

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

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

Michel Papo Berger

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

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

C 1677-75660
0133-22160

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

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

Memoria para optar al Grado de Doctor en Medicina y Cirugía

Michel Papo Berger

T 144

Director de la Tesis: Profesor Cristóbal Richart Jurado

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





UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

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

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

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

Firmado. Profesor Cristóbal Richart

Tarragona, 20 Enero de 1999

AGRADECIMIENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABREVIATURAS

aa: Aminoácidos

ACR: *American College of Rheumatology*

AECA: Anticuerpos anticélula endotelial

ANA: Anticuerpos antinucleares

ANCA: Anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo

AR: Artritis reumatoide

α 1-AT: α 1-antitripsina

BPI: *Bactericidal/permeability increasing protein*

c-ANCA: Patrón citoplasmático

CBP: Cirrosis biliar primaria

CEP: Colangitis esclerosante primaria

CU: Colitis ulcerosa

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

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

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

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

EC: Enfermedad de Crohn

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

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

EII: Enfermedad inflamatoria intestinal

ELISA: Enzimoimmunoensayo

GN: Glomerulonefritis necrosante

GS-ANA: Anticuerpos antinucleares específicos de los granulocitos

GW: Granulomatosis de Wegener

HAI: Hepatitis autoinmune

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

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

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

ICE: Enzima convertidor de la interleucina 1 β

IFI: Inmunofluorescencia indirecta

IL-1: Interleucina 1

IL-1 α : Interleucina 1 α

IL-1 β : Interleucina 1 β

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

IL1A: Gen de la interleucina 1 α

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

LES: Lupus eritematoso sistémico

kb: Kilobases
kD: Kilodaltons

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

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

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

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

VNTR: *Variable Number of Tandem Repeats*

1. PREAMBULO

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

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

2. INTRODUCCION

2.1. ANTICUERPOS ANTICITOPLASMA DE NEUTROFILO

2.1.1. Introducción

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

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

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

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

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

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

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

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

2.1.2. Técnicas de detección de los ANCA

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

2.1.2.1. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

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

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

2.1.2.1.1. Sustratos antigénicos

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

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

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

2.1.2.1.2. Patrones de inmunofluorescencia.

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

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

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

◆ c-ANCA

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

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

♦ p-ANCA

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

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

2.1.2.1.3. Interpretación de los resultados de la IFI.

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

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

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

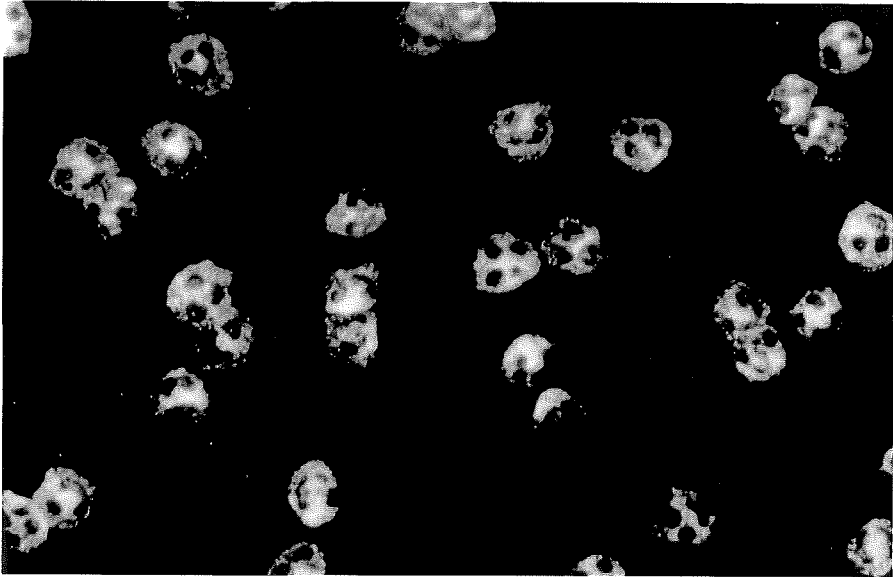


Figura 1. Patrón c-ANCA a 40 aumentos.

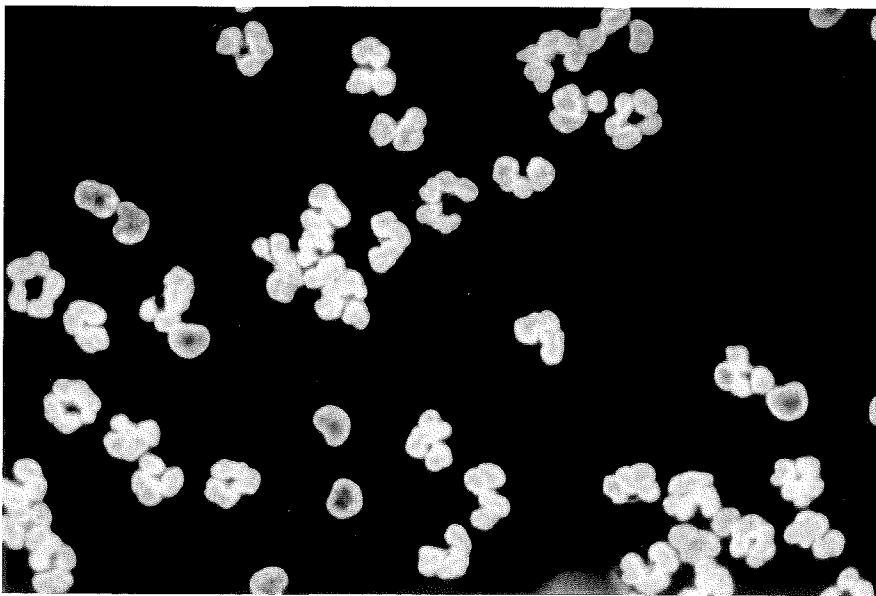


Figura 2. Patrón p-ANCA a 40 aumentos.

2.1.2.2. Enzimoimmunoensayo (ELISA)

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

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

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

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

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

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

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

2.1.2.3. Otras técnicas

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

2.1.3. Especificidades antigénicas de los ANCA

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

2.1.3.1. Gránulos y vesículas secretoras de los neutrófilos

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

2.1.3.1.1. Vesículas secretoras

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

2.1.3.1.2. Gránulos

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

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

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

2.1.3.2. Principales antígenos de los ANCA

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

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

2.1.3.2.1. Proteínasa 3 (PR3)

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

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

2.1.3.2.2. Mieloperoxidasa (MPO)

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

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

2.1.3.2.3. Otros antígenos

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

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

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

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

2.1.4. Enfermedades asociadas

2.1.4.1. Vasculitis

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

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

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

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

Tabla 1. Clasificación de las vasculitis*

VASCULITIS DE LOS VASOS DE GRAN TAMAÑO

Arteritis de células gigantes

Arteritis de Takayasu

VASCULITIS DE LOS VASOS DE MEDIANO TAMAÑO

Poliarteritis nodosa (PAN)

Enfermedad de Kawasaki

Vasculitis primaria granulomatosa del sistema nervioso central

VASCULITIS DE LOS VASOS DE PEQUEÑO TAMAÑO

Vasculitis de los vasos de pequeño tamaño asociadas a los ANCA

Granulomatosis de Wegener

Poliangeítis microscópica

Síndrome de Churg-Strauss

Vasculitis asociadas a los ANCA inducidas por fármacos

Vasculitis de los vasos de pequeño tamaño por inmunocomplejos

Púrpura de Schönlein-Henoch

Vasculitis crioglobulinémica

Vasculitis lúpica

Vasculitis reumatoidea

Vasculitis del síndrome de Sjögren

Vasculitis urticarial hipocomplementémica

Enfermedad de Behçet

Síndrome de Goodpasture

Vasculitis de la enfermedad del suero

Vasculitis por inmunocomplejos inducida por fármacos

Vasculitis por inmunocomplejos inducida por infecciones

Vasculitis paraneoplásicas

Vasculitis inducida por procesos neoplásicos linfoproliferativos

Vasculitis inducida por procesos neoplásicos mieloproliferativos

Vasculitis inducida por carcinomas

Vasculitis de la enfermedad inflamatoria intestinal

* Según Falk y Jennette (ref 41)

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

VASCULITIS DE LOS VASOS DE GRAN TAMAÑO

Arteritis (temporal) de células gigantes

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

Arteritis de Takayasu

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

VASCULITIS DE LOS VASOS DE MEDIANO TAMAÑO

Poliarteritis nodosa

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

Enfermedad de Kawasaki

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

VASCULITIS DE LOS VASOS DE PEQUEÑO TAMAÑO

Granulomatosis de Wegener

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

Síndrome de Churg-Strauss

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

Poliangeítis microscópica

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

Púrpura de Schönlein-Henoch

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

Vasculitis crioglobulinémica esencial

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

Angeítis cutánea leucocitoclástica

angeítis cutánea leucocitoclástica aislada sin vasculitis sistémica ni glomerulonefritis.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.1.4.1.1.2. Vasculitis asociadas a los ANCA inducidas por fármacos

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

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

2.1.4.1.2. Otras Vasculitis

2.1.4.1.2.1. Otras vasculitis de los vasos de pequeño tamaño

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

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

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

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

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

2.1.4.1.2.2. Vasculitis de los vasos de mediano tamaño.

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

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

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

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

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

2.1.4.1.2.3. Vasculitis de los vasos de gran tamaño

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

2.1.4.2. Otras enfermedades asociadas a los ANCA

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

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

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

2.1.4.2.1. Conectivopatías

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

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

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

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

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

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

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

2.1.4.2.2. Hepatopatías crónicas

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

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

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

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

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

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

2.1.4.2.3. Enfermedades infecciosas

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

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

Koderisch y cols.²²³ fueron los primeros en comunicar la presencia de ANCA en 24 de 29 pacientes infectados por el **VIH**, si bien estos autores atribuyeron sus hallazgos a una reacción falsamente positiva de la IFI. Posteriormente otros investigadores han reportado una prevalencia de un 18-42% en la infección por el **VIH**²²⁴⁻²²⁶.

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

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

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

2.1.4.2.4. Otras enfermedades

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

2.1.5. Papel patogénico de los ANCA en las vasculitis sistémicas

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

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

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

2.1.5.1.1. Activación de los neutrófilos mediada por los ANCA

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

2.1.5.1.2. Activación de los monocitos mediada por los ANCA

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

2.1.5.1.3. Interacción entre los ANCA y las células endoteliales

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

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

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

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

2.1.5.1.5. Interacción de los ANCA con sus antígenos diana

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

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

2.1.5.2. Papel fisiopatológico de los ANCA *in vivo*

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

2.2. ANCA EN LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

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

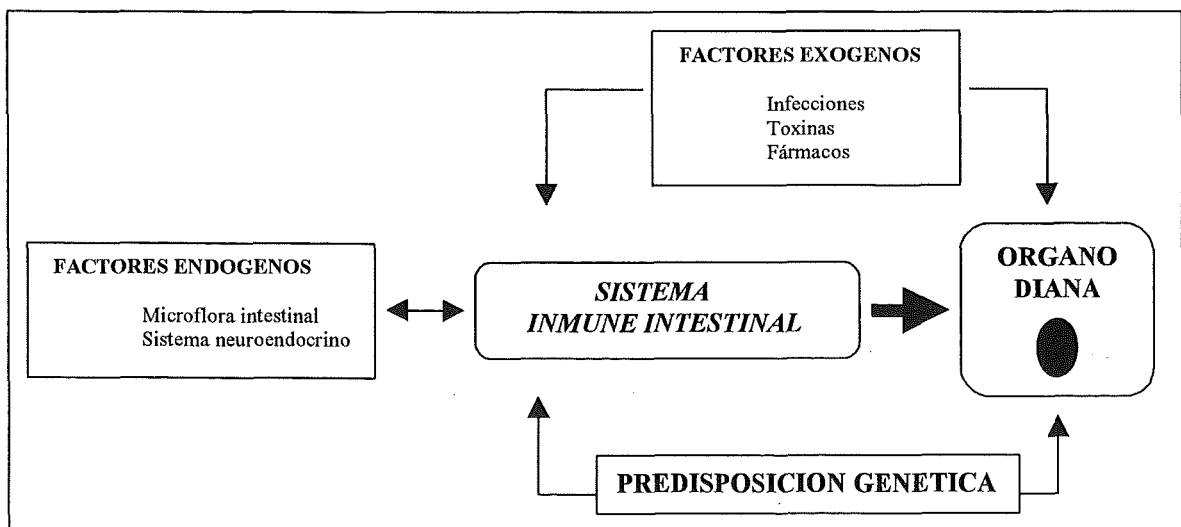


Figura 3. Etiopatogenia de la enfermedad inflamatoria intestinal

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

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

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

2.2.1. Técnicas de detección

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

2.2.1.1. Inmunofluorescencia indirecta

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

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

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

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

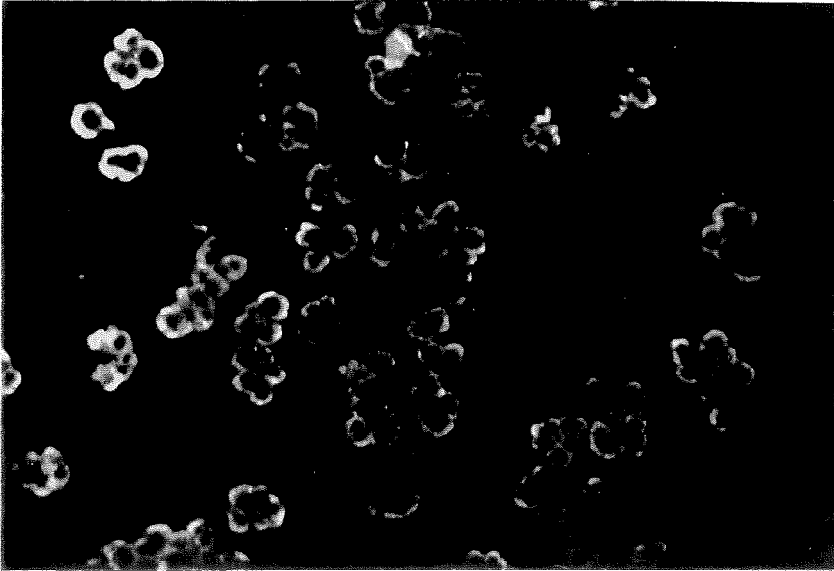


Figura 4. Patrón p-ANCA a 40 aumentos de un paciente con CU.

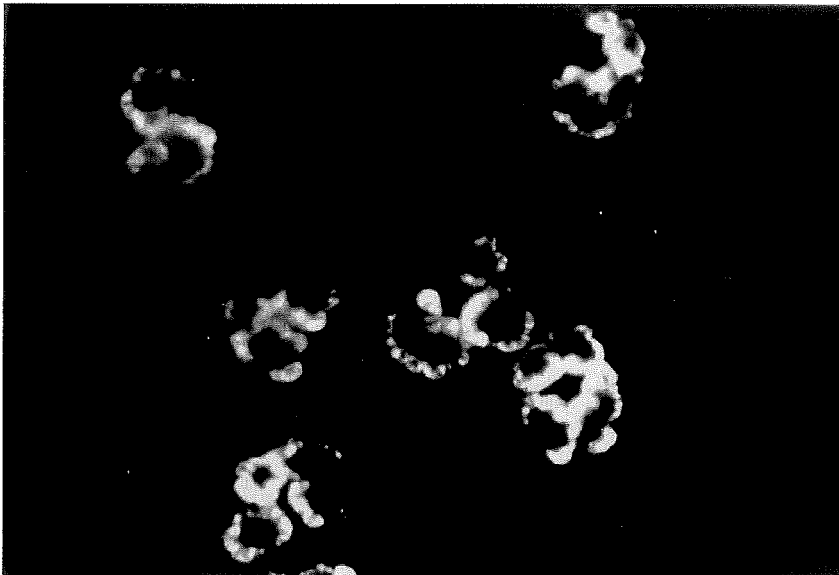


Figura 5. Patrón p-ANCA a 100 aumentos de un paciente con CU.

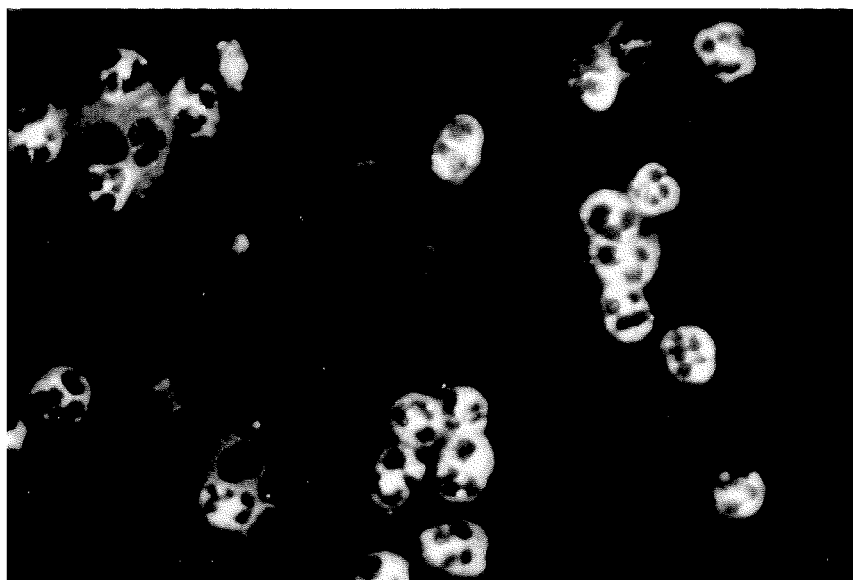


Figura 6. Patrón c-ANCA a 40 aumentos de un paciente con CU.



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

2.2.1.2. ELISA

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

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

2.2.2. Especificidades antigénicas

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

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

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

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

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

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

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

2.2.3. Clases y subclases de ANCA en la EII

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

2.2.4. Prevalencia de los ANCA en la enfermedad inflamatoria intestinal

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.2.5. Papel patogénico de los ANCA en la EII

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

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

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

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

2.2.6. Significado y utilidad de los ANCA en la EII

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

2.2.6.1. Papel de los ANCA como marcadores serológicos clínicos

2.2.6.1.1. Marcadores diagnósticos de la colitis ulcerosa

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

2.2.6.1.2. Marcadores de bursitis (pouchitis)

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

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

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

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

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

2.2.6.2. Papel de los ANCA como marcadores genéticos

2.2.6.2.1. Marcadores subclínicos de susceptibilidad genética a la EII

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

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

2.2.6.2.2. Marcadores subclínicos de heterogeneidad genética en la EII

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

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

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

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

2.3. GENETICA DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

2.3.1. Predisposición genética en la EII

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

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

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

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

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

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

2.3.2. Modelo de herencia en la EII

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

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

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

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

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

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

2.3.3. Identificación de los genes susceptibles en la EII

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

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

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

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

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

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

2.3.4. Elección de los marcadores genéticos

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

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

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

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

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

2.3.5. Antagonista del receptor de la interleucina 1

2.3.5.1. Familia de la interleucina 1

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

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

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

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

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

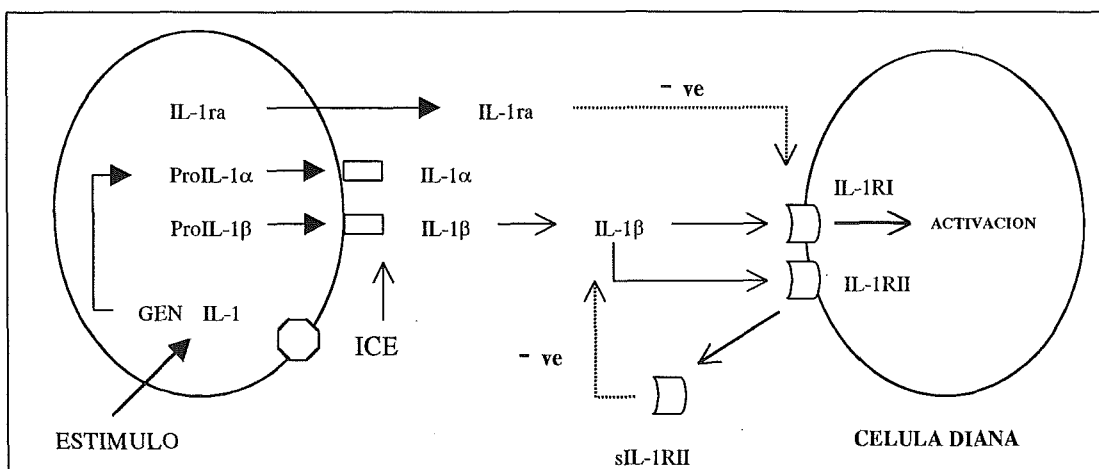


Figura 8. Estructura y mecanismos de acción de la familia de la IL-1.

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

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

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

2.3.5.2. IL-1ra en la EII

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

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

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

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

2.3.5.3. Gen del IL-1ra

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

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

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

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

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

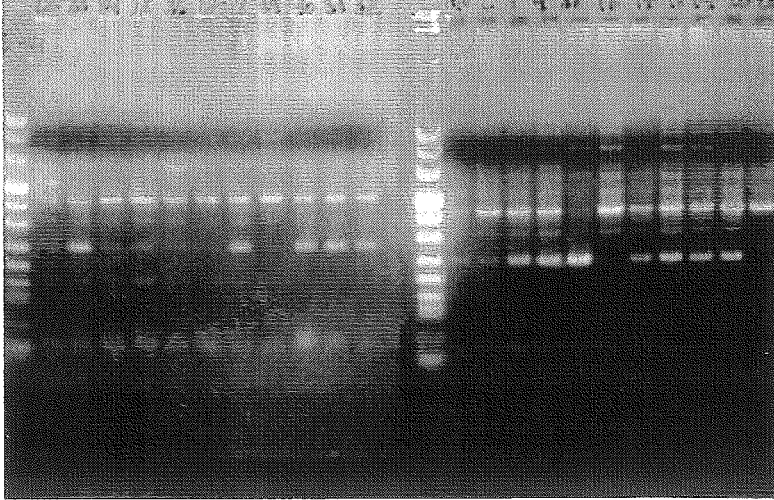


Figura 9. Gel correspondiente al análisis del polimorfismo VNTR en el intrón 2 del IL-1RN.

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

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

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

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

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

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

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

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

2.3.6. Factor de necrosis tumoral

2.3.6.1. Estructura y función

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

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

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

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

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

2.3.6.2. TNF en la EII

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

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

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

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

2.3.6.3. Genes del TNF α y del TNF β

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

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

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

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

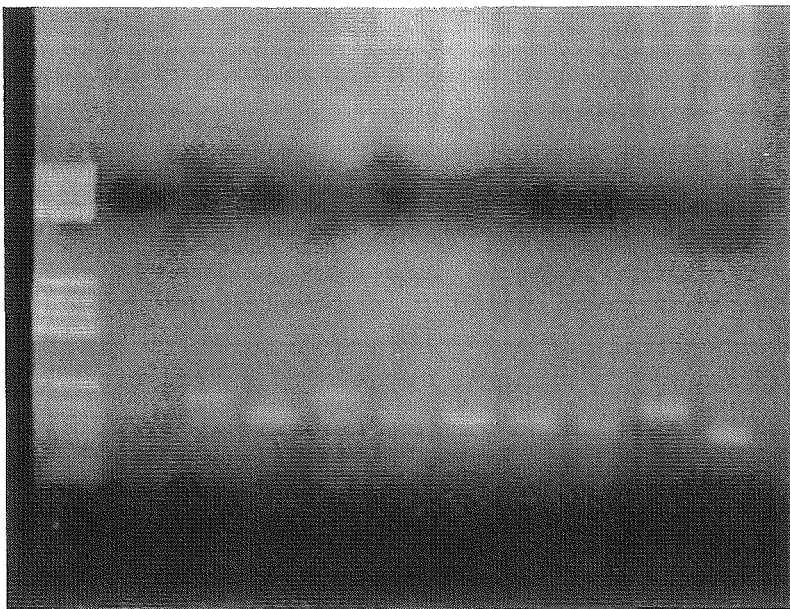


Figura 10. Gel correspondiente al análisis del polimorfismo TNF α -308.

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

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

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

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

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

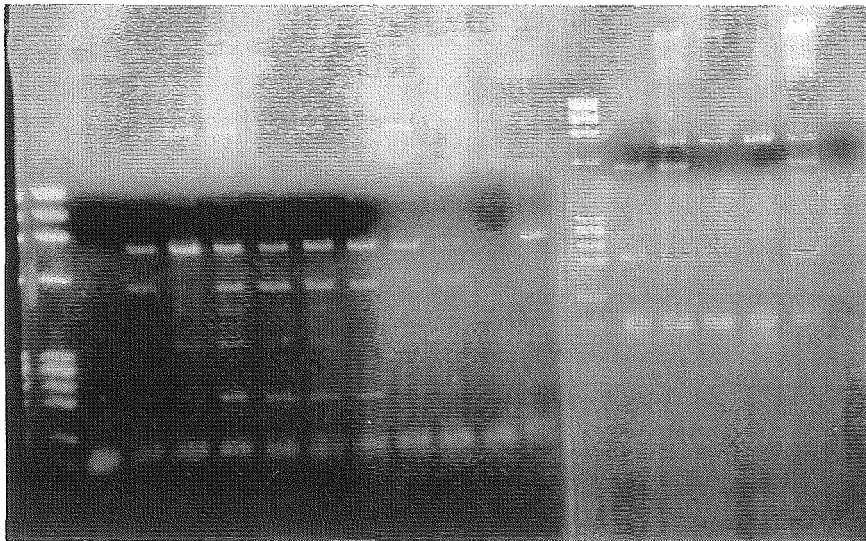


Figura 11. Gel correspondiente al análisis del polimorfismo RFLP en el primer intrón del gen del TNFB.

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

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

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

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

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

3. OBJETIVOS

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

ESTUDIO 1.

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

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

ESTUDIO 2.

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

ESTUDIO 3.

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

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

4. PUBLICACIONES

4.1. ESTUDIO 1

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

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

4.2. ESTUDIO 2

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

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

4.3. ESTUDIO 3

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

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

4.1. ESTUDIO 1

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

Anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo en la enfermedad inflamatoria del intestino

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

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

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

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

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

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

Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease

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

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

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

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

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

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

Manuscrito aceptado el 6-5-1997

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

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

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

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

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

Pacientes y métodos

Pacientes

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

Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

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

Análisis estadístico

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

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

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

Resultados

Prevalencia de anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo en la enfermedad inflamatoria intestinal

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

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

Anticuerpos antinucleares (ANA)

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

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

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

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

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

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

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

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

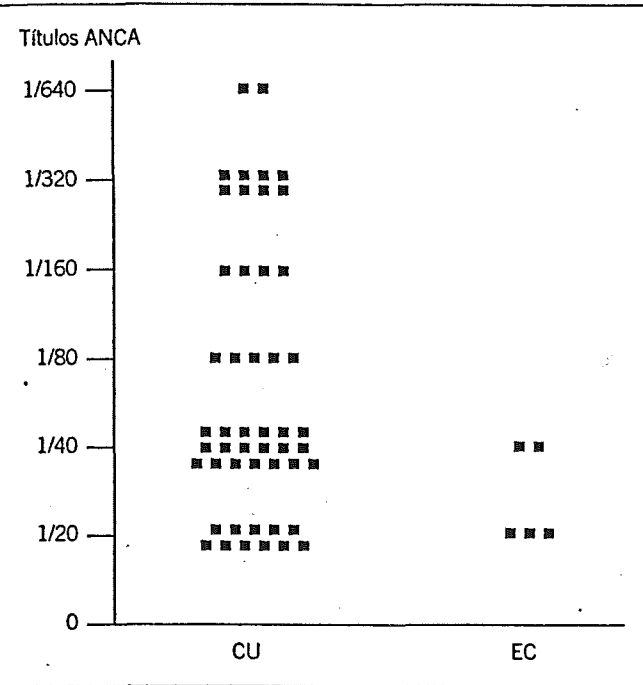


Fig. 1. Títulos de anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo (ANCA) de los pacientes con colitis ulcerosa (CU) y enfermedad de Crohn (EC).

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

Discusión

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

cuerpos dirigidos contra las células epiteliales del colon, anticuerpos antilinfocitotóxicos y anticuerpos contra las células endoteliales vasculares⁴⁰. El significado de estos anticuerpos en la EII es incierto, pero su relevancia clínica parece limitada debido a que no son específicos de la enfermedad, y además se detectan con una frecuencia generalmente baja.

