

ANTICUERPOS ANTICITOPLASMA DE NEUTROFILOS (ANCA) EN PACIENTES INFECTADOS POR HIV SINTOMATICOS Y ASINTOMATICOS

**ALICIA HABEGGER de SORRENTINO¹, PATRICIA MOTTA¹, ERNESTO ILIOVICH²,
ADRIAN P. SORRENTINO¹**

¹ Servicio de Inmunología y ² Servicio de Infectología, Hospital Julio C. Perrando, Resistencia, Chaco

Resumen Es conocido que en la etiopatogenia del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) no sólo interviene el efecto citopático del virus sobre la población CD4, sino que también se activan otros complejos mecanismos entre ellos los de tipo autoinmune. El objetivo del trabajo fue estudiar en 88 pacientes HIV (+) (49 asintomáticos y 39 sintomáticos) los anticuerpos anticitoplasma de los neutrófilos (ANCA), a fin de correlacionarlos con algunos de los cuadros clínicos más frecuentes. Se utilizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) sobre improntas de polimorfonucleares (PMN). Se observó que la presencia de ANCA fue más frecuente en el grupo de enfermos (53,8%) respecto de los portadores asintomáticos (4,1%). Dentro del grupo ANCA(+) se observó correlación con infección pulmonar (95,9%), siendo la tuberculosis (TBC), la causa más frecuente de ésta. Cuando se comparó la presencia de ANCA en el grupo TBC(+) HIV(+) con el grupo TBC(+) HIV(-), se observó que los ANCA positivos se asociaban al primer grupo en forma significativa. Se cree que la presencia de estos anticuerpos puede estar relacionada con mecanismos de tipo autoinmune determinados por la expresión inadecuada de ciertas proteínas blanco tales como la mieloperoxidasa o proteinasa 3. La presencia importante de ANCA en pacientes HIV sintomáticos con infección pulmonar por *Mycobacterium tuberculosis* y no así en pacientes HIV(+) asintomáticos o en pacientes con TBC pulmonar sin infección con HIV, parecería indicar que ni el virus *per se*, ni la infección pulmonar serían los responsables directos de la producción de estos anticuerpos.

Palabras clave: anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos, infección por HIV, tuberculosis

Los anticuerpos (Ac) anti-citoplasma de los neutrófilos (ANCA) están dirigidos contra varios componentes del citoplasma, uno de los cuales fue identificado como proteinasa 3 (Pr-3), la que es una proteasa sérica de los gránulos azurófilos de los neutrófilos diferente de otras dos serinas de estos gránulos, la elastasa y la catepsina G. La enzima es altamente catiónica y tiene actividad proteolítica. Esta proteinasa ha sido detectada en la membrana de los polimor-fonucleares (PMN) cuando son activados *in vitro* con dosis

baja de factor de necrosis tumoral (TNF)¹ o *in vivo* en condiciones de shock tóxico². El ANCA citoplasmático (ANCA-c) ha sido demostrado en el año 1982 por Davies *et al*^{3,4} en un grupo de pacientes con glomerulonefritis necrotizante, y en 1985 aparece como marcador sensible de la glomerulonefritis de Wegener^{5,6}.

Se ha observado que un número de pacientes con vasculitis⁷ presentaba una fluorescencia perinuclear en los neutrófilos que fueron fijados con etanol, recibiendo la denominación de ANCA perinuclear (ANCA-p). Algunos autores demostraron que estos anticuerpos están dirigidos contra otros componentes de los gránulos de los neutrófilos, tal como la mieloperoxidasa (MPO) y se postuló que el ANCA-p era sinónimo de anti-

Recibido: 3-I-1997

Aceptado: 20-III-1997

Dirección postal: Dra. Alicia Habegger de Sorrentino,
Pasaje Gotti 246, 3500 Resistencia, Chaco, Argentina

cuerpo antimieloperoxidasa⁸. Sin embargo, esto no parece ser absoluto, ya que se ha encontrado anti MPO con imagen citoplasmática en neutrófilos fijados con etanol^{9, 4}. La mieloperoxidasa es una enzima altamente catiónica y juega un rol crítico en la generación de radicales de oxígeno¹⁰. Por otro lado han sido detectado ANCA-p contra diferentes constituyentes citoplasmáticos de los neutrófilos^{11, 12}, estando asociados a un gran número de desórdenes inflamatorios^{13, 14}.

