
Anticuerpos anticitoplasmáticos de neutrófilos (ANCA): Un estudio sobre su presencia en patologías no asociadas con arteritis.

Ernesto Novo¹, Ernesto García-Mac Gregor², Jesús Weir-Medina³, Gustavo Parra⁴, Argelia Ocando² y Ninoska Viera².

¹Área de Biología Oral, Instituto de Investigaciones, Facultad de Odontología, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela, ²Unidad de Reumatología, Hospital Central, Maracaibo, Venezuela, ³Instituto Hematológico de Occidente, Maracaibo, Venezuela y ⁴Unidad de Diálisis, Hospital Universitario, Maracaibo, Venezuela.

Palabras claves: ANCA, autoinmunidad, neutrófilo, autoanticuerpos.

Resumen. En la presente investigación, se ha estudiado la presencia de anticuerpos anticitoplasmáticos de neutrófilos (ANCA) en 101 pacientes con diferentes patologías: Artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, neutropenia idiopática, síndrome de Down, glomerulonefritis aguda postestreptocócica, síndrome nefrótico con cambios mínimos, periodontitis del adulto, calcinosis tumoral, lipodistrofia y monoartritis. Inmunofluorescencia indirecta e inmunoensayo enzimático indirecto (ELISA) fueron las técnicas utilizadas para la detección de estos autoanticuerpos. Nuestros resultados muestran el patrón de distribución de ANCA en estas enfermedades y por primera vez se describe la presencia de estos autoanticuerpos en enfermedades como síndrome de Down, glomerulonefritis aguda postestreptocócica y periodontitis del adulto. El alto grado de positividad para ésta última enfermedad, plantea la posibilidad de que un número de casos positivos para ANCA reportados para ciertas enfermedades sistémicas, correspondan verdaderamente a otra enfermedad concurrente no detectada.

Antineutrophil cytoplasmatic antibodies (ANCA): Study on its presence in pathologies not associated with artheritis.

Invest Clin 37(2): 83-94, 1996.

Key words: ANCA, autoimmunity, neutrophil, autoantibodies.

Abstract. Our study describes the presence of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in a group of different pathologies comprising 101

patients. Rheumatoid arthritis, systemic lupus erithematosus, idiopathic neutropenia, acute post-streptococcal glomerulonephritis, minimal change nephrotic syndrome, Downs syndrome, adult periodontitis, tumoral calcinosis, monoarthritis and lipodystrophy were investigated for ANCA, through indirect immunofluorescence and an indirect solid-phase immunoassay (ELISA). Our results show the pattern of distribution of ANCA in the diseases investigated, and allowed us to make the first description of ANCA in diseases such as Downs syndrome, acute post-streptococcal glomerulonephritis and adult periodontitis. The high percentage of reactivity for ANCA detected in adult periodontitis, raise important questions about the possibility of reporting inaccurate percentages of positivity for some diseases, due to the presence of a concurrent disease such as adult periodontitis.

Recibido: 26-6-95. Aceptado: 23-10-95.

INTRODUCCION

Los anticuerpos anticitoplasmáticos del neutrófilo (ANCA) son un tipo de autoanticuerpos dirigidos contra las enzimas presentes en los gránulos de las células mieloides. Fueron observados inicialmente por Davies en 1982 (3), en pacientes con glomerulonefritis necrotizante. Posteriormente, este tipo de anticuerpos ha sido descrito en otras enfermedades como la granulomatosis de Wegener (23), la poliarteritis microscópica (19), y la forma idiopática de glomerulonefritis crescéntica (7). Hasta el presente, se han realizado una gran cantidad de estudios que sugieren que la presencia de ANCA está vinculada a la fisiopatología de enfermedades relacionadas con vasculitis (13); sin embargo, hasta el momento no existe suficiente evidencia que confirme esta hipótesis. Uno de los aspectos mas controversiales, lo constituye los trabajos en donde se describe la presencia de

ANCA en una amplia gama de enfermedades inflamatorias e infecciosas tales como: artritis reumatoide (15), lupus eritematoso sistémico (16), amibiasis (17), colitis ulcerativa (4), infección por VIH (11) entre otras, lo cual obliga a una nueva interpretación de los datos en cuanto al valor etiológico ó diagnóstico de estos autoanticuerpos.

