

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas
Instituto de Servicio de Laboratorio de Diagnóstico en Salud
(SELADIS)



“DETERMINACION DE ANTICUERPOS
ANTICITOPLASMA DE NEUTROFILO (ANCA) POR
INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI) ”

Tesis para optar el grado de Especialista en Diagnóstico en Salud, mención Hematología.

Postulante: Lic. Dunia Torrico Terceros

Asesoras: Dra. Patricia Gómez M. Sc.
Dra. Jacqueline Calla

La Paz - Bolivia – 2000

***DETERMINACION DE ANTICUERPOS
ANTICITOPLASMA DE NEUTROFILO
(ANCA) POR INMUNOFLUORESCENCIA
INDIRECTA (IFI).***

Agradecimientos

Gracias:

A Dios.

A mis padres, hermanos, Marcos, docentes, compañeros y amigos por ayudarme a cumplir mis objetivos.

A SELADIS por el apoyo intelectual y material para la realización del presente trabajo.

A mis asesoras Dra. Patricia Gómez, Dra. Jacqueline Calla por su invaluable apoyo.

A María Rosa Cortés por su desinteresada colaboración.

Dedicatoria.

A mis padres Eliodoro y Blanca; hermanos Roxana, Alvaro, Alejandro y a Marcos.

RESUMEN.-

En condiciones normales, los mecanismos de inmunidad son capaces de ejercer su función exclusivamente contra antígenos extraños. En múltiples oportunidades y por factores diversos, pueden producirse fallas en dichos mecanismos, dando lugar a procesos aberrantes, como en las enfermedades autoinmunes. Dentro del variado espectro de estas, se han identificado aquellas en las que existe presencia de anticuerpos anti-neutrófilo (ANCA).

El presente estudio fue realizado con el propósito de obtener polimorfonucleares (PMN), sueros control positivo (ANCA) y conjugado para mejorar el diagnóstico de laboratorio. La técnica utilizada para la evaluación de estos sueros fue la inmunofluorescencia indirecta (IFI).

La técnica de IFI utiliza la comparación de los patrones observados para discriminar una determinada reacción, siendo susceptible a la subjetividad del observador. Por esto es indispensable contar con controles, tanto positivos como negativos.

Con esta finalidad, se planteó la obtención de sueros de animales de experimentación y la realización de la técnica de IFI para el adecuado reconocimiento de los patrones. Se aislaron PMN humanos por la técnica de gradiente de doble densidad, los cuales se inocularon en conejos. Se logró obtener anticuerpos-antineutrófilo en un título 1:8 (inmunodifusión doble) y se emplearon como substrato en la técnica IFI.

Además, se preparó el conjugado anticuerpos de cordero anti-gammaglobulinas de conejo marcados con fluoresceína, el mismo que se purificó por cromatografía de exclusión molecular (G-75).

Posteriormente, se procedió a la titulación del anticuerpo y del conjugado. Se encontró que la dilución 1:5000 del conjugado obtenido es la que permite observar patrones granulares bien definidos cuando se utiliza el antisuero en dilución 1:500.

INDICE.

<u>Contenido</u>	<u>Pagina</u>
1.- Introducción.	1
2.- Marco Teórico.	3
2.1.- Enfermedades autoinmunes.	3
2.1.1.- Mecanismo fisiopatológico de las enfermedades autoinmunes.	4
2.2.- Neutrófilos.	4
2.2.1.- Generalidades.	4
2.3.- Respuestas autoinmunes desencadenadas por los neutrófilos anticuerpos anti-neutrófilos (ANCA).	7
2.4.- Vasculitis.	7
2.4.1.- Vasculitis y su relación con los ANCA.	8
2.5.- Tipos de ANCA conocidos.	9
3.- Planteamiento del problema.	12
4.- Justificación.	13
5.- Objetivos.	14
5.1.- Objetivos generales.	14
5.2.- Objetivos específicos.	14
6.- Material y métodos.	15

6.1.- Aislamiento de Polimorfonucleares (PMN).	15
6.1.1.- Obtención de PMN por centrifugación en gradiente simple de densidad.	15
6.1.2.- Obtención de PMN por gradiente de doble densidad.	16
6.2.- Obtención de gránulos azurófilos a partir de degranulación de PMN con ester de acetato forbol miristato (PMA).	16
6.3.- Inmunización en animales.	17
6.3.1.- Protocolo de inmunización I.	17
6.3.2.- Protocolo de inmunización II.	17
6.4.- Titulación de los antisueros de conejo anti-PMN o sus fracciones por inmunodifusión.	18
6.4.1.- Tinción de placas de inmunodifusión	19
6.5.- Purificación de gammaglobulinas de conejo para su inmunización en cordero.	20
6.5.1.- Precipitación de gammaglobulinas por salado con sulfato de amonio.	20
6.5.2.- Purificación de gammaglobulinas de conejo por cromatografía de exclusión molecular.	22
6.6.- Determinación de la concentración de proteínas obtenidas.	23
6.7.- Preparación del conjugado (anticuerpos de cordero anti-gammaglobulinas de conejo con fluoresceína).	23
6.8.- Preparación de sustrato (placas con PMN) para inmunofluorescencia indirecta (IFI).	24

6.9.- Evaluación de la reactividad de los antisueros obtenidos mediante la técnica de inmunofluorescencia.	25
7.-Resultados.	26
7.1.- Aislamiento de PMN.	26
7.2.- Obtención de gránulos azurófilos a partir de la degranulación de PMN con acetato de forbol miristato (PMA). 27	
7.3.- Inmunización de conejo para la obtención de antisuero (antineutrófilo humano).	28
7.4.- Purificación de gammaglobulinas de conejo mediante precipitación por salado.	30
7.4.1.- Determinación del contenido de proteínas.	30
7.4.2.- Purificación de gammaglobulinas de conejo por cromatografía de exclusión molecular.	30
7.5.- Preparación de conjugado (anticuerpos gammaglobulinas de cordero anti-gammaglobulinas de conejo – fluoresceína).	30
7.5.1.- Titulación del conjugado fluoresceinado y anticuerpos anti PMN humanos.	32
8.-Discusión.	34
9.-Conclusiones.	38
10.-Bibliografía.	39
11.-Anexos.	42

1.- INTRODUCCION

En condiciones normales, los mecanismos de inmunidad son capaces de ejercer su función exclusivamente contra antígenos extraños. Sin duda, es una función de defensa y, por eso mismo, hay necesidad de un mecanismo de reconocimiento de las estructuras propias del organismo sin el cual podría haber autoagresión (1).

En múltiples oportunidades y por factores diversos, pueden producirse fallas en dicho mecanismo; en estas condiciones, hay agresión a las células, a los componentes celulares o hísticos, desencadenándose enfermedades de autoagresión (autoinmunes). La agresión puede producirse por medio de autoanticuerpos o por células (inmunidad celular) (1).

Dentro del variado espectro de enfermedades autoinmunes, se han identificado aquellas en las que existe presencia de anticuerpos antineutrófilos. Se considera que estos autoanticuerpos anticitoplasma de neutrófilo (ANCA) intervienen en las alteraciones de las paredes vasculares que se observan en algunas enfermedades caracterizadas por inflamación con infiltración de neutrófilos y leucocitos mononucleares, por lo que su detección se ha incluido en ocasiones como parte de la evaluación diagnóstica de ciertas formas de vasculitis y glomerulonefritis (6) (27).

Cuando los sueros de pacientes con vasculitis son probados por inmunofluorescencia utilizando neutrófilos purificados y fijados con etanol como sustrato, es posible observar dos patrones predominantes. El patrón citoplasmático (c-ANCA), que está estrechamente asociado con la granulomatosis de Wegener y un patrón perinuclear (p-ANCA), que está asociado principalmente con otras vasculitis. La importancia clínica de los ANCA con patrón de inmunofluorescencia atípico, como el observado en pacientes con enfermedades inflamatorias de los huesos es todavía desconocida (7).

La caracterización de estos anticuerpos ha determinado que la respuesta está dirigida contra estructuras celulares y especialmente contra componentes de los gránulos neutrofilicos. Los antígenos de los ANCA se localizan a nivel de los gránulos del citoplasma; ciertos anticuerpos como los producidos contra la mieloperoxidasa, elastasa, etc. adoptan un patrón de fluorescencia perinuclear o nuclear p-ANCA. Por otro lado, los anticuerpos dirigidos contra la proteinasa 3 (PR-3) muestran un patrón granular citoplasmático c-ANCA (4).

Este componente autoinmunitario debe ser monitoreado basándose en la detección de estos anticuerpos como parte del diagnóstico de las patologías desarrolladas. Con esta finalidad se ha planteado mejorar la detección de ANCA a través de la obtención de polimorfonucleares (PMN), sueros control positivo para ANCA y conjugado fluoresceinado que permitan mejorar la detección de anticuepos antineutrófilos por el método de IFI.

2.- MARCO TEORICO.

La teoría de la selección clonal establece que el sistema inmunológico sería capaz de reaccionar contra cualquier antígeno. Durante la vida intrauterina y en un breve periodo posnatal, los linfocitos son informados de los constituyentes del propio organismo y condicionados para no producir anticuerpos y células reactivas contra ellos (tolerancia inmunológica). Solamente las sustancias extrañas al organismo podrían convertirse en antigénicas en condiciones normales. Este concepto de propio y no propio impide la autoagresión inmunológica (1). Sin embargo, bajo ciertas circunstancias este equilibrio puede ser perturbado, dando lugar a la instalación de un cuadro autoinmunitario, que es producto de procesos multifactoriales y múltiples que permiten que las células autoreactivas escapen a la selección negativa y de esta forma se instalan los efectores autoreactivos (30).

2.1.- ENFERMEDADES AUTOINMUNES

De acuerdo con las estructuras agredidas, este grupo de enfermedades pueden involucrar un amplio espectro de posibilidades; en un extremo están las enfermedades organoespecíficas y, en el otro, las que no son. Entre ambas, se clasifican a otras enfermedades de acuerdo con la mayor o menor especificidad al órgano o a los órganos afectados (1).

