

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MARCADORES INMUNOGENETICOS EN LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL: ESTUDIO SOBRE LOS ANTICUERPOS
ANTICITOPLASMA DE NEUTROFILO Y POLIMORFISMOS GENETICOS DE CITOCINAS (IL-1RA, TNF α Y TNF β) EN UNA POBLACION
DE PACIENTES ESPAÑOLES CON COLITIS ULCEROSA Y ENFERMEDAD DE CROHN

Michel Papo Berger

ISBN:978-84-691-2705-6/DL: T.398-2008

**MARCADORES INMUNOGENETICOS EN LA ENFERMEDAD
INFLAMATORIA INTESTINAL: ESTUDIO SOBRE LOS ANTICUERPOS
ANTICITOPLASMA DE NEUTROFILO Y POLIMORFISMOS
GENETICOS DE CITOCINAS (IL-1ra, TNF α y TNF β) EN UNA
POBLACION DE PACIENTES ESPAÑOLES CON COLITIS ULCEROSA
Y ENFERMEDAD DE CROHN.**

C 1677-75660
0133-22160

Departamento de Medicina Interna y Cirugía General
Facultad de Medicina
UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI DE TARRAGONA

**MARCADORES INMUNOGENETICOS EN LA ENFERMEDAD
INFLAMATORIA INTESTINAL: ESTUDIO SOBRE LOS ANTICUERPOS
ANTICITOPLASMA DE NEUTROFILO Y POLIMORFISMOS
GENETICOS DE CITOCINAS (IL-1ra, TNF α y TNF β) EN UNA
POBLACION DE PACIENTES ESPAÑOLES CON COLITIS ULCEROSA
Y ENFERMEDAD DE CROHN.**

Memoria para optar al Grado de Doctor en Medicina y Cirugía

Michel Papo Berger

T 144

Director de la Tesis: Profesor Cristóbal Richart Jurado

Servicio de Medicina Interna – Sección de Aparato Digestivo
Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII
Tarragona, 1999





UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT
DEPARTAMENT DE MEDICINA I CIRURGIA

Carrer Sant Llorenç, 21
43201 - Reus
Tel. 977 75 93 00
Fax 977 75 93 22
E-mail: sdmc@fmcs.urv.es

CRISTOBAL RICHART JURADO, Catedrático de Medicina de la Universitat Rovira i Virgili y Director de la Tesis Doctoral titulada "**marcadores inmunogenéticos en la enfermedad inflamatoria intestinal: estudio sobre los anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo y polimorfismos genéticos de citocinas (IL-1ra, TNF α y TNF β) en una población de pacientes españoles con colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn**" del Doctorando MICHEL PAPO BERGER, licenciado en Medicina y Cirugía, considera que cumple los requisitos para su presentación al Consejo de Departamento y la realización de todos los trámites pertinentes para su definitiva lectura y defensa pública.

Firmado. Profesor Cristóbal Richart

Tarragona, 20 Enero de 1999

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor Cristóbal Richart Jurado, Jefe del Servicio de Medicina Interna del Hospital Joan XXIII, por haber aceptado la dirección de esta Tesis Doctoral, y haber facilitado su realización en el servicio que dirige.

Al Dr Juan Carlos Quer Boniquet, inseparable compañero como Médico Adjunto de la Sección de Aparato Digestivo del Hospital Joan XXIII, por su amistad, su apoyo, y las innumerables horas de trabajo y diversión compartidas. Y sobre todo, por ser como mi hermano mayor.

A la Dra Rosa María Pastor Barellas, Médico Adjunto de la Sección de Inmunología del Servicio de Bioquímica del Hospital Joan XXIII, por las muchas horas de trabajo dedicadas a la determinación de los ANCA tras la puesta a punto de la técnica de la inmunofluorescencia indirecta. Su inestimable colaboración ha sido uno de los elementos clave en la realización de esta Tesis.

A la Dra Cristina Gutiérrez Fornés, miembro de la Unidad de Investigación del Hospital Joan XXIII, por su ayuda en la puesta a punto de las técnicas de biología molecular y determinación de los marcadores genéticos, asesoramiento estadístico de los datos, y constante ánimo e interés en el desarrollo de este trabajo.

A Montserrat Broch Montané y Carmen Aguilar Crespillo, miembros de la Unidad de Investigación del Hospital Joan XXIII, por su contribución en la determinación de los marcadores genéticos.

Al Dr Joan Vendrell Ortega, Médico Adjunto de la Sección de Endocrinología y Responsable de la Unidad de Investigación del Hospital Joan XXIII, por su contribución en la supervisión de las técnicas de biología molecular, y la crítica lectura realizada de esta memoria.

A la Dra Montserrat Olona Cabases, Médico Adjunto del Servicio de Medicina Preventiva del Hospital Joan XXIII, responsable directa del asesoramiento y análisis estadístico de este trabajo.

Al Dr Graciano García Pardo, Médico Residente de Medicina Interna del Hospital Joan XXIII, por su colaboración en la inclusión de los pacientes y recogida de las muestras sanguíneas.

Al Dr Eduard Prats, Médico Adjunto de la Sección de Aparato Digestivo del Hospital San Joan de Reus, por su colaboración en la inclusión de pacientes.

A Marta Targa Vilamajor y Montserrat Gandul Regaño, enfermeras de Endoscopia Digestiva del Hospital Joan XXIII, por su colaboración en la extracción de las muestras de sangre. Gracias por su siempre disponibilidad y colaboración durante los años de trabajo compartidos, y sobre todo, por su inagotable paciencia.

Al Dr Joan Ramón Malagelada Benaprés, Jefe del Servicio de Aparato Digestivo del Hospital de la Vall d'Hebron, máximo responsable de mi formación como digestólogo durante mi periodo de Médico Residente en el Servicio que dirige.

Al Dr José Ramón Armengol Miró, Jefe de la Sección de Endoscopia Digestiva del Hospital de la Vall d'Hebron, máximo responsable de mi formación en el campo de la Endoscopia Digestiva durante mi periodo de Médico Residente en el Servicio que dirige.

A los Drs Jaime Vilaseca Momplet y Luisa Guarner Aguilar, Jefes Clínicos del Servicio de Aparato Digestivo del Hospital de la Vall d'Hebron, como responsables directos de mi formación como digestólogo, y a los que debo las bases fundamentales de mis conocimientos en el campo de la Gastroenterología.

Al Dr Francesc Casellas Jordá, Médico Adjunto del Servicio de Aparato Digestivo del Hospital de la Vall d'Hebron, por ser el máximo responsable de mi introducción y formación en el campo de la investigación, hacerme copartícipe de los estudios que realizó durante mi periodo de Residente, y también por contribuir a la inclusión de pacientes. Por ser un ejemplo de perseverancia en el trabajo, inquietud científica, y profesionalidad.

A los Drs Esteban Saperas Franch y Fermín Mearin Manrique, así como a los demás miembros del Staff del Servicio de Aparato Digestivo del Hospital de la Vall d'Hebron, por sus enseñanzas en la práctica clínica y transmisión de sus conocimientos en el campo de la Digestología.

A mis excompañeros de Residencia del Servicio de Aparato Digestivo del Hospital de la Vall d'Hebron, Drs Valentín Puig-Diví, Javier Santos Vicente y Javier de Ribot Molinet, por su amistad, y por las horas de trabajo y momentos de diversión compartidos en tantas ocasiones.

Al Dr Eduard Mirapeix Vicens y Rosa Rodríguez, Médico Adjunto y enfermera respectivamente, del Servicio de Nefrología del Hospital Clínic i Provincial de Barcelona, por su acogida incondicional en su laboratorio y su disponibilidad para ayudarme a realizar este trabajo.

2.1.4.1.2. Otras vasculitis.....	33
2.1.4.1.2.1. Otras vasculitis de los vasos de pequeño tamaño	33
2.1.4.1.2.2. Vasculitis de los vasos de mediano tamaño	34
2.1.4.1.2.3. Vasculitis de los vasos de gran tamaño	36
<u>2.1.4.2. Otras enfermedades asociadas a los ANCA</u>	<u>36</u>
2.1.4.2.1. Conectivopatías	37
2.1.4.2.2. Hepatopatías crónicas	39
2.1.4.2.3. Enfermedades infecciosas	41
2.1.4.2.4. Otras enfermedades	42
<u>2.1.5. Papel patogénico de los ANCA en las vasculitis sistémicas</u>	<u>43</u>
<u>2.1.5.1. Papel fisiopatológico de los ANCA: estudios <i>in vitro</i></u>	<u>44</u>
2.1.5.1.1. Activación de los neutrófilos mediada por los ANCA.....	44
2.1.5.1.2. Activación de los monocitos mediada por los ANCA	44
2.1.5.1.3. Interacción entre los ANCA y las células endoteliales	45
2.1.5.1.4. Reactividad de las células T en las vasculitis asociadas a ANCA	46
2.1.5.1.5. Interacción de los ANCA con sus antígenos diana	46
<u>2.1.5.2. Papel fisiopatológico de los ANCA <i>in vivo</i></u>	<u>47</u>
<u>2.2. ANCA EN LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL</u>	<u>48</u>
<u>2.2.1. Técnicas de detección</u>	<u>50</u>
2.2.1.1. Inmunofluorescencia indirecta	50
2.2.1.2. ELISA	54
<u>2.2.2. Especificidades antigénicas</u>	<u>54</u>
<u>2.2.3. Clases y subclases de ANCA en la EII</u>	<u>57</u>
<u>2.2.4. Prevalencia de los ANCA en la EII</u>	<u>57</u>
<u>2.2.5. Papel patogénico de los ANCA en la EII</u>	<u>64</u>
<u>2.2.6. Significado y utilidad de los ANCA en la EII</u>	<u>65</u>
2.2.6.1. Papel de los ANCA como marcadores serológicos clínicos	66
2.2.6.1.1. Marcadores diagnósticos de la colitis ulcerosa	66

2.2.6.1.2. Marcadores de bursitis (pouchitis)	66
2.2.6.1.3. Marcadores de la enfermedad de Crohn con fenotipo clínico "UC-like"	67
<u>2.2.6.2. Papel de los ANCA como marcadores genéticos</u>	68
2.2.6.2.1. Marcadores subclínicos de susceptibilidad genética a la EII	68
2.2.6.2.2. Marcadores subclínicos de heterogeneidad genética en la EII	69
<u>2.3. GENETICA DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL</u>	72
<u>2.3.1. Predisposición genética en la EII</u>	72
<u>2.3.2. Modelo de herencia en la EII</u>	73
<u>2.3.3. Identificación de los genes susceptibles en la EII</u>	76
<u>2.3.4. Elección de los marcadores genéticos</u>	78
<u>2.3.5. Antagonista del receptor de la interleucina 1 (IL-1ra)</u>	80
2.3.5.1. Familia de la interleucina 1	80
2.3.5.2. IL-1ra en la EII	84
2.3.5.3. Gen del IL-1ra	86
2.3.5.4. Polimorfismo VNTR del gen del IL-1ra y EII	89
<u>2.3.6. Factor de Necrosis Tumoral (TNF)</u>	91
2.3.6.1. Estructura y función	91
2.3.6.2. TNF en la EII	93
2.3.6.3. Genes del TNF α y del TNF β	94
2.3.6.4. Polimorfismos de los genes del TNF α y TNF β , y EII	98
3. OBJETIVOS	100

4. PUBLICACIONES	103
4.1. Estudio I:	
Anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo en la enfermedad inflamatoria del intestino. <u><i>Med Clin (Barc) 1998;110: 11-15.</i></u>	105
4.2. Estudio II:	
Antineutrophil cytoplasmic antibodies in relatives of patients with inflammatory bowel disease. <u><i>Am J Gastroenterol 1996;91: 1512-1515.</i></u>	111
4.3. Estudio III:	
Genetic heterogeneity within ulcerative colitis determined by an interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and antineutrophil cytoplasmic antibodies. <u><i>Eur J Gastroenterol Hepatol 1999;11: 413-420.</i></u>	116
5. DISCUSION	125
6. CONCLUSIONES	141
7. BIBLIOGRAFIA	144

ABREVIATURAS

aa: Aminoácidos

ACR: *American College of Rheumatology*

AECA: Anticuerpos anticélula endotelial

ANA: Anticuerpos antinucleares

ANCA: Anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo

AR: Artritis reumatoide

α 1-AT: α 1-antitripsina

BPI: *Bactericidal/permeability increasing protein*

c-ANCA: Patrón citoplasmático

CBP: Cirrosis biliar primaria

CEP: Colangitis esclerosante primaria

CU: Colitis ulcerosa

CU-ANCA+: Pacientes con colitis ulcerosa y ANCA positivos

CU-ANCA-: Pacientes con colitis ulcerosa y ANCA negativos

CU-cANCA: Pacientes con colitis ulcerosa y ANCA con patrón citoplasmático

CU-pANCA: Pacientes con colitis ulcerosa y ANCA con patrón perinuclear

EC: Enfermedad de Crohn

EC-ANCA+: Pacientes con enfermedad de Crohn y ANCA positivos

EC-ANCA-: Pacientes con enfermedad de Crohn y ANCA negativos

EII: Enfermedad inflamatoria intestinal

ELISA: Enzimoimmunoensayo

GN: Glomerulonefritis necrosante

GS-ANA: Anticuerpos antinucleares específicos de los granulocitos

GW: Granulomatosis de Wegener

HAI: Hepatitis autoinmune

h-lamp-2: *human lysosomal -associated membrane protein 2*

HMG1: *High mobility group non-histone chromosomal protein 1*

HMG2: *High mobility group non-histone chromosomal protein 2*

ICE: Enzima convertidor de la interleucina 1 β

IFI: Inmunofluorescencia indirecta

IL-1: Interleucina 1

IL-1 α : Interleucina 1 α

IL-1 β : Interleucina 1 β

IL-1ra: Antagonista del receptor de la interleucina 1

IL1A: Gen de la interleucina 1 α

IL1B: Gen de la interleucina 1 β
IL1RN: Gen del antagonista del receptor de la interleucina 1
IL-1RI: Receptor de la interleucina 1 tipo I
IL-1RII: Receptor de la interleucina 1 tipo II

LES: Lupus eritematoso sistémico

kb: Kilobases
kD: Kilodaltons

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad
MPO: Mieloperoxidasa
MPO-ANCA: Anticuerpos antimieloperoxidasa

PAN: Poliarteritis nodosa
p-ANCA: Patrón perinuclear
pb: Pares de bases
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PMN: Polimorfonucleares
PM: Poliangeítis microscópica
PR3: Proteinasa 3
PR3-ANCA: Anticuerpos antiproteinasa 3

RNA_m: RNA mensajero
RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*

TNF α : Factor de necrosis tumoral α
TNF β : Factor de necrosis tumoral β
TNFA: Gen del factor de necrosis tumoral α
TNFB: Gen del factor de necrosis tumoral β
TNFR: Receptor del TNF
TGF β : *Transforming growth factor β*

VNTR: *Variable Number of Tandem Repeats*

1. PREAMBULO

La presente tesis doctoral es el fruto de dos circunstancias bien determinadas. En primer lugar, los tres estudios de los que consta, son el resultado de la colaboración entre varios centros hospitalarios sin la cual no hubiera sido posible su realización. En el primer estudio, **Anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo en la enfermedad inflamatoria intestinal**, colaboraron 3 centros: Hospital Clínic i Provincial de Barcelona, Hospital San Joan de Reus, y Hospital Joan XXIII de Tarragona. En el segundo estudio, **Antineutrophil cytoplasmic antibodies in relatives of patients with inflammatory bowel disease**, colaboraron los mismos centros: Hospital Clínic i Provincial de Barcelona, Hospital San Joan de Reus, y Hospital Joan XXIII de Tarragona. Finalmente en el tercer trabajo, **Genetic heterogeneity within ulcerative colitis determined by an interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and antineutrophil cytoplasmic antibodies**, colaboraron dos centros: Hospital General Vall d'Hebrón de Barcelona y Hospital Joan XXIII de Tarragona.

En segundo lugar, de la oportunidad de realizar una tesis doctoral a partir de diferentes trabajos publicados en revistas de prestigio, siempre y cuando estos sigan una misma línea de investigación, que incentiva la práctica de estudios y permite profundizar en cada línea de investigación, además de facilitar la elaboración de la tesis doctoral.

2. INTRODUCCION

2.1. ANTICUERPOS ANTICITOPLASMA DE NEUTROFILO

2.1.1. Introducción

Los anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo (ANCA: antineutrophil cytoplasmic antibodies) son un conjunto de anticuerpos dirigidos contra componentes específicos del citoplasma de los neutrófilos y de los monocitos¹.

Los ANCA fueron inicialmente descritos en el año 1982 por Davies y cols.² en una serie de 8 pacientes con una glomerulonefritis necrosante segmentaria sin depósito de inmunocomplejos, algunos de los cuales presentaban también manifestaciones clínicas de vasculitis sistémica. Todos ellos respondieron satisfactoriamente al tratamiento con glucocorticoides y ciclofosfamida o azatioprina, objetivándose la desaparición de los anticuerpos con la remisión de la enfermedad, y su reaparición en dos pacientes que tuvieron una reactivación clínica posterior. El desarrollo del proceso vasculítico y la presencia de los anticuerpos se relacionó con la evidencia serológica de una viremia por arbovirus. Dos años más tarde, Hall y cols.³ observaron la presencia de los mismos anticuerpos en otros 4 pacientes con glomerulonefritis necrosante (GN) y vasculitis sistémica. La importancia de estos dos trabajos no fue reconocida hasta 1985, año en el que Van der Woude y cols.⁴ establecieron por primera vez una estrecha asociación entre los ANCA y la granulomatosis de Wegener (GW). En su estudio que incluyó 41 pacientes con GW, Van der Woude y cols. definieron el patrón de inmunofluorescencia citoplasmático característico de los ANCA asociados a la GW, demostraron que eran inmunoglobulinas de la clase IgG, y sugirieron su utilidad para el seguimiento evolutivo

de la enfermedad. Los hallazgos de los investigadores dano-holandeses fueron rápidamente ratificados por otros grupos americanos y europeos, en varios trabajos publicados entre los años 1986 y 1989⁵⁻⁹.

En el año 1987 Savage y cols.¹⁰ reportaron la presencia de ANCA en otras vasculitis sistémicas distintas a la GW, y un año más tarde Falk y Jennette¹¹ confirmaron su asociación con la GN pauci-inmune con o sin manifestaciones extrarrenales. Los resultados de estos dos estudios fueron así mismo rápidamente corroborados por otros autores¹²⁻¹⁶.

Numerosos estudios realizados durante esta última década han confirmado la estrecha asociación de los ANCA con la GW, y han delimitado las otras vasculitis asociadas que incluyen el síndrome de Churg-Strauss, la poliangeítis microscópica (PM), la GN pauci-inmune idiopática, y algunas vasculitis inducidas por fármacos¹⁷⁻³⁷. Su valor como marcador serológico útil para el diagnóstico de estas enfermedades ha quedado bien establecido, y se ha documentado su posible contribución para la monitorización de las mismas.

El descubrimiento de los ANCA representa uno de los avances más importantes realizados durante los últimos años en el campo de las vasculitis, y sin duda, se puede afirmar que ha marcado una nueva era en el estudio de las mismas. Por una parte, su posible papel patogénico en el desarrollo de estos procesos, constituye un novedoso y atractivo mecanismo inmunopatogénico capaz de producir lesión vascular^{38,39}. La participación de estos anticuerpos en la etiopatogenia de las vasculitis ha sido durante

todos estos años, y sigue siendo hoy en día, uno de los campos más extensos y activos de la investigación sobre los ANCA. Por otra parte, el reconocimiento de que los procesos vasculíticos primarios asociados, además de la posible implicación patogénica de los ANCA, comparten características histopatológicas y clínicas muy similares, ha permitido comprender que estas entidades se encuentran estrechamente relacionadas entre sí. Estos hallazgos han sido la base para el desarrollo de una nueva clasificación de las vasculitis, derivada de la conferencia de consenso de Chapel Hill de 1992 en la que se consensuaron los nombres y las definiciones de las principales vasculitis primarias⁴⁰. Esta clasificación incluye por primera vez el grupo de las "vasculitis asociadas a los ANCA", y es la que mayoritariamente se sigue en la actualidad⁴¹⁻⁴⁴.

Los ANCA no se asocian únicamente al grupo de las vasculitis primarias señaladas. En efecto, desde los primeros años de su descubrimiento, y durante los años posteriores, numerosos trabajos han demostrado su presencia en el suero de pacientes afectados de diversas entidades distintas a las vasculitides⁴⁵⁻⁴⁸. Actualmente está bien establecida su asociación con diversas conectivopatías, hepatopatías de etiología autoinmune, procesos infecciosos, y la enfermedad inflamatoria intestinal (EII). Sin embargo, contrariamente a los síndromes vasculíticos, la frecuencia con la que se detectan los ANCA en estas patologías es muy variable, y su significado es todavía incierto. Con respecto a la EII, desde que en el año 1990 se publicaran los primeros estudios^{49,50} que demostraron su presencia en pacientes con colitis ulcerosa (CU) y enfermedad de Crohn (EC), otros trabajos han confirmado plenamente dicha asociación.

2.1.2. Técnicas de detección de los ANCA

Las principales técnicas inmunológicas utilizadas para la detección de los ANCA son la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el análisis del inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA)^{51,52}.

2.1.2.1. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

La IFI con neutrófilos fijados en etanol fue la primera técnica utilizada para la detección de los ANCA, sigue siendo la más empleada por la mayoría de laboratorios, y es la que se considera en la actualidad como técnica de referencia.

Hasta el año 1988 existieron notables diferencias metodológicas para la aplicación de la IFI entre distintos laboratorios. Las más importantes radicaban en los fijadores utilizados, y en los tiempos y la temperatura de fijación. Consecuentemente, los resultados obtenidos por diferentes grupos eran difícilmente comparables. De esta forma, durante las primeras jornadas de trabajo internacionales para el estudio de los ANCA celebradas en Copenhague en el año 1988, se procedió a estandarizar la técnica de la IFI con neutrófilos fijados en etanol basándose en las diferentes metodologías empleadas por los distintos grupos de trabajo⁵³. Estudios multicéntricos posteriores han demostrado una alta reproducibilidad de los resultados obtenidos por distintos laboratorios cuando se aplica la metodología estandarizada por Wiik durante las citadas primeras jornadas de trabajo sobre los ANCA⁵⁴.

2.1.2.1.1. Sustratos antigénicos

Los neutrófilos aislados de la sangre periférica de donantes sanos representan en la actualidad el sustrato antigénico empleado para la IFI. El proceso de aislamiento, separación, y posterior fijación de los neutrófilos, se continua realizando en muchos laboratorios. Actualmente, la comercialización de portaobjetos con neutrófilos fijados en etanol ha facilitado notablemente la elaboración de la técnica.

Algunos autores habían utilizado la línea promielocítica HL-60 como sustrato antigénico alternativo a los neutrófilos⁵⁵⁻⁵⁸. Estas células contienen gran cantidad de gránulos primarios, pero son deficitarias en gránulos secundarios⁵⁹. No obstante, existen diferencias en sus distintas subpoblaciones debido a su crecimiento asincrónico y cambios fenotípicos en el cultivo celular, lo que repercute en un déficit de producción de proteínas de los gránulos primarios^{59,60}. En consecuencia, la utilidad de las células HL-60 como sustrato alternativo a los neutrófilos, depende fundamentalmente de la cantidad de los gránulos primarios y secundarios que posean las células utilizadas en cada laboratorio. Por ello, los resultados obtenidos en varios trabajos han sido discordantes, y actualmente esta línea celular ha dejado de utilizarse de forma rutinaria.

Recientemente, Specks y cols.⁶¹ han señalado que la utilización de una línea celular de mastocitos humanos que expresan proteinasa 3 recombinante (células HMC-1/PR3r) como sustrato antigénico para la IFI, constituye un método más sensible y específico que la IFI standard con neutrófilos fijados en etanol para la detección de los c-ANCA/PR3-ANCA (ANCA con patrón de inmunofluorescencia citoplasmático cuyo antígeno es la proteinasa 3).

2.1.2.1.2. Patrones de inmunofluorescencia.

El patrón de inmunofluorescencia inicialmente descrito en los primeros trabajos fue el patrón citoplasmático²⁻⁷. En el año 1988 Falk y Jennette¹¹ describieron por primera vez la existencia de dos subtipos de ANCA: unos que presentaban una inmunotinción perinuclear mediante la IFI con neutrófilos fijados en etanol y cuyo antígeno identificaron como la mieloperoxidasa (MPO), y otros que presentaban la previamente reconocida tinción citoplasmática y que no reaccionaban con la MPO. Posteriormente, durante las segundas jornadas de trabajo internacionales para el estudio de los ANCA celebradas en Leiden en el año 1989, se consensuó la nomenclatura de los patrones de fluorescencia obtenidos mediante IFI con neutrófilos fijados en etanol⁶². Así, se distinguen dos patrones fundamentales de inmunotinción: el patrón citoplasmático y el patrón perinuclear, conocidos respectivamente mediante los acrónimos c-ANCA (cytoplasmic o classical ANCA), y p-ANCA (perinuclear ANCA). El patrón citoplasmático (c-ANCA) se caracteriza por la tinción granular del citoplasma, más acentuada en el centro de los polimorfonucleares (PMN) entre los segmentos nucleares. El patrón perinuclear (p-ANCA) muestra una tinción difusa del núcleo que queda delimitado por un marcado refuerzo periférico. Se han descrito otros patrones de inmunotinción que se caracterizan por una tinción intermedia entre los patrones p-ANCA y c-ANCA. Estos otros patrones se detectan por lo general en enfermedades distintas a las vasculitis. Estas reactividades se pueden englobar dentro de un tercer patrón de inmunotinción que se ha denominado a-ANCA (atypical ANCA) o x-ANCA, si bien la mayoría de autores las incluyen dentro del grupo de los c-ANCA o p-ANCA, dependiendo del predominio de la tinción del

citoplasma o del núcleo respectivamente^{48,62}. Las figuras 1 y 2 (página 14) muestran los dos patrones de IFI, c-ANCA y p-ANCA.

La existencia de estos distintos patrones de inmunotinción traduce la presencia de anticuerpos dirigidos contra diferentes especificidades antigénicas, que se asocian distintamente a diversas enfermedades. Aunque estas cuestiones se tratarán de forma detallada más adelante, a continuación se exponen de forma resumida.