Durante los últimos años, ha quedado bien establecida la asociación entre los ANCA y la EII, en concreto la CU^{7,30}. Al igual que los otros anticuerpos asociados a la CU, la evidencia actual indica que los ANCA tampoco participan en la patogenia de la enfermedad. Por el contrario, su elevada especificidad para la CU, la

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

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

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

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

TABLA 3

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

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

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

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

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

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

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

- trophil autoantibodies (p-ANCA) in unaffected relatives of patients with ulcerative colitis (UC). Suggestions against familial aggregation [resumen]. *Gut* 1994; 35 (Supl 4): A31.
24. Castellino F, Rosina F, Bansi DS, Bauducci M, Touscoz GA, Giorda L et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease: do they recognize different subsets of a heterogeneous disease? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995; 7: 859-864.
 25. Lee JCW, Lennard-Jones JE, Cambridge G. Antineutrophil antibodies in familial inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995; 108: 428-433.
 26. Kossa K, Coulthart A, Ives CT, Pusey CD, Hodgson HJF. Antigen specificity of circulating antineutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995; 7: 783-789.
 27. Hertvig E, Wieslander J, Johansson C, Wiik A, Nilsson A. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in chronic inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1995; 30: 693-698.
 28. Esteve M, Mallolas J, Klaassen J, Abad-Lacruz A, González-Huix F, Cabré E et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in sera from colectomized ulcerative colitis patients and its relation to the presence of pouchitis. *Gut* 1995; 38: 894-898.
 29. García Herola A, Bustamante M, Hoyos M, Sanchez-Cuenca JM, Nos P, Carmona E et al. Prevalencia de anticuerpos frente al citoplasma de los neutrófilos (ANCA) en la enfermedad inflamatoria intestinal [resumen]. *Rev Esp Enf Digest* 1996; 88 (Supl 1): 6.
 30. Vasiliauskas EA, Plevy SE, Landers CJ, Binder SW, Ferguson DM, Yang H et al. Perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with Crohn's disease define a clinical subgroup. *Gastroenterology* 1996; 110: 1810-1819.
 31. Ellerbroek PM, Oudkerk Pool M, Ridwan BU, Dolman KM, Von Blomberg BME, Von dem Borne AEGKR et al. Neutrophil cytoplasmic antibodies (p-ANCA) in ulcerative colitis. *J Clin Pathol* 1994; 47: 257-262.
 32. Stoffel MP, Csernok E, Herzberg C, Johnston T, Carroll F, Gross W. Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) directed against bactericidal/permeability increasing protein (BPI): a new seromarker for inflammatory bowel disease and associated disorders. *Clin Exp Immunol* 1996; 104: 54-59.
 33. Shanahan F. Neutrophil autoantibodies in inflammatory bowel disease: are they important? *Gastroenterology* 1994; 107: 586-589.
 34. Dignass A, Goebell H. Genetics of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 1995; 11: 292-297.
 35. Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1989; 24 (Supl 170): 2-6.
 36. Truelove SC, Witts LJ. Cortisone in ulcerative colitis. Final report of a therapeutic trial. *Br Med J* 1955; 2: 1,041-1,048.
 37. Harvey RF, Bradshaw JM. A simple index of Crohn's disease activity. *Lancet* 1980; 1: 514-515.
 38. Wiik A. Delineation of a standard procedure for indirect immunofluorescence detection of ANCA. *APMIS* 1989; 97 (Supl 6): 12-13.
 39. Shanahan F. Pathogenesis of ulcerative colitis. *Lancet* 1994; 342: 407-411.
 40. Jacquot S, Boumsell L, Bensussan A, Modigliani R. Anomalies du système immunitaire dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. *Gastroenterol Clin Biol* 1994; 18: 945-953.
 41. Papo M, Quer JC, Pastor RM, García-Pardo G, Prats E, Mirapeix E et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in relatives of patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 1996; 91: 1,512-1,515.
 42. Rump JA, Wörner I, Roth M, Schölmerich J, Hänsch M, Peter HH. p-ANCA of undefined specificity in ulcerative colitis: correlation to disease activity and therapy. *Adv Exp Med Biol* 1993; 336: 507-513.
 43. Seibold F, Slametschka D, Gregor M, Weber P. Neutrophil autoantibodies: a genetic marker in primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1994; 107: 532-536.
 44. Lindgren S, Florén CH, Lindhagen T, Starck M, Stewenius J, Nässberger L. Low prevalence of antineutrophil cytoplasmic antibodies in ulcerative colitis patients with long-term remission. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995; 7: 563-568.
 45. Sandborn WJ, Landers CJ, Tremaine WJ, Targan SR. Association of antineutrophil cytoplasmic antibodies with resistance to treatment of left-sided ulcerative colitis: results of a pilot study. *Mayo Clin Proc* 1996; 71: 431-436.

4.2. ESTUDIO 2

ANTICUERPOS ANTICITOPLASMA DE NEUTROFILO EN FAMILIARES DE PACIENTES CON ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL.

Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies in Relatives of Patients with Inflammatory Bowel Disease

Michel Papo, M.D., Juan Carlos Quer, M.D., Rosa María Pastor, M.D., Graciano García-Pardo, M.D.,
Eduard Prats, M.D., Eduard Mirapeix, M.D., Rosa Rodríguez, and Cristobal Richart, M.D.

Section of Gastroenterology, Department of Biochemistry, and Department of Internal Medicine,
Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, School of Medicine, Universitat Rovira i Virgili of Tarragona, Spain;
Department of Internal Medicine, Hospital San Joan, Reus, Spain; and Department of Nephrology,
Hospital Clinic i Provincial, Barcelona, Spain

Background: The occurrence of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) has been reported more frequently than expected in healthy first-degree relatives of patients with ulcerative colitis, suggesting that these antibodies may represent a subclinical marker of genetic disease susceptibility. **Aim:** To determine the prevalence of ANCA in unaffected first-degree relatives of inflammatory bowel disease patients in a Spanish population. **Methods:** Three hundred and seventy sera obtained from 80 patients with inflammatory bowel disease (55 ulcerative colitis, 25 Crohn's disease), 217 unaffected first-degree relatives (157 from ulcerative colitis and 60 from Crohn's disease patients), 62 healthy controls, and 11 celiac disease patients were tested using an indirect immunofluorescence assay. **Results:** Antibodies were detected in 64% of patients with ulcerative colitis but in only 12.5% of patients with Crohn's disease. ANCA were seldom present in their unaffected first-degree relatives (4.6%), control subjects (1.6%), and celiac disease patients (0%). **Conclusions:** In the Spanish population studied, antineutrophil cytoplasmic antibodies occur more commonly in ulcerative colitis than in Crohn's disease, as reported in other Caucasian populations. Moreover, their presence is not increased in their first-degree relatives. These findings indicate that ANCA are not a subclinical marker of genetic susceptibility to inflammatory bowel disease in this population.

INTRODUCTION

The etiopathogenesis of the chronic inflammatory bowel diseases (IBD), ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD), remains poorly understood. The most comprehensive theory proposed is that the disease occurs in a genetically susceptible subject, as a result of the interaction between environmental agents and host immunological responses (1).

Evidence for genetic predisposition is strongly supported by epidemiological and genetic studies showing ethnic differences in disease frequency, familial aggregation, increased monozygotic twin concordance, and different HLA associations for UC and CD (2).

Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) directed against the cytoplasmic components of neutrophil granules were first described as an important marker in patients with Wegener's granulomatosis and other forms of vasculitis (3-5). Their clinical relevance has been well established in the diagnosis and management of the vasculitic syndromes (6). More recently, the occurrence of a subset of ANCA has been recognized in the sera of patients with IBD. The reported frequency of ANCA in patients with UC varies from 23 to 88%. In CD, ANCA have been detected much less frequently, with a prevalence of 0-25% and usually in low titers (7-15). In contrast to the vasculitides, however, the potential clinical significance of ANCA in IBD is still unclear. Currently available evidence indicates that they are not directly involved in its pathogenesis. On the other hand, their high degree of specificity for ulcerative colitis in comparison with other colitides, lack of correlation with disease extent and severity, and persistence after colectomy, suggests that they are not simply an epiphenomenon related to active colonic inflammation. Rather, they may reflect an underlying immunoregulatory disturbance in a subgroup of UC patients.

For the last few years, a higher frequency of ANCA has been reported in unaffected family members of patients with UC than in control subjects (16, 17). These findings raised the question of whether such antibodies may represent a subclinical marker of genetic susceptibility to UC. This increased prevalence, however, has not been confirmed by other studies (18-21). The discrepancy between the various reports may reflect population and ethnic differences in the patients studied. In the present study we have evaluated the frequency of ANCA in first-degree family members of patients with IBD in a well-defined Spanish population.

Study population

Serum samples obtained from patients with IBD, their first-degree relatives, and controls were coded and stored at -70°C until assayed.

All patients, family members, and controls analyzed in the present report are Caucasians, and were born and live in the same geographic area (province of Tarragona, Catalonia).

IBD patients

Eighty patients with IBD attending the Gastroenterology Section and the Department of Internal Medicine of two participating medical centers were included in the study. All patients were well known to the investigators, their diagnosis having been established based on conventional clinico-pathological criteria according to those described by Leonard-Jones (22). There were 55 patients with UC (25 men, 30 women; 40 yr mean age) and 25 patients with CD (8 men, 17 women; 31 yr mean age). The main clinical features of the patients studied are shown in Table 1.

First-degree relatives of patients with IBD

One hundred fifty-seven first-degree relatives of patients with UC ranging in age from 13 to 78 yr (mean 39.5) were tested for ANCA. There were 51 parents (30 women and 21 men), 19 brothers, 39 sisters, and 48 children (27 daughters and 21 sons). The group of first-degree relatives of patients with CD consisted of 60 subjects ranging in age from 15 to 73 (mean 42). There were 10 fathers, 19 mothers, 10 brothers, 13 sisters, 7 sons, and 1 daughter.

At the time of the blood collection, relatives were interviewed and a detailed medical history was obtained to yield information concerning any significant gastrointestinal symptom or extraintestinal manifestation that may relate to as-yet-undiagnosed IBD. Five relatives were found to have IBD and were not included in the study population.

Control subjects

As controls, we examined sera from 40 healthy blood donors (25 men, 15 women, 35 yr mean age) without any history of gastrointestinal disease, nor family members affected with IBD. We also investigated 22 healthy spouses of patients with IBD (20 UC, 2 CD; 14 men, 8 women; 45 yr mean age) as environmental controls, and 11 patients with celiac disease.

Indirect immunofluorescence assay

A standard indirect immunofluorescence (IIF) method was used for detection of ANCA (23). Sera were diluted 1:20 in phosphate-buffered saline (PBS), and approximately 35 µL of the diluted sera was placed onto test wells on glass slides containing ethanol-fixed neutrophils as antigen sub-

TABLE 1
Clinical Characteristics of Patients with Inflammatory Bowel Disease at the Time of Serum Sampling

Features	Ulcerative Colitis	Crohn's Disease
Number	55	25
Gender (Male/Female)	25/30	8/17
Mean age, yr (range)	40 (18-76)	31 (17-61)
Disease location		
Proctitis	6 (10.9%)	—
Proctosigmoiditis	16 (29.1%)	—
Left-sided colitis	14 (25.4%)	—
Extensive colitis	4 (7.3%)	—
Total colitis	10 (18%)	—
Small bowel	—	6 (24%)
Ileocolic	—	6 (24%)
Colonic	—	10 (40%)
Postresection	5 ^a	3 ^b
Disease activity		
Activity	19 (38%)	8 (36%)
Remission	31 (62%)	14 (64%)
Medication		
Steroids	10	7
Azathioprine	3	4

^a 3 ileostomy, 2 ileoanal anastomosis.

^b 3 ileocolic anastomosis.

state (INOVA Diagnostics, San Diego, CA). All incubations were performed in humidified boxes at room temperature for 30 min. The slides were then washed with three changes of PBS for 5 min each. After a 30-min incubation period with anti-human IgG conjugated to fluorescein with Evans blue counterstain (INOVA Diagnostics), they were washed again as above, mounted under a coverslip with PBS-glycerin, and finally examined with a fluorescent microscope. Positive and negative controls were included for all assays. The slides were analyzed in a blinded fashion, and perinuclear or cytoplasmic immunofluorescence staining pattern was regarded as positive. All positive results and 20 negative results randomly selected were retested in another laboratory (Laboratory of Nephrology, Hospital Clinic i Provincial of Barcelona) following the same IIF test procedure by another investigator. Only sera with positive test results in both laboratories were regarded as positive in the final results. Sera with different results between the two laboratories were excluded from the final analysis.

Sera that produced a nuclear or equivocal perinuclear ANCA staining pattern in neutrophils were tested for the presence of antinuclear antibodies (ANA) using commercially prepared slides with fixed HEp2 cells as substrate (INOVA Diagnostics).

Statistical analysis

Statistical comparisons of prevalence of ANCA in the study groups were performed by the chi-square test. To measure the correlation of tests performed in the two different laboratories, Cohen's kappa coefficient was used.

Michel Pajo Berger
 ISBN: 978-0-8400-1111-1
 TABLE 2
 Prevalence of ANCA in Patients with UC, CD, First-Degree Relatives,
 Healthy Controls, and Celiac Disease

Diagnosis	n	ANCA Positive (n) (%)
Ulcerative colitis	53	34 (64)*
Crohn's disease	24	3 (12.5)
First-degree relatives of UC patients	155	6 (3.9)**
First-degree relatives of CD patients	60	4 (6.7)**
Healthy controls	40	1 (2.5)
Spouses of IBD patients	22	0
Celiac disease	11	0

* $p < 0.0001$ vs all other groups.

** p NS vs healthy controls.

RESULTS

Interlaboratory correlation of the immunofluorescence test

Results of the sera ($n = 72$) tested in the two laboratories were as follows. Forty-seven sera tested ANCA positive and 20 tested ANCA negative in both laboratories. Only five sera tested different results. Thus, a high degree of correlation was found between the two laboratories (kappa score = 0.84; $p < 0.001$).

Prevalence of ANCA in IBD patients

Thirty-four of 53 (64%) UC patients showed the presence of circulating ANCA. Perinuclear staining around neutrophil nuclei was the predominant IIF pattern observed (76.5%), similar to the proportion described in previous reports. In addition, a homogeneous cytoplasmic staining was given by eight sera. There was no correlation between ANCA positivity and duration, course, extent, and activity of the disease (data not shown). In CD, ANCA were detected in 3 of 24 patients (12.5%). Two patients had the disease confined to the colon and the other to the ileum.

Prevalence of ANCA in first-degree relatives

Of the unaffected first-degree relatives of patients with UC studied, only 6 sera of 155 (3.9%) tested ANCA positive. Four of the 60 (6.7%) relatives of patients with CD were ANCA positive. All of these 10 positive ANCA relatives belonged to different families. Among them, one had seropositive rheumatoid arthritis and another ankylosing spondylitis, conditions known to exhibit ANCA. Table 2 summarizes the results.

Control subjects

Only one of the 40 healthy controls tested ANCA positive. ANCA were not detected in any of the 22 spouses of patients with IBD, nor in the 11 patients with celiac disease.

Antinuclear antibodies

Three patients with UC and one patient with CD had an equivocal ANCA or diffuse nuclear immunofluorescence staining of all leukocyte nuclei in ethanol-fixed human

neutrophils. In all cases they were found to be positive for ANA when tested on HEp2 cells. A total of 9 sera among 11 of family members assessed were positive for ANA.

DISCUSSION

In recent years it has been firmly established that ANCA are often present in patients with UC but not in other IBDs, including CD (7-15). The results from the present study are within the limits of most previous reports. Thirty-four of 53 UC patients (64%) were ANCA positive compared with only 3 of 24 patients with CD (12.5%). Additionally, we did not detect an increased prevalence of ANCA in the unaffected first-degree relatives of IBD patients compared with healthy controls.

A familial predisposition to IBD is now widely recognized; the risk of developing the disease in family members is increased approximately 10-fold (24). At the present time, however, no subclinical markers are available to identify those at risk of developing the disease; studies of lymphocytotoxic antibodies, antibodies to colonic epithelial cells, colonic mucins, mucosal immunoglobulins, intestinal permeability, and complement system have not shown any consistent pattern (2). The role of ANCA as a potential subclinical marker of genetic predisposition to UC was first suggested by the finding of an increased prevalence of ANCA in the unaffected family members of patients with UC from two North American patient populations. The authors reported the presence of ANCA in 14 of 93 (15%) first-degree relatives to 38 UC patients in Los Angeles and in 9 of 43 (21%) first-degree relatives to 22 UC patients in Calgary, Canada (16). This observation was strengthened by a German study in which ANCA were detected in 30% of 142 first-degree relatives of patients with UC (17). In contrast to the American and German reports, however, four other studies from France, Italy, and England failed to detect a higher frequency of ANCA in the sera of relatives of IBD patients (18-21). In addition, Yang *et al.* have recently reported that ANCA were not significantly increased in healthy monozygot twin siblings to twins with UC, thus arguing against the hypothesis of ANCA as a subclinical marker of genetic susceptibility to UC (25).

It is uncertain why our results are in agreement with the latter studies but differ from those of the North American and German ones. It has been suggested that the different methods used for the detection of ANCA may explain in part these substantial differences. The whole cell ELISA method used by Shanahan *et al.* (16) has provided in most studies a higher sensitivity but lower specificity than the IIF test. Thus, the ELISA test might detect antineutrophil cytoplasmic antibodies other than those responsible for ANCA in UC. On the other hand, although subjective in interpretation, IIF results are more reproducible and correlate well in independent laboratories as shown by Oudkerk Pool *et al.* (12, 13) and our own study. Of note, the American investigators used IIF to verify every positive ELISA result, and

Seibold *et al.* (17) applied the same IIF method performed in the other European studies. Thus, these differences are unlikely to be entirely caused by technical variations. So far, the nature of the antigen(s) to which ANCA react in UC remain unknown. It seems likely that their identification will allow the development of more specific assays to overcome these methodological problems.

Another explanation for the divergent results among unaffected relatives may be related to variability in different populations and ethnic groups. In fact, the reported frequency of positivity of ANCA in UC patients varies widely in several different study populations. Positivity is more than 70% in North America (7, 8), 70% in Germany (10), but only 50% in France (9), 50% in England (11), and 40% in Australia (15). Here again, differences could be caused by the use of different detection methods as alluded to earlier. Nevertheless, studies performing simultaneous analysis of samples from distinct populations in different laboratories have confirmed significant regional differences, thus suggesting genetic differences between these populations (13, 17). Similarly, such variability may occur not only in probands, but also in relatives in different geographic areas.

In summary, we have not found an increased prevalence of ANCA among the unaffected first-degree relatives of patients with IBD compared with healthy controls. Therefore, our results indicate that, at least in our population, ANCA do not represent a subclinical marker of genetic susceptibility to IBD.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ms. Marta Targa and Ms. Montse Gandul for their great collaboration in the performance of this study.

Reprint requests and correspondence: Michel Papo, Section of Gastroenterology, Hospital Joan XXIII, c/Dr. Mallafre Guasch n $^{\circ}$ 4, 43007 Tarragona, Spain.

REFERENCES

- Shanahan F. Pathogenesis of ulcerative colitis. *Lancet* 1994;342:407-11.
- Yang H, Rotter JI. The genetics of inflammatory bowel disease. In: Targan S, Shanahan F, eds. *Inflammatory bowel disease: From bench to bedside*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1993: 32-64.
- Davis DJ, Moran JE, Nial JF, et al. Segmental necrotizing glomerulonephritis with antineutrophil antibodies: Possible arbovirus aetiology. *Br Med J* 1982;285:606.
- 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.
- Van der Woude FJ, Rasmussen N, et al. Autoantibodies against neutrophils and monocytes: Tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* 1985;1:425-9.
- Kallenberg CGM, Brouwer E, Weening JJ, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies: Current diagnostic and pathophysiological potential. *Kidney Int* 1994;46:1-15.
- Saxon A, Shanahan F, Landers C, et al. A distinct subset of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies is associated with inflammatory bowel disease. *J Allergy Clin Immunol* 1990;86:202-10.
- Duerr RH, Targan SR, Landers CJ, et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in ulcerative colitis: Comparison with other colitides/diarrheal illnesses. *Gastroenterology* 1991;100:1590-6.
- Colombel J-F, Reumaux D, Duthilleul P, et al. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterol Clin Biol* 1992;16:656-60.
- Seibold F, Weber P, Klein R, et al. Clinical significance of antibodies against neutrophils in patients with inflammatory bowel disease and primary sclerosing cholangitis. *Gut* 1992;33:657-62.
- Cambridge G, Rampton DS, Stevens TRJ, et al. Anti-neutrophil antibodies in inflammatory bowel disease: Prevalence and diagnostic role. *Gut* 1992;33:668-74.
- Oudkerk Pool M, Ellerbroek PM, Ridwan BU, et al. Serum antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease are mainly associated with ulcerative colitis: A correlation study between perinuclear antineutrophil cytoplasmic autoantibodies and clinical parameters, medical and surgical treatment. *Gut* 1993;34:46-50.
- Oudkerk Pool M, Roca M, Reumaux D, et al. The value of pANCA as a serological marker for ulcerative colitis in different European regions. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1994;6:399-403.
- Vecchi M, Bianchi MB, Sinico RA, et al. Antibodies to neutrophil cytoplasm in Italian patients with ulcerative colitis: Sensitivity, specificity and recognition of putative antigens. *Digestion* 1994;55:34-9.
- Romas E, Paspaliaris B, d'Apice AJF, et al. Autoantibodies to neutrophil cytoplasmic (ANCA) and endothelial cell surface antigens (AECA) in chronic inflammatory bowel disease. *Aust NZ J Med* 1992;22:652-9.
- Shanahan F, Duerr RH, Rotter JI, et al. Neutrophil autoantibodies in ulcerative colitis: Familial aggregation and genetic heterogeneity. *Gastroenterology* 1992;103:456-461.
- Seibold F, Slametschka D, Gregor M, Weber P. Neutrophil autoantibodies: A genetic marker in primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1994;107:532-6.
- Reumaux D, Delecourt L, Colombel JF, et al. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in relatives of patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1992;103:1706.
- Monteleone G, Doldo P, Marasco R, et al. Perinuclear neutrophil autoantibodies (p-ANCA) in unaffected relatives of patients with ulcerative colitis (UC): Suggestions against familial aggregation. *Gut* 1994;35(suppl 4):A31 (abstract).
- Lo SK, Fleming K, Chapman R. No increased frequency of p-ANCA in the families of patients with ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol* 1994;21:556 (abstract).
- Lee JCW, Lennard-Jones JE, Cambridge G. Antineutrophil antibodies in familial inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995;108:428-33.
- Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1989;24(suppl 7):2-6.
- Wiik A. Delineation of a standard procedure for indirect immunofluorescence detection of ANCA. *APMIS* 1989;97(suppl 6):12-3.
- Orholm M, Munkholm P, Langholz E, et al. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 1991;324:84-8.
- Yang P, Järnerot G, Danielsson D, et al. P-ANCA in monozygotic twins with inflammatory bowel disease. *Gut* 1995;36:887-90.

4.3. ESTUDIO 3

**HETEROGENEIDAD GENÉTICA EN LA COLITIS
ULCEROSA DETERMINADA POR UN POLIMORFISMO
GENÉTICO DEL ANTAGONISTA DEL RECEPTOR DE LA
INTERLEUCINA 1 Y ANTICUERPOS ANTICITOPLASMA
DE NEUTROFILO.**

Genetic heterogeneity within ulcerative colitis determined by an interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and antineutrophil cytoplasmic antibodies

Michel Papo^a, Juan Carlos Quer^a, Cristina Gutierrez^b, Montserrat Broch^b, Francesc Casellas^c, Rosa María Pastor^d, Montserrat Olona^e and Cristobal Richart^f

Background Although there is strong evidence implicating genetic predisposition in the pathogenesis of the chronic inflammatory bowel diseases, the number and identity of susceptibility genes remain uncertain. Cytokine genes are tentative candidate loci, but data regarding association studies in different populations are conflicting.

Aims To determine potential associations of interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra), tumour necrosis factor α (TNF α), and tumour necrosis factor β (TNF β) gene polymorphisms with ulcerative colitis or subsets of ulcerative colitis in a Spanish population.

Methods Genotyping for IL-1ra, TNF α and TNF β gene polymorphisms was performed by the polymerase chain reaction in 95 patients with ulcerative colitis and 74 healthy controls. A variable number of tandem repeats (VNTR) in the IL-1ra gene, and a single base pair polymorphism in the TNF α gene promoter region (-308) and in the first intron of the TNF β gene were analysed. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) were detected using an indirect immunofluorescence assay.

Results There were no significant differences between ulcerative colitis patients and controls in either polymorphism analysed, nor between ulcerative colitis subgroups as a function of the clinical disease pattern. However, when stratified by their ANCA status, perinuclear ANCA (p-ANCA) ulcerative colitis showed an increased frequency of the genotype 1,2 of the IL-1ra gene compared with ANCA-negative ulcerative colitis (52% versus 28%;

$P = 0.02$, $P_{\text{corr}} = 0.1$). Furthermore, p-ANCA ulcerative colitis had a statistically significant increase of this genotype compared with cytoplasmic ANCA (c-ANCA)/ANCA-negative ulcerative colitis (52% versus 26.5%; $P = 0.01$, $P_{\text{corr}} = 0.05$).

Conclusions In the Spanish population studied, the polymorphisms analysed in the IL-1ra, TNF α and TNF β genes are unlikely to be important in the overall susceptibility to ulcerative colitis. However, the combination of a subclinical (p-ANCA) and a genetic (IL-1ra gene) marker identified a distinct ulcerative colitis subgroup (p-ANCA; IL-1ra genotype 1,2). These findings provide further evidence of genetic heterogeneity within ulcerative colitis, and support the concept that ANCA may represent a subclinical marker of genetic heterogeneity. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 11:413-420 © 1999 Lippincott Williams & Wilkins

European Journal of Gastroenterology & Hepatology 1999, 11:413-420

Keywords: anti-neutrophil cytoplasmic antibodies, cytokine gene polymorphisms, inflammatory bowel disease, ulcerative colitis

^aSection of Gastroenterology, ^bResearch Unit, ^dDepartment of Biochemistry, ^eDepartment of Epidemiology and ^fDepartment of Internal Medicine, Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, School of Medicine, Universitat Rovira i Virgili of Tarragona, Tarragona, Spain, and ^cDigestive System Research Unit, Hospital General Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

Correspondence to Michel Papo, Section of Gastroenterology, Hospital Joan XXIII, c/ Dr Mallafre Guasch no. 4, 43007 Tarragona, Spain
Tel: +34 977 211554; fax: +34 977 224011

Received 26 May 1998 Revised 31 July 1998
Accepted 13 August 1998

Introduction

The aetiopathogenesis of the chronic inflammatory bowel diseases (IBDs) ulcerative colitis and Crohn's disease remains unknown. The most comprehensive theory proposed is that the diseases occur in a genetically susceptible subject, as a result of the interaction between environmental triggers and host immunological responses [1]. Although numerous lines of evidence strongly support the contribution of genetic factors in the pathogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease, the pattern of inheritance is still unclear [2].

Currently available evidence indicates that they are not inherited in any simple Mendelian or polygenic models. Moreover, recent studies using the genome-wide screening technique have shown the involvement of multiple genes in different chromosomes [3-5]. In addition, epidemiological and genetic studies support the hypothesis that the IBDs may be genetic heterogeneous disorders of polygenic inheritance [6,7].

For the last few years, the identification of susceptibility genes in IBD has become a major focus of research.

Considering the central role of the immune system in mediating the tissue damage in IBD, most studies have investigated the potential contribution of the HLA class II genes. Several reports from North America [8,9], Europe [10] and Japan [11] have shown that these genes are determinants of disease susceptibility and behaviour in ulcerative colitis. However, data regarding HLA class II associations with ulcerative colitis in different populations have been conflicting.

Other non-HLA genes also involved in the regulation of the immune response have been proposed recently as natural candidates for genetic IBD studies. Although their functional significance is still under evaluation, the description of several polymorphisms within the cytokine genes has allowed the investigation of associations with ulcerative colitis and Crohn's disease [12].

Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) is a natural receptor antagonist that modulates the pro-inflammatory effects of interleukin 1. Both experimental and clinical studies have pointed out the importance of IL-1ra in IBD [13]. Of note, an intestinal mucosal imbalance of IL-1 and IL-1ra has been described in patients with ulcerative colitis, which may contribute to the pathogenesis of chronic gut inflammation. The gene encoding the IL-1ra lies on chromosome 2 and contains a variable number of tandem repeats (VNTR) of an 86 base pair sequence in intron 2 [14]. Mansfield *et al.* [15] reported an association between ulcerative colitis and allele 2 of the polymorphic IL-1ra gene. This was the first observed association of ulcerative colitis with a gene outside the major histocompatibility complex (MHC). Although this finding was strengthened by two North American studies [16,17], data from subsequent European reports did not support it [18–23].

Tumour necrosis factor α (TNF α) and tumour necrosis factor β (TNF β) are potent pro-inflammatory and immunomodulatory cytokines, implicated in the initiation and regulation of the immune response [12]. The genes for these cytokines are tandemly arranged in the class III region of the MHC, on the short arm of chromosome 6. A number of polymorphisms that might be responsible for differences in the secretion of these cytokines have been described in the TNF locus. Of particular interest, a polymorphism at position -308 in the promoter region of the TNF α gene may be important for the transcriptional control of TNF α [24–26], and has been implicated in genetic susceptibility to some autoimmune diseases [27]. Within the first intron of the TNF β gene, an *NcoI* restriction fragment length polymorphism (RFLP) influencing TNF β production has been described [28]. In addition, an association between this polymorphism and TNF α production has also been found [29]. Genetic variation within this polymorphism might be

involved in the pathogenesis of certain autoimmune diseases [27].

During recent years, the occurrence of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) has been recognized in patients with IBD, particularly ulcerative colitis [30]. The majority of ulcerative colitis-associated ANCA show an immunofluorescence perinuclear pattern (p-ANCA), but cytoplasmic (c-ANCA) and mixed patterns have also been described. The significance of ANCA in IBD, however, remains unclear. Their value as disease markers is supported by the high degree of specificity for IBD in comparison with other colitides, lack of correlation with disease extent and activity, and persistence after colectomy. Furthermore, it has been suggested that p-ANCA may allow stratification of clinically distinct subsets of IBD patients: they have been found to be particularly associated with patients with pouchitis [31], treatment-resistant left-sided ulcerative colitis [32], aggressive disease [33] and Crohn's disease patients with an 'ulcerative colitis-like' clinical phenotype [34]. On the other hand, ANCA may represent a genetic marker in IBD, although this issue is a matter of debate. This concept was raised by the finding of an increased prevalence of these antibodies in healthy relatives of ulcerative colitis patients, suggesting their role as a subclinical marker of genetic disease susceptibility [35,36]. In addition, the reported associations between ANCA and different genetic markers in ulcerative colitis (HLA class II and intercellular adhesion molecule 1 genes) point to their role as a potential marker of genetic heterogeneity [37,38].

In the present study, we report on the distribution of three cytokine gene polymorphisms (IL-1ra, TNF α and TNF β) in a well-defined Spanish population of patients with ulcerative colitis. We have also investigated potential associations between these polymorphisms and subgroups of patients defined by their clinical disease pattern and ANCA status.

Materials and methods

Study subjects

Ninety-five non-operated patients with ulcerative colitis attending the Gastroenterology Section and the Department of Gastroenterology of two participating medical centres (Hospital Joan XXIII of Tarragona and Hospital Vall d'Hebron of Barcelona) were included in the study. The patients studied did not have any other conditions known to exhibit ANCA, nor anti-nuclear antibody positive serum samples. All patients were well known to the investigators, their diagnosis having been established based on conventional clinico-pathological criteria. Disease extent was determined by endoscopy and/or radiology, and classified as extensive (proximal to the splenic flexure) or distal. Patients were divided according to the clinical course into relapsing–remitting

and chronic-relapsing requiring immunosuppressive therapy. The main clinical features of the patients are shown in Table 1.