Para la detección de este tipo de autoanticuerpos, se utilizan técnicas de inmunofluorescencia (IIF) y pruebas inmunoenzimáticas (ELISA). En el primer caso, cuando se emplea etanol como fijador, se pueden obtener dos tipos de patrones de fluorescencia: un patrón citoplasmático típico de la granulomatosis de Wegener (c-ANCA) y un patrón perinuclear (p-ANCA) como el observado en la poliarteritis microscópica y en la glomerulonefritis necrotizante crescéntica. Se ha descrito un tercer patrón (x-ANCA), que corresponde a una mezcla de los dos anteriores, como el observado en algu-

nas enfermedades como es el caso de la colitis ulcerativa (4).

El valor diagnóstico de los ANCA ha sido bien establecido para las enzimas granulares proteinasa-3 (23) y mieloperoxidasa (5). La presencia en el suero de ANCA con especificidad para proteinasa-3 es un indicador confiable de granulomatosis de Wegener en un 90% de los casos (2); al mismo tiempo, un aumento en los niveles de estos autoanticuerpos, sugiere un cambio hacia un estado "activo" de la enfermedad (23). Por otra parte, la presencia de anticuerpos contra mieloperoxidasa, se ha asociado con diferentes formas de vasculitis necrotizante, como es el caso de la glomerulonefritis necrotizante idiopática (7) y la crescénica (2).

La función que tienen los ANCA en la patogénesis de estas enfermedades se ha investigado tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*, donde se ha podido establecer la capacidad de estos anticuerpos de participar en los procesos inflamatorios y también la de activar mecanismos biológicos que producen daño tisular (8).

En el presente trabajo, se ha investigado la presencia de ANCA en el suero de una amplia gama de diferentes patologías tanto de tipo inmune como no inmune; en algunas de ellas no han sido descritos estos anticuerpos previamente. Nuestro propósito ha sido, conocer su distribución y con ello tratar de realizar un análisis acerca del posible papel que pudieran estar jugando en las enfermedades donde están

presentes. Los resultados obtenidos en el caso de la periodontitis del adulto, que es una enfermedad no detectable en los exámenes médicos de rutina y que a la vez es común y de alta prevalencia, sugiere que la positividad de ANCA reportada para otras enfermedades, debe ser revisada en el sentido de descartar la posibilidad de que su aparición se deba a una enfermedad concurrente no detectada como es el caso de la periodontitis del adulto.

MATERIALES Y METODOS

Reactivos: Todos los materiales y reactivos químicos ó inmunológicos utilizados en esta investigación, fueron obtenidos de Sigma Chemical Co., (St. Louis, MO, USA), a menos que se especifique otro proveedor.

Muestras: Las muestras de suero de los pacientes y controles fueron obtenidas de sangre periférica a través de punción de la vena basilica media. Se tomaron 6 ml de sangre a través de un sistema Vacutainer® sin anticoagulante. La muestra se mantuvo a temperatura ambiente por una hora, se centrifugó a 300 g x 10 min a 4°C y la fracción sérica se aspiró con pipeta Pasteur, se dividió en 4 alícuotas que se mantuvieron a -20°C hasta ser usadas.

Pacientes y Controles

Lupus Eritematoso Sistémico (LES): Se tomaron ocho pacientes de la Unidad de Reumatología del Hospital Central Maracaibo, Venezuela. Todos ellos cumplían con los crite-

rios para el diagnóstico de LES establecido por el Colegio Americano de Reumatología(14). Después de su evaluación clínica, al igual que a todos los demás pacientes y controles sanos, se les tomó una muestra de sangre para la detección de ANCA. De los ocho pacientes, uno era de sexo masculino de 27 años y siete eran de sexo femenino (edad promedio \pm desviación estandar = $35,5 \pm 17,32$ años; rango de edad (r) = 13 a 72 años).