◆ c-ANCA

Aproximadamente el 90% de los c-ANCA corresponden a anticuerpos dirigidos contra la proteinasa 3 (PR3) (PR3-ANCA)^{63,64}. Otras especificidades antigénicas que se detectan muy raramente son la elastasa, la catepsina G, la lisozima, la BPI (*bactericidal/permeability increasing protein*), y excepcionalmente la MPO^{63,64}.

Clínicamente los c-ANCA/PR3-ANCA se asocian principalmente a la GW. De forma global se detectan en un 65-75% de los pacientes^{36,41-43}, y en la mayoría de las series en más del 90% de las formas activas y generalizadas de la enfermedad. Sin embargo, los c-ANCA/PR3-ANCA no son exclusivos de la GW, de tal forma que se encuentran en un 30-45% de las otras vasculitis asociadas a los ANCA (síndrome de Churg-Strauss, PM, y GN pauci-inmune idiopática). Finalmente, también se ha reportado de forma variable la presencia de c-ANCA en algunos procesos infecciosos, y raras veces en otras entidades, si bien las especificidades antigénicas son desconocidas en la mayoría de estos casos⁴⁵⁻⁴⁸.

♦ p-ANCA

A diferencia de los c-ANCA, las especificidades antigénicas del patrón p-ANCA son mucho más variadas. Los p-ANCA corresponden a anticuerpos dirigidos contra la MPO, la elastasa, la catepsina G, la lisozima, la lactoferrina, la β glucuronidasa, la azurocidina, la α -enolasa, la catalasa, las defensinas, la h-lamp-2 (*human lysosomal-associated membrane protein 2*), las HMG1 y HMG2 (*high mobility group non-histone chromosomal proteins HMG1 y HMG2* respectivamente), y excepcionalmente la PR3⁶³⁻⁶⁴. A excepción de la α -enolasa y la catalasa, todas las demás proteínas se localizan en los gránulos primarios y secundarios del citoplasma de los neutrófilos y monocitos. Sin embargo, tal como se ha señalado, el patrón de IFI que producen con neutrófilos fijados en etanol es perinuclear. La explicación de esta particularidad radica en que el patrón p-ANCA se considera un patrón artefactuado, que se obtiene como consecuencia de una redistribución de los antígenos citoplasmáticos catiónicos hacia el núcleo cargado negativamente, debido al aumento de la permeabilidad de las membranas de los neutrófilos al utilizar el etanol como fijador^{11,45,47,65}. Esta circunstancia se comprobó con el empleo de otros fijadores, como la formalina y/o la acetona, que no alteran la permeabilidad de las membranas y fijan las proteínas en su localización original. Cuando se emplean estos últimos fijadores, el patrón p-ANCA adopta un patrón de inmunotinción citoplasmático^{11,45,47,65}. Sin embargo, es preciso señalar, que recientemente se han publicado trabajos mostrando que la IFI con neutrófilos fijados en acetona o formalina produce resultados inconsistentes y no siempre reproducibles^{66,67}. Los autores de estos últimos trabajos desaconsejan en consecuencia la práctica de la IFI con estos fijadores.

El espectro de las enfermedades asociadas a los p-ANCA incluye, en primer lugar, el grupo de las vasculitis asociadas a los ANCA⁴¹⁻⁴³. En estas enfermedades, aproximadamente el 90% de los p-ANCA corresponde a anticuerpos dirigidos contra la MPO (MPO-ANCA), rara vez la elastasa, la catepsina G, y la lisozima, y excepcionalmente la PR3. Los p-ANCA/MPO-ANCA se detectan en un 45-70% de pacientes con el síndrome de Churg-Strauss, la PM, y la GN pauci-inmune idiopática, y en un 15-25% de pacientes con GW. El patrón p-ANCA se detecta así mismo en un porcentaje muy variable de pacientes con diversas conectivopatías, hepatopatías crónicas de origen autoinmune, enfermedades infecciosas, y la EII⁴⁵⁻⁴⁸. En estas enfermedades rara vez se detectan MPO-ANCA, y las especificidades antigénicas son muy variadas y por lo general desconocidas.

2.1.2.1.3. Interpretación de los resultados de la IFI.

Para una correcta interpretación de los resultados de la IFI con neutrófilos fijados en etanol, es preciso destacar que este método tiene dos inconvenientes principales. El primero, es que la técnica no es antígeno-específica, por lo que para la caracterización de las correspondientes especificidades antigénicas de los distintos patrones de IFI, se deben utilizar las otras técnicas inmunológicas que se comentarán posteriormente^{51,52}. En segundo lugar, la IFI cuenta con el inconveniente de la subjetividad de su interpretación, sobre todo con respecto al patrón p-ANCA, que puede ser indistinguible del patrón de inmunofluorescencia producido por los anticuerpos antinucleares (ANA). Para resolver este problema se han propuesto distintas estrategias. Primero, la presencia de linfocitos en

las preparaciones de neutrófilos facilita la distinción, debido a que los p-ANCA no reaccionan con estas células, mientras que los ANA muestran su típico patrón en células distintas a los PMN⁵². Segundo, se ha sugerido la aplicación de la IFI con neutrófilos fijados en formalina o acetona para diferenciar los p-ANCA de los ANA. Así, los p-ANCA adoptarían un patrón citoplasmático, mientras que los ANA permanecen inmodificados^{45,46} o no muestran reactividad^{65,68-70}, según los autores. Sin embargo, teniendo en cuenta esta última discrepancia, y por los motivos previamente expuestos sobre la utilización de estos fijadores, esta estrategia no es aconsejable. Finalmente, un procedimiento alternativo es la determinación de ANA mediante IFI usando como sustratos líneas de cultivos celulares (células HEp2, VERO, WIL-2 o fibroblastos) o cortes histológicos de tejidos, en todos los sueros que presenten un patrón de inmunotinción perinuclear mediante la IFI con neutrófilos fijados en etanol. Los sueros se consideran p-ANCA positivos cuando los títulos de la IFI con neutrófilos son al menos el doble (o el cuádruple para algunos autores), que los que se obtienen con la IFI realizada con los sustratos específicos para los ANA^{51,52}.

Por último, señalar que los pacientes con ANCA presentan por lo general, un único patrón de inmunotinción, p-ANCA o c-ANCA. Se ha reportado la presencia de ambos patrones de forma simultánea, pero esto ocurre en un bajo porcentaje de casos.

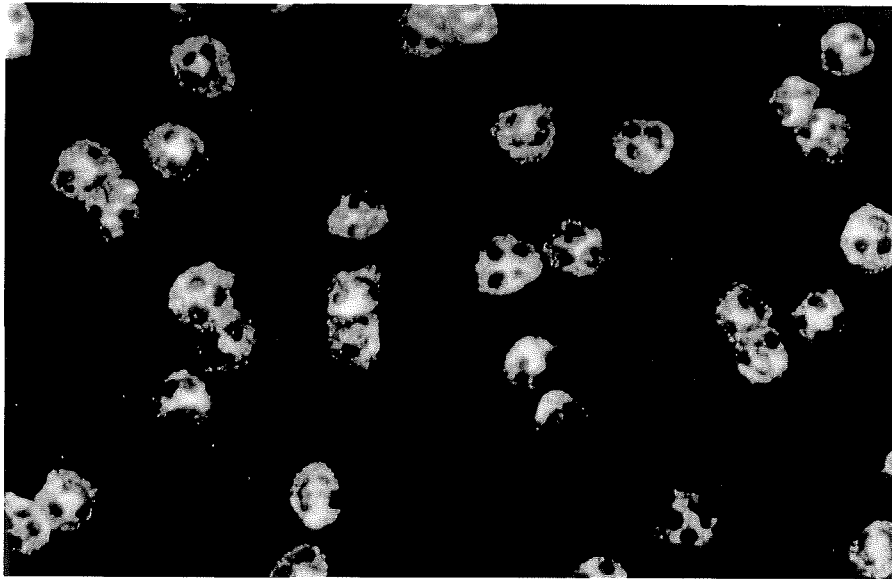


Figura 1. Patrón c-ANCA a 40 aumentos.

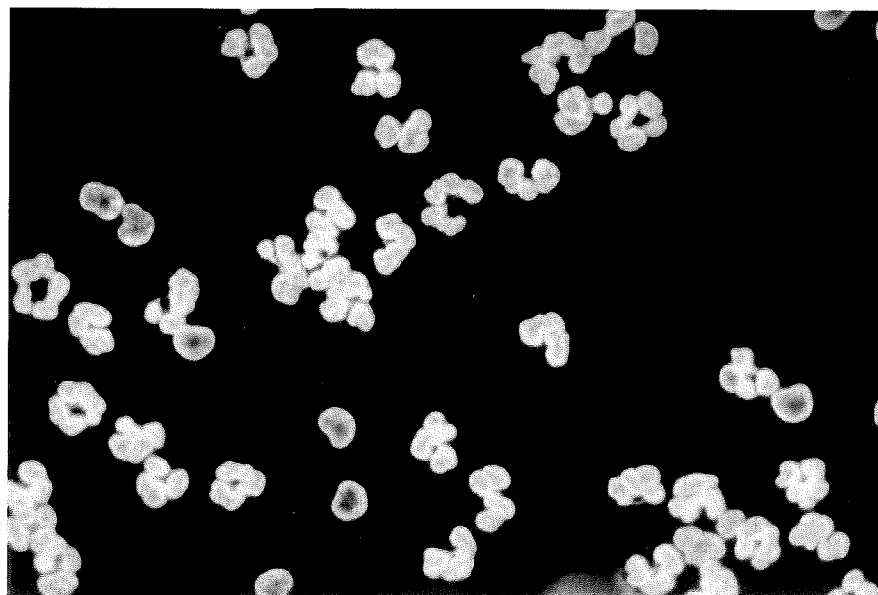


Figura 2. Patrón p-ANCA a 40 aumentos.

2.1.2.2. Enzimoimmunoensayo (ELISA)

El desarrollo de la técnica de ELISA ha supuesto un progreso muy significativo para la detección de los ANCA, y actualmente constituye la otra técnica más utilizada para su determinación. Su mayor ventaja con respecto a la IFI, radica en la posibilidad de demostrar las diversas especificidades antigénicas de los ANCA. De esta forma, si bien el ELISA se puede utilizar como método alternativo a la IFI, en la práctica se emplea como método complementario, precisamente con el propósito de determinar las especificidades antigénicas correspondientes.

Para la realización del ELISA se pueden utilizar como antígenos los neutrófilos enteros, los gránulos primarios, los gránulos secundarios, fracciones de membrana citoplasmática, y las proteínas purificadas de los gránulos^{51,52}.

En los primeros trabajos se utilizaban como antígenos los neutrófilos enteros o extractos de los granulocitos. Falk y Jennette¹¹ fueron los primeros investigadores en diseñar un ELISA para la detección de los ANCA. Utilizaron como antígenos neutrófilos enteros, gránulos primarios y secundarios, fracciones de membrana citoplasmática, y antígenos purificados como la MPO, la lisozima, y la fosfatasa alcalina. Este estudio mostró una buena correlación de los resultados obtenidos mediante la IFI y el ELISA. La excelente sensibilidad y especificidad del ELISA para la determinación de los ANCA se comprobó en trabajos posteriores^{9,71,72}. Estos estudios confirmaron así mismo, que los ANCA van dirigidos contra componentes específicos de los gránulos de los neutrófilos.

Desde la identificación de las principales especificidades antigénicas de los ANCA, la mayoría de laboratorios aplican el ELISA utilizando como antígenos las

proteínas purificadas de los gránulos de los neutrófilos (PR3 y MPO, pero también otras). Desafortunadamente, la preparación y purificación de las proteínas, así como la metodología de la técnica están todavía hoy en día insuficientemente estandarizadas, por lo que los resultados obtenidos por diferentes laboratorios son poco comparables. Wang y cols.⁷³ han reportado, que incluso la sensibilidad y especificidad difieren significativamente entre diferentes kits comercializados con los principales antígenos de los ANCA (PR3 y MPO). Con el objetivo de estandarizar la técnica en Europa, recientemente se han realizado una serie de estudios multicéntricos en los que han participado 14 centros de varios países (*The European Commission/Measurement and Testing, EC/BCR, Study Group for ANCA Assay Standardization*). En el primer estudio publicado por este grupo, se evidenció una marcada variabilidad de los resultados obtenidos por los distintos laboratorios participantes, como consecuencia de las diferencias metodológicas existentes⁵⁴. En un segundo estudio, se procedió a estandarizar la técnica, de tal forma que tras varias rondas de ensayos con la metodología protocolizada, los resultados obtenidos por los diferentes laboratorios mostraron un coeficiente de variabilidad inferior al 20%⁷⁴.

A pesar de estos inconvenientes, los resultados del ELISA y la IFI elaborados por un mismo laboratorio muestran por lo general una buena correlación, siendo la especificidad y sensibilidad de ambas técnicas similar. Aproximadamente entre un 80-90% de los sueros IFI-positivos, son positivos con el ELISA, y un 90% de sueros que son positivos mediante ELISA, lo son con la IFI. La ausencia de una correlación absoluta

entre las dos técnicas se atribuye en parte a la posible desnaturalización de las proteínas, que puede ocurrir durante su proceso de purificación o durante su unión a la superficie de plástico de la placa de ELISA. Para evitar esta última eventualidad, se han diseñado los llamados ELISA de captura, en los que un anticuerpo monoclonal se usa como soporte del antígeno, en lugar de la unión directa al plástico. Los resultados de varios estudios sugieren una mayor sensibilidad y especificidad de esta técnica con respecto al ELISA directo^{19,75,76}.

2.1.2.3. Otras técnicas

Otras técnicas empleadas para la detección de los ANCA capaces de identificar anticuerpos específicos son la cuantificación por citometría de flujo (CTF), el radioinmunoanálisis (RIA), el western-blot, el dot-blot, y la inmunoprecipitación. Estos métodos son técnicamente bastante más complejos que la IFI y el ELISA, y no aportan ventajas con respecto a éstas últimas. Su difusión es mucho menor, y por lo general su aplicación se restringe al campo de la investigación.

2.1.3. Especificidades antigénicas de los ANCA

Los ANCA van dirigidos contra componentes específicos del citoplasma de los neutrófilos y de los monocitos, que en su gran mayoría corresponden a constituyentes de los gránulos primarios y secundarios de dichas células.

2.1.3.1. Gránulos y vesículas secretoras de los neutrófilos

Los granulocitos y los monocitos son células que participan, en colaboración con otras células del sistema mononuclear fagocítico y diversas moléculas, en la defensa del organismo frente a las agresiones del medio externo. Estas células y elementos moleculares carecen de capacidad de reconocimiento específico, integrando la denominada inmunidad natural, no adaptativa, o inespecífica. Los granulocitos y los monocitos desarrollan sus funciones gracias a que poseen una dotación enzimática abundante contenida en diferentes gránulos y vesículas⁷⁷. La estricta movilización jerárquica de estos componentes celulares ofrece la base estructural para orquestar la metamorfosis de los neutrófilos desde un estado de quiescencia durante su circulación sanguínea, a un estado de máxima actividad metabólica y destructiva característico de estas células en el foco inflamatorio.

2.1.3.1.1. Vesículas secretoras

Las vesículas secretoras son pequeñas vesículas repartidas por el citoplasma que se forman durante las fases finales del desarrollo de los neutrófilos. Contienen proteínas plasmáticas y proteínas que se incorporan a la membrana celular, fundamentales para los fenómenos de movilización y adhesión de los PMN al endotelio vascular.

2.1.3.1.2. Gránulos

Los neutrófilos contienen dos tipos principales de gránulos, los gránulos peroxidasa-positivos, también llamados gránulos primarios, gránulos α , o azurófilos, y los gránulos peroxidasa- negativos o secundarios.

Los gránulos secundarios se forman en una fase tardía de la diferenciación celular, y se dividen en gránulos específicos y gránulos gelatinasa, dependiendo de su contenido en lactoferrina o no, respectivamente. Estos gránulos participan fundamentalmente en el proceso de diapedesis de los granulocitos hacia los focos inflamatorios.

Los gránulos primarios se forman durante la fase promielocítica de la diferenciación de los PMN, y son los más abundantes. Contienen enzimas proteolíticos y bactericidas, de los cuales los más importantes son la MPO y las proteasas serinas, PR3, elastasa, catepsina G, y azurocidina. Estos gránulos participan directamente en la digestión de agentes infecciosos y no infecciosos.

2.1.3.2. Principales antígenos de los ANCA

La identificación y caracterización de las especificidades antigénicas de los ANCA ha sido posible gracias al empleo de muy diversas técnicas que incluyen el ELISA, el western blot, el fraccionamiento subcelular, la purificación de proteínas, y la secuenciación de los aminoácidos (aa) y el DNA⁶³.

Los dos antígenos principales, inicialmente identificados, y que característicamente se relacionan con el grupo de la vasculitis asociadas a los ANCA, son la PR3 y la MPO.

2.1.3.2.1. Proteínasa 3 (PR3)

En el año 1987 Lockwood y cols.⁷⁸ fueron los primeros autores en reconocer un autoantígeno de los c-ANCA, que identificaron como la fosfatasa alcalina. Los resultados del grupo de Lockwood fueron rápidamente rebatidos por Rasmussen⁷⁹, Gross⁸⁰ y Goldschmeding⁸¹ alegando errores metodológicos. Tres años más tarde, los trabajos iniciados por Goldschmeding⁸² y seguidos por Niles⁸³ y Lüdemann⁸⁴ consiguieron identificar el antígeno de los ANCA con patrón de inmunotinción citoplasmático característico de la GW, como la proteínasa 3 (PR3), hallazgo que fue posteriormente confirmado por otros autores⁸⁵⁻⁸⁷.

La PR3 corresponde a la tercera proteína sérica neutra identificada por Kao y cols.⁸⁸, diferente de la elastasa, la catepsina G y la azurocidina, las otras tres proteasas serinas de los gránulos azurófilos de los neutrófilos y monocitos. La PR3 es una glicoproteína con un peso molecular de 29 kD, está constituida por 229 aa, y es idéntica a otras proteínas descritas previamente: la p29b, la mieloblastina, y la AGP7⁴⁵ (*azurophilic granule protein 7*). La PR3 es un enzima multifuncional con actividad proteolítica, antibiótica, y promotora del crecimiento mielode. Su inhibidor fisiológico más importante es la α 1-antitripsina (α 1-AT). Los anticuerpos contra la PR3 (PR3-ANCA) también inhiben su actividad, además de inhibir la inactivación de la molécula por la α 1-AT.

2.1.3.2.2. Mieloperoxidasa (MPO)

En el año 1988 Falk y Jennette¹¹ identificaron a la MPO como el principal autoantígeno de los p-ANCA. Estos autores, además de describir por primera vez los dos patrones de inmunotinción de los ANCA, demostraron una excelente correlación entre el patrón p-ANCA detectado por IFI y los anticuerpos dirigidos contra la MPO detectados por ELISA, estableciendo así que el antígeno de los ANCA con patrón de IFI perinuclear es la MPO. Posteriormente otros autores confirmaron que la MPO es el antígeno más representativo de los p-ANCA^{19,77}.

La MPO es una proteína de 146 kD que se localiza en los gránulos primarios de los neutrófilos y de los monocitos. Es una enzima con capacidad bactericida, que participa en la destrucción oxidativa de los microorganismos mediante la generación de radicales libres de oxígeno⁴⁵.

2.1.3.2.3. Otros antígenos

A diferencia de la PR3 y la MPO, los otros antígenos de los ANCA se detectan raramente. Se han identificado anticuerpos dirigidos contra la elastasa⁸⁹, la lactoferrina^{90,91}, la catepsina G⁹⁰, la lisozima⁹², y la β glucuronidasa⁹³, todos ellos enzimas de los gránulos primarios y secundarios, y la α -enolasa⁹⁴ y la catalasa⁶⁴, localizadas en el citosol de los neutrófilos. Estos anticuerpos producen generalmente un patrón de IFI p-ANCA, y excepcionalmente en algunos casos, c-ANCA. Se distinguen muy infrecuentemente en las vasculitis sistémicas, y se reconocen de forma muy variable en diversas conectivopatías, hepatopatías crónicas de etiología autoinmune, enfermedades

infecciosas, y la EII. Para ninguna de estas especificidades antigénicas se ha establecido una asociación clínica relevante, por lo que de momento no se les puede atribuir ningún valor diagnóstico ni patogénico.

Durante los últimos años se han identificado nuevas especificidades antigénicas que comprenden la BPI, la azurocidina, las defensinas, la h-lamp-2 y las HMG1 y HMG2. Zhao y cols.^{95,96} reportaron que la **BPI** (CAP57: 57-kD *cationic antimicrobial protein*) y la **azurocidina** (CAP37: 37-kD *cationic antimicrobial protein*), dos enzimas de los gránulos azurófilos de los neutrófilos con una marcada actividad antimicrobiana, representan nuevos e importantes antígenos de los c-ANCA y p-ANCA respectivamente, en las vasculitis sistémicas. Estos autores detectaron anticuerpos anti-BPI en 45 de 100 (45%) sueros ANCA-IFI positivos pero PR3-ANCA y MPO-ANCA negativos, y en 44 de 400 (11%) sueros nuevos remitidos para evaluación rutinaria de ANCA⁹⁵. El 87% de las muestras con anticuerpos anti-BPI correspondían a pacientes afectados de diversas vasculitis primarias. Con respecto a la azurocidina, comunicaron la presencia de anticuerpos dirigidos contra esta proteína en 20 de 185 (11%) sueros ANCA-IFI positivos, todos ellos de pacientes con vasculitis sistémicas⁹⁶. La relevancia de los anticuerpos anti-BPI y anti-azurocidina en las vasculitis ha sido recientemente cuestionada por el grupo de Falk y Jennette⁹⁷: la frecuencia de estos anticuerpos fue similar en el suero de pacientes ANCA-IFI positivos y ANCA-IFI negativos, y similar en el suero de pacientes con GN pauci-inmune y otras enfermedades renales glomerulares. Gallin y cols.⁹⁸ identificaron anticuerpos contra las **defensinas**, un grupo de péptidos de los gránulos azurófilos de los neutrófilos con potente actividad antimicrobiana, citotóxica y

quimiotáctica, en 35 pacientes (100%) afectados de una enfermedad parasitaria tropical denominada onchocerciasis crónica hiperreactiva (sowda). Kain y cols.⁹⁹ encontraron anticuerpos contra la **h-lamp-2**, una proteína de las membranas de los gránulos de los PMN, en el 90% (n=16) de una serie de pacientes con GN activa. Finalmente, un grupo de investigadores japoneses ha descrito recientemente la presencia de anticuerpos dirigidos contra la **HMG1** y la **HMG2**, proteínas localizadas en el núcleo y en el citoplasma de la células eucariotas, y que actúan como factores de transcripción, en pacientes con CU^{100,101} y diversas conectivopatías¹⁰².

2.1.4. Enfermedades asociadas

2.1.4.1. Vasculitis

La localización de los vasos afectados, su diferente tamaño, y las distintas lesiones histopatológicas, constituyen las características principales que definen los diversos síndromes vasculíticos y permiten su individualización. Sin embargo, la heterogeneidad de estos procesos como grupo, su solapamiento clinicopatológico, y la ausencia de datos patognomónicos y agentes etiológicos reconocidos para la mayoría de ellos, dificultan notablemente su clasificación. Desde la clasificación inicial de Zeek¹⁰³ que distinguía cinco tipos principales de vasculitis, se han efectuado numerosos intentos posteriores sin que ninguno de ellos resulte plenamente satisfactorio. La clasificación de Fauci¹⁰⁴ basada en criterios clinicopatológicos, y la modificada de Alarcón-Segovia^{105,106} que agrupa a las vasculitis según el tamaño de los vasos afectados, han sido durante muchos años las dos más aceptadas. En el año 1990 el *American College of Rheumatology* (ACR) propuso una

serie de criterios para los principales síndromes vasculíticos basándose en datos recogidos prospectivamente de pacientes con las enfermedades clásicas plenamente establecidas¹⁰⁷. El estudio de la ACR es útil para clasificar a los enfermos con la finalidad de realizar estudios epidemiológicos y clínicos, pero ha sido muy criticado porque no resuelve muchas de las inconsistencias sobre la nomenclatura de estas enfermedades, y no permite diferenciar adecuadamente las diferentes formas clinicopatológicas que afectan a los vasos de pequeño calibre.

El reconocimiento de la estrecha asociación de los ANCA con un subgrupo de vasculitides primarias, que incluye la GW, la PM, la GN pauci-inmune idiopática, el síndrome de Churg-Strauss, y algunas vasculitis inducidas por fármacos, ha permitido la elaboración de una nueva clasificación de las vasculitis. Estos procesos, además de la implicación patogénica de los ANCA, comparten características histopatológicas y clínicas muy similares, que los distinguen como grupo de los otros síndromes vasculíticos. Estas observaciones sustentan el concepto de que estas enfermedades están estrechamente relacionadas, y han sido la base para el desarrollo de esta nueva clasificación derivada de la Conferencia de Consenso Internacional de Chapel Hill de 1992 para la nomenclatura de las vasculitis⁴⁰. La nueva clasificación hace referencia por primera vez al grupo de las "vasculitis asociadas a los ANCA", y es la que mayor aceptación tiene en la actualidad⁴¹⁻⁴⁴.

En el siguiente apartado sobre las enfermedades asociadas a los ANCA se utiliza dicha clasificación, así como los nombres y las definiciones de las vasculitis propuestos por la Conferencia de Consenso de Chapel Hill (tablas 1 y 2).