De manera general, es posible relacionar las enfermedades autoinmunes con los siguientes **mecanismos etiopatogénicos:**

- Los componentes normales del organismo son modificados por diversas causas y pasan a ser reconocidos como extraños y, por lo tanto, inmunogénicos por ejemplo la degradación enzimática de ciertas proteínas normales del organismo y la aparición de nuevos determinantes antigénicos funcionan como neoantígenos (1).
- La alteración básica en el sistema de los inmunocitos, que funcionan anormalmente (1).
- Reacciones cruzadas. Es posible por ejemplo, que un anticuerpo producido contra determinantes antigénicos de una bacteria reaccione con una proteína no alterada, pero con estructura molecular semejante (por lo menos en parte) a la de la bacteria (1).

- Liberación de antígenos. Sustancias proteicas que normalmente, no entran en contacto con la sangre o están contenidas en involucros celulares, tubulares o membranosos, actúan como no propios. Si por cualquier razón fueran liberadas, pueden desencadenar la producción de autoantígenos (1).
- Alteraciones del sistema inmunológico. La autoagresión podría ser el resultado de la acción de clones celulares inmunocompetentes anormales (clones prohibidos de Burnet), que desencadenarían las reacciones contra los componentes normales (1).

2.1.1.- MECANISMO FISIOPATOLOGICO DE LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES.-

Estos incluyen:

Acción directa de anticuerpos, produciendo la destrucción o lisis de elementos sanguíneos (hematíes, PMN, linfocitos, plaquetas); se debe posiblemente a la acción lesiva de anticuerpos fijadores de complemento (1).

Acción de complejos antígeno-anticuerpo. Las lesiones glomerulares de muchas enfermedades son debidas al depósito de complejos solubles de antígeno y anticuerpo, con activación del complemento (1).

Hipersensibilidad mediada por células. Este tipo de mecanismo tiene importancia por lo menos parcial en gran número de enfermedades de autoagresión, principalmente las organoespecíficas (1).

2.2.- NEUTROFILOS

2.2.1.- GENERALIDADES

Entre el 50 y 70% de los leucocitos de la sangre periférica son neutrófilos. En números absolutos, se considera normal de 3000 a 6000/mm³ de sangre, por ello estas células son el tipo más común de leucocitos presentes en un extendido sanguíneo (2).

Antes de adquirir su forma madura y entrar al torrente sanguíneo, los neutrófilos pasan por varias etapas de desarrollo en el tejido mieloide (médula ósea roja). La mayoría de los

neutrófilos que llegan al torrente sanguíneo han madurado. Sin embargo, en algunas enfermedades, existe en sangre periférica la presencia de cantidades mayores de neutrófilos inmaduros (2).

Se estima que la permanencia de los granulocitos en el torrente sanguíneo es aproximadamente de 10 hrs. Luego, los granulocitos abandonan al azar los pequeños vasos sanguíneos (principalmente las vénulas) y entran al tejido conectivo, donde llevan a cabo útiles funciones durante 1 o 2 días (2).

El citoplasma de los neutrófilos maduros contiene dos tipos de gránulos. Los verdaderos gránulos neutrofilicos de muchas preparaciones son tan finos que resultan difíciles de advertir con el microscopio; por ello, todo lo que puede verse es citoplasma con una apariencia granular, comúnmente estos gránulos imparten al citoplasma un color lila (2).

También se observan gránulos más grandes que los neutrofilicos específicos; éstos se denominan AZUROFILOS debido a que toman el color del azul de metileno, que es uno de los colorantes básicos de las tinciones para sangre. Los primeros gránulos que aparecen en las células de esta línea son los del tipo azurófilo; sólo posteriormente aparecen los verdaderos gránulos neutrofilicos y cuando surgen, se observan primero en la región del aparato de Golgi de las células en desarrollo (2).

Los gránulos azurófilos contienen una serie de diferentes enzima proteolíticas, lipolíticas y degradantes de carbohidratos, así como otras proteínas catiónicas, hidrolasas ácidas y algunas proteinasas neutras, estos tres últimos constituyentes lisosomicos con actividad inflamatoria potencial (2).

Entre las proteínas catiónicas que poseen se incluyen:

- a) un factor rico en arginina (proteína de la banda 2) que aumenta la permeabilidad vascular al liberar histamina de los mastocitos.
- b) proteínas (bandas 1, 3, 4) que incrementan la permeabilidad vascular, independientemente de la liberación de histamina. Por otro lado, la degradación que produce la PR-3 sobre la elastina es comparable a la que produce la elastasa de

leucocitos humanos a pH 6,5. Además, causa enfisema cuando se administra a hamsters por vía traqueal (24) (25).

- c) un factor quimiotáctico para monocitos, y
- d) un factor que parece inhibir el movimiento de otros neutrófilos y eosinófilos.

Las proteasas ácidas degradan proteínas a pH ácido. Normalmente suelen degradar bacterias y material de desecho dentro de los fagolisosomas, pero in vitro también degradan la membrana basal. Es dudoso que tengan un efecto extracelular in vivo, puesto que los valores óptimos de bajo pH no se alcanzan extracelularmente. Las proteasas neutras, por otra parte, son capaces de degradar varios componentes extracelulares. Estas enzimas (colagenasa, elastasa, catepsina-G, etc.) pueden atacar el colágeno, membrana basal, fibrina, elastina y cartilago, dando lugar a la destrucción de tejido característico de procesos inflamatorios purulentos y deformantes. Las proteasas neutras pueden también liberar del quinínogeno un péptido tipo quinina (2).

Además, contienen una peroxidasa llamada mieloperoxidasa, porque caracteriza a los granulocitos que se derivan de la serie mieloide. Se cree que esta enzima potencia la actividad bactericida del peróxido de hidrógeno que también produce la célula (2) (3).

En comparación, los GRÁNULOS ESPECÍFICOS son más numerosos y contienen pocas sustancias. Estas incluyen a la colagenasa, fosfatasa alcalina, lisozima y a una proteína afín al hierro denominada lactoferrina que fue identificada por primera vez en la leche. Esta proteína se une al hierro con una afinidad tan alta que puede privar a las bacterias fagocitadas del hierro que necesitan para seguir desarrollándose; de aquí que sea bacteriostática. Una segunda propiedad de la lactoferrina es que puede inhibir la producción del factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos, en los macrófagos.

Este factor es un regulador de la hematopoyesis que si se produce en cantidad suficiente, estimula la formación in vitro de colonias (GM-CSF) de macrófagos de neutrófilos y monocitos. De aquí que se haya sugerido que la lactoferrina puede servir como uno de los reguladores de retroalimentación negativa de la producción de neutrófilos. Los dos tipos de gránulos de los neutrófilos se unen a los fagosomas, después de lo cual sus fuerzas combinadas pueden destruir eficazmente a toda bacteria que los neutrófilos hayan engullido por fagocitosis (2) (3).

2.3.-RESPUESTA AUTOINMUNE DESENCADENADA POR LOS NEUTROFILOS.-

La respuesta autoinmune desencadenada por los neutrófilos se manifiesta a través de la producción de autoanticuerpos dirigidos principalmente contra los componentes citoplasmáticos de los mismos. Los ANCA predominantes son del isotipo IgG (6) (22).

Los anticuerpos contra los gránulos de los neutrófilos se conocieron desde mediados de los años 60 con el nombre de anticuerpos antinucleares contra los gránulos específicos. Reconocidos posteriormente en 1973 como anticuerpos contra el citoplasma de los neutrófilos; que no se describieron en la literatura antes de 1982 (6).

2.4.- VASCULITIS

Bajo el término de vasculitis se engloba un grupo heterogéneo de procesos que reconoce como patología común la presencia de inflamación de los vasos sanguíneos, que puede asociarse a necrosis de la pared vascular (5).

Existen diversas situaciones clínicas que hacen sospechar la presencia de vasculitis sistémica cómo fiebre de origen desconocido, cuadro de deterioro constitucional no explicado, evidencia clínica de afección multisistémica, fenómeno isquémico, sobre todo en la edad media de la vida o de jóvenes, mononeuritis múltiples, púrpura palpable, glomerulonefritis rápidamente proliferativa (26).

La localización de los vasos, su diferente tamaño y la distinta histopatología, en los que predomina la lesión necrosante o la granulomatosa, constituyen las características que definen los diferentes síndromes vasculíticos y permiten su individualización. La vasculitis puede ser la única expresión de enfermedad y constituir el grupo de las vasculitis primarias, como la poliarteritis nodosa (PAN) o la granulomatosis de Wegener, o asociarse a otra entidad nosológica, como ocurre en algunos casos de artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (LES), infecciones y neoplasias, configurando entonces el grupo de las vasculitis secundarias (5).

Aunque se conoce poco acerca de los AGENTES ETIOLOGICOS, se piensa que muchos tipos de vasculitis están inducidos por mecanismos inmunológicos y los datos que los apoyan se resumen a continuación:

- 1.- Las lesiones vasculares se parecen a las producidas con inmunocomplejos en condiciones experimentales como el fenómeno de Arthus local y la enfermedad del suero.
- 2.- La vasculitis se encuentra asociada a LES, esclerodermia, dermatomiositis y síndrome de Sjögren. En estos trastornos hay inmuno complejos DNA-antiDNA en las lesiones vasculares.
- 3.- Se han encontrado IgG, IgM (anti-IgG) y componentes del complemento en los vasos afectados de pacientes con crioglobulinemia mixta.
- 4.- Con frecuencia se han asociado fármacos como sulfamidas, penicilinas, tiouracilo, yoduros y arsenicales al desarrollo de vasculitis, en la mayoría de éstas la lesión descrita ha sido la de una poliarteritis microscópica (angitis por hipersensibilidad).
- 5.- Un dato importante es la demostración de alta incidencia de antigenemia de hepatitis B (HBs Ag) y de inmunocomplejos circulantes HBsAg-antiHBsAg en el suero de algunos pacientes con vasculitis; además aparecen HbsAg, inmunoglobulinas y complemento en las lesiones vasculares. De hecho se ha estimado que el antígeno de la hepatitis B puede ser el agente desencadenante de vasculitis necrosante en un 25 a 40% de los pacientes. La incidencia de vasculitis en drogadictos puede ser debida a la incidencia de antigenemia de hepatitis B en estos sujetos, aunque también otros agentes infecciosos pueden ser la causa.