La expresión de autoantígenos ANCA en la superficie de los PMN es mediada por citoquinas, fundamentalmente el TNF alfa, que es una importante monoquina cuya liberación está inducida en caso de infecciones por estafilococos aureus, mycobacterias y otros microorganismos^{15, 1}.

Se conoce, que los pacientes con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) sufren una profunda desregulación inmunológica¹⁶, que lleva a defectos funcionales de la población T CD4 como así también hiperactividad de células B y desarrollo de autoanticuerpos^{17, 18, 19}.

Implicadas en la patogénesis del SIDA se encuentran algunas citoquinas producidas por el sistema monocito-macrófago, siendo la más importante el TNF alfa, cuya liberación es inducida en estadios tempranos de la infección por HIV^{16, 18}. Teniendo en cuenta estos factores (presencia de TNF alfa, intervención de muchos microorganismos en la liberación de estos mediadores y reiteradas infecciones), se decidió estudiar los ANCA en pacientes infectados por HIV, y se buscó la relación con algunas de las infecciones oportunistas.

Los pacientes infectados por HIV sufren infecciones pulmonares oportunistas y el mayor porcentaje es debido a *Pneumocitidis carini*. En el Nordeste Argentino la patología pulmonar más frecuente en SIDA es causada por *Mycobacterium tuberculosis* (TBC); fue por ello que se trató de detectar la presencia de ANCA en pacientes con TBC pulmonar infectados y no infectados con HIV, con fines de estudio comparativo.

Material y métodos

Se realizó un estudio controlado sobre 88 pacientes portadores del HIV, de los que 49 no presentaban síntomas de enfermedad en tanto que los 39 restantes correspondían a SIDA según criterios del CDC. Paralelamente se estudiaron 30 controles sanos seleccionados según

ausencia de enfermedades autoinmunes, infecciosas o neoplásicas demostrables, así como 19 neumonías por TBC en pacientes no portadores del HIV.

Se obtuvieron muestras de suero de pacientes en distintos estadios de la enfermedad, se realizó la determinación de ANCA por la técnica de inmunofluorescencia indirecta sobre imprecisiones de polimorfonucleares obtenidos de pacientes sanos, las que se fijaron con etanol; los resultados fueron corroborados recurriendo a imprecisiones comerciales. Cada uno de los sueros se realizó por duplicado o triplicado usando una dilución inicial de 1/50 en solución salina bafeada (PBS), consecutivamente a una incubación de 30 minutos, seguida de lavados, se reveló con antiinmunoglobulinas totales marcada con tiocianato de fluoresceína bajo observación en microscopio de fluorescencia en 40X. En el caso de las muestras que resultaron positivas se efectuó titulación.

Para la determinación de anticuerpos antinúcleo se recurrió a la inmunofluorescencia indirecta usando hígado de rata como sustrato.

La evaluación estadística se realizó por cálculo de diferencia de proporciones del programa Primer.

Resultados

Del total de 88 individuos HIV(+), 55,6% se encontraban asintomáticos y 44,4% con enfermedad SIDA según los criterios del CDC.

Según ilustra la Fig. 1, de la comparación del % de ANCA en pacientes HIV(+) asintomáticos y sintomáticos, resultó un 4,1% (2/49) en los primeros, mientras que en los segundos era del 53,8% (21/39), con ausencia en los 30 controles sanos.

Cuando se relacionó la presencia de ANCA en los pacientes enfermos de SIDA con sus cuadros clínicos: el 95,2% de los 21 ANCA (+) se asociaba a patologías pulmonares, de las que 11 correspondieron a infección por TBC, 3 a gérmenes comunes, 4 a *Pneumocitidis carini* y 2 a micosis pulmonar.

