

SERVICIO NACIONAL DE REUMATOLOGIA. HOSPITAL CLINICO QUIRURGICO "10 de OCTUBRE", La Habana, CUBA.

"Anticuerpos Anticitoplasma de Neutrófilos en pacientes con Artritis Reumatoide".

*Hernández Caéllar M.V. *, Torres Lima A.M. **, Hernández Caéllar I.M. ***, Fernández Ordóñez A. *****

- * Especialista de 1^{er}. grado en Inmunología
- ** Especialista de 2^{do}. grado en Inmunología
- *** Especialista de 1^{er}. grado en Reumatología
- **** Licenciada en Biología, Investigador Auxiliar

RESUMEN

La Artritis Reumatoidea (A.R.) es una enfermedad inflamatoria crónica que cursa con manifestaciones articulares y extra-articulares, presentando manifestaciones vasculíticas. Los anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos (AACN) constituyen en la actualidad marcadores serológicos de gran valor en las vasculitis. En la A.R. se han reportado en un 40% y con predominio del patrón p AACN. En nuestro estudio nos propusimos determinar la presencia de AACN en pacientes con A.R. y comparar los hallazgos clínicos y de laboratorio en pacientes AACN positivos y AACN negativos. Determinamos por inmunofluorescencia indirecta la presencia de AACN en el suero de 160 pacientes con una positividad de 18.75% correspondiendo todos los casos al patrón p AACN y encontrándose que los mismos presentaban más actividad de su enfermedad. Sugerimos la necesidad de ampliar la muestra estudiada y definir la probable importancia de estos anticuerpos en el pronóstico de la A.R..

INTRODUCCION

Los AACN son autoanticuerpos que reconocen componentes de los gránulos primarios de neutrófilos y lisosomas de los monocitos y tienen diferentes especificidades antigénicas, por enzimas lisosomales mieloides: proteinasas (PR3) y mieloperoxidasa (MPO), fundamentalmente involucradas en la destrucción mediada por neutrófilos (1, 2).

Comúnmente son detectados por inmunofluorescencia indirecta (IFI) (3), métodos inmunoenzimáticos (ELISA) usando diferentes fuen-

tes antigénicas (4) y por radioinmunoensayo (RIA) (5). Se clasifican de acuerdo al patrón de IFI y se observan tres patrones fundamentales: citoplasmático (c AACN), perinuclear (p AACN) y atípico (x AACN) (2).

En el patrón de c AACN el autoanticuerpo reconoce a la PR 3, que es una glicoproteína de 29 Kd localizada en los gránulos azurófilos de los neutrófilos y se asocia a la granulomatosis de Wegener. Por su

parte, en el patrón p AACN el autoanticuerpo está dirigido contra la MPO y se han descrito otras especificidades como para la elastasa leucocítica humana, lactoferrina de los monocitos y catepsinas G. Está presente fundamentalmente en afecciones limitadas al riñón como: glomerulonefritis rápidamente progresiva, enfermedades reumáticas fundamentalmente A.R., enfermedad de Kawasaki, mielodisplasia, Sida entre otras (6,7). Sin embargo, en el patrón x AACN se incluyen patrones atípicos para los que no han sido definidos especificidades antigénicas hasta estos momentos (2).

En la A.R. la incidencia de AACN ha sido reportada entre un 0 y un 40% (8, 9) y aunque se refiere un predominio del patrón p AACN, también se reportan algunos casos c AACN y x AACN. Existen además reportes diversos en relación con la relevancia clínica de los AACN y a pesar de que se ha observado una asociación entre estos autoanticuerpos y la actividad de la enfermedad, los resultados no han sido confirmatorios (10, 11).

Por lo tanto los AACN constituyen un marcador serológico común en entidades clínicas diferentes pero muy relacionadas desde el punto de vista inmunopatogénico, de ahí que existan diversas teorías que tratan de explicar el posible papel patogénico de los AACN (2, 6).