Artritis Reumatoide (AR): Se estudiaron catorce pacientes de la Unidad de Reumatología del Hospital Central, Maracaibo, Venezuela. Todos ellos cumplían con los criterios para el diagnóstico de AR establecido por el Colegio Americano de Reumatología (14). Tres pacientes eran de sexo masculino de 32, 50 y 52 años respectivamente. Once pacientes eran de sexo femenino ($48,0 \pm 15,13$ años; r = 26 a 73 años).

Periodontitis del Adulto (PA): Este grupo estuvo constituido por doce pacientes que asisten a la clínica de postgrado de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela, diagnosticados como periodontitis del adulto a través de examen clínico y radiográfico, sistémicamente saludables y sin historia de enfermedad de tipo inmunológico. Ocho pacientes eran de sexo masculino ($41,5 \pm 4,24$ años; r = 36 a 47 años) y cuatro de sexo femenino ($37,25 \pm 8,22$ años; r = 28 a 46 años).

Glomerulonefritis Aguda Postestreptococcica (GAPE): En este

grupo se incluyeron doce pacientes con diagnóstico de GAPE, provenientes de la Unidad de Diálisis del Hospital Universitario de Maracaibo, Venezuela. Seis eran de sexo masculino ($10,0 \pm 3,68$ años; r = 7 a 13 años) y seis pacientes de sexo femenino ($9,0 \pm 7,21$ años; r = 2 a 25 años).

Síndrome Nefrótico con Cambios Mínimos (SNCM): Se tomaron doce pacientes diagnosticados como SNCM, provenientes de la Unidad de Diálisis del Hospital Universitario, Maracaibo, Venezuela. Cinco eran de sexo masculino ($6,0 \pm 4,35$ años; r = 2 a 13 años). Siete pacientes eran de sexo femenino ($9,85 \pm 7,24$ años; r = 2 a 25 años).

Neutropenia Idiopática (NI): En este grupo se estudiaron quince pacientes provenientes del Instituto Hematológico de Occidente (Banco de Sangre), Maracaibo Venezuela, presentando neutropenia continua sin origen detectable y sin presentar ninguna otra enfermedad. Tres eran de sexo masculino, de 28, 36 y 45 años respectivamente. Once pacientes eran de sexo femenino ($27,25 \pm 14,70$ años; r = 6 a 48 años).

Síndrome de Down (SD): Este grupo estuvo constituido por 25 individuos provenientes de una escuela para jóvenes excepcionales (Instituto Zulia, Maracaibo, Venezuela), diagnosticados como poseedores de trisomía 21, determinada por estudios citogenéticos. Quince individuos eran de sexo masculino ($12,70 \pm 3,49$ años; r = 8 a 20 años) y diez de sexo femenino ($11,60 \pm 2,59$

años; $r = 9$ a 17 años). Para el momento de la toma de la muestra todos los miembros de este grupo se encontraban en condiciones saludables y ninguno de ellos había recibido medicación alguna reciente.

Otras enfermedades: También se incluyeron en este estudio tres pacientes de sexo femenino, una de 35 años de edad con diagnóstico de Monoartritis; una de 60 años de edad, con diagnóstico de Calcinosis Tumoral y otra de 40 años de edad con diagnóstico de Lipodistrofia, provenientes de la Unidad de Reumatología del Hospital Central, Maracaibo, Venezuela.

Controles Sanos: Se utilizaron veinte individuos voluntarios provenientes del personal y estudiantado de la Facultad de Odontología de la Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela. Todos ellos fueron seleccionados por no presentar enfermedades sistémicas periodontales, además de no referir antecedentes de enfermedades inmunológicas. Diez controles eran de sexo masculino ($36,8 \pm 10,64$ años; $r = 25$ a 52 años) y diez de sexo femenino ($37,8 \pm 11,05$ años; $r = 21$ a 55 años).