Tabla 1. Clasificación de las vasculitis*

VASCULITIS DE LOS VASOS DE GRAN TAMAÑO

Arteritis de células gigantes

Arteritis de Takayasu

VASCULITIS DE LOS VASOS DE MEDIANO TAMAÑO

Poliarteritis nodosa (PAN)

Enfermedad de Kawasaki

Vasculitis primaria granulomatosa del sistema nervioso central

VASCULITIS DE LOS VASOS DE PEQUEÑO TAMAÑO

Vasculitis de los vasos de pequeño tamaño asociadas a los ANCA

Granulomatosis de Wegener

Poliangeítis microscópica

Síndrome de Churg-Strauss

Vasculitis asociadas a los ANCA inducidas por fármacos

Vasculitis de los vasos de pequeño tamaño por inmunocomplejos

Púrpura de Schönlein-Henoch

Vasculitis crioglobulinémica

Vasculitis lúpica

Vasculitis reumatoidea

Vasculitis del síndrome de Sjögren

Vasculitis urticarial hipocomplementémica

Enfermedad de Behçet

Síndrome de Goodpasture

Vasculitis de la enfermedad del suero

Vasculitis por inmunocomplejos inducida por fármacos

Vasculitis por inmunocomplejos inducida por infecciones

Vasculitis paraneoplásicas

Vasculitis inducida por procesos neoplásicos linfoproliferativos

Vasculitis inducida por procesos neoplásicos mieloproliferativos

Vasculitis inducida por carcinomas

Vasculitis de la enfermedad inflamatoria intestinal

* Según Falk y Jennette (ref 41)

Tabla 2. Nombres y definiciones de las vasculitis adoptadas por la Conferencia de Consenso de Chapel Hill sobre la nomenclatura de las de las vasculitis sistémicas*

VASCULITIS DE LOS VASOS DE GRAN TAMAÑO

Arteritis (temporal) de células gigantes

arteritis granulomatosa de la aorta y sus ramas mayores, con predilección de las extracraneales de la arteria carótida. *Frecuentemente afecta a la arteria temporal. Ocurre usualmente en pacientes de más de 50 años, y se asocia frecuentemente a la polimialgia reumática.*

Arteritis de Takayasu

inflamación granulomatosa de la aorta y sus ramas principales. *Ocurre usualmente en pacientes menores de 50 años.*

VASCULITIS DE LOS VASOS DE MEDIANO TAMAÑO

Poliarteritis nodosa

inflamación necrosante de las arterias de mediano o pequeño tamaño, sin glomerulonefritis o vasculitis de arteriolas, capilares, o vénulas.

Enfermedad de Kawasaki

arteritis que afecta a las arterias de gran, mediano, y pequeño tamaño, y que se asocia al síndrome ganglionar mucocutáneo. *Las arterias coronarias están frecuentemente afectadas. La aorta y las venas pueden estar afectadas. Ocurre usualmente en niños.*

VASCULITIS DE LOS VASOS DE PEQUEÑO TAMAÑO

Granulomatosis de Wegener

inflamación granulomatosa involucrando el tracto respiratorio y vasculitis necrosante que afecta los vasos de pequeño a mediano tamaño. *La glomerulonefritis necrosante es frecuente.*

Síndrome de Churg-Strauss

inflamación granulomatosa eosinófila involucrando el tracto respiratorio y vasculitis necrosante que afecta los vasos de pequeño a mediano tamaño y asociada con asma y eosinofilia.

Poliangeítis microscópica

vasculitis necrosante sin depósito de inmunocomplejos que afecta a los vasos de pequeño tamaño. *La arteritis necrosante que afecta a las arterias de pequeño y mediano tamaño puede estar presente. La glomerulonefritis necrosante es muy frecuente. La capilaritis alveolar pulmonar ocurre frecuentemente.*

Púrpura de Schönlein-Henoch

vasculitis con depósito de inmunocomplejos de predominio IgA que afecta a los vasos de pequeño tamaño. *Típicamente afecta a la piel, intestino, glomérulo, y se asocia con artralgias o artritis.*

Vasculitis crioglobulinémica esencial

vasculitis con depósitos de crioglobulinas que afecta a los vasos de pequeño tamaño y asociada con crioglobulinas en el suero. *La piel y el glomérulo están frecuentemente afectados.*

Angeítis cutánea leucocitoclástica

angeítis cutánea leucocitoclástica aislada sin vasculitis sistémica ni glomerulonefritis.

* "Vaso de gran tamaño" se refiere a la aorta y sus ramas principales dirigidas hacia las regiones mayores del cuerpo (extremidades, cabeza y cuello). "Vaso de mediano tamaño" se refiere a las arterias viscerales principales (renales, hepáticas, coronarias, mesentéricas). "Vaso de pequeño tamaño" se refiere a las vénulas, capilares, arteriolas, y los radicales distales arteriales intraparenquimatosos que conectan con las arteriolas. Las arterias, especialmente las de pequeño tamaño, se pueden incluir en esta categoría de vasculitis. Las tres categorías afectan a las arterias, pero únicamente las vasculitis de los vasos de pequeño tamaño afectan a los vasos más pequeños que las arterias.

2.1.4.1.1. Vasculitis de los vasos de pequeño tamaño asociadas a los ANCA

Antes de describir la distinta asociación de los ANCA con los diferentes síndromes de este grupo, conviene destacar un aspecto importante. Los estudios realizados a finales de la década de los ochenta y la primera mitad de la de los noventa, mostraron que la GW se asocia característicamente a los c-ANCA/PR3-ANCA, mientras que la PM, la GN pauci-inmune idiopática, y el síndrome de Churg-Strauss lo hacen con los p-ANCA/MPO-ANCA. Los trabajos más recientes han confirmado la tendencia general de estas asociaciones, pero han demostrado que tanto los c-ANCA/PR3-ANCA como los p-ANCA/MPO-ANCA se pueden detectar en cualquiera de las afecciones mencionadas.

2.1.4.1.1.1. Granulomatosis de Wegener (GW), poliangeítis microscópica (PM), GN pauci-inmune idiopática, y síndrome de Churg-Strauss.

La **GW** fue la primera entidad asociada a los ANCA, y ha sido la más estudiada. La prevalencia de los ANCA en la GW varía en función de la extensión y el grado de actividad de la enfermedad^{14-11,15-22,26-37}. En la forma generalizada o clásica, caracterizada por la inflamación granulomatosa del tracto respiratorio superior e inferior, vasculitis sistémica y afectación renal consistente con GN, se detectan c-ANCA/PR3-ANCA en un 85-100% de los pacientes con actividad clínica, y en un 35-40% de los que se encuentran en remisión. En la GW localizada o limitada, definida por la ausencia de afectación renal, se detectan en un 60-65% de los pacientes con enfermedad activa, y en un 30-35% de los que están en remisión. Aunque con menor frecuencia, la GW también se asocia con la

presencia de p-ANCA/MPO-ANCA. Estos anticuerpos se han reportado en un 15-25 % de los pacientes.

La asociación de los ANCA con la **PM**, previamente denominada poliarteritis microscópica (PAN microscópica), está así mismo ampliamente documentada^{10-22,27-32,36,37}. De forma global, estos anticuerpos se detectan en más del 80% de los pacientes. Aproximadamente entre un 45-55% corresponden a p-ANCA/MPO-ANCA, y entre un 35-45% a c-ANCA/PR3-ANCA.

Los ANCA se presentan en más de un 80% de los pacientes afectados con una **GN pauci-inmune idiopática**^{11-32,36,37}, entidad que actualmente se considera una variante limitada al riñón de la PM. De forma similar a la PM, se detectan p-ANCA/MPO-ANCA en un 60-70% de los casos, y c-ANCA/PR3-ANCA en un 30-40%.

Wathen y Harrison¹⁰⁸ fueron los primeros autores en reportar la presencia de ANCA en el **síndrome de Churg-Strauss**. Su asociación con este síndrome ha sido más difícil de establecer debido a la rareza del mismo. Los datos combinados de las pocas series de la literatura muestran una prevalencia de entre un 60-70%^{17,21,25,26,109-111}, si bien en uno de los trabajos fue únicamente del 44%¹¹². La distribución de los subtipos de ANCA es semejante a la observada en las dos entidades anteriores: la mayoría corresponden a p-ANCA/MPO-ANCA, y menos frecuentemente a c-ANCA/PR3-ANCA.

Los numerosos estudios de la literatura han demostrado que los ANCA son marcadores serológicos muy específicos del grupo de las vasculitis asociadas a los ANCA. En varios trabajos la especificidad de los c-ANCA/PR3-ANCA para la GW es

del 95-100%^{4-10,15,17}, y la de los p-ANCA/MPO-ANCA para la GN pauci-inmune idiopática es del 95-100%^{19,24-26}. No obstante, tal como ya se ha discutido en el apartado anterior, los estudios más recientes han evidenciado que ambos subtipos de ANCA se pueden detectar en cualquiera de estas cuatro entidades, y en consecuencia su especificidad para las distintas vasculitis no es tan alta como se presumía. En este sentido, los resultados del último trabajo del *European Commission/Masurement and Testing, EC/BCR, Study Group for ANCA Assay Standardization* son muy demostrativos³⁶. Estos investigadores evaluaron de forma prospectiva el valor diagnóstico de los ANCA detectados mediante IFI y ELISA en un grupo de 169 pacientes con las diferentes vasculitis pauci-inmunes idiopáticas que afectan a los vasos de pequeño calibre. La sensibilidad los c-ANCA/PR3-ANCA fue de un 56-58% para la GW, de un 12-16% para la PM, y del 36% para la GN pauci-inmune idiopática. La sensibilidad de los p-ANCA/MPO-ANCA fue del 16% para la GW, del 49% para la PM, y del 46% para la GN pauci-inmune idiopática. Por el contrario, se detectaron c-ANCA/PR3-ANCA y/o p-ANCA/MPO-ANCA únicamente en 3 de los 184 controles estudiados. La especificidad de los c-ANCA/PR3-ANCA y de los p-ANCA/MPO-ANCA para las vasculitis asociadas a los ANCA, consideradas globalmente como grupo, fue de un 99%. Recientemente Falk y Jennette⁴² han comunicado resultados muy similares.

En definitiva, de los datos expuestos, se puede resumir que los ANCA (c-ANCA/PR3-ANCA y p-ANCA/MPO-ANCA) constituyen verdaderos marcadores serológicos muy sensibles y específicos del grupo de las vasculitis asociadas a los ANCA. La GW se asocia preferentemente a los c-ANCA/PR3-ANCA, mientras que las otras

vasculitis pauci-inmunes que afectan a los vasos de pequeño calibre lo hacen con los p-ANCA/MPO-ANCA. Sin embargo, el subtipo de ANCA no permite clasificar de forma definitiva a los pacientes en una de las distintas categorías de las vasculitis de este grupo. En consecuencia, la mayor utilidad de los ANCA reside en su valor como marcadores serológicos útiles para el diagnóstico de estos procesos como grupo, permitiendo su distinción con otras vasculitis no asociadas a estos anticuerpos y con otras enfermedades sistémicas de difícil diagnóstico diferencial.

Además de su valor diagnóstico, los ANCA pueden ser marcadores serológicos útiles para evaluar la actividad, la monitorización de la respuesta terapéutica, y la evolución clínica.

Las principales evidencias que así lo indican se resumen a continuación. En primer lugar, los ANCA se detectan con mucha mayor frecuencia en los pacientes con actividad clínica que en los que están en remisión^{4-9,13,15,17,30}. Además, el título de los anticuerpos es también superior en los pacientes en brote cuando se comparan con los inactivos. De forma similar a lo que sucede con otros marcadores o índices de actividad serológicos, no existe un valor de corte absoluto, por lo que para la monitorización se deben comparar los títulos de determinaciones seriadas con el título basal para cada paciente. En segundo lugar, cuando se induce la remisión con el tratamiento inmunosupresor, los ANCA frecuentemente se negativizan y/o disminuye su título⁵⁻⁹. Tercero, precediendo o acompañando a las exacerbaciones se suele detectar una positivización o aumento del título de ANCA^{7,8,113-120}. Finalmente, se ha constatado que los pacientes persistentemente

ANCA positivos tienen un riesgo incrementado de reactivación clínica^{117,119}. Sin embargo, es preciso destacar que todas estas observaciones no se cumplen en todos los casos. Así, varios autores han reportado que tras el tratamiento la remisión no siempre se acompaña de la negativización o disminución del título de ANCA, las exacerbaciones no siempre se correlacionan con su positivización, la reaparición de ANCA no se asocia de forma ineludible con una reactivación clínica, y la persistencia de ANCA no implica necesariamente un mayor riesgo de desarrollar una exacerbación¹²¹⁻¹²⁴. De hecho, el análisis combinado de diversos estudios muestra que la positivización o el aumento del título de ANCA tiene una sensibilidad y una especificidad para detectar una exacerbación que varía de forma muy amplia entre las series publicadas (24-100%¹²⁵, y 23-77%¹²⁶ respectivamente). Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, actualmente se asume que la determinación secuencial de ANCA puede contribuir a la monitorización de los pacientes, pero que no debe ser el único criterio utilizado, y se debe combinar con la evaluación de los parámetros clínicos y otros datos de laboratorio.

2.1.4.1.1.2. Vasculitis asociadas a los ANCA inducidas por fármacos

Durante muchos años las vasculitis inducidas por fármacos han sido englobadas dentro del denominado grupo de las "vasculitis por hipersensibilidad" de la clasificación de Fauci y la de la ACR. La lesión vascular por inmunocomplejos era el único mecanismo patogénico conocido. El cuadro clínico característico está dominado por la afectación cutánea acompañada ocasionalmente de manifestaciones sistémicas. Dentro de este grupo también se incluían las formas en las que no se detectaban depósitos de

inmunocomplejos en los vasos afectados, y en las que el cuadro clínico se caracterizaba por un comportamiento más agresivo con el desarrollo de GN y capilaritis alveolar, características actualmente reconocidas como propias del grupo de las vasculitis asociadas a los ANCA. Durante los últimos años se ha demostrado que estas formas pauci-inmunes y clínicamente más agresivas se asocian con la presencia de ANCA¹²⁷⁻¹³⁸. Es por ello que en la nueva clasificación de las vasculitis se distinguen los dos grupos: vasculitis por inmunocomplejos inducidas por fármacos y vasculitis asociadas a los ANCA inducidas por fármacos. Los fármacos más frecuentemente involucrados en el desarrollo de este último grupo han sido la hidralazina¹²⁷⁻¹²⁹ y el propiltiouracilo¹³⁰⁻¹³⁴. Se han descrito algunos casos implicando el carbimazol¹³¹, el metamizol¹³², la D-penicilamina^{128,135-137}, y más recientemente los retinoides¹³⁸. Con respecto al subtipo de ANCA, prácticamente en todos los casos el patrón de IFI es p-ANCA, y las especificidades antigénicas correspondientes más frecuentemente detectadas son la MPO, la lactoferrina, y la elastasa.

2.1.4.1.2. Otras Vasculitis

2.1.4.1.2.1. Otras vasculitis de los vasos de pequeño tamaño

Las otras vasculitis que afectan a los vasos de pequeño tamaño se clasifican acorde con el mecanismo patogénico responsable dentro del grupo de las vasculitis por inmunocomplejos.

La **púrpura de Schönlein-Henoch** no se asocia con la presencia de ANCA^{7,10,16,22,27,30}. La detección de ANCA del isotipo IgA en un 28-79% de los pacientes

reportada por algunos autores^{139,140} no se ha confirmado en otras series¹⁴¹⁻¹⁴³. Además, la presencia de IgA-ANCA se ha atribuido a la utilización de ELISAs que pueden producir resultados falsos positivos debido a la presencia en el suero de los pacientes de moléculas de IgA de composición anormal o de factor reumatoide IgA¹⁴⁴⁻¹⁴⁶.

Los ANCA no se asocian con la **crioglobulinemia mixta esencial**. Se han descrito únicamente dos casos aislados en los que se detectaron c-ANCA¹⁴⁷.

De forma anecdótica se han descrito casos de pacientes con **enfermedad de Behçet** asociada a ANCA¹⁴⁸⁻¹⁵⁰, pero en la única serie extensa que incluyó 45 pacientes no se detectó su presencia en ninguno de los pacientes evaluados¹⁵¹.

2.1.4.1.2.2. Vasculitis de los vasos de mediano tamaño.

La asociación de los ANCA con la **poliarteritis nodosa (PAN)** es un tema discutido y todavía no plenamente resuelto. La variabilidad de los resultados reportados entre las distintas series de la literatura se debe básicamente a un problema nosológico. La clasificación de las vasculitis de Fauci¹⁰⁴ y la de la ACR¹⁰⁷ definen a la PAN como una vasculitis necrosante que afecta a los vasos de mediano y pequeño calibre. De acuerdo con estas clasificaciones, se distinguen dos formas principales: la PAN clásica y la PAN microscópica. El término de PAN microscópica hace referencia a las formas de PAN caracterizadas por hallazgos clínicos e histopatológicos consistentes con la afectación vasculítica de los vasos de pequeño calibre. Por su parte, la Conferencia de Consenso de Chapel Hill⁴⁰ adopta el nombre de poliangeítis microscópica (PM) en lugar del de PAN microscópica, y la define como una vasculitis pauci-inmune que afecta a los vasos de

pequeño tamaño, y ocasionalmente a los de mediano calibre. Así, de acuerdo con las definiciones la Conferencia de Consenso de Chapel Hill, la diferencia entre la PAN y la PM consiste en que la primera afecta únicamente a las arterias respetando los vasos de pequeño calibre, mientras que en la segunda, éstos últimos están afectados de forma constante y preferente. De esta forma, la PAN y la PM se consideran dos entidades diferentes, que pertenecen a distintas categorías de vasculitis. El enfoque adoptado por la Conferencia de Chapel Hill se sustenta en el reconocimiento de que la PM se asocia con los ANCA, y de que sus manifestaciones clínicas (derivadas de la afectación de los vasos de pequeño tamaño, fundamentalmente capilaritis alveolar y GN), pronóstico, respuesta terapéutica, y curso evolutivo, son muy semejantes a los del grupo de las vasculitis asociadas a los ANCA, con las que consecuentemente está relacionada. De hecho, este concepto no es nuevo, y había sido ya apuntado hace años, inicialmente por Zeek¹⁵² y posteriormente por Godman y Churg¹⁵³.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, la prevalencia de los ANCA en la PAN debe analizarse cautelosamente. Así, en numerosas series se reporta la presencia de ANCA en las formas de PAN con afectación renal consistente con GN, es decir la denominada PAN microscópica, o más apropiadamente PM. Por otra parte, muchos de los casos diagnosticados de PAN clásica que se asocian con la presencia de ANCA tienen manifestaciones clínicas consistentes con púrpura, afectación pulmonar en forma de capilaritis alveolar, y afectación glomerular en forma de GN, propias de la afectación de los vasos de pequeño tamaño, y por lo tanto actualmente se reclasificarían como PM.

En definitiva, de acuerdo con la nomenclatura de las vasculitis de la Conferencia de Consenso de Chapel Hill, la PAN es una vasculitis que no se asocia con los ANCA. Los estudios de los grupos de Guillevin y de Gross son los más demostrativos. La prevalencia de ANCA en la PAN es de un 4-16% en las series publicadas por estos autores^{110,111,154}.

La asociación de los ANCA con la **enfermedad de Kawasaki** sugerida en algunos estudios^{155,156} no se ha confirmado en trabajos más recientes¹⁵⁷⁻¹⁵⁹.

2.1.4.1.2.3. Vasculitis de los vasos de gran tamaño

Los ANCA no se asocian a las vasculitis que afectan a los vasos de gran tamaño. En la **arteritis de células gigantes** se ha reportado una prevalencia de un 4-14%¹⁶⁰⁻¹⁶². En la **enfermedad de Takayasu** se han detectado en un 0-10% de los pacientes¹⁶³⁻¹⁶⁶.

2.1.4.2. Otras enfermedades asociadas a los ANCA

Los ANCA se han detectado en enfermedades distintas a las vasculitis, que comprenden diversas conectivopatías, hepatopatías crónicas de etiología autoinmune, enfermedades infecciosas, y la EII⁴⁵⁻⁴⁸.

Antes de pasar a exponer la asociación de los ANCA con estas patologías, es preciso insistir sobre algunos aspectos importantes que ya se han comentado en algún apartado de este texto. En primer lugar, la frecuencia con la que se detectan los ANCA en estos procesos es muy variable entre las distintas series. En segundo lugar, estas enfermedades se asocian raramente con la presencia de PR3-ANCA o de MPO-ANCA; las especificidades antigénicas descritas son muy variadas, frecuentemente desconocidas,

y para ninguna de estas patologías se ha establecido una asociación antigénica relevante. Finalmente, estos anticuerpos no desempeñan ningún papel patogénico en el desarrollo de todas estas patologías. Todas estas observaciones indican que, contrariamente a los síndromes vasculíticos, el significado de los ANCA en este grupo de enfermedades es incierto, y su posible valor diagnóstico discutido.

2.1.4.2.1. Conectivopatías

Las primeras descripciones en la literatura médica sobre anticuerpos reactivos contra los leucocitos en la **artritis reumatoide (AR)** fueron realizadas por Calabresi y cols.^{167,168} unas décadas antes del descubrimiento de los ANCA. Estos autores publicaron en los años 1959 y 1961 dos trabajos describiendo la presencia de anticuerpos con un patrón de fluorescencia nuclear o perinuclear sobre neutrófilos fijados en etanol mediante IFI, en una serie de enfermos afectados de AR, CU, y hepatitis crónica. Sus hallazgos fueron confirmados por otros investigadores, que además demostraron que el suero de los pacientes mostraba reactividad únicamente con los granulocitos¹⁶⁹⁻¹⁷⁷. Estos anticuerpos fueron denominados "anticuerpos antinucleares específicos de los granulocitos (GS-ANA)" o "anticuerpos antinucleares de los granulocitos"¹⁷⁴.

Desde el descubrimiento de los ANCA, se han publicado numerosas series demostrando su asociación con la AR¹⁷⁸⁻¹⁸⁹. Sin embargo, la prevalencia de los ANCA en esta enfermedad es difícil de establecer, debido a que todavía hoy en día no existe acuerdo sobre si los GS-ANA y los ANCA son los mismos anticuerpos. La mayoría de autores consideran que los GS-ANA son equivalentes a los ANCA, debido a que el patrón

de IFI con neutrófilos fijados en etanol es indistinguible, y las especificidades antigénicas idénticas^{178,180,181,184,186,187}. Por el contrario, otros investigadores argumentan que se trata de anticuerpos distintos basándose en que producen un patrón de IFI con neutrófilos fijados en etanol diferente, y en que los GS-ANA van dirigidos contra antígenos nucleares^{177,182,183}.

La prevalencia de los ANCA/GS-ANA en la AR es muy variable entre las distintas series, oscilando entre un 0-75%. No obstante, en la mayoría de los trabajos se cifra entre un 15-50%^{178,180,182-186,188,189}. El patrón de IFI con neutrófilos fijados en etanol más frecuentemente detectado es el p-ANCA, si bien se ha descrito también el patrón c-ANCA. Las especificidades antigénicas son desconocidas en la mayoría de casos, identificándose por lo general en menos del 30% de los pacientes: se han descrito anticuerpos dirigidos contra la lactoferrina, la elastasa, la catepsina G, la lisozima, la MPO, la BPI, y recientemente contra las HMG1 y HMG2. Algunos estudios han observado una correlación entre la presencia de los ANCA y la severidad de la enfermedad^{186,188} o la coexistencia de una vasculitis reumatoidea^{177,178,186}, pero la mayoría de los trabajos no han demostrado relación con ninguno de los parámetros clínicos de la enfermedad¹⁸⁰⁻¹⁸⁵.

Aunque con menor frecuencia, los ANCA también se asocian al **lupus eritematoso sistémico (LES)**^{183,184,189-195}. Su prevalencia en esta conectivopatía, al igual que en la AR, es difícil de establecer, debido en este caso a la presencia de ANA en la mayoría de los pacientes con LES, que como ya se ha comentado repetidamente son difícilmente distinguibles de los p-ANCA mediante la IFI. Aún así, se han publicado

varios trabajos reportando una prevalencia de un 20-40%^{192,193}. El patrón de IFI predominante es el p-ANCA. Las especificidades antigénicas en la mayoría de los casos son desconocidas, si bien en algunos casos se han demostrado anticuerpos contra la lactoferrina, la elastasa, la lisozima, la MPO y las HMG1 y HMG2. Los ANCA se asocian así mismo al lupus inducido por fármacos: Nässberger y cols.¹⁹⁶ detectaron ANCA (anticuerpos contra la MPO y la elastasa) en 6 de 6 pacientes con LES inducido por hidralazina, mientras que Cambridge y cols.¹²⁸ observaron la presencia de p-ANCA/MPO-ANCA en 7 de 7 pacientes con LES medicamentoso (hidralazina y penicilamina).

Finalmente, aunque de forma anecdótica e inconsistente, también se ha descrito la presencia de ANCA en un bajo porcentaje de pacientes afectados de **otras conectivopatías** que incluyen la artritis crónica juvenil¹⁹⁷, la artritis psoriásica¹⁸², la espondilitis anquilopoyética¹⁸², la artritis reactiva¹⁹⁸, la esclerosis sistémica progresiva^{183,189,199}, la polimiositis/dermatopolimiositis¹⁸⁹, y el síndrome de Sjögren¹⁸⁹.

2.1.4.2.2. Hepatopatías crónicas

Los ANCA se han descrito en varias enfermedades hepáticas, especialmente en las que los fenómenos autoinmunes son más relevantes.

La **colangitis esclerosante primaria (CEP)** ha sido la más estudiada. Actualmente, la asociación entre la CEP y los ANCA está plenamente establecida²⁰⁰⁻²⁰⁸. Su prevalencia en los pacientes afectados con CEP y EII coexistente se cifra en un 64-88% en las distintas series, mientras que es algo inferior en los pacientes que únicamente

tienen una CEP sin EII acompañante (26-80%). El patrón de IFI detectado en la mayoría de los casos es el p-ANCA. Se han descrito diversas especificidades antigénicas en algunos pacientes que comprenden la elastasa, la catepsina G, la lactoferrina, la β glucuronidasa, la α -enolasa y la catalasa, pero ninguna de ellas es exclusivamente responsable de la reactividad de los ANCA en esta hepatopatía^{209,210}. La mayoría de los estudios no han objetivado relación entre la presencia de los anticuerpos y la severidad de la enfermedad valorada mediante el estadio histológico o la función hepática^{200-207,211}. No obstante, Bansi y cols.²⁰⁸ reportaron una relación con la afectación extensa del tracto biliar, y Pokorny y cols.²¹² con un peor pronóstico de la enfermedad.

La segunda hepatopatía claramente asociada a los ANCA es la **hepatitis autoinmune (HAI)**^{203-205,207,213-216}. La prevalencia reportada en las distintas series oscila entre un 49-96%. Únicamente Claise y cols.²⁰⁷ han encontrado una prevalencia inferior (30%). Por otra parte, los estudios más recientes han demostrado que los ANCA se asocian concretamente a la HAI tipo 1, y no así a la HAI tipo 2. El patrón de IFI detectado mayoritariamente es p-ANCA, pero también se ha observado en algunos casos el patrón c-ANCA. La especificidad (o especificidades) antigénica no se ha identificado. Recientemente un grupo alemán ha sugerido que puede tratarse de la actina^{217,218}, pero sus hallazgos no han sido validados por otros investigadores.