Seventy-four unrelated healthy blood donors without any history of gastrointestinal disease nor family members affected with IBD served as controls. All patients and controls analysed in the present report are non-Jewish Caucasians, and were born and live in the same geographical area (Catalonia).

Isolation of DNA

A 10 ml sample of venous blood was collected in an EDTA tube. Within 1 h of drawing, the buffy coat was separated from the blood by centrifugation at 800–900 g for 10 min. Genomic DNA was isolated from the buffy coat using QiaAMP spin columns (Qiagen, Chatsworth, California, USA).

Cytokine gene polymorphisms analysis

Genotyping for the cytokine gene polymorphisms was performed using the polymerase chain reaction (PCR).

IL-1ra VNTR gene polymorphism

A 100 ng aliquot of the extracted DNA was used as a template for amplifying the second intron of the IL-1ra gene, which contains a variable number of 86 bp sequence that gives rise to this polymorphism [15].

The primers used in the PCR were: 5'-CTCAGC-AACACTCCTAT-3' and 5'-TCCTGGTCTGCAGG-TAA-3'. The reaction was carried out in a final volume of 50 μ l containing 2 mmol/l MgCl₂, 0.2 mmol/l of each dNTP (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany), 0.2 μ mol/l of each primer and 2.5 units of Taq polymerase (Gibco Life Technologies). DNA was amplified for 30 cycles, with an initial denaturation of 30 s at 94°C and a final extension of 10 min at 70°C. Each cycle consisted of 30 s denaturation at 94°C, 1 min annealing at 58°C and 1 min extension at 70°C. PCR products were electrophoresed on a 2% agarose gel. VNTR was detected by ethidium bromide staining.

VNTR IL-1ra analysis revealed a five-allele polymorph-

ism which produced five bands of different sizes. A 410 bp band corresponded to the class 1 allele (four repeats), a 240 bp band to the class 2 allele (two repeats), a 500 bp band to the class 3 allele (five repeats), a 325 bp band to the class 4 allele (three repeats), and a 595 bp band to the class 5 allele (six repeats).

TNF α gene polymorphism

A transition polymorphism G \rightarrow A in the -308 position of the gene was detected [15]. A 100 ng aliquot of the extracted DNA was used as a template. The primers used were: 5'-AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3' and 5'-TCCTCCCTGCTCCGATTCCG-3'. The reaction was carried out in a final volume of 50 μ l containing 3 mmol/l of MgCl₂, 0.5 mmol/l of each dNTP, 0.2 μ mol/l of each primer and 2.5 units of Taq DNA polymerase. DNA was amplified for 35 cycles, each consisting of 1 min denaturation at 94°C, 1 min annealing at 60°C and 1 min extension at 72°C. Before the first cycle, one cycle of 3 min denaturation at 94°C, 1 min annealing at 60°C and 1 min extension at 72°C was performed. After all the cycles, a final cycle of 1 min denaturation at 94°C, 1 min annealing at 60°C and 5 min extension at 72°C was included. PCR products were digested with a 10-fold excess of *Nco*I restriction enzyme at 37°C for 2–4 h and electrophoresed on a 2.5% agarose gel. *Nco*I RFLPs were detected by ethidium bromide staining.

RFLP-TNF α gene analysis revealed a two-allele polymorphism that produced three bands of different sizes: a 107 bp fragment corresponding to the TNF2 allele (restriction site absent) and a set of 87 bp and 20 bp bands corresponding to the TNF1 allele (restriction site present).

TNF β gene polymorphism

A 100 ng aliquot of the extracted DNA was used as a template for amplifying the first intron of the TNF β gene, which contains a mutation that correlates 100% with a mutation in the second exon of this gene that produces a transversion of A \rightarrow C [28]. The primers used in the PCR were: 5'-CCGTGCTTCGTGC-TTTGGACTA-3' and 5'-AGAGCTGGTGGGGACA-TGTCTG-3'. The reaction was carried out in a final volume of 50 μ l containing 1.75 mmol/l MgCl₂, 0.34 mmol/l of each dNTP, 0.38 μ mol/l of each primer and 2.8 units of Taq polymerase. DNA was amplified for 30 cycles with an initial denaturation of 2 min at 94°C and a final extension of 7 min at 68°C. The cycles were divided into two programmes, one consisting of 10 cycles of 10 s denaturation at 94°C, 30 s annealing at 65°C and 2 min extension at 68°C, and the other consisting of 20 cycles with the same temperatures and times except for the extension time which increased by 20 s per cycle. PCR products were digested with a 10-fold excess of *Nco*I restriction enzyme at 37°C

Table 1 Characteristics of patients with ulcerative colitis

Total number		95
Gender (male/female)		45/50
Age (years)		
Mean		41
Range		16–79
Extent of ulcerative colitis		
Extensive		39 (41%)
Distal		56 (59%)
Clinical course		
Relapsing–remitting	relapsing	76 (80%)
Chronic–relapsing	chronic	19 (20%)

overnight and electrophoresed on a 0.8% agarose gel. *NcoI* RFLPs were detected by ethidium bromide staining.

RFLP-TNF β gene analysis revealed a two-allele polymorphism that produced three bands of different sizes: a 740 bp band corresponding to the TNFB1 allele (absence of restriction site) and a set of 555 bp and 185 bp bands corresponding to the TNFB2 allele (restriction site present).

ANCA indirect immunofluorescence assay

A standard indirect immunofluorescence (IIF) method was used for detection of ANCA as previously described [39]. In brief, sera were diluted 1:20 in phosphate-buffered saline (PBS), and approximately 35 μ l of the diluted sera was placed onto test wells on glass slides containing ethanol-fixed neutrophils as antigen substrate (INOVA Diagnostics, San Diego, California, USA). All incubations were performed in humidified boxes at room temperature for 30 min. The slides were then washed with three changes of PBS for 5 min each. After a 30 min incubation period with anti-human immunoglobulin (IgG) conjugated to fluorescein with Evans blue counterstain (INOVA Diagnostics), they were washed again as above, mounted under a cover slip with PBS-glycerin, and finally examined with a fluorescent microscope. Positive and negative controls were included for all assays. The slides were analysed in a blinded fashion by two independent investigators, and a perinuclear or cytoplasmic immunofluorescence staining pattern was regarded as positive. Sera with an equivocal ANCA staining pattern were excluded from the final analysis.

Statistical analysis

Statistical comparisons of genotypes, allele frequencies and carriage rates between the study groups were performed using either a χ^2 test or Fisher's Exact Test when appropriate. For subgroup analysis as a function of clinical disease pattern (extent and clinical course) and ANCA status, correction was made using a Bonferroni correction for multiple analysis. Thus probability values were multiplied by a factor of 5 to obtain corrected probability values. A probability value of 0.05, after correction if necessary, was considered to be the threshold for statistical significance.

Results

Comparisons between ulcerative colitis patients and controls

The distribution of the IL-1ra, TNF α and TNF β genotypes and allelic frequencies in patients with ulcerative colitis and healthy controls is shown in Tables 2 and 3. There were no significant differences in the IL-1ra VNTR genotypes and allelic frequencies between the two groups (Table 2). In patients with ulcerative colitis, the frequency of allele 2 (30.5%) was similar to that in the controls (31%). Moreover, no significant difference was observed between ulcerative colitis patients and controls in the allele 2 carriage rate (50.5% versus 53%). The polymorphisms studied in the TNF α and TNF β genes did not either reveal any associations with ulcerative colitis when compared with the control group (Table 3).

Comparisons within subgroups of ulcerative colitis patients as a function of the clinical disease pattern and ANCA status

On subgroup analysis based on the clinical disease pattern, no associations between the IL-1ra VNTR genotypes and allelic frequencies, and groups defined by extent and clinical course were found. In patients with extensive colitis, the frequency of allele 2 (29%) was similar to that in the patients with distal colitis (31%). Nineteen of 39 patients (49%) with extensive colitis and 29 of 56 patients (52%) with distal disease were carriers of at least one copy of allele 2.

When we divided patients according to their ANCA status, we observed that p-ANCA ulcerative colitis patients had an increased frequency of the genotype 1,2 compared with ANCA-negative patients (52% versus 28%; $P = 0.02$, $P_{\text{corr}} = 0.1$) (Table 4). Similarly, p-ANCA ulcerative colitis patients had a higher frequency of the genotype 1,2 than c-ANCA ulcerative colitis patients (52% versus 22%), although the difference was not statistically significant probably due to the small numbers analysed. For further analysis, we combined c-ANCA and ANCA-negative patients, since both groups showed a similar genotype distribution, and compared them with p-ANCA ulcerative colitis patients. The result indicated that p-ANCA ulcerative colitis patients had a statistically significant increase of the genotype 1,2 compared with c-ANCA/ANCA-nega-

Table 2 IL-1ra genotypes and allele frequencies in patients and controls

	Genotype						Allelic frequencies (%)			
	1,1	1,2	1,3	1,5	2,2	3,3	1	2	3	5
Healthy controls (n = 73)	31	33	2	1	6	0	67	31	1	1
Ulcerative colitis (n = 95)	44	38	2	0	10	1	67.5	30.5	2	0

Table 3 TNF α and TNF β genotypes and allele frequencies in patients and controls

	Genotype			Allelic frequencies (%)	
	1,1	2,2	1,2	1	2
TNFα					
Healthy controls (n = 74)	52	4	18	82.5	17.5
Ulcerative colitis (n = 93)	71	3	19	86.5	13.5
TNFβ					
Healthy controls (n = 71)	7	41	23	26	74
Ulcerative colitis (n = 92)	7	46	39	29	71

tive ulcerative colitis (52% versus 26.5%; $P = 0.01$, $P_{\text{corr}} = 0.05$) (Fig. 1). Finally, p-ANCA/IL-1ra genotype 1,2 ulcerative colitis was not associated with any clinical disease pattern when compared with the remaining ulcerative colitis patients (data not shown).

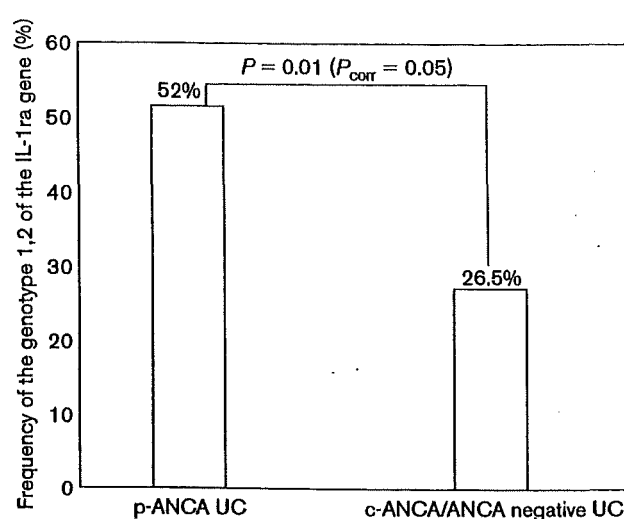
The genotype and allelic frequencies of the TNF α and TNF β genes did not reveal any significant differences between subgroups defined by their clinical disease pattern, nor their ANCA status (data not shown).

ANCA

Four patients had an equivocal ANCA staining pattern and were excluded from further analysis. Fifty-five of 91 (60.5%) ulcerative colitis patients showed the presence of circulating ANCA. Perinuclear staining around neutrophil nuclei was the predominant IIF pattern observed (50.5%), whereas a cytoplasmic staining was seen for nine samples (10%). There was no correlation between ANCA positivity and course, extent, and activity of the disease (data not shown).

Discussion

Considering the key role of cytokines in the control of the mucosal inflammatory response in IBD, genes involved in the regulation of their activity have recently been proposed as tentative candidate loci for genetic IBD studies. Mansfield *et al.* [15] first reported an association between the polymorphic gene for IL-1ra and ulcerative colitis in a British population. The rare allele 2 was over-represented in patients with ulcerative colitis (35%) compared with controls (24%). Furthermore, since this association was greatest in patients

Fig. 1

Frequency of the genotype 1,2 of the IL-1ra gene in p-ANCA ulcerative colitis and c-ANCA/ANCA-negative ulcerative colitis. p-ANCA ulcerative colitis patients showed an increased frequency of the genotype 1,2 ($P = 0.01$, $P_{\text{corr}} = 0.05$) compared with c-ANCA/ANCA-negative ulcerative colitis patients.

with total colitis, the authors suggested that allele 2 of the IL-1ra gene might represent a genetically specified severity factor in ulcerative colitis. This overall association was supported by two North American studies [16,17] which showed a significant increase in the allele 2 carriage rate in ulcerative colitis patients compared with controls. In contrast, however, other European studies from Germany [18,22], England [20,21], The Netherlands [19] and France [23] failed to detect a significant association of this allele with ulcerative colitis. The results of the present study are in agreement with the latter reports. Allele 2 frequencies and carriage rates were similar in patients with ulcerative colitis and healthy controls (30.5% versus 31% and 50.5% versus 53%, respectively). In addition, no differences were detected between patients with extensive and distal colitis (49% versus 52%). Our present results are also consistent with those of another study in a Spanish population, which showed no association between allele 2 and ulcerative colitis [40].

Table 4 IL-1ra genotypes in p-ANCA ulcerative colitis, c-ANCA ulcerative colitis and ANCA-negative ulcerative colitis patients

	Genotype 1,2	Genotypes 1,1 1,3 2,2 and 3,3
ANCA-negative ulcerative colitis (n = 36)	10 (28%)	26 (72%)
p-ANCA ulcerative colitis (n = 46)	24 (52%)*	22 (48%)
c-ANCA ulcerative colitis (n = 9)	2 (22%)	7 (78%)

*p-ANCA ulcerative colitis versus ANCA-negative ulcerative colitis: $P = 0.02$, $P_{\text{corr}} = 0.1$.

The reasons for the discrepancies between these studies are unclear. Methodological reasons are unlikely to be responsible, since all of them used the same molecular genotyping procedures. There are several possible explanations for the divergent results. First, ethnic differences, which account for many of the inconsistencies reported in HLA association studies in ulcerative colitis, may in part explain them. Thus, the North American studies involved a mixed Jewish/non-Jewish population from Pittsburgh and a Hispanic one from Los Angeles, whereas the European studies included predominantly non-Jewish white European subjects. Moreover, Tountas *et al.* [41] have recently reported that the association with allele 2 of the IL-1ra gene was only relevant in a Jewish subgroup from a Caucasian population in Los Angeles, but not in the whole study cohort. Second, the different results could be due to disease heterogeneity. From a clinical point of view, ulcerative colitis is a heterogeneous disease, which may be a reflection of underlying genetic heterogeneous background. For instance, there is evidence that genes in the HLA region may influence disease behaviour in ulcerative colitis: the HLA-DRB1*1502 allele has been found to be associated with disease intractability [11] and corticosteroid treatment [42], whereas the DR3-DQ2 haplotype has been found to predict extensive disease [10]. Similarly, the allele 2 of IL-1ra might only be associated with a particular subgroup of ulcerative colitis patients. In fact, three of the above studies showed a significant association of allele 2 exclusively with extensive disease [19,21] or disease intractability [23], but not with the whole group of ulcerative colitis patients. Finally, it is possible that the reported weak association in some studies reflects the fact that the IL-1ra gene does not contribute in itself to genetic susceptibility to ulcerative colitis, but rather is a marker of other closely linked genes on chromosome 2 of primary importance, or alternatively, the synergistic association of specific alleles of the IL-1ra gene with other nearby genetic markers predisposes to ulcerative colitis. Supporting this last hypothesis, different associations of allelic variants of the IL-1 β and IL-1ra genes in both ulcerative colitis and Crohn's disease patients compared to healthy controls have recently been reported [23,43].

Genetic variation within the TNF locus may be involved in the pathogenesis, or clinical manifestations, of some autoimmune and infectious diseases [27]. In IBD, there are relatively few studies of TNF α and TNF β gene polymorphism associations with either ulcerative colitis or Crohn's disease. Plevy *et al.* [44] have recently reported an association of the TNF microsatellite haplotype a2b1c2d4e1 with Crohn's disease, which is the strongest genetic risk factor described so far in Crohn's disease. Bi-allelic single-base polymorphisms of either TNF α [15,20,21,45,46] or

TNF β genes [45-47] have shown weak [45] or no association [15,20,21,46,47] with ulcerative colitis. In agreement with these previous studies, we found no differences between ulcerative colitis patients and controls in the TNF α and TNF β polymorphisms analysed. Taken as a whole, these data indicate that bi-allelic single-base polymorphisms of the TNF genes are not important determinants of overall disease susceptibility to ulcerative colitis.

A number of observations support the concept of genetic heterogeneity within IBD [2]. According to these, IBD is regarded not as a single disease, but rather as several aetiologically and genetically distinct diseases presenting a similar clinical picture. Furthermore, there is an increasing body of evidence suggesting genetic heterogeneity within each disease. The most relevant clues have come from genetic marker studies, which have demonstrated different HLA associations for ulcerative colitis and Crohn's disease, and distinct associations between subsets of ulcerative colitis as discussed earlier. Likewise, there are hints that subclinical markers, such as ANCA, may contribute to establish genetic heterogeneity within ulcerative colitis. This was first suggested by Shanahan *et al.* [35], who described a familial distribution of these antibodies: the relatives of ANCA-positive ulcerative colitis patients had an increased prevalence of the presence of ANCA compared with those of ANCA-negative patients. Additional evidence was provided by the same investigators from Los Angeles, who reported distinct associations between ANCA and various genetic markers. Thus, both ANCA-positive and ANCA-negative ulcerative colitis were associated with the HLA-DR2 and the HLA-DR4 alleles respectively in a mixed Jewish/non-Jewish population from Los Angeles [37]. In another study, ANCA-negative ulcerative colitis exhibited an increased frequency of allele R241 in codon 241 of the intercellular adhesion molecule 1 gene [38]. However, the role of ANCA as a subclinical marker of genetic heterogeneity in ulcerative colitis has been questioned, because further studies did not establish any relationship between ANCA and HLA status, particularly with the HLA-DR2 allele [9,19]. The discrepancies between the studies may reflect methodological differences and disease heterogeneity. Ethnic differences may also be relevant, as shown by Satsangi *et al.* [48] who recently reported that in North European patients with ulcerative colitis there is an association between ANCA and the HLA-DR3 DQ2 TNF2 haplotype, but not with HLA-DR2.

The results of the present study provide further support for the notion of ANCA as a subclinical marker of genetic heterogeneity within ulcerative colitis. We have shown an association between an inherited polymorphism of the IL-1ra gene and an immunologically

defined subgroup of ulcerative colitis patients: p-ANCA ulcerative colitis was positively associated with the genotype 1,2 (52%) compared with c-ANCA/ANCA-negative ulcerative colitis (26.5%). In contrast to our results, no association between p-ANCA and the IL-1ra gene polymorphism was found in reports from North America [16], Germany [18] and The Netherlands [19]. In a British study [21], the proportion of carriers of allele 2 was increased in the ANCA-positive group (38.2%) compared with the ANCA-negative group (11.8%). Here again, as for the HLA association studies, the conflicting results may reflect methodological differences, disease heterogeneity and/or variability between different study populations and ethnic groups.

The association of ANCA with ulcerative colitis is now well established. The majority of ulcerative colitis-associated ANCA exhibit a perinuclear immunofluorescence pattern, but cytoplasmic and mixed patterns have also been described [49–53]. There is no consensus, however, on which patterns should be considered associated with ulcerative colitis. While most authors only consider the perinuclear type, others also include the less frequent cytoplasmic or mixed patterns. The findings of our study provide evidence supporting this last view. When we first compared ANCA-positive ulcerative colitis with ANCA-negative ulcerative colitis patients, we did not find any association between ANCA and the cytokine gene polymorphisms analysed. It was only after the stratification of ulcerative colitis by their different ANCA immunofluorescence patterns, p-ANCA and c-ANCA, that we detected an association between p-ANCA and a specific IL-1ra genotype. c-ANCA and ANCA-negative ulcerative colitis patients showed a similar 1,2 genotype distribution, which was opposite to that of p-ANCA ulcerative colitis patients. However, these data should be interpreted with caution, first due to the small number analysed, and second because attempts to differentiate clinical disease patterns between p-ANCA ulcerative colitis patients and c-ANCA ulcerative colitis patients have so far been unsuccessful. Nevertheless, considering that the nature of the antigen(s) to which ANCA react in ulcerative colitis remains unknown, although it is likely that p-ANCA and c-ANCA are directed against different antigens, it does not seem reasonable to exclude any type of ANCA pattern when an unequivocal immunofluorescence staining is found.

In summary, this study shows that cytokine gene polymorphisms of the TNF α , TNF β and IL-1ra are not important factors in determining genetic susceptibility to ulcerative colitis in the Spanish population studied. On the other hand, our findings are in accordance with the concept of genetic heterogeneity within ulcerative colitis, and provide further evidence that

ANCA may represent a serological marker of genetic heterogeneity in this disease.

References

- 1 Shanahan F. Pathogenesis of ulcerative colitis. *Lancet* 1993; **342**:407–411.
- 2 Yang H, Rotter JI. The genetics of inflammatory bowel disease. In: *Inflammatory Bowel Disease: From Bench to Bedside*. Targan S, Shanahan F (editors). Baltimore: Williams & Wilkins; 1993. pp. 32–64.
- 3 Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beauperie L, *et al.* Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 1996; **379**:821–823.
- 4 Satsangi J, Parkes M, Louis E, Hashimoto L, Kato N, Welsh K, *et al.* Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. *Nature Genet* 1996; **14**:199–202.
- 5 Ohmen JD, Yang HY, Yamamoto KK, Zhao HY, Ma Y, Bentley LG, *et al.* Susceptibility locus for inflammatory bowel disease on chromosome 16 has a role in Crohn's disease, but not in ulcerative colitis. *Hum Mol Genet* 1996; **5**:1679–1683.
- 6 Satsangi J, Jewell DP, Rosenberg WMC, Bell JI. Genetics of inflammatory bowel disease. *Gut* 1994; **35**:696–700.
- 7 Satsangi J, Jewell DP, Bell JI. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gut* 1997; **40**:572–574.
- 8 Toyoda H, Wang SJ, Yang HY, Redford A, Magalong D, Tyan D, *et al.* Distinct associations of HLA class II genes with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1993; **104**:741–748.
- 9 Duerr RH, Neigut DA. Molecularly defined HLA-DR2 alleles in ulcerative colitis and an antineutrophil cytoplasmic antibody-positive subgroup. *Gastroenterology* 1995; **108**:423–427.
- 10 Satsangi J, Welsh KI, Bunce M, Julier C, Farrant JM, Bell JI, *et al.* Contribution of genes of the major histocompatibility complex to susceptibility and disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Lancet* 1996; **347**:1212–1217.
- 11 Masuda H, Nakamura Y, Tanaka T, Hayakawa S. Distinct relationship between HLA-DR genes and intractability of ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1994; **89**:1957–1962.
- 12 Koutroubakis I, Crusius JBA, Peña AS. Immunogenetics of cytokines. *Scand J Gastroenterol* 1995; **30**:1139–1146.
- 13 Cominelli F, Pizarro TT. Interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1996; **10**(suppl 2):49–53.
- 14 Tarlow JK, Blakemore AIF, Lennard A, Solari R, Hughes HN, Steinkasserer A, *et al.* Polymorphism in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86-bp tandem repeat. *Hum Genet* 1993; **91**:403–404.
- 15 Mansfield JC, Holden H, Tarlow JK, Di Giovine FS, McDowell TL, Wilson AG, *et al.* Novel genetic association between ulcerative colitis and the anti-inflammatory cytokine interleukin-1 receptor antagonist. *Gastroenterology* 1994; **106**:637–642.
- 16 Duerr RH, Tran T. Association between ulcerative colitis and a polymorphism in intron 2 of the interleukin-1 receptor antagonist gene [Abstract]. *Gastroenterology* 1995; **108**:A812.
- 17 Tountas NA, Kam L, di Giovine FS, Casini-Raggi V, Cominelli F. Genetic association between allele 2 of IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) and ulcerative colitis in a Los Angeles based Hispanic population [Abstract]. *Gastroenterology* 1995; **108**:A930.
- 18 Andus T, Caesar I, Vogl D, Schölmerich J, Gross V. Association of HLA-DR15, p-ANCA and IL-1 receptor antagonist allele 2 with ulcerative colitis [Abstract]. *Gastroenterology* 1995; **108**:A770.
- 19 Bioque G, Bouma G, Crusius JBA, Koutroubakis I, Kostense PJ, Meuwissen SGM, *et al.* Evidence for genetic heterogeneity in IBD: the interleukin-1 receptor antagonist in the predisposition to suffer from ulcerative colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996; **8**:105–110.
- 20 Louis E, Satsangi J, Roussomoustakaki M, Parkes M, Fanning G, Welsh K, *et al.* Cytokine gene polymorphisms in inflammatory bowel disease. *Gut* 1996; **39**:705–710.
- 21 Roussomoustakaki M, Satsangi J, Welsh K, Louis E, Fanning G, Targan S, *et al.* Genetic markers may predict disease behavior in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1997; **112**:1845–1853.
- 22 Hacker UT, Gomolka M, Keller E, Eigler A, Folwaczny C, Fricke H, *et al.* Lack of association between an interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and ulcerative colitis. *Gut* 1997; **40**:623–627.
- 23 Heresbach D, Alizadeh M, Dabadie A, Le Berre N, Colombel JF, Yaouanq J, *et al.* Significance of interleukin-1 β and interleukin-1 receptor antagonist

- genetic polymorphism in inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* 1997; **92**:1164-1169.
- 24 Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor α promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**:3195-3199.
 - 25 Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor- α promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol* 1997; **34**:391-399.
 - 26 Bouma G, Crusius JBA, Oudkerk Pool M, Kolkman JJ, von Blomberg BME, Kostense PJ, et al. Secretion of tumor necrosis factor α and lymphotoxin α in relation to polymorphisms in the TNF genes and HLA-DR alleles. Relevance for inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol* 1996; **43**:456-463.
 - 27 Wilson AG, di Giovine FS, Duff GW. Genetics of tumor necrosis factor- α in autoimmune, infectious, and neoplastic diseases. *J Inflamm* 1995; **45**:1-12.
 - 28 Messer G, Spengler U, Jung MC, Honold G, Blömer K, Pape GR, et al. Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: an NcoI polymorphism in the first intron of the human TNF- β gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF- β production. *J Exp Med* 1991; **173**:209-219.
 - 29 Pociot F, Briant L, Jongeneel CV, Mölvig J, Worsaae H, Abbal M, et al. Association of tumor necrosis factor (TNF) and class II major histocompatibility complex alleles with the secretion of TNF- α and TNF- β by human mononuclear cells: a possible link to insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Immunol* 1993; **23**:224-231.
 - 30 Duerr RH, Targan SR, Landers CJ, Sutherland LR, Shanahan F. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in ulcerative colitis: comparison with other colitides/diarrheal illnesses. *Gastroenterology* 1991; **100**:1590-1596.
 - 31 Sandborn WJ, Landers CJ, Tremaine WJ, Targan SR. Antineutrophil cytoplasmic antibody correlates with chronic pouchitis after ileal pouch-anal anastomosis. *Am J Gastroenterol* 1995; **90**:740-747.
 - 32 Sandborn WJ, Landers CJ, Tremaine WJ, Targan SR. Association of antineutrophil cytoplasmic antibodies with resistance to treatment of left-sided ulcerative colitis: results of a pilot study. *Mayo Clin Proc* 1996; **71**:431-436.
 - 33 Vecchi M, Bianchi MB, Sinico RA, Radice A, Meucci G, Torgano G, et al. Antibodies to neutrophil cytoplasm in Italian patients with ulcerative colitis: sensitivity, specificity and recognition of putative antigens. *Digestion* 1994; **55**:34-39.
 - 34 Vasiliauskas EA, Plevy SE, Landers CJ, Binder SW, Ferguson DM, Yang H, et al. Perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with Crohn's disease define a clinical subgroup. *Gastroenterology* 1996; **110**:1810-1819.
 - 35 Shanahan F, Duerr RH, Rotter JI, Yang H, Sutherland LR, McElree C, et al. Neutrophil autoantibodies in ulcerative colitis: familial aggregation and genetic heterogeneity. *Gastroenterology* 1992; **103**:456-461.
 - 36 Seibold F, Slametschka D, Gregor M, Weber P. Neutrophil autoantibodies: a genetic marker in primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1994; **107**:532-536.
 - 37 Yang H, Rotter JI, Toyoda H, Landers C, Tyan D, McElree CK, et al. Ulcerative colitis: a genetically heterogeneous disorder defined by genetic (HLA class II) and subclinical (antineutrophil cytoplasmic antibodies) markers. *J Clin Invest* 1993; **92**:1080-1084.
 - 38 Yang H, Vora DK, Targan SR, Toyoda H, Beaudet AL, Rotter JI. Interleukin 1 gene associations with immunologic subsets of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995; **109**:440-448.
 - 39 Papo M, Quer JC, Pastor RM, García-Pardo G, Prats E, Mirapeix E, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in relatives of patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 1996; **91**:1512-1515.
 - 40 García-Paredes J, Bioque G, Crusius JBA, García-González A, López-Nava G, Díaz-Rubio M, et al. The interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in Spanish IBD patients [Abstract]. *Gastroenterology* 1996; **110**:A914.
 - 41 Tountas NA, Yang H, Coulter DL, Rotter JI, Cominelli F. Increased carriage of allele 2 of IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) in Jewish populations: the strongest known genetic association in ulcerative colitis [Abstract]. *Gastroenterology* 1996; **110**:A1029.
 - 42 Futami S, Aoyama N, Honsako Y, Tamura T, Morimoto S, Nakashima T, et al. HLA-DRB1*1502 allele, subtype of DR15 is associated with susceptibility to ulcerative colitis and its progression. *Dig Dis Sci* 1995; **40**:814-818.
 - 43 Bioque G, Crusius JBA, Koutroubakis I, Bouma G, Kostense PJ, Meuwissen SGM, et al. Allelic polymorphism in IL-1 β and IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) genes in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 1995; **102**:379-383.
 - 44 Plevy SE, Targan SR, Yang H, Fernández D, Rotter JI, Toyoda H. Tumor necrosis factor microsatellites define a Crohn's disease-associated haplotype on chromosome 6. *Gastroenterology* 1996; **110**:1053-1060.
 - 45 Bouma G, Xia B, Crusius JBA, Bioque G, Koutroubakis I, Von Blomberg BME, et al. Distribution of four polymorphisms in the tumor necrosis factor (TNF) genes in patients with inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1996; **103**:391-396.
 - 46 Heresbach D, Ababou A, Bourienne A, Alizadeh M, Quelvennec E, Pagenault M, et al. Étude du polymorphisme des microsatellites et des gènes du tumor necrosis factor (TNF) au cours des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. *Gastroenterol Clin Biol* 1997; **21**:555-561.
 - 47 Sugimura K, Asakura H, Mizuki N, Inoue M, Hibi T, Yagita A, et al. Analysis of genes within the HLA region affecting susceptibility to ulcerative colitis. *Hum Immunol* 1993; **36**:112-118.
 - 48 Satsangi J, Landers C, Welsh K, Koss K, Targan S, Jewell DP. ANCA and HLA genes in North European patients with ulcerative colitis [Abstract]. *Gastroenterology* 1996; **110**:A1009.
 - 49 Cambridge G, Rampton DS, Stevens TRJ, McCarthy DA, Kamm M, Leaker B. Anti-neutrophil antibodies in inflammatory bowel disease: prevalence and diagnostic role. *Gut* 1992; **33**:668-674.
 - 50 Patel RT, Stokes R, Birch D, Ibbotson J, Keighley MRB. Influence of total colectomy on serum antineutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease. *Br J Surg* 1994; **81**:724-726.
 - 51 Kossa K, Coulthart A, Ives CT, Pusey CD, Hodgson JF. Antigen specificity of circulating anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995; **7**:783-789.
 - 52 Castellino F, Rosina F, Bansi DS, Bauducci M, Touscoz GA, Giorda L, et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease: do they recognize different subsets of a heterogeneous disease? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995; **7**:859-864.
 - 53 Hertervig E, Wieslander J, Johansson C, Wiik A, Nilsson A. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in chronic inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1995; **30**:693-698.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

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

Michèl Papo Berger

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

5. DISCUSION

ESTUDIO 1.