Inmunofluorescencia Indirecta: Los ensayos de inmunofluorescencia indirecta se realizaron de acuerdo al método descrito por Wiik (24) y adoptado en el Primer Simposio Internacional sobre ANCA. Se seleccionó una dilución 1:100 de suero en buffer fosfato salino (PBS) como dilución de trabajo para pacientes y controles por ser la dilución que produjo mejores resultados

en las pruebas preliminares. Para este ensayo, se utilizaron como sustrato neutrófilos obtenidos de sangre periférica a partir de un donante voluntario sano. Las células se aislaron por un gradiente de Ficoll-Hypaque y se distribuyeron en láminas portaobjetos para su fijación con etanol frío al 95%. Como conjugado, se utilizó el fragmento Fab'2 de una anti-inmunoglobulina humana preparada en chivo y marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC), específica para cadena γ a una dilución 1:128.

ELISA: Para la detección de ANCA se utilizó un ensayo inmunoenzimático indirecto. Como antígenos para la sensibilización de las placas de ELISA se emplearon, un extracto granular de neutrófilos y las enzimas granulares purificadas mieloperoxidasa (MPO), elastasa (HLE), lactoferrina (LF), y catepsina-G (CG), obtenidas comercialmente.

El extracto granular consiste en una mezcla de diferentes proteínas granulares que reaccionan en sueros positivos para p-ANCA y c-ANCA; el mismo, fué preparado de acuerdo al método descrito por Riches et al (19), para lo cual 10^7 neutrófilos obtenidos de sangre periférica proveniente de un donante voluntario sano, fueron aislados por Ficoll-Hypaque y colocados en PBS frío en presencia de los inhibidores de proteólisis fluoruro de metilsulfonilo (PMSF) y cetona clorona:etilada de N-tosil-L-fenilalanina (TPCK), ambos a una concentración 0,006M. Posteriormente las células

fueron sometidas a sonicación, en hielo, en un sonicador Artek modelo 300 (Artek Systems Co. Farmingdale, NY, USA), a 70% de intensidad con una punta intermedia, durante 4 min con intervalos de 30 segundos. Posteriormente, se realizó la separación de fracciones celulares por centrifugación diferencial de acuerdo al método descrito por Klempner *et al* (12). La fracción que contenía los gránulos fué sonicada de nuevo como se ha descrito anteriormente, se distribuyó en alícuotas de 0,5 ml y se almacenaron a -70°C hasta ser usadas. Una de las alícuotas se utilizó para la determinación de proteínas.

Para los ensayos, las placas de ELISA fueron sensibilizadas con el extracto granular y las proteínas purificadas MPO, HLE, CG y LF cada una por separado. Como dilución de trabajo para los sueros, se seleccionó 1:100 por proporcionar los mejores resultados en los ensayos preliminares. Las placas utilizadas en los ensayos de ELISA fueron de poliestireno (Corning®). Se sensibilizaron colocando 200 μl del extracto granular y de cada una de las proteínas purificadas a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, en un buffer de cubierta carbonato 5mM, pH 9,6. Se colocaron en cámara húmeda y se incubaron a 4°C por 18 h. Posteriormente, las placas se lavaron cinco veces por 3 minutos con buffer PBS-Tween pH 7,4, se les adicionaron por duplicado 200 μl de los sueros en estudio a una dilución de 1:100 en PBS-Tween, después de lo

cual se colocaron en cámara húmeda y se incubaron a temperatura ambiente por 1 h. Las placas se lavaron de la manera descrita previamente, se les adicionaron 200 μl de una dilución 1:5000 en PBS-Tween del fragmento Fab'2 de anti-inmunoglobulina humana, preparada en chivo, específica para cadena γ , acoplada a fosfatasa alcalina. Se incubaron a temperatura ambiente en cámara húmeda por 1 h. Las placas se lavaron y se les adicionaron 200 μl de la solución del sustrato para fosfatasa alcalina *p*-nitrofenil fosfato, incubándose a temperatura ambiente por 30 min y la reacción se detuvo por la adición de 50 μl de 3M NaOH. La lectura de las placas se realizó a una longitud de onda de 405 nm en un lector de placas de ELISA (Cambridge Tech. Inc., Watertown, MA, USA).

Se consideraron como positivas las muestras de los pacientes cuyo valor de densidad óptica fué mayor al valor promedio de la densidad óptica de los veinte controles sanos más dos veces la desviación estándar.

