

## ANTICUERPOS ANTI CITOPLASMA DEL NEUTROFILO (ANCA) EN ANCIANOS

FEDERICO MOSCARDI, JOSE L. IANIRO, MIGUEL J. MAXIT

**Resumen** El envejecimiento implica frecuentemente en humanos y animales disregulación de la respuesta inmune. En lo que hace a la inmunidad humoral se puede observar que ancianos «sanos» tienen autoanticuerpos contra una variedad de antígenos autólogos: nucleares, tiroideos, microsomales, factor reumatoideo y otros. Un nuevo autoanticuerpo, ANCA (*antineutrophil cytoplasmic antibodies*), descrito en 1982 es un marcador serológico de ciertas vasculitis necrotizantes y enfermedades inflamatorias intestinales. El objeto de este trabajo es determinar la eventual aparición de ANCA en sus dos formas: C-ANCA (patrón de fluorescencia citoplasmática) y P-ANCA (patrón de fluorescencia perinuclear) en la población de 70 o más años concurrente a este hospital sin sugerencia clínica de vasculitis o enfermedad que haya sido asociada. También se determinó la frecuencia de a. antinucleares en ausencia de patología en la misma población. En 447 ancianos se encontró una frecuencia total de ANCA de 1,8%, pero en ausencia de patología las frecuencias de C-ANCA fueron 0% y de P-ANCA 0,2% mientras que la frecuencia de a. antinucleares sin patología (2,9%) estuvo dentro de los valores descriptos en la literatura. Categorizando el grupo de ancianos por patología se observó una sugerencia de asociación entre C-ANCA y cáncer. Se concluye que pese a la disregulación inmunológica que se asocia a la vejez y a diferencia de otros autoanticuerpos, ANCA no aparece en ausencia de patología, posiblemente por ser causa de la misma.

**Palabras clave:** ANCA, AAN, ancianos

El envejecimiento se asocia en humanos y animales a trastornos de la respuesta inmune<sup>1-4</sup>. En lo que hace a la inmunidad humoral se puede observar que ancianos normales tienen autoanticuerpos contra una variedad de componentes celulares<sup>2, 17</sup>. Los anticuerpos antinucleares han sido descriptos en 2,5% al 19% de ancianos sin evidencia clínica de la patología que se asocia a ellos<sup>4, 17</sup>. Un nuevo autoanticuerpo, ANCA («antineutrophil cytoplasm antibodies»), descrito en 1982, es un marcador serológico de ciertas vasculitis necrotizantes<sup>18, 19</sup> y de enfermedades inflamatorias intestinales<sup>14, 21</sup>. El objeto de este trabajo es determinar la eventual aparición de ANCA en sus dos formas: C-ANCA (patrón de fluorescencia citoplasmática) y P-ANCA (patrón de fluorescencia perinuclear) sin sugerencia clínica

de vasculitis, u otra enfermedad que haya sido asociada, en la población mayor de 70 años concurrente a este hospital.

### Material y métodos

La técnica empleada para investigar ANCA (Inmunofluorescencia sobre neutrófilos humanos fijados con etanol) también detecta anticuerpos antinucleares. Se registró la presencia de a. antinucleares en la misma población, según la técnica para ANCA. Los pacientes positivos para ANCA o AAN fueron clasificados según manifestaran o no patología que se asocia a vasculitis o colagenopatía, determinándose las frecuencias correspondientes. La frecuencia de AAN obtenida en ancianos sin patología asociada se comparó con la referida en la bibliografía para ancianos «sanos».

### Sujetos del estudio

Se obtuvo suero de 447 personas concurrentes al laboratorio de este hospital, 269 mujeres y 178 hombres, de 70 a 99 años (promedio 77,9, D.S. 5.20) que se divi-

Recibido: 6-IX-1996

Aceptado: 30-X-1996

Dirección postal: Dr. Federico Moscardi, Hospital Privado de Comunidad, Córdoba 4545, 7600 Mar del Plata, Argentina