La **cirrosis biliar primaria (CBP)** ha sido menos estudiada. Algunos autores han comunicado la presencia de ANCA en un 30-45% de los pacientes evaluados^{202,203,205}, pero otros no han observado su presencia en ninguno de los enfermos estudiados^{204,207}.

Finalmente, la asociación con la **hepatitis crónica C** sugerida por algunos investigadores^{213,219}, tampoco se ha corroborado en series más extensas^{204,207,216}.

2.1.4.2.3. Enfermedades infecciosas

Desde el descubrimiento de los ANCA se han publicado varios estudios y observaciones clínicas sugiriendo que algunas enfermedades infecciosas se asocian con la presencia de estos anticuerpos.

Entre las mismas destacan las **infecciones del tracto respiratorio**. Efthimiou y cols.²²⁰ comunicaron la detección de ANCA en 15 de 30 pacientes afectados de fibrosis quística que presentaban infecciones bacterianas del árbol traqueobronquial y en 7 de 10 pacientes con neumonía y/o empiema. Davenport y cols.³² encontraron 27 pacientes ANCA positivos que padecían varias infecciones respiratorias (neumonías, empiemas, bronquiectasias, y tuberculosis). Finalmente, se han reportado otros casos de pacientes con tuberculosis que eran ANCA positivos^{221,222}.

Koderisch y cols.²²³ fueron los primeros en comunicar la presencia de ANCA en 24 de 29 pacientes infectados por el **VIH**, si bien estos autores atribuyeron sus hallazgos a una reacción falsamente positiva de la IFI. Posteriormente otros investigadores han reportado una prevalencia de un 18-42 % en la infección por el VIH²²⁴⁻²²⁶.

Otras infecciones en las que se han detectado la presencia de ANCA con una frecuencia muy variable son la **onchocerciasis crónica hiperreactiva** (100%)⁹⁸, la **amebiasis** (97%)²²⁷, la **malaria** (5-50,5%)²²⁸⁻²³⁰, la **lepra lepromatosa** (26%)²³¹, y la **chromomicosis** (20%)²³².

Finalmente, durante los últimos años se han publicado observaciones clínicas aisladas de pacientes con infecciones fúngicas asociadas a los ANCA²³³⁻²³⁵.

A pesar de que actualmente se reconoce la asociación de las enfermedades infecciosas con los ANCA, el análisis global de los datos de la literatura indica que en la mayoría de éstas no se detectan estos anticuerpos. Así, en los estudios realizados con el objetivo de determinar la sensibilidad y especificidad de los ANCA para las distintas vasculitis, frecuentemente se han incluido como controles pacientes con infecciones, que en la mayoría de las series han sido negativos. Por otra parte, el análisis conjunto de tres trabajos en los que se investigó la presencia de ANCA en enfermos con diversos procesos infecciosos, incluyendo cuadros de shock séptico, muestra que únicamente se detectaron en 3 de 279 (1%) pacientes²³⁶⁻²³⁸.

2.1.4.2.4. Otras enfermedades

Se han publicado trabajos sugiriendo la posible asociación de los ANCA con otras enfermedades. Las más documentadas son la fibrosis quística²³⁹⁻²⁴¹ y el síndrome de Goodpasture²⁴²⁻²⁴⁶. Otras series aisladas han detectado la presencia de ANCA en un bajo porcentaje de pacientes con patologías muy variadas que incluyen el síndrome de Sweet²⁴⁷, la nefropatía IgA^{248,249}, la glomerulonefritis post-estreptocócica^{250,251}, algunas enfermedades neoplásicas^{252,253}, la diabetes mellitus²⁵⁴, las uveitis^{255,256}, la eclampsia²⁵⁷, la enfermedad ateroembólica²⁵⁸, y enfermedades tiroideas autoinmunes²⁵⁹. Finalmente se ha reportado su presencia en individuos expuestos crónicamente a sílice²⁶⁰.

2.1.5. Papel patogénico de los ANCA en las vasculitis sistémicas

La etiología de las vasculitis primarias es desconocida. La teoría etiopatogénica más extensamente aceptada propone que distintos agentes etiológicos, entre los que los más importantes son las infecciones, pero también fármacos y otros agentes ambientales no bien identificados, desencadenan en individuos genéticamente predispuestos una serie de mecanismos inmunopatogénicos que conducen a la inflamación y daño vascular^{38,39}. Entre ellos cabe considerar el depósito de inmunocomplejos, la producción de ANCA, la producción de anticuerpos anticélula endotelial (AECA), y una respuesta inmunológica mediada por linfocitos T frente a antígenos propios o extraños. Estos mecanismos patogénicos no son excluyentes, sino que probablemente actúan de forma combinada con un protagonismo variable según la enfermedad o la fase evolutiva de la misma.

El papel patogénico de los ANCA en las vasculitis fue inicialmente sugerido a partir del reconocimiento de su estrecha asociación con estas entidades, y de los estudios clínicos documentando su correlación con la actividad del proceso vasculítico. Posteriormente, estudios experimentales realizados *in vitro*, y en menor proporción estudios *in vivo* con modelos animales de vasculitis, han proporcionado numerosas evidencias sugiriendo que los ANCA están directamente involucrados en la patogenia de la inflamación y la lesión vascular²⁶¹.

2.1.5.1. Papel fisiopatológico de los ANCA: estudios *in vitro*

2.1.5.1.1. Activación de los neutrófilos mediada por los ANCA

En el año 1990 Falk y Jennette²⁶² demostraron por primera vez que los ANCA son capaces de modular la conducta biológica de los neutrófilos. Estos autores mostraron que la estimulación de los PMN por diferentes citocinas provoca un proceso de translocación de la PR3 y la MPO, que se desplazan desde los gránulos hacia la membrana celular donde se expresan en su superficie. Los ANCA reconocen y se fijan al correspondiente enzima lisosómico expresado en la superficie del PMN, estimulando y amplificando la inicial activación los neutrófilos por las citocinas. Como consecuencia, se induce una desgranulación de los neutrófilos con la consiguiente liberación de radicales libres de oxígeno, citocinas y enzimas proteolíticas lisosomales (incluyendo la PR3 y la MPO) con gran capacidad necrosante. Mediante el mecanismo descrito, la activación de los neutrófilos mediada por los ANCA puede ser directamente citotóxica para las células diana. Así, diversos estudios *in vitro* han demostrado que los ANCA promueven la adhesión de los neutrófilos al endotelio vascular, y los activan induciendo el desprendimiento y lisis de las células endoteliales²⁶³⁻²⁶⁶.

2.1.5.1.2. Activación de los monocitos mediada por los ANCA

Los efectos de los ANCA sobre los monocitos han sido menos estudiados, pero se ha demostrado que también son capaces de activar estas células. Los ANCA estimulan los monocitos para producir radicales libres de oxígeno²⁶⁷, así como para secretar diversas quimiocinas (MCP-1: *monocyte chemoattractant protein-1*²⁶⁸, e interleucina 8²⁶⁹).

2.1.5.1.3. Interacción entre los ANCA y las células endoteliales

Además de la activación de los PMN, los ANCA pueden interactuar indirecta o directamente con las células endoteliales²⁷⁰. Por una parte, la PR3 y la MPO liberadas durante la desgranulación de los PMN pueden unirse a la membrana de las células endoteliales. Por otra parte, se ha sugerido que las propias células endoteliales son capaces de sintetizar PR3, que se transloca a la superficie de la membrana celular cuando estas células se estimulan con citocinas²⁷¹. Por cualquiera de estos dos mecanismos, la expresión de la PR3 y la MPO sobre la superficie de las células endoteliales, posibilita su interacción con los ANCA. Diversos estudios *in vitro* han mostrado que la subsiguiente unión de los anticuerpos puede ser citotóxica para las células endoteliales: 1) se induce la expresión de moléculas de adhesión y se estimula la producción de citocinas por parte de dichas células, amplificando de esta forma el proceso de reclutamiento de células inflamatorias²⁶¹. 2) los ANCA se unen a las células endoteliales previamente incubadas con PR3 y MPO, induciendo la lisis de las mismas a través de la activación del sistema del complemento^{264-266,272}. 3) la adición de PR3-ANCA en presencia de neutrófilos activados induce la lisis de las células endoteliales²⁷³.

A pesar de que los estudios *in vitro* han demostrado que los ANCA interactúan con las células endoteliales, conviene destacar que en las vasculitis asociadas a los ANCA no se detectan depósitos de inmunoglobulinas en los tejidos lesionados. En consecuencia, la relevancia *in vivo* de estos estudios *in vitro* es incierta.

2.1.5.1.4. Reactividad de las células T en las vasculitis asociadas a los ANCA

Estudios inmunopatológicos han demostrado que en las vasculitis asociadas a los ANCA, el infiltrado inflamatorio está compuesto por una proporción variable de PMN, pero fundamentalmente por macrófagos y linfocitos T que expresan marcadores de activación inmunológica y proliferan activamente en las lesiones. Estas observaciones, y la ausencia de depósitos de inmunoglobulinas, sugieren que la respuesta inmune mediada por linfocitos T contribuye de forma notoria a la fisiopatología del daño vascular. A pesar de que los antígenos que activan estos linfocitos T autorreactivos son desconocidos, la PR3 y la MPO son candidatos potenciales. En este sentido, varios estudios *in vitro* han demostrado que los linfocitos T aislados de pacientes con GW y otras vasculitis proliferan en respuesta a extractos de neutrófilos, así como a la estimulación con PR3 y MPO²⁷⁴⁻²⁷⁷.

2.1.5.1.5. Interacción de los ANCA con sus antígenos diana

Los ANCA pueden modificar las propiedades enzimáticas de sus antígenos diana. En concreto, el complejo c-ANCA \equiv PR3-ANCA se hace insensible a la acción neutralizante de la PR3 por su inhibidor fisiológico más importante, la α 1-AT²⁷⁸. Se ha postulado que ello permitiría una prolongación de la vida media de los complejos c-ANCA \equiv PR3-ANCA en los tejidos. La subsiguiente disociación de la PR3 activa desde estos complejos podría contribuir al daño tisular. En consonancia con esta hipótesis, algunos estudios han observado que en la GW, la actividad de la enfermedad se correlaciona mejor con la capacidad inhibitoria de los ANCA sobre la inactivación de la PR3 por la α 1-AT, que con el título de los c-ANCA/PR3-ANCA^{279,280}. Por otra parte, los

pacientes portadores de variantes alélicas del gen de la α 1-AT responsables de concentraciones plasmáticas disminuidas de esta proteína, presentan formas más graves de vasculitis y tienen una mayor mortalidad^{281,282}.

2.1.5.2. Papel fisiopatológico de los ANCA *in vivo*

Los estudios *in vitro* han aportado numerosas evidencias que sugieren fuertemente la participación activa de los ANCA en la patogenia de las vasculitis, pero que lógicamente no prueban *in vivo*, la operatividad de los fenómenos descritos. Con este propósito, durante los últimos años se han desarrollado varios modelos experimentales de vasculitis en animales²⁸³. A pesar de que ninguno de los modelos descritos ha conseguido reproducir de forma fidedigna el patrón de las vasculitis asociadas a los ANCA en los humanos, los resultados de estos estudios también sugieren, aunque no prueban de forma definitiva, que los ANCA participan en la patogenia de las vasculitis. Probablemente, la observación más importante derivada de los modelos experimentales *in vivo* consiste en que los ANCA, por sí mismos, no son patogénicos. Así, se precisan de factores adicionales que actuarían como agentes etiológicos desencadenantes, induciendo una inicial estimulación y activación de los neutrófilos, monocitos y endotelio vascular. Una vez iniciado este proceso, los ANCA actuarían como elemento amplificador y facilitador de los fenómenos biológicos inflamatorios. En este sentido, los modelos *in vivo* reflejarían la situación en los humanos, en los que como ya se ha comentado, se presume que diversos agentes etiológicos desencadenan la cascada de fenómenos inmunológicos responsables de producir lesión vascular.

2.2. ANCA EN LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

A pesar de que la etiología de la EII es desconocida, durante los últimos años se han conseguido importantes avances en el conocimiento de los mecanismos fisiopatogénicos involucrados. Actualmente se considera que la EII se desarrolla como consecuencia de la interacción entre factores genéticos predisponentes, factores desencadenantes exógenos y factores moduladores endógenos²⁸⁴ (figura 3). El resultado de estas interacciones es la aparición de un proceso inflamatorio crónico de evolución recurrente-remitente, en el cual las lesiones de los tejidos implicados están mediadas por el sistema inmunitario. La cronicidad del proceso inflamatorio está determinada por un estado de hiperactividad incontrolada del sistema inmunitario intestinal, que puede ser consecuencia de una respuesta apropiada a un estímulo antigénico intraluminal mantenido, o bien de una respuesta anómala y prolongada debida a una alteración en la regulación de la inmunidad.

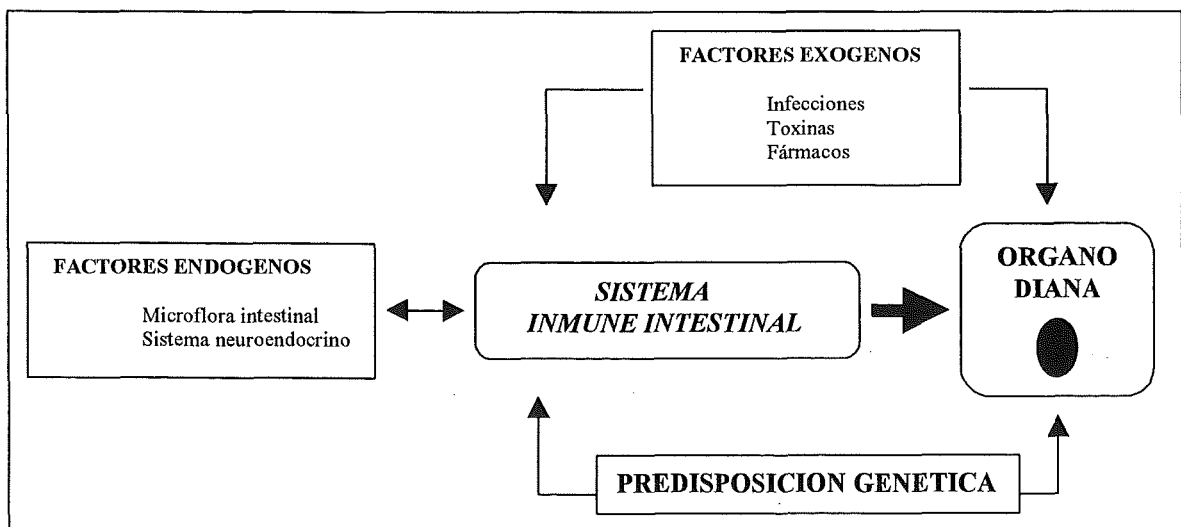


Figura 3. Etiopatogenia de la enfermedad inflamatoria intestinal

Los avances experimentados en los aspectos básicos de la inmunología durante los últimos años han permitido una mejor caracterización de las alteraciones inmunológicas que se producen en la EII. Por una parte, se ha demostrado que la inmunidad celular mediada por linfocitos T desempeña un papel determinante en la patogenia de la enfermedad. Por otra parte, si bien sus implicaciones patogénicas son discutidas, también se han identificado alteraciones de la inmunidad humoral. Entre estas últimas, es bien conocida la presencia de diversos autoanticuerpos en los pacientes afectados²⁸⁴. Se han descrito anticuerpos dirigidos contra las células epiteliales del colon, anticuerpos linfocitotóxicos, anticuerpos contra las células endoteliales vasculares, y anticuerpos contra el páncreas. El significado de estos anticuerpos en la EII es incierto, pero no parecen tener un potencial patogénico, sino que más bien representan un epifenómeno secundario a la inflamación intestinal, o traducen una alteración de la inmunorregulación de base de la enfermedad.

En el año 1990, dos grupos independientes describieron por primera vez la presencia de ANCA en la EII^{49,50}. Los autores de estos estudios destacaron dos aspectos importantes de sus investigaciones. En primer lugar, existían características diferenciales entre los ANCA asociados a la EII y los descritos en las vasculitis. En segundo lugar, los anticuerpos se asociaban preferentemente a la CU, y en mucha menor proporción a la EC. Los autores apuntaban en sus conclusiones que los ANCA podían representar importantes marcadores serológicos de la CU, y que su determinación podía ser de utilidad para diferenciar esta entidad de la EC. Estos dos trabajos suscitaron un notable

interés, que impulsó en los años siguientes una dinámica y productiva investigación sobre los ANCA en la EII. Así, durante los últimos años, se han publicado numerosos estudios que han confirmado la asociación entre los ANCA y la EII^{200,202-204,207-209,285-318}. Sin embargo, contrariamente a los síndromes vasculíticos, su significado en la EII no ha sido esclarecido y sigue siendo motivo de controversia.

2.2.1. Técnicas de detección

La IFI y el ELISA, al igual que en las vasculitis sistémicas, son las dos técnicas más empleadas para la detección de los ANCA en la EII. Un grupo de investigadores ingleses ha descrito una técnica inmunohistoquímica que ha utilizado en diversos estudios^{202,208,311}, pero que no ha sido empleada por otros autores.

2.2.1.1. Inmunofluorescencia indirecta

La IFI con neutrófilos fijados en etanol que se aplica según la metodología estandarizada por Wiik, es el método más utilizado y que se considera de referencia. De hecho, todos los laboratorios usan esta técnica, ya sea como único método de detección, o bien de forma complementaria al ELISA.

El patrón de inmunofluorescencia que se asocia a la EII, es fundamentalmente del tipo perinuclear. Se trata de un patrón p-ANCA distinto al que se observa en las vasculitis, caracterizado por una distribución de la fluorescencia alrededor del núcleo delimitando perfectamente los segmentos nucleares sin afectar su interior, y que algunos autores refieren como a-ANCA (atypical ANCA) o x-ANCA (figuras 4 y 5, página 52).

Este patrón perinuclear es el que se detecta de forma predominante tanto en la CU como en la EC, e incluso numerosos autores han encontrado que se trata del único patrón de inmunofluorescencia asociado a la EII (tablas 3 y 4, páginas 60-63). No obstante, también se ha descrito el patrón c-ANCA en una proporción no despreciable de casos, sobre todo en la EC, y menos frecuentemente en la CU (figuras 6 y 7, página 53; tablas 3 y 4, páginas 60-63).

La IFI con neutrófilos fijados en formalina también se ha utilizado en algunos trabajos, pero los resultados obtenidos con este fijador en la EII son contradictorios. Saxon y cols.⁴⁹ así como Yang⁶⁷, señalan que el patrón p-ANCA no se modifica cuando se emplea esta técnica, mientras que Cambridge y cols.²⁸⁶ indican que la inmunotinción desaparece por completo. Otros investigadores encuentran que de forma similar a lo que ocurre con los ANCA asociados a las vasculitis, los p-ANCA adoptan un patrón de inmunotinción citoplasmático cuando los neutrófilos se fijan con formaldehído^{204,287,292,300}.

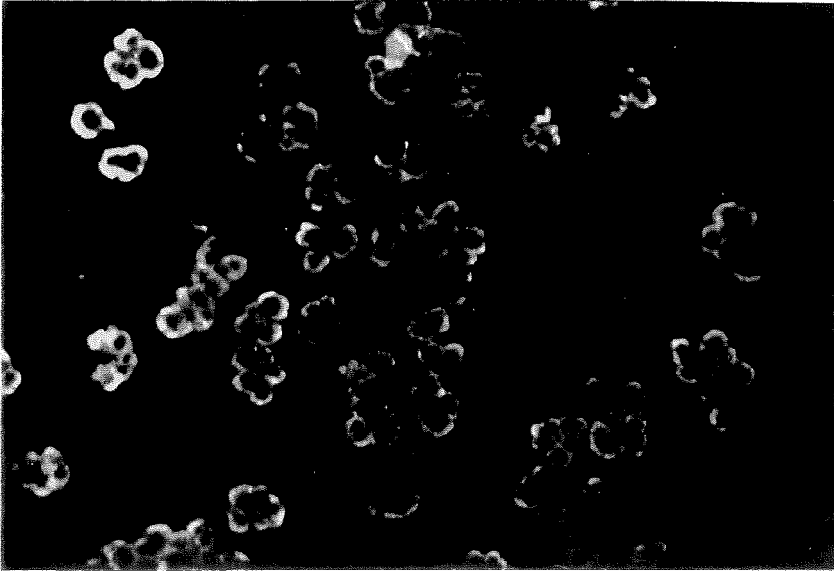


Figura 4. Patrón p-ANCA a 40 aumentos de un paciente con CU.

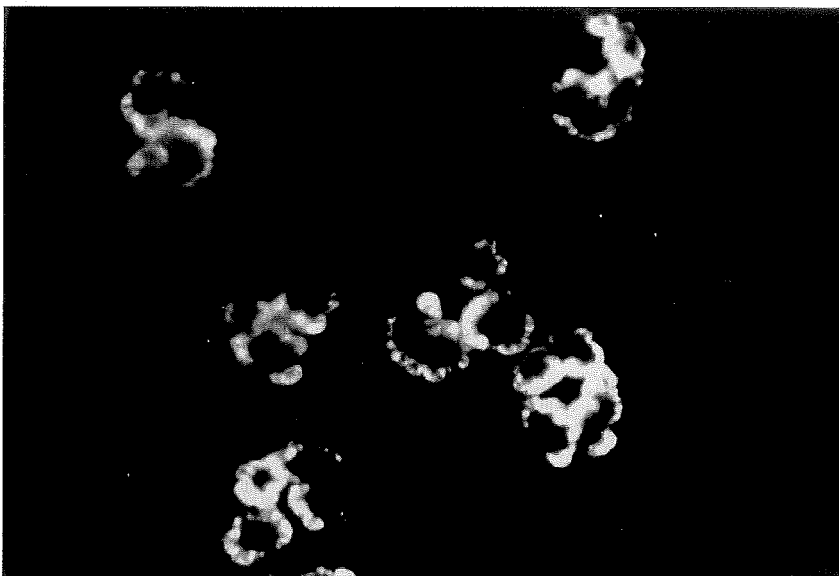


Figura 5. Patrón p-ANCA a 100 aumentos de un paciente con CU.

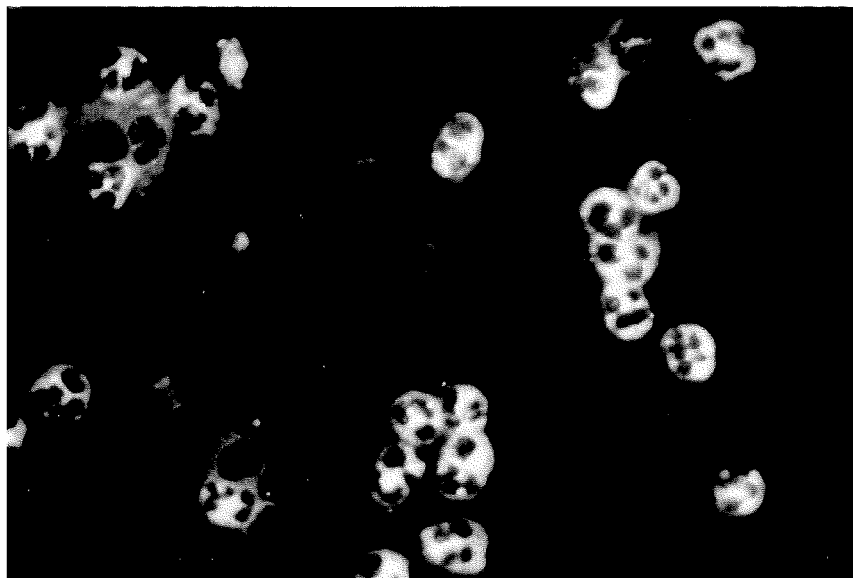


Figura 6. Patrón c-ANCA a 40 aumentos de un paciente con CU.



Figura 7. Patrón c-ANCA a 100 aumentos de un paciente con CU.

2.2.1.2. ELISA

El grupo de investigadores del *Cedars Sinai Medical Center* de Los Angeles fue el primero en diseñar un ELISA para la detección de los ANCA en la EII⁴⁹. Teniendo en cuenta que el antígeno frente al que reaccionan los ANCA en la EII no se conoce, estos investigadores utilizan neutrófilos enteros como sustrato antigénico^{49,285,309,314}. De forma rutinaria emplean el ELISA como método de cribaje, y posteriormente aplican la IFI para definir los patrones de inmunotinción. Para estos autores el ELISA tiene la ventaja de ser más sensible e igual de específico que la IFI. Sin embargo, existen discrepancias en cuanto a la sensibilidad y especificidad de las dos técnicas. Así, Oudkerk Pool y cols.²⁹⁰ objetivan que el ELISA es mucho menos sensible, pero igual de específico que la IFI.

El ELISA también se ha aplicado utilizando como antígenos las proteínas purificadas de los gránulos de los neutrófilos para el estudio de las especificidades antigénicas de los ANCA en la EII. De esta forma, tal como se discute en el siguiente apartado, se ha podido comprobar que ninguna de ellas es el antígeno responsable frente al que reaccionan los ANCA en la EII.

2.2.2. Especificidades antigénicas

El antígeno (o antígenos) de los ANCA asociado a la EII es desconocido. Ciertamente, su reconocimiento aparece como requisito indispensable para desarrollar técnicas diagnósticas más específicas, pero sobre todo, para elucidar de forma más precisa el significado de estos anticuerpos en la EII. La identificación del antígeno de los ANCA en la

EII ha sido durante todos estos años, y es todavía hoy en día, un objetivo prioritario que ha centrado numerosos esfuerzos.