Los resultados de este primer trabajo han demostrado la presencia de ANCA en 49 de 75 pacientes (65%) con CU, en 5 de 41 pacientes con EC (12%) y únicamente en un sujeto del grupo control (2,5%). Estos hallazgos coinciden con los de la mayoría de las series de la literatura, en las que estos anticuerpos tienen una alta prevalencia en la CU (50-80%)^{49,50,200-204,285-288,290,291,293-295,297,299-303,306-310,312,313,316}, se detectan con mucho menor frecuencia en la EC (5-25%)^{49,50,202-204,207,285-291,293,298,299,301-306,308,310,311,316,318}, y no se asocian a otras patologías del tracto gastrointestinal. Por el contrario, contrastan con los de otros trabajos que han comunicado una prevalencia sensiblemente inferior en la CU (30-40%)^{202,207,208,289,304,305}, y una mayor frecuencia a la reportada habitualmente en la EC (40-55.5%)^{292,295,297,300,307,312-314}.

Las causas de tan notables diferencias sobre la prevalencia de los ANCA en la EII no han sido del todo esclarecidas. Se han propuesto varias explicaciones posibles y no excluyentes. En primer lugar, la utilización de distintas técnicas para su detección puede ser parcialmente responsable. Como ya se ha señalado en la introducción, existen discrepancias en cuanto a la sensibilidad y especificidad de la IFI y el ELISA^{290,358}. Sin embargo, el hecho de que también se perciban marcadas diferencias entre laboratorios que emplean únicamente la IFI, técnica con la que se consiguen resultados altamente reproducibles^{290,296}, sugiere que éstas no se deben únicamente a diferencias metodológicas. En segundo lugar, la divergencia de resultados puede atribuirse a diferencias reales de prevalencia en las distintas poblaciones estudiadas, entre las que cabe considerar diferencias

raciales y/o étnicas. Así, la frecuencia de ANCA reportada en la CU varía en distintas áreas geográficas, siendo del 72-85% en Norteamérica^{49,204,285}, 58-83% en Alemania^{203,291,293}, 45-79% en Holanda^{290,292,296} y 41-76% en Inglaterra^{286,297,305,366}. La prevalencia reportada en nuestro país oscila entre un 41% y 73%^{296,302,303,318,352}. Estas cifras, exceptuando el estudio de García Herola y cols.³¹⁸, son superiores a las descritas en los otros países europeos del área mediterránea: 39,8-48% en Italia^{298,304,365}, 46-52% en Francia^{288,296,364}, y 30% en Grecia²⁸⁹. Estudios en los que se han analizado simultáneamente sueros de distintas poblaciones en laboratorios independientes han confirmado diferencias regionales significativas^{296,363}. Finalmente, no se puede excluir que las diferencias de prevalencia puedan deberse a sesgos de tamaño y de selección de los pacientes estudiados. No obstante, esta última posibilidad es menos probable, teniendo en cuenta que no existe una relación demostrada entre el status ANCA y las principales variables demográficas y clínicas de la enfermedad.

Lógicamente, el valor de los ANCA como marcadores serológicos útiles para el diagnóstico de la CU, está en función de la prevalencia encontrada en los pacientes con CU y con EC, que como se ha discutido, varía notablemente entre las distintas series, muy posiblemente como consecuencia de diferencias metodológicas y/o poblacionales. En nuestro estudio, la sensibilidad y especificidad de los ANCA para la CU fue de un 65% y de un 88% respectivamente. El valor predictivo positivo fue del 91%, y el valor predictivo negativo del 58%. De esta forma, nuestros resultados coinciden con los de la mayoría de trabajos publicados que han reportado una sensibilidad y especificidad de los ANCA para el diagnóstico de la CU de entre un 50-80% y un 80-95%

respectivamente^{49,204,285,287,288,290,296,298,302,303,309,311,318}. Por contra, los autores que detectan una baja prevalencia de los anticuerpos en la CU y/o una mayor frecuencia a la reportada habitualmente en la EC, señalan obviamente, que si bien los ANCA pueden ser de utilidad para diferenciar la CU de ciertas colitides, su valor discriminatorio frente a la EC es limitado^{207,295,304,306,312,313}.

A pesar de que nuestro estudio, al igual que otros, sugiere que la determinación de los ANCA puede contribuir al diagnóstico CU, ciertamente su utilidad en la práctica clínica tiene una serie de limitaciones que merecen ser comentadas. En primer lugar, es importante señalar que las técnicas utilizadas en la actualidad para la detección de los ANCA en la EII tienen el inconveniente de no ser antígeno-específicas. En este sentido, los estudios más recientes que ubican el antígeno de los ANCA asociados a la EII en el núcleo celular³²⁶⁻³³⁰, han creado nuevas expectativas para conseguir finalmente su identificación, lo que debería permitir en último término el desarrollo de técnicas más específicas para soslayar los problemas metodológicos. En segundo lugar, la hipotética utilidad de los marcadores serológicos para el diagnóstico de la CU y la EC es discutible. En efecto, a diferencia de otras patologías (conectivopatías u otras enfermedades autoinmunes organoespecíficas por citar algunos ejemplos) en las que diversos autoanticuerpos tienen una considerable utilidad clínica, el valor potencial de los marcadores serológicos en la EII parece más limitado, teniendo en cuenta que el diagnóstico tanto de la CU como de la EC no plantea por lo general grandes dificultades cuando se combinan criterios convencionales clínicos, radiológicos, endoscópicos y anatomopatológicos. Por ello, la mayor utilidad de los marcadores serológicos en la EII, y en concreto la de los ANCA, consistiría en posibilitar el

diagnóstico diferencial en aquellas situaciones en las que realmente existen dificultades diagnósticas. Primero, deberían facilitar el diagnóstico diferencial de la EII con otras colítides, principalmente las infecciosas enteroinvasivas y algunas colitis isquémicas de curso evolutivo crónico. Como ya se ha señalado en otros apartados de este texto, los ANCA parecen cumplir este objetivo, ya que no se detectan en otras colopatías agudas y/o crónicas. Únicamente se ha sugerido su asociación con las colitis microscópicas²⁸⁵, si bien este hallazgo no ha sido posteriormente ratificado⁵¹². Segundo, deberían posibilitar el diagnóstico diferencial entre la CU y la EC con afectación colónica, cuando las técnicas diagnósticas habituales no son del todo concluyentes. En este sentido, la alta prevalencia de los anticuerpos en los pacientes con EC que tienen un fenotipo *UC-like* reportada por algunos autores^{314,359}, obviamente limitaría su utilidad. Esta observación, sin embargo, no ha sido confirmada por otros investigadores^{360,361}. Finalmente, la mayor utilidad de los ANCA consistiría en poder establecer el diagnóstico definitivo de CU o EC en los pacientes que tienen una colitis indeterminada. No obstante, esta cuestión es difícil de evaluar, y hasta la fecha no se ha publicado ningún estudio al respecto.

En resumen, si bien los ANCA pueden contribuir al diagnóstico de la CU, posibilitando el diagnóstico diferencial con otras colítides, su valor clínico para diferenciar las formas de CU difícilmente distinguibles de la EC no se ha establecido. Es posible que la combinación de la detección de los ANCA con otros marcadores serológicos, como por ejemplo los anticuerpos anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) que tienen una alta especificidad para la EC, pueda aumentar el rendimiento diagnóstico de los marcadores serológicos en la EII, tal como se ha sugerido recientemente en diversos trabajos^{341,513,514}.

En nuestro estudio, al igual que en la mayoría de los trabajos publicados, no encontramos relación entre la seropositividad de los ANCA en la CU, y el tiempo de evolución, el curso clínico, la extensión, la actividad de la enfermedad, las manifestaciones extraintestinales, o el tratamiento farmacológico recibido. Tampoco existió relación entre el título o patrón de inmunofluorescencia y los parámetros clínicos valorados. Sin embargo, algunos autores sí han detectado relación con alguna de las variables analizadas. Tural³⁰³ y Rump y cols.²⁹³ encuentran una correlación entre la positividad de los ANCA y la actividad de la enfermedad. Rump y cols.²⁹³ describen además su negativización en pacientes que entran en remisión tras tratamiento esteroideal. De forma similar, otros autores hallan relación entre el título de los ANCA y la actividad clínica de la CU^{203,287,293,295}. Por otra parte, se ha sugerido que el status ANCA se relacionaría con la evolución de la enfermedad, de tal forma que su presencia se asociaría con un curso clínico más agresivo: se ha reportado una mayor prevalencia entre los pacientes que tienen más exacerbaciones anuales^{298,515}, y una muy baja prevalencia en enfermos que presentan una remisión clínica prolongada⁵¹⁶. Finalmente, Sandborn y cols.⁵¹⁷ han encontrado una frecuencia incrementada en pacientes con colitis izquierda resistente al tratamiento médico, sugiriendo una posible asociación entre los ANCA y una resistencia relativa al tratamiento farmacológico. No obstante, como previamente se ha hecho referencia, la tendencia más constante observada en la bibliografía es la ausencia de relación entre el status ANCA y las características clínicas de la enfermedad. Lógicamente, la ausencia de relación entre la positividad y/o el título de los ANCA con la actividad de la CU, inhabilitan una hipotética utilidad de estos anticuerpos

como marcadores serológicos para la monitorización de la respuesta terapéutica y evolución
clínica.

ESTUDIO 2.

En este segundo trabajo se evaluó el posible papel de los ANCA como marcadores subclínicos de susceptibilidad genética a la EII en nuestro medio. Para ello se establecieron tres grupos de estudio. En el primero, formado por pacientes con EII, se detectó la presencia de ANCA en 34 de 53 pacientes (64%) con CU, y en 3 de 24 de pacientes (12,5%) con EC. El segundo grupo incluyó 215 familiares de primer grado de los pacientes con EII. Se encontró la presencia de los anticuerpos en 6 de 155 familiares (3,9%) de pacientes con CU, y en 4 de 60 familiares (6,7%) de pacientes afectados de EC. De esta forma, globalmente se detectó la presencia de ANCA en 10 de los 215 familiares estudiados de los pacientes con EII, lo que representa un 4.6%. Finalmente, en el grupo control, los ANCA se detectaron únicamente en uno de 40 sujetos sanos donantes de sangre (2,5%), en ninguno (0%) de 22 cónyuges de pacientes con EII (grupo control ambiental), y en ninguno (0%) de los 11 pacientes con enfermedad celíaca que también fueron evaluados. De esta forma, la presencia de ANCA fue estadísticamente más frecuente en los pacientes con CU respecto a todos los demás grupos de estudio. La prevalencia de los anticuerpos no se encontró incrementada en los familiares sanos de los pacientes con respecto al grupo control.

A pesar de los considerables esfuerzos realizados durante la última década con el objetivo de identificar los locus genéticos que expliquen el carácter hereditario de la CU y la EC, la naturaleza de los genes implicados sigue siendo desconocida.

Consecuentemente, a diferencia de lo que sucede actualmente con numerosas enfermedades hereditarias monogénicas en las que el riesgo de recurrencia para los miembros de una familia específica puede determinarse con relativa facilidad, en la EII no se disponen de marcadores genéticos que permitan identificar a los sujetos susceptibles de desarrollar la enfermedad. Por ello, el estudio de diversos marcadores subclínicos en los familiares sanos de los pacientes, parámetros que permiten detectar a los sujetos con un genotipo anormal en ausencia de expresión fenotípica de una enfermedad, y que se han mostrado útiles en otros trastornos genéticos multifactoriales, ha sido objeto de una considerable atención³⁷⁵. Se han propuesto diversos candidatos que incluyen el sistema del complemento⁵¹⁸, las glicoproteínas colónicas⁵¹⁹, la flora anaerobia intestinal⁵²⁰, las subclases de inmunoglobulinas IgG^{521,522}, el estudio de la permeabilidad intestinal⁵²³⁻⁵²⁹, y varios anticuerpos como los anti-linfocitotóxicos⁵³⁰, anticuerpos dirigidos contra antígenos epiteliales intestinales (ECAC)⁵³¹, contra el páncreas^{532,533}, anti-tropomiosina⁵³⁴, anti-*globet cells*⁵³⁵, anti-*Saccharomyces cerevisiae*⁵³⁶, e incluso los ANA⁵³⁷. Sin embargo, para ninguno de estos potenciales marcadores subclínicos se han obtenido resultados consistentes.

El valor de los ANCA como marcadores subclínicos de susceptibilidad genética a la CU fue inicialmente sugerido por el grupo de Shanahan y cols.³⁶² que encontraron una frecuencia significativamente más alta de los anticuerpos en los familiares sanos de los pacientes que en sujetos controles. Estos autores reportaron la presencia de los anticuerpos en 14 de 93 (15,7%) de los familiares sanos de pacientes con CU en una población de Los Angeles, y en 9 de 43 (20,9%) de los de una población canadiense de

Calgary. Estos hallazgos fueron confirmados dos años más tarde por Seibold y cols.³⁶³ en Alemania: detectaron la presencia de ANCA en el 30% de los familiares sanos de pacientes con CU, y en el 25% de los de pacientes con CEP. No obstante, contrariamente a estos dos trabajos, cuatro estudios realizados en Francia³⁶⁴, Italia³⁶⁵ e Inglaterra^{366,367}, no evidenciaron una prevalencia incrementada de ANCA en los familiares sanos de pacientes con CU (0-6,6%). Nuestro estudio, al igual que estos últimos trabajos, tampoco ha mostrado una mayor frecuencia de los anticuerpos en los familiares de los enfermos con CU, ni en los de los de pacientes con EC, con respecto al grupo control. Más recientemente, otros autores han comunicado, ya sea en forma de artículos originales o de comunicaciones, resultados igualmente negativos^{532,538-540}. Por otra parte, Yang y cols.⁵⁴¹ han reportado que la frecuencia de ANCA no está incrementada en hermanos gemelos monocigotos sanos de hermanos con CU, resultados que están en contra del hipotético papel de estos anticuerpos como marcadores genéticos en la EII.

En resumen, los resultados de los estudios del grupo de Shanahan y del de Seibold sugiriendo el papel de los ANCA como marcadores de susceptibilidad genética a la CU, y por extensión a la CEP, no se han reproducido en otros estudios europeos. Las diferencias entre estos trabajos, al igual que las encontradas con respecto a la prevalencia de los ANCA en los propios pacientes, también se han atribuido a diferencias metodológicas y/o poblacionales. Considerando esta última explicación, es posible que los ANCA representen marcadores genéticos en la CU únicamente en determinadas poblaciones. En cualquier caso, en la mayoría de las poblaciones estudiadas, incluida la nuestra, los ANCA no representan marcadores de susceptibilidad genética a la EII.

ESTUDIO 3.

Durante los últimos años, los genes que codifican para diversas citocinas con importante actividad inflamatoria y/o inmunoreguladora, moléculas que participan de forma activa en la patogenia de la EII, se han considerado como importantes candidatos potenciales a la susceptibilidad genética de la CU y la EC. Los importantes avances realizados en el campo de la biología molecular, han llevado por una parte, a la clonación y secuenciación de estos locus genéticos, y por otra, la descripción de polimorfismos de los mismos, permitiendo de esta forma el estudio de posibles asociaciones con las enfermedades inflamatorias idiopáticas crónicas del intestino. Los trabajos publicados hasta la fecha han evaluado polimorfismos de los genes que codifican para el TNF α , el TNF β , la IL-1 β , el IL-1ra, la IL-2, y la IL-10^{284,421,422}.

Con respecto al gen del IL-1ra, desde que en el año 1994 Mansfield y cols.⁴⁶⁰ reportaran una asociación entre el alelo 2 del polimorfismo VNTR en el intrón 2 del IL-1RN y la CU en una población de Sheffield, otros investigadores han comunicado resultados discordantes. Entre los estudios positivos, dos grupos norteamericanos^{461,462} evidenciaron una mayor frecuencia de portadores del alelo 2 en la CU, confirmando los hallazgos de los investigadores ingleses. Recientemente, el grupo de Mansfield ha estudiado una serie considerablemente más amplia de pacientes con CU, ratificando los datos de su primer estudio⁵⁴². Sin embargo, los resultados obtenidos al evaluar este polimorfismo en otras poblaciones europeas, de Alemania^{463,464}, Inglaterra^{465,466}, Holanda³⁷³, Francia⁴⁶⁷ y España⁴⁶⁸, no han encontrado esta asociación. En nuestro estudio,

al igual que en estos últimos trabajos, tampoco encontramos una asociación entre el alelo 2 del IL-1RN y la CU. En concreto, la frecuencia del alelo 2 en la CU (30,5%) fue similar a la detectada en el grupo control (31%), y la frecuencia de los portadores de este alelo en la CU (50,5%) fue también equiparable a la observada en los controles (53%).

Las discrepancias entre estos trabajos difícilmente se pueden atribuir a diferencias metodológicas, ya que las técnicas de biología molecular utilizadas en todos ellos son muy similares. Diferencias poblacionales, en concreto étnicas, así como la heterogeneidad clínica y genética propias de la EII, parecen ser más relevantes⁴⁶⁹. Con respecto a las posibles diferencias étnicas, en los dos trabajos realizados en Estados Unidos se evaluaron una población mixta de judíos/no judíos de Pittsburgh y una población hispánica de los Angeles, mientras que en los estudios europeos se incluyeron mayoritariamente sujetos blancos no judíos del norte de Europa. Más aún, Tountas y cols.⁵⁴³ han reportado que la asociación entre el alelo 2 y la CU era relevante únicamente en el subgrupo de pacientes judíos de la población caucásica que estudiaron. En cuanto a la explicación que considera la heterogeneidad clínica y genética de la CU, ya en el estudio inicial del grupo de Mansfield⁴⁶⁰, la asociación entre el alelo 2 y la CU era mucho más manifiesta en los pacientes con una afectación extensa del colon (pancolitis) que en los que tenían una colitis distal. De igual forma, en dos de los estudios europeos en los que no se objetivó una asociación del alelo 2 con la CU, sí se observó una asociación con la forma de afectación extensa de la enfermedad^{373,466}, y en otro trabajo, con la intratabilidad de la misma⁴⁶⁷. Así, los autores de estos trabajos han sugerido que el alelo 2 podría representar un marcador de "gravedad" en la CU. Su asociación con las formas más "graves" de CU,

sin embargo, no se ha objetivado en los demás estudios, incluido el nuestro. Finalmente, otra posible explicación a las discrepancias entre los estudios, propone que las asociaciones positivas comunicadas por algunos autores entre el alelo 2 y la CU, se deben a que el IL1RN, no siendo directamente responsable de la susceptibilidad a la enfermedad, está en desequilibrio de ligamiento con algún otro gen de importancia primaria en el cromosoma 2, o alternativamente, la acción sinérgica del ILRN con otros genes cercanos es la que determina la susceptibilidad genética a la CU. Sosteniendo esta última hipótesis, Bioque y cols.⁵⁴⁴, y Heresbach y cols.⁴⁶⁷, han descrito una asociación de distintas variantes alélicas de polimorfismos genéticos del IL1B y IL1RN en la CU, sugiriendo que puede ser la combinación de genotipos IL1B/IL1RN la que define las bases biológicas de la predisposición a la enfermedad.

Considerando que el TNF juega un importante papel en la patogenia de la EII, y que la variación genética de ciertos polimorfismos del TNFA y del TNFB se ha asociado a diversas enfermedades autoinmunes e infecciosas, estos dos locus se han considerado candidatos potenciales en la EII⁴⁹⁵. Sin embargo, los resultados de los diversos estudios de la literatura sobre polimorfismos RFLP del TNFA y del TNFB en la EII, realizados básicamente en poblaciones del norte de Europa, han mostrado una muy discreta o nula asociación con la CU y la EC^{460,465,466,506-508,510,511}. En concordancia con estos estudios, en el nuestro no hemos detectado ningún tipo de asociación alélica ni genotípica de los dos polimorfismos analizados con la CU. A partir del análisis combinado de todos estos estudios, se infiere que los polimorfismos bialélicos del locus del TNF no son determinantes mayores de susceptibilidad global a la CU, ni a la EC. Es importante

señalar, no obstante, que esta asunción no descarta que los genes que codifican para estas citocinas puedan jugar un papel en la genética de la EII. En efecto, Plevy y cols.⁵⁴⁶ han reportado una asociación del haplotipo a2b1c2d4e1 de microsatélites del TNF con la EC, que representa el mayor riesgo genético descrito hasta la fecha en esta enfermedad. Recientemente, Heresbach y cols.⁵⁰⁷ no han podido reproducir los mismos resultados en un estudio realizado en Francia.

Uno de los avances más importantes realizados durante los últimos años en el estudio de la genética de la EII ha sido el reconocimiento de que la CU y la EC son enfermedades genéticamente heterogéneas. Como ya se ha señalado en otros apartados de este texto, la heterogeneidad genética de las dos enfermedades se sustenta en diversas evidencias aportadas por estudios experimentales, clínico-epidemiológicos, y genéticos. Así mismo, también se ha destacado que los marcadores subclínicos, y en concreto los ANCA, pueden contribuir a definir la heterogeneidad genética de la CU y la EC. Shanahan y cols.³⁶² fueron los primeros autores que lo sugirieron, al encontrar una mayor frecuencia de los anticuerpos en los familiares de pacientes con CU que eran ANCA+ que en los familiares de los pacientes ANCA- (21.4% vs 7%). Posteriormente, varios estudios han mostrado que se pueden definir subgrupos homogéneos de pacientes con CU, a partir de la asociación de marcadores genéticos (genes HLA, ICAM-1, y motilina)^{368,369,370,374,547,548} y el status ANCA, y sugerir en consecuencia que la CU-ANCA+ y la CU-ANCA- son grupos genéticamente distintos. Sin embargo, otros trabajos no han conseguido establecer asociaciones de estas características, cuestionando

así el papel de los ANCA como marcadores de heterogeneidad genética³⁷¹⁻³⁷³. Nuevamente aquí, las discrepancias entre estos trabajos se han atribuido a diferencias metodológicas y/o poblacionales.

Los resultados de nuestro estudio apoyan el papel de los ANCA como marcadores subclínicos de heterogeneidad genética en la CU, y consecuentemente proporcionan evidencia adicional al concepto de heterogeneidad genética de la enfermedad. En efecto, se encontró una asociación estadísticamente significativa entre el polimorfismo VNTR del IL-1RN y un subgrupo de pacientes con CU definidos por el status ANCA: los pacientes pANCA+ se asociaron con el genotipo 1,2 cuando se compararon con los pacientes ANCA-/c-ANCA (52% vs 26,5%; $p=0,01$; $p_c=0,05$). Estos hallazgos contrastan con los de otros autores que no han objetivado asociaciones entre la CU-pANCA y variantes genóticas del polimorfismo del IL-1RN^{373,461,463}. Únicamente Roussomoustakaki y cols.⁴⁶⁶ han encontrado que la proporción de portadores del alelo 2 está aumentada en la CU-ANCA+ comparada con la CU-ANCA-.

La ventaja principal de contemplar a la CU y la EC como enfermedades genéticamente heterogéneas, consiste en la posibilidad de estratificar a los pacientes por la naturaleza de su alteración genética subyacente, por ejemplo como se ha descrito previamente, mediante el estudio de asociaciones con marcadores genéticos y subclínicos, para conseguir mejorar los conocimientos sobre los mecanismos fisiopatogénicos implicados en cada forma etiológica. Además, la identificación de grupos genéticamente homogéneos debería permitir el empleo de tratamientos más racionales y ensayar nuevas estrategias terapéuticas acorde con las alteraciones fisiopatológicas inherentes a cada uno

de ellos. En este sentido, los estudios comentados más arriba, a pesar de que consiguen definir subgrupos homogéneos de CU a partir de marcadores genéticos y los ANCA, no encuentran que los subgrupos "genéticos" tengan características fenotípicas específicas, lo que sin duda debería ser el principal objetivo de este tipo de trabajos. Por citar un ejemplo, recientemente Plevy y cols.⁵⁴⁹ han reportado que el estudio combinado de microsatélites del gen del TNF α y del status ANCA, identifica a un subgrupo de pacientes con EC caracterizados por una pobre respuesta al tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-TNF α . Lógicamente, los resultados de este trabajo deberían ser ratificados para cobrar relevancia, y únicamente se cita aquí el mismo, para ilustrar lo que puede llegar a aportar este campo de la investigación en el estudio, y sobre todo, en el manejo de la EII. Por todo lo expuesto, se comprende el interés que existe en lograr identificar marcadores genéticos y subclínicos, como los ANCA, que nos permitan alcanzar en el futuro estos objetivos.

6. CONCLUSIONES

ESTUDIO 1.

1.- La presencia de ANCA se asocia a la CU y en mucha menor proporción a la EC en la población catalana estudiada. Su determinación mediante IFI puede ser de utilidad para el diagnóstico diferencial entre las dos enfermedades en nuestro medio.

2.- La seropositividad de los ANCA no se asocia con las diferentes características demográficas ni clínicas de la CU.

ESTUDIO 2.

1.- La prevalencia de los ANCA no se encuentra incrementada en los familiares sanos de primer grado de los pacientes con EII en la población catalana estudiada. Estos anticuerpos no representan marcadores subclínicos de susceptibilidad genética a la EII en esta población.

ESTUDIO 3.

1.- Los polimorfismos de los genes del TNF α , TNF β , e IL-1ra analizados no tienen un papel determinante en la susceptibilidad genética global a la CU en la población catalana estudiada.

2.- La combinación de un marcador genético (IL-1RN) y subclínico (ANCA) identifica a un subgrupo de pacientes con CU (genotipo 1,2 del gen IL-1ra; ANCAp). Este resultado:

2.1. Proporciona evidencia adicional al concepto de heterogeneidad genética en la CU.

2.2. Apoya el papel de los ANCA como marcadores subclínicos de heterogeneidad genética en la CU.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Wiik A. Current classification and definitions of autoantibodies to neutrophil granulocytes. *APMIS* 1990; Suppl 19: 24-25.
2. Davies DJ, Moran JE, Niall JF, Ryan GB. Segmental necrotising glomerulonephritis with antineutrophil antibody: possible arbovirus aetiology ? *Br Med J* 1982;285: 606.
3. Hall JB, Wadham BM, Wood CJ, Ashton V, Adam WR. Vasculitis and glomerulonephritis: a subgroup with an antineutrophil cytoplasmic antibody. *Aust N Z J Med* 1984;14: 277-278.
4. Van der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S, Wiik A, Permin H, Van Es LA, Van der Giessen M, Van der Hem GK, The TH. Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* 1985;1: 425-429.
5. Gross WL, Lüdemann G, Kiefer G, Lehmann H. Anticytoplasmic antibodies in Wegener's granulomatosis. *Lancet* 1986;1: 806.
6. Lüdemann G, Gross WL. Autoantibodies against cytoplasmic structures of neutrophil granulocytes in Wegener's granulomatosis. *Clin Exp Immunol* 1987;69: 350-357.
7. Specks U, Wheatley CL, McDonald TJ, Rohrbach MS, DeRemee RA. Anticytoplasmic autoantibodies in the diagnosis and follow-up of Wegener's granulomatosis. *Mayo Clin Proc* 1989;64: 28-36.
8. Cohen Tervaert JW, van der Woude FJ, Fauci AS, Ambrus JL, Velosa J, Keane WF, Meijer S, van der Giessen M, The TH, van der Hem GK, Kallenberg CGM. Association between active Wegener's granulomatosis and anticytoplasmic antibodies. *Arch Intern Med* 1989;149: 2461-2465.
9. Nölle B, Specks U, Lüdemann J, Rohrbach MS, DeRemee RA, Gross WL. Anticytoplasmic autoantibodies: their immunodiagnostic value in Wegener granulomatosis. *Ann Intern Med* 1989;111: 28-40.
10. Savage COS, Winearls CG, Jones S, Marshall PD, Lockwood CM. Prospective study of radioimmunoassay for antibodies against neutrophil cytoplasm in diagnosis of systemic vasculitis. *Lancet* 1987;1: 1389-1393.
11. Falk RJ, Jennette JC. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Eng J Med* 1988;318: 1651-1657.