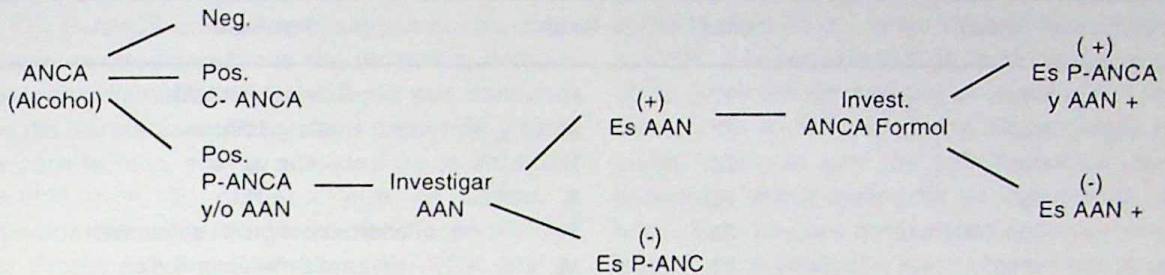


Fig. 1.— Protocolo serológico para discriminar ANCA de AAN

dieron según grupos etarios (70 a 74, 75 a 79, 80 a 84 y > de 85). El único criterio de selección fue tener 70 o más años y disponer de los datos de Hb, recuento leucocitario y ERS simultáneos con la extracción. El resto de los datos necesarios para definirlos como presentando o no patología asociada al autoanticuerpo se obtuvo de las respectivas Historias Clínicas. Los sueros se congelaron a -20 °C hasta el momento de su uso (*desde inmediato hasta 60 días*).

#### Detección de ANCA Etanol

Se usó el método de van der Woude<sup>5</sup>, obteniendo los neutrófilos a partir de personas sanas grupo 0 por dilución con Dextran 70 (Roux Ocefá) o por centrifugación diferencial con Ficoll Hypaque 1.077 y 1.119 (Sigma). Los sueros se ensayaron en dilución 1/20 y, los positivos, se titularon. Se empleó la antiglobulina humana fluoresceinada (Kallestad N° 110) diluida 1/100. Las improntas propias mostraron una sensibilidad igual o superior a las comerciales.

#### Detección de ANCA Formol/Acetona

El fijado con Formol/Acetona sobre células de leucemia mieloide crónica al destruir los antígenos reconocidos por los anticuerpos antinucleares, impide selectivamente este patrón, pero no afecta la capacidad del sustrato de detectar ANCA, aunque sin discriminar entre C y P ANCA, por ser este último un artefacto originado por la fijación con etanol<sup>6</sup>. El fijado con formol/acetona también puede hacerse con neutrófilos,<sup>7</sup> con resultados semejantes, aunque en nuestra experiencia con moderada disminución del título.

La única diferencia metodológica con ANCA etanol es el fijado con 9,25% de formol y 45% de acetona en PBS pH 7,2, 45 segundos a -20°C<sup>7</sup>.

#### Detección de anticuerpos antinucleares

Los sueros con patrón p-ANCA se investigaron para ac. antinucleares diluidos 1/20 sobre cortes de riñón, es-

tómago e hígado de rata y ocasionalmente sobre células Hep 2. Los a. antinucleares son detectados con igual sensibilidad por los neutrófilos humanos fijados que por los cortes murinos. ANCA se descubrió investigando a. antinucleares sobre neutrófilos.

Se definió como ANCA +, sin evidencia clínica de vasculitis, a aquellos pacientes ANCA +, que no manifestaran: a) Fiebre prolongada, b) Artralgias o artritis, c) Polineuritis, d) Nefritis o daño renal, e) Rash cutáneo, púrpura o úlceras, f) Infiltrados pulmonares, y e) Daño del SNC.

Se definió como AAN+, sin evidencia clínica de collagenopatía, a aquellos pacientes AAN +, sin: a) Sint. articulares, b) sint. renales c) enf. cutánea, d) enf. de serosas, e) enf. hematológica, f) enf. pulmonar, e) enf. neurológica, f) ERS elevada, y g) gamma globulina elevada.

#### Protocolo de estudio de los sueros

La positividad de la técnica de Inmunofluorescencia para ANCA sobre neutrófilos fijados con alcohol puede indicar c-ANCA (patrón citoplasmático), p-ANCA (patrón perinuclear) o anticuerpos antinucleares. Estos dos últimos dan patrones semejantes.

Para discriminar entre ambos se siguió el protocolo descrito en la figura 1.

#### Análisis estadístico

La relación entre C-ANCA y cáncer se estudió mediante una tabla de doble entrada, determinándose el valor P de los chi cuadrados con el método «Fisher Exact» adecuado para «n» menores de 5.