Los primeros estudios demostraron que los ANCA en la EII no van dirigidos contra ninguno de los antígenos asociados a las vasculitis, la MPO y la PR3^{49,50,286-291}. Posteriormente se han examinado numerosos componentes del citoplasma de los PMN, principalmente otras proteínas de los gránulos y del citosol de estas células. Nässberger y cols.⁹³ y Schumacher y cols.³⁰⁷ detectaron anticuerpos dirigidos contra la **β glucuronidasa** en un 57% y 42% de pacientes con CU respectivamente. Halbwachs-Mecarelli y cols.³¹⁹ propusieron la **catepsina G** como antígeno de los ANCA en la EII. En algunos estudios se han encontrado anticuerpos contra esta proteína en un 5-46% de los pacientes^{287,305,306,313,318,320,321}. Peen y cols.²⁰⁹ hallaron anticuerpos contra la **lactoferrina** en el 50% sus pacientes con CU, mientras que otros autores han reportado su presencia en un 5-41% de los enfermos analizados^{292,295,300,305,306,313,318}. También se han detectado anticuerpos contra la **elastasa**^{287,305,306,318,320} (7-46%) y la **lisozima**^{92,305,320} (10-53%). Con respecto a las especificidades antigénicas más novedosas de los ANCA, Stoffel y cols.³²² han reportado anticuerpos contra la **BPI** en el 37% de CU y en el 23% de EC, mientras que Walmsley y cols.³²³ hallaron anticuerpos anti-BPI en el 29% y 14% de pacientes con CU y EC respectivamente. Sobajima y cols.^{100,101} comunicaron la presencia de anticuerpos contra la **HMG1** y **HMG2**, proteínas del citosol y núcleo de las células eucariotas, en un 32% y 33% de pacientes con CU. Por último, Roozendaal y cols.³²⁴ han identificado dos nuevos posibles antígenos localizados en el citosol de los PMN: detectaron anticuerpos frente a la **catalasa**

en el 38% de pacientes con CU y en el 26% de pacientes con EC, y frente a la α -enolasa en el 10% de CU y en el 18% de EC.

En resumen, se ha comunicado la presencia de anticuerpos frente a diferentes constituyentes de los gránulos y del citosol de los PMN. Sin embargo, es importante destacar, que para ninguno de los candidatos propuestos en algunos trabajos se han conseguido reproducir los resultados en la mayoría de los restantes estudios. Además, frecuentemente se encuentran múltiples especificidades antigénicas de forma simultánea^{300,305-307,313,318,320}, y lo que es más importante, en una gran proporción de los pacientes no se detecta ninguna^{300,305-307,313,318,320,325}. Consecuentemente, estas observaciones indican que ninguno de los componentes celulares citoplasmáticos estudiados hasta la fecha se presenta como el antígeno responsable de los ANCA en la EII.

Una alternativa sumamente atractiva es que el antígeno no se encuentre ubicado en el citoplasma de los PMN, sino que esté situado en otra localización celular, como por ejemplo en el núcleo. Esta hipótesis fue inicialmente sugerida por el grupo del *Cedars Sinai Medical Center* de Los Angeles, ante la imposibilidad de identificar el antígeno entre los diversos elementos del citoplasma, y observar que el patrón de inmunofluorescencia perinuclear en la EII no se modifica cuando los neutrófilos se fijan con formaldehído. Mediante el examen de sueros con neutrófilos fijados en etanol y paraformaldehído con microscopía confocal y microscopía inmunoelectrónica, estos autores han señalado que el antígeno de los p-ANCA asociados a la CU (así como a la CEP y a la HCA) se encuentra ubicado en la parte interna de la membrana nuclear,

íntimamente ligado a la heterocromatina^{326,327}. Recientemente, otros autores han confirmado estos hallazgos aplicando básicamente la misma estrategia metodológica³²⁸⁻³³⁰. Lógicamente, a partir de estos hallazgos, la búsqueda del antígeno se ha orientado hacia el dominio nuclear. El antígeno sigue siendo todavía desconocido, pero se ha demostrado que no se trata del DNA³²⁷. Eggena y cols.^{331,332} mediante la generación y el empleo de un panel de anticuerpos monoclonales han señalado que la histona H1 es el antígeno neutrofílico detectado por los p-ANCA en la CU, pero este hallazgo ha sido cuestionado³²⁸.

2.2.3. Clases y subclases de ANCA en la EII

De forma similar a muchos otros anticuerpos séricos, los ANCA en la EII son básicamente inmunoglobulinas de clase IgG. Sin embargo, también se detectan ANCA de clase IgA en el suero de entre un 20-50% de los pacientes³³³⁻³³⁵, incluso en los enfermos previamente colectomizados³³⁶. Con respecto a las subclases de IgG, existe un claro predominio del isotipo IgG1, aunque algunos pacientes secretan también inmunoglobulinas IgG3^{333,334}.

2.2.4. Prevalencia de los ANCA en la enfermedad inflamatoria intestinal

La prevalencia de los ANCA en la EII es muy variable entre las distintas series de la literatura, pero todos los estudios coinciden en que es notablemente mayor en la CU que en la EC (tablas 3 y 4). A pesar de la amplia variabilidad reportada, en la mayoría de los trabajos se detectan en un 50-80% de pacientes con CU y únicamente en un 5-25% de

pacientes con EC. Su prevalencia en la EII pediátrica, tanto en la CU como en la EC, es equiparable a la reportada en los adultos³³⁷⁻³⁴¹. Los ANCA no se detectan en otras patologías del tracto gastrointestinal, por lo que estos anticuerpos tienen una alta especificidad para la CU.

Las causas de tan notables diferencias sobre la prevalencia de los ANCA en la EII se han atribuido principalmente a la utilización de distintas técnicas para su detección, y a diferencias reales de prevalencia en las distintas poblaciones estudiadas (entre las que cabe considerar diferencias raciales y/o étnicas). En este sentido, estudios en los que se ha analizado simultáneamente sueros de distintas poblaciones en laboratorios independientes han confirmado diferencias regionales significativas²⁹⁶.

Otro aspecto de considerable interés y que se analiza de forma sistemática en todos los estudios de asociación entre los ANCA y la EII, es si la seropositividad de los anticuerpos se relaciona con las características demográficas y clínicas de la enfermedad. En la CU, la mayoría de los trabajos publicados no han encontrado relación entre la presencia o título de los ANCA y el curso clínico, extensión, actividad de la enfermedad, manifestaciones extraintestinales, o tratamiento farmacológico recibido^{49,286,288-292,296,297,299,301,302,304-313,318}. Sin embargo, algunos autores sí han detectado relación con alguna de las variables analizadas, en concreto entre la positividad y/o título de los ANCA y la actividad de la enfermedad^{50,203,287,293,295,303}.

Con respecto a la relación existente entre la presencia de ANCA y el tratamiento quirúrgico de la CU, la mayoría de estudios han demostrado que no existen diferencias de

prevalencia significativas entre los pacientes no intervenidos y los que se les ha practicado una colectomía total³⁴²⁻³⁵¹. Además, en numerosos casos, los ANCA se detectan incluso tras muchos años de la colectomía. Estos hallazgos sugieren que la resección colónica no modifica el status ANCA. Contrastando con la mayoría de los estudios, Esteve y cols.³⁵² han objetivado una menor frecuencia de los anticuerpos en los pacientes operados frente a los no intervenidos, y algunos autores han descrito, aunque de forma anecdótica, su negativización en varios pacientes tras la colectomía. Aitola y cols.³⁵³, señalan además, en el único estudio prospectivo que valora el status ANCA antes y después de la cirugía, una significativa disminución del título de los anticuerpos tras el procedimiento quirúrgico.

Con respecto a la EC, considerando la baja prevalencia de los ANCA en esta entidad, la mayoría de las series no son lo suficientemente extensas para poder analizar hipotéticas asociaciones con los parámetros clínicos. Únicamente, hay que destacar una mayor prevalencia en los pacientes con EC que tienen afectado el colon con respecto a los que tienen una afectación exclusiva del intestino delgado^{49,291,299,306,307}, si bien esta circunstancia no se percibe en numerosos trabajos.

Tabla 3. Prevalencia de los ANCA en la colitis ulcerosa.

AUTOR (Ref.)	MÉTODO DE DETECCIÓN	PREVALENCIA ANCA	Patrón ANCA	
			p-ANCA	c-ANCA
Saxon (49)	ELISA IFI	84% 68%	100%	
Rump (50)	IFI	59%	100%	
Duerr (285)	ELISA IFI	85% 60%	70%	30%
Duerr (200)	ELISA IFI	79% 79%	87%	13%
Seibold (203)	IFI	83%	100%	
Cambridge (286)	IFI	54%	55,5%	37%
Romas (287)	ELISA IFI	73% 40%	100%	
Colombel (288)	IFI	48%	95%	5%
Lo (202)	IAP	33%		
Dalekos (289)	IFI	30%	96%	4%
Oudkerk Pool (290)	ELISA IFI	39% 79%	100%	
Deusch (291)	IFI	68%	100%	
Mulder (292)	IFI	45%	100%	
Rump (293)	IFI	58%	100%	
Hardarson (204)	IFI	76%	100%	
Sung (294)	IFI	73,5%	43%	57%
Broekroelofs (295)	IFI	51%	97%	3%
Vecchi (298)	IFI	45,1%	100%	
Patel (297)	IFI	76%	100%	
Muñoz (302)	IFI	60,8%	82%	18%

Tabla 3. Prevalencia de los ANCA en la colitis ulcerosa.

AUTOR (Ref.)	MÉTODO DE DETECCIÓN	PREVALENCIA ANCA	Patrón ANCA	
			p-ANCA	c-ANCA
Tural (303)	IFI	73%	84,2%	15,7%
Lamproye (299)	IFI	64%	94%	6%
Sung (301)	IFI	73%	43%	57%
Mulder (300)	IFI	51%	100%	
Castellino (304)	IFI	39,8%	88%	12%
Kossa (305)	IFI	41%	80%	20%
Hertervig (306)	IFI	50,3%	86%	13%
Schumacher (307)	IFI	71%		
Oudkerk Pool (308)	IFI	61%	100%	
Kim (309)	ELISA	83,3%		
	IFI	83,3%	85%	15%
Eliakim (310)	IFI	68,5%	100%	
Claise (207)	IFI	37%	95%	5%
Bansi (208)	IAP	42,4%	100%	
Andreani (312)	IFI	71,4%		
Sugi (313)	IFI	76,9%	82,5%	17,5%
Bansi (311)	IAP	45%	100%	
Haabeeb (315)	IFI	3%	100%	
Freeman (316)	IFI	66,3%		
García Herola (318)	IFI	46%	69,4%	30,5%

Tabla 4. Prevalencia de los ANCA en la enfermedad de Crohn.

AUTOR (Ref.)	MÉTODO DE DETECCIÓN	PREVALENCIA ANCA	Patrón ANCA	
			p-ANCA	c-ANCA
Saxon (49)	ELISA	20%		
	IFI	20%	100%	
Rump (50)	IFI	10%	100%	
Duerr (285)	ELISA	28%		
	IFI	6%		
Seibold (203)	IFI	25%	100%	
Cambridge (286)	IFI	10%	40%	40%
Romas (287)	ELISA	27%		
	IFI	8%	100%	
Colombel (288)	IFI	7%	100%	
Lo (202)	IAP	0%		
Oudkerk Pool (290)	ELISA	2%		
	IFI	13%	100%	
Deusch (291)	IFI	21%	100%	
Mulder (292)	IFI	34%	100%	
Rump (293)	IFI	2%	100%	
Hardarson (204)	IFI	8%	100%	
Broekroelofs (295)	IFI	40%	100%	
Vecchi (298)	IFI	4%	100%	
Patel (292)	IFI	43%	100%	
Muñoz (302)	IFI	6,6%	100%	
Tural (303)	IFI	16,2%	66,6%	33,3%
Lamproye (299)	IFI	17%	31%	69%
Sung (301)	IFI	25%	100%	
Mulder (300)	IFI	40%	100%	

Tabla 4. Prevalencia de los ANCA en la enfermedad de Crohn.

AUTOR (Ref.)	MÉTODO DE DETECCIÓN	PREVALENCIA ANCA	Patrón ANCA	
			p-ANCA	c-ANCA
Castellino (304)	IFI	11,9%	36%	64%
Kossa (305)	IFI	10%	100%	
Hertervig (306)	IFI	24,2%	65%	29%
Schumacher (307)	IFI	46%		
Oudkerk Pool (308)	IFI	21%	100%	
Eliakim (310)	IFI	6%	100%	
Claise (207)	IFI	15%	100%	
Bansi (311)	IAP	5%	100%	
Andreani (312)	IFI	33,3%		
Sugi (313)	IFI	74,4%	97%	3%
Vasiliauskas (314)	ELISA	55%		
	IFI	55%	47%	53%
Freeman (316)	IFI	11,9%		
García Herola (318)	IFI	18%	22%	78%

2.2.5. Papel patogénico de los ANCA en la EII

Contrariamente a los procesos vasculíticos, la evidencia actual indica que los ANCA no participan en la patogenia de la EII. Los datos clínicos y experimentales que así lo prueban se resumen a continuación.

Desde el punto de vista clínico, diversas observaciones están en contra del papel patogénico de los ANCA en la EII. Primero, estos anticuerpos no son necesarios para desarrollar la enfermedad, desde el momento en que una proporción significativa de pacientes son ANCA negativos. Segundo, la presencia o título de ANCA no se correlaciona con la actividad, extensión, ni curso clínico de la enfermedad. Tercero, los ANCA se detectan en los pacientes operados, incluso tras muchos años de la colectomía. Por último y como se comenta más adelante, los anticuerpos se pueden detectar en ausencia de enfermedad como es el caso de los familiares sanos de los pacientes.

Con respecto a los estudios experimentales, los datos disponibles son muy limitados. En el único estudio realizado *in vitro*, Gionchetti y cols.³⁵⁴ han evidenciado que los p-ANCA asociados a la CU no son capaces de activar los neutrófilos para producir radicales libres de oxígeno. De los numerosos modelos experimentales de EII, únicamente dos modelos generados mediante manipulación genética, en concreto la colitis del ratón TCR- $\alpha^{-/-}$ (deficiente en receptor α de las células T)³⁵⁵ y la enterocolitis del ratón IL10 $-/-$ (con delección del gen de la interleucina 10)³⁵⁶ desarrollan ANCA. Sin embargo, aunque estos animales producen ANCA, no se ha demostrado que los anticuerpos tengan ningún papel patógeno en ninguno de estos dos modelos. En cualquier caso, cabe señalar que estos y otros modelos experimentales pueden contribuir a mejorar los conocimientos sobre el papel de los

ANCA en la EII. En este sentido, los dos modelos previamente descritos han aportado datos muy interesantes: 1) en la mucosa colónica inflamada de los ratones TCR- $\alpha^{-/-}$ existen linfocitos B que producen p-ANCA³⁵⁵, observación que por otra parte Targan y cols.³⁵⁷ ya habían señalado previamente en pacientes con CU. 2) en el modelo de enterocolitis del ratón IL10 $-/-$, los p-ANCA se generan como consecuencia de una reactividad cruzada frente a antígenos de la flora bacteriana intestinal³⁵⁶.

2.2.6. Significado y utilidad de los ANCA en la EII

A pesar de la prolífica investigación sobre los ANCA en la EII, su significado sigue siendo desconocido. Actualmente, las dos hipótesis más plausibles proponen que, o bien estos anticuerpos traducen simplemente un epifenómeno secundario a la inflamación intestinal, o bien representan marcadores de disregulación inmunológica de un subgrupo de pacientes con CU³⁵⁸. Esta última presunción es defendida por numerosos autores, y se fundamenta en las siguientes observaciones: 1) los anticuerpos se asocian estrechamente a la CU y no se detectan en otros procesos inflamatorios agudos o crónicos que afectan al tracto gastrointestinal. 2) no existe una relación claramente establecida entre la presencia y/o título de los anticuerpos y la actividad o extensión de la enfermedad. 3) los ANCA se detectan en los pacientes colectomizados. 4) los anticuerpos pueden ser marcadores genéticos en la EII, tal como se expone más adelante.

2.2.6.1. Papel de los ANCA como marcadores serológicos clínicos

2.2.6.1.1. Marcadores diagnósticos de la colitis ulcerosa

La alta prevalencia de los ANCA en la CU, y su especificidad para esta entidad con respecto a otras patologías gastrointestinales, indican que estos anticuerpos representan marcadores serológicos de la enfermedad. En consecuencia, se ha sugerido su valor potencial como marcadores serológicos útiles para el diagnóstico de la CU, además de posibilitar el diagnóstico diferencial con otras colítides, en concreto con la EC. Numerosos estudios han evidenciado que los ANCA tienen una sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la CU que oscilan entre un 50-80% y 80-95% respectivamente^{49,204,285,287,288,290,296,298,302,303,309,311,318}. Sin embargo, teniendo en cuenta las diferencias de prevalencia reportadas en las series publicadas, que se atribuyen en parte a diferencias de prevalencia entre las distintas poblaciones estudiadas, para establecer la utilidad clínica de la determinación de los ANCA para el diagnóstico de la CU en una población concreta, es preciso conocer su prevalencia en una muestra homogénea de pacientes con EII del área geográfica de estudio.

2.2.6.1.2. Marcadores de bursitis (pouchitis)

La asociación de los ANCA con la bursitis, inflamación del reservorio ileal que ocurre en un 20-60% de los pacientes operados a los que se les ha realizado una proctocolectomía restauradora mediante un reservorio ileoanal, ha sido motivo de controversia. Basándose en los resultados de tres estudios que indicaban una prevalencia muy alta de los anticuerpos (90-100%) en pacientes con bursitis, se sugirió que podrían

tener un valor predictivo del desarrollo de esta complicación quirúrgica³⁴³⁻³⁴⁵. Sin embargo, estudios posteriores no han detectado diferencias de prevalencia significativas entre los pacientes portadores de un reservorio que tienen o no una bursitis^{346,348,350-352}. Los datos de la literatura sobre esta cuestión son confusos, debido a que la inflamación del reservorio puede adoptar diferentes formas evolutivas que no se definen apropiadamente en algunos de los trabajos. La bursitis aguda, caracterizada por un único episodio inflamatorio o brotes intermitentes que responden al tratamiento, es la forma más frecuente. La bursitis crónica es infrecuente (5% de los pacientes portadores de un reservorio), y se caracteriza por la inflamación persistente del reservorio que precisa de tratamiento inmunosupresor. El análisis detallado de las series publicadas muestra que la frecuencia de los ANCA no se encuentra incrementada en los pacientes con bursitis aguda. En cuanto a la forma crónica, Aisenberg y cols.³⁴⁶ no han encontrado diferencias con respecto a los pacientes portadores de un reservorio que no tienen esta complicación, mientras que Sandborn y cols.³⁴⁵ sí han observado una mayor prevalencia en los pacientes afectados. En otras series también se constata una mayor frecuencia en los pacientes con bursitis crónica, pero debido al escaso número de casos estudiados las diferencias no son significativas³⁵¹.

2.2.6.1.3. Marcadores de la EC con fenotipo clínico "*UC-like*"

Vasiliauskas y cols.³¹⁴ publicaron un estudio sugiriendo que en la EC, los p-ANCA definen a un subgrupo de pacientes que se caracterizan por tener un fenotipo clínico similar al de la CU (*UC-like clinical phenotype*) consistente con la presencia de una afectación del colon izquierdo documentada endoscópica y/o histopatológicamente, y sintomatología clínica

de colitis izquierda. En este estudio, el 100% de los pacientes con EC que eran p-ANCA positivos (EC-pANCA+) tenían un fenotipo clínico "UC-like", frente a un 45% de los pacientes c-ANCA positivos (EC-cANCA+) y un 39% de los ANCA negativos (EC-ANCA-). En base a estos resultados los autores proponían que el status ANCA puede definir distintos subgrupos fenotípicos de la EC. Estos interesantes hallazgos han sido reproducidos por algunos investigadores³⁵⁹, pero no así por otros autores^{360,361}.

2.2.6.2. Papel de los ANCA como marcadores genéticos

2.2.6.2.1. Marcadores subclínicos de susceptibilidad genética a la EII

Los marcadores subclínicos son parámetros que permiten detectar individuos con un genotipo anormal en ausencia de expresión fenotípica de una enfermedad. Son útiles para el estudio de enfermedades de base genética porque en muchos trastornos hereditarios no todos los individuos con el genotipo mutado manifiestan la enfermedad (penetrancia reducida), la variabilidad fenotípica puede ser tan amplia que las características clínicas sean demasiado sutiles para ser aparentes (expresividad variable), o puede existir un retraso en la edad de debut de la enfermedad de tal forma que los sujetos jóvenes genéticamente predispuestos no tengan todavía manifestaciones clínicas. De esta forma, los marcadores subclínicos maximizan el número de "sujetos afectados" que pueden ser detectados. En este sentido, el estudio de determinados marcadores subclínicos en los familiares sanos de los pacientes con una enfermedad hereditaria puede ayudar a identificar los sujetos genéticamente predispuestos.

El potencial papel de los ANCA como marcadores subclínicos de susceptibilidad genética a la CU fue sugerido por dos grupos independientes que encontraron una frecuencia significativamente más alta de los anticuerpos en los familiares sanos de los pacientes que en sujetos controles. Primero, Shanahan y cols.³⁶² reportaron la presencia de ANCA en un 15,7% y en un 20,9% de los familiares sanos de pacientes con CU en dos poblaciones norteamericanas. Dos años más tarde, Seibold y cols.³⁶³ comunicaron resultados similares en una población alemana: detectaron la presencia de ANCA en el 30% de los familiares sanos de pacientes con CU y en el 25% de los familiares sanos de pacientes con CEP. No obstante, contrariamente a estos dos trabajos, cuatro estudios realizados en Francia³⁶⁴, Italia³⁶⁵, e Inglaterra^{366,367}, no evidenciaron una prevalencia incrementada de ANCA en los familiares sanos de pacientes con CU (0-6,6%). Estas diferencias, al igual que las encontradas en los propios pacientes, también se han atribuido a diferencias metodológicas y/o poblacionales. Considerando esta última explicación, es posible que los ANCA representen marcadores genéticos en la CU únicamente en determinadas poblaciones. Por lo tanto, para establecer su utilidad como marcadores de susceptibilidad genética a la CU en una población concreta, es preciso conocer su prevalencia entre los familiares de los pacientes del área geográfica de estudio.

2.2.6.2.2. Marcadores subclínicos de heterogeneidad genética en la EII

La EII, como más adelante se expondrá, es una enfermedad genéticamente heterogénea. El concepto de heterogeneidad hace referencia a que la CU y la EC son enfermedades genéticamente distintas que se presentan con un espectro clínico similar.

Más aún, hoy en día se considera que cada una de las dos enfermedades, la CU y la EC, son a su vez enfermedades genéticamente heterogéneas. Esto es, tanto la CU como la EC, englobarían una serie de trastornos diferentes, cada uno de los cuales tendría una base genética distinta. Entre las numerosas evidencias que así lo indican y que se comentarán más detalladamente en otro capítulo, el estudio de marcadores subclínicos, y en concreto el de los ANCA, puede contribuir a probar la existencia de heterogeneidad genética en estas dos enfermedades.

El potencial papel de los ANCA como marcadores subclínicos de heterogeneidad genética en la CU fue inicialmente sugerido por Shanahan y cols.³⁶² en el estudio que describía una frecuencia incrementada de los anticuerpos en los familiares sanos de los pacientes con CU. Los autores encontraron una mayor frecuencia de los anticuerpos en los familiares de pacientes con CU que eran ANCA positivos (CU-ANCA+) que en los familiares de los pacientes ANCA negativos (CU-ANCA-) (21.4% vs 7%). Posteriormente, durante los últimos años se han publicado varios estudios evidenciando que la distinta asociación entre el status ANCA y diversos marcadores genéticos caracterizan subgrupos de pacientes con CU. De nuevo, el grupo del *Cedars Sinai Medical Center* de Los Angeles fue el primero en establecer asociaciones de estas características. En concreto, en un primer estudio, mostraron que la CU-ANCA+ se asociaba con el alelo HLA-DR2, y la CU-ANCA- con el alelo HLA-DR4³⁶⁸. Estos resultados permitían establecer subgrupos de pacientes con CU definidos por la asociación de marcadores genéticos (genotipo HLA) y subclínicos (ANCA), y sugerir en

consecuencia que la CU-ANCA+ y la CU-ANCA- son grupos genéticamente distintos. En un segundo estudio, los mismos autores señalaron una frecuencia incrementada del alelo R241 del codón 241 del gen de la molécula de adhesión intercelular tipo 1 (ICAM-1) en la CU-ANCA- comparada con la CU-ANCA+, y una mayor frecuencia del mismo alelo en la EC-ANCA+ respecto a la EC-ANCA-³⁶⁹. Los resultados de trabajos subsiguientes, no obstante, han sido contradictorios. Así, mientras que Annese y cols.³⁷⁰ también han encontrado una asociación entre la CU-ANCA+ y el alelo HLA-DR2, otros autores no han detectado ningún tipo de asociación entre el status ANCA y los alelos HLA valorados, en concreto el HLA-DR2³⁷¹⁻³⁷³. Nuevamente aquí, las discrepancias entre estos trabajos se atribuyen a diferencias metodológicas y/o poblacionales. Así se refleja en un reciente estudio realizado en pacientes con EII del norte de Europa, en el que se ha evidenciado una asociación entre la CU-ANCA+ y el haplotipo HLA DR3 DQ2 TNF2, pero no así con el alelo HLA-DR2³⁷⁴.

2.3. GENETICA DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

2.3.1. Predisposición genética en la EII

Estudios clínicos, epidemiológicos y genéticos han mostrado que el riesgo de desarrollar la EII está genéticamente determinado³⁷⁵⁻³⁸⁰. Las evidencias que así lo indican incluyen diferencias raciales y étnicas en la frecuencia de la enfermedad, la agregación familiar, la existencia de síndromes genéticos que se asocian a la EII, y la asociación entre la EII y varios marcadores genéticos.

La incidencia de la EII es mayor en la raza caucásica, menor en la raza negra, y baja en la raza asiática³⁷⁵⁻³⁷⁷. No obstante, la incidencia en distintas comunidades raciales disminuye o aumenta cuando éstas emigran a zonas geográficas de menor o mayor prevalencia de la enfermedad respectivamente, por lo que si bien los factores genéticos determinan en parte las diferencias raciales, los factores ambientales contribuyen a las mismas. Es por ello que son más relevantes los estudios que muestran que entre la raza caucásica, los judíos tienen un mayor riesgo de padecer EII que otros grupos étnicos de la población no judía, y que la enfermedad es más prevalente entre los judíos Ashkenazies que entre los Sefardíes^{378,380}. Las repetidas observaciones de que estas diferencias se mantienen a lo largo de distintas décadas y en distintas áreas geográficas, subrayan la importancia de la participación genética en la predisposición a la EII.

