. Imágenes de ANCA por IFI luego de la absorción de ANA y sus anticuerpos asociados

INMUNOFLUORESCENCIA			ELISA	LIA			
cANCA n(%)	pANCA n(%)	aANCA n(%)	aPR3 n(%)	aMPO n(%)	aLf n(%)	aCatG n(%)	aHLE n(%)
-	5(9,8)	-	-	3(5,9)	2(3,9)	-	-
-	-	3(5,9)	-	-	3(5,9)	-	-
-	-	-	-	-	-	1(2,1)	-
-	-	-	-	2(3,9)	-	-	-
-	-	-	-	-	2(3,9)	-	-
(0)	5(9,8)	3(5,9)	(0)	5(9,8)	7(13,7)	1(2,1)(x)	(0)

n:51 - (x)n:47

Las asociaciones anticuerpos-antígeno específico con imágenes fueron: aMPO + pANCA (3/5), aLf + pANCA (2/5), aLf + aANCA (3/3). No se detectaron cANCA ni tampoco anticuerpos aPR3 ni aHLE (Tabla II).

En la Tabla III se describe la frecuencia de las distintas manifestaciones clínicas en la población estudiada y de ANCA. Cuando se evaluó la relación entre las diferentes manifestaciones clínicas y la presencia de ANCA y sus especificidades, sólo se encontró asociación significativa entre glomerulonefritis pANCA o aMPO, o pANCA + aMPO ($p < 0,05$). No se detectó ANCA en ninguno de los pacientes que presentó vasculitis.

Al momento del estudio 2 pacientes estaban clínicamente inactivos, 24 pacientes (48%) presentaron actividad leve o moderada y los 24 (48%) restantes eran LES severos. Al intentar correlacionar la reactividad de los ANCA y sus especificidades con diferentes subgrupos de pacientes según actividad de la enfermedad, no se halló asociación significativa con ellos ($p > 0,05$) (Tabla IV).

Discusión y Conclusiones

Se debe considerar las dificultades en la detección de ANCA por IFI, en particular en casos como el de la población estudiada en este trabajo, debido a la alta frecuencia de ANA (100%) y también analizar la resolución de este problema.

Existen otros interferentes además de los ANA que se deben tener en cuenta al hacer el análisis de los resultados, como por ejemplo los anticuerpos contra alloantígenos de neutrófilos, que ocasionan fluorescencia citoplasmática (20), la que se descartó por no observarse en ningún caso una imagen semejante a la cANCA. Otra interferencia es la producida por anticuerpos específicos contra núcleos de neutrófilos (GS-ANA), los cuales se caracterizan por presentar fluorescencia en los núcleos de neutrófilos y no en células HEp-2 (21). Esto se descartó en la población estudiada ya que, tal como se describió, el 100% presentó ANA en células Hep-2. Se debe desta-

Tabla III. Frecuencia de manifestaciones clínicas en pacientes con LES juvenil y su asociación con ANCA.

MANIFESTACIONES CLINICAS	FRECUENCIA n(%)	pANCA + aMPO		pANCA + aLf		aANCA + aLf	
		n° R	n° NR	n° R	n° NR	n° R	n° NR
Hematológicas	21(42)	1	20	1	20	0	21
Mucocutáneas	31(60,8)	2	29	2	29	3	28
Músculo esqueléticas	29 (56,9)	2	27	1	28	1	28
Raynaud	4 (7,8)	0	4	0	4	1	3
Renales	7 (13,7)	3 (#)	4	0	7	0	7
Serositis	15 (30)	1	14	0	15	2	13
Sistema nervioso central	7(14)	1	6	0	7	0	7
Vasculitis	4 (7,8)	0	4	0	4	0	4

n:51 - (#) $p=0,02$ - n° R: reactivo - n° NR: no reactivo

Hematológicas: anemia y/o leucopenia y/o linfopenia y/o plaquetopenia

Mucocutáneas: rash malar y/o alopecia y/o compromiso cutáneo subagudo y/o discoide y/o fotosensibilidad y/o úlceras orales

Músculoesqueléticas: artritis y/o miositis

Serositis: ascitis y/o derrame pleural y/o pericárdico.

Sistema nervioso central: convulsiones y/o corea y/o síndrome orgánico cerebral y/o psicosis y/o cefalea y/o accidente cerebrovascular.