## Resultados

La frecuencia, en ausencia de patología asociada, de C-ANCA fue 0% Un solo P-ANCA no presentó patología asociada (0,2%) en los 447



TABLA 1.— Ancianos ANCA +

ANCA	Título	Edad	Sexo	Patología
C	1/40	87	F	S. febril. ERS 70
C	1/20	77	M	Ca. gástrico
C	1/40	75	F	Ca. vulva
P	1/80	76	F	A.R.
P	1/20, AAN:1/40	82	M	Polineuritis, fibrosis pulmonar
P	1/160	77	M	Leucemia mielomonocítica
P	1/80, AAN:1/40	79	M	Infil. pulmonar. ERS 80, Wegener?
P	1/20	79	M	Ninguna

pacientes. La frecuencia total de ANCA + fue 1,8% (8/447) correspondiendo a 3 C-ANCA (0,7%) y 5 P-ANCA (1,1%), dos de los cuales tenían también a. antinucleares (Tabla 1).

Cuando los 447 pacientes fueron categorizados por patologías el grupo de 61 ancianos con diagnóstico de cáncer sugirió una asociación entre C-ANCA y esa enfermedad y C-ANCA y mortalidad durante el año que duró el estudio. El «P» para el pequeño número de casos positivos (Fisher Exact) estuvo en el límite de la *significatividad*. (Tablas 2 y 3).

La frecuencia de anticuerpos antinucleares en ancianos sin patología fue 2,9% (13/447), con

títulos de 1/20 a 1/80. El total de muestras positivas fue 6,9% (31/447).

El grupo de sueros positivos para autoanticuerpos sin patología, pequeño en valor absoluto, no mostró asociación con sexo ni subgrupos etarios.

## Discusión

Usualmente el envejecimiento implica en humanos y animales disregulación inmunológica que afecta las respuestas celular y humoral. En esta última se puede observar aumentos de IgG e IgA y presencia de Factor Reumatoideo, anticuerpos antitiroideos y antinucleares sin evidencia de patología asociada.<sup>17</sup> Esto podría asociarse a una disminución de la actividad supresora<sup>8</sup>. Se ha descrito un antígeno del envejecimiento marcador de células senescentes, que fijando autoanticuerpos fisiológicos, permite su eliminación por los fagocitos<sup>20</sup>. Los reportes sobre la respuesta inmune en ancianos son a veces contradictorios reflejando los efectos del entorno en las historias individuales.

Un mismo estudio informa grandes oscilaciones en la frecuencia de a. antinucleares en subgrupos etarios consecutivos<sup>17</sup>.

Las conclusiones válidas requieren estudiar muchos casos. El significado de la presencia de autoanticuerpos, por ejemplo, antinucleares, sin patología, independientemente de la edad, es incierto. Es sabido que se pueden encontrar en familiares sanos, de pacientes con colagenosis y que su presencia en enfermos, no refleja la actividad de la enfermedad. Sin embargo, Walford<sup>8</sup> ha sugerido una posible interferencia de los autoanticuerpos con la capacidad reparadora de

TABLA 2.— Relación entre C- ANCA y cáncer

	Cancer +vo	Cancer -vo	Total
C- ANCA +	2	1	3
C- ANCA -	59	385	444
Total	61	386	447

Fisher exact.: P = 0,050

TABLA 3.— Relación entre C-ANCA y muerte en pacientes con cáncer

	Muertos	Vivos	Total
C-ANCA +	2	0	2
C-ANCA-	12	47	59
Total	14	47	61

Fisher exact.: P = 0,049



DNA con disminución de sobrevida. También McKay<sup>8</sup> le atribuye capacidad de acortar la vida.

C y P ANCA son autoanticuerpos contra constituyentes citoplasmáticos del neutrófilo, detectados por inmunofluorescencia, que son marcadores de ciertas vasculitis y cuya presencia y título se correlaciona con la actividad de la enfermedad<sup>11-13, 18, 19</sup>. El primero, que se asocia a granulomatosis de Wegener, tiene especificidad por Proteinasa 3 y CAP 57, el P-ANCA que se describe en distintas enfermedades con vasculitis reconoce mieloperoxidasa, elastasa y lactoferrina.