La existencia de un componente genético en la EII se sustenta así mismo en la evidencia que aportan los trabajos en los que se pone de manifiesto una agregación

familiar. La proporción de pacientes que tienen una historia familiar positiva es de un 10-20%, y el riesgo relativo de desarrollar una CU o EC es del orden de 10 a 30 veces superior en los familiares de primer grado de los enfermos que en la población general^{375,379,380}. Más importante todavía, la concordancia de la EII entre gemelos monocigotos es superior a la encontrada entre dicigotos, o entre hermanos no gemelos^{381,382}.

La EII se asocia claramente con tres síndromes genéticos: el Síndrome de Turner, el síndrome de Hermansky-Pudlak, y la glucogenosis tipo Ib³⁷⁵. La asociación con otros síndromes genéticos (ciertos síndromes de inmunodeficiencia y el agioedema hereditario), y otras enfermedades con una conocida predisposición genética (la espondilitis anquilopoyética, la psoriasis, la colangitis esclerosante primaria, la esclerosis múltiple y la enfermedad celíaca) está así mismo bien documentada.

Finalmente, y como se discutirá más adelante, la asociación de la CU y la EC con varios marcadores genéticos, así como los trabajos de análisis de ligamiento en los que se estudia todo el genoma humano demostrando la implicación de diversas regiones cromosómicas en la predisposición genética a la CU y la EC, constituyen importantes pruebas adicionales del papel relevante de la herencia en la EII³⁸³⁻³⁸⁵.

2.3.2. Modelo de herencia en la EII

El patrón de herencia de la EII no es del todo conocido, pero los datos epidemiológicos y genéticos sugieren un modelo no-mendeliano complejo, en el que varios genes parecen estar involucrados³⁸³⁻³⁸⁵. La evidencia actual indica que la CU y la

EC son trastornos multifactoriales, resultado de la interacción entre factores ambientales y la influencia aditiva de varios genes con efectos menores (modelo poligénico) o de genes con efectos mayores (modelo oligogénico).

Por otra parte, como ya se ha apuntado en otra parte de este texto, hoy en día se tiende a considerar que la EII es una enfermedad genéticamente heterogénea³⁷⁵. El concepto de heterogeneidad genética, como ya se ha explicado, hace referencia a que la CU y la EC no son una única enfermedad, sino enfermedades genéticamente distintas que se presentan con un espectro clínico similar. La noción de heterogeneidad genética en la EII se sustenta principalmente en la diferente asociación de la CU y de la EC con distintos marcadores genéticos y subclínicos, así como en los estudios de ligamiento de todo el genoma que han mostrado que si bien las dos enfermedades pueden compartir algunos locus genéticos, difieren en muchos otros. Además, numerosas y recientes observaciones sugieren que cada una de las dos enfermedades, la CU y la EC, son a su vez, enfermedades genéticamente heterogéneas: tanto la CU como la EC, englobarían una serie de trastornos diferentes, cada uno de los cuales tendría una base genética distinta. Entre las evidencias que así lo indican, son muy demostrativos los trabajos que muestran una concordancia familiar de los principales parámetros clínicos de la EC, como la localización anatómica, la extensión, el patrón clínico (inflamatorio, fibroestenótico o fistulizante), y los requerimientos quirúrgicos, sugiriendo que las diferentes características clínicas están sujetas a control genético³⁸⁶⁻³⁹¹. Consistente con la idea de heterogeneidad genética tanto de la CU como de la EC, durante los últimos años se han

reportado numerosas asociaciones entre marcadores genéticos y distintos subgrupos fenotípicos de cada una de las dos enfermedades. Por citar algunos ejemplos, se ha señalado una asociación negativa del genotipo AA del gen TAP2 y pacientes con EC corticorresistente³⁹², y una menor frecuencia del alelo HLA-DRB1* 03 en un subgrupo de pacientes con EC con fístulas perianales³⁹³; con respecto a la CU, se ha reportado que el alelo HLA-DRB1*15 se asocia a la intratabilidad de la enfermedad³⁹⁴, la necesidad de tratamiento con glucocorticoides³⁹⁵, y la colitis extensa³⁹⁶, el haplotipo DR3-DQ2 se asocia a la colitis extensa³⁹⁷, mientras que el alelo HLA-DRB1*0103 se asocia con una evolución más severa de la enfermedad³⁹⁸. Por otra parte, los marcadores subclínicos pueden así mismo contribuir a establecer la presencia de heterogeneidad genética en estas dos enfermedades. Como ya se ha discutido en otro apartado de este texto, los ANCA han sido los más estudiados, publicándose varios estudios que muestran que la combinación de estos anticuerpos con ciertos marcadores genéticos caracterizan subgrupos de pacientes con CU. Finalmente, la constatación de que diferentes modelos experimentales de EII con animales transgénicos o "knockout" generados por muy distintas manipulaciones genéticas desencadena un proceso inflamatorio intestinal más o menos similar para todos ellos, constituye otro dato indirecto apoyando el concepto de heterogeneidad genética de la CU y de la EC³⁹⁹.

En resumen, el modelo genético más extensamente aceptado para la EII, es el que engloba el concepto de heterogeneidad genética, herencia poligénica, y contribución de factores ambientales. La ventaja principal de contemplar a la CU y la EC como

enfermedades genéticamente heterogéneas, consiste en la posibilidad de identificar subgrupos genéticamente homogéneos mediante el empleo de marcadores genéticos y/o subclínicos, lo que debería permitir profundizar sobre la fisiopatología de estas enfermedades, y en último término aplicar tratamientos más racionales acorde con las alteraciones fisiopatológicas inherentes a cada una de las diferentes formas etiológicas.

2.3.3. Identificación de los genes susceptibles en la EII

Los importantes avances científicos realizados durante la última década en el campo de la biología molecular han permitido caracterizar la base molecular de muchas enfermedades. Para ello, actualmente existen dos grandes estrategias⁴⁰⁰. La primera y más novedosa, "*genome-wide screening*", consiste en el estudio de todo el genoma humano mediante análisis de ligamiento de marcadores genéticos muy polimórficos (microsatélites) que permiten el mapeo de múltiples lugares en cada cromosoma. Para este tipo de estudio, es necesario examinar familias con varios de sus miembros afectados. La comparación de los marcadores analizados entre familiares afectados, permite la localización de regiones cromosómicas de interés, para posteriormente iniciar la búsqueda de genes susceptibles en dichas regiones cromosómicas. La segunda estrategia, el estudio de los genes candidatos, se fundamenta en la evaluación de diversos marcadores genéticos específicos en base a hipótesis biológicas, y ha sido la más empleada hasta hace pocos años. Esta estrategia se puede abordar mediante estudios de asociación poblacionales en los que un determinado marcador genético se compara entre casos y controles, o a través de estudios de análisis de ligamiento genético en familias con

varios miembros afectados en los que se determina si ciertos alelos de un marcador genético se transmite con la enfermedad.

Durante los últimos años, la identificación de los locus genéticos de susceptibilidad que explique el carácter hereditario de la CU y la EC se ha convertido en un objetivo prioritario del estudio de la EII. Sin embargo, la naturaleza de los defectos moleculares involucrados sigue siendo poco conocida³⁸³⁻³⁸⁵. De forma similar a lo aplicado en las enfermedades hereditarias monogénicas u otras enfermedades con un modelo de herencia complejo no-mendeliano, en la EII se están utilizando las dos estrategias de estudio previamente descritas.

Los resultados de los estudios de ligamiento de todo el genoma humano publicados hasta la fecha, han implicado regiones en los cromosomas 3, 7, 12 y 16 en la predisposición genética a la EC⁴⁰¹⁻⁴⁰⁹, y en los cromosomas 2, 3, 7, 6, 12, y 16 para la CU⁴⁰¹⁻⁴⁰⁹. Las regiones susceptibles más claramente implicadas se encuentran en el cromosoma 16 (*locus IBD1*) y en el cromosoma 12 (*locus IBD2*).

Por su parte, el enfoque de la búsqueda de locus genéticos susceptibles mediante la estrategia de los genes candidatos, se ha basado lógicamente en la evaluación de los genes que se presume pueden participar en la patogenia de la EII, según los conocimientos actuales de la misma. En este sentido, diversos genes que operarían tanto a nivel del órgano diana como a nivel del sistema inmunitario pueden estar involucrados. Considerando el papel central del sistema inmunitario en la patogenia de la EII, y que la disfunción inmunitaria puede estar genéticamente determinada, los genes implicados en el

control de la respuesta inmune se consideran importantes candidatos potenciales. Los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II, que codifican para las moléculas HLA de clase II necesarias para el reconocimiento antigénico y por lo tanto el inicio de la respuesta inmune, han sido los más estudiados. En la CU se han descrito asociaciones con el alelo HLADR2 (DRB1*15) en poblaciones norteamericanas⁴¹⁰ y japonesas⁴¹¹, pero no así en las europeas^{412,413}. Con respecto a la EC, se han reportado asociaciones con el haplotipo DR1-DQ5⁴¹⁴, y con los alelos DRB1*01 y DRB1*07⁴¹⁵. No obstante, conviene destacar que los resultados de los numerosos trabajos de asociación con los alelos HLA no han sido consistentes. El análisis conjunto de todos ellos revela que la contribución de los genes HLA de clase II a la susceptibilidad global de la CU es modesta, mientras que en la EC es todavía incierta. Otros genes igualmente involucrados en la respuesta inmune como los que codifican para el sistema del complemento, inmunoglobulinas, receptor antigénico de las células T, y moléculas de adhesión, han sido también evaluados³⁷⁵. Ninguna de estas regiones genómicas se ha mostrado útil como marcador de susceptibilidad a la EII, si bien en algunos casos se han descrito asociaciones débiles. Finalmente, la evaluación de los genes que codifican para citocinas con importante actividad inflamatoria y/o inmunorreguladora que participan de forma activa en la patogenia de la EII, ha sido el objeto de una creciente atención⁴¹⁶⁻⁴²².

2.3.4. Elección de los marcadores genéticos

Las citocinas son un amplio grupo de glicoproteínas producidas por diferentes tipos celulares que juegan un papel esencial en el inicio, la regulación, la amplificación, y

el tipo de la respuesta inmune, así como en la naturaleza de los procesos de inflamación local y/o sistémica que dicha respuesta provoca. Las citocinas juegan un papel central en la modulación del sistema inmunitario intestinal, y contribuyen de forma muy importante a mantener la homeostasis de la mucosa del tracto gastrointestinal⁴²⁰.

Estudios clínicos y experimentales han mostrado que en la EII existe un desequilibrio del balance entre citocinas proinflamatorias y citocinas con función predominantemente inmunorreguladora o antiinflamatoria⁴¹⁶⁻⁴¹⁹. Las principales citocinas proinflamatorias involucradas en la inducción y perpetuación de la respuesta inflamatoria en la EII incluyen la interleucina 1 (IL-1), la IL-6, la IL-12, el factor de necrosis tumoral α (TNF α), el interferón γ , así como diversas quimiocinas, mientras que las citocinas reguladoras inmunosupresoras más importantes estarían representadas por la IL-4, la IL-10 y el TGF β . El conocimiento preciso del papel que desempeña cada uno de estos mediadores de forma individual es todavía limitado, pero los estudios experimentales han puesto de manifiesto que el desequilibrio entre citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias juega un papel determinante en el desarrollo y perpetuación del proceso inflamatorio intestinal. Sin embargo, se desconoce si estas alteraciones reflejan simplemente la activación inmune exagerada o incontrolada que caracteriza la EII, o por contra representan una disfunción inmunitaria primaria determinada por una alteración de la regulación de la respuesta inmune que pudiera estar genéticamente determinada. De esta forma, y bajo esta última hipótesis, la descripción de polimorfismos en los genes que codifican para varias de estas citocinas, ha permitido el estudio de su asociación con la CU y la EC⁴²¹. Los estudios publicados hasta la fecha, han evaluado polimorfismos de los

genes que codifican para el $\text{TNF}\alpha$, el $\text{TNF}\beta$, la $\text{IL-1}\beta$, el antagonista del receptor de la interleucina 1 (IL-1ra), la IL-2 , y la IL-10 ^{284,421,422}. Como se comentará más adelante, los resultados de los trabajos realizados mayoritariamente en poblaciones norteamericanas y de los países del norte de Europa han mostrado resultados discordantes.

En este trabajo hemos adoptado la estrategia del estudio de los genes candidatos mediante un estudio de asociación poblacional caso-control, para evaluar la posible contribución de los genes que codifican para las citocinas del $\text{TNF}\alpha$, $\text{TNF}\beta$, y del gen del IL-1ra , a la susceptibilidad genética a la CU en nuestra población. En concreto, hemos estudiado dos polimorfismos de tipo bialélico de los genes del $\text{TNF}\alpha$ y $\text{TNF}\beta$, y un polimorfismo VNTR (número variable de secuencias repetidas en tandem) del gen del IL-1ra .

2.3.5. Antagonista del receptor de la interleucina 1

2.3.5.1. Familia de la interleucina 1

La IL-1 es una potente citocina proinflamatoria producida fundamentalmente por los monocitos y los macrófagos, aunque también por otras células que incluyen los fibroblastos, las células musculares, y las células epiteliales⁴²³. Se distinguen dos formas moleculares diferentes: la interleucina 1α ($\text{IL-1}\alpha$), mayoritariamente asociada a la membrana celular, y la interleucina 1β ($\text{IL-1}\beta$), forma predominantemente secretada. Son citocinas pleiotrópicas, es decir, ejercen múltiples acciones al actuar sobre diferentes tipos celulares, así como redundantes, esto es, comparten los efectos que producen. De entre

sus numerosas funciones, las más importantes son su potente efecto inflamatorio, tanto a nivel local como sistémico, que ejercen mediante la estimulación y activación de diferentes estirpes celulares (neutrófilos, monocitos, macrófagos, células endoteliales, fibroblastos y otras células hícticas), y su actividad inmunorreguladora consistente con la activación linfocitaria B y T.

En condiciones homeostáticas la IL-1 α y β no se sintetizan, por lo que lógicamente no se detectan en los tejidos, ni en la circulación sistémica. Es en el contexto de múltiples procesos patológicos, que estímulos muy diversos activan los monocitos-macrófagos para secretar estas citocinas. La síntesis se inicia en forma de precursores, que se denominan proIL-1 α y proIL-1 β , respectivamente. La proIL-1 α es activa, y permanece en el citosol o se fija a la membrana celular, pero no se secreta de forma natural al medio extracelular. Las células necrosadas liberan proIL-1 α que es procesada a la forma madura por diferentes proteasas. Por su parte, la proIL-1 β es inactiva, y sí se secreta parcialmente al medio extracelular. No obstante, la mayor parte de la molécula es procesada por el enzima convertidor de la IL-1 β (ICE), produciéndose la forma madura biológicamente activa que se secreta extracelularmente. La IL-1 α y la IL-1 β ejercen sus acciones mediante su unión a receptores específicos de membrana en la células diana. Se han descrito dos tipos: el receptor de la IL-1 tipo I (IL-1RI) y el receptor de la IL-1 tipo II (IL-1RII). Tanto la IL-1 α como la IL-1 β son capaces de acoplarse a ambos, pero únicamente la unión al IL-1RI traduce una señal en la célula diana.

La enorme capacidad proinflamatoria de la IL-1 α y la IL-1 β está sujeta a un estrecho control de regulación, del que se distinguen tres mecanismos fundamentales⁴²³.

En primer lugar, las citocinas no se expresan de forma constitutiva en la gran mayoría de las células del organismo. Su síntesis y posterior secreción en los focos inflamatorios, requiere de la activación de los monocitos-macrófagos que inducen la transcripción de los genes de ambas citocinas. En segundo lugar, el procesamiento de los precursores a las formas maduras y biológicamente activas, está regulado por diversos enzimas, y muy en particular por la ICE. Finalmente, la unión de las dos citocinas al receptor funcionante IL-1RI, está sujeta a tres mecanismos competitivos: 1) la unión de las citocinas al IL-1RII, que no traduce señal en la célula diana. 2) la secreción del IL-1RII al medio extracelular (sIL-1RII), que al unirse a las citocinas las inactiva. 3) la existencia de un antagonista de los receptores de membrana, el antagonista del receptor de la interleucina 1 (IL-1ra), que juega un papel determinante al bloquear los receptores sin inducir respuesta celular. La figura 8 esquematiza la estructura y mecanismos de acción de la familia de la IL-1.

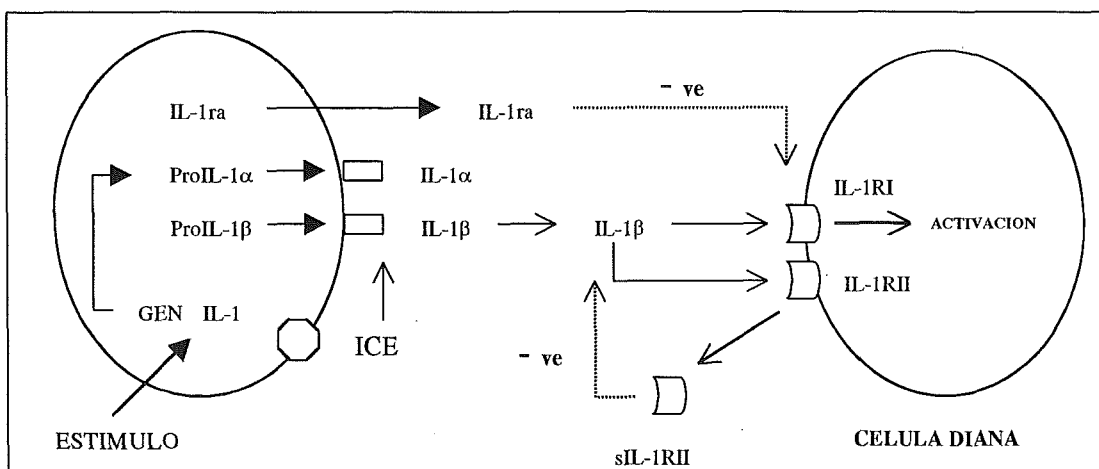


Figura 8. Estructura y mecanismos de acción de la familia de la IL-1.

El IL-1ra es el primer antagonista natural específico de los receptores de cualquier citocina u hormona conocidas que se ha descrito⁴²³⁻⁴²⁵. Es una proteína que se sintetiza por las mismas células que producen IL-1, es decir fundamentalmente los monocitos y los macrófagos. El IL-1ra fue inicialmente aislado por dos grupos independientes en el año 1985^{426,427}. Posteriormente se descubrieron diversas isoformas de esta molécula, de tal manera que actualmente se conocen cuatro formas estructurales. La IL-1ra secretora (sIL-1ra) fue la primera descrita, ha sido la más estudiada, y es a la que habitualmente se hace referencia en la literatura cuando se utiliza de forma genérica el término IL-1ra. En el año 1990 se clonó por primera vez y se determinó su secuencia⁴²⁵. Se sintetiza en los monocitos-macrófagos en forma de un precursor de 177 amino ácidos (aa), siendo la forma madura secretada, una glicoproteína de 152 aa y peso molecular de 22-25 kD. Las otras tres variantes estructurales se sintetizan principalmente en los fibroblastos, keratinocitos, y otras células epiteliales, y son isoformas intracitoplasmáticas (iIL-1ra), cuyas funciones no están bien definidas.

La principal función del IL-1ra, como ya se ha señalado, consiste en el antagonismo específico de los receptores de la IL-1⁴²⁵. El IL-1ra compite con la IL-1 α y IL-1 β para unirse a los IL-1RI y IL-1RII. Su unión a los receptores no induce respuesta celular, por lo que de esta forma se "suprime" la actividad biológica de la IL-1 α y la IL-1 β . El IL-1ra es por lo tanto, una citocina anti-inflamatoria, que contrarresta de forma natural los efectos de las dos interleucinas proinflamatorias. A pesar de que su papel en la fisiología normal no se conoce con exactitud, estudios experimentales han demostrado la importancia del IL-1ra endógeno como proteína natural antiinflamatoria en diversos

modelos animales de enfermedad. Además, el patrón de la expresión endógena del IL-1ra en diversas enfermedades autoinmunes e inflamatorias agudas y crónicas en los humanos, sugiere también su papel como elemento importante en la defensa y homeostasis del huésped. Así, en numerosos procesos patológicos, la producción incrementada de IL-1 α y β , se acompaña de forma paralela de un aumento de la secreción del IL-1ra como parte de una respuesta reguladora fisiológica para limitar los efectos inflamatorios de los agonistas. El balance entre la producción de IL-1 y IL-1ra (ratio IL-1/IL-1ra) en los tejidos inflamados, muy probablemente influencia la susceptibilidad, progresión y curso clínico de las enfermedades inflamatorias⁴²³⁻⁴²⁵. En este sentido, es importante destacar, que en estos procesos, la producción IL-1ra es mucho mayor que la de IL-1, pero no lo suficiente para neutralizar de forma efectiva los efectos de los agonistas, ya que se ha constatado, tanto *in vitro* como *in vivo*, que para ello se precisan niveles en exceso de 100 o más veces de IL-1ra que de IL-1.

2.3.5.2. IL-1ra en la EII

La IL-1 y la IL-1ra juegan un importante papel en la patogenia de la EII. El estudio del patrón de expresión endógena de ambas citocinas en diferentes modelos de EII experimental en animales y en la enfermedad en los humanos, ha contribuido de forma decisiva al conocimiento del papel que desempeña cada una de ellas.

Los modelos experimentales han aportado numerosas evidencias que permiten relacionar la producción de IL-1 con la inducción y perpetuación de las lesiones en el tracto gastrointestinal, y que demuestran el importante papel modulador antiinflamatorio

del IL-1ra. Primero, la administración intraperitoneal de IL-1 en ratas provoca la aparición de infiltrado inflamatorio intestinal, fibrosis, y granulomas⁴²⁸. Segundo, en varios modelos experimentales de colitis, los niveles tisulares IL-1 se encuentran muy incrementados, se correlacionan con la severidad del proceso inflamatorio, y disminuyen al mejorar la colitis⁴²⁹. Tercero, el bloqueo de la IL-1 mediante la administración de IL-1ra recombinante exógeno previene la aparición de las lesiones⁴³⁰⁻⁴³². Cuarto, el bloqueo de la acción del IL-1ra mediante la administración de anticuerpos anti-IL-1ra aumenta la mortalidad, y el infiltrado inflamatorio intestinal en los animales que sobreviven⁴³³. Quinto, la delección del gen que codifica para el IL-1ra determina una mayor susceptibilidad de las ratas a la colitis inducida por dextrano sulfato, mientras que la sobreexpresión del gen les confiere protección⁴³⁴.

Con respecto a la EII en los humanos, numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado que la producción/secreción tanto de IL-1 como de IL-1ra, se encuentran muy aumentadas en la mucosa intestinal inflamada de los pacientes⁴³⁵⁻⁴³⁹. Sin embargo, y lo que es más importante, existe un desequilibrio relativo en la producción de IL-1 y IL-1ra en la mucosa intestinal afectada comparada con el tejido intestinal indemne, de tal forma que el balance entre las dos citocinas (ratio IL-1/IL-1ra) está aumentado en el tejido lesionado⁴⁴⁰⁻⁴⁴⁸. Más aún, este desequilibrio parece ser específico de la EII, ya que no se objetiva en otros procesos inflamatorios intestinales. El desequilibrio IL-1/IL-1ra, que puede estar bajo control genético de los genes que codifican para estas citocinas, puede jugar un importante papel en la patogenia de la EII, determinando la susceptibilidad, progresión y perpetuación de la inflamación crónica intestinal.

2.3.5.3. Gen del IL-1ra

El locus del gen del IL-1ra (IL1RN) se localiza en el brazo largo del cromosoma 2, región q14-q21⁴⁴⁹⁻⁴⁵³. Los genes de la IL-1 α (IL1A), la IL-1 β (IL1B) y el IL-1ra, se localizan todos ellos en un segmento de unos 430 kb en el cromosoma 2: el IL1A está situado entre +0 y +35 kb, el IL1B entre +70 y +100 kb, y el IL1RN entre +330 y +430 kb. Por otra parte, los genes que codifican para los receptores, IL-1RI y IL-1RII, también se localizan en el brazo largo del cromosoma 2, aunque están alejados de los tres anteriormente mencionados.

La estructura génica del IL1RN se parece a la del IL1A y la del IL1B. Sin embargo, mientras que el IL1RN tiene cuatro exones (regiones codificantes de los genes que se transcriben) y tres intrones (regiones no codificantes que se encuentran distribuidas entre los exones), los IL1A y IL1B contienen tres exones y dos intrones.

Antes de proseguir con la descripción del gen del IL-1ra, es conveniente recordar lo que es un polimorfismo genético. Se define como una variación genética detectable en al menos el 1% de los individuos de una población. A esta variación se le denomina variante polimórfica. La mayoría de estos cambios se producen en los intrones o secuencias no codificantes que hay en los genes. Se distinguen tres tipos principales de polimorfismos. El primero, conocido mediante el acrónimo RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), detecta variaciones del DNA producidos por cambios en determinados lugares que se pueden poner de manifiesto mediante enzimas de restricción (enzimas que cortan secuencias específicas en DNA de 4-7 nucleótidos). El segundo tipo

de polimorfismo conocido como minisatélites o número variable de secuencias repetidas en tandem (VNTR= *Variable Numbers of Tandem Repeats*) depende de reordenamientos o repeticiones de secuencias de oligonucleótidos en tandem, variables para cada individuo, obteniéndose un alelo por cada vez que se encuentra repetida la secuencia o grupos de esta secuencia. Finalmente, los microsatélites o STR (*Short Tandem Repeats*) representan un tercer tipo de polimorfismo del DNA, que depende de la repetición en tandem de secuencias de solo 2 o 3 pares de bases.

Se han descrito varios polimorfismos del gen que codifica para el IL-1ra, el IL1RN. El primero que se describió y el más estudiado, es un polimorfismo VNTR localizado en el intrón 2, consistente con una repetición en tandem de una secuencia de 86 pb⁴⁵⁴. Mediante la amplificación de esta región génica con la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posterior procesamiento electroforético, se distinguen 5 alelos, cada uno correspondiente a un número variable de repeticiones de la secuencia de 86 pb. El alelo 1 corresponde a 4 repeticiones de la secuencia, el alelo 2 corresponde a 2 repeticiones, el alelo 3 corresponde a 5 repeticiones, el alelo 4 corresponde a 3 repeticiones, y el alelo 5 corresponde a 6 repeticiones (figura 9).