Por otro, lado la presencia de células mononucleares y de granulomas en algunas vasculitis sugiere inmunidad celular, que puede estar dirigida contra antígenos exógenos o contra componentes propios de la pared vascular. De hecho, se ha descrito inmunidad celular hacia antígenos de la pared arterial en una forma de vasculitis, la arteritis temporal (5).

2.4.1.- VASCULITIS Y SU RELACION CON LOS ANCA

Es importante señalar que en la granulomatosis de Wegener se detectan ANCA que reaccionan con una serinproteasa (mieloblastina) presente en los gránulos azurófilos de los granulocitos humanos, que se conoce con las siglas PR-3; la frecuencia con la que se presenta en

pacientes con casos de enfermedad generalizada activa se aproxima al 100% y al 50% en la fase inicial de la enfermedad, en pacientes en remisión completa no se detectan dichos anticuerpos y en caso de remisión parcial su título disminuye considerablemente. Su valor pronóstico es muy alto, ya que los anticuerpos se detectan con cierta antelación a la recaída. Se han descrito también anticuerpos anti-PR-3; aunque con muy poca frecuencia en casos de PAN clásica (5).

Otros tipos de ANCA reconocen a la mieloperoxidasa. Se detectan anticuerpos antimieloperoxidasa en pacientes con diferentes tipos de vasculitis que incluyen: poliarteritis microscópica, síndrome de Churg Strauss y glomerulonefritis rápidamente progresiva (5).

Los anticuerpos contra los componentes superficiales de los neutrófilos se consideran extremadamente raros (5).

2.5.- TIPOS DE ANCA CONOCIDOS

El blanco molecular antigénico en los neutrófilos con patrón c-ANCA es la PR-3, una proteína de 29 kDa encontrada en los gránulos citoplasmáticos. La sensibilidad del diagnóstico para los c-ANCA depende de la actividad de la enfermedad. La sensibilidad es alta (más del 90%) en la fase vasculítica de la enfermedad pero solo es el 65% en los pacientes con limitadas manifestaciones de la enfermedad en el tracto respiratorio y es cerca del 30% en pacientes con granulomatosis de Wegener en remisión (7).

Además existe un amplio espectro de enfermedades asociadas a inmunofluorescencia positiva para el patrón p-ANCA. Estos incluyen enfermedades inflamatorias de los huesos, enfermedades autoinmunes del hígado, artritis reumatoide con o sin complicación de vasculitis, síndrome de Felty y lupus eritematoso sistémico. Se han descrito varias estructuras antigénicas causantes del patrón de inmunofluorescencia p-ANCA; estos incluyen la elastasa, catepsina G, lactoferrina, lisozima, y en forma más notable la mieloperoxidasa; por ejemplo, se han encontrado ANCA contra esta proteína en pacientes con enfermedades severas de vasculitis autoinmunes, como:

Poliangitis microscópica,-(inflamación de las pequeñas venas sanguíneas). Caracterizada por hemorragias en los alvéolos pulmonares, que se da como resultado inflamación de los capilares; mononeuritis múltiple, lesiones cutáneas, glomerulonefritis progresiva, y otras manifestaciones en otros órganos donde la vasculitis afecta (7).

Glomerulonefritis rápidamente progresiva.- Cerca del 70% de los pacientes con esta enfermedad presentan estos anticuerpos, esta puede ser consecuencia de la deposición de complejos inmunes, como se observa en el lupus eritematoso sistémico, aunque también se cree que en ocasiones esta enfermedad puede ser de origen idiopático, con poca o ninguna presencia de complejos inmunes en los glomérulos (7).

Este mismo tipo de anticuerpos son detectados en el 30 a 40 % de los pacientes con la enfermedad anti-membrana basal glomerular en síndrome de Good Pasture, en 8% de los pacientes con lupus eritematoso sistémico, en 50 al 100 % de los lupus inducidos por drogas y en otros síndromes de hemorragia alveolar con o sin glomerulonefritis, los mismos que podrían ser considerados como pequeñas variantes de poliangeitis microscópica (7).

Por otro lado, se han encontrado anticuerpos anti-PMN en pacientes con enfermedades inflamatorias de los huesos, en los casos en los que existen otros autoanticuerpos, también luego de infecciones y en individuos que han recibido transfusiones sanguíneas múltiples (21) (23).

Además, los ANCA anti-mieloperoxidasa son poco comunes en la clásica PAN, enfermedad que esta restringida a los grandes vasos sanguíneos (4).

Los ANCA pueden ser detectados utilizando técnicas de inmunofluorescencia, empleando neutrófilos humanos fijados con etanol. Todos los antígenos de los ANCA se localizan a nivel de los gránulos del citoplasma; ciertos anticuerpos como los producidos contra la mieloperoxidasa adoptan un patrón de fluorescencia perinuclear o nuclear descrito anteriormente como p-ANCA. Por otro lado, los anticuerpos dirigidos contra la PR-3 muestran un patrón granular citoplasmático c-ANCA (4).

Sin embargo, algunos autores entre ellos Falk y Jennette señalan el hecho de que el patrón p-ANCA podría ser un artefacto, ya que durante la fijación de los granulocitos con el etanol las membranas de los gránulos son destruidas, los antígenos ANCA positivamente cargados son conducidos y localizados hacia las cargas negativas de la membrana nuclear (4).

El patrón c-ANCA en la inmunofluorescencia siempre ha estado caracterizado exclusivamente por los anticuerpos contra la PR-3, mientras que los antígenos p-ANCA pueden incluir no sólo a la mieloperoxidasa, sino también a la lactoferrina, elastasa y otras enzimas

granulares. Las muestras que dan patrones de inmunofluorescencia p-ANCA pueden ser diferenciadas por comparación de la inmunofluorescencia efectuada por la fijación clásica con etanol y la fijación con formalina de los PMN; la formalina inhibe la migración de la mieloperoxidasa hacia las cargas negativas localizadas en la membrana nuclear, tales ANCA anti-mieloperoxidasa muestran un patrón granular (c-ANCA). En cambio, otros ANCA no dirigidos contra mieloperoxidasa que dan un patrón perinuclear (p-ANCA) cuando son fijados con etanol, no muestran reactividad alguna al ser formolizados con formalina. Esto podría ser el resultado de la destrucción de los epítopes relevante en presencia de la formalina, o la pérdida de los antígenos que son solubles en la formalina. Los ANCA dirigidos contra antígenos indeterminados muestran un patrón perinuclear al ser fijados con metanol (4).

3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.-

En las técnicas de inmunofluorescencia en forma general, al ser cualitativas y en las que la subjetividad de la observación puede influir en la evaluación, se hace indispensable usar controles, tanto positivos como negativos, para poder discriminar la reactividad correspondiente; además de establecer el nivel de reactividad basal para evitar falsos positivos.

Por otro lado, se han buscado otras pruebas diagnósticas para la determinación de ANCA, así, el test de ELISA ha sido una de las posibles alternativas.

Sin embargo, las ventajas de tales procedimientos sobre el IFI tendrán que ser determinadas posteriormente en ensayos clínicos (19). Siendo las técnicas de inmunofluorescencia standard los métodos de screening más confiables para esta detección (17).

4.- JUSTIFICACION.-

La detección de ANCA es actualmente un instrumento importante para establecer el diagnóstico en pacientes con vasculitis sistémica y glomerulonefritis rápidamente progresiva (18). Además estos anticuerpos detectados por inmunofluorescencia indirecta son marcadores sensibles de granulomatosis de Wegener, poliangitis microscópica y de glomerulonefritis idiopática rápidamente progresiva (19).

Se ha observado que cambios en los niveles de c-ANCA van paralelamente acompañados con cambios en la actividad de la enfermedad en más del 85% de los pacientes con granulomatosis de Wegener. Puede ser importante el valor pronóstico de los títulos de c-ANCA crecientes que sugieren una inminente recaída. Cohen Tervaert y colaboradores en 1990 mostraron que las recaídas clínicas de granulomatosis de Wegener eran precedidas por una significativa elevación de los títulos de c-ANCA.

Sin embargo la elevación de los títulos de c-ANCA pueden preceder a una recaída varios meses antes; pero no todos los títulos elevados de c-ANCA van seguidos de recaídas. Además, se demostró en un pequeño grupo de pacientes que las recaídas podían ser prevenidas por el empleo de terapia inmunosupresora. No obstante, los serios efectos secundarios provocados por la inmunoterapia supresora basados en los títulos altos de c-ANCA deben ser evaluados (7).

La detección ANCA ha sido el interés de muchos investigadores desde los años 60. La necesidad de contar con controles positivos, PMN aislados adecuadamente, conjugado que sirvan para mejorar la determinación, diagnóstico y seguimiento de enfermedades relacionadas con los ANCA en nuestro medio nos condujo a realizar el presente trabajo.

5.- OBJETIVOS.-

5.1.- OBJETIVOS GENERALES.-

- Mejorar la determinación de anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilo (ANCA).

5.2.- OBJETIVOS ESPECIFICOS.-

- Mejorar el método de purificación de PMN humanos.
- Determinar la vía de inmunización más adecuada para obtener anticuerpos antineutrófilos en conejos.
- Obtener gránulos azurófilos a partir de la degranulación de PMN con Ester acetato de forbol miristato.
- Obtener sueros control positivo (ANCA) en conejos.
- Determinar el título de los antiseros de conejo antineutrófilo y antigranulos de neutrófilo por inmunodifusión doble.
- Purificar gammaglobulinas de conejo mediante precipitación por salado con sulfato de amonio y por cromatografía de exclusión molecular.
- Preparar conjugado de anticuerpos de cordero anti-gammaglobulinas de conejo con fluoresceína.
- Evaluar la reactividad de los antiseros de conejo (antineutrófilo y/o sus fracciones) mediante la técnica de IFI.

6.- MATERIAL Y METODOS.-

6.1.- AISLAMIENTO DE (PMN).

6.1.1.- OBTENCION DE PMN POR CENTRIFUGACION EN GRADIENTE SIMPLE DE DENSIDAD

Material y reactivos.-

EDTA 0,1M pH 7,2

Ficoll-hipaque densidad = 1,082

PBS 0,15M pH 7,2

Dextrosa

Dextran al 5%

Sangre total (de donante obtenida por punción venosa).