La teoría más estudiada es la que propone que los AACN circulantes con capaces de interactuar con sus antígenos (PR3 y MPO fundamentalmente), presentes en el citoplasma de neutrófilos y monocitos que son células efectoras mayores del daño inflamatorio en las vasculitis asociadas a AACN. Esto constituye una evidencia como lo reportan algunos autores de que los AACN pueden tener un efecto patofisiológico en neutrófilos y monocitos y puedan jugar un rol directo en la patogénesis. La teoría está sustentada por observaciones de que estos pacientes tienen elevada incidencia de síntomas y signos prodrómicos semanas o meses antes del desarrollo de la enfermedad como son infecciones virales o bacterianas (12, 13).

Lo explicado anteriormente conlleva a la expresión de pequeñas cantidades de constituyentes de los gránulos (PR3 y MPO) en la superficie celular, quedando accesibles a la interacción con los AACN, lo que se ha demostrado *in vitro* por citometría de flujo y microscopía electrónica. Posteriormente a esta

interacción los neutrófilos y monocitos sufren una rápida activación, cuya demostración *in vivo* es la intensa respuesta inflamatoria observada en pacientes con vasculitis asociada a AACN (12).

En resumen, el espectro de enfermedades que se asocian en la actualidad a distintas subespecificidades de AACN ha aumentado con los estudios recientes, pero aún debe establecerse el valor predictivo y/o diagnóstico de los AACN en las diferentes entidades por lo que nos propusimos evaluar la presencia de estos autoanticuerpos en la A.R. y relacionarlos con algunos elementos clínicos y de laboratorio que caracterizan el desarrollo de la enfermedad.

MATERIAL Y METODO

Se analizaron muestras de 160 pacientes con A.R. atendidos en el Servicio Nacional de Reumatología en el período comprendido entre 1996 - 1998. Todos los pacientes cumplían con los criterios para A.R. del Colegio Americano de Reumatología. En todos los casos se tomaron muestras de sangre venosa y luego de la retracción espontánea del coágulo, las muestras de sangre colectadas se centrifugaron a 800 gravedades durante 10 minutos y el suero así colectado se dispensó en viales eppendorf de 1 mL., los cuales se conservaron a -20°C.

Las muestras de suero se utilizaron para determinar AACN por inmunofluorescencia indirecta, usando el método convencional recomendado por el grupo de estudio europeo para AACN, donde se utilizaron como sustrato preparaciones de granulocitos fijados en etanol que se incubaron con diluciones del suero del paciente y la presencia de los autoanticuerpos se detectó con un conjugado de anti-inmunoglobulinas humanas. Los patrones de fluorescencia se clasificaron como:

c AACN (citoplasmático), p AACN (perinuclear) o x AACN (atípico). Para la diferenciación del p AACN de los anticuerpos antinucleares (ANA), las muestras con patrón p AACN fueron evaluadas en láminas con neutrófilos fijados en formalina y con células HEP-2 respectivamente. Los pacientes con AACN positivos fueron comparados

con un grupo de pacientes con A.R., AACN negativos considerando que fueron comparables en cuanto a edad y duración de la enfermedad. En todos los casos se tomaron muestras de sangre para determinar: eritrosedimentación globular, hemoglobina y factor reumatoideo (mediante la técnica de aglutinación de partículas de látex).

Estos pacientes fueron evaluados radiológicamente incluyendo radiografías de manos, pies, columna cervical y articulaciones con compromiso artrítico. El daño articular radiológico se determinó considerando cuatro estadios de compromiso articular según los cambios radiológicos establecidos para evaluar la evolución de la artritis (Anexo 1).

En ambos grupos de pacientes AACN positivo y AACN negativo se evaluó el grado de actividad de la enfermedad (DAS = Disease Activity Score), teniendo en cuenta el índice de Ritchie, el número de articulaciones tumefactas, la velocidad de sedimentación globular y el estado de salud del paciente según una escala visual análoga.

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó la prueba U de Mann-Whitney.