De las infecciones pulmonares por TBC, (Fig. 2) 91,6% (11/12) fueron ANCA(+), mientras de las infecciones pulmonares por TBC en pacientes HIV(-), sólo el 10,5%; la diferencia entre ambos grupos fue altamente significativa.

No se observó asociación de ANCA con enfermedad viral, toxoplasmosis, vasculitis ni cuadros neurológicos, aunque el número de la muestra no fue lo suficientemente relevante.

De los 21 pacientes con SIDA ANCA (+), sólo 2 tenían ambas imágenes, citoplasmática y perinuclear, con predominio de esta última.

% ANCA HIV Sintomáticos y Asintomáticos

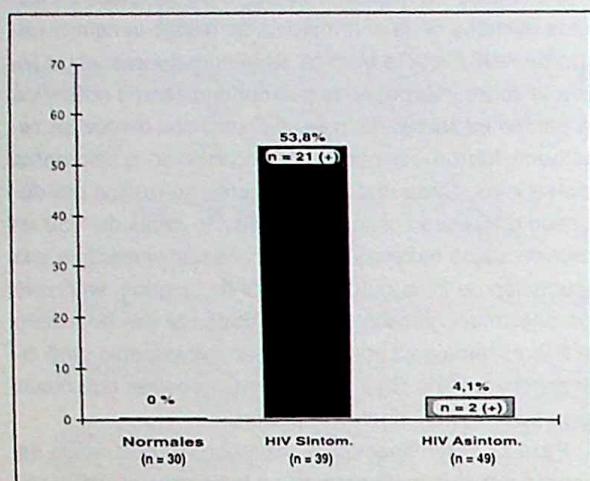


Fig. 1.— % ANCA HIV sintomáticos y asintomáticos
Comparación de los porcentajes de ANCA(+) en 39 pacientes HIV (=) sintomáticos, 49 HIV (+) asintomáticos y 30 controles normales

% ANCA Infección Pulmonar a TBC HIV POSITIVO Y VIH NEGATIVO

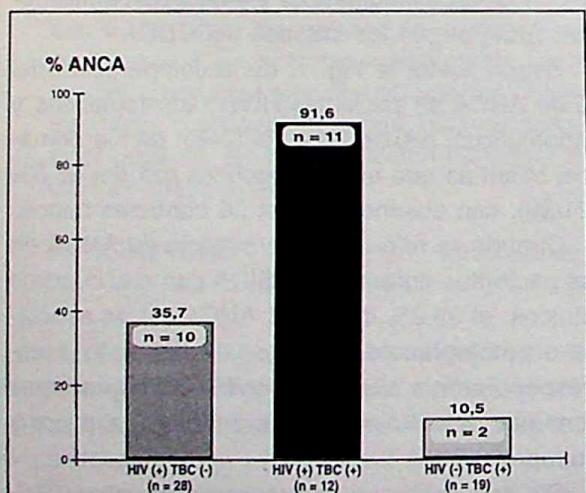


Fig. 2.— % ANCA. Infección pulmonar a TBC. HIV positivos y HIV Negativos.
Comparación de los porcentajes en los pacientes con TBC tanto HIV (+) como HIV (-) y los pacientes HIV (+) sin TBC

Los títulos de los ANCA (+) tenían en su mayoría valores superiores a 1/100.

Los anticuerpos antinucleares de los 88 pacientes HIV(+) asintomáticos y con enfermedad SIDA resultaron negativos.

Todos los controles normales dieron negativos para ANCA.

Discusión

La progresiva depleción de los linfocitos T CD4+, como resultado de la acción citopática del HIV, es la causa más ampliamente aceptada de la profunda inmunosupresión que muestran los pacientes de SIDA^{16, 20, 21}; sin embargo, recientes estudios sugieren que la acción del HIV en sí misma no es causa suficiente para el desarrollo del SIDA y que diversos mecanismos y cofactores^{18, 22}, tales como el fenómeno de apoptosis^{19, 23}, la acción de superantígenos bacterianos y retrovirales^{24, 25} y las infecciones oportunistas podrían desempeñar una función esencial en la patogénesis de la enfermedad, provocando las disfunciones inmunorregulatorias (hiperreactividad de las células B, desarrollo de autoanticuerpos) encontradas en estos pacientes.