Anticuerpos Antinucleares (ANA): Los pacientes provenientes de la Unidad de Reumatología los cuales correspondían a artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, monoartritis, lipodistrofia y calcinosis tumoral, al igual que los pacientes con periodontitis del adulto, fueron evaluados para la presencia de ANCA a través de inmunofluorescencia indirecta utilizando como sustrato células Hep-2 (Inestar Cor-

poration, Stillwater, Minnesota, USA), que es una línea de células epiteloides procedentes de un carcinoma humano de laringe. El rango de diluciones utilizado para cada suero fué de 1/40 a 1/1280. Del resto de las patologías presentadas, no se poseen datos sobre este tipo de anticuerpos.

Análisis de Datos: La distribución de ANCA para las diferentes patologías fue expresada en porcentajes de positividad para cada una de ellas.

RESULTADOS

La reactividad de todos los pacientes y del grupo de controles sanos, se esquematiza en la Tabla I. En el caso de la **artritis reumatoide**, cuatro pacientes de catorce (30%), fueron positivos para ANCA, dos de los cuales mostraron reactividad a diferentes proteínas. El patrón de inmunofluorescencia observado en estos pacientes fué de tipo perinuclear.

En el caso de **lupus eritematoso sistémico**, cinco de ocho pacientes (60%), fueron positivos para ANCA. La enzima elastasa fué reconocida en el 80% de los casos positivos; mieloperoxidasa, lactoferrina y catepsina-G en un 60%. El patrón de inmunofluorescencia encontrado en los pacientes lúpicos, fué de tipo perinuclear.

La **periodontitis del adulto**, fué la entidad con mayor grado de positividad para ANCA (75%), aunque solamente se pudo identificar a la lactoferrina como antígeno en el

30% de los casos. El patrón de inmunofluorescencia observado fué p-ANCA.

En la **glomerulonefritis postestreptocócica**, dos casos de doce (16%), fueron positivos para ANCA. En ambos casos, lactoferrina fué la enzima reconocida como antígeno. El patrón de inmunofluorescencia observado fué p-ANCA.

En el **síndrome nefrótico a cambios mínimos**, ninguno de los pacientes estudiados mostró positividad para ANCA.

En el **síndrome de Down**, tres de veinticinco pacientes (12%), fueron positivos para ANCA, uno de ellos, reconoció la elastasa como antígeno. El patrón de inmunofluorescencia observado fué p-ANCA.

Los pacientes con **calcinosis tumoral, lipodistrofia y monoartritis** resultaron positivos para ANCA con reconocimiento de la mayoría de las enzimas utilizadas. Los patrones de inmunofluorescencia para los tres fué el mismo p-ANCA.

Anticuerpos antinucleares (ANA): Solamente los pacientes de la Unidad de Reumatología y de la Facultad de Odontología, fueron evaluados para la presencia de ANA. De catorce pacientes con artritis reumatoide, siete fueron positivos para ANA. Los cuatro pacientes positivos para ANCA fueron también positivos para ANA. Siete pacientes no presentaron reactividad ni para ANA ni para ANCA. Ninguno de los pacientes con periodontitis del adulto, fué positivo para ANA. Todos los pacientes con lupus eritematoso sistémico fueron positivos para ANA.

TABLA I
PATRÓN DE DISTRIBUCIÓN DE ANCA EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO

Condición	Inmuno- fluorescencia		ELISA					
	c-ANCA	p-ANCA	EXG	MPO	HLE	CG	LF	
Artritis Reumatoide (n = 14)	0*	4	4	1	2	1	2	
Lupus Eritematoso Sistémico (n=8)	0	5	5	3	4	3	3	
Periodontitis del Adulto (n = 12)	0	9	9	0'	0	0	3	
Neutropenia Idiopática (n = 15)	0	1	1	0	0	0	1	
Glomerulonefritis Post. Estrept (n=12)	0	2	2	0	0	0	2	
Síndrome Nefrótico (n = 12)	0	0	0	0	0	0	0	
Síndrome de Down (n = 25)	0	3	3	0	1	0	0	
Monoartritis (n = 1)	-	+	+	+	+	-	+	
Lipodistrofia (n = 1)	-	+	+	+	+	+	-	
Calcinosis Tumoral (n = 1)	-	+	+	+	+	+	-	
Controles Sanos (n = 20)	0	0	0	0	0	0	0	

* Número de individuos positivos

Abreviaturas: EXG= Extrato Granular, MPO= Mieloperoxidasa, HLE= Elastasa, CG= Catepsina-G, LF= Lactoferrina, Post. Estrept= Postestreptococcica.