Renales: cilinduria + proteinuria (>0,5 g/L)

car que las imágenes que se interpretaron previamente a la absorción de ANA erróneamente como pANCA, en realidad fueron producidas por aADNn, con la excepción de una muestra. Esto se pudo demostrar utilizando el absorbente específico de aADNn, que provee una herramienta accesible al laboratorio para dilucidar resultados de inmunofluorescencia en este tipo de sueros donde pueden coexistir ambos autoanticuerpos. De todos modos, luego de la absorción con ADNn la fluorescencia debe ser correctamente interpretada. Esto se debe a que en la mayoría de los casos coexisten diferentes ANA y por lo tanto, luego de la absorción con ADNn puede desaparecer la imagen característica debida a su anticuerpo específico, pero puede persistir aún una imagen nuclear (Fig. 5). La presunción de que la imagen que se confunde con pANCA cuando coexiste ANA se debe a aADNn se deduce básicamente de la elevada incidencia de aADNn en LES, y en particular en esta población (70,6%). La

imagen de la IFI producida por anticuerpos aADNn es nuclear periférica; esto se debe a que en las células altamente diferenciadas (neutrófilos humanos o secciones de órganos como hígado de rata, tiroides, etc.), la cromatina está inactiva y se ubica en la periferia del núcleo. No se observa esto cuando las células provienen de cultivos donde la cromatina está en actividad, como es el caso de las células HEP-2 (22).

Cuando se intentaron comparar los resultados obtenidos con los descriptos en la bibliografía relacionados con LES juvenil, se encontró que la información es escasa. Wong *et al* (10) describieron 60,9% de pANCA frente a un 16% detectado en este trabajo luego de la absorción de los ANA, aunque antes de la absorción el porcentaje detectado fue de 37,4%. Esto indicó que el elevado porcentaje se debía mayoritariamente a ANA y posteriormente se confirmó que específicamente se debía a aADNn (Tabla I). Los anticuerpos aPR3 - IgG, aLf - IgG