ANCA ha sido descrito en hasta un 5% de personas sanas<sup>14</sup> pero de la mayor parte de los trabajos consultados con casuística numerosa se deducen porcentajes mucho menores. Laboratorios que han hecho «screening» en miles de sueros, encuentran entre 0,5 y 1,5% positivos<sup>15, 23</sup>. Una de las causas de la discrepancia puede ser que existen patrones de fluorescencia que semejan ANCA, como P-ANCA Atípico y Anti nuclear Granulocito Específico<sup>9, 10, 21, 24</sup> y pueden confundirse con él.

No conocemos ninguna investigación de ANCA en ancianos. El presente estudio encuentra que los ANCA, a diferencia de otros autoanticuerpos prácticamente no aparecen (1/447 P-ANCA) en ellos en ausencia de patología. Esto puede estar relacionado con la evidencia de que ANCA, a diferencia de AAN, es causante de lesión, induciendo en los neutrófilos la liberación de enzimas proteolíticas, prolongando su acción y produciendo vasculitis.<sup>11, 12</sup>

Con respecto a la sugerencia de asociación entre C-ANCA y cáncer, constituye una observación que requiere la confirmación de un estudio más amplio y en condiciones mejor definidas. Un reporte reciente describe ANCA asociado a vasculitis paraneoplásica<sup>16</sup>. También se ha asociado ANCA a cáncer en pacientes HIV+. De estar ANCA ligado a cáncer ello podría tener relación con la necrobiosis de neutrófilos que se observa en algunos tumores y con el hecho de que el «Factor de necrosis tumoral» se requiera «in vitro» para la degranulación de neutrófilos por los ANCA<sup>26</sup>.

El 2,9% de AAN + que encontramos en ancianos sin patología coincide con el descrito por Stites et al en Inmunología Básica y Clínica, para el intervalo de 70 a 79 años<sup>17</sup>.

Otros autores encuentran valores más altos<sup>4</sup>. Esto podría deberse a causas metodológicas como la dilución del suero en ensayo (desde 1/2 a 1/20), a la sensibilidad de la técnica y al rigor de la definición de anciano sin patología. La frecuencia de AAN en ancianos sin patología asociada, coincide con los valores bajos de los descriptos en la bibliografía para ancianos «sanos». Esto sugiere que los dos métodos de selección de la población a estudiar definen grupos semejantes para los fines de este estudio.

## Summary

### *Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in the elderly*

Aging in animals and human beings is frequently accompanied by a disarray of the immune response. In subjects 70 years of age or older the frequency of some autoantibodies (anti-nuclear, RF, antithyroid anti-parietal cell and others) without any associated pathology is clearly increased when compared against a younger population. ANCA (antineutrophil cytoplasmic antibodies) is considered to be a good marker for necrotizing systemic vasculitis. This auto-antibody is known to show two patterns when investigated by indirect immunofluorescence on alcohol fixed normal neutrophils: c-ANCA (cytoplasmatic fluorescence) and p-ANCA (perinuclear fluorescence), each one associated with different pathologies.

The purpose of this work was to investigate how frequently was ANCA found in subjects 70 years of age or older without evidence of any associated pathology. ANCA was investigated in 447 ambulatory patients from our hospital and the only requirement to be included was age. The ANCA+ patients were divided into having or not clinical suspicion of vasculitis, according to the medical charts we reviewed. The same methodology was applied to investigate the frequency of antinuclear antibodies (ANA+) without clinical evidence of any associated pathology. This frequency was compared with that described in the literature as «ANA+ in healthy old subjects».

In the 447 patients studied, 8 were positive for ANCA (1.8%), 3 for c-ANCA and 5 for p-ANCA. None of the 3 c-ANCA and only 1 of 5 p-ANCA belonged to patients without any associated pathology.

A possible relationship between c-ANCA and cancer is discussed.



As ANCA+ cases were very few no relationship with gender or age was investigated. The extremely low finding of ANCA+ in the absence of pathology, even considering old people's frequent immunological disarray suggests that in opposition to other autoantibodies, the presence of ANCA is always related to disease.

The frequency of ANA+ without associated pathology was 2.9% , being this value on the lower limits of what is described in the literature. This can be due to different methodology or to the scope of the definition of «without associated pathology».