12. Walters MDS, Savage COS, Dillon MJ, Lockwood CM, Barratt TM. Antineutrophil cytoplasm antibodies in crescentic glomerulonephritis. *Arch Dis Child* 1988;63: 814-817.
13. Parlevliet KJ, Henzen-Logmans SC, Oe PL, Bronsveld W, Balm AJM, Donker AJM. Antibodies to components of neutrophil cytoplasm: a new diagnostic tool in patients with Wegener's granulomatosis and systemic vasculitis. *Q J Med* 1988;66: 55-63.
14. Jennette JC, Wilkman AS, Falk RJ. Antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated glomerulonephritis and vasculitis. *Am J Pathol* 1989;135: 921-930.
15. Andrassy K, Koderisch J, Rufer M, Erb A, Waldherr R, Ritz E. Detection and clinical implication of anti-neutrophil cytoplasm antibodies in Wegener's granulomatosis and rapidly progressive glomerulonephritis. *Clin Nephrol* 1989;32: 159-167.
16. Nassberger L, Sjöholm AG, Bygren P, Thysell H, Hojer-Madsen M, Rasmussen N. Circulating anti-neutrophil cytoplasm antibodies in patients with rapidly progressive glomerulonephritis and extracapillary proliferation. *J Intern Med* 1989;225: 191-196.
17. Venning MC, Quinn A, Broomhead V, Bird AG. Antibodies directed against neutrophils (C-ANCA and P-ANCA) are of distinct diagnostic value in systemic vasculitis. *Q J Med* 1990;77: 1287-1296.
18. Mustonen J, Soppi E, Pasternack A, Hällström O. Clinical significance of autoantibodies against neutrophil cytoplasmic components in patients with renal disease. *Am J Nephrol* 1990;10: 482-488.
19. Cohen Tervaert JW, Goldschmeding R, Elema JD, van der Giessen M, Huitema MG, van der Hem GK, The TH, von dem Borne AEGKr, Kallenberg CGM. Autoantibodies against myeloid lysosomal enzymes in crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int* 1990;37: 799-806.
20. Falk RJ, Hogan S, Carey TS, Jennette JC, and the Glomerular Disease Collaborative Network. Clinical course of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated glomerulonephritis and systemic vasculitis. *Ann Intern Med* 1990;113: 656-663.
21. Cohen Tervaert JW, Goldschmeding R, Elema JD, Limburg PC, van der Giessen M, Huitema MG, Koolen MI, Hené RJ, The TH, van der Hem GK, von dem Borne AEGKr, Kallenberg CGM. Association of autoantibodies to myeloperoxidase with different forms of vasculitis. *Arthritis Rheum* 1990;33: 1264-1272.
22. MacIsaac AI, Moran JE, Davies DJ, Murphy BF, Georgiou T, Niall JF. Antineutrophil cytoplasm antibody (ANCA) associated vasculitides. *Clin Nephrol* 1990;34: 5-8.

23. Saxena R, Bygren P, Rasmussen N, Wieslander J. Circulating autoantibodies in patients with extracapillary glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 1991;6: 389-397.
24. Niles JL, Pan GL, Collins AB, Shannon T, Skates S, Fienberg R, Arnaout MA, McCluskey RT. Antigen-specific radioimmunoassays for anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in the diagnosis of rapidly progressive glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 1991;2:27-36.
25. Cohen Tervaert JW, Limburg PC, Elema JD, Huitema MG, Horst G, The TH, Kallenberg CGM. Detection of autoantibodies against myeloid lysosomal enzymes: a useful adjunct to classification of patients with biopsy-proven necrotizing arteritis. *Am J Med* 1991;91: 59-66.
26. Bosch X, Mirapeix E, Font J, Ingelmo M, Revert L. Anti-myeloperoxidase antibodies in crescentic glomerulonephritis. *Nephron* 1991;59:504-505.
27. Bosch X, Mirapeix E, Font J, Cervera R, Ingelmo M, Khamashta MA, Revert LL, Hughes GRV, Urbano-Márquez A. Anti-myeloperoxidase autoantibodies in patients with necrotizing glomerular and alveolar capillaritis. *Am J Kidney Dis* 1992;20: 231-239.
28. Velosa JA, Homburger HA, Holley KE. Prospective study of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody tests in the diagnosis of idiopathic necrotizing-crescentic glomerulonephritis and renal vasculitis. *Mayo Clin Proc* 1993;68:561-565.
29. Bindi P, Mougnot B, Mentre F, Noel LH, Peraldi MN, Vanhille P, Lesavre P, Mignon F, Ronco PM. Necrotizing crescentic glomerulonephritis without significant immune deposits: a clinical and serological study. *Q J Med* 1993;86: 55-68.
30. Bosch X, Mirapeix E, Font J, López-Soto A, Rodríguez R, Vivancos J, Revert L, Ingelmo M, Urbano-Márquez A. Anticuerpos anticito plasma de neutrófilo: utilidad diagnóstica en vasculitis y glomerulonefritis. *Med Clin (Barc)* 1994;102: 412-417.
31. Davenport A, Lock RJ, Wallington TB, Feest TG. Clinical significance of anti-neutrophil cytoplasm antibodies detected by a standardized indirect immunofluorescence assay. *Q J Med* 1994;87: 291-299.
32. Davenport A, Lock RJ, Wallington TB. Clinical relevance of testing for antineutrophil cytoplasm antibodies (ANCA) with a standard indirect immunofluorescence ANCA test in patients with upper or lower respiratory tract symptoms. *Thorax* 1994;49: 213-217.

33. Rao JK, Allen NB, Feussner JR, Weinberger M. A prospective study of antineutrophil cytoplasmic antibody (c-ANCA) and clinical criteria in diagnosing Wegener's granulomatosis. *Lancet* 1995;346: 926-931.
34. Rao JK, Weinberger M, Oddone EZ, Allen NB, Landsman P, Feussner JR. The role of antineutrophil cytoplasmic antibody (c-ANCA) testing in the diagnosis of Wegener granulomatosis. *Ann Intern Med* 1995;123: 925-932.
35. Blockmans D, Stevens E, Marien G, Bobbaers H. Clinical spectrum associated with positive ANCA titres in 94 consecutive patients: is there a relation with PR-3 negative c-ANCA and hypergammaglobulinemia? *Ann Rheum Dis* 1998;57: 141-145.
36. Hagen EC, Daha MR, Hermans J, Andrassy K, Csernok E, Gaskin G, Lesavre P, Lüdemann J, Rasmussen N, Sinico RA, Wiik A, van der Woude FJ. Diagnostic value of standardized assays for anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in idiopathic systemic vasculitis. *Kidney Int* 1998;53: 743-753.
37. Jennette C, Wilkman AS, Falk RJ. Diagnostic predictive value of ANCA serology. *Kidney Int* 1998;53: 796-798.
38. Sneller MC, Fauci AS. Pathogenesis of vasculitis syndromes. *Med Clin North Am* 1997;81: 221-242.
39. Cid Xutglà MC. Mecanismos patogénicos de las vasculitis sistémicas. Nuevos conceptos. *Med Clin (Barc)* 1998;110: 587-596.
40. Jennette JC, Falk RJ, Andrassy K, Bacon PA, Churg J, Gross WL, Hagen EC, Hoffman GS, Hunder GG, Kallenberg CGM, McCluskey RT, Sinico RA, Rees AJ, van Es LA, Waldherr R, Wiik A. Nomenclature of systemic vasculitides. *Arthritis Rheum* 1994;37: 187-192.
41. Jennette J, Falk RJ. Small-vessel vasculitis. *N Engl J Med* 1997;337: 1512-1523.
42. Falk RJ, Jennette JC. ANCA small-vessel vasculitis. *J Am Soc Nephrol* 1997;8: 314-322.
43. Savage COS, Harper L, Adu D. Primary systemic vasculitis. *Lancet* 1997;349: 553-558.

44. Jayne DRW, Rasmussen N, for the European Community Systemic Vasculitis Clinical Trials Study Group (ECSYSVASTRIAL). Treatment of antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated systemic vasculitis: initiatives of the European community systemic vasculitis clinical trials study group. *Mayo Clin Proc* 1997;72: 737-747.
45. Kallenberg CGM, Brouwer E, Weening JJ, Cohen Tervaert JW. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies: current diagnostic and pathophysiological potential. *Kidney Int* 1994;46: 1-15.
46. Gross W, Csernok E, Helmchen U. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies, autoantigens, and systemic vasculitis. *APMIS* 1995;103: 81-97.
47. Schnabel A, Hauschild S, Gross WL. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in generalized autoimmune diseases. *Int Arch Allergy Immunol* 1996;109: 201-206.
48. Hoffman GS, Specks U. Antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Arthritis Rheum* 1998;41: 1521-1537.
49. Saxon A, Shanahan F, Landers C, Ganz T, Targan S. A distinct subset of antineutrophil cytoplasmic antibodies is associated with inflammatory bowel disease. *J Allergy Clin Immunol* 1990;86: 202-210.
50. Rump JA, Schölmerich J, Gross V, Roth M, Helfesrieder R, Rautmann A, Lüdemann J, Gross WL, Peter HH. A new type of perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibody (p-ANCA) in active ulcerative colitis but not in Crohn´s disease. *Immunobiol* 1990;181: 406-413.
51. Wieslander J. How are antineutrophil cytoplasmic antibodies detected ? *Am J Kidney Dis* 1991;18: 154-158.
52. Wiik A, Rasmussen N, Wieslander J. Methods to detect autoantibodies to neutrophilic granulocytes. In: van Venrooij WJ and Maini RN eds. *Manual of biological markers of disease*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 1993: A9, 1-14.
53. Wiik A. Delineation of a standard procedure for indirect immunofluorescence detection of ANCA. *APMIS* 1989;97 (supl 6): 12-13.
54. Hagen EC, Andrassy K, Csernok E, Daha MR, Gaskin G, Gross WL, Lesavre Ph, Lüdemann J, Pusey CD, Rasmussen N, Savage CO, Sinico RA, Wiik A, Van der Woude FJ. The value of indirect immunofluorescence and solid phase techniques for ANCA detection. A report on the first phase of an international cooperative study on the standardization of ANCA assays. *J Immunol Methods* 1993;159: 1-16.

55. Charles LA, Falk RJ, Jennette JC. Reactivity of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with HL-60-cells. *Clin Immunol Immunopathol* 1989;53: 243-253.
56. Rasmussen N, Borregaard N, Wieslander J. Alfa-ELISA determination of ANCA and characterization of the ANCA related antigen. *Acta Pathol Microbiol Immunol* 1989;S697: 40.
57. Charles LA, Jennette JC, Falk RJ. The role of HL-60 cells in the detection of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies. *J Rheumatol* 1991;18: 492-494.
58. Wheeler FB, Saluta G, Wise CM, Semble EL, Pisko EJ. Detection of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies using the promyelocytic HL-60 cell-line. *Clin Exp Rheumatol* 1991;9: 569-580.
59. Gallagher R, Collins S, Trujillo J. Characterization of the continuous differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1979;54: 713-733.
60. Leglise MC, Dent GA, Ayscue LH, Ross DW. Leukemic cell maturation: phenotypic variability and oncogene expression in HL60 cells: a review. *Blood Cells* 1988;13: 319-337.
61. Specks U, Wiegert EM, Homburger HA. Human mast cells expressing recombinant proteinase 3 (PR3) as substrate for clinical testing for anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *Clin Exp Immunol* 1997;109: 286-295.
62. Wiik A, van der Woude FJ. The new ACPA/ANCA nomenclature: *Neth J Med* 1990;36: 107-108.
63. Wiik A, Stummann L, Kjeldsen L, Borregaard N, Ullman S, Jacobsen S, Halberg P. The diversity of perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies (pANCA) antigens. *Clin Exp Immunol* 1995;101 (suppl 1): 15-17.
64. Zhao MH, Lockwood CM. ANCA defines the clinical disease manifestations of vasculitis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 1996;13: 221-226.
65. Bang la Cour B, Wiik A, Hoier-Madsen M, Baslund B. Clinical correlates and substrate specificities of antibodies exhibiting neutrophil nuclear reactivity - A methodological study. *J Immunol Methods* 1995;187: 287-295.
66. Spickett GP, Broomhead V. Formalin fixation and patterns of antineutrophil cytoplasmic antibodies. *J Clin Pathol* 1995;48: 89-90.

67. Yang P. Comparative evaluation of unfixed and fixed human neutrophils for determination of antineutrophil cytoplasmic antibodies by indirect immunofluorescence. *J Clin Pathol* 1997;50: 677-680.
68. Chevailler A, Noël LH, Renier G, Gardembas-Pain M, Subra JF, Nusbaum P, Hurez D, Lesavre P. Determination of anti-neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA) specificity by immunofluorescence on chronic myelocytic leukemia cells. *J Immunol Methods* 1992;147: 101-109.
69. Lock RJ. Detection of autoantibodies to neutrophil cytoplasmic antigens. *J Clin Pathol* 1994;47: 4-8.
70. Lesavre P, Noël LH, Gayno S, Nusbaum P, Reumaux D, Erlinger S, Grünfeld JP, Halbwachs-Mecarelli L. Atypical autoantigen targets of perinuclear antineutrophil cytoplasm antibodies (P-ANCA): specificity and clinical associations. *J Autoimm* 1993;6: 185-195.
71. Lüdemann J, Utecht B, Gross WL. Detection and quantitation of anti-neutrophil cytoplasm antibodies in Wegener's granulomatosis by ELISA using affinity purified antigen. *J Immunol Methods* 1988;114:167-174.
72. Rasmussen N, Sjölin C, Isaksson B, Bygren P, Wieslander J. An ELISA for the detection of anti-neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA). *J Immunol Methods* 1990;127: 139-145.
73. Wang G, Csernok E, de Groot K, Gross WL. Comparison of eight commercial kits for quantitation of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *J Immunol Methods* 1997;208: 203-211.
74. Hagen EC, Andrassy K, Csernok E, Daha MR, Gaskin G, Gross WL, Hansen B, Heigl Z, Hermans J, Jayne D, Kallenberg CGM, Lesavre Ph, Lockwood CM, Lüdemann J, Mascart-Lemone F, Mirapeix E, Pusey CD, Rasmussen N, Sinico RA, Tzioufas A, Wieslander J, Wiik A, Van der Woude FJ. 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. *J Immunol Methods* 1996;196: 1-15.
75. Baslund B, Segelmark M, Wiik A, Szpirt W, Petersen J, Wieslander J. Screening for anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA): is indirect immunofluorescence the method of choice? *Clin Exp Immunol* 1995;99: 486-492.
76. Westman KWA, Selga D, Bygren P, Segelmark M, Baslund B, Wiik A, Wieslander J. Clinical evaluation of a capture ELISA for detection of proteinase-3 antineutrophil cytoplasmic antibody (PR3-ANCA). *Kidney Int* 1998;53: 1230-1236.

77. Borregaard N, Kjeldsen L, Lollike K, Sengelov H. Granules and secretory vesicles of the human neutrophil. *Clin Exp Immunol* 1995;101 (suppl 1): 6-9.
78. Lockwood CM, Bakes D, Jones S, Whitaker KB, Moss DW, Savage COS. Association of alkaline phosphatase with an autoantigen recognised by circulating anti-neutrophil antibodies in systemic vasculitis. *Lancet* 1987;1: 716-719.
79. Rasmussen N, Borregaard N, Wiik A. Anti-neutrophil-cytoplasm antibodies in Wegener's granulomatosis are not directed against alkaline phosphatase. *Lancet* 1987;1: 1488.
80. Gross WL, Lüdemann J, Schröder JM. Anti-neutrophil-cytoplasm antibodies in Wegener's granulomatosis are not directed against alkaline phosphatase. *Lancet* 1987;1: 1488-1489.
81. Goldschmeding R, Tetteroo PAT, Von dem Borne AEGK, Kallenberg CGM. Anti-neutrophil-cytoplasm antibodies in Wegener's granulomatosis are not directed against alkaline phosphatase. *Lancet* 1987;1: 1489.
82. Goldschmeding R, van der Schoot CE, Ten Bokkel Huinink D, Hack CE, van den Ende ME, Kallenberg CGM, von dem Borne AEGKr. Wegener's granulomatosis autoantibodies identify a novel diisopropylfluorophosphate-binding protein in the lysosomes of normal human neutrophils. *J Clin Invest* 1989;84: 1577-1587.
83. Niles JL, McCluskey RT, Ahmad MF, Arnaout MA. Wegener's granulomatosis autoantigen is a novel serine proteinase. *Blood* 1989;74: 1888-1893.
84. Lüdemann J, Utecht B, Gross WL. Anti-neutrophil cytoplasm antibodies in Wegener's granulomatosis recognize an elastinolytic enzyme. *J Exp Med* 1990;171: 357-362.
85. Goldschmeding R, Cohen-Tervaert JW, van der Schoot CE, van der Veen C, Kallenberg CGM, von dem Borne AEGKr. ANCA, anti-myeloperoxidase, and anti-elastase: three members of a novel class of autoantibodies against myeloid lysosomal enzymes. *APMIS* 1989;97(S6): 48-49.
86. Jennette JC, Hoidal JR, Falk RJ. Specificity of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies for proteinase 3. *Blood* 1990;75: 2263-2264.
87. Jenne DE, Tschopp J, Lüdemann J, Utecht B, Gross WL. Wegener's autoantigen decoded. *Nature* 1990;346: 520.
88. Kao RC, Wehner NG, Skubitz KM, Gray BH, Hoidal JR. Proteinase 3: a distinct human polymorphonuclear leukocyte proteinase that produces emphysema in hamsters. *J Clin Invest* 1988;82: 1963-1973.

89. Nässberger L, Jonsson H, Sjöholm AG, Sturfelt G, Heubner A. Circulating antielastase in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1989;1: 509.
90. Flesch BK, Lampe M, Rautman A, Gross WL. Anti-elastase, cathepsin G, and lactoferrin antibodies in sera with c-ANCA or atypical fluorescence staining pattern. *Am J Kidney Dis* 1991;18: 201.
91. Thomson RA, Lee SS. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies. *Lancet* 1989;1: 670-671.
92. Schmitt WII, Csernok E, Flesch BK, Hauschild S, Gross WL. Autoantibodies directed against lysozyme: a new target antigen for anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *Adv Exp Med Biol* 1993;336: 267-272.
93. Nässberger L, Ljungh A, Schumacher G, Kollberg B. β -glucuronidase antibodies in ulcerative colitis. *Lancet* 1992;340: 734-735.
94. Moodie FDL, Leaker G, Cambridge NF, Totty NF, Segal AW. Alpha-enolase: a novel cytosolic autoantigen in ANCA positive vasculitis. *Kidney Int* 1993;43: 675-681.
95. Zhao MH, Jones SJ, Lockwood CM. Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) is an important antigen for anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in vasculitis. *Clin Exp Immunol* 1995;99: 49-56.
96. Zhao MH, Lockwood CM. Azurocidin is a novel antigen for anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in systemic vasculitis. *Clin Exp Immunol* 1996;103: 397-402.
97. Yang JJ, Tuttle R, Falk RJ, Jennette JC. Frequency of anti-bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) and anti-azurocidin in patients with renal disease. *Clin Exp Immunol* 1996;105: 125-131.
98. Gallin MY, Jacobi AB, Büttner DW, Schönberger Ö, Marti T, Erttmann KD. Human autoantibody to defensin: disease association with hyperreactive onchocerciasis (sowda). *J Exp Med* 1995;182: 41-47.
99. Kain R, Matsui K, Exner M, Binder S, Schaffner G, Sommer EM, Kerjaschki D. A novel class of autoantigens of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in necrotizing and crescentic glomerulonephritis: the lysosomal membrane glycoprotein h-lamp-2 in neutrophil granulocytes and a related membrane protein in glomerular endothelial cells. *J Exp Med* 1995;181: 585-597.

100. Sobajima J, Ozaki S, Osakada F, Uesugi H, Shirakawa H, Yoshida M, Nakao K. Novel autoantigens of perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (P-ANCA) in ulcerative colitis: non-histone chromosomal proteins, HMG1 and HMG2. *Clin Exp Immunol* 1997;107: 135-140.
101. Sobajima J, Ozaki S, Uesugi H, Osakada F, Shirakawa H, Yoshida M, Nakao K. Prevalence and characterization of perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (P-ANCA) directed against HMG1 and HMG2 in ulcerative colitis (UC). *Clin Exp Immunol* 1998;111: 402-407.
102. Uesugi H, Ozaki S, Sobajima J, Osakada F, Shirakawa H, Yoshida M, Nakao K. Prevalence and characterization of novel pANCA, antibodies to the high mobility group non-histone chromosomal proteins HMG1 and HMG2, in systemic rheumatic diseases. *J Rheumatol* 1998;25:703-709.
103. Zeek PM. Periarthritis nodosa: a critical review. *Am J Clin Pathol* 1952;22: 777-790.
104. Fauci AS, Haynes BF, Katz P. The spectrum of vasculitis: clinical, pathologic, immunologic and therapeutic considerations. *Ann Intern Med* 1978;89:660-676.
105. Alarcón-Segovia D. Classification of the necrotizing vasculitides in man. *Clin Rheum Dis* 1980;6: 223-231.
106. Lie JT. The classification and diagnosis of vasculitis in large and medium-sized blood vessels. *Pathol Annu* 1987;22: 125-162.
107. Hunder GG, Arend WP, Bloch DA, Calabrese LH, Fauci AS, Fries JF, Leavitt RY, Lie JT, Lightfoot RW Jr, Masi AT, McShane DJ, Michel BA, Mills JA, Stevens MB, Wallace SL, Zvaifler NJ. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of vasculitis: introduction. *Arthritis Rheum* 1990;33: 1065-1067.
108. Wathen CW, Harrison DJ. Circulating anti-neutrophil antibodies in systemic vasculitis. *Lancet* 1987;1: 1037.
109. Cohen Tervaert JW, Goldschmeding R, Elema JD, von dem Borne AEGKr, Kallenberg CGM. Antimyeloperoxidase antibodies in the Churg-Strauss syndrome. *Thorax* 1991;46: 70-71.
110. Guillevin L, Visser H, Noel LH, Pourrat J, Vernier I, Gayraud M, Oksman F, Lesavre P. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in systemic polyarteritis nodosa with and without hepatitis B virus infection and Churg-Strauss syndrome-62 patients. *J Rheumatol* 1993;20: 1345-1349.

111. Guillevin L, Lhote F, Amouroux J, Gherardi R, Callard P, Casassus P. Antineutrophil cytoplasmic antibodies, abnormal angiograms and pathological findings in polyarteritis nodosa and Churg-Strauss syndrome: indications for the classification of vasculitides of the polyarteritis nodosa group. *Br J Rheumatol* 1996;35: 958-964.
112. Schmitt WH, Csernok E, Kobayashi S, Klinkenborg A, Reinhold-Keller E, Gross WL. Churg-Strauss syndrome. Serum markers of lymphocyte activation and endothelial damage. *Arthritis Rheum* 1998;41: 445-452.
113. Egner W, Chapel HM. Titration of antibodies against neutrophil cytoplasmic antigens is useful in monitoring disease activity in systemic vasculitides. *Clin Exp Immunol* 1990;82: 244-249.
114. Cohen Tervaert JW, Huitema MG, Hené RJ, Sluiter WJ, The TH, van der Hem GK, Kallenberg CGM. Prevention of relapses in Wegener's granulomatosis by treatment based on antineutrophil cytoplasmic antibody titre. *Lancet* 1990;336: 709-711.
115. Gaskin G, Savage CO, Ryan JJ, Jones S, Rees AJ, Lockwood CM, Pusey CD. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies and disease activity during long-term follow-up of 70 patients with systemic vasculitis. *Nephrol Dial Transplant* 1991;6: 689-694.
116. Chan TM, Frampton G, Jayne DRW, Perry GJ, Lockwood CM, Cameron JS. Clinical significance of anti-endothelial cell antibodies in systemic vasculitis: a longitudinal study comparing anti-endothelial cell antibodies and anti-neutrophil cytoplasm antibodies. *Am J Kid Dis* 1993;22: 387-392.
117. Stegeman CA, Cohen Tervaert JW, Sluiter WJ, Manson WL, de Jong PE, Kallenberg CGM. Association of chronic nasal carriage of staphylococcus aureus and higher relapse rates in Wegener granulomatosis. *Ann Intern Med* 1994;120: 12-17.
118. Markey BA, Warren JS. Use of anti-neutrophil cytoplasmic antibody assay to distinguish between vasculitic disease activity and complications of cytotoxic therapy. *Am J Clin Pathol* 1994;102: 589-594.
119. Jayne DRW, Gaskin G, Pusey CD, Lockwood CM. ANCA and predicting relapse in systemic vasculitis. *Q J Med* 1995;88: 127-133.
120. De'Oliviera J, Gaskin G, Dash A, Rees AJ, Pusey CD. Relationship between disease activity and anti-neutrophil cytoplasmic antibody concentration in long-term management of systemic vasculitis. *Am J Kidney Dis* 1995;25: 380-389.

121. Kerr GS, Fleisher TA, Hallahan CW, Leavitt RY, Fauci AS, Hoffman GS. Limited prognostic value of changes in antineutrophil cytoplasmic antibody titer in patients with Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum* 1993;36: 365-371.
122. Geffriaud-Ricouard C, Noël LH, Chauveau D, Houhou S, Grünfeld JP, Lesavre P. Clinical spectrum associated with ANCA of defined antigen specificities in 98 selected patients. *Clin Nephrol* 1993;39: 125-136.
123. Davenport A, Lock RJ, Wallington T. Clinical significance of serial measurement of autoantibodies to neutrophil cytoplasm using a standard indirect immunofluorescence test. *Am J Nephrol* 1995;15: 201-207.
124. Cohen P, Guillevin L, Baril L, Lothe F, Noël LH, Lesavre P. Persistence of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in asymptomatic patients with systemic polyarteritis nodosa or Churg-Strauss syndrome: follow-up of 53 patients. *Clin Exp Rheumatol* 1995;13: 193-198.
125. Cohen Tervaert JW, Stegeman CA, Kallenberg CG. Serial ANCA testing is useful in monitoring disease activity of patients with ANCA-associated vasculitides. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 1996;13: 241-245.
126. Lesavre P, Kyndt X, Vanhille P, Reumaux D, Guillevin L, Noël LH. Serial ANCA testing has limited value during the follow-up of disease activity in patients with ANCA-associated vasculitis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 1996;13: 246-248.
127. Nässberger L, Johansson AC, Björck S, Sjöholm AG. Antibodies to neutrophil granulocyte myeloperoxidase and elastase: autoimmune responses in glomerulonephritis due to hydralazine treatment. *J Int Med* 1991;229: 261-265.
128. Cambridge G, Wallace H, Bernstein RM, Leaker B. Autoantibodies to myeloperoxidase in idiopathic and drug-induced systemic lupus erythematosus and vasculitis. *Br J Rheumatol* 1994;33:109-114.
129. Short AK, Lockwood CM. Antigen specificity in hydralazine associated ANCA positive systemic vasculitis. *Q J Med* 1995;88: 775-783.
130. Dolman KM, Gans ROB, Vervaat ThJ, Zevenbergen G, Maingay D, Nikkels RE, Donker AbJM, von dem Borne AEGKr, Goldschmeding R. Vasculitis and antineutrophil cytoplasmic autoantibodies associated with propylthiouracil therapy. *Lancet* 1993;342: 651-652.
131. D´Cruz D, Chesser AMS, Lightowler C, Comer M, Hurst MJ, Baker LRI, Raine AEG. Antineutrophil cytoplasmic antibody-positive crescentic glomerulonephritis associated with anti-thyroid drug treatment. *Br J Rheumatol* 1995;34:1090-1091.

132. Tanemoto M, Miyakawa H, Hanai J, Yago M, Kitaoka M, Uchida S. Myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody-positive crescentic glomerulonephritis complicating the course of Graves' disease: report of three adult cases. *Am J Kidney Dis* 1995;26: 774-780.
133. Kitahara T, Hiramura K, Maezawa A, Ono K, Narahara N, Yano S, Naruse T, Takenouchi K, Yasumoto Y. Case of propylthiouracil-induced vasculitis associated with anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA); review of literature. *Clin Nephrol* 1997;47: 336-340.
134. Harper L, Cockwell P, Savage COS. Case of propylthiouracil-induced ANCA associated small vessel vasculitis. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13: 455-458.
135. Jones BF, Major GAC. Crescentic glomerulonephritis in a patient taking penicillamine associated with antineutrophil cytoplasmic antibody. *Clin Nephrol* 1992;38:293.
136. Hillis GS, Khan IH, Simpson JG, Rees AJ. Scleroderma, D-Penicillamine treatment, and progressive renal failure associated with positive antimyeloperoxidase antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Am J Kidney Dis* 1997;30: 279-281.
137. Karpinski J, Jothy S, Radoux V, Levy M, Baran D. D-Penicillamine-induced crescentic glomerulonephritis and antimyeloperoxidase antibodies in a patient with scleroderma. *Am J Nephrol* 1997;17: 528-532.
138. Merkel PA. Drugs associated with vasculitis. *Curr Opin Rheumatol* 1998;10:45-50.
139. Van den Wall-Bake AWL, Lobatto S, Jonges L, Daha MR, van Es LA. IgA antibodies directed against cytoplasmic antigens of polymorphonuclear leukocytes in patients with Henoch-Schönlein purpura. *Adv Exp Med Biol* 1987;216: 1593-1598.
140. Ronda N, Esnault VLM, Layward L, Sepe V, Allen A, Feehally J, Lockwood CM. Antineutrophil cytoplasm antibodies (ANCA) of IgA isotype in adult Henoch-Schönlein purpura. *Clin Exp Immunol* 1994;95: 49-55.
141. O'Donoghue DJ, Nusbaum P, Noel LH, Halbwachs-Mecarelli L, Lesavre P. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in IgA nephropathy and Henoch-Schönlein purpura. *Nephrol Dial Transplant* 1992;7: 534-538.
142. Robson WL, Leung AK, Woodman RC. The absence of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in patients with Henoch-Schönlein purpura. *Pediatr Nephrol* 1994;8: 295-298.