ANEXO 1

GRADOS DE COMPROMISO ARTICULAR RADIOLOGICO DE LA ARTRITIS REUMATOIDEA.

ESTADIO 1.-

Cambios a nivel de tejidos blandos, es decir, inflamación intra y extra-articular. Ligera descalcificación local o general.

ESTADIO 2.-

Espacio articular definitivamente alterado. Pérdida de cartílago o de masa ósea. Descalcificación moderada. Cambios definitivos en los tejidos blandos. Inflamación capsular y atrofia adyacente. Formación de osteofitos e hipercalcificaciones locales.

ESTADIO 3.-

Destrucción de articulaciones, subluxaciones, deformidades. Marcada descalcificación y cambios en tejidos blandos. Cambios hipertróficos importantes y osteofitos.

ESTADIO 4.-

Cambios articulares ampliamente extendidos

con destrucción y anquilosis ósea. Extremados cambios hipertróficos.

Tomado de: Taylor D, CMAJ 36: 608-10, 1937.

RESULTADOS Y DISCUSION

Encontramos en los 160 pacientes con A.R. una positividad de 18.75% para AACN. Estos resultados no difieren de lo reportado por otros autores, ya que la incidencia de AACN en la A.R. varía notablemente desde 0-40% (10, 11); este hecho podría relacionarse en parte con las dificultades técnicas para detectar p AACN, ya que frecuentemente pueden confundirse los ANA con el patrón p AACN, pues para evitarlo es necesario montar paralelamente granulocitos fijados con formalina y descartar la presencia de ANA en células HEp-2.

No se observaron patrones de c AACN ni de x AACN en ningún paciente, por lo que todos los casos correspondieron al patrón p AACN y los títulos oscilaron desde 1:10 hasta 1:640. Esto coincide con lo reportado por algunos autores (14, 15). Otros autores han reportado patrones x AACN (8) e incluso cAACN (8). La naturaleza controversial de estos hallazgos podría atribuirse a la selección de los pacientes para diferentes estudios así como a las dificultades en la interpretación de los patrones de AACN por IFI. A pesar de que los AACN se detectan habitualmente como describe Wiik (3), la variabilidad parece ser importante. La confiabilidad de la detección de los AACN depende del sustrato empleado, el origen celular y la experiencia del observador.

Desafortunadamente, no disponemos de medios diagnósticos para poder identificar las diferentes subespecificidades antigénicas de los AACN detectados (lisozimas, mieloperoxidas, elastasa, catepsina G, lactoferrina, proteinasa R3); no obstante, debe señalarse que existen discrepancias entre los resultados de diferentes autores y no han podido establecerse aún asociaciones entre estos autoanticuerpos y los hallazgos clínicos radiográficos y serológicos (16, 17, 18).

La muestra de pacientes AACN positivos y negativos tenían las características similares (Tabla 1).

Tabla N° 1. Datos de pacientes AACN positivos y negativos

	p AACN (+)	p AACN (-)
NUMERO	30	30
EDAD	54+ - 10	58 + - 10
MASC / FEM.	9 / 21	8 / 22
DURACION DE LA A.R. (años)	6 + - 10	6 + - 9

Desde el punto de vista serológico, los pacientes AACN positivos con A.R. presentaron mayor actividad de la enfermedad comparados con los AACN negativos al evaluar los valores de velocidad de eritrosedimentación globular significativamente superiores y las cifras de hemoglobina, significativamente inferiores (Tabla 2). Además encontramos un porcentaje significativamente superior de pacientes con factor reumatoideo positivo en el grupo AACN positivo, aunque no se encontró correlación entre los títulos de AACN y factor reumatoideo en los pacientes estudiados (Tabla 2).