Procedimiento.-

Se mezclaron 6 ml de sangre con 0,5 ml de EDTA, agregándose luego 1,25 ml de solución de dextran (1,25 ml de dextran + 37,5 mg de dextrosa). Posteriormente se dejaron sedimentar las células a 37°C por 45 minutos. El plasma obtenido fue diluido 1:2 con PBS.

En un tubo cónico se colocaron 3 ml de ficoll- hipaque de densidad 1,082, y se añadieron cuidadosamente 6 ml del plasma diluido.

Se centrifugó a 900 r.p.m. por 45 minutos, separándose la capa de células obtenidas entre la interfase del plasma y el ficoll- hipaque.

Las células se centrifugaron a 900 r.p.m. por 10 minutos y se lavaron 2 veces con PBS y se ajustó la población de células a 1×10^6 cel/ml

6.1.2.- OBTENCION DE PMN POR GRADIENTE DE DOBLE DENSIDAD.

Material y reactivos.-

EDTA 0,1M pH 7,2

Ficoll-hipaque densidad = 1,077

Ficoll- hipaque densidad = 1,119

PBS 0,15M pH 7,2

Sangre total (de donante obtenida por punción venosa)

Procedimiento

Se colocaron en un tubo cónico de centrifuga 3ml de ficoll- hipaque de densidad 1,119 agregándose cuidadosamente 3 ml de ficoll-hipaque de densidad 1,077, luego se añadieron 6 ml de sangre humana (6 ml de sangre + 0,6 ml de EDTA) y se centrifugó a 1500 r.p.m. por 30 minutos.

Se recogió la segunda interfase, y se lavaron las células con PBS 3 veces a 1000 r.p.m., por 10 minutos cada lavado.

El rendimiento se determinó en una cámara de Newbauer, el porcentaje de pureza con tinciones hematológicas y el porcentaje de viabilidad con azul tripan al 0,4%

La población celular se ajustó a 1×10^6 cel/ml, las mismas fueron guardadas a congelación (-20°C) hasta el momento de su uso.

6.2.- OBTENCION DE GRANULOS AZUROFILOS A PARTIR DE DEGRANULACION DE PMN CON ESTER DE ACETATO FORBOL MIRISTATO (PMA).

Material y reactivos.-

PMN obtenidos por gradiente de doble densidad.

PBS 0,1M pH 7,2 con 0,5 mM de cloruro de magnesio y 0,9 mM de cloruro de calcio.

Solución de Ester acetato de forbol miristato (PMA)

Filtro millipore 0,22 μm

Procedimiento.-

Los PMN se resuspendieron en PBS que contenía 0,5 mM de cloruro de magnesio y 0,9 mM de cloruro de calcio hasta obtener una relación de 40×10^6 cel/ml.

Se estimuló la degranulación de las células colocando 1 $\mu\text{g/ml}$ de PMA y dejando a 37°C por 30 minutos, después de los cuales separamos el contenido de los gránulos de los elementos formes con filtro millipore 0,22 μm .

6.3.- INMUNIZACION EN ANIMALES.-

6.3.1.- PROTOCOLO DE INMUNIZACION I

Material y reactivos.-

Conejo

Jeringas de insulina

Xilol

Alcohol.

Suspensión de PMN de concentración 1×10^6 cel/ml.

Procedimiento-

Se inocularon 15 dosis en forma interdiaria (1ml de suspensión de PMN) por vía intravenosa, dilatando las venas previamente con xilol y desinfectándolas con alcohol.

6.3.2.- PROTOCOLO DE INMUNIZACION II

Material y métodos.-

Conejo.

Jeringas de insulina.

Xilol.

Alcohol.

Adyuvante de Freund completo (ACF)

Adyuvante de Freund incompleto(AIF).

Suspensión de PMN de concentración 1×10^6 cel/ml

Procedimiento.-

Se obtuvo una emulsión mezclando partes iguales de PMN 1×10^6 cel/ml con ACF y agitando en vórtex por 25 minutos enfriando cada 7 minutos.

Después de 15 días se preparó una emulsión con partes iguales de la Suspensión de PMN lisados (concentración 1×10^6 cel/ml) y el AIF agitando en vórtex por 30 minutos con enfriamientos después de cada 10 minutos, se inoculo 1,8 ml también por vía intramuscular.

Finalmente después de 13 días se inoculó por vía intravenosa durante 3 días consecutivos 0,25 ml, 0,5 ml y 1 ml de una Suspensión de PMN enteros (1×10^6 cel/ml), respectivamente.

6.4.- TITULACION DE LOS ANTISUEROS DE CONEJO ANTI PMN O SUS FRACCIONES POR INMUNODIFUSION.-

Material y reactivos

Agar de baja electroendosmosis.

Solución de azida de sodio al 10%

Agua destilada

Pipetas

Porta objetos

Sacabocados

Sonicador

Procedimiento.-

Se disolvieron 100 mg de Agarosa en 10 ml de agua destilada con 10 μ l de solución de azida de sodio al 10% calentado hasta que el agar este completamente líquido, se colocaron 3 ml sobre un porta objeto y se dejó solidificar, con un sacabocado se realizaron 6 perforaciones alrededor de una perforación central donde se introdujeron aproximadamente 20 μ l del antígeno en el pozo central y en los pozos marginales el antisuero de conejo puro y diluciones modulo 2 X, así se mantuvo en cámara húmeda por 48 horas, los antígenos empleados para la titulación del antisueros fueron:

PMN puros sonicados (por 15 minutos).

PMN puros lisados (por congelación a -20°C y descongelación).

PMN intactos (recién obtenidos).

Gránulos azurófilos.

6.4.1.-TINCION DE PLACAS DE INMUNODIFUSION.

Material y reactivos.-

Solución de rojo Ponceau al 1%

Solución de ácido acético al 1%

Solución de ácido acético al 2%

Agua destilada

Geles de inmuno difusión

Solución fisiológica

Procedimiento.-

Las placas con los geles de inmunodifusión fueron lavadas con solución fisiológica 4 veces, luego con agua destilada 4 veces, por 8 horas cada lavado. Posteriormente las placas se secaron por 8 horas aproximadamente, colocando sobre cada una papel filtro que fue removido y se introdujo la placa en la solución de rojo ponceau al 1% por 5 minutos. Se eliminó la tinción inespecífica colocando la placa en ácido acético al 2% por 5 minutos y luego en una solución de ácido acético al 1% por 5 minutos. Finalmente, las placas fueron lavadas con agua destilada y secadas a temperatura ambiente.

6.5.- PURIFICACION DE GAMMAGLOBULINAS DE CONEJO PARA SU INMUNIZACION EN CORDERO.

6.5.1.- PRECIPITACION DE GAMMAGLOBULINAS POR SALADO CON SULFATO DE AMONIO

Material y reactivos

Sulfato de amonio (sustancia).

Buffer PBS 0,15M pH 7,2.

Buffer PBS 0,01M pH 7,2.

Solución salina.

Sangre de conejo.

Baño de hielo.

Cloruro de Bario al 10%.

Procedimiento.

Se obtuvieron 6,4 ml de suero a partir de 17 ml de sangre de conejo, el suero se diluyó 1:2 en solución salina y colocó en baño de hielo, en estas condiciones se fue

añadiendo el sulfato de amonio en forma lenta sobre un agitador magnético suavemente.

La cantidad de sulfato de amonio añadida fue la necesaria para alcanzar una saturación final del 45%, la misma que se calculó mediante la siguiente fórmula (29).

$$X = \frac{50,6 (S_2 - S_1)}{1 - (0,3 \times S_2)}$$

Donde X = g de sulfato de amonio sólido que se añaden a 100 ml de solución de saturación S₁ para alcanzar la saturación S₂.

Ejemplo:

$$X = \frac{50,6 (0,45 - 0,0)}{1 - (0,3 \times 0,45)} = 26,32 \text{ g}$$

Para 100 ml de solución-----26,32 g sulfato de amonio.

Para 12,8 ml de solución----- X

$$X = 3,36 \text{ g sulfato de amonio}$$

Terminado el agregado de sulfato de amonio, se dejó en agitación 30 minutos a la temperatura ambiente, se centrifugó por 15 minutos a 3500 r.p.m. desechandose el sobrenadante y se lavó una vez el precipitado con solución de sulfato de amonio al 45%.

Posteriormente se suspendió el precipitado en PBS 0,15M pH 7,2 en el volumen inicial de la muestra de suero sin diluir, en nuestro caso 6,4 ml, el mismo que se colocó en baño de hielo y al que se agregó en forma lenta sulfato de amonio en la cantidad necesaria para alcanzar el 40% de saturación, utilizando la fórmula anterior. Se dejó agitando durante 30 minutos a temperatura ambiente, centrifugándose posteriormente a 3500 r.p.m. por 15 minutos. El precipitado obtenido se lavó con 60 ml de solución saturada de sulfato de amonio al 40%, luego del último lavado se resuspendió en 5ml de PBS 0,15M pH 7,2 y colocó el mismo en una bolsa de diálisis que se introdujo en un vaso con PBS 0,01M pH 7,2 en un volumen de 200 ml, el que se cambio cada 8 hrs 7 veces.

Se comprobó la ausencia de sulfato de amonio en el PBS en el que se estaba realizando la diálisis haciendo una prueba cualitativa para identificar sulfatos con solución

de cloruro de bario, la ausencia de precipitado blanquecino evidencia la eliminación de sulfato en el PBS.

Se recupero la solución de la bolsa de diálisis y se centrifugó a 3000 r.p.m.. por 15 minutos y se conservó el sobrenadante a congelación (-20°C).

6.5.2.- PURIFICACION DE GAMMAGLOBULINAS DE CONEJO POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION MOLECULAR.

Material y reactivos.

Sephadex G-75.

Buffer PBS 0,1M pH 7,2.

Columna de cromatografía.

altura de la columna = 25,5 cm.

diámetro = 1,2 cm.

volumen = 28,83 cm³

Gammaglobulinas precipitadas previamente con sulfato de amonio.

Azul dextran 0,5%.

Bolsa de diálisis.

Colector de fracciones.

Bomba de vacío.