En importante número de trabajos continúa refiriéndose el hallazgo de homologías entre proteínas del VIV con las proteínas del stress (Hsp) y la capacidad del HIV de infectar a las células presentadoras de antígeno, dando señales aberrantes a las células T por analogía entre regiones codificadas por el HIV con las proteínas del stress²⁶; quizá sea una de las razones de la alta incidencia de fenómenos autorreactivos en infección HIV y de su posible influencia en la progresión de la enfermedad.^{27, 28}

En el presente trabajo se detectó la presencia de ANCA fundamentalmente en pacientes HIV(+) con síntomas de la enfermedad; en el total de los pacientes ANCA(+) se evidenciaron compromisos pulmonares, siendo la tuberculosis pulmonar (TBC) la causa más frecuente.

No se encontró asociación con infecciones virales, toxoplasmosis, compromiso neurológico del SIDA, ni vasculitis, aunque el número de casos con esas patologías fue escaso.

Savage et al²⁹ encontraron 41% de ANCA (+) en pacientes con SIDA, sin observar asociación con vasculitis cutánea o sistémica, ni con infección bacteriana o viral.

Otros autores como Klassen et al³⁰ también detectaron ANCA(+) en pacientes con enfermedad SIDA con escasa asociación a infecciones oportunistas y enfermedad maligna.

Riera et al^{31, 32} encontraron anticuerpos anti-leucocitarios y leucoaglutininas presentes en el suero de pacientes hemofílicos HIV(+), con un incremento de los mismos en estadios más avanzados de la enfermedad, lo que sugiere que podría ser una manifestación de autorreactividad asociada a la progresión del HIV.

Con respecto al origen de estos anticuerpos en pacientes HIV(+), son varios los interrogantes. Se ha demostrado un aumento de la producción de citoquinas (TNF alfa, Interleucina 1, Prostaglandina 2) por los monocitos de individuos HIV(+)³³; estas citoquinas, fundamentalmente el TNF alfa, son capaces de inducir la expresión en la membrana de autoantígeno Pr3, así como ciertos productos bacterianos inducen la expresión de MPO¹. Considerando estos hallazgos, la presencia de ANCA en las infecciones pulmonares en su mayoría causada por TBC, es probable que resulte de la infiltración de PMN en el parénquima pulmonar, la acción del TNF alfa y la inmunodes-regulación provocada por el HIV, todos ellos asociados para el desencadenamiento de fenómenos de autoinmunidad.

Es importante tener en cuenta la presencia de células T autorreactivas a las proteínas del stress (Hsp) y la observación de que estas proteínas son un importante blanco de la respuesta inmune al *Mycobacterium tuberculosis*³⁴. Por otro lado, la asociación con Hsp y ciertos autoantígenos como la MPO³⁵ de los PMN y el mecanismo de mimetismo molecular¹², podrían ser algunas de las razones de la asociación de ANCA y TBC en estos pacientes con severa alteración de su respuesta inmune.

Cabe señalar que 80% de los pacientes infectados con TBC pulmonar presentaban valores de CD4 por debajo de 200/mm³.

De acuerdo con estos resultados, la limitada presencia de ANCA en pacientes HIV(+) asintomáticos y HIV(-) con infección pulmonar por TBC, parecería indicar que ni el virus *per se* ni la infección pulmonar serían los responsables directos de la producción de estos anticuerpos, pero sí influiría la asociación de ambos. En futuros estudios quedaría por demostrar si la presencia de estos anticuerpos contribuye al progreso de la enfermedad SIDA.