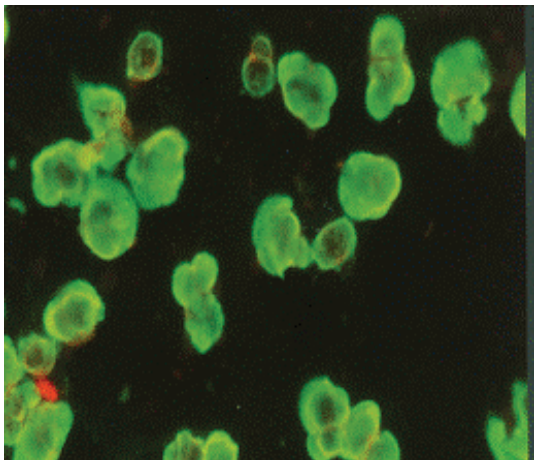


Fig. 5.a

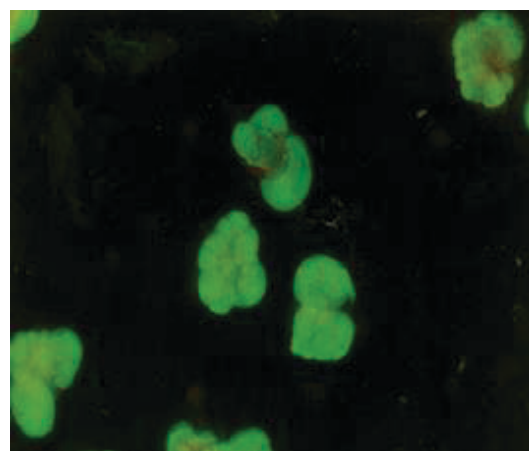


Fig. 5.b

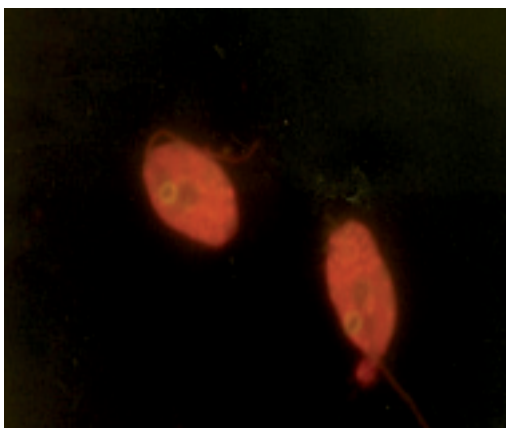


Fig. 5.c

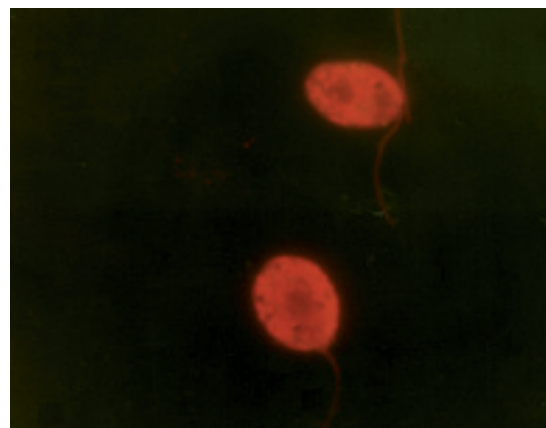


Fig. 5.d

Fig. 5. Muestra correspondiente a un suero ANA y aADNn reactivo. Fig 5.a, Imagen fluorescente nuclear y perinuclear más acentuada en la periferia de los núcleos de neutrófilos (se observa también en linfocitos). Fig. 5.b, Desaparición de la imagen perinuclear en neutrófilos, con conservación de la fluorescencia nuclear luego de la absorción con ADNn (400 X). Fig. 5.c, Imagen fluorescente en la periferia del kinetoplasto de la *Crithidia luciliae*. Fig. 5.d, Imagen fluorescente no reactiva en el kinetoplasto de la *Crithidia luciliae*, luego de la absorción con ADNn (1000 X).

Tabla IV. Frecuencia de ANCA y antígenos relacionados según los grados de actividad de la enfermedad

IMAGEN/ANTIGENO	SLE-DAI = 0 n(%)	SLE-DAI 1 -10 n(%)	SLE-DAI >10 n(%)
pANCA	1(50)	1(4)	3(12.5)
aANCA	0(0)	1(4)	2(8)
aMPO	0(0)	2(8)	3(12.5)
aLf	1(50)	2(8)	4(17)
aCat G(x)	0	0	1(4)
pANCA/ aMPO	0(0)	1(4)	2(8)
pANCA/ aLf	1(50)	0(0)	1(4)
aANCA/ aLf	0(0)	1(4)	2(8)
	2(4) (")	24(48) (")	24(48) (")

n:51 - (x)n:47 - (") n(%) total de cada grupo

fueron detectados en 17,4 y 4,0% respectivamente, también por Wong, *et al* y en ese mismo trabajo no se detectaron anticuerpos aMPO - IgG; sí, en cambio, aCat G - IgG (34,8%) y aHLE - IgG (17,4%). En el trabajo citado llama la atención la elevada incidencia de aPR3 y conjuntamente la ausencia de imagen cANCA, imagen y antígeno fuertemente asociados a GW (3) (23) (24), resultados que no se han podido confirmar en la serie estudiada. También se observó la ausencia de aMPO - IgG en la serie de Wong *et al* donde se detectó en un 9,8% de los casos. Además, a diferencia de los autores antes citados, no se han detectado anticuerpos contra más de un antígeno asociado a ANCA en un mismo suero. Wong *et al.* no encontraron diferencias significativas entre ANCA y sus especificidades con respecto a la aADNn ni con SLE - DAI, ni tampoco con el órgano que afecta. En el presente trabajo se encontró asociación significativa ($p < 0,05$) solamente para las variables glomerulonefritis, pANCA o aMPO, consideradas en forma aislada o en conjunto.

La metodología utilizada para la detección de anticuerpos (LIA-Blot) es útil debido a que en una misma membrana de nitrocelulosa se pueden colocar, como en este caso, cuatro antígenos diferentes relacionados con ANCA y es posible detectar anticuerpos de diferentes especificidades en un mismo procedimiento. Por otro lado, la puesta a punto del método es más sencilla que la de un ELISA, además puede realizarse en forma cualitativa o semicuantitativa. Parece ser más sensible que la IFI (Tabla II), al igual que lo observado por otros autores utilizando técnicas de ELISA (9), y además permite conocer la especificidad de los anticuerpos.