Procedimiento.-

Se procedió al hinchado del Sephadex G-75 resuspendiendo el mismo en PBS 0,1M pH 7,2, realizando cambios de PBS cada 8 horas. Se desgaseo el gel utilizando una bomba de vacío. La columna fue empacada teniendo el cuidado de evitar la formación de

interfases y burbujas, se equilibró la columna con PBS 0,1M pH 7,2 con dos veces el volumen del gel.

Para medir el volumen de elusión de la columna se utilizó azul dextran al 0,5 %, colocando 200 µl del mismo sobre la superficie de la columna en forma lenta, eluyendo posteriormente con PBS 0,1M pH 7,2 y colectando fracciones de 2 ml registrando las densidades ópticas de cada una de ellas a 280 nm luego de efectuar el lavado de la columna con PBS 0,1M pH 7,2 con 2 veces el volumen de la misma; se efectuó la corrida de la muestra, colectando fracciones de 2 ml en 25 tubos por cada corrida cromatográfica.

6.6.- DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS OBTENIDAS.

Las proteínas en solución absorben la luz ultravioleta a 280 nm debido fundamentalmente al triptófano, pero también a la tirosina y a la fenilalanina. Para la conversión de las lecturas 280 nm en expresiones de concentración debe utilizarse la absorbancia molar, por cuanto cada proteína contiene una cantidad diferente de cada uno de estos tres aminoácidos.

Dado que los ácidos nucleicos que absorben con intensidad la luz ultravioleta a 260 nm pueden estar presentes en preparados proteicos, el contenido proteico total viene dado por la siguiente ecuación (28).

$$[\text{proteínas}] = 1.55 \times \text{D.O. } 280 \text{ nm} - 0.76 \times \text{D.O. } 260 \text{ nm}$$

6.7.- PREPARACION DEL CONJUGADO (ANTICUERPOS DE CORDERO ANTI-GAMMAGLOBULINAS DE CONEJO CON FLUORESCEINA)

Material y reactivos.-

Gammaglobulinas de cordero anti-gammaglobulinas de conejo obtenidos por precipitación con sulfato de amonio (gentileza de María Rosa Cortez) y purificadas por cromatografía de exclusión molecular.

Isotiocianato de fluoresceína.

PBS 0,1M pH 7,2

Columna de cromatografía Sephadex G-25.

Bomba peristáltica.

Colector de fracciones.

Procedimiento.-

La concentración de proteínas fue determinada y ajustada a 20 mg/ml, se adicionó 0,05 mg de isotiocianato de fluoresceína por mg de proteína total, se dejó toda la noche en agitación (shaker) a 4°C. Posteriormente se hizo pasar la mezcla por una columna de cromatografía con Sephadex G-25, usando como eluyente PBS 0,1M pH 7,2. Se colectaron fracciones de 2 ml de las cuales se determinó la absorbancia al espectrofotómetro a 280 y 498 nm de longitud de onda, respectivamente.

6.8.- PREPARACION DE SUBSTRATO (PLACAS CON PMN) PARA INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)

Material y reactivos.-

Suspensión de PMN de concentración 4×10^6 cel/ml, obtenidos con gradiente de doble densidad con ficoll-hipaque.

Papel filtro.

Parafilm.

Procedimiento.-

Se prepararon citocentrifugados colocando 10 μ l de la suspensión de células centrifugando inmediatamente a 900 r.p.m. por 5 minutos.

Los porta objetos fueron guardados a congelación (-20 °C) envueltos herméticamente con parafilm.

6.9.- EVALUACION DE LA REACTIVIDAD DE LOS ANTISUEROS OBTENIDOS MEDIANTE LA TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA.

Material y reactivos.-

Fijadores: metanol, etanol, formol.

PBS 0,01M pH 7,2

Conjugado (anticuerpos de cordero anti-gammaglobulina de conejo con fluoresceína) preparados en este trabajo.

Microscopio de inmunofluorescencia.

Procedimiento.-

Los citocentrifugados de PMN fueron fijados con diferentes fijadores por 10 minutos.

Las placas se dejaron secar, posteriormente fueron hidratadas con PBS por 10 minutos, se escurrieron y se agregó 50 µl del suero control de ANCA (obtenidos por inmunización en conejos) en diluciones de 1:250; 1:500; 1:1000; 1:5000; 1:10000 incubando 30 minutos a temperatura ambiente.

Las placas se lavaron con PBS por 10 minutos, el exceso de PBS fue secado y se agregaron 50 µl del conjugado preparado (anticuerpos de cordero anti-gammaglobulinas de conejo) en diluciones 1:5000; 1:10000. Se incubó 30 minutos protegiendo de la luz. Nuevamente la placas fueron lavadas con PBS de la forma anteriormente indicada y fueron secadas a temperatura ambiente.

Finalmente se observaron al microscopio de fluorescencia.

7.- RESULTADOS.-

7.1.- AISLAMIENTO DE PMN

Los resultados obtenidos con las diferentes técnicas empleadas para la separación de PMN se describen a continuación (tabla 1).

Método de obtención de PMN	Ficoll-hipaque densidad =1.082 a partir de 6 ml de plasma diluido 1:2.	Gradiente de doble densidad a partir de 6 ml de sangre total.	Gradiente de doble densidad a partir de 6 ml de plasma diluido 1:2.
RENDIMIENTO	4x10 ⁶ cel/ml	5x10 ⁶ cel/ml	4x10 ⁶ cel/ml
% PUREZA	68 %	95 %	98 %
VIABILIDAD	90 %	90 %	89 %

Tabla 1.- Rendimiento, % de pureza, viabilidad de PMNs obtenidos por diferentes métodos



Fig. 1.- Separación de PMN por gradiente de doble densidad

Las técnicas que emplearon gradiente de doble densidad (fig. 1) para la separación de PMN son las mas adecuadas de acuerdo a la pureza obtenida (tabla 1). Además, cuando se empleó plasma fue posible eliminar la contaminación de eritrocitos, que se encontraban presentes al utilizar sangre total.

7.2.- OBTENCION DE GRANULOS AZUROFILOS A PARTIR DE LA DEGRANULACION DE PMN CON ACETATO DE FORBOL MIRISTATO (PMA)

La degranulación de PMN se verificó microscópicamente realizando cuidadosamente extendidos de la suspensión de células antes y después de la adición de PMA.

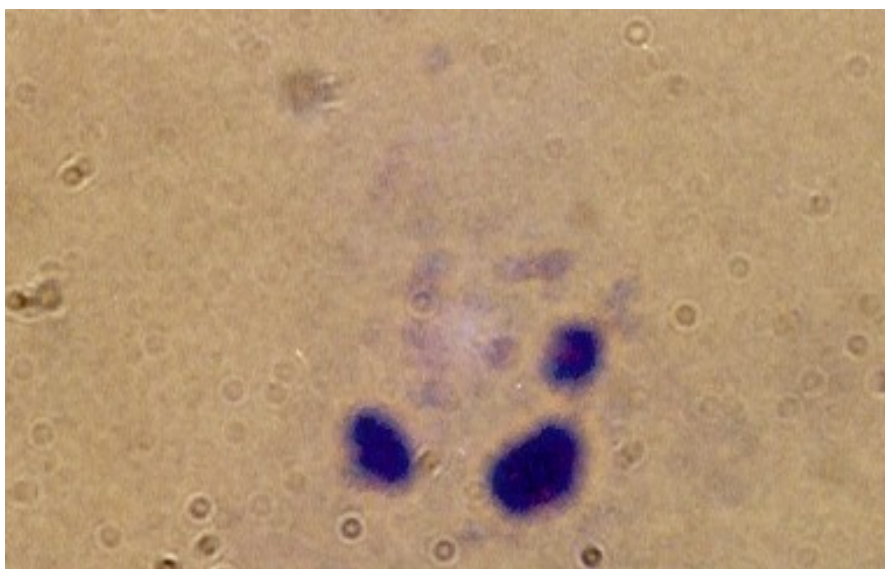


Fig. 2.- Degranulación de PMN con PMA.- Se observan los gránulos liberados después de la incubación con PMA.

Los extendidos fueron teñidos con azul de toluidina; se observó que la totalidad de los PMN tratados con PMA (1 μ g/ml) estaban degranulados (Fig. 2) en contraposición a las células no tratadas con PMA, en las que no se observaron signos de degranulación (células íntegras).

7.3.- INMUNIZACION DE CONEJO PARA LA OBTENCION DE ANTISUERO (ANTINEUTROFILOS HUMANOS)

Luego de realizadas las inmunizaciones los títulos de anticuerpos obtenidos fueron los siguientes:

Al inmunizar al conejo empleando el protocolo de inmunización I, inoculando PMN aislados por gradiente de doble densidad, luego de 11 dosis se obtuvo un antisuero de un título 1:2 frente a PMN lisados, en cambio frente a los otros antígenos no hubo ninguna respuesta. Sin embargo, después de 15 inoculaciones ya no se detectaron anticuerpos.

Posteriormente, inoculando el antígeno con ACF, AIF y puro (protocolo inmunización II), se lograron obtener títulos mayores con relación al primero, utilizando PMN puros intactos (fig. 3A), PMN puros lisados (fig. 3B), PMN puros sonicados (fig. 4), contenido de gránulos azurófilos (fig. 5) como antígeno, el título encontrado fue de 1:8 en todos los casos.

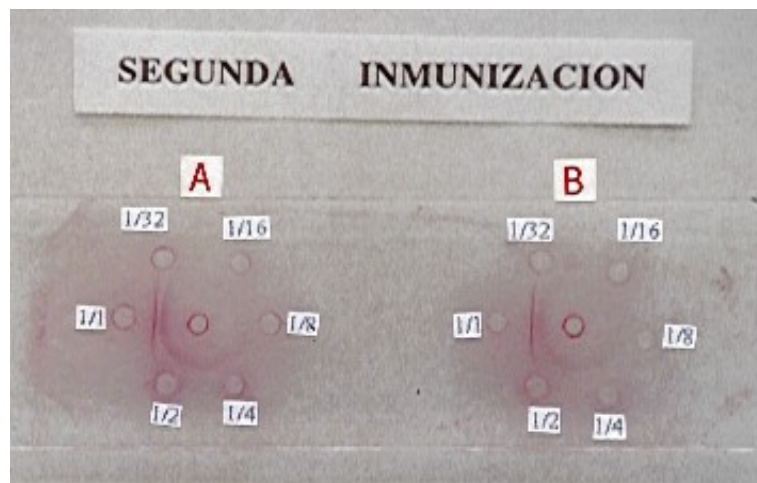


Fig. 3.- Titulación de antisuero anti-PMN (protocolo de inmunización II) de conejo, frente a PMN intactos (A) y lisados (B) por inmunodifusión doble. Se observa las bandas de precipitación en las diluciones correspondientes.