Del mismo modo, los tres pacientes con monoartritis, lipodistrofia y calcinosis tumoral fueron positivos para ANA.

DISCUSION

Desde hace poco tiempo, se sabe que la presencia de ANCA, constituye un evento común para un gran número de enfermedades inflamatorias e infecciosas. Nuestra investigación parece confirmar este hecho, cuando explora la presencia de estos autoanticuerpos en un grupo de enfermedades en donde la presencia de ANCA no ha sido descrita todavía, junto a otras patologías donde estos anticuerpos son conocidos ampliamente. En nuestro trabajo, investigamos la presencia de ANCA en el síndrome de Down, teniendo en cuenta reportes previos que establecen un aumento de la presencia general de autoanticuerpos en esta enfermedad (10). El 12% de positividad para ANCA en nuestra muestra de estudio, es el primer reporte de este tipo de anticuerpos en esta enfermedad, y corrobora la observación hecha para otro tipo de autoanticuerpos. De la misma forma, en la glomerulonefritis post-estreptocócica, encontramos un 16% de positividad para ANCA en una muestra de 12 individuos. Hasta el presente, no tenemos conocimiento de reportes previos de la presencia de ANCA en este tipo de nefropatía, exceptuando la descripción aislada hecha por Gallicchio (9) de dos pacientes con esta enfermedad. Contrariamente, en el síndrome nefrótico con cambios mi-

nimos, no hubo ningún caso positivo para ANCA.

Uno de los resultados inesperados fué el obtenido en pacientes con neutropenia idiopática. Se conoce por estudios en conejos, que la fagocitosis de neutrófilos unidos a anticuerpos anti-neutrófilo por macrófagos, es un mecanismo para la aparición de neutropenia (20), trasladando esta observación al humano, este hecho colocaría a los ANCA como candidatos para realizar la misma función en el humano. Por otra parte, es sabido que la activación de neutrófilos por diferentes mecanismos, entre ellos por citokinas, provocan la traslocación de proteínas granulares como MPO y PR-3 a la superficie celular (1). Una hipótesis postula que la interacción de ANCA con estas proteínas producirían una activación excesiva de la célula que provocaría degranulación y liberación de radicales oxidantes que conllevarían a la muerte del neutrófilo y la neutropenia correspondiente. Nuestros resultados indicaron que apenas uno de 15 pacientes fué positivo para ANCA, lo cual descartaría un posible papel de estos anticuerpos en esta patología.

Hasta este momento, no existe evidencia alguna, exceptuando tal vez a la granulomatosis de Wegener, en que se pueda establecer una relación directa entre ANCA y alguna patología en particular, ya que muchos investigadores consideran la presencia de estos anticuerpos como un fenómeno concurrente pero no vinculado a la etiología de la enfermedad. Investigaciones reali-

zadas en pacientes con artritis reumatoide y lupus eritematoso, muestran que la severidad de la enfermedad no guarda ninguna relación con la presencia de ANCA, y si alguna relación existe, es tal vez la vinculada con la duración de la enfermedad, donde se ha podido observar que pacientes con menos de diez años con lupus o artritis reumatoide, raramente son ANCA positivos, a diferencia de aquellos que tienen mas de diez años con estas patologías (15).