Los datos anteriores se correlacionan con algunos autores (8, 10) que han encontrado un mayor número de pacientes seropositivos en el grupo p AACN positivo (80% versus 60%) aunque no encontramos relación entre los títulos de AACN y de factor reumatoideo en el grupo p AACN positivo. Hipotéticamente podría postularse que los AACN y los factores reumatoideos se generan por mecanismos inmunológicos diferentes y en distintas etapas de la enfermedad, aunque se necesitan realizar estudios de seguimiento de pacientes con A.R. en cuanto a la cinética del factor reumatoideo y los AACN para establecer la relación entre ellos.

Al evaluar el estado radiológico de los pacientes estudiados se observó que más del 50% de los pacientes AACN positivos estaban en los estadios 2 y 3, mientras que más del 50% de los casos AACN negativos se encontraban en estadio 1 (Tabla 3).

En cuanto al grado de actividad de la enfermedad encontramos que en los pacientes p AACN positivos, el 60% tenían un DAS mayor de 6 y un 40%

Tabla N° 2. Variables serológicas en pacientes con A.R. p AACN positivos

	p AACN (+) AR	p AACN (-) AR
VSG (medio)	55 *	32
FR (%)	80+ *	60+
Hemoglobina	9,6 *	10,8

* p menor 0,005 Significativo

Tabla N° 3. Estadios radiológicos de los pacientes en relación con los AACN

ESTADIOS RADIOLOGICOS	Pac. AACN (+)	Pac. AACN (-)
I	10 (33%)	17 (57%)
II	12 (40%)	10 (33%)
III	8 (27%)	3 (10%)
IV	0	0

presentaron un DAS menor de 6. Por otra parte, en los casos p AACN negativos, el 80% tenían un DAS menor de 6 y el 20% un DAS mayor de 6. Reportamos estos datos como otro parámetro de interés en estos pacientes para asociarlo a la presencia o no de AACN, pero sabemos que resulta hipotético atribuirle el grado de actividad de la enfermedad y el daño radiológico a este marcador serológico, pues a pesar de que ambos grupos (Tabla 1) tenían características similares en cuanto a edad, sexo y duración de la enfermedad, los tratamientos utilizados en estos pacientes eran distintos, incluso el momento de la enfermedad en que se impusieron las distintas variantes terapéuticas y en muchas ocasiones hubo intermitencia de los tratamientos e indiscutiblemente esto puede influir en el grado de actividad. Aunque siempre resulta de interés reportar la presencia de marcadores serológicos de la naturaleza de autoanticuerpos en esta patologías autoinmunes, pues debemos tener presente todos los marcadores que podrían indicar quizás

prematuramente la presencia de formas clínicas más agresivas de la A.R., que incluso nos servirían para una intervención terapéutica más oportuna (15, 19).

Respecto a las manifestaciones extra-articulares fueron más frecuentes en el grupo de pacientes p AACN positivos que en el p AACN negativo, aunque no resultó estadísticamente significativo (Tabla4). De los pacientes AACN positivos nueve casos tenían manifestaciones extra-articulares, un paciente con neuropatía y epiescleritis, dos pacientes con fibrosis pulmonar, tres pacientes con nódulos subcutáneos y otros tres con nódulos y neuropatías. Estos hallazgos coinciden con otros autores (11, 16) que también encontraron mayores manifestaciones de vasculitis y complicaciones pulmonares en los AACN positivos.

En resumen, nuestro estudio podría sugerir la posibilidad de que clínicamente los pacientes con A.R. p AACN positivos forman un grupo con una enfermedad de curso más agresivo a juzgar por los hallazgos serológicos y radiológicos, así como el compromiso extra-articular encontrado en comparación con pacientes AACN negativos.

Tabla N° 4. Manifestaciones extra-articulares en pacientes con A.R. p AACN (+) y p AACN (-)

MANIFESTACIONES EXTRARTICULARES	Pac. AACN (+)	Pac. AACN (-)
EPIESCLERITIS	1	1
NEUROPATIAS	4	0
FIBROSIS PULMONAR	2	0
NODULOS SUBCUTANEOS	6	0
SINDROME SICCA	0	3

CONCLUSIONES

Encontramos un 18.75% de los pacientes con AACN positivos en la muestra de casos estudiados de A.R., observándose en todos los casos el patrón p AACN.