Fig. 4.- Titulación de antisuero anti-PMN de conejo, frente a PMN sonicados por duplicado. Se observaron bandas en las diluciones correspondientes



Fig. 5.- Titulación de antisuero anti-PMN de conejo, frente a contenido de gránulos azurófilos. Se observa una banda única en las respectivas diluciones.

Antígeno	Antígeno frente al que se tituló			
	PMN puros intactos	PMN puros lisados	PMN puros sonicados	Contenido de gránulos de neutrófilos
Título del antisuero	1/8	1/8	1/8	1/8

Tabla 2.- Titulación del antisuero antineutrófilos humanos y/o sus fracciones frente al antígeno sometido a diferentes tratamientos.

7.4.- PURIFICACION DE GAMMAGLOBULINAS DE CONEJO MEDIANTE PRECIPITACION POR SALADO.

7.4.1.- DETERMINACION DEL CONTENIDO DE PROTEINAS

De la fracción de gammaglobulinas obtenidas por precipitación con sulfato de amonio a partir de 6,4 ml de suero de conejo, se obtuvieron 44,48 mg de proteína, (6,95 mg/ml de proteínas).

7.4.2.- PURIFICACION DE GAMMAGLOBULINAS DE CONEJO POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION MOLECULAR.

Las gammaglobulinas obtenidas por salado fueron purificadas mediante Sephadex G-75.

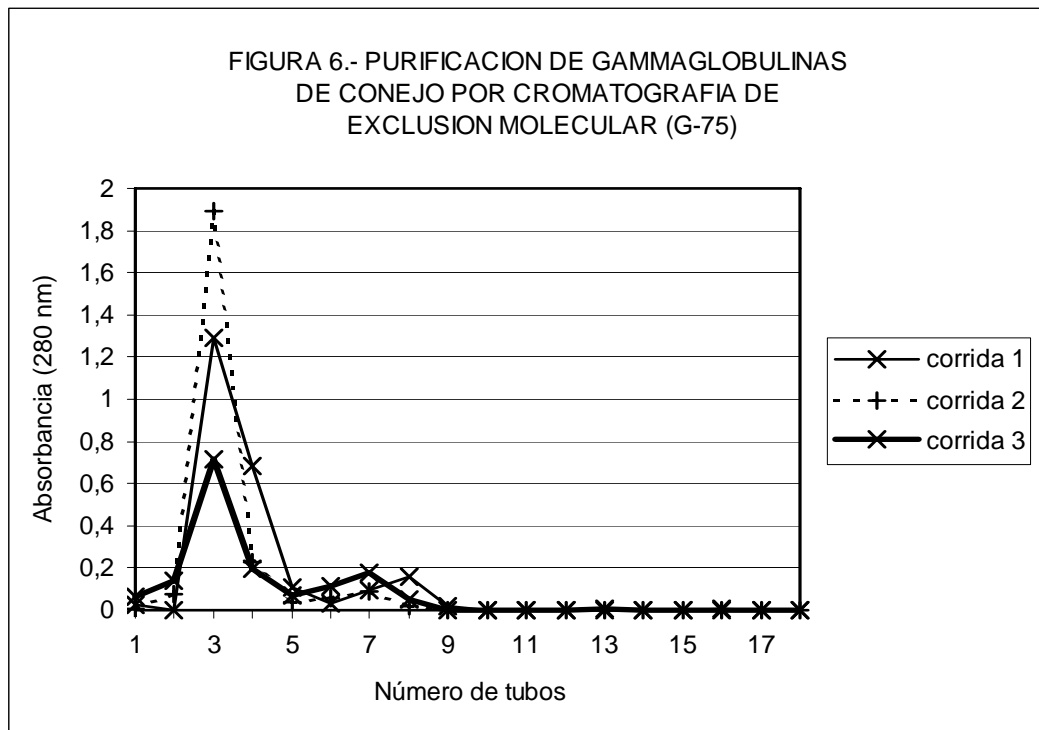
La fig. 6 muestra los perfiles cromatográficos de diferentes corridas de la fracción de gammaglobulinas. Se observa un primer pico claro y definido (volumen excluido) que corresponde a las gammaglobulinas (peso molecular mayor a 150 000 Da).

Además, se observa un segundo pico, menos definido que corresponde a trazas de otras proteínas, principalmente albúmina que no fue totalmente eliminada en el proceso de precipitación con sulfato de amonio. Este segundo pico se encuentra dentro del volumen incluido y fue desechado.

Las fracciones de gammaglobulina obtenidas en las diferentes corridas fueron concentradas con PEG, determinándose una concentración promedio de 1,639 mg/ml en un volumen de 16 ml.

7.5.- PREPARACION DE CONJUGADO (ANTICUERPOS GAMMAGLOBULINAS DE CORDERO ANTI GAMMAGLOBULINAS DE CONEJO - FLUORESCENCIA).

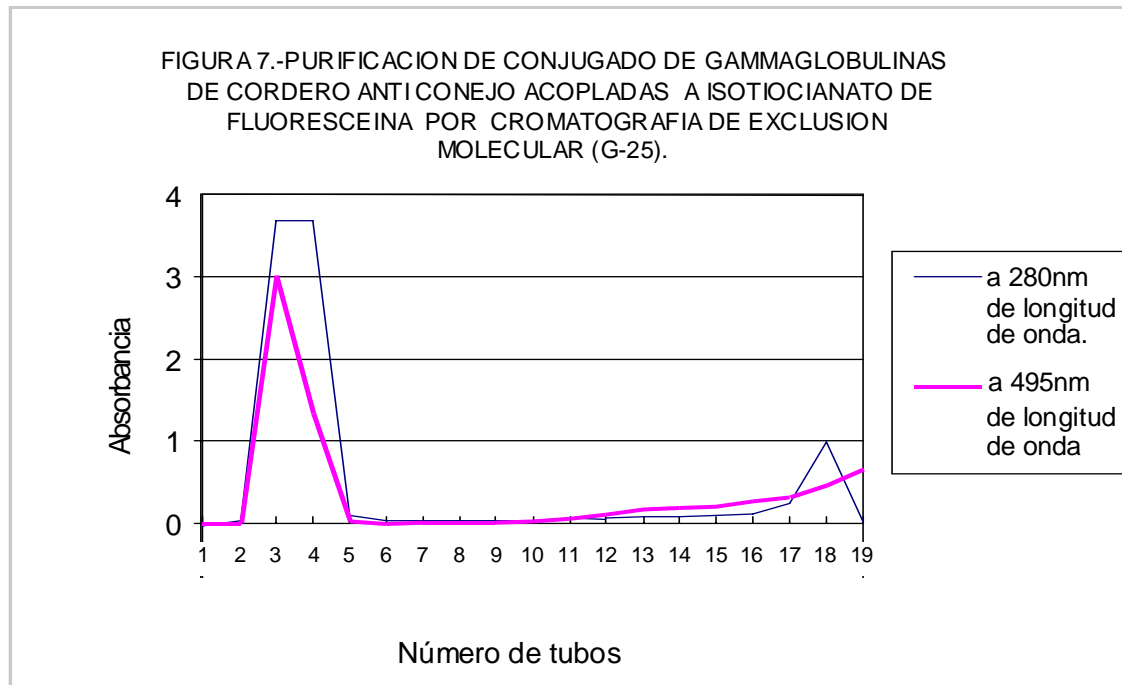
Se ajustó la concentración de proteínas a 20 mg/ml y se mezcló con 1 mg de isocianato de fluoresceína. Después de la incubación, éste fue purificado por cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-25 para separar del conjugado el exceso de los reactantes.



La cromatografía de exclusión molecular con Sephadex G-25 utilizada para purificar el conjugado fluoresceinado presentó el perfil cromatográfico de la fig. 7.

El conjugado se obtuvo en los tubos 3 y 4, correspondiendo al volumen excluido por el alto peso molecular. Las fracciones colectadas fueron leídas a 280 y 495 nm para determinar la relación fluoresceína/proteína y además para verificar la adecuada purificación del conjugado; observándose que existe un primer pico conteniendo proteínas acopladas a fluoresceína (conjugado), un segundo pico a 280 nm que corresponde a la proteína libre no conjugada (tubo 18) y un tercer pico a 495 nm más retardado que corresponde a la fluoresceína libre contenida en el tubo 19.

El conjugado obtenido tenía una relación fluoresceína/proteína de 2,8 para el tubo 3 y 3,8 para el tubo 4 siendo el óptimo el tubo 3 cuyo valor se aproxima a la relación 2:1 que indica la bibliografía (20) (ver anexo I).



7.5.1.- TITULACION DEL CONJUGADO FLUORESCINADO Y ANTICUERPOS ANTI PMN HUMANOS.

Se ensayó el conjugado 3 que es el que presenta una relación fluoresceína/proteína más cercana a la reportada para utilizarse en tejidos fijados que es de 2:1 (20).

Se ensayaron diferentes diluciones del conjugado preparado (1:5000 y 1:10000) con diferentes fijadores y con diferentes diluciones del primer anticuerpo (obtenido por inmunización con PMN en conejos).

Los patrones de fluorescencia observados cuando se utilizó metanol fueron de localización citoplasmática con presencia de gránulos que presentaban mayor intensidad de fluorescencia en la mayoría de los casos.

ANTISUERO	CONJUGADO	
	1 : 5 000	1 : 10 000
1 : 500	96 %	99%
1 : 1 000	70 %	30 %
1 : 5 000	98%	0 %

Tabla 3.- Porcentaje de PMN con fluorescencia citoplasmática observados en la titulación del conjugado (anticuerpo de cordero anti-gammaglobulinas de conejo) utilizando metanol como fijador del substrato de PMN.

Con las diluciones mas bajas y altas de conjugado (1:1000 y 1:20000) y diluciones 1:500 y 1:1000 del antisuero no había diferencia clara entre las células positivas y negativas encontrándose un patrón difuso y no observándose ninguna granulación. En la dilución 1:5000 del antisuero se encontró una reacción cercana a la negatividad en la mayoría de las diluciones del conjugado.