No obstante, lo mas significativo en este trabajo lo constituye el alto porcentaje de pacientes con periodontitis del adulto con positividad para ANCA (75%), los cuales fueron negativos para ANA y las vinculaciones que esta observación pueda tener con respecto a otras enfermedades. La presencia de autoanticuerpos no específicos, es conocida en ciertos tipos de periodontitis desde hace algun tiempo(21), en una publicación anterior en el Journal of Periodontal Research (en imprenta), describimos por primera vez la presencia de ANCA en periodontitis del adulto. Esta enfermedad, es sumamente común y de alta prevalencia, sobre todo en nuestro medio. Aproximadamente entre un 60 a 70% de nuestra población mayor de 30 años puede tener este tipo de enfermedad en mayor ó menor grado. Por otra parte, es sabido que la mayoría de los pacientes que acuden a las consultas médicas de las diferentes especialidades, son examinados rigurosamente desde el punto de vista médico, pero sin explorar ó determi-

nar la condición periodontal de los mismos. Este hecho, podría significar que muchos de los casos positivos para ANCA reportados en diferentes enfermedades, podrían estar asociados a una condición periodontal y no de otra índole.

Lamentablemente en este estudio, la reactividad observada en los casos de periodontitis del adulto, está dirigida principalmente hacia el extracto granular y un 30% de los casos positivos reconocieron solamente a la enzima lactoferrina. No se observó reactividad hacia mieloperoxidasa, elastasa ó cathepsina G, que son las enzimas sobre las que existe mayor reactividad en casos como artritis reumatoide ó lupus eritematoso sistémico. De cualquier modo, es importante hacer notar que en nuestro trabajo no se utilizaron otras enzimas granulares en las pruebas de ensayo inmunoenzimático, tales como: β -glucuronidasa, lisozima, cathepsina-D, proteinasa-3 ó la proteína acopladora de la vitamina B-12, que podrían ser las enzimas responsables de la reactividad del extracto granular observada en periodontitis.

Aparte de las observaciones hechas sobre la presencia de ANCA en patologías en las cuales estos anticuerpos no se habian descrito, nuestro trabajo plantea una serie de interrogantes donde la más importante sería saber si la determinación de ANCA en pacientes con artritis reumatoide y lupus eritematoso, realmente corresponde a un fenómeno propio de esas patologías o por el

contrario corresponde a una enfermedad concurrente como es el caso de la periodontitis del adulto. La generación de autoanticuerpos por activación policlonal de células B, es un evento común para ciertas enfermedades en donde existe una masa antigénica bacteriana permanente, como es el caso de ciertas periodontitis (21). Esta activación policlonal, sería el evento generador de los ANCA, los cuales como hemos expresado anteriormente podrían ser vinculados a otra enfermedad sistémica concomitante.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- CHARLES L.A., CALDAS M.L., FALK R.J., TERRELL R.S., JENNETTE J.C.: Antibodies against granule proteins activate neutrophils *in vitro*. *J Leuk Biol* 50:539-546, 1991.
- 2- COHEN J.B., GOLDSCHMEDING R., ELEMA J.D., VAN DER GIESSEN M., HUITEMA M.G., VAN DER HEM G.K., THE T.H., VON DER BORNE A.E., KALLENBERG C.G.: Autoantibodies against myeloid lysosomal enzymes in crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int* 37:799-806, 1990.
- 3- DAVIES D.J., MORAN J.E., NIALL J.F., RYAN G.B.: Segmental necrotizing glomerulonephritis with antineutrophil antibody. *Br Med J* 285:606, 1982.
- 4- DUERR R.H., TARGAN S.R., LANDERS C.J., LARUSSO N.F., LINDSAY K.L., WIESNER R.H., SHANAHAN F.: Neutrophil cytoplasmic antibodies: A link between primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis. *Gastroenterology* 100:1385-1391, 1991.
- 5- EGNER W., CHAPEL H.M.: Titration of antibodies against neutrophil cytoplasmic antigens is useful in monitoring disease activity in systemic vasculitides. *Clin Exp Immunol* 82:244-249, 1990.
- 6- EWERT B.H., JENNETTE J.C., FALK R.J.: Anti-myeloperoxidase antibodies stimulate neutrophils to damage human endothelial cells. *Kidney Int* 41:375-383, 1992.
- 7- FALK R.J., JENNETTE J.C.: Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 318(25):1651-1657, 1988.
- 8- FALK R.J., TERRELL R.S., CHARLES L.A., JENNETTE J.C.: Anti-neutrophil autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:4115-4119, 1990.
- 9- GALLICCHIO M.C., SAVIGE J.A.: Detection of anti-myeloperoxidase and anti-elastase antibodies in vasculitis and infections. *Clin Exp Immunol* 84:232-237, 1991.
- 10- KANAVIN O., SCOTT H., FAUSA O., EK J., GAARDER P.I., BRANDTZAEG P.: Immunological studies of patients with Downs syndrome. *Acta Med Scand* 244:473-477, 1988.
- 11- KLAASEN R.J., GOLDSCHMEDING R., DOLMAN K.M., ULEKKE A.B., WEIGEL H.M., EEF TINCK-SCHTTENKERK J.K., MULDER J.W., WESTEDT M.L., VON DER