143. Kuester S, Andrassy K, Waldherr R, Ritz E. Contrasting clinical course of Henoch-Schönlein purpura in younger and elderly patients. *Contr Nephrol* 1993;105: 93-97.
144. Saulsbury FT, Kirkpatrick PR, Bolton WK. IgA antineutrophil cytoplasmic antibody in Henoch-Schönlein purpura. *Am J Nephrol* 1991;11: 295-300.
145. Sinico RA, Tadros M, Radice A, Pozzi C, Quarenghi M, Comotti C, Gregorini G, Castiglione A, Arrigo G, D'Amico G. Lack of IgA antineutrophil cytoplasmic antibodies in Henoch-Schönlein purpura and IgA nephropathy. *Clin Immunol Immunopathol* 1994;73: 19-26.
146. Coppo R, Cirina P, Amore A, Sinico RA, Radice A, Rollino C, for the Italian Group of Renal Immunopathology Collaborative Study on Henoch-Schönlein purpura in adults and in children. *Nephrol Dial Transplant* 1997;12: 2269-2276.
147. Lamprecht P, Schmitt WH, Gross WL. Mixed cryoglobulinaemia, glomerulonephritis, and ANCA: essential cryoglobulinaemic vasculitis or ANCA-associated vasculitis? *Nephrol Dial Transplant* 1998;13: 213-221.
148. Khan IH, Catto GRD, MacLeod AM. Antineutrophil cytoplasmic autoantibody associated vasculitis and renal failure in Behçet's disease. *Nephrol Dial Transplant* 1994;9: 332.
149. Baleva M, Kolarov Z, Nikolov K. Antineutrophil cytoplasmic autoantibody in two patients with Behçet's disease. *Nephrol Dial Transplant* 1994;9: 876.
150. Burrows NP, Zhao MH, Norris PG, Lockwood CM. ANCA associated Behçet's disease. *J R Soc Med* 1996;89: 47P-48P.
151. Ben Hmida M, Hachicha J, Kaddour N, Makni H, Aydel FZ, Chakroun N, Bahloul Z, Ayadi H, Noël LH, Jarraya A. ANCA in Behçet's disease. *Nephrol Dial Transplant* 1997;12: 2465-2466.
152. Zeek PM, Smith CC, Weeter JC. Studies on periarteritis nodosa. The differentiation between the vascular lesions of periarteritis nodosa and of hypersensitivity. *Am J Pathol* 1948;24: 889-917.
153. Godman G, Churg J. Wegener's granulomatosis. Pathology and review of the literature. *Arch Pathol Lab Med* 1954;58: 533-553.
154. Guillevin L, Lhote F, Cohen P, Sauvaget F, Jarrousse B, Lortholary O, Noël LH, Trépo C. Polyarteritis nodosa related to hepatitis B virus. *Medicine* 1995;74:238-253.

155. Savage CO, Tizard J, Jayne D, Lockwood CM, Dillon MJ. Antineutrophil cytoplasm antibodies in Kawasaki disease. *Arch Dis Child* 1989;64: 360-363.
156. Rider LG, Wener MH, French J, Sherry DD, Mendelman PM. Autoantibody production in Kawasaki syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 1993;11: 445-449.
157. Guzman J, Fung M, Petty RE. Diagnostic value of anti-neutrophil cytoplasmic and anti-endothelial cell antibodies in early Kawasaki disease. *J Pediatr* 1994;124: 917-920.
158. Nash MC, Shah V, Reader JA, Dillon MJ. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies and anti-endothelial cell antibodies are not increased in Kawasaki disease. *Br J Rheumatol* 1995;34: 882-887.
159. Falcini F, Trapani S, Turchini S, Farsi A, Ermini M, Keser G, Khamashta MA, Hughes GR. Immunological findings in Kawasaki disease: an evaluation in a cohort of Italian children. *Clin Exp Rheumatol* 1997;15: 685-689.
160. Mc Hugh NJ, James IE, Plant GT. Anticardiolipin and antineutrophil antibodies in giant cell arteritis. *J Rheumatol* 1990;17: 916-922.
161. Bosch X, Font J, Mirapeix E, Cid M, Revert L, Ingelmo M. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in giant cell arteritis. *J Rheumatol* 1991;18: 787-788.
162. Baranger TAR, Audrain MAP, Castagne A, Barrier JH, Esnault VLM. Absence of antineutrophil cytoplasmic antibodies in giant cell arteritis. *J Rheumatol* 1994;21: 871-873.
163. Vera O, Pérez-Hernández T, Mejía R, Ariza R, Frati A. Anticuerpos anticitoplasmáticos del neutrófilo (ANCA) en arteritis de Takayasu. *Rev Mex Reumatol* 1994;9: 71.
164. Dagenais P, Dalpé G, Fernandez MF, Boire G, Keystone EC, Gross WL. ANCA in patients with Takayasu's arteritis. *Clin Exp Immunol* 1993;93 (suppl 1): 534.
165. Eichhorn J, Sima D, Thiele B, Lindschau C, Turowski A, Schmidt H, Schneider W, Haller H, Luft FC. Anti-endothelial cell antibodies in Takayasu arteritis. *Circulation* 1996;94: 2396-2401.
166. García-Torres R, Noël LH, Reyes PA, Vera OL, Amigo MC, Silveira LH, Pineda C. Absence of ANCA in Mexican patients with Takayasu's arteritis. *Scand J Rheumatol* 1997;26: 55-57.

167. Calabresi P, Edwards EA, Schilling RF. Fluorescent antiglobulin studies in leukopenic and related disorders. *J Clin Invest* 1959;38: 2091-2100.
168. Calabresi P, Thayer WR, Jr, Spiro HM. Demonstration of circulating antinuclear globulins in ulcerative colitis. *J Clin Invest* 1961;40: 2126-2133.
169. Faber V, Elling P, Norup G, Mansa B, Nissen NI. An antinuclear factor specific for leucocytes. *Lancet* 1964;2: 344-345.
170. Barnett EV, North F Jr, Condemi JJ, Jacox RF, Vaughan JH. Antinuclear factors in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med* 1965;63: 100-108.
171. Faber V, Elling P. Leucocyte-specific anti-nuclear factors in patients with Felty's syndrome, rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and other diseases. *Acta Med Scand* 1966;179:257-267.
172. Svec KH. Immunological and clinical observations of granulocyte-specific antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum* 1969;12: 165-172.
173. Wiik A, Jensen E, Friis J. Granulocyte-specific antinuclear factors in synovial fluids and sera from patients with reumathoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1974;33: 515-522.
174. Wiik A. Granulocyte-specific antinuclear antibodies. *Allergy* 1980;35: 263-289.
175. Nielsen H, Wiik A, Elmegreen J. Granulocyte specific anti-nuclear antibodies in ulcerative colitis. Aid in differential diagnosis of inflammatory bowel disease. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand (C)* 1983;91: 23-26.
176. Snook JA, Chapman RW, Fleming K, Jewell DP. Anti-neutrophil nuclear antibody in ulcerative colitis, Crohn's disease, and primary sclerosing cholangitis. *Clin Exp Immunol* 1989;76: 30-33.
177. Nässberger L, Sjöholm AG, Sturfelt G. Absence of circulating antineutrophil cytoplasm antibodies (ANCA) in severe vasculitis associated with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 1990;19: 189-192.
178. Savige JA, Gallicchio MC, Stockman A, Cunningham TJ, Rowley MJ, Georgiou T, Davies D. Anti-neutrophil cytoplasm antibodies in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 1991;86: 92-98.
179. Juby A, Johnston C, Davis P, Russell AS. Antinuclear and antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in the sera of patients with Felty's syndrome. *Br J Rheumatol* 1992;31: 185-188.

180. Coremans IEM, Hagen EC, Daha MR, van der Woude FJ, van der Voort EAM, Kleijburg-van der Keur C, Breedveld FC. Antilactoferrin antibodies in patients with rheumatoid arthritis are associated with vasculitis. *Arthritis Rheum* 1992;35: 1466-1475.
181. Mulder AHL, Horst G, van Leeuwen MA, Limburg PC, Kallenberg CGM. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1993;36: 1054-1060.
182. Helsloot J, Virgo S, McGuigan L, Sturgess A. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory arthritis-potential for misdiagnosis ? *Br J Rheumatol* 1995;34: 820-824.
183. Bosch X, Llena J, Collado A, Font J, Mirapeix E, Ingelmo M, Muñoz-Gómez J, Urbano-Márquez A. Occurrence of antineutrophil cytoplasmic and antineutrophil (peri)nuclear antibodies in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1995;22:2038-2045.
184. De Bandt M, Meyer O, Haim T, Kahn MF. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in rheumatoid arthritis patients. *Br J Rheumatol* 1996;35: 38-43.
185. Afeltra A, Sebastiani GD, Galeazzi M, Caccavo D, Ferri GM, Marcolongo R, Bonomo L. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in synovial fluid and in serum of patients with rheumatoid arthritis and other types of synovitis. *J Rheumatol* 1996;23: 10-15.
186. Braun MG, Csernok E, Schmitt WH, Gross WL. Incidence, target antigens, and clinical implications of antineutrophil cytoplasmic antibodies in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1996;23: 826-830.
187. Brimnes J, Halberg P, Jacobsen S, Wiik A, Heegaard NHH. Specificities of anti-neutrophil autoantibodies in patients with rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol* 1997,110: 250-256.
188. Mustila A, Korpela M, Mustonen J, Helin H, Huhtala H, Soppi E, Pasternack A, Miettinen A. Perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibody in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1997;40: 710-717.
189. Merkel PA, Polisson RP, Chang YC, Skates SJ, Niles JL. Prevalence of antineutrophil cytoplasmic antibodies in a large inception cohort of patients with connective tissue disease. *Ann Intern Med* 1997;126:866-873.
190. Lawton JWM, Lee SS. Anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) in systemic lupus erythematosus. *Am J Kidney Dis* 1991;18: 200-201.

191. Lee SS, Lawton JWM, Chan CE, Li CS, Kwan TH, Chau KF. Antilactoferrin antibody in systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol* 1992;31: 669-673.
192. Puzner R, Urowitz M, Gladman D, Gough J. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1994;1670-1673.
193. Schnabel A, Csernok E, Isenberg DA, Mrowka C, Gross WL. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1995;38: 633-637.
194. Spronk PE, Bootsma H, Horst G, Huitema MG, Limburg PC, Cohen Tervaert JW, Kallenberg CG. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol* 1996;35: 625-631.
195. Nishiya K, Chikazawa H, Nishimura S, Hisakawa N, Hashimoto K. Anti-neutrophil cytoplasmic antibody in patients with systemic lupus erythematosus is unrelated to clinical features. *Clin Rheumatol* 1997;16: 70-75.
196. Nässberger L, Sjöholm AG, Jonsson H, Sturfelt G, Akesson A. Autoantibodies against neutrophil cytoplasm components in systemic lupus erythematosus and in hydralazine-induced lupus. *Clin Exp Immunol* 1990;81: 380-383.
197. Mulder L, van Rossum M, Horst G, Limburg P, de Graeff-Meeder ER, Kuis W, Kallenberg C. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in juvenile chronic arthritis. *J Rheumatol* 1997;24: 568-575.
198. Loch H, Peen E, Skogh T. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in reactive arthritis. *J Rheumatol* 1995;22: 2304-2306.
199. Akimoto S, Ishikawa O, Tamura T, Miyachi Y. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with systemic sclerosis. *Br J Dermatol* 1996;134: 407-410.
200. Duerr RH, Targan SR, Landers CJ, LaRusso NF, Lindsay KL, Wiesner RH, Shanahan F. Neutrophil cytoplasmic antibodies: a link between primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1991;100: 1385-1391.
201. Klein R, Eisenburg J, Weber P, Seibold P, Berg PA. Significance and specificity of antibodies to neutrophils detected by western blotting for the serological diagnosis of primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 1991;14: 1147-1152.
202. Lo SK, Fleming KA, Chapman RW. Prevalence of anti-neutrophil antibody in primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis using an alkaline phosphatase technique. *Gut* 1992;33: 1370-1375.

203. Seibold F, Weber P, Klein R, Berg PA, Wiedmann KH. Clinical significance of antibodies against neutrophils in patients with inflammatory bowel disease and primary sclerosing cholangitis. *Gut* 1992;33: 657-662.
204. Hardarson S, LaBrecque DR, Mitros FA, Neil GA, Goeken JA. Antineutrophil cytoplasmic antibody in inflammatory bowel and hepatobiliary diseases. *Am J Clin Pathol* 1993;99: 277-281.
205. Mulder AHL, Horst G, Haagsma EB, Limburg PC, Kleibeuker JH, Kallenberg CGM. Prevalence and characterization of neutrophil cytoplasmic antibodies in autoimmune liver diseases. *Hepatology* 1993;17: 411-417.
206. Lo SK, Chapman RW, Cheeseman P, Charlton CP, Walker-Smith JA, Mieli-Vergani G, Fleming KA. Antineutrophil antibody: a test for autoimmune primary sclerosing cholangitis in childhood ? *Gut* 1993;34: 199-202.
207. Claise C, Johanet C, Bouhnik Y, Kapel N, Homberg JC, Poupon R. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in autoimmune liver and inflammatory bowel diseases. *Liver* 1996;16: 28-34.
208. Bansi DS, Fleming KA, Chapman RW. Importance of antineutrophil cytoplasmic antibodies in primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis: prevalence, titre, and IgG subclass. *Gut* 1996;38: 384-389.
209. Peen E, Almer S, Bodemar G, Rydén BO, Sjölin C, Tejle K, Skogh T. Anti-lactoferrin antibodies and other types of ANCA in ulcerative colitis, primary sclerosing cholangitis, an Crohn's disease. *Gut* 1993;34: 56-62.
210. Orth T, Kellner R, Diekmann O, Faust J, Meyer Zum Büschenfelde KH, Mayet WJ. Identification and characterization of autoantibodies against catalase and α -enolase in patients with primary sclerosing cholangitis. *Clin Exp Immunol* 1998;112: 507-515.
211. Lo SK, Fleming KA, Chapman RW. A 2 year follow-up study of anti-neutrophil antibody in primary sclerosing cholangitis: relationship to clinical activity, liver biochemistry and ursodeoxycholic acid treatment. *J Hepatol* 1994;21: 974-978.
212. Pokorny CS, Norton ID, McCaughan GW, Selby WS. Anti-neutrophil cytoplasmic antibody: a prognostic indicator in primary sclerosing cholangitis. *J Gastroenterol Hepatol* 1994;9: 40-44.
213. Warny M, Brenard R, Cornu C, Tomasi JP, Geubel AP. Anti-neutrophil antibodies in chronic hepatitis and the effect of α -interferon therapy. *J Hepatol* 1993;17: 294-300.

214. Targan SR, Landers C, Vidrich A, Czaja AJ. High-titer antineutrophil cytoplasmic antibodies in type-1 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1995;108: 1159-1166.
215. Bansal DS, Fleming KA, Chapman RW. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1995;109: 2049-2050.
216. Zauli D, Ghetti S, Grassi A, Descovich C, Cassani F, Ballardini G, Muratori L, Bianchi FB. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in type 1 and 2 autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1997;25: 1105-1107.
217. Kellner R, Orth T, Mayet WJ. Characterization of target antigens from anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in autoimmune hepatitis type-1. *Electrophoresis* 1997;18: 507-510.
218. Orth T, Gerken G, Kellner R, Meyer Zum Büschenfelde KH, Mayet WJ. Actin is a target antigen of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in autoimmune hepatitis type-1. *J Hepatol* 1997;26: 37-47.
219. Malnick SD, Lurie Y, Fogel N, Cohen P, Geltner D, Bass DD. Chronic HCV hepatitis is associated with a high incidence of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies and anti-cardiolipin antibodies. *Hepatology* 1995;22: 352A.
220. Efthimiou J, Spickett G, Lane D, Thompson A. Antineutrophil cytoplasmic antibodies, cystic fibrosis, and infection. *Lancet* 1991;337: 1037-1038.
221. Gallicchio MC, Savige JA. Detection of anti-myeloperoxidase and anti-elastase antibodies in vasculitides and infections. *Clin Exp Immunol* 1991;84: 232-237.
222. Davenport A. "False positive" perinuclear and cytoplasmic anti-neutrophil cytoplasmic antibody results leading to misdiagnosis of Wegener's granulomatosis and/or microscopic polyarteritis. *Clin Nephrol* 1992;37:124-130.
223. Koderisch J, Andrassi K, Rasmussen N, Hartmann M, Tilgen W. "False-positive" anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in HIV infection. *Lancet* 1990;335: 1227-1228.
224. Klaassen RJJ, Goldschmeding R, Dolman KM, Vlekke ABJ, Weigel HM, Schattenkerk JKME, Mulder JW, Westedt ML, von dem Borne AEGKr. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies in patients with symptomatic HIV infection. *Clin Exp Immunol* 1992;87: 24-30.
225. Savige JA, Chang L, Crowe SM. Anti-neutrophil cytoplasm antibodies in HIV infection. *Adv Exp Med Biol* 1993;336: 349-352.

226. Savige JA, Chang L, Horn S, Crowe SM. Anti-nuclear, anti-neutrophil cytoplasmic and anti-glomerular basement membrane antibodies in HIV-infected individuals. *Autoimmunity* 1994;18: 205-211.
227. Pudifin DJ, Duursma J, Gathiram V, Jackson TFHG. Invasive amoebiasis is associated with the development of anti-neutrophil cytoplasmic antibody. *Clin Exp Immunol* 1994;97: 48-51.
228. Adebajo AO, Charles P, Maini RN, Hazleman BL. Autoantibodies in malaria, tuberculosis and hepatitis B in a West African population. *Clin Exp Immunol* 1993;92: 73-76.
229. Wenisch C, Wenisch H, Bankl HC, Exner M, Graninger W, Looareesuwan S, Rumpold H. Detection of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies after acute plasmodium falciparum malaria. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996;31: 132-134.
230. Yahya TM, Benedict S, Shalabi A, Bayoumi R. Anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) in malaria is directed against cathepsin G. *Clin Exp Immunol* 1997;110: 41-44.
231. Medina F, Camargo A, Moreno J, Zonana-Nacach A, Aceves-Avila J, Fraga A. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies in leprosy. *Br J Rheumatol* 1998;37: 270-273.
232. Galperin C, Shoenfeld Y, Gilburd B, Esterre P, Meroni PL, Del Papa N, Halpern GM, Andriantsimahavandy A, Gershwin ME. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in patients with chromomycosis. *Clin Exp Rheumatol* 1996;14: 479-483.
233. Milesi-Lecat AM, Aumaitre O, Deusebis T, Kaufman P, Tridon A, Cambon M, Marcheix JC. Semi-invasive diffuse pulmonary aspergillosis with antineutrophil cytoplasmic antibodies. 2 cases. *Ann Med Interne (Paris)* 1994;145: 140-146.
234. Stappaerts I, Bogers J, Ebo D, Vanden Broecke E, Stevens WJ, Van Marck E, Vermeire P. c-ANCA positivity in a Belgian patient with pulmonary paracoccidioidomycosis. *Eur Resp J* 1997;10: 2419-2422.
235. Byrd R, Hourany J, Cooper C, Roy TM. False-positive antineutrophil cytoplasmic antibodies in a patient with cavitary pulmonary sporotrichosis. *Am J Med* 1998;104: 101-103.
236. Schmitt WH, Csernok E, Gross WL. ANCA and infection. *Lancet* 1991;337: 1416-1417.

237. Mege JL, Escallier JC, Capo C, Bongrand P, Velut JG, Quiles N, Soubeyrand J, Durand JM. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) and infection. *Adv Exp Med Biol* 1993;336: 353-356.
238. Murphy EA, McVie A, Galbraith I, Capell HA. Antineutrophil cytoplasmic antibody titres in patients with recent infection. *Br J Rheumatol* 1993;32: 941-942.
239. Finnegan MJ, Hinchcliffe J, Russell-Jones D, Neill S, Sheffield E, Jayne D, Wise A, Hodson ME. Vasculitis complicating cystic fibrosis. *Q J Med* 1989;267: 609-621.
240. Zhao MH, Jayne DRW, Ardiles LG, Culley F, Hodson ME, Lockwood CM. Autoantibodies against bactericidal/permeability-increasing protein in patients with cystic fibrosis. *Q J Med* 1996;89: 259-265.
241. Sedivá A, Bartunková J, Kolarová I, Hrusák O, Vávrová V, Macek jr M, Lockwood CM, Dunn AC. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in children with cystic fibrosis. *J Autoimmunity* 1998;11: 185-190.
242. Jayne DRW, Marshall PD, Jones SJ, Lockwood CM. Autoantibodies to GMB and neutrophil cytoplasm in rapidly progressive glomerulonephritis. *Kidney Int* 1990;37: 965-970.
243. Bosch X, Mirapeix E, Font J, Borrellas X, Rodriguez R, Lopes-Soto A, Ingelmo M, Revert L. Prognostic implication of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with myeloperoxidase specificity in anti-glomerular basement membrane disease. *Clin Nephrol* 1991;36: 107-113.
244. Niles JL, Böttinger EP, Saurina GR, Kelly KJ, Pan GL, Collins AB, McCluskey RT. The syndrome of lung hemorrhage and nephritis is usually an ANCA-associated condition. *Arch Intern Med* 1996;156: 440-445.
245. Westman KWA, Bygren PG, Eilert I, Wiik A, Wieslander J. Rapid screening assay for anti-GBM antibody and ANCAs; an important tool for the differential diagnosis of pulmonary renal syndromes. *Nephrol Dial Transplant* 1997;12: 1863-1868.
246. Hellmark T, Niles JL, Collins AB, McCluskey RT, Brunmark C. Comparison of anti-GBM antibodies in sera with or without ANCA. *J Am Soc Nephrol* 1997;8: 376-385.
247. Kemmett D, Harrison DJ, Hunter JA. Antibodies to neutrophil cytoplasmic antigens: serologic marker for Sweet's syndrome. *J Am Acad Dermatol* 1991;24: 967-969.

248. Allmaras E, Nowack R, Andrassy K, Waldherr R, van der Woude F, Ritz E. Rapidly progressive IgA nephropathy with anti-myeloperoxidase antibodies benefits from immunosuppression. *Clin Nephrol* 1997;48: 269-273.
249. Ramirez SB, Rosen S, Niles J, Somers MJG. IgG antineutrophil cytoplasmic antibodies in IgA nephropathy: a clinical variant ? *Am J Kidney Dis* 1998;31: 341-344.
250. Mezzano S, Valderrama G, Olavarria F, Ardiles L, Arriagada A, Castillo A, Caorsi I. Antineutrophil-cytoplasmic-autoantibodies in poststreptococcal nephritis. *Adv Exp Med Biol* 1993;336: 449-453.
251. Ardiles LG, Valderrama G, Moya P, Mezzano SA. Incidence and studies on antigenic specificities of antineutrophil-cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in poststreptococcal glomerulonephritis. *Clin Nephrol* 1997;47: 1-5.
252. Savige JA, Chang L, Smith CL, Duggan JC. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in myelodysplasia and other haematologic disorders. *Aust N Z Med* 1994;24: 282-287.
253. Hull DR, McMillan SA, Rea IM, Boyd N, McMullin MF. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in myelodysplasia. *Ulster med J* 1996;65: 55-57.
254. Pietravalle P, Monteleone G, Morano S, Cristina G, De Rossi MG, Sagratella E, Biancone L, Parrello T, Oliva A, Pallone F, Di Mario U. Antineutrophil cytoplasmic antibodies are present in long standing type 1 diabetics but not correlate with selective proteinuria. *J Autoimmunity* 1996;9: 113-117.
255. Hagen EC, van de Vijver-Reenalda H, De Keizer RJW, Kijlstra A, Van Es LA, Daha MR, van der Woude FJ. Uveitis and anti-neutrophil cytoplasmic antibodies. *Clin Exp Immunol* 1994;95: 56-59.
256. Gordon LK, Eggena M, Holland GN, Weisz JM, Braun J. pANCA antibodies in patients with anterior uveitis: identification of a marker antibody usually associated with ulcerative colitis. *J Clin Immunol* 1998;18: 264-271.
257. Shaarawy M, el-Mallah Y, el-Yamani AM. The prevalence of serum antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in preeclampsia and eclampsia. *J Soc Gynecol Investig* 1997;4: 34-39.
258. Kaplan-Pavlovic S, Vizjak A, Vene N, Ferluga D. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in atheroembolic disease. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13: 985-987.

259. Afeltra A, Paggi A, De Rosa FG, Manfredini P, Addessi MA, Amoroso A. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in autoimmune thyroid disorders. *Endocr Res* 1998;24: 185-194.
260. Wichmann I, Sanchez-Roman J, Morales J, Castillo MJ, Ocaña C, Nuñez-Roldan A. Antimyeloperoxidase antibodies in individuals with occupational exposure to silica. *Ann Rheum Dis* 1996;55: 205-207.
261. Mirapeix E. Anticuerpos anticitoplasmáticos del neutrófilo (ANCA). Su contribución en la patogenia de las vasculitis. *Med Clin (Barc)* 1998;110: 778-780.
262. Falk RJ, Terrell RS, Charles LA, Jennette JC. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87: 4115-4119.
263. Keogan MT, Rifkin I, Lockwood CM, Brown DL. Antineutrophil cytoplasm autoantibodies increase neutrophil adhesion to cultured human endothelium. *Adv Exp Med Biol* 1993;336: 115-119.
264. Ewert BH, Jennette JC, Falk RJ. Anti-myeloperoxidase antibodies stimulate neutrophils to damage human endothelial cells. *Kidney Int* 1992;41: 375-383.
265. Savage CO, Pottinger BE, Gaskin G, Pusey CD, Pearson JD. Autoantibodies developing to myeloperoxidase and proteinase 3 in systemic vasculitis stimulate neutrophil cytotoxicity towards cultured endothelial cells. *Am J Pathol* 1992;141: 335-342.
266. Vargunam M, Adu D, Taylor CM, Michael J, Richards N, Neuberger J, Thompson RA. Endothelium myeloperoxidase-antimyeloperoxidase interaction in vasculitis. *Nephrol Dial Transplant* 1995;7: 1077-1081.
267. Ewert BH, Jennette JC, Falk RJ. The pathogenic role of antineutrophil cytoplasmic autoantibodies. *Am J Kid Dis* 1991;18: 188-195.
268. Casselman BL, Kilgore KS, Miller BF, Warren JS. Antibodies to neutrophil cytoplasmic antigens induce monocyte chemoattractant protein-1 secretion from human monocytes. *J Lab Clin Med* 1995;126: 495-502.
269. Ralston DR, Marsh CB, Lowe MP, Wewers MD. Antineutrophil cytoplasmic antibodies induce monocyte IL-8 release. Role of surface proteinase-3, α 1-antitrypsin, and fcy receptors. *J Clin Invest* 1997;100: 1416-1424.

270. Savage COS, Gaskin G, Pusey CD. Anti-neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA) can recognize vascular endothelial cell-bound ANCA-associated autoantigens. *J Exp Nephrol* 1993;1: 190-195.
271. Mayet WJ, Csernok E, Szymkowiak C, Gross WL, Meyer Zum Buschenfelde KH. Human endothelial cells express proteinase 3, the target antigen of anticytoplasmic antibodies in Wegener's granulomatosis. *Blood* 1993;82: 1221-1229.
272. Ballieux BEPB, Hiemstra PS, Klar-Mohamad N, Hagen EC, Van Es LA, van der Woude FJ, Daha MR. Detachment and cytolysis of human endothelial cells by proteinase 3. *Eur J Immunol* 1994;24: 3211-3215.
273. Mayet WJ, Schwarting A, Meyer Zum Buschenfelde KH. Cytotoxic effects of antibodies to proteinase 3 (C-ANCA) on human endothelial cells. *Clin Exp Immunol* 1993;97: 458-465.
274. Petersen J, Rasmussen N, Szpirt W, Hermann E, Mayet W. T lymphocyte proliferation to neutrophil cytoplasmic antigen(s) in Wegener's granulomatosis (WG). *Am J Kidney Dis* 1991;18: 205-209.
275. Brouwer E, Stegeman CA, Huitema MG, Limburg PC, Kallenberg CGM. T-cell reactivity to proteinase 3 and myeloperoxidase in patients with Wegener's granulomatosis. *Clin Exp Immunol* 1994;98: 448-453.
276. Griffith ME, Coulthart A, Pusey CD. T cell responses to myeloperoxidase (MPO) and proteinase 3 (Pr3) in patients with systemic vasculitis. *Clin Exp Immunol* 1996;103: 253-258.
277. King WJ, Brooks CJ, Holder R, Hughes P, Adu D, Savage COS. T lymphocyte responses to anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody (ANCA) antigens are present in patients with ANCA-associated systemic vasculitis and persist during disease remission. *Clin Exp Immunol* 1998;112: 539-546.
278. Van der Wiel BA, Dolman KM, van der Meer-Gerritsen CH, Hack CE, von dem Borne AEGK, Goldschmeding R. Interference of Wegener's granulomatosis autoantibodies with neutrophil proteinase 3 activity. *Clin Exp Immunol* 1992;90: 409-414.
279. Dolman KM, Stegeman CA, van der Wiel BA, Hack CE, von dem Borne AEGK, Kallenberg CGM, Goldschmeding R. Relevance of classic anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody (c-ANCA)-mediated inhibition of proteinase 3-alpha-1-antitrypsin complexation to disease activity in Wegener's granulomatosis. *Clin Exp Immunol* 1993;93: 405-410.

280. Daouk GH, Palsson R, Arnaout MA. Inhibition of proteinase 3 by ANCA and its correlation with disease activity in Wegener's granulomatosis. *Kidney Int* 1995;47: 1528-1536.
281. Segelmark M, Elzouki AN, Wieslander J, Eriksson S. The PiZ gene of α_1 -antitrypsin as a determinant of outcome in PR3-ANCA-positive vasculitis. *Kidney Int* 1995;48: 844-850.
282. Griffith ME, Lovegrove JU, Gaskin G, Whitehouse DB, Pusey CD. C-antineutrophil cytoplasmic antibody positivity in vasculitis patients is associated with Z allele of alpha-1-antitrypsin, and P-antineutrophil cytoplasmic antibody with the S allele. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11: 438-443.
283. Heeringa P, Brouwer E, Cohen Tervaert JW, Weening JJ, Kallenberg CGM. Animal models of anti-neutrophil cytoplasmic antibody associated vasculitis. *Kidney Int* 1998;53: 253-263.
284. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998;115: 182-205.
285. Duerr RH, Targan SR, Landers CJ, Sutherland LR, Shanahan F. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in ulcerative colitis: comparison with other colitides/diarrheal illnesses. *Gastroenterology* 1991;100: 1590-1596.
286. Cambridge G, Rampton DS, Stevens TRJ, McCarthy DA, Kamm M, Leaker B. Anti-neutrophil antibodies in inflammatory bowel disease: prevalence and diagnostic role. *Gut* 1992;33: 668-674.
287. Romas E, Paspaliaris B, d'Apice AJF, Elliott PR. Autoantibodies to neutrophil cytoplasmic (ANCA) and endothelial cell surface antigens (AECA) in chronic inflammatory bowel disease. *Aust NZ J Med* 1992;22: 652-659.
288. Colombel J-F, Reumaux D, Duthilleul P, Noël LH, Gower-Rousseau C, Paris JC, Cortot A. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterol Clin Biol* 1992;16: 656-660.
289. Dalekos GN, Manoussakis MN, Goussia AC, Tsianos EV, Moutsopoulos HM. Soluble interleukin-2 receptors, antineutrophil cytoplasmic antibodies, and other autoantibodies in patients with ulcerative colitis. *Gut* 1993;34: 658-664.