Cuando se utilizó el conjugado en una dilución 1:5000, se pudo diferenciar claramente el citoplasma con fluorescencia granular en 96 % de los PMN a una dilución de 1:500 del primer anticuerpo. El mismo patrón de fluorescencia aunque más tenue y en menor porcentaje de células (70 %), se observó al utilizar el antisuero diluido 1:1000. Sin embargo, utilizando una dilución 1:5000 del antisuero se encontró una reacción positiva difusa en 98% de las células.

Por otro lado, al emplear la dilución 1:10000 del conjugado y una dilución 1:500 del antisuero el 99% de los PMN presentaban fluorescencia tenue difusa. Con la dilucion 1:1000 del antisuero solo el 30% de los PMN presentaban fluorescencia difusa.

Finalmente, con la dilución 1:5000 del antisuero se observó reacción negativa con el conjugado en dilución 1:10000, y se determinó entonces que la dilución 1:5000 del conjugado es la ideal para ensayos posteriores.

Por otro lado, se ensayaron otros dos fijadores con la finalidad de distinguir patrones de fluorescencia citoplasmáticos de perinucleares. Así, se fijaron PMN con etanol y formol, respectivamente; sin embargo no se encontró el patrón perinuclear esperado, además existió una aparente disminución de la actividad del conjugado en ambos casos (datos no mostrados).

8.- DISCUSION

El propósito de desarrollar y estandarizar pruebas que permitan la detección de ANCA ha sido el interés de muchos investigadores desde los años 60, sin embargo las investigaciones acerca del tema no están completamente concluidas (6).

La detección de anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA) es actualmente un instrumento importante para establecer el diagnóstico en pacientes con vasculitis sistémica y glomerulonefritis rápidamente progresiva. Cuando estos anticuerpos son detectados por inmunofluorescencia indirecta son marcadores sensibles de granulomatosis de Wegener, poliangeitis microscópica y de glomerulonefritis idiopática rápidamente progresiva (19).

El presente estudio fue realizado con el propósito de separar PMN humanos, obtener controles positivos y preparar conjugado para mejorar el diagnóstico por inmunofluorescencia indirecta (IFI); ya que la disponibilidad de controles positivos y negativos adecuados para la detección de anticuerpos anti-PMN humanos no es de fácil acceso; especialmente en lo referente al control positivo, ya que como controles negativos es posible utilizar sueros de donadores aparentemente sanos.

Al ser la IFI una técnica semi-cuantitativa, se hace indispensable el uso de dichos controles, para poder establecer claras diferencias entre una reacción positiva fuerte, moderada y débil de una negativa.

Por tanto, se probaron diferentes técnicas para el aislamiento de PMN humanos, como la centrifugación en gradiente simple de densidad y en gradiente doble de densidad, con la finalidad de obtener un antígeno puro, tanto para la inmunización en animales, así como para su utilización como sustrato en la técnica IFI.

El mejor porcentaje de pureza (98%) fue logrado con la técnica de gradiente de doble densidad, utilizando plasma diluido 1:2 como muestra. Este porcentaje es similar al obtenido por Stephen B. Pruet (96% - 98% de pureza) en 1990 utilizando gradiente de doble densidad empleando como muestra sangre total. En cambio la pureza que obtuvimos fue superior al 95% conseguido por Hagen et. al. en 1996 siguiendo la técnica de Lüdermann et. al. 1988 (8) (18).

Además; pudimos eliminar la contaminación con eritrocitos, presente al utilizar sangre total empleando como muestra plasma. Para lograr dicha eliminación Andrew Saxon et. al. utilizaron shock hipotónico. La ventaja de emplear plasma para este propósito es que los restos de glóbulos rojos no contaminan la suspensión de PMN (21).

Los resultados de viabilidad obtenidos por las técnicas de gradiente de doble y simple densidad estaban comprendidos entre 90% y el 89%. Viabilidad inferior a la obtenida por Hagen et. al. siguiendo la técnica de Lüdermann et. al. (1988), que fue de 97% (18).

El mayor rendimiento de PMN (5×10^6 cel/ml) se obtuvo con la técnica de gradiente de doble densidad empleando como muestra sangre total.

Después de 11 dosis de inmunización de conejos se obtuvo un antisuero de título 1:2 frente a PMN lisados. Con la finalidad de mejorar la respuesta obtenida se procedió a la administración de 4 dosis más, después de las cuales no se observó reacción alguna. Esto último probablemente por la inducción de tolerancia, razón por la cual se decidió incorporar los PMN con adyuvante completo de Freund (ACF) y adyuvante incompleto de Freund (AIF) en posteriores inmunizaciones.

Utilizando estos adyuvantes, fue posible obtener anticuerpos anti-PMN en el suero en un título de 1:8 frente a los diferentes antígenos (inmunodifusión doble). Cuando se utilizó como antígeno los gránulos de PMN obtenidos por estimulación con PMA, se observó una banda de precipitación definida, a diferencia de las bandas formadas con el resto de los antígenos; que fueron varias y de diferentes intensidades (fig. 6); lo que confirmó la presencia de anticuerpos contra el contenido de los gránulos azurófilos, esto es importante ya que A. Wiik et. al. en 1993 indican que los neutrófilos pueden desencadenar respuesta autoinmune a través de la formación de autoanticuerpos dirigidos principalmente contra componentes citoplasmáticos (6). Aún más específicamente trabajos realizados por Rasmussen et al en 1990 determinan que las enzimas de los gránulos han sido caracterizadas como el mayor blanco antigénico (14) (15).

Por otro lado, la obtención de otros bioreactivos necesarios para la ejecución de este trabajo incluyeron la purificación de gammaglobulinas, que siguiendo el protocolo establecido

permitió la obtención de la fracción deseada. La cual nos serviría para la inmunización del cordero y obtención del antisuero respectivo en éste. Sin embargo, debido a la premura del tiempo y en vista de contar con suero de cordero anti-conejo se procedió directamente con el siguiente paso, almacenándose estas fracciones obtenidas para posteriores estudios. El antisuero de cordero fue tratado por centrifugación, diálisis y cromatografía de exclusión molecular con el objeto de asegurar la obtención de gammaglobulinas.

Esta fracción fue utilizada como tal ante la imposibilidad de realizar cromatografía de afinidad en ausencia del reactivo acoplante (bromuro de cianógeno), que hubiera permitido la obtención de gammaglobulinas anti-conejo específicas.

Entonces, se procedió al marcado con fluoresceína y la posterior purificación del conjugado, obteniéndose dos fracciones, de las cuales se decidió utilizar la que presentaba una relación fluoresceína/proteína de 2,8 siendo este el más cercano al rango aconsejado para células viables por Leslie Hudson; en las cuales la reacción es mucho más específica y la fluorescencia inespecífica es mucho más débil comparada con la reacción en tejido fijado (20).

Para la titulación del conjugado preparado se ensayaron dos diluciones 1:5000 y 1:10000. Se encontró que la dilución 1:5000 es la que permite observar patrones granulares citoplasmáticos bien definidos cuando se utiliza el antisuero 1:500 casi en todas las células. Estudios anteriores empleando IFI muestran dos patrones de fluorescencia, el patrón c-ANCA (citoplasmático) que está fuertemente relacionado con la enzima PR-3. El patrón p-ANCA (perinuclear) está asociado con los anticuerpos dirigidos contra varias enzimas como mieloperoxidasa, lactoferrina, elastasa, catepsina-G (6). Sin embargo, nosotros solo pudimos observar el patrón citoplasmático granular; posiblemente debido a que los anticuerpos formados contra la mieloperoxidasa y otras enzimas que dan patrón p-ANCA fueron enmascarados por el patrón citoplasmático.

No obstante algunos autores entre ellos Falk y Jennette señalan el hecho de que el patrón p-ANCA podría ser un artefacto, ya que durante la fijación de los granulocitos con el etanol las membranas de los gránulos son destruidas, los antígenos ANCA positivamente cargados son conducidos y localizados hacia las cargas negativas de la membrana nuclear (4).

Se descarto la dilución 1:10000 del conjugado, ya que aunque permite observar considerable número de células positivas con el antisuero 1:500, el patrón observado no fue granular, sino simplemente difuso.

Diluciones menores, tanto del conjugado como del suero fueron empleadas por A. Wiik et al; 1:100 del conjugado (antisuero de conejo anti-IgG humano marcado con fluoresceína de Dako, Glostrup, Denmark) y 1:20 de los sueros. Del mismo modo J. Lüdeman et al en 1988 emplearon diluciones de conjugado 1:40 (antisuero de oveja anti-IgG humano marcado con fluoresceína de Wellcome, Dartford. England). Las diluciones bajas posiblemente se deban a que estos conjugados sean de naturaleza monoclonal.

Por otro lado, se ensayaron otras diluciones mayores y menores del conjugado y del suero control (datos no mostrados). Sin embargo los resultados encontrados no fueron adecuados ya que presentaban mucho ruido de fondo, descartándose éstas en ensayos posteriores.

Además, los controles negativos mostraron fluorescencia difusa tenue, la que permitió discriminar los patrones granulares intensos claramente.

De esta forma, se logró obtener antisuero control positivo, que además de permitir el reconocimiento de reacciones positivas, de diferentes intensidades permitirá la optimización de otras variables en la detección de anticuerpos anti-PMN.

Finalmente, sería necesario optimizar otros métodos de fijación que permiten discriminar patrones perinucleares de citoplasmáticos e incluso poder identificar el blanco antigénico.

9.- CONCLUSIONES

Se purificaron PMN humanos, con rendimiento de 5×10^6 cel/ml, 98% de pureza y 90% de viabilidad, utilizando la técnica de gradiente de doble densidad.

Se estableció que la vía óptima de inmunización de conejos para la obtener sueros anticitoplasma de neutrófilo es la vía intradérmica, utilizando además adyuvante de Freund.

Se logró obtener suero control positivo (anti-PMN humanos), mediante la inmunización de PMN purificados en conejos.

Fue posible además, inducir la liberación de gránulos específicos de PMN utilizando PMA; éstos permitieron determinar la presencia de anticuerpos dirigidos contra su contenido enzimático.