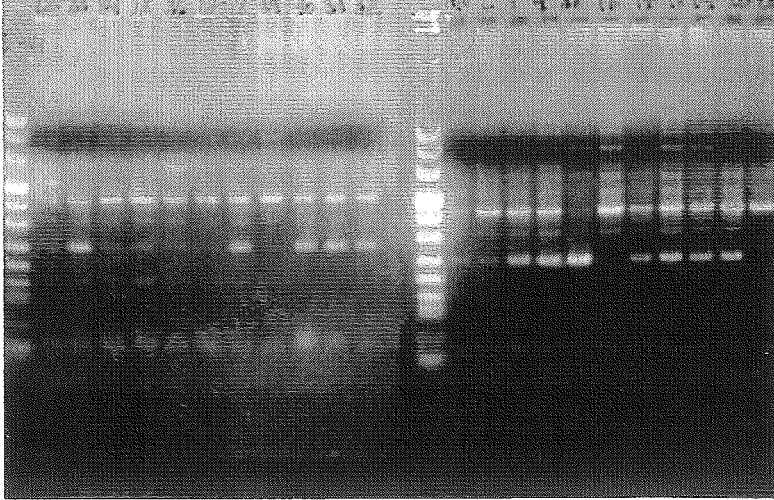


Figura 9. Gel correspondiente al análisis del polimorfismo VNTR en el intrón 2 del IL-1RN.

El significado funcional de este polimorfismo genético no ha sido esclarecido. Para su estudio se han empleado diferentes metodologías, comunicándose resultados contradictorios. Dannis y cols.⁴⁵⁵ han reportado que el alelo 2 se relaciona con un incremento en la producción de IL-1ra en monocitos humanos estimulados *in vitro* con GM-CSF (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), mientras que Cominelli y cols.⁴⁵⁶ han encontrado que este alelo se asocia a una producción disminuida de IL-1ra por las células mononucleares sanguíneas. Mediante el estudio de los niveles plasmáticos de IL-1ra, Hurme y cols.⁴⁵⁷ han señalado que son más altos en los sujetos portadores del

alelo 2, mientras que Stokkers y cols.⁴⁵⁸ no han encontrado ninguna relación entre los mismos y las diferentes variantes alélicas o genotípicas. Finalmente, Clay y cols.⁴⁵⁹ han comunicado que los niveles de RNAm del IL-1ra en los keratinocitos no se relacionan con los diferentes alelos del polimorfismo.

A pesar de que el significado funcional de este polimorfismo genético no ha sido aclarado, la importancia del mismo viene determinada por los resultados de varios estudios de asociación poblacionales caso-control, que han revelado una asociación entre el alelo 2 y varias enfermedades inflamatorias crónicas y/o autoinmunes⁴²⁵. Este es el caso del LES cutáneo, la enfermedad de Graves-Basedow, la nefropatía diabética, la alopecia areata, el lichen escleroso, y tal como se discute en el siguiente capítulo, la CU.

2.3.5.4. Polimorfismo VNTR del gen del IL-1ra y EII

Mansfield y cols.⁴⁶⁰ reportaron por primera vez en el año 1994, una asociación entre el alelo 2 del polimorfismo VNTR del IL-1RN y la CU. En su estudio, los investigadores ingleses encontraron que los pacientes con CU tenían una frecuencia significativamente incrementada del alelo 2 comparado con un grupo control (35% vs 24%). De esta forma, los autores describían por primera vez una asociación entre la CU y un marcador genético distinto al los del MHC. Durante los últimos años, el papel del alelo 2 del polimorfismo VNTR del IL-1RN como marcador de susceptibilidad genética a la CU ha sido evaluado en diferentes poblaciones norteamericanas y europeas, obteniéndose resultados contrapuestos. Así, mientras que en dos estudios norteamericanos se evidenció una mayor frecuencia de portadores del alelo 2 en la CU^{461,462}, varios trabajos europeos realizados en

Alemania^{463,464}, Inglaterra^{465,466}, Holanda³⁷³, Francia⁴⁶⁷ y España⁴⁶⁸, no han confirmado estos hallazgos. Las discrepancias entre estos estudios no han sido esclarecidas, pero probablemente se deben a diferencias poblacionales, así como a la heterogeneidad clínica y genética propias de la EII⁴⁶⁹.

El mecanismo por el que el alelo 2 del polimorfismo VNTR del IL1RN contribuiría a la susceptibilidad genética a la CU no se ha identificado⁴⁶⁹. Por una parte, es posible que sea únicamente un marcador asociado a algún otro gen de importancia primaria ligado al IL1RN en el cromosoma 2. Por contra, si realmente el propio IL1RN confiere una predisposición a la CU, los estudios sobre su posible funcionalismo a los que previamente se ha hecho referencia no explican el mecanismo por el cual alelo 2 estaría involucrado en la patogenia de la enfermedad. No obstante, es importante destacar, que dichos trabajos han evaluado el funcionalismo del polimorfismo a nivel sistémico. Recientemente, Perrier y cols.⁴⁷⁰ han reportado que en el síndrome de Sjögren, el alelo 2 se asocia a niveles de IL-1ra disminuidos en el plasma y aumentados en la saliva, sugiriendo que este alelo puede tener efectos distintos en diferentes sistemas de la economía. Una discrepancia similar entre la producción local y sistémica del IL-1ra podría existir en otras enfermedades asociadas al alelo 2. En este sentido, los dos únicos estudios que han evaluado lo que sucede a nivel intestinal en la EII, han mostrado que el alelo 2 del polimorfismo del IL1RN se asocia a una concentración disminuida del IL-1ra en la mucosa colónica de los pacientes con CU^{445,471}, lo que explicaría el desequilibrio del

balance IL-1/IL-1ra colónico detectado en la enfermedad, y que supuestamente está implicado en su patogenia.

2.3.6. Factor de necrosis tumoral

2.3.6.1. Estructura y función

El TNF α y el TNF β (también denominado linfotoxina α) son dos potentes citocinas proinflamatorias producidas fundamentalmente por los monocitos, los macrófagos y los linfocitos. Ambas citocinas pertenecen a una amplia familia de proteínas y receptores estructuralmente relacionados, que están involucrados principalmente en la regulación de la inmunidad⁴⁷².

En condiciones homeostáticas el TNF α y el TNF β no se detectan ni en los tejidos, ni en la circulación sistémica. Es en el contexto de múltiples procesos patológicos, que estímulos muy diversos activan la secreción de estas citocinas. El TNF α está producido fundamentalmente por los monocitos y los macrófagos, pero también por otras células que incluyen los linfocitos T, fibroblastos y células epiteliales. Se sintetiza en forma de un precursor de 26 kD, a partir de numerosos estímulos que incluyen los lipopolisacáridos, activadores de proteinquinasas, otras citocinas, y radicales libres de oxígeno, entre otros. La mayor parte del precursor es procesada por una metaloproteínasa específica a la forma madura, una proteína de 157 aa y peso molecular de 17 kD, que se secreta al medio extracelular y circula en forma de un homotrímero de 51 kD. El resto del precursor que no es procesado a la forma madura se fija a la membrana celular, siendo biológicamente activo mediante el contacto con otras células vecinas. Por su parte,

el TNF β es una proteína de 171 aa y peso molecular de 25 kD, que comparte aproximadamente un 30 % de su homología en su composición de aa con el TNF α , y se sintetiza exclusivamente por los linfocitos y las células asesinas. A diferencia del TNF α , el TNF β se secreta en su totalidad al medio extracelular.

El TNF α y el TNF β ejercen sus acciones mediante su unión a receptores específicos de membrana (TNFR) en la células diana. Se han descrito dos tipos: el receptor tipo I de 55 kD, y el receptor tipo II de 75 kD. Ambas citocinas son capaces de acoplarse a los dos receptores, induciendo así una serie de respuestas efectoras en la células diana. Por otra parte, los TNFR pueden liberarse y secretarse al medio extracelular. Los TNFR solubles se pueden unir a las citocinas, neutralizándolas o amplificando su actividad, dependiendo de las concentraciones de los agonistas y del sistema biológico estudiado.

El TNF α y el TNF β son citocinas que presentan una actividad biológica similar⁴⁷². Tienen un amplio espectro de actividades funcionales, actuando sinérgicamente con otras citocinas, particularmente la IL-1, con la que comparten numerosas propiedades. De entre sus numerosas funciones, las más importantes son, por una parte, su potente actividad inflamatoria, que ejercen mediante la estimulación y activación de diferentes estirpes celulares (neutrófilos, monocitos, macrófagos, linfocitos, células endoteliales, fibroblastos y otras células hícticas), y por otra, su actividad inmunorreguladora consistente con la activación linfocitaria B y T.

2.3.6.2. TNF en la EII

Numerosas evidencias clínicas, y sobre todo experimentales, han demostrado que el TNF juega un importante papel en la patogenia de la EII⁴⁷³. Cabe señalar, que mientras que el papel del TNF α en la EII ha sido extensamente estudiado, existen muy pocos trabajos que hayan evaluado el del TNF β .

Diversos modelos experimentales han permitido relacionar la producción de TNF α con la inducción y perpetuación de las lesiones en el tracto gastrointestinal. Primero, la infusión de TNF α en animales de experimentación produce una severa lesión intestinal, que está mediada por diversos mecanismos, entre los que se han implicado la participación del factor de agregación plaquetaria⁴⁷⁴, la liberación de radicales libres⁴⁷⁵, la estimulación de la quimiotaxis leucocitaria⁴⁷⁶, y la inducción de la sintetasa de óxido nítrico⁴⁷⁷. Segundo, en los modelos experimentales de colitis, los niveles tisulares colónicos de TNF α están elevados, y disminuyen con la curación del proceso inflamatorio⁴⁷⁸. Tercero, en animales transgénicos en los que existe un patrón de secreción de citocinas Th1, caracterizado por la producción de TNF α , TNF β , IL-2 e interferón γ , se desencadena una colitis severa, que se puede prevenir o reducir, con la administración de anticuerpos anti-TNF α ⁴⁷⁹. Cuarto, otros modelos experimentales de EII espontáneos o inducidos químicamente, también responden al tratamiento con anticuerpos anti-TNF α ⁴⁸⁰⁻⁴⁸².

Con respecto a la EII en los humanos, los pacientes con EII activa tienen niveles elevados de TNF α en las heces⁴⁸³, y su producción en la mucosa colónica se encuentra muy incrementada⁴⁸⁴⁻⁴⁸⁹, disminuyendo ambos en los enfermos que responden al

tratamiento médico. Por otra parte, la utilización de anticuerpos anti-TNF α para el tratamiento de la EII se ha mostrado muy efectiva, hasta el punto de que recientemente la *Food and Drug Administration* ha aprobado su empleo para el tratamiento de la EC⁴⁹⁰⁻⁴⁹⁴.

2.3.6.3. Genes del TNF α y del TNF β

El locus del TNF se encuentra localizado en la región de clase III del MHC en el brazo corto del cromosoma 6, en concreto en la región p23-q12⁴⁹⁵. Se encuentra ubicado aproximadamente a 250 kb centromérico del locus HLA-B, y a 850 kb telomérico de la región HLA de clase II. Los genes que codifican para el TNF α (TNFA) y el TNF β (TNFB) se sitúan en tandem a lo largo de un tramo de unas 7 kb de longitud, separados por 1,1 kb. Ambos genes tienen un tamaño similar, y contienen tres intrones y tres exones.

El MHC es el sistema más polimórfico que se conoce. Los genes de clase I y clase II son con diferencia los más polimórficos, presentando varias decenas de alelos. Aunque en mucha menor cantidad, también se han descrito polimorfismos de los genes de la región de clase III. Con respecto al locus del TNF, se han identificado tanto del tipo RFLP, como del tipo de los microsatélites⁴⁹⁵.

Wilson y cols.⁴⁹⁶ describieron un polimorfismo RFLP de tipo bialélico en la región promotora del TNFA, en concreto en la posición -308, que aparece como consecuencia de una mutación puntual que consiste en la sustitución de una Guanina por una Adenosina. Este polimorfismo se pone de manifiesto mediante la amplificación de esta

región génica por medio de la PCR, digestión con el enzima de restricción NcoI, y posterior procesamiento electroforético. De esta manera, el estudio de este polimorfismo da lugar a tres bandas de diferentes tamaños. Un fragmento de 107 pb correspondiente al alelo TNF2 (lugar de restricción ausente) y dos bandas de 87 pb y de 20 pb correspondientes al alelo TNF1 (lugar de restricción presente). La figura 10 muestra un gel correspondiente al análisis de este polimorfismo.

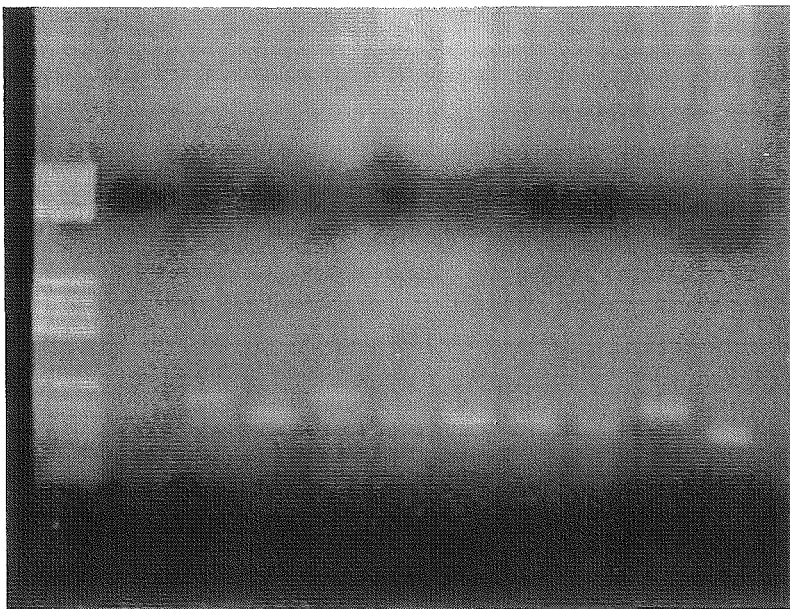


Figura 10. Gel correspondiente al análisis del polimorfismo TNF α -308.

El significado funcional de este polimorfismo genético se ha estudiado mediante el empleo de diferentes metodologías. Los resultados de los diferentes trabajos han evidenciado que el alelo TNF2 se asocia con una secreción incrementada de TNF α , con respecto al alelo TNF1. Así, Bouma y cols.⁴⁹⁷ comunicaron que el alelo TNF2 se relaciona con un incremento en la producción de TNF α en células mononucleares humanas estimuladas *in vitro*, mientras que Louis y cols.⁴⁹⁸ reportaron los mismos resultados estudiando un modelo de cultivo de células sanguíneas enteras. Apoyando estas observaciones, otros autores han objetivado que el alelo TNF2 se relaciona con un incremento en la transcripción de TNF α por diferentes estirpes celulares^{499,500}, si bien este hallazgo no se confirmó en un tercer estudio⁵⁰¹.

En definitiva, los resultados de estos trabajos, sugieren que el polimorfismo RFLP en la posición -308 del TNFA influencia la producción de TNF α , de tal forma que la relación del alelo TNF2 con una mayor secreción de TNF α podría explicar la asociación de este alelo con varias enfermedades infecciosas, inflamatorias crónicas, y/o autoinmunes descritas en la literatura.

Con respecto al TNFB, Badenhop y cols.⁵⁰² describieron por primera vez un polimorfismo obtenido al analizar el locus TNF utilizando el enzima de restricción NcoI que inicialmente atribuyeron al TNFA, pero que dos años más tarde Messer y cols.⁵⁰³ descubrieron que era realmente debido a una mutación en el primer intrón del TNFB, posición que se correlacionaba con una variante en el aminoácido 26 de la proteína final. Posteriormente, se demostró que además de esta mutación en el primer intrón, existe otra

mutación puntual en el segundo exón del TNFB, que consiste en la transversión de una Adenina por una Citosina, lo que produce la sustitución de Asparagina por Treonina en la misma posición 26 de la proteína⁵⁰⁴.

Este polimorfismo también se pone de manifiesto mediante la amplificación de esta región génica por medio de la PCR, digestión con el enzima de restricción NcoI, y posterior procesamiento electroforético. De esta manera, se obtienen tres bandas de diferentes tamaños. Un fragmento de 740 bp correspondiente al alelo TNFB1 (lugar de restricción ausente) y dos bandas de 555 pb y de 185 pb correspondientes al alelo TNFB2 (lugar de restricción presente). La figura 11 muestra un gel correspondiente al análisis de este polimorfismo.

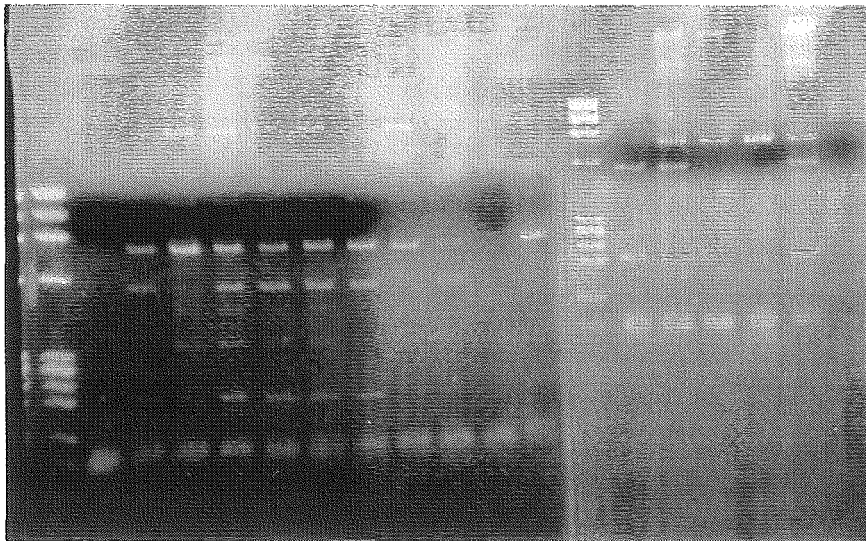


Figura 11. Gel correspondiente al análisis del polimorfismo RFLP en el primer intrón del gen del TNFB.

El significado funcional de este polimorfismo genético se ha estudiado mucho menos, y no ha sido esclarecido. Messer y cols.⁵⁰³ comunicaron que el alelo TNFB2 se asocia con una menor secreción de TNF β , mientras que Pociot y cols.⁵⁰⁴ encontraron que este polimorfismo no influencia la producción de TNF β , pero sí se relaciona con la de TNF α . Finalmente, Whichelow y cols.⁵⁰⁵ han reportado recientemente, que el alelo TNFB2 determina una mayor secreción de TNF β .

2.3.6.4. Polimorfismos de los genes del TNF α y TNF β , y EII

Considerando los efectos biológicos del TNF α y del TNF β , su implicación fisiopatogénica en varias enfermedades infecciosas, inflamatorias crónicas, y/o autoinmunes, y la localización cromosómica de los TNFA y TNFB, la descripción de polimorfismos que codifican para estas citocinas ha permitido el estudio de su asociación con estas enfermedades. De esta forma, varios trabajos han objetivado que el alelo TNF2 del polimorfismo RFLP en la posición -308 del TNFA se asocia al LES, la diabetes mellitus, la dermatitis herpetiforme, la enfermedad celíaca, la leishmaniasis mucocutánea, y la malaria cerebral⁴⁹⁵.

Con respecto a la EII, la hipotética contribución de los TNFA y TNFB a la susceptibilidad genética de la CU y/o la EC se ha evaluado mediante el estudio de estos dos polimorfismos, entre otros, fundamentalmente en poblaciones del norte de Europa. Los resultados de los trabajos realizados hasta la fecha, no han mostrado por lo general asociaciones relevantes. Así, el estudio del polimorfismo RFLP en la posición -308 del TNFA, no ha mostrado asociaciones alélicas ni genotípicas con la CU, ni con la EC, en

varios trabajos realizados en Holanda⁵⁰⁶, Inglaterra^{460,466}, y Francia⁵⁰⁷. Unicamente un estudio inglés⁴⁶⁵ encontró una menor frecuencia del alelo TNF2 en la EC, y un trabajo holandés⁵⁰⁸ reportó una menor frecuencia de este mismo alelo en la CU. Por otra parte, se ha sugerido que el estudio de este polimorfismo permitiría subclasificar a los pacientes con EC, de tal forma que el alelo TNF2 se asociaría a las formas caracterizadas por la afectación del colon, patrón clínico fistulizante, y corticodependencia⁵⁰⁹. Con respecto al polimorfismo del primer intrón del TNFB, diversos trabajos realizados en Holanda^{508,510}, Francia⁵⁰⁷ y Japón⁵¹¹, no han evidenciado asociaciones alélicas ni genotípicas significativas con la EII.

3. OBJETIVOS

Los objetivos planteados en los tres trabajos que configuran la presente Tesis Doctoral son los siguientes:

ESTUDIO 1.

- 1.- Determinar la prevalencia de los ANCA en una serie de enfermos con EII de la provincia de Tarragona, y evaluar de esta forma su utilidad clínica como marcadores serológicos para el diagnóstico de la CU en nuestro medio.

- 2.- Evaluar la relación entre la seropositividad de los ANCA y las principales características demográficas y clínicas de la CU.

ESTUDIO 2.

- 1.- Valorar el papel de los ANCA como marcadores subclínicos de susceptibilidad genética a la EII en nuestra población, determinando su prevalencia en los familiares sanos de primer grado de pacientes con EII.

ESTUDIO 3.

1.- Analizar si determinados polimorfismos de los genes del TNF α , TNF β , e IL-1ra participan en la predisposición genética a la CU en nuestro medio.

2.- Evaluar si los polimorfismos estudiados caracterizan subgrupos de pacientes con CU definidos por el patrón clínico y el status ANCA.

4. PUBLICACIONES

4.1. ESTUDIO 1

Anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo en la enfermedad inflamatoria del intestino. **Med Clin (Barc) 1998**;110: 11-15.

AUTORES: Papo M, Quer JC, Pastor RM, García-Pardo G, Olona M, Prats E, Mirapeix E, Rodríguez R, Richart C.

4.2. ESTUDIO 2

Antineutrophil cytoplasmic antibodies in relatives of patients with inflammatory bowel disease. **Am J Gastroenterol 1996**;91: 1512-1515.

AUTORES: Papo M, Quer JC, Pastor RM, García-Pardo G, Prats E, Mirapeix E, Rodríguez R, Richart C.

4.3. ESTUDIO 3

Genetic heterogeneity within ulcerative colitis determined by an interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and antineutrophil cytoplasmic antibodies. **Eur J Gastroenterol Hepatol 1999**;11: 413-420.

AUTORES: Papo M, Quer JC, Gutierrez C, Broch M, Casellas F, Pastor RM, Olona M, Richart C.

4.1. ESTUDIO 1

**ANTICUERPOS ANTICITOPLASMA DE NEUTROFILO EN
LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA DEL INTESTINO.**

Anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo en la enfermedad inflamatoria del intestino

Michel Papo, Juan Carlos Quer, Rosa María Pastor^a, Graciano García-Pardo^b, Montserrat Olona^c, Eduard Prats^d, Eduard Mirapeix^e, Rosa Rodríguez^a y Cristóbal Richart^b

Sección de Aparato Digestivo. Servicios de ^aBioquímica, ^bMedicina Interna y ^cMedicina Preventiva. Hospital Universitario de Tarragona Joan XXIII. Universitat Rovira i Virgili. ^dServicio de Medicina Interna. Hospital Sant Joan. Reus. ^eServicio de Nefrología. Hospital Clínic i Provincial. Barcelona.

FUNDAMENTO: Determinar la prevalencia y utilidad diagnóstica de los anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo (ANCA) en una serie de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII) de la provincia de Tarragona.

PACIENTES Y MÉTODOS: Ciento cincuenta y seis sueros obtenidos de 116 pacientes con EII (75 con colitis ulcerosa [CU] y 41 con enfermedad de Crohn [EC]) y de 40 controles sanos fueron evaluados mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI).

RESULTADOS: Se detectaron ANCA en el 65% de los pacientes con CU, en el 12% de pacientes con EC ($p < 0,01$) y en el 2,5% de los controles ($p < 0,01$). La sensibilidad de los ANCA para el diagnóstico de la CU en pacientes con EII fue del 65%, con una especificidad del 88%, y un valor predictivo positivo del 91%. En los pacientes con CU no se encontró asociación significativa entre la presencia o el título de los ANCA y el tiempo de evolución, el curso clínico, la extensión, la actividad de la enfermedad o el tratamiento farmacológico recibido.

CONCLUSIONES: De forma similar a lo referido en otras poblaciones, la presencia de ANCA se asoció a la CU y en mucha menor proporción a la EC. Su determinación mediante IFI puede ser de utilidad para el diagnóstico diferencial entre las dos enfermedades.

Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease

BACKGROUND: The aim of the present study was to determine the prevalence and diagnostic usefulness of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in a Spanish population of patients with inflammatory bowel disease from the province of Tarragona.

PATIENTS AND METHODS: One hundred and fifty-six sera obtained from 116 patients with inflammatory bowel disease (75 ulcerative colitis and 41 Crohn's disease) and 40 healthy controls were tested using an indirect immunofluorescence assay.

RESULTS: ANCA were detected in 65% of patients with ulcerative colitis but in only 12% of patients with Crohn's disease ($p < 0.01$), and 2.5% of control subjects ($p < 0.01$). The overall sensitivity of the test for the diagnosis of ulcerative colitis was 65% with a specificity of 88% and a positive predictive value of 91%. Among patients with ulcerative colitis there was no relationship between the presence or titre of ANCA and the duration, the clinical course, the extent, the disease activity or the need for medical treatment.

CONCLUSIONS: In the population studied, ANCA occur more commonly in ulcerative colitis than in Crohn's disease, as reported in other populations. Their determination in patients with inflammatory bowel disease may be useful to differentiate ulcerative colitis from Crohn's disease.

Med Clin (Barc) 1998; 110: 11-15

Correspondencia: Dr. M. Papo.
Sección de Aparato Digestivo. Hospital Joan XXIII.
Mallabrè Guasch, 4. 43007 Tarragona.