290. Oudkerk Pool M, Ellerbroek PM, Ridwan BU, Goldschmeding R, von Blomberg BME, Peña AS, Dolman KM, Bril H, Dekker W, Nauta JJ, Gans ROB, Breed H, Meuwissen SGM. Serum antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease are mainly associated with ulcerative colitis. A correlation study between perinuclear antineutrophil cytoplasmic autoantibodies and clinical parameters, medical, and surgical treatment. *Gut* 1993;34: 46-50.
291. Deusch K, Oberstadt K, Schaedel W, Weber M, Classen M. P-ANCA as a diagnostic marker in ulcerative colitis. *Adv Exp Med Biol* 1993;336: 527-531.
292. Mulder AHL, Broekroelofs J, Horst G, Limburg PC, Nelis GF, Kallenberg CGM. Antineutrophil antibodies in inflammatory bowel disease recognize different antigens. *Adv Exp Med Biol* 1993;336: 519-522.
293. Rump JA, Wörner I, Roth M, Schölmerich J, Hänsch M, Peter HH. P-ANCA of undefined specificity in ulcerative colitis: correlation to disease activity and therapy. *Adv Exp Med Biol* 1993;336: 507-513.
294. Sung JY, Chan KL, Hsu R, Liew CT, Lawton JWM. Ulcerative colitis and cytoplasmic antibodies in Hong Kong Chinese. *Am J Gastroenterol* 1993;88: 864-869.
295. Broekroelofs J, Mulder AHL, Nelis GF, Westerveld BD, Cohen Tervaert JW, Kallenberg CGM. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in sera from patients with inflammatory bowel disease (IBD). *Dig Dis Sci* 1994;39: 545-549.
296. Oudkerk Pool M, Roca M, Reumaux D, Bouma G, Peña AS, Colombel J-F, von Blomberg BME, Meuwissen SGM. The value of pANCA as a serological marker for ulcerative colitis in different european regions. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1994;6: 399-403.
297. Patel RT, Pall AA, Stokes R, Birch D, Hail C, Adu D, Keighley MRB. Autoantibody prevalence and association in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1994;6: 705-709.
298. Vecchi M, Bianchi MB, Sinico RA, Radice A, Meucci G, Torgano G, Omodei P, Forzenigo L, Landoni M, Arrigoni M, Pozzi C, de Franchis R. Antibodies to neutrophil cytoplasm in Italian patients with ulcerative colitis: sensitivity, specificity and recognition of putative antigens. *Digestion* 1994;55: 34-39.
299. Lamproye A, Belaiche J, Louis E, Salmon J, Mahieu P. Anticorps anticytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA) dans les maladies inflammatoires du tube digestif. *Acta Gastroenterol Belg* 1994;57: 171-176.

300. Mulder AHL, Broekroelofs J, Horst G, Limburg PC, Nelis GF. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in inflammatory bowel disease: characterization and clinical correlates. *Clin Exp Immunol* 1994;95: 490-497.
301. Sung JY, Chan FKL, Lawton J, Leung JCK, Liew CT, Leung NWY, Hsu R, Lai KN. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) and inflammatory bowel diseases in Chinese. *Dig Dis Sci* 1994;39: 886-892.
302. Muñoz C, Gómez R, Alcántara M, Martínez JL, Artaza T, Flores V, Tordera FJ, Martínez J. Serum anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in ulcerous colitis: clinical utility (resumen). *Gut* 1994;35 (supl 4): A30.
303. Tural C. Anticuerpos anti-citoplasma de los neutrófilos y enfermedad inflamatoria intestinal (Tesis doctoral). Barcelona: Universitat Autònoma, 1994.
304. Castellino F, Rosina F, Bansi DS, Bauducci M, Touscoz GA, Giorda L, Borghesio E, Bessone MP, Astegiano M, Musso A, Maina AM, Mattalia A, Bonino F, Fleming K, Chapman R, Verme G, Pera A. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease: do they recognize different subsets of a heterogeneous disease? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995;7: 859-864.
305. Kossa K, Coulthart A, Ives CT, Pusey CD, Hodgson HJF. Antigen specificity of circulating anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995;7: 783-789.
306. Hertervig E, Wieslander J, Johansson C, Wiik A, Nilsson A. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in chronic inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1995;30: 693-698.
307. Schumacher G, Kollberg B, Sandstedt B, Ljungh A, Nässberger L. Circulating granulocyte antibodies in first attacks of colitis. *Scand J Gastroenterol* 1995;30: 157-163.
308. Oudkerk Pool M, Bouma G, Meuwissen SGM, von Blomberg BME, van de Merwe JP, Devillé WLJM, Fonk JCM, Peña AS. Serological markers to differentiate between ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Clin Pathol* 1995;48: 346-350.
309. Kim WH, Choi PM, Landers CJ, Targan SR. Role of antineutrophil cytoplasmic antibodies in an ethnically distinct population: Korean patients with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1995;90: 1953-1958.
310. Eliakim R, Naparstek Y, Stalnikowicz R, Ulmansky R, Rachmilewitz D. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in IBD are the same in Ashkenazi and Sephardi jews in Israel. *J Clin Gastroenterol* 1995;20: 82-84.

311. Bansi DS, Chapman RW, Fleming KA. Prevalence and diagnostic role of antineutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996;8: 881-885.
312. Andreani ML, Frasca G, Brusco G, Borgnino L, Biagi F, Gasbarrini G, Corazza GR. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease: diagnostic tool or research procedure? *Ann Ital Med Int* 1996;11: 254-257.
313. Sugi K, Saitoh O, Matsuse R, Uchida K, Nakagawa K, Kozima K, Yoshizumi M, Maemura K, Hirata I, Katsu K. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in Japanese patients with inflammatory bowel disease (IBD): prevalence and recognition of putative antigens. *Gastroenterology* 1996;110: A1021.
314. Vasiliauskas EA, Plevy SE, Landers CJ, Binder SW, Ferguson DM, Yang H, Rotter JJ, Vidrich A, Targan SR. Perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with Crohn's disease define a clinical subgroup. *Gastroenterology* 1996;110:1810-1819.
315. Habeeb MA, Rajalingam R, Dhar A, Kumar A, Sharma MP, Mehra NK. HLA association and occurrence of autoantibodies in Asian-Indian patients with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1997;92: 772-776.
316. Freeman H, Roeck B, Devine D, Carter C. Prospective evaluation of neutrophil autoantibodies evaluation in 500 consecutive patients with inflammatory bowel disease. *Can J Gastroenterol* 1997;11: 203-207.
317. Freeman H. Inflammatory bowel disease with cytoplasmic-staining antineutrophil cytoplasmic antibody and extensive colitis. *Can J Gastroenterol* 1998;12: 279-282.
318. García Herola A, Nos P, Hoyos M, Hinojosa J, Molés JR, Pascual S, Bustamante M, Sánchez Cuenca JM, Carmona E, Ponce J, Berenguer J. Significado de la determinación de anticuerpos frente al citoplasma de los neutrófilos (ANCA) en la colitis ulcerosa y en la enfermedad de Crohn. *Gastroenterol Hepatol* 1998;21: 169-173.
319. Halbwachs-Mecarelli L, Nusbaum P, Noël LH, Reumaux D, Erlinger S. Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) directed against cathepsin G in ulcerative colitis, Crohn's disease and primary sclerosing cholangitis. *Clin Exp Immunol* 1992;90: 79-84.
320. Ellerbroek PM, Oudkerk Pool M, Ridwan BU, Dolman KM, von Blomberg BME, von dem Borne AEGKr, Meuwissen SGM, Goldschmeding R. Neutrophil cytoplasmic antibodies (p-ANCA) in ulcerative colitis. *J Clin Pathol* 1994;47: 257-262.

321. Sobajima J, Ozaki S, Okazaki T, Osakada F, Sumita S, Mori K, Nakao K. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in ulcerative colitis: anti-cathepsin G and a novel antibody correlate with a refractory type. *Clin Exp Immunol* 1996;105: 120-124.
322. Stoffel MP, Csernok E, Herzberg C, Johnston T, Carroll F, Gross W. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) directed against bactericidal/permeability increasing protein (BPI): a new seromarker for inflammatory bowel disease and associated disorders. *Clin Exp Immunol* 1996;104: 54-59.
323. Walmsley RS, Zhao MH, Hamilton MI, Brownlee A, Chapman P, Pounder RE, Wakefield AJ, Lokwood CM. Antineutrophil cytoplasm autoantibodies against bactericidal/permeability increasing protein in inflammatory bowel disease. *Gut* 1997;40: 105-109.
324. Roozendaal C, Zhao MH, Horst G, Lockwood CM, Kleibeuker JH, Limburg PC. Catalase and α -enolase: two novel granulocyte autoantigens in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 1998;112: 10-16.
325. Yang P, Bohr J, Tysk C, Danielson D, Järnerot G. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease and collagenous colitis: no association with lactoferrin, β -glucuronidase, myeloperoxidase, or proteinase 3. *Inflamm Bowel Dis* 1996;2: 173-177.
326. Billing P, Tahir S, Calfin B, Gagne G, Cobb L, Targan S, Vidrich A. Nuclear localization of the antigen detected by ulcerative colitis-associated perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Am J Pathol* 1995;147: 979-987.
327. Vidrich A, Lee J, James E, Cobb L, Targan S. Segregation of pANCA antigenic recognition by DNase treatment of neutrophils: ulcerative colitis, type 1 autoimmune hepatitis, and primary sclerosing cholangitis. *J Clin Immunol* 1995;15: 293-299.
328. Terjung B, Herzog V, Worman HJ, Gestmann I, Bauer C, Sauerbruch T, Spengler U. Atypical antineutrophil cytoplasmic antibodies with perinuclear fluorescence in chronic inflammatory bowel diseases and hepatobiliary disorders colocalize with nuclear lamina proteins. *Hepatology* 1998;28: 332-340.
329. Cameron BJ, Bansal DS, Ali R, Chapman RW, Fleming KA. Characterization of the antigen for the anti-neutrophil cytoplasmic antibody specific for primary sclerosing cholangitis (PSC)/ulcerative colitis (UC). *Gastroenterology* 1998;114: A1218.
330. Mallolas J, Esteve M, Rius E, Cabré E, Gassull MA. Anti-neutrophil antibodies (ANCA) associated to ulcerative colitis interact with a nuclear antigen during the process of apoptosis. *Gastroenterology* 1998;114: A1031.

331. Eggena M, Targan SR, Iwanczyk L, Vidrich A, Gordon LK, Braun J. Phage display cloning and characterization of an immunogenetic marker (perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibody) in ulcerative colitis. *J Immunol* 1996;156: 4005-4011.
332. Cohavy O, Eggena M, Parseghian M, Hamkalo B, Targan SR, Gordon LK, Braun J. Histone H-1, a candidate p-ANCA antigen in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1997;112: A951.
333. Müller-Ladner U, Gross V, Andus T, Gschwendtner H, Roth M, Caesar I, Schölmerich J, Lang B. Distinct patterns of immunoglobulin classes and IgG subclasses of autoantibodies in patients with inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996;8: 579-584.
334. Seibold F, Weber P, Schöning A, Mörk H, Goppel S, Scheurlen M. Neutrophil antibodies (pANCA) in chronic liver disease and inflammatory bowel disease: do they react with different antigens ? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996;8: 1095-1100.
335. Gigase P, de Clerck LS, van Cotthem KA, Bridts CH, Stevens WJ, van Outryve M, Pelckmans PA. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease with special attention for IgA-class antibodies. *Dig Dis Sci* 1997;42: 2171-2174.
336. Esteve M, Mallolas J, Klaassen J, Abad-Lacruz A, González-Huix F, Cabré E, Fernández-Bañares F, Menacho M, Condom E, Martí-Ragué J, Gassull MA. Factors related to the presence of IgA class antineutrophil cytoplasmic antibodies in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1998;93: 615-618.
337. Proujansky R, Fawcett PT, Gibney KM, Treem WR, Hyams JS. Examination of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in childhood inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993;17: 193-197.
338. Winter HS, Landers CJ, Winkelstein A, Vidrich A, Targan SR. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in children with ulcerative colitis. *J Pediatr* 1994;125: 707-711.
339. Kaneko K, Suzuki Y, Shimizu T, Yamashiro Y, Yabuta K, Lifschitz CH. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in Japanese children with ulcerative colitis. *J Paediatr Child Health* 1995;31: 336-338.
340. Olives JP, Breton A, Hugot JP, Oksman F, Johannet C, Ghisolfi J, Navarro J, Cezard JP. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in children with inflammatory bowel disease: prevalence and diagnostic value. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997;25: 142-148.
341. Ruummele FM, Targan SR, Levy G, Dubinsky M, Braun J, Seidman EG. Diagnostic accuracy of serological assays in pediatric inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1998;115: 822-829.

342. Reumaux D, Colombel JF, Duclos B, Chaussade S, Belaiche J, Jacquot S, Dupas JL, Molis C, Duthilleul P. Antineutrophil cytoplasmic auto-antibodies in sera from patients with ulcerative colitis after proctocolectomy with ileo-anal anastomosis. *Adv Exp Med Biol* 1993;336: 523-525.
343. Patel RT, Stokes R, Birch D, Ibbotson J, Keighley MRB. Influence of total colectomy on serum antineutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease. *B J Surg* 1994;81: 724-726.
344. Vecchi M, Gionchetti P, Bianchi MB, Belluzzi A, Meucci G, Campieri M, de Franchis R. p-ANCA and development of pouchitis in ulcerative colitis patients after proctocolectomy and ileal pouch anastomosis. *Lancet* 1994;344: 886-887.
345. Sandborn WJ, Landers CJ, Tremaine WJ, Targan SR. Antineutrophil cytoplasmic antibody correlates with chronic pouchitis after ileal pouch-anal anastomosis. *Am J Gastroenterol* 1995; 90:740-747.
346. Aisenberg J, Wagraich J, Shim J, Almer S, Peen E, Heimann T, Gelernt IM, Greenstein A, Rubin P, Harpaz N, Mayer L, Sachar D. Perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibody and refractory pouchitis. *Dig Dis Sci* 1995;40: 1866-1872.
347. Zins BJ, Sandborn WJ, Penna CR, Landers CJ, Targan SR, Tremaine WJ, Wiesner RH, Dozois RR. Pouchitis disease course after orthotopic liver transplantation in patients with primary sclerosing cholangitis and ileal pouch-anal anastomosis. *Am J Gastroenterol* 1995;90: 2177-2181.
348. Yang P, Öresland T, Järnerot G, Hultén L, Danielsson D. Perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibody in pouchitis after proctocolectomy with ileal pouch-anal anastomosis for ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 1996;31: 594-598.
349. Freeman HJ, Roeck B, Devine DV, Carter CJ. Atypical perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies after colectomy in inflammatory bowel disease. *Can J Gastroenterol* 1997;11: 305-310.
350. Kaditis AG, Perrault J, Sandborn WJ, Landers CJ, Zinsmeister AR, Targan SR. Antineutrophil cytoplasmic antibodies subtypes in children and adolescents after ileal pouch-anal anastomosis for ulcerative colitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998;26: 386-392.
351. Yasuda N, Thomas P, Ellis H, Herbst F, Nicholls J, Ciclitira P. Perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in ulcerative colitis after restorative proctocolectomy do not correlate with the presence of pouchitis. *Scand J Gastroenterol* 1998;33: 509-513.

352. Esteve M, Mallolas J, Klaassen J, Abad-Lacruz A, González-Huix F, Cabré E, Fernández-Bañares F, Bertrán X, Condom E, Martí-Ragué J, Gassull MA. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in sera from colectomised ulcerative colitis patients and its relation to the presence of pouchitis. *Gut* 1996;38: 894-898.
353. Aitola P, Miettinen A, Mattila A, Matikainen M, Soppi E. Effect of proctocolectomy on serum antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with chronic ulcerative colitis. *J Clin Pathol* 1995;48: 645-647.
354. Gionchetti P, Vecchi M, Rizzello F, Ferretti M, Calabresi C, Venturi A, Bianchi MB, Brignola C, Sinico RA, De Franchis R, Miglioli M, Campieri M. Lack of effect of antineutrophil cytoplasmic antibodies associated with ulcerative colitis on superoxide anion production from neutrophils. *Gut* 1997;40: 102-104.
355. Mizoguchi E, Mizoguchi A, Chiba C, Niles JL, Bhan AK. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in T-cell receptor α -deficient mice with chronic colitis. *Gastroenterology* 1997;113: 1828-1835.
356. Seibold F, Brandwein S, Simpson S, Terhorst C, Elson CO. pANCA represents a cross-reactivity to enteric bacterial. *J Clin Immunol* 1998;18: 153-160.
357. Targan SR, Landers CJ, Cobb L, MacDermott RP, Vidrich A. Perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies are spontaneously produced by mucosal B cells of ulcerative colitis patients. *J Immunol* 1995;155: 3262-3267.
358. Shanahan F. Neutrophil autoantibodies in inflammatory bowel disease: Are they important? *Gastroenterology* 1994;107: 586-589.
359. Freeman H. Atypical perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with Crohn's disease. *Can J Gastroenterol* 1997;11: 689-693.
360. Peeters M, Rutgeerts P, Cheyns K, Baert F, D'Haens G, Vlietinck R. Presence of pANCA in Crohn's patients with "UC-like" clinical phenotype is related to disease activity. *Gastroenterology* 1997;112: A1060.
361. Jamar-Leclerc N, Reumaux D, Duthilleul P, Colombel JF. Do pANCA define a clinical subgroup in patients with Crohn's disease? *Gastroenterology* 1997;112: 316-317.
362. Shanahan F, Duerr RH, Rotter JJ, Yang H, Sutherland LR, McElree C, Landers CJ, Targan SR. Neutrophil autoantibodies in ulcerative colitis: familial aggregation and genetic heterogeneity. *Gastroenterology* 1992;103: 456-461.

363. Seibold F, Slametschka D, Gregor M, Weber P. Neutrophil autoantibodies: A genetic marker in primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1994;107: 532-536.
364. Reumaux D, Colombel J-F, Delecourt L, Noël L-H, Cortot A, Duthilleul P. Anti-neutrophil cytoplasmic auto-antibodies (ANCA) in patients with ulcerative colitis (UC): influence of disease activity and familial study. *Adv Exp Med Biol* 1993;336: 515-518.
365. Monteleone G, Marasco R, Parrello T, De Medici A, Giglio A, Doldo P, Luzza F, Pallone F. Low prevalence of p-ANCA in unaffected relatives of patients with ulcerative colitis from a mediterranean area. *Inflamm Bowel Dis* 1996;2: 11-15.
366. Lee JCW, Lennard-Jones JE, Cambridge G. Antineutrophil antibodies in familial inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995;108: 428-433.
367. Bansi DS, Lo S, Chapman RW, Fleming KA. Absence of antineutrophil cytoplasmic antibodies in relatives of UK patients with primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996;8;111-116.
368. Yang H, Rotter JJ, Toyoda H, Landers C, Tyan D, McElree CK, Targan SR. Ulcerative colitis: a genetically heterogeneous disorder defined by genetic (HLA class II) and subclinical (antineutrophil cytoplasmic antibodies) markers. *J Clin Invest* 1993;92: 1080-1084.
369. Yang H, Vora DK, Targan SR, Toyoda H, Beaudet AL, Rotter JJ. Intercellular adhesion molecule 1 gene associations with immunologic subsets of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995;109: 440-448.
370. Perri F, Annese V, Piepoli A, Napolitano G, Lombardi G, Ciavarella G, Di Giorgio G, Andriulli A. HLA antigens and pANCA define ulcerative colitis as a genetically heterogeneous disorder. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1998;30: 56-61.
371. Heresbach D, Alizadeh M, Reumaux D, Colombel JF, Delamaire M, Danze PM, Gosselin M, Genetet B, Bretagne JF, Semana G. Are HLA-DR or TAP genes genetic markers of severity in ulcerative colitis ? *J Autoimmun* 1996;9: 777-784.
372. Duerr RH, Neigut DA. Molecularly defined HLA-DR2 alleles in ulcerative colitis and an antineutrophil cytoplasmic antibody-positive subgroup. *Gastroenterology* 1995;108: 423-427.
373. Bioque G, Bouma G, Crusius JBA, Koutroubakis I, Kostense PJ, Meuwissen SGM, Peña AS. Evidence for genetic heterogeneity in IBD: The interleukin-1 receptor antagonist in the predisposition to suffer from ulcerative colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996;8: 105-110.

374. Satsangi J, Landers CJ, Welsh KI, Koss K, Targan S, Jewell DP. The presence of anti-neutrophil antibodies reflects clinical and genetic heterogeneity within inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 1998;4: 18-26.
375. Yang H, Rotter JI. Genetics of inflammatory bowel disease. In: Targan S, Shanahan F, eds. *Inflammatory bowel disease: from bench to bedside*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994: 32-64.
376. Russel MGVM, Stockbrügger RW. Epidemiology of inflammatory bowel disease: an update. *Scand J Gastroenterol* 1996;31:417-427.
377. Sandler RS. Epidemiology of inflammatory bowel disease. In: Targan S, Shanahan F, eds. *Inflammatory bowel disease: from bench to bedside*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994: 5-30.
378. Rotter JI, Yang H, Shohat T. Genetic complexities of inflammatory bowel disease and its distribution among the Jewish people. In: Bonne-Tamir B, Adam A, eds. *Genetic diversity among Jews: diseases and markers at the DNA level*. New York: Oxford University Press 1992; 395-411.
379. Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sorensen TIA, Binder V. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 1991;324: 84-88.
380. Yang H, McElree C, Roth M-P, Shanahan F, Targan SR, Rotter JI. Familial empirical risks for inflammatory bowel disease: differences between Jews and non-Jews. *Gut* 1993;34: 517-524.
381. Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G, Floderus-Myrhed B. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* 1988;29: 990- 996.
382. Thompson NP, Driscoll R, Pounder RE, Wakefield AJ: Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. *BMJ* 1996;312: 95-96.
383. Parkes M, Satsangi J, Jewell D. Mapping susceptibility loci in inflammatory bowel disease: why and how ? *Mol Med Today* 1997;3: 546-553.
384. Peña AS, Crusius JBA. Genetics of inflammatory bowel disease: implications for the future. *World J Sug* 1998;22: 390-393.
385. Satsangi J, Parkes M, Jewell DP, Bell JI. Genetics of inflammatory bowel disease. *Clin Sci (Colch)* 1998;94: 473-478.

386. Satsangi J, Grootsholten C, Holt H, Jewell DP. Clinical patterns of familial inflammatory bowel disease. *Gut* 1996;38: 738-741.
387. Bayless TM, Tokayer AZ, Polito JM II, Quaskey SA, Mellits ED, Harris ML. Crohn's disease: concordance for site and clinical type in affected family members-potential hereditary influences. *Gastroenterology* 1996;111: 573-579.
388. Polito JM II, Childs B, Mellits ED, Tokayer AZ, Harris ML, Bayless TM. Crohn's disease: influence of age at diagnosis on site and clinical type of disease. *Gastroenterology* 1996;111: 580-586.
389. Peeters M, Nevens H, Baert F, Hiele M, De Meyer AM, Vlietinck R, Rutgeerts P. Familial aggregation in Crohn's disease: increased age-adjusted risk and concordance in clinical characteristics. *Gastroenterology* 1996;111: 597-603.
390. Colombel JF, Grandbastien B, Gower-Rousseau C, Plegat S, Evrard JP, Dupas JL, Gendre JP, Modigliani R, Bélaïche J, Hostein J, Hugot JP, van Kruiningen H, Cortot A. Clinical characteristics of Crohn's disease in 72 families. *Gastroenterology* 1996;111: 604-607.
391. Cottone M, Brignola C, Rosselli M, Oliva L, Belloli C, Cipolla C, Orlando A, De Simone G, Aiala MR, Di Mitri R, Gatto G, Buccellato A. Relationship between site of disease and familial occurrence in Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1997;42: 129-132.
392. Heresbach D, Alizadeh M, Bretagne JF, Dabadie A, Colombel JF, Pagenault M, Heresbach-Le Berre N, Genetet B, Gosselin M, Semana G. TAP gene transporter polymorphism in inflammatory bowel diseases. *Scand J Gastroenterol* 1997;32: 1022-1027.
393. Bouma G, Poen AC, Garcia-Gonzalez MA, Schreuder GMT, Felt-Bersma RJF, Meuwissen SGM, Peña AS. HLA-DRB1*03, but not the TNFA -308 promoter gene polymorphism, confers protection against fistulising Crohn's disease. *Immunogenetics* 1998;47: 451-455.
394. Masuda H, Nakamura Y, Tanaka T, Hayakawa S. Distinct relationship between HLA-DR genes and intractability of ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1994;89: 1957-1962.
395. Futami S, Aoyama N, Honsako Y, Tamura T, Morimoto S, Nakashima T, Ohmoto A, Okano H, Miyamoto M, Inaba H, Naruse T, Nose Y, Kasuga M. HLA-DRB1*1502 allele, subtype of DR15 is associated with susceptibility to ulcerative colitis and its progression. *Dig Dis Sci* 1995;40: 814-818

396. Bouma G, Oudkerk Pool M, Crusius JBA, Schreuder GMTH, Hellemans HPR, Meijer BUGA, Kostense PJ, Giphart MJ, Meuwissen SGM, Peña AS. Evidence for genetic heterogeneity in inflammatory bowel disease (IBD); HLA genes in the predisposition to suffer from ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD). *Clin Exp Immunol* 1997;109: 175-179.
397. Satsangi J, Welsh KI, Bunce M, Julier C, Farrant JM, Bell JI, Jewell DP. Contribution of genes of the major histocompatibility complex to susceptibility and disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Lancet* 1996;347: 1212-1217.
398. Roussomoustakaki M, Satsangi J, Welsh K, Louis E, Fanning G, Targan S, Landers C, Jewell DP. Genetic markers may predict disease behavior in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1997;112: 1845-1853
399. Sartor RB. The pathogenesis of chronic intestinal inflammation: clues from animal models. *Research and Clinical Forums* 1996;18: 17-24.
400. Lander ES, Schork NJ. Genetic dissection of complex traits. *Science* 1994;265: 2037-2048.
401. Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugier L, Naom I, Dupas JL, Van Gossum AV, Groupe d'Etude Thérapeutique des Affections Inflammatoires Digestives, Orholm M, Bonaiti-Pellie C, Weissenbach J, Mathew CG, Lennard-Jones JE, Cortot A, Colombel JF, Thomas G. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16; *Nature* 1996;379: 821-823.
402. Satsangi J, Parkes M, Louis E, Hashimoto L, Kato N, Welsh K, Terwilliger JD, Lathrop GM, Bell JI, Jewell DP. Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. *Nat Genet* 1996;14: 199-202.
403. Ohmen JD, Yang HY, Yamamoto KK, Zhao HY, Ma Y, Bentley LG, Huang Z, Gerwehr S, Pressman S, McElree C, Targan S, Rotter JI, Fischel-Ghodsian N. Susceptibility locus for inflammatory bowel disease on chromosome 16 has a role in Crohn's disease, but not in ulcerative colitis. *Hum Mol Genet* 1996;10: 1679-1683.
404. Parkes M, Satsangi J, Lathrop GM, Bell JI, Jewell DP. Susceptibility loci in inflammatory bowel disease. *Lancet* 1996;348: 1588.
405. Brant SR, Fu Y, Fields CT, Baltazar R, Ravenhill G, Pickles MR, Rohal PM, Mann J, Kirschner BS, Jabs EW, Bayless TM, Hanauer SB, Cho JH. American families with Crohn's disease have strong evidence for linkage to chromosome 16 but not chromosome 12. *Gastroenterology* 1998;115: 1056-1061.

406. Duerr RH, Barmada MM, Zhang L, Davis S, Preston RA, Chensny LJ, Brown JL, Ehrlich GD, Weeks DE, Aston CE. Linkage and association between inflammatory bowel disease and a locus on chromosome 12. *Am J Hum Genet* 1998;63: 95-100.
407. Curran ME, Lau KF, Hampe J, Schreiber S, Bridger S, Macpherson AJ, Cardon LR, Sakul H, Harris TJ, Stokkers P, Van Deventer SJ, Mirza M, Raedler A, Kruis W, Meckler U, Theuer D, Herrmann T, Gionchetti P, Lee J, Mathew C, Lennard-Jones J. Genetic analysis of inflammatory bowel disease in a large european cohort supports linkage to chromosome 12 and 16. *Gastroenterology* 1998;115: 1066-1071.
408. Mirza MM, Lee J, Teare D, Hugot JP, Laurent-Puig P, Colombel JF, Hodgson SV, Thomas G, Easton DF, Lennard-Jones JE, Mathew CG. Evidence of linkage of the inflammatory bowel disease susceptibility locus on chromosome 16 (IBD1) to ulcerative colitis. *J Med Genet* 1998;35: 218-221.
409. Rioux JD, Daly MJ, Green T, Stone V, Lander ES, Hudson TJ, Steinhart AH, Bull S, Cohen Z, Greenberg G, Griffiths A, McLeod R, Silverberg M, Williams CN, Siminovitch KA. Absence of linkage between inflammatory bowel disease and selected loci on chromosomes 3, 7, 12, and 16. *Gastroenterology* 1998;115: 1062-1065.
410. Toyoda H, Wang SJ, Yang HY, Redford A, Magalong D, Tyan D, McElree CK, Pressman SR, Shanahan F, Targan SR, Rotter JI. Distinct associations of HLA class II genes with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1993;104: 741-748.
411. Sugimura K, Asakura H, Mizuki N, Inoue M, Hibi T, Yagita A, Tsuji K, Inoko H. Analysis of genes within the HLA region affecting susceptibility to ulcerative colitis. *Hum Immunol* 1993;36: 112-118.
412. De la Concha EG, Fernandez-Arquero M, Santa-Cruz S, Lopez-Nava G, Figueredo MA, Diaz-Rubio M, García-Paredes J. Positive and negative associations of distinct HLA-DR2 subtypes with ulcerative colitis (UC). *Clin Exp Immunol* 1997;108: 392-395.
413. Naom I, Lee J, Ford D, Bowman SJ, Lanchbury JS, Haris I, Hodgson SV, Easton D, Lennard-Jones J, Mathew CG. Analysis of the contribution of HLA genes to genetic predisposition in inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 1996;59: 226-233.
414. Reinshagen M, Loeliger C, Kuehnl P, Weiss U, Manfras BJ, Adler G, Boehm BO. HLA class II gene frequencies in Crohn's disease: a population based analysis in Germany. *Gut* 1996;38: 538-542.
415. Danzé PM, Colombel JF, Jacquot S, Loste MN, Heresbach D, Ategbo S, Khamassi S, Périchon B, Semana G, Charron D, Cézard JP. Association of HLA class II genes with susceptibility to Crohn's disease. *Gut* 1996;39: 69-72.