Los pacientes AACN positivos presentaron

mayor actividad de la enfermedad comparados con los casos AACN negativos demostrado en las variables serológicas evaluadas e incluso en los parámetros clínico radiológicos.

RECOMENDACIONES

Sugerimos ampliar la muestra de estudio para definir la probable importancia de los AACN en el pronóstico de la A.R.

BIBLIOGRAFIA

1. Sinico, R.A.: "Specificity of ANCA in vasculitis syndromes". *Nephrol. Dial. Transplant.* 5: 684, 1990.
2. Hagen, E.C. et al: "Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibodies: A Review of the Antigens Involved, the Assays, and the Clinical and Possible Pathogenic Consequences". *Blood* 81: 1996-2002, 1993.
3. Wiik, A.: "Delineation of a standard procedure for indirect immunofluorescence detection of ANCA". *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. (Suppl.)* 97: 12-13, 1989.
4. Rasmussen, N. et al: "ELISA for detection of antineutrophil cytoplasm antibodies (ANCA)". *J. Immunol. Methods* 127: 139-145, 1990.
5. Savage, C.O. et al: "Prospective study of radioimmunoassay for antibodies against neutrophil cytoplasm in diagnosis of systemic vasculitis". *Lancet* 1: 1389-1393, 1987.
6. Gross, W.L. et al: "Classic Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies (c-ANCA), "Wegener's autoantigen" and their Immunopathogenic role in Wegener's Granulomatosis." *I. Autoimmu.* 6: 171-184, 1993.
7. Allen, N.B.: "ANCA- The Rheumatologists perspective". *Bull. Rheum. Dis.* 41: 6-7, 1992.
8. Metzger, D. et al: "Anti-Neutrophil-Zytoplasma-Antikörper (ANCA) bei rheumatoider Arthritis: Spezifität und Klinische Relevanz". *Immun. Infekt* 21: 18-20, 1993.
9. Mulder A.H.L., et al: "Antineutrophil cytoplasmic antibodies in rheumatoid arthritis". *Arthritis Rheum.* 36: 1054-60, 1993.

10. Juby A. et al: "Antinuclear and Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA) in sera of patients with Fety's syndrome" *B.J. Rheumatology* 31: 185-188, 1992.
11. Savige J.A. et al: "Antineutrophyl cytoplasm antibodies in rheumatoid arthritis" *Clin. Exp. Immunol.* 86: 92-98, 1991.
12. Jennette, J.C. et al: Editorial Pathogenic Potential of Anti-neutrophil Cytoplasmic Autoantibodies". *Laboratory Investigation* 70: 135-137, 1995.
13. Mayet, W.J.: "Membranes expression of proteinase 3 in human endothelial cells under the influence of different cytokines". *Exp. Immunol.* 93: 17, 1993.
14. Gross W.L. et al: "ANCA and associated diseases: Immunodiagnostic and pathogenetic aspects". *Clin. Exp. Immunol.* 91: 1-12, 1993.
15. Mustila, A. et al: "p-ANCA in RA a marker in severe disease with associated nephropathy". *Arth. and Rheum.* 40 (4): 710-717, 1997.
16. Edger J.D.M., et al. : "Antineutrophyl cytoplasmic antibodies in rheumatoid arthritis". *B. J. Rheum.* 31: 859, 1992.
17. Esnault V.L.M. et al: "Antibodies to lactoferrin and histone in systemic vasculitis identified by anti-myeloperoxidase solid phase assays". *Kidney Int.* 46: 153-160, 1994.
18. Hagen, E.C.: "Standardisation of ELISA for the detection of anti-proteinase (PR-3) and antimyeloperoxidase (MPO) antibodies. *Clin. Exp. Immunol.* 93: 32, 1993.
19. Baslum, B. et al: "Antilactoferrin antibodies in rheumatoid disease". Lubeck. Germany. June 28, 1992.