Analizando resultados de ANCA en pacientes adultos con LES, los mismos varían de acuerdo a lo que expresan diferentes autores; por ejemplo, Cohen Tervaert, *et al* (25) no detectaron aHLE, aMPO ni aPR3 en 38 pacientes con LES, 9 con afección de sistema nervioso central (SNC) y 29 sin afección del SNC. Otras series tampoco detectaron aPR3 ni aMPO (5) (25) (26). Sin embargo, en otras series se han detectado porcentajes

variables de ANCA y sus especificidades, aLF (10-15%) (5) (26), aHLE (6-10%) (5) (7), aMPO (8.3%) (5). Schnabel A *et al* (5) en relación a la ausencia cANCA y aPR3 postularon que esto podría diferenciar al LES de las vasculitis asociadas a ANCA y que el hallazgo de ANCA en LES no permitiría diferenciar subpoblaciones de pacientes. En cambio, Nässberger *et al* (7) detectaron aHLE en 6 de 104 pacientes con LES, 4 de ellos con afecciones neurológicas; los autores concluyeron que los aHLE podrían ser un marcador de esta afección. En la serie de pacientes con LES juvenil de este estudio no se detectó ningún suero aHLE reactivo, aun entre los pacientes con compromiso neurológico y tampoco en ninguno de los pacientes con vasculitis.

Finalmente, este trabajo estableció la prevalencia de ANCA por IFI (15,7%) y por LIA Blot (25,6%) en los pacientes estudiados; estos porcentajes son menores a los ya reportados. Se halló solamente correlación significativa con la presencia de compromiso renal severo. Se necesitarán otros estudios con mayor número de pacientes para evaluar asociaciones clínicas diferentes a la glomerulonefritis. Sin embargo, estos hallazgos permiten formular la siguiente disyuntiva: si la existencia de los ANCA en relación al LES es un epifenómeno derivado del fenómeno inflamatorio general o los mecanismos inmunopatogénicos de las vasculitis asociadas a ANCA están ligados a la inmunopatogenia vascular en el LES. Así, por ejemplo, existen diferentes líneas de investigación *in vitro* donde se implica a los ANCA o a sus antígenos asociados en la fisiopatogenia de las lesiones histológicas de la granulomatosis de Wegener y enfermedades relacionadas (1). En el LES, por ejemplo, el mecanismo clásico de lesión tisular está asociado a la acción de complejos inmunes solubles o insolubles sobre el tejido de los órganos blanco, con intervención del sistema del complemento. Esto difiere del mecanismo propuesto para los ANCA.

En el caso de los pacientes estudiados con LES, la diferencia fundamental está marcada por el hecho de

que los antígenos comprometidos en su fisiopatogenia son diferentes a los de ANCA, aunque pueden tener la misma ubicación histológica. En esta enfermedad la coexistencia de marcadores inmunológicos y clínicos clásicos, sumados a los ANCA, podría indicar la presencia simultánea de dos mecanismos distintos de lesión.

CORRESPONDENCIA

DR. ANTONIO CARDINALLI

Laboratorio de Análisis Bioquímicos. P & A Labs.

Belgrano 81. (B6000 GZA). JUNÍN. Buenos Aires. Argentina.

Tel/Fax : 02362-442845.