- BORNE A.E.: Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies in patients with symptomatic HIV infection. *Clin Exp Immunol* 87:24-30, 1992.
- 12- KLEMPNER M.S., MIKKELSEN R.B., CORFMAN D.H., SCWARTZ J.A.: Neutrophil plasma membranes . Y. High-yield purification of human neutrophil plasma membrane vesicles by nitrogen cavitation and differential centrifugation. *J Cell Biol* 86:21-25, 1980.
- 13- MAC ISSAC A.I., MORAN J.E., DAVIES D.J., MURPHY B.F., GEORGIORIO T., NIALL J.F.: Anti-neutrophil cytoplasm antibody (ANCA) associated vasculitis. *Clin Nephrol* 34:5-8, 1990.
- 14- MITCHELL D.M., FRIES J.F.: An analysis of the American Rheumatism Association criteria for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 25:481, 1982
- 15- MULDER A.H., HORST G., VAN LEEUWEN M.A., LIMBURG P.C., KALLENBERG C.G.: Antineutrophil cytoplasmic antibodies in rheumatoid arthritis. Characterization and clinical correlations. *Arthritis and Rheumatism* 36:(8)1054-1060, 1993.
- 16- PAUZNER R., UROWITZ M., GLADMAND., GOUGH J.: Antineutrophil cytoplasmic in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 21:1670-1673, 1994.
- 17- PUDIFIN D.J., DUURSMA J., GATHIRAM V., JACKSON T.F.: Serum from patients with invasive amoebiasis has anti-neutrophil cytoplasmic antibody activity. *Clin Exp Immunol* 93(Suppl 1):S33, 1993.
- 18- RICHES D.W., YOUNG S.K., SECOMBE J.F., HENSON J.E., CLAY K.L., HENSON P.M.: The subcellular distribution of platelet-activating factor in stimulated human neutrophils. *J Immunol* 145: 3062-3069, 1990.
- 19- SAVAGE C.O., WINEARLS C.G., JONES S.J., MARSHALL P.D., LOCKWOOD C.M.: Prospective study of radioimmunoassay for antibodies against neutrophil cytoplasm in diagnosis of systemic vasculitis. *Lancet* 8: 1389-1393, 1987.
- 20- SIMPSON D.M., ROSS R.: Effects of heterologous anti-neutrophil serum in guinea pigs. Hematologic and ultrastructural observations. *Am J Pathol* 65:79-84, 1971.
- 21- TEW J., ENGEL D., MANGAN D.: Polyclonal B-cell activation in periodontitis. *J Periodont Res* 2488(7): 225-241, 1989.
- 22- VAN DER WOUDE F.J., RASMUSSEN N., LOBATTOS., WIJK A., PERMIN H., VAN ES L.A., VAN DER GIESSEN M., VAN DER HEM G.K., THE T.H.: Autoantibodies to neutrophils and monocytes: A new tool for diagnosis and a marker in disease activity in Wegeners granulomatosis. *Lancet* ii:425-429, 1985.
- 23- WEBER M.F., ANDRASSY K., PULLIG O., KODERISCH J., NETZER K.: Antineutrophil cytoplasmic antibodies in Goodpastures syndrome and in Wegener's granulomatosis. *Ann Intern Med* 111:28-40, 1989.
- 24- WIJK A.: A delineation of a standard procedure for indirect immunofluorescence of ANCA. *APMIS* 97 (Suppl 6):12-13, 1989.