Fue posible purificar gammaglobulinas de conejo y preparar conjugado (anticuerpos de cordero antigammaglobulinas de conejo con fluoresceína).

Se logró titular el antisuero de conejo ANCA por inmunodifusión doble; así se encontró un título 1:2 para PMN y 1:8 para los gránulos de estos.

El antisuero de cordero obtenido, permitió establecer un título de 1:5000 del conjugado como el más adecuado, pudiendo observarse un patrón citoplasmático granular intenso, claramente diferente al observado con suero control negativo. Además, la dilución óptima del antisuero de conejo (anti-PMN) fue 1:500, diluciones mayores y menores disminuyen la eficacia del conjugado.

Se lograron aislar PMN que con las características mencionadas anteriormente que sirvieron de sustrato para la detección de ANCA, los controles positivos permitieron adquirir entrenamiento en la visualización e interpretación de patrones de fluorescencia, de esta forma fue posible detectar ANCA por IFI.

10.- BIBLIOGRAFIA

1. Bevilacqua, Bensoussan, Jansen, Spinola, Carvalhaes; **"Fisiopatología Clínica"**; 2º edición; Librería Editorial El Ateneo; 1980.
2. Robbins S.L., Cotran R.S.; **"Patología estructural y funcional"**; 3º edición; Editorial Interamericana; 1987.
3. David H., Cormack; **"Histología de Ham"**; 9º edición; 1988.
4. Wiegke, Wetzel; **"Detection of ANCA by indirect immunofluorescence method"**, Elias International; 3; 7-8; 1996.
5. Farreras R.; **"Medicina interna"**; 13º edición; Mosby Doyma libros Madrid España; Madrid España; 1995.
6. Wiik A., Rasmussen N., Wieslande J.; **"Methods to detect autoantibodies to neutrophilic granulocytes"**, Manual of biological Markers of Disease; 9; 1-14; 1993.
7. Michael D., Amos; **"Serodiagnosis of autoimmune vasculitis anti-neutrophil cytoplasmic antibodies"**, Elias International; 3; 5-6; 1996.
8. Stephe B., Audey Y., Loftis, Pruett; **"Characteristics of MTT as an Indicator of viability and respiratory burst activity of human neutrophils, in arch allergy appl. Immunol"**, Int Arch Allergy Appl Immunol; Mississippi USA; 92; 189-192; 1990.
9. Wiik A., Jensen E., Friis J.; **"Granulocyte-specific antinuclear factors in synovial fluids and sera from patients with rheumatoid arthritis"**; 33; 515-522; 1974.
10. Rasmussen N., Wiik A.; **"Indirect immunofluorescence for IgG ANCA in sera submitted for the 1st International workshop on ANCA"**, Acta Pathol Microbiol Immunol Scand; 6; 16-20; 1989.
11. Wiik A.; **"Delineation of a standard procedure for indirect immunofluorescence detection of ANCA"**, Acta Pathol Microbiol Immunol Scand; 6; 12-13; 1989.
12. Savage C.O.S., Winearls C.G., Jones S., Marshall P.S., Lockwood C.M.; **"Prospective study of radioimmunoassay for antibodies against neutrophil cytoplasm in diagnosis of systemic vasculitis"**, Lancet; 1389-1393; 1987.

13. Rasmussen N., Sjolín C., Isaksson B., Bygren P., Wieslander J.; "**An ELISA for the detection of anti-neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA)**", Journal of Immunological Methods; 127; 139-145; 1990.
14. Falk R.F., Jennette J.C.; "**Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis an idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis**", New England Journal Medicine; 318; 1651-1657; 1988.
15. Luderman J., Utecht B., Gross W.L.; "**Detection and quantification of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in Wegener's granulomatosis by ELISA using affinity purified antigen**", Journal of Immunological Methods; 114; 167-174; 1988.
16. Rasmussen N., Ludermann J., Utecht B.; "**ELISA examination for IgG ANCA in sera submitted for the 1st International workshop on ANCA**", Acta Pathol Microbiol Immunol Scand 97; 6; 21-22; 1989.
17. Daha M.R., Rasmussen N.; "**Presentation of solid phase assays from several laboratories**", Network Journal Medicine; 36; 137-142; 1990.
18. Hagen E.C., Andrassy K., Chernoke, Daha M.R., Gaskin B., Gross W., Lesavre P., Ludemann J., Pusey C.D., Rasmussen N., Savage C.O.S., Sinico A., Wiik A., Vander Woude F.J.; "**The value of indirect immuno, fluorescence and solid phase technique for ANCA detection. A report on the first phase of an International cooperative study on the standardization of ANCA on the first phase of an International cooperative study on the standardization of ANCA assays**", Journal of Immunological Methods; 159; 1-16; 1993.
19. Hagen E.C., Andrassy K., Csernok E., Daha M.R., Gaskin B., Gross W.L., Hansen B., Heigl Z., Hermans J., D'Jayne D., Kallenberg C.G.M., Lesavre P.; "**Development and standardization of solid phase assays for the detection of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies ANCA a report on the second phase of an international cooperative study on the standardization of ANCA assays**", Journal of immunological Methods; 196; 1-5; 1996.
20. Hudson L.; "**Practical immunology**"; 3^o edición; Blackwell scientific publications;

21. Saxon A., Shanahan F., Landers C., Ganz T., Targan S.; "**Adistict subset of antineutrophil cytoplasmic antibodies is associatied with inflammatory bowel disease**"; Journal Allergy Clinical Immunology; 86; 202-10; 1990.
22. Bradwell A.R., Stokes R.P., Johnson G.O.; "**Neutrophil cytoplasmic antigens (ANCA). Atlas of auto-antibody patterns, on tissues**"; 1999.
23. Savage J.A., Smith L., Duggan J.C.; "**Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in myelodysplasia and other haematological disorders**", Australian and New Zealand Journal of Medicine; 24; 282-287; 1994.
24. Groutas W.C., Hoidall J.R., Brubaker M.J., Stanga M.A., Venkataraman R., Gray B.H. Rao N.V.; "**Inhibitors of human leukocyte proteinase-3**", Journal Medicine Chemistry; 33; 1085-1086; 1990.
25. Strurrock A.B., Franklin K.F., Rao G., Marshall B.C., Rebentisch M.B., Lemons R.S., Hoidal J.R.; "**Structure, chromosomal assignment, and expression of the gene for proteinase-3 the Wegener`s granulomatosis autoantigen**", Journal Biology Chemistry.; 267; 21193-21199; 1992.
26. File://C:\WINDOWS\ANCA1.htm.; "**Anticuerpos-anticitoplasma de neutrófilos (ANCA) en el diagnóstico de vasculitis**".
27. Sanford T., Davidsohn; "**Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio**"; 8º edición; Salvat Editores S.A.; Barcelona España; 1; 1988.
28. Julio C., Linares M., Villaescusa B.R., Morera L.M.; "**Anticuerpos anticitoplasma de néutrofilos (ANCA) en pacientes con nefropatía diabética**", Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia; 14; 87-90; 1998.
29. Sanchez L., Carvajal R.; "**Guía de trabajos prácticos de laboratorio**", Inmunología; 1995.
30. Cornall R.J., Goodnow C.C., Cyster J.G.; "**The regulation of self-reactive B cells**" Current opinion in immunology; 7;804-811; 1995.

ANEXOS

ANEXO I.-

PREPARACION DE REACTIVOS

*** Solución de EDTA 0,1M pH 7,2**

EDTA	0,744	g
Agua destilada	20	ml

Disolver el EDTA en agua destilada y ajustar el pH con HCl 0,5 N.

*** Buffer PBS 0,15M pH 7,2**

ClNa	4,38	g/L
NaH ₂ PO ₄	2,15	g/L
Na ₂ HPO ₄	8,09	g/L

Disolver cada reactivo por separado, mezclar, ajustar el pH y aforar a 1litro.

*** Buffer PBS 0,1M pH 7,2 con 0,5 mM de Cl₂Mg y 0,9 mM de Cl₂Ca.**

Cl ₂ Mg. 6H O	1,01	mg
Cl ₂ Ca. 2H O	1,3	mg
PBS 0,1M pH 7,2	10	ml

Disolver el Cl₂Mg y el Cl₂Ca en 10ml de PBS 0,1M pH 7,2

*** Solución de Azida de sodio 10%**

Azida de sodio	0,1	g
Agua destilada	1	ml

Disolver azida de sodio en agua

*** Solución de Rojo Ponceau 1%**

Rojo Ponceau	0,1	ml
Agua destilada	10	ml

Disolver el Rojo Ponceau en agua destilada.

*** Solución de ácido acético al 1%**

Acido acético glacial	0,1	ml
Agua destilada	10	ml

Diluir el ácido acético glacial hasta enrasar a 10 ml con agua destilada

*** Solución de ácido acético al 2%**

Acido acético glacial	1,2	ml
Agua destilada	10	ml

Diluir el ácido acético glacial hasta enrasar a 10 ml con agua destilada

ANEXO II.-

DETERMINACION DE LA RELACION FLUORESCENCIA/PROTEINA.

$$\text{Relación Fluorescencia/Proteína} = \frac{2,87 \times \text{Absorbancia a 495 nm}}{\text{Absorbancia a 280 nm} \times 0,35 \text{ Absorbancia a 495 nm}}$$

Relación Fluorescencia/Proteína Tubo 3 = 2,8

Relación Fluorescencia/Proteína Tubo 4 = 3,8

ANEXO III.-

PREPARACION DE FICOLL-HIPAQUE PARA UN VOLUMEN DE 50 ml

Preparación de Ficoll

Disolver 3,35 g de Ficoll en 35,3 ml de agua destilada

Preparación de hipaque

Diluir 142,35 ml. de Hipaque al 70% con 294,1 ml. de agua destilada

Mezclar el Ficoll e Hipaque, medir y ajustar la densidad de la solución.

Para medir la densidad del la solución de ficoll-hipaque:

Pesar el pignómetro vacío PV

Pesar el pignómetro con agua destilada = PA

Pesar el pignómetro con la solución de ficoll-hipaque = Pf-h

$$\text{Densidad} = \frac{\text{Pf-h} - \text{PV}}{\text{PA} - \text{PV}}$$