E-mail: pyalabs@acerca.com.ar

Referencias bibliográficas

- Hagen EC, Ballieux BEP, Van Es IA, Daha MR, Van Der Woude FJ. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA): a review of antigens involved, the assays, the clinical and possible pathogenetic consequences. *Blood* 1996; 81: 226-42.
- Gross WL, Schmitt WH, Csernok E. ANCA and associated diseases: immunodiagnostic and pathogenetic aspects. *Clin Exp Immunol* 1993; 91: 1-12.
- Nölle B, Specks U, Lüdemann MS, Rohrbach, De Remee RA, Gross WL. Anticytoplasmic autoantibodies: Their immunodiagnostic value in Wegener granulomatosis. *Ann Intern Med* 1989; 111: 28-40.
- Falk RJ, Jennette JC. Anti - neutrophil cytoplasmic autoantibodies with especificity for mieloperoxidase in patients with sistemic vasculitis and idiopatic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 1988; 318: 1651.
- Schnabel A, Csernok E, Isenberg DA, Mrowka C, Gross WL. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1985; 38: 633-7.
- Pulido JS, Goeken JA, Nerad JA, Sobol WM, Folberg M. Ocular manifestations of patients with circulating and antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Arch Ophthalmol* 1990; 108: 845-50.
- Nässberger I, Sjöholm AG, Jonsson H, Sturfelt G, Akeson A, Heubner A. Circulating anti-elastase in systemic lupus erythematosus (letter). *Lancet* 1989; 333: 509.
- Lee S, Lawton JWM, Chan CE. Anti-lactoferrin antibody in systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol* 1992; 31: 669-73.
- Cambridge G, Wallace H, Bernstein RM, Leaker B. Autoantibodies to myeloperoxidase in idiopathic and drug-induced systemic lupus erythematosus and vasculitis. *Br J Rheumatol* 1994; 33: 109-14.
- Wong SN, Shah S, Dillon MJ. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in childhood systemic lupus erythematosus. *Eur J Pediatr* 1995; 154: 43-5.
- Ulmer M, Rautmann J, Gross, WL. Immunodiagnostic aspects of autoantibodies against myeloperoxidase. *Clin Nephrol* 1992; 37: 161-8.
- Cardinali A, Etchevez P, Pizzimenti MC, Griemberg G. Preparación de improntas para la detección de anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos: evaluación de un método alternativo. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 1994; 4: 561-6.
- Cardinali A, Micucci G, Pizzimenti MC, Griemberg G. Absorción de los anticuerpos antinucleares interferentes en la detección de anticuerpos anti citoplasma de neutrófilos por inmunofluorescencia indirecta. *Inmunología* 1997; (16): 1-7.
- Chevallier A, Renier G, Gardembas-Pain M, Nusbaum P. Determination of anti-neutrophil cytoplasm antibodies on chronic myelocytic leukemia cells. *J Immunol Meth* 1992; 147: 101-9.
- Tan EM, Cohen AS, Fries JF. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 1271-5.
- Liang MH, Socher SA, Larson MG, Schur PH. Reliability and validity of six systems for the clinical assessment of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1989; 32: 1107-18.
- Wiik A. Delineation of standard procedure for indirect immunofluorescence detection of ANCA. *Apmis (suppl)*. 1989; 6: 12-3.
- Christiaan Hagen E, Andrassy K, Chernok E, Daha MR, Gaskin G, Gross W, *et al*. The value of indirect immunofluorescence and solid phase techniques for ANCA detection. *J Immunol Meth* 1993; 159: 1-16.
- Christiaan Hagen E, Andrassy K, Chernok E, Daha MR, Gaskin G, Gross W, *et al*. Development and standardization of solid phase assays for the detection of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *J Immunol Meth* 1996; 196: 1-15.
- Stroncek DF, Egging MS, Eiber GA, Clay ME. Neutrophil alloantibodies react with cytoplasmic antigens: possible cause of false - positive indirect immunofluorescence assays for antibodies to neutrophil cytoplasmic antigens. *Am J Kidney Dis* 1993; 21: 368-73.
- Wiik A. Granulocyte-specific antinuclear antibodies. *Allergy* 1980; 35: 263-89.
- Von Muhlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Seminars Arthritis Rheumatism* 1995; 24: 323-58.
- Wiik A. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies and their disease associations. *Rheumatol Rev* 1994; 3: 91-6.
- Schultz DR, Tozman EC. Antineutrophil cytoplasmic antibodies: major autoantigens, pathophysiology, and disease associations. *Seminars Arthritis Rheumatism* 1995; 25: 143-59.
- Cohen Tervaert JW, Goldschmeding R, Elema JD, Limburg PC, Van Der Giessem M, Huitema M, *et al*. Association of autoantibodies to myeloperoxidase with different forms of vasculitis. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 1264-72.
- Cohen Tervaert JW, Mulder I, Stegeman C, Elema JD, Huitema TH, Kallemborg CGM. Occurrence of autoantibodies to human leucocyte elastase in Wegener's granulomatosis and other inflammatory disorders. *Ann Rheum Dis* 1993; 52: 115-20.

Aceptado para su publicación el 18 de diciembre de 2012