Manuscrito aceptado el 6-5-1997

Los anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo (ANCA) dirigidos contra componentes de los gránulos primarios de los neutrófilos fueron inicialmente descritos en la granulomatosis de Wegener (GW) y otros síndromes vasculíticos¹⁻³. En estas enfermedades su relevancia clínica ha quedado bien establecida. Así, por una parte se ha demostrado que desempeñan un papel patogénico directo en el desarrollo de las mismas, y por otra se han revelado como importantes marcadores serológicos tanto para su diagnóstico como para su control evolutivo^{4,5}. Mediante la inmunofluorescencia indirecta (IFI) con neutrófilos fijados en etanol se distinguen dos patrones fundamentales de inmunotinción: el patrón citoplasmático (ANCA-c), que presenta una tinción granular del citoplasma, y el patrón perinuclear (ANCA-p), caracterizado por la tinción periférica del núcleo. La mayor parte de los ANCA-c corresponden a anticuerpos dirigidos contra la proteinasa 3 y se detectan principalmente en pacientes afectados de GW, mientras que los ANCA-p van dirigidos mayoritariamente contra la mieloperoxidasa y se asocian a formas idiopáticas de glomerulonefritis necrosantes rápidamente progresivas y otras vasculitis sistémicas⁴.

Desde que en el año 1990 Saxon et al⁶ refirieran la presencia de ANCA en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII), estudios posteriores han confirmado plenamente dicha asociación⁷⁻³⁰. Su prevalencia en los pacientes con colitis ulcerosa (CU) oscila entre un 23-88%, mientras que en la enfermedad de Crohn (EC) estos anticuerpos se detectan en la mayoría de series con mucha menos frecuencia (0-25%), y generalmente a títulos bajos. El principal patrón de IFI asociado a la EII es el ANCA-p, si bien se ha descrito, así mismo, el patrón ANCA-c. Aunque se ha detectado la presencia de anticuerpos dirigidos contra distintos componentes de los neutrófilos como la elastasa, catepsina G, lactoferrina, lisozima, betaglucuronidasa y proteína BPI (*bactericidal/permeability-increasing protein*) en algunos

pacientes, ninguno de ellos se ha presentado como exclusivamente responsable de la especificidad antigénica de los ANCA en la EI^{31,32}.

A pesar de que el significado clínico de los ANCA en la EI es desconocido, su alta especificidad para la CU en relación a otras patologías del colon les confiere un valor potencial como marcador serológico útil para el diagnóstico de la enfermedad³³. Sin embargo, las perceptibles diferencias de prevalencia reportadas en las series publicadas, y que se atribuyen en parte a diferencias entre las distintas poblaciones estudiadas³⁴, obligan a disponer de una prevalencia local de estos anticuerpos.

El objetivo del presente estudio ha sido determinar la prevalencia de los ANCA en una serie de enfermos con EI de la provincia de Tarragona, y evaluar de esta forma su utilidad clínica como marcador serológico para el diagnóstico de la CU. Así mismo, hemos investigado si su presencia se relaciona con las principales características demográficas y clínicas de la enfermedad.

Pacientes y métodos

Pacientes

En el periodo comprendido entre febrero de 1995 y junio de 1996 se estudiaron 116 pacientes consecutivos afectados de EI controlados por la sección de gastroenterología y el servicio de medicina interna de los dos hospitales participantes (Hospital Universitario Joan XXIII de Tarragona y Hospital Sant Joan de Reus). El diagnóstico de la enfermedad se estableció mediante los criterios clinicopatológicos convencionales de acuerdo con los descritos por Lennard-Jones et al³⁵. La localización y la extensión de la enfermedad se valoraron mediante endoscopia, estudios radiológicos y estudios isotópicos. La actividad de la enfermedad en el momento del estudio se estableció según el índice de Truelove-Witts³⁶ para la CU, y según el índice de Harvey-Bradshaw³⁷ para la EC. Setenta y cinco pacientes estaban afectados de una CU (31 varones y 44 mujeres; edad media, 40; límites, 18-76). Nueve pacientes presentaban una rectitis, 20 una rectosigmoiditis, 17 una colitis izquierda, 7 una colitis extensa y 16 una pancolitis. Los otros 6 pacientes estudiados habían sido colectomizados previamente (tres con ileostomía de Brooke y tres con reservorio ileoanal). En el momento del estudio, 28 pacientes presentaban un brote de actividad de la enfermedad (20 leve, seis moderado y dos grave) y 41 se encontraban en remisión. Dieciséis recibían tratamiento con glucocorticoides y cuatro con azatioprina. Catorce pacientes presentaban más de dos brotes anuales, mientras que los 55 restantes tenían menos de dos brotes por año. El grupo de pacientes con EC incluyó a 41 sujetos (12 varones y 29 mujeres; edad media, 31 años; límites, 16-80). La enfermedad estaba confinada al intestino delgado en 12 pacientes, otros 10 tenían afectación ileocolónica y 15 afectación exclusiva del colon. Así mismo, fueron incluidos 4 pacientes con afectación ileal intervenidos quirúrgicamente (resección del segmento ileal afectado y ciego con anastomosis ileocolónica). En el momento del estudio, 13 pacientes se encontraban en actividad de la enfermedad y 24 en remisión. Diez recibían tratamiento con corticoides y cuatro con azatioprina. Por último, se analizaron las muestras serológicas de 40 sujetos sanos donantes de sangre como grupo control (25 varones y 15 mujeres; edad media, 35; límites, 25-66).

Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Para la determinación de los ANCA, se utilizó la técnica de IFI sobre neutrófilos humanos fijados en etanol absoluto según la metodología de Wiik³⁸ propuesta durante el First International ANCA Workshop (Copenhague, Dinamarca, 1988). Los sueros se diluyeron 1/20 con tampón fosfato salino (PBS), y aproximadamente 35 µl de suero diluido se colocaron sobre pocillos de portas que contenían neutrófilos fijados en etanol absoluto (INOVA Diagnostics, San Diego, EE.UU.). Las incubaciones se practicaron en cámaras humidificadas a temperatura ambiente durante 30 min. Posteriormente, se lavaron con PBS y se incubaron con anti-IgG humana fluoresceinada (INOVA Diagnostics) otros 30 min. Finalmente, las preparaciones fueron lavadas nuevamente con PBS, cubiertas con glicerina tamponada y examinadas con el microscopio de fluorescencia a 40 aumentos de forma ciega siempre por el mismo investigador (RMP). Se consideraron resultados positivos los patrones de IFI ANCA-p y ANCA-c. Los sueros positivos se titularon mediante diluciones dobles seriadas hasta 1:1.280. Finalmente, los sueros que presentaron un patrón nuclear o de forma dudosa ANCA-p fueron evaluados para la presencia de anticuerpos antinucleares (ANA) utilizando portas comerciales con células HEP2 como sustrato (INOVA Diagnostics).

Análisis estadístico

Utilidad de los ANCA para el diagnóstico de la CU en pacientes con EI. El estudio comparativo sobre la prevalencia de los ANCA en los distintos grupos de estudio se realizó mediante el test de la χ^2 . Para evaluar la utilidad de los ANCA para el diagnóstico de la CU se calcularon la sensibilidad (proporción de pacientes con CU que tienen ANCA positivo), la especificidad (proporción de pacientes con EC que tienen ANCA negativo), el valor predictivo positivo (proporción de pacientes con ANCA positivo que tienen CU) y el valor predictivo negativo (proporción de pacientes con ANCA negativo que tienen EC). Para cada valor se calculó el intervalo de confianza del 95% (IC del 95%).

Relación entre los ANCA y las características clínicas en los pacientes con CU. De acuerdo a los datos descritos en la bibliografía³³, se estimó que para encontrar diferencias en la actividad clínica entre pacientes ANCA positivo y pacientes ANCA negativo, con un error alfa del 5% y un error beta del 20%, eran necesarios 76 pacientes. Se efectuó un análisis bivariable para estudiar la asociación de la presencia de ANCA con las características demográficas y clínicas en la CU, y se utilizó la prueba no paramétrica de la U de Mann-Whitney para variables cuantitativas y la prueba de la χ^2 para variables cualitativas. Para variables

de más de 2 categorías se aplicó también la prueba de la χ^2 para la tendencia lineal. Por último, para evaluar la asociación entre los parámetros clínicos de la enfermedad y el título de ANCA se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Resultados

Prevalencia de anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo en la enfermedad inflamatoria intestinal

Se detectaron ANCA en 49 de 75 pacientes (65%) con CU, 5 de 41 pacientes (12%) con EC y únicamente en un sujeto del grupo control (2,5%) ($p < 0,01$ para la CU en relación a la EC y el grupo control). El patrón de IFI que se observó de forma predominante fue el ANCA-p (42 de 54, 78%), mientras que en 12 pacientes se detectó un patrón ANCA-c (9 pacientes con CU y tres con EC). Los resultados se resumen en la tabla 1.

Los títulos de ANCA en los pacientes con CU oscilaron entre 1:20 y 1:640 (mediana, 1:40). En los pacientes con EC los títulos oscilaron entre 1:20 y 1:40 (mediana, 1:20) (fig. 1).

Anticuerpos antinucleares (ANA)

Tres pacientes con CU y un paciente con EC presentaron un patrón nuclear o de forma dudosa ANCA-p mediante la IFI sobre neutrófilos fijados en etanol. Todos ellos fueron positivos para ANA cuando fueron evaluados sobre células HEP2.

Sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo de la determinación de anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo mediante inmunofluorescencia indirecta para la colitis ulcerosa

La sensibilidad y la especificidad de los ANCA para la CU fueron de un 65% (IC del 95% = 53,5-76) y de un 88% (IC del 95% = 74-96), respectivamente. El valor predictivo positivo fue del 91% (IC del 95% = 80-97), y el valor predictivo negativo del 58% (IC del 95% = 44,8-70,5).

Relación entre los anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo y las principales características demográficas y clínicas en los pacientes con colitis ulcerosa

La correlación entre la presencia de los ANCA y las características demográficas y clínicas en los pacientes con CU se indica en la tabla 2. No existió relación entre la positividad de los ANCA y el sexo, la edad, el tiempo de evolución, el número de brotes anuales, la extensión, la actividad clínica ni el tratamiento farmacológico recibido. Tampoco encontramos relación entre el título de los anticuerpos o patrón de fluorescencia y los parámetros estudiados. Tres de los 6 pacientes

TABLA 1
Prevalencia de los ANCA en los pacientes con colitis ulcerosa (CU), enfermedad de Crohn (EC) y controles sanos

Diagnóstico	Número de pacientes	ANCA, n (%)	Patrón IFI	
			ANCA-p, n (%)	ANCA-c, n (%)
CU	75	49 (65)*	40 (82)	9 (18)
EC	41	5 (12)	2 (40)	3 (60)
Controles sanos	40	1 (2,5)	1	

* $p < 0,01$ frente a otros grupos. ANCA: anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo. IFI: inmunofluorescencia indirecta; ANCA-p: patrón perinuclear; ANCA-c: patrón citoplasmático.

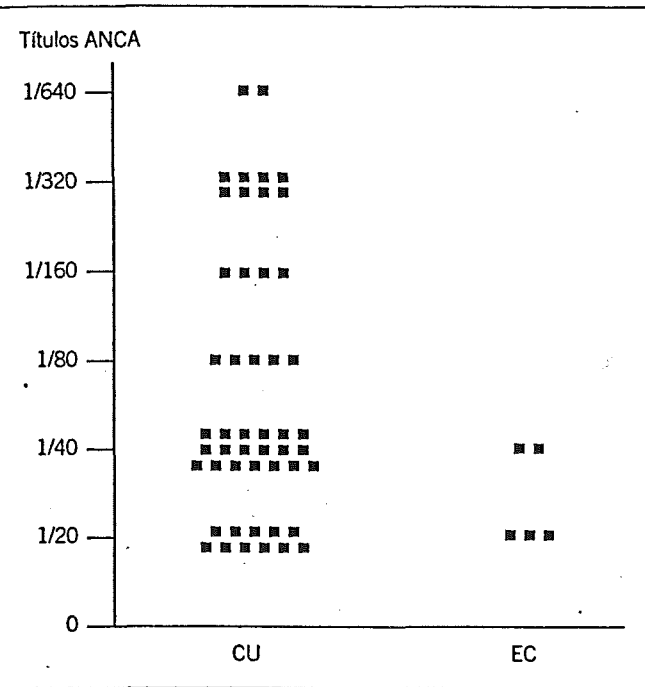


Fig. 1. Títulos de anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo (ANCA) de los pacientes con colitis ulcerosa (CU) y enfermedad de Crohn (EC).

colectomizados fueron positivos para ANCA (dos portadores de reservorio ileoanal y uno con ileostomía de Brooke).

Discusión

La etiología de la EII es desconocida. La teoría etiopatogénica más extensamente aceptada es que la enfermedad se desarrolla en sujetos genéticamente predispuestos, como consecuencia de la interacción entre factores ambientales e inmunológicos³⁹. Entre las numerosas alteraciones inmunológicas descritas en la EII, es bien conocida la presencia de diversos autoanticuerpos en los pacientes afectados. En la CU, se detectan anti-

cuerpos dirigidos contra las células epiteliales del colon, anticuerpos antilinfocitotóxicos y anticuerpos contra las células endoteliales vasculares⁴⁰. El significado de estos anticuerpos en la EII es incierto, pero su relevancia clínica parece limitada debido a que no son específicos de la enfermedad, y además se detectan con una frecuencia generalmente baja. Durante los últimos años, ha quedado bien establecida la asociación entre los ANCA y la EII, en concreto la CU^{7,30}. Al igual que los otros anticuerpos asociados a la CU, la evidencia actual indica que los ANCA tampoco participan en la patogenia de la enfermedad. Por el contrario, su elevada especificidad para la CU, la

ausencia de relación con la extensión y la actividad de la enfermedad, así como su persistencia en pacientes colectomizados, sugieren que los ANCA representan importantes marcadores serológicos de la enfermedad, y no simplemente un epifenómeno secundario a la inflamación colónica³³. En consecuencia, en los últimos años se ha considerado que su determinación puede contribuir al diagnóstico de la CU, además de posibilitar el diagnóstico diferencial con otras colitides, en particular con la EC³³. Para ello, teniendo en cuenta las notables diferencias de prevalencia entre las series publicadas, es preciso conocer la misma entre la población de pacientes con EII del área geográfica de estudio. Los resultados de nuestro trabajo han demostrado la presencia de ANCA en 49 de 75 pacientes con CU (65%), pero únicamente en 5 de 41 pacientes con EC (12%). De esta forma, la determinación de los ANCA presentó una alta sensibilidad y especificidad diagnósticas para la CU (65 y 88%, respectivamente). Nuestros resultados coinciden con los de la mayoría de trabajos publicados^{6-11,14,20-22,29}. Por el contrario, algunos autores señalan que, si bien los ANCA pueden ser de utilidad para diferenciar la CU de ciertas colitides, su valor discriminatorio frente a la EC es limitado debido a la baja prevalencia que encuentran en la CU o una mayor frecuencia a la reportada previamente en la EC^{17,24,27}. Las causas de tan notables discrepancias sobre la prevalencia de los ANCA en la EII no han sido del todo esclarecidas. Se han propuesto dos explicaciones posibles y no excluyentes. En primer lugar, la utilización de distintas técnicas para su detección puede ser parcialmente responsable³⁴. Las técnicas más empleadas y de mayor difusión en la actualidad son el análisis del inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA) y la IFI. En la mayoría de los estudios, la primera ha evidenciado una más alta sensibilidad pero menor especificidad que la IFI^{6,7,10}. La menor especificidad del ELISA viene probablemente determinada por la inmunoreactividad no específica que se obtiene al utilizar neutrófilos «enteros» como antígeno: el test puede detectar ANCA distintos a los responsables de éstos en la CU. Por otra parte, los resultados de la IFI son más reproducibles y se correlacionan bien cuando se comparan los mismos sueros evaluados en laboratorios independientes, como demuestra el grupo de Oudkerk Pool et al^{14,18} y el nuestro propio⁴¹. La IFI, no obstante, cuenta con el inconveniente de la subjetividad de su interpretación, sobre todo cuando los sueros contienen otros anticuerpos como los ANA, que pueden presentar patrones de tinción prácticamente indistinguibles del patrón ANCA-p. En nuestro estudio,

TABLA 2
Relación entre la presencia de ANCA y las principales características demográficas y clínicas en los pacientes con colitis ulcerosa (CU)

	ANCA positivo	ANCA negativo
Número de pacientes	49	26
Edad media (años)	41 (DE = 16)	37 (DE = 14)
Sexo V/M	19/30	12/14
Tiempo de evolución (meses)	70 (DE = 63)	74 (DE = 90)
Extensión		
Proctitis (%)	6 (12)	3 (11,5)
Proctosigmoiditis (%)	12 (25)	8 (31)
Colitis izquierda (%)	15 (30,5)	2 (8)
Colitis extensa (%)	1 (2)	6 (23)
Pancolitis (%)	12 (24,5)	4 (15)
Colectomía (%)	3 (6)	3 (11,5)
Actividad clínica		
Actividad (%)	20 (43)	8 (35)
Remisión (%)	25 (57)	15 (65)
Número de brotes anuales		
Menos de dos brotes/año (%)	37 (80)	18 (78)
Más de dos brotes/año (%)	9 (20)	5 (22)
Tratamiento médico		
Glucocorticoides	10	6
Azatioprina	2	2

ANCA: anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo; DE: desviación estándar.

TABLA 3

Prevalencia de los ANCA en la CU en diferentes series en España

Autor	Número de pacientes	Método de detección	Prevalencia de ANCA (%)	Patrón ANCA	
				ANCA-p (%)	ANCA-c (%)
Muñoz et al ²⁰	46	IFI	60,8	82	18
Tural ²¹	52	IFI	73	84,2	15,7
Oudkerk Pool et al ²³	79	IFI		71	
Esteve et al ²⁸	54	IFI	55,5*	86,5	3,5
García Herola et al ²⁹	75	IFI	41		

*El 10% patrón ANCA mixto. ANCA: anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo; CU: colitis ulcerosa; ANCA-p: patrón perinuclear; ANCA-c: patrón citoplasmático; IFI: inmunofluorescencia indirecta.

los cuatro sueros que presentaron un patrón nuclear o de forma dudosa ANCA-p fueron positivos para ANA al examinarlos en portas con células HEp2. Ciertamente, la identificación del antígeno (o de los antígenos, en caso de que sean varios) responsable de los ANCA en la CU permitirá el desarrollo de técnicas más específicas para soslayar estos problemas metodológicos. En segundo lugar, y como previamente se ha señalado, la divergencia de resultados puede atribuirse a diferencias reales de prevalencia entre las distintas poblaciones estudiadas. En efecto, la frecuencia de ANCA reportada en la CU varía ampliamente en distintas áreas geográficas, siendo del 72-85% en Norteamérica^{6,7,33}, del 58-83% en Alemania^{3,13,42}, del 45-79% en Holanda^{14,15} y del 41-76% en Inglaterra^{9,19,25,26}. La prevalencia reportada en nuestro país oscila entre un 41 y un 73%^{18,20,21,28,29} (tabla 3). Estas cifras, exceptuando el estudio de García Herola et al²⁹, son discretamente superiores a las descritas en los otros países europeos del área mediterránea: el 39,8-48% en Italia²²⁻²⁴, el 46-52% en Francia^{11,16,18} y el 30% en Grecia¹². Estudios en los que se han analizado simultáneamente sueros de distintas poblaciones en laboratorios independientes han confirmado diferencias regionales significativas, y han demostrado así que las discrepancias no se deben únicamente a diferencias metodológicas^{18,43}.

En nuestro estudio, al igual que en la mayoría de trabajos publicados, no encontramos relación entre la presencia de los ANCA y el tiempo de evolución, el curso clínico, la extensión, la actividad de la enfermedad o el tratamiento farmacológico recibido. Tampoco existió relación entre el título o patrón de fluorescencia y los parámetros clínicos valorados. Sin embargo, la ausencia de relación entre los ANCA y las características clínicas de la CU ha sido cuestionada por algunos autores. Así, Tural²¹ y Rump et al²² encuentran una correlación entre su positividad y la actividad de la enfermedad. Rump et al²² describen, además, su negativización en pacientes que entran en remisión tras tratamiento esteroideal o tras la colecto-

mía. De forma similar, otros autores hallan relación entre el título de los ANCA y la actividad clínica de la CU^{8,10,17,42}. Por otra parte, se ha sugerido que el estado de los ANCA se relacionaría con la evolución de la enfermedad, de tal forma que su presencia se asociaría a un curso clínico más agresivo. Así, mientras que Vecchi et al²² encuentran una mayor prevalencia entre los pacientes que presentan más exacerbaciones anuales, Lindgren et al⁴⁴ destacan una muy baja prevalencia (9%) en un grupo de enfermos caracterizados por una remisión clínica prolongada. Finalmente, Sandborn et al⁴⁵ han reportado recientemente una frecuencia incrementada en pacientes con colitis izquierda resistentes al tratamiento médico, sugiriendo una posible asociación entre los ANCA y una resistencia relativa al tratamiento farmacológico en la CU. No obstante, como previamente ya se ha hecho referencia, cabe destacar que la tendencia más constante observada en la bibliografía es la ausencia de relación entre la presencia de ANCA y las características clínicas de la enfermedad^{6,7,9,11-15,20,24,27,29}.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Davis DJ, Moran JE, Niall JF, Ryan GB. Segmental necrotizing glomerulonephritis with antineutrophil antibody: possible arbovirus aetiology. *Br Med J* 1982; 285: 606.
- Van der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S, Wiik A, Permin H, Van Es LA et al. Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* 1985; 1: 425-429.
- Falk RJ, Jennette JC. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Eng J Med* 1988; 318: 1.651-1.657.
- Kallenberg CGM, Brouwer E, Weening JJ, Cohen Tervaert JW. Antineutrophil cytoplasmic antibodies: current diagnostic and pathophysiological potential. *Kidney Intern* 1994; 46: 1-15.
- Bosch X, Mirapeix E, Font J, López-Soto A, Rodríguez R, Vivancos J et al. Anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo: utilidad diagnóstica en vasculitis y glomerulonefritis. *Med Clin (Barc)* 1994; 102: 412-417.

- Saxon A, Shanahan F, Landers C, Ganz T, Targan S. A distinct subset of antineutrophil cytoplasmic antibodies is associated with inflammatory bowel disease. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 86: 202-210.
- Duerr RH, Targan SR, Landers CJ, Sutherland LR, Shanahan F. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in ulcerative colitis: comparison with other colitides/diarrheal illnesses. *Gastroenterology* 1991; 100: 1.590-1.596.
- Seibold F, Weber P, Klein R, Berg PA, Wiedmann KH. Clinical significance of antibodies against neutrophils in patients with inflammatory bowel disease and primary sclerosing cholangitis. *Gut* 1992; 33: 657-662.
- Cambridge G, Rampton DS, Stevens TRJ, McCarthy DA, Kamm M, Leaker B. Antineutrophil antibodies in inflammatory bowel disease: prevalence and diagnostic role. *Gut* 1992; 33: 668-674.
- Romas E, Paspaliaris B, D'Apice AJF, Elliott PR. Autoantibodies to neutrophil cytoplasmic (ANCA) and endothelial cell surface antigens (AECA) in chronic inflammatory bowel disease. *Aust NZ J Med* 1992; 22: 652-659.
- Colombel JF, Reumaux D, Duthilleul P, Noël LH, Gower-Rousseau C, Paris JC et al. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterol Clin Biol* 1992; 16: 656-660.
- Dalekos GN, Manoussakis MN, Goussia AC, Tsianos EV, Moutsopoulos HM. Soluble interleukin-2 receptors, antineutrophil cytoplasmic antibodies, and other autoantibodies in patients with ulcerative colitis. *Gut* 1993; 34: 658-664.
- Deusch K, Oberstadt K, Schaedel W, Weber M, Classen M. p-ANCA as a diagnostic marker in ulcerative colitis. *Adv Exp Med Biol* 1993; 336: 527-531.
- Oudkerk Pool M, Ellerbroek PM, Ridwan BU, Goldschmeding R, Von Blomberg BME, Peña AS et al. Serum antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease are mainly associated with ulcerative colitis. A correlation study between perinuclear antineutrophil cytoplasmic autoantibodies and clinical parameters, medical, and surgical treatment. *Gut* 1993; 34: 46-50.
- Mulder AHL, Broekroelofs J, Horst G, Limburg PC, Nelis GF, Kallenberg CGM. Antineutrophil antibodies in inflammatory bowel disease recognize different antigens. *Adv Exp Med Biol* 1993; 336: 519-522.
- Reumaux D, Colombel JF, Delecourt L, Noël LH, Cortot A, Duthilleul P. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in patients with ulcerative colitis (UC): influence of disease activity and familial study. *Adv Exp Med Biol* 1993; 336: 515-518.
- Broekroelofs J, Mulder AHL, Nelis GF, Westerveld BD, Cohen Tervaert JW, Kallenberg CGM. Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in sera from patients with inflammatory bowel disease (IBD). *Dig Dis Sci* 1994; 39: 545-549.
- Oudkerk Pool M, Roca M, Reumaux D, Bouma G, Peña AS, Colombel JF et al. The value of p-ANCA as a serological marker for ulcerative colitis in different european regions. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1994; 6: 399-403.
- Patel RT, Pall AA, Stokes R, Birch D, Hail C, Adu D et al. Autoantibody prevalence and association in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1994; 6: 705-709.
- Muñoz C, Gómez R, Alcántara M, Martínez JL, Artaza T, Flores V et al. Serum antineutrophil cytoplasmic antibodies in ulcerous colitis: clinical utility [resumen]. *Gut* 1994; 35 (Supl 4): A30.
- Tural C. Anticuerpos anticitoplasma de los neutrófilos y enfermedad inflamatoria intestinal [tesis doctoral]. Barcelona: Universitat Autònoma. 1994.
- Vecchi M, Bianchi MB, Sinico RA, Radice A, Meucci G, Torgano G et al. Antibodies to neutrophil cytoplasm in Italian patients with ulcerative colitis: sensitivity, specificity and recognition of putative antigens. *Digestion* 1994; 55: 34-39.
- Monteleone G, Doldo P, Marasco R, Parrello T, Imeneo M, De Medici A et al. Perinuclear neu-