Summary

Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in patients with symptomatic and asymptomatic HIV infection

The cytopathic effect of HIV on CD4 T cells, as well as the active autoimmune mechanism occurring during infection, have been documented. Of the cytokines involved in the pathogenesis of AIDS, the main one produced by the monocyte-macrophage series is tumor necrosis factor alfa (TNF α). This cytokine induces antigens such as proteinase 3 (Pr 3) or myeloperoxidase (MPO). Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) are directed against this type of PMN antigens. In the present paper, the role of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in HIV infected patients as responsible for autoimmune phenomena in relation to opportunistic infections, was studied. A total of 88 serum samples belonging to 49 asymptomatic and 39 symptomatic HIV infected patients were tested for ANCA by an indirect immunofluorescence (IIF) test over a neutrophil substrate. ANCA were detected in 53.8% of symptomatic patients as compared to 4.1% in asymptomatic cases ($p < 0.0001$). A 95.9% correlation was observed between ANCA-positive samples and pulmonary infection ($n = 20$). In those ANCA (+) samples 95.9% correlation was found with pulmonary infection ($n = 20$). Pulmonary infection due to *Mycobacterium tuberculosis* is a frequent finding in HIV infected patients from Northeastern Argentina. When the presence of ANCA in TB(+) HIV(+) and TB(+) HIV(-) patients was studied, it was seen that positive-ANCA significantly correlated with the first group ($p < 0.001$).

The presence of ANCA was not related to viral infections, toxoplasmosis, neurological features of AIDS, vasculitis or malignant diseases. ANCA during pulmonary infection, mostly caused by TB, as well as PMN infiltration in pulmonary parenchyma, and the deregulated immune reaction elicited by HIV, may contribute to the onset of autoimmune phenomena. The presence of human T lymphocytes reactive to heat stress proteins (Hsp), an important target of immune response against certain intracellular auto-antigens such as MPO from PMN, added to the mechanism of molecular mimicry, could explain the association of ANCA and TB in patients with severe alterations of their immune response.

According to these results, the limited presence of ANCA in asymptomatic patients HIV(+) and in HIV(-) with pulmonar TB, could indicate that the virus may not be responsible for the induction of these antibodies.