## Bibliografía

- Kay M. Immunological aspects of aging. In: Aging, Immunity and Arthritic Disease, Kay, Galpin and Makinodan, New York: Raven Press, 1980.
- Dubey D, Yunis E. Aging and nutritional effects in immune functions in humans. In: Basic and Clinic Immunology, San Francisco: Stites and Terr Appleton and Lange, 1991.
- Tomer Y. Ageing and autoantibodies *Autoimmunity* 1988; 1: 141-9.
- Pérez L, Rodríguez C, Sepúlveda J, Silva M. Autoimmune phenomena in the elderly. *Rev Med Chil* 1991; 119: 287-92.
- van de Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S. Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's Granulomatosis. *Lancet* 1985; 1: 425-9.
- Chevallier A, Nobel LH, Renier G, et al. Determination of ANCA specificity by IF on CML cells. *J Immunol Meth* 1992; 147: 101-9.
- Falk RJ, Jennett CJ. ANCA with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 1988; 318: 1651-7.
- Ford P. The immunology of ageing, *Clin Rheum Dis* 1986; 12:
- Savigne JA, Gallicchio MC, Stockman A, et al. Anti-neutrophil cytoplasm antibodies in Rheumatoid Arthritis. *Clin Exp Immunol* 1991; 86: 92-8.
- Lucena-Fernández MF, Richard C, Menard HA. Fine specificity of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus sera containing antineutrophil cytoplasmic antibodies, *Arthr Rheum* 1991; 34: (suppl.) S 69.
- Gross WL, Csernok E, Schmitt WH. Anti neutrophil cytoplasm antibodies: immunobiological aspects. *Klin Wochenschr* 1991; 69: 558-66.
- Keogan MT, Esnault VL, Green AJ, Lockwood CM, Brown DL. Activation of normal neutrophils by ANCA. *Clin Exp Immunol* 1992; 90: 228-34.
- Tuso P, Moudgil A, Hay J, et al. Treatment of anti neutrophil cytoplasm antibodies positive systemic vasculitis with pooled IVG. *Am J Kidney Dis* 1992; 20: 504-8.
- Kallenberg CG, Mulder AH, Tervaert JW. Anti neutrophil cytoplasm antibodies: a still growing class of autoantibodies in inflammatory diseases. *Am J Med* 1992; 93: 675-82.
- Ecklund SR, Saluta GS, Agudelo CA, Pisko EJ. Clinical characteristics of 10 patients with the perinuclear pattern of immunofluorescence in ANCA testing, *South Med J* 1992; 85: p 132-8.
- Navarro JF, Quereda C, Rivera M, Ortuno J. Anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated para-neoplastic vasculitis. *Postgrad Med J* 1994; 70: 373-5.
- Stites, Fudenberg, Stobo, Wells. *Inmunología Básica y Clínica*. Mexico: Ed. Mundo Moderno, 1983; 316-24.
- Cohen-Tervaert JW, Stegeman CA, Brouwer E, Moulder AH. Anti neutrophil cytoplasm antibodies: a new class of autoantibodies in glomerulonephritis, vasculitis and other inflammatory diseases *Neth J Med* 1994; 45: 262-72.
- Hagen EC, Ballieux BE, Daha MR, van Es LA, van der Woude FJ. Fundamental and clinical aspects of anti neutrophil cytoplasm antibodies. *Autoimmunity* 1992; 11: 199-207.
- Kay MM. Molecular mapping of human band 3 aging antigenic sites and active amino acids using synthetic peptides. *J Protein Chem* 1992; 11: 595-602.
- 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: 202-10.
- Halbwachs-Mecarelli L, Nusbaum P, Noel L, Reumaux D, Erlinger S, Grunfeld J. Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) directed against cathepsin G in ulcerative colitis, Crohn disease and primary sclerosing cholangitis. *Clin Exp Immunol* 1992; 90: 79-84.
- MacIsaac A, Moran JE, Davies DJ, Murphy BF, Georgiou T, Niall JF. Antineutrophil cytoplasm antibody (ANCA) associated vasculitis. *Clin Nephrol* 1990; 34: 5-8.
- Nessberger L, Sjöholm AG, Sturfelt G. Absence of ANCA in severe vasculitis associated with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 1990; 19: 189-92.
- Klaasen RJ, Goldschmeding R, Dolman KM. ANCA in patients with symptomatic HIV infection. *Clin Exp Immunol* 1992; 87: 24-30.
- Falk RJ, Terrell RS, Charles LA, Jennette JC. Antineutrophil cytoplasm antibody induces neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87: 4115-9.