Bibliografía

- Charles LA, Caldas MLR, Falk RJ, et al. Antibodies against granule proteins activate neutrophils in vitro. *J Leuk Biol* 1991; 50: 539-46.
- Csernok E, Schmith WH, Bainton D, Gross WL. Translocation of Pr-3 on the cell surface of neutrophils: Association with disease activity in Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum* 1990; 34: S79.
- Davies DJ, Moran JE, Niall JF, et al. Segmental necrotizing glomerulonephritis with antineutrophil antibody: Possible arbovirus aetiology? *Br Med J* 1982; 285: 606.
- Cambridge G, Hall TJ, Leaker B. Heterogeneity of antibodies to myeloperoxidase in sera from patients with vasculitis. *J Am Soc Nephrol* 1991; 2: 590.
- Jennette JC, Ewert BH, Falk RJ. Do antineutrophil cytoplasmic autoantibodies cause Wegener's Granulomatosis and other forms of necrotizing vasculitis? *Rheumatic Dis Clin NA* 1993; 19: 1-14.
- Van Der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto, S, et al. Autoantibodies to neutrophils and monocytes: A new tool for diagnosis and a marker of disease activity in Wegener's Granulomatosis. *Lancet* 1985; 2: 425-9.
- Cohen Tervaert JW, Goldschmeding R, Elena JD, et al. Association of autoantibodies to myeloperoxidase with different forms of vasculitis. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 1264-72.
- Falk RJ, Jennette JC. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 1988; 318: 1651-7.
- Segelmark M, Baslund B, Wieslander J. ANCA Some patients with c-ANCA pattern have antibodies to myeloperoxidase and not to proteinase 3. *Clin Exp Immunology* 1993; S1: 21.
- Mocconi D, Zanolli AF, Orisio S, et al. Methylprednisolone normalizes superoxide anion production by polymorphs from patients with ANCA-positive vasculitides. *Kidney Intern* 1993; 44: 215-20.
- Moodie FDL, Leaker L, Cambridge G, et al. Alpha enolase: A novel cytosolic autoantigen in ANCA positive vasculitis. *Kidney Intern* 1993; 43: 675-81.
- Esnault VLM, Testa A, Audrain M, et al. Alpha1-antitrypsin genetic polymorphism in ANCA-positive systemic vasculitis. *Kidney Intern* 1993; 43: 1329-32.
- Esnault VLM, Soleimani B, Keegan MT, et al. Association of IgM with IgG ANCA in patients presenting with pulmonary hemorrhage. *Kidney Intern* 1992; 41: 1304-10.
- Kallenberg CG, Leontine Mulder AH, Cohen Tervaert JW: Antineutrophils cytoplasmic antibodies. A still-growing class of autoantibodies in inflammatory disorders. *Am J Med* 1992; 93: 675-81.
- Noronha IL, Kruger C, Andrassy K, et al. In situ production of TNF alpha, IL 1 beta and IL2R in ANCA positive glomerulonephritis. *Kidney Intern* 1993; 43: 682-92.
- Rosenberg ZF, Fauci AS. Immunopathology and pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Pediatr Infect Dis J* 1991; 10: 230-8.
- Behar S, Porcelli S. Mechanisms of autoimmune disease induction. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 458-76.
- Nájera R. Cofactores en infección por VIH y en SIDA. *SIDA* 1991; 2: 203-6.
- Pantaleo G, Fauci A. Apoptosis in HIV infection. *Nature Medicine* 1995; 1: 118-20.
- Dalgleish Angus G. The immune response to HIV. *Immunology Today* 1995; 16: 356-7.
- Meléndez Guerrero LM, Nicholson JKA, McDougal JS. Infection of human monocytes with HI-1 Ba-L. *AIDS Res Human Retroviruses* 1991; 7: 465-74.
- Embreton J, Zupancic M, Rivas JL, et al. Massive convert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature* 1993; 362: 359-62.
- Nájera R, González Lahoz J, De Andrés R. *SIDA* 1991; 2: 383-8.
- Friedman SM, Tumang JR, Crow M. Microbial superantigens as etiopathogenic agents in autoimmunity. *Rheumatic Dis Clin NA* 1993; 19: 207-18.
- Nájera Morrondo R. Superantígenos y patogenia del SIDA. *SIDA* 1991; 2: 24-7.
- Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1995; 320: 365-76.
- Medina Rodríguez F, Guzmán C, Jara IJ. Rheumatic manifestations in human Immunodeficiency virus positive and negative individuals: A study of 2 populations with similar risk factors. *J Rheumatol* 1993; 20: 1880-4.
- Morrow WJW, Isenberg DA, et al. AIDS virus infection and autoimmunity: a perspective of the clinical immunological and molecular origins of the autoallergic pathologies associated with HIV disease. *Clin Immunol Immunopathol* 1991; 58: 163-80.
- Savige JA, Chang L, Crowe SM. Anti-neutrophil cytoplasm antibodies in HIV infection. *Adv Exp Med Biol* 1993; 336: 349-52.
- Klaassen RJ, Goldsmeding R, Dolman KM, et al. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies in patients with symptomatic HIV infection. *Clin Exp Immunol* 1992; 87: 24-30.
- Riera NE, Galassi N, Anselmo A, et al. Leukoagglutinins in patients with hemophilia. *Immunol Lett* 1990; 24: 107-12.
- Riera NE, Galassi N, de la Barrera S, et al. Anti-leukocyte antibodies as a consequence of HIV infection in HIV+ individuals. *Immunol Lett* 1992; 33: 99-104.
- Longo N, Zabay JM, Sempere JM. Altered production of PGE2, IL1b and TNF by peripheral blood monocytes from HIV-positive individuals at early stages of HIV infection. *J Acq Def Synd* 1993; 6: 1017-23.
- Young R. Stress proteins and immunology. *Annu Rev Immunol* 1990; 5: 401-20.
- Jones DB, Coulson AFW, Duff GW. Sequence homologies between hsp60 and autoantigens. *Immunology Today* 1993; 14: 115-8.