416. Sartor RB. Cytokines in intestinal inflammation: Pathophysiological and clinical considerations. *Gastroenterology* 1994;106: 533-9.
417. Rogler G, Andus T. Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J. Surg* 1998;22: 382-389.
418. McAlindon ME, Mahida YR. Pro-inflammatory cytokines in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1996;10 (suppl.2): 72-74.
419. Pallone F, Monteleone G. Regulatory cytokines in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1996;10 (suppl.2): 75-79.
420. Kagnoff MF. Immunology and inflammation of the gastrointestinal Tract. In: Sleisenger MH, ed. *Gastrointestinal and liver disease*. Philadelphia: Saunders, 1998: 19-48.
421. Koutroubakis I, Crusius JBA, Peña AS. Immunogenetics of cytokines. *Scand J Gastroenterol* 1995;30: 1139-1146.
422. Parkes M, Satsangi J, Jewell D. Contribution of the IL-2 and IL-10 genes to inflammatory bowel disease (IBD) susceptibility. *Clin Exp Immunol* 1998;113: 28-32.
423. Dinarello CA. The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB J* 1994;8: 1314-1325.
424. Nikolic-Paterson DJ, Lan HY, Atkins RC. Interleukin- receptor antagonist. *Sem Nephrol* 1996;16: 583-590.
425. Arend WP, Malyack M, Guthridge CJ, Gabay C. Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. *Annu Rev Immunol* 1998;16: 27-55.
426. Arend WP, Joslin FG, Massoni RJ. Effects of immune complexes on production by human monocytes of interleukin 1 or an interleukin 1 inhibitor. *J Immunol* 1985;134: 3868-3875.
427. Balavoine JF, de Rochemonteix B, Williamson K, Seckinger P, Cruchaud A, Dayer JM. Prostaglandin E2 and collagenase production by fibroblasts and synovial cells is regulated by urine-derived human interleukin 1 and inhibitor(s). *J Clin Invest* 1986;78: 1120-1124.
428. Otterness I, Golden H, Brissette W, Seymour P, Daumy G. Effects of continuously administered murine interleukin 1: tolerance, development and granuloma formation. *Infection Immun* 1989;57: 2742-2750.

429. Rachmilewitz D, Simon PL, Schwartz LW, Griswold DE, Fondacaro JD, Wasserman MA. Inflammatory mediators of experimental colitis in rats. *Gastroenterology* 1989;97: 326-337.
430. Sartor RB, Holt LC, Bender DE, Murphy ME, McCall RD, Thompson RC. Prevention and treatment of experimental enterocolitis with a recombinant interleukin-1 receptor antagonist. *Gastroenterology* 1991;100: A613.
431. Cominelli F, Nast CC, Duchini A, Lee M. Recombinant interleukin-1 receptor antagonist blocks the proinflammatory activity of endogenous interleukin-1 in rabbit immune colitis. *Gastroenterology* 1992;103: 65-71.
432. Cominelli F, Nast CC, Clark BD, Schindler R, Llerena R, Eysselein VE, Thompson RC, Dinarello CA. Interleukin 1 (IL-1) gene expression, synthesis, and effect of specific IL-1 receptor blockade in rabbit immune complex colitis. *J Clin Invest* 1990;86: 972-980.
433. Ferreti M, Casini-Raggi V, Pizarro TT, Eisenberg SP, Nast CC, Cominelli F. Neutralization of endogenous IL-1 receptor antagonist exacerbates and prolongs inflammation in rabbit immune colitis. *J Clin Invest* 1994;94: 449-453.
434. Melani L, Hirsch E, Guanzon M, Pizarro TT, Hirsh D, Cominelli F. Deletion of the IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) gene increases susceptibility to experimental colitis in mice. *Gastroenterology* 1997;112: A1040.
435. Mahida YR, Wu K, Jewell DP. Enhanced production of interleukin-1 β by mononuclear cells isolated from mucosa with active ulcerative colitis or Crohn's disease. *Gut* 1989;30: 835-838.
436. Brynskov J, Tvede N, Vilien M, Andersen CB, Bentzen K. Increased concentrations of interleukin 1 β , interleukin 2, and soluble interleukin-2 receptors in endoscopic mucosal biopsy specimens with active inflammatory bowel disease. *Gut* 1992;33: 55-58.
437. Pullman WE, Elsbury S, Kobayashi M, Hapel AJ, Doe WF. Enhanced mucosal cytokine production in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1992;102: 529-537.
438. Ligumski M, Simon PL, Karmeli F, Rachmilewitz D. Role of interleukin 1 in inflammatory bowel disease: enhanced production during active disease. *Gut* 1990;31: 686-689.

439. Casellas F, Papo M, Guarner F, Antolín M, Segura RM, Armengol JR, Malagelada JR. Intracolonic release *in vivo* of interleukin-1 β in chronic ulcerative colitis. *Clinical Science* 1995;89: 521-526.
440. Isaacs KL, Sartor RB, Haskill S. Cytokine messenger RNA profiles in inflammatory bowel disease mucosa detected by polymerase chain reaction amplification. *Gastroenterology* 1992;103: 1587-1595.
441. Gilberts EC, Greenstein AJ, Katsel P, Harpaz N, Greenstein RJ. Molecular evidence of two forms of Crohn disease. *Poc Natl Acad Sci USA* 1994;20: 12721-12724.
442. Nishiyama T, Mitsuyama K, Toyonaga A, Sasaki E, Tanikawa K. Colonic mucosal interleukin 1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. *Digestion* 1994;55: 368-373.
443. Casini-Raggi V, Kam L, Chong YJ, Fiocchi C, Pizarro TT, Cominelli F. Mucosal imbalance of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. A novel mechanism of chronic intestinal inflammation. *J Immunol* 1995;154: 2434-2440.
444. Dionne S, D'Agata ID, Hiscott J, Vanounou T, Seidman EG. Colonic explant production of IL-1 and its receptor antagonist is imbalanced in inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1998;112: 435-442.
445. Andus T, Daig R, Vogl D, Aschenbrenner E, Lock G, Hollerbach S, Köllinger M, Schölmerich J, Gross V. Imbalance of the interleukin 1 system in colonic mucosa-association with intestinal inflammation and interleukin 1 receptor agonist genotype 2. *Gut* 1997;651-657.
446. Hyams JS, Fitzgerald JE, Wyzga N, Muller R, Treem WR, Justinich CJ, Kreutzer DL. Relationship of interleukin-1 receptor antagonist to mucosal inflammation in inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995;21: 419-425.
447. Hendel J, Nielsen OH, Madsen S, Brynskov J. A simple filter-paper technique allows detection of mucosal cytokine levels *in vivo* in ulcerative colitis. Interleukin-1 and interleukin-1-receptor antagonist. *Dig Dis Sci* 1996;41: 1775-1779.
448. Saiki T, Mitsuyama K, Toyonaga A, Ishida H, Tanikawa K. Detection of pro- and anti-inflammatory cytokines in stools of patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1998;33: 616-622.
449. Eisenberg SP, Evans RJ, Arend WP, Verderber E, Brewer MT, Hannum CH, Thompson RC. Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 receptor antagonist. *Nature* 1990;343: 341-346.

450. Eisenberg SP, Brewer MT, Verderber E, Heimdal P, Brandhuber BJ, Thompson RC. IL-1 receptor antagonist is a member of the IL-1 gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88: 5232-5236.
451. Lennard A, Gorman P, Carrier M, Griffiths S, Scotney H, Sheer D, Solari R. Cloning and chromosome mapping of the human interleukin-1 receptor antagonist gene. *Cytokine* 1992;4: 83-89.
452. Steinkasserer A, Spurr NK, Cox S, Jeggo P, Sim RB. The human IL-1 receptor antagonist gene (IL1RN) maps to chromosome 2q14-q21, in the region of the IL-1 alpha and IL-1 beta loci. *Genomics* 1992;13: 654-657.
453. Patterson D, Jones C, Hart I, Bleskan J, Berger R, Geyer D, Eisenberg SP, Smith MF, Arend WP. The human IL-1 receptor antagonist gene (IL1RN) is located in the chromosome 2q14 region. *Genomics* 1993;15: 173-176.
454. Tarlow JK, Blakemore AIF, Lennard A, Solari R, Hughes HN, Steinkasserer A, Duff GW. Polymorphism in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86-bp tandem repeat. *Hum Genet* 1993;91: 403-404.
455. Danis VA, Millington M, Hyland VJ, Grennan D. Cytokine production by normal human monocytes: inter-subject variation and relationship to an IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene polymorphism. *Clin Exp Immunol* 1995;99: 303-310.
456. Cominelli F, Pizarro TT. Interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1996;10 (suppl 2): 49-53.
457. Hurme M, Santtila S. IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) plasma levels are coordinately regulated by both IL-1Ra and IL-1beta genes. *Eur J Immunol* 1998;28: 2598-2602.
458. Stokkers PCF, van Aken BE, Basoki N, Reitsma PH, Tytgat GNJ, van Deventer SJH. Five genetic markers in the interleukin 1 family in relation to inflammatory bowel disease. *Gut* 1998;43: 33-39.
459. Clay FE, Tarlow JK, Cork MJ, Cox A, Nicklin MJH, Duff GW. Novel interleukin-1 receptor antagonist exon polymorphisms and their use in allele-specific mRNA assessment. *Hum Genet* 1996;97: 723-726.
460. Mansfield JC, Holden H, Tarlow JK, Di Giovine FS, McDowell TL, Wilson AG, Holdsworth CD, Duff GW. Novel genetic association between ulcerative colitis and the anti-inflammatory cytokine interleukin-1 receptor antagonist. *Gastroenterology* 1994;106: 637-642.

461. Duerr RH, Tran T. Association between ulcerative colitis and a polymorphism in intron 2 of the interleukin-1 receptor antagonist gene. *Gastroenterology* 1995;108: A812.
462. Tountas NA, Kam L, di Giovine FS, Casini-Raggi V, Cominelli F. Genetic association between allele 2 of IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) and ulcerative colitis in a Los Angeles based Hispanic population. *Gastroenterology* 1995;108: A930.
463. Andus T, Caesar I, Vogl D, Schölmerich J, Gross V. Association of HLA-DR15, p-ANCA and IL-1 receptor antagonist allele 2 with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1995;108: A770.
464. Hacker UT, Gomolka M, Keller E, Eigler A, Folwaczny C, Fricke H, Albert E, Loeschke K, Endres S. Lack of association between an interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and ulcerative colitis. *Gut* 1997;40: 623-627.
465. Louis E, Satsangi J, Roussomoustakaki M, Parkes M, Fanning G, Welsh K, Jewell D. Cytokine gene polymorphisms in inflammatory bowel disease. *Gut* 1996;39: 705-710.
466. Roussomoustakaki M, Satsangi J, Welsh K, Louis E, Fanning G, Targan S, Landers C, Jewell DP. Genetic markers may predict disease behavior in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1997;112: 1845-1853.
467. Heresbach D, Alizadeh M, Dabadie A, Le Berre N, Colombel JF, Yaouanq J, Bretagne JF, Semana G. Significance of interleukin-1 β and interleukin-1 receptor antagonist genetic polymorphism in inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* 1997;92: 1164-1169.
468. García-Paredes J, Bioque G, Crusius JBA, García-González A, López-Nava G, Díaz-Rubio M, Fernandez-Arquero M, Gómez de la Concha E, Peña AS. The interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in Spanish IBD patients. *Gastroenterology* 1996;110: A914.
469. Satsangi J, Jewell DP. Are cytokine gene polymorphisms important in the pathogenesis of inflammatory bowel disease? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996;8:97-99.
470. Perrier S, Coussediere C, Dubost JJ, Albuissou E, Sauvezie B. IL-1 receptor antagonist (IL-1RA) gene polymorphism in Sjogren's syndrome and rheumatoid arthritis. *Clin Immunol Immunopathol* 1998;87: 309-313.
471. Carter MJ, Jones S, di Giovine FS, Camp NJ, Lobo AJ, Duff GW. Allele 2 of the interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism is associated with reduced expression of interleukin-1 receptor antagonist in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1998;114: A947

472. Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* 1996;334: 1717-1725.
473. Armstrong AM, Gardiner KR, Kirk SJ, Halliday MI, Rowlands BJ. Tumor necrosis factor and inflammatory bowel disease. *B J Surg* 1997;84: 1051-1058.
474. Sun X, Hsueh W. Bowel necrosis induced by tumor necrosis factor in rats is mediated by platelet-activating factor. *J Clin Invest* 1988;81: 1328-1331.
475. Bautista AP, Schuler A, Spolarics Z, Spitzer JJ. Tumor necrosis alfa stimulates superoxide anion generation by perfused rat liver and Kupffer cells. *Am J Physiol* 1991;261: G891-G895.
476. Moser R, Scheliffenbaum B, Groscurth P, Fehr J. Interleukin 1 and tumor necrosis factor stimulate human vascular endothelial cells to promote transendothelial neutrophil passage. *J Clin Invest* 1989;83: 444-455.
477. Foulkes R, Shaw S. Recombinant human TNF induces a non-constitutive form of nitric oxide (NO)-synthase in the endothelium and smooth muscle. *Br J Pharmacol* 1992;105: 292P.
478. Neilly PJD, Campbell GR, Anderson NH, Gardiner KR, Kirk SJ, Rowlands BJ. Faecal and systemic tumor necrosis factor in experimental inflammatory bowel disease. *Surgical Research Communications* 1995;18: 11-17.
479. Powrie F, Leach MW, Mauze S, Menon S, Caddle LB, Coffman RL. Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in SCID mice reconstituted with CD45RB^{high} CD4+ T cells. *Immunity* 1994;1: 553-562.
480. Watkins PE, Warren BF, Stephens P, Ward P, Foulkes R. Treatment of ulcerative colitis in the cottontop tamarin using antibody to tumor necrosis factor alpha. *Gut* 1997;40: 628-633.
481. Neurath MF, Fuss I, Pasparakis M, Alexopoulou L, Haralambous S, Meyer zum Buschenfelde KH, Strober W, Kollias G. Predominant pathogenic role of tumor necrosis factor in experimental colitis in mice. *Eur J Immunol* 1997;27: 1743-1750.
482. Kojouharoff G, Hans W, Obermeier F, Mannel DN, Andus T, Schölmerich J, Gross V, Falk W. Neutralization of tumor necrosis factor (TNF) but not of IL-1 reduces inflammation in chronic dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *Clin Exp Immunol* 1997;107: 353-358.
483. Braegger CP, Nicholls S, Murch SH, Stephens S, McDonald TT. Tumor necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation. *Lancet* 1992;339: 89-91.

484. Cappello M, Keshav S, Prince C Jewell DP, Gordon S. Detection of mRNA for macrophage products in inflammatory bowel disease. *Gut* 1992;33: 1214-1219.
485. Reinecker HC, Steffen M, Witthoef T, Pflueger I, Schreiber S, MacDermott RP, Raedler A. Enhanced secretion of tumor necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1-beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 1993;94: 174-181.
486. Murch SH, Braegger CP, Walker SJ, MacDonald TT. Location of tumor necrosis factor- α by immunohistochemistry in chronic inflammatory bowel disease. *Gut* 1993;34: 1705-1709.
487. Breese EJ, Michie CA, Nicholls SW, Murch SH, Williams CB, Domizio PWS, MacDonald TT. Tumor necrosis factor alpha-producing cells in the intestinal mucosa of children with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1994;106: 1455-1466.
488. Casellas F, Papo M, Guarner F, Antolín M, Armengol JR, Malagelada JR. Intraluminal colonic release of immunoreactive tumor necrosis factor in chronic ulcerative colitis. *Clin Sci (Colch)* 1994;87: 453-458.
489. Funakoshi K, Sugimura K, Anezaki K, Bannai H, Ishizuka K, Asakura H. Spectrum of cytokine gene expression in intestinal mucosal lesions of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Digestion* 1998;59: 73-78.
490. Van Dullemen HM, Van Deventer SJH, Hommes DW, Bijl HA, Jansen J, Tytgat GNJ, Woody J. Treatment of Crohn's disease with anti-tumor necrosis factor chimeric monoclonal antibody (cA2). *Gastroenterology* 1995;109: 129-135.
491. Stack WA, Mann SD, Roy AJ, Heath P, Sopwith M, Freeman J, Holmes G, Long R, Forbes A, Kamm MA, Hawkey CJ. Randomised controlled trial of CDP571 antibody to tumor necrosis factor- α in Crohn's disease. *Lancet* 1997;349: 521-524.
492. Targan SR, Hanauer SB, Van Deventer SJH, Mayer L, Present DH, Braakman T, DeWoody KL, Schaible TF, Rutgeerts PJ, for the Crohn's Disease cA2 Study Group. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor α for Crohn's disease. *N Engl J Med* 1997;337: 1029-1035.
493. Evans RC, Clarke L, Heath P, Stephens S, Morris AI, Rhodes JM. Treatment of ulcerative colitis with an engineered human anti-TNFalpha antibody CDP571. *Aliment Pharmacol Ther* 1997;11: 1031-1035.
494. Nightingale SL. From the Food and Drug Administration. *JAMA* 1998;280: 1128.

495. Wilson AG, di Giovine FS, Duff GW. Genetics of tumor necrosis factor- α in autoimmune, infectious, and neoplastic diseases. *J Inflamm* 1995;45: 1-12.
496. Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore, Duff GW. Single base polymorphism in the human necrosis factor alpha (TNF α) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum Mol Genet* 1992;1: 353.
497. Bouma G, Crusius JBA, Oudkerk Pool M, Kolkman JJ, von Blomberg BME, Kostense PJ, Giphart MJ, Schreuder GMTH, Meuwissen SGM, Peña AS. Secretion of tumor necrosis factor α and lymphotoxin α in relation to polymorphisms in the TNF genes and HLA-DR alleles. Relevance for inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol* 1996;43: 456-463.
498. Louis E, Franchimont D, Piron A, Gevaert Y, Schaaf-Lafontaine N, Roland S, Mahieu P, Malaise M, De Groote D, Louis R, Belaiche J. Tumor necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF- α production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clin Exp Immunol* 1998;113: 401-406.
499. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW: Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor α promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci* 1997, 94:3195-3199.
500. Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ: The -308 tumor necrosis factor- α promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol* 1997, 34:391-399.
501. Brinkman BMN, Zuijdgheest D, Kaijzel EL, Breedveld FC, Verweij C. Relevance of the tumor necrosis factor alpha (TNF α) -308 promoter polymorphism in TNF α gene regulation. *J Inflamm* 1996;46: 32-41.
502. Badenhoop K, Schwarz G, Trowsdale J, Lewis V, Usadel KH, Gale EA, Bottazzo GF. TNF-alpha gene polymorphisms in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1989;32: 445-448.
503. Messer G, Spengler U, Jung MC, Honold G, Blömer K, Pape GR, Riethmüller G, Weiss EH. Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: an NcoI polymorphism in the first intron of the human TNF- β gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF- β production. *J Exp Med* 1991;173: 209-219.

504. Pociot F, Briant L, Jongeneel CV, Mölvig J, Worsaae H, Abbal M, Thomsen M, Nerup J, Cambon-Thomsen A. Association of tumor necrosis factor (TNF) and class II major histocompatibility complex alleles with the secretion of TNF- α and TNF- β by human mononuclear cells: a possible link to insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Immunol* 1993;23: 224-231.
505. Whichelow CE, Hitman GA, Raafat I, Bottazzo GF, Sachs JA. The effect of TNF*B gene polymorphism on TNF-alpha and beta secretion levels in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and healthy controls. *Eur J Immunogenet* 1996;23: 425-435.
506. Koutroubakis I, Xia B, Crusius JBA, Bioque G, Bouma G, Meuwissen SGM, Manousos ON, Peña AS. Tumor necrosis factor-alpha polymorphism in inflammatory bowel disease. *Hell J Gastroenterol* 1995;8: 132-135.
507. Heresbach D, Ababou A, Bourienne A, Alizadeh M, Quelvennec E, Pagenault M, Dabadie A, Heresbach-Le Berre N, Campion JP, Launois B, Gosselin M, Genetet B, Bretagne JF, Semana G. Étude du polymorphisme des microsatellites et des gènes du tumor necrosis factor (TNF) au cours des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. *Gastroenterol Clin Biol* 1997;21: 555-561.
508. Bouma G, Xia B, Crusius JBA, Bioque G, Koutroubakis I, Von Blomberg BME, Meuwissen SGM, Peña AS. Distribution of four polymorphisms in the tumor necrosis factor (TNF) genes in patients with inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1996;103: 391-396.
509. Louis E, Peeters M, Demolin G, Croes F, Dupont P, Rutgeerts P, Belaiche J, and the Belgian IBD Research Group. TNF gene polymorphism may influence disease behavior in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1998;114: A1027.
510. Bing X, Bouma G, Crusius JBA, Meuwissen SGM, Peña AS. Distribution of an NcoI polymorphism in the lymphotoxin α gene in dutch patients with inflammatory bowel diseases. *Chin Med J* 1995;108: 739-742.
511. Sugimura K, Asakura H, Mizuki N, Inoue M, Hibi T, Yagita A, Tsuji K, Inoko H. Analysis of genes within the HLA region affecting susceptibility to ulcerative colitis. *Hum Immunol* 1993;36: 112-118.
512. Bohr J, Tysk C, Yang P, Danielsson D, Järnerot G. Autoantibodies and immunoglobulins in collagenous colitis. *Gut* 1996;39: 73-76.

513. Quinton JF, Sendid B, Reumaux D, Duthilleul P, Cortot A, Grandbastien B, Charrier G, Targan SR, Colombel JF, Poulain D. Anti-*Saccharomyces cerevisiae* mannan antibodies combined with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease: prevalence and diagnostic role. *Gut* 1998;42: 788-791.
514. Aisenberg J, Zelman G, Bodian C, Sachar D. Serological analysis permits differentiation of Crohn's disease from ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1998;114: A918.
515. Vecchi M, Bianchi MB, Calabresi C, Meucci G, Tatarella M. Long-term observation of the perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibody status in ulcerative colitis patients. *Scand J Gastroenterol* 1998;33: 170-173.
516. Lindgren S, Florén C-H, Lindhagen T, Starck M, Stewenius J, Nässberger L. Low prevalence of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in ulcerative colitis patients with long-term remission. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995;7: 563-568.
517. Sandborn WJ, Landers CJ, Tremaine WJ, Targan SR. Association of antineutrophil cytoplasmic antibodies with resistance to treatment of left-sided ulcerative colitis: results of a pilot study. *Mayo Clin Proc* 1996;71: 431-436.
518. Elmgreen J, Both H, Binder V. Familial occurrence of complement dysfunction in Crohn's disease: correlation with intestinal symptoms and hypercatabolism of complement. *Gut* 1985;26: 151-157.
519. Tysk C, Riedesel H, Lindberg E, Panzini B, Podolsky D, Jarnerot G. Colonic glycoproteins in monozygotic twins with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1991;100: 419-423.
520. Van de Merwe JP, Schroder AM, Wensinck F, Hazenberg MP. The obligate anaerobic faecal flora of patients with Crohn's disease and their first-degree relatives. *Scand J Gastroenterol* 1988;23: 1125-1131.
521. Helgeland L, Tysk C, Jarnerot G, Kett K, Lindberg E, Danielsson D, Andersen SN, Brandtzaeg P. IgG subclass distribution in serum and rectal mucosa of monozygotic twins with or without inflammatory bowel disease. *Gut* 1992;33: 1358-1364.
522. Wayne LG, Hollander D, Anderson B, Sramek HA, Vadheim CM, Rotter JJ. Immunoglobulin A (IgA) and IgG serum antibodies to mycobacterial antigens in Crohn's disease patients and their relatives. *J Clin Microbiol* 1992;30: 2013-2018.
523. Hollander D, Vadheim CM, Brettholz E, Petersen GM, Delahunty T, Rotter JJ. Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor. *Ann Intern Med* 1989;105: 883-885.

524. Katz KD, Hollander D, Vadheim CM, McElree C, Delahunty T, Dadufalza VD, Krugliak P, Rotter JJ. Intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their healthy relatives. *Gastroenterology* 1989;97: 927-931.
525. May GR, Sutherland LR, Meddings JB. Is small intestinal permeability really increased in relatives of patients with Crohn's disease? *Gastroenterology* 1993;104:1627-1632.
526. Ruttenberg D, Young GO, Wright JP, Isaacs S. PEG-400 excretion in patients with Crohn's disease, their first-degree relatives, and healthy volunteers. *Dig Dis Sci* 1992;37: 705-708.
527. Teahon K, Smethurst P, Levi AJ, Menzies IS, Bjarnason I. Intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their first degree relatives. *Gut* 1992;33: 320-323.
528. Howden CW, Gillanders I, Morris AJ, Duncan A, Danesh B, Russell RI. Intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their first degree relatives. *Am J Gastroenterol* 1994;89: 1175-1176.
529. Peeters M, Geypens B, Claus D, Nevens H, Ghoois Y, Verbeke G, Baert F, Vermeire S, Vlietinck R, Rutgeerts P. Clustering of increased small intestinal permeability in families with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1997;113: 802-807.
530. Korsmeyer SJ, Williams RC Jr, Wilson ID, Strickland RG. Lymphocytotoxic antibody in inflammatory bowel disease. A family study. *N Engl J Med* 1975;293: 1117-1120.
531. Fiocchi C, Roche JK, Michener WM. High prevalence of antibodies to intestinal epithelial antigens in patients with inflammatory bowel disease and their relatives. *Ann Intern Med* 1989;110: 786-794.
532. Folwaczny C, Noehl N, Endres SP, Loeschke K, Fricke H. Antineutrophil and pancreatic autoantibodies in first-degree relatives of patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1998;33: 523-528.
533. Seibold F, Mörk H, Tanza S, Müller A, Holzhüter C, Weber P, Scheurlen M. Pancreatic autoantibodies in Crohn's disease: a family study. *Gut* 1997;40: 481-484.
534. Biancone L, Monteleone G, Marasco R, Pallone F. Autoimmunity to tropomyosin isoforms in ulcerative colitis (UC) patients and unaffected relatives. *Clin Exp Immunol* 1998;113: 198-205.
535. Folwaczny C, Noehl N, Tschöp K, Endres SP, Heldwein W, Loeschke K, Fricke H. Globet cell autoantibodies in patients with inflammatory bowel disease and their first-degree relatives. *Gastroenterology* 1997;113: 101-106.

536. Sendid B, Quinton JF, Charrier G, Goulet O, Cortot A, Grandbastien B, Poulain D, Colombel JF. Anti-Saccharomyces cerevisiae mannan antibodies in familial Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 1998;93: 1306-1310.
537. Folwaczny C, Noehl N, Endres SP, Heldwein W, Loeschke K, Fricke H. Antinuclear autoantibodies in patients with inflammatory bowel disease. High prevalence in first-degree relatives. *Dig Dis Sci* 1997;42: 1593-1597.
538. Napolitano G, Piepoli A, Annese V, Perri F, Astegiano M, Clemente R, Iaquinto V, Cucchiara S, Andriulli A. Antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) in unaffected relatives in familial inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1996;110: A978.
539. Vecchi M, Bianchi MB, Meucci G, Beretta L, Bortoli A, Cesari P, Colombo E, Comin U, Corbellini A, Ferrara A, Gullotta R, Lupinacci G, Politi P, Ranzi T, Ravelli P, Rocca F, de Franchis R. Prevalence of p-ANCA in unaffected family members of Italian ulcerative colitis patients. *Gastroenterology* 1996;110: A1037.
540. Annese V, Piepoli A, Lombardi G, Napolitano G, Latiano A, Borrelli O, Andriulli A. Antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) in familial inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1997;112: A922.
541. Yang P, Järnerot G, Danielsson D, Tysk C, Lindberg E. P-ANCA in monozygotic twins with inflammatory bowel disease. *Gut* 1995;36: 887-890.
542. Carter MJ, Jones S, Mansfield JC, di Giovine FS, Camp NJ, Lobo AJ, Duff GW. Further evidence of an association between the allele 2 of the interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RA) gene (IL-1RN) polymorphism and ulcerative colitis (UC). *Gastroenterology* 1998;114: A948.
543. Tountas NA, Yang H, Coulter DL, Rotter JJ, Cominelli F. Increased carriage of allele 2 of IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) in jewish populations: the strongest known genetic association in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1996;110: A1029.
544. Bioque G, Crusius JBA, Koutroubakis I, Bouma G, Kostense PJ, Meuwissen SGM, Peña AS. Allelic polymorphism in IL-1 β and IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) genes in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 1995;102: 379-383.
545. Hacker UT, Bidlingmaier C, Gomolka M, Keller E, Eigler A, Hartmann G, Folwaczny C, Fricke H, Albert E, Loeschke K, Endres S. Inflammatory bowel disease: no association between allele combinations of the interleukin (IL) 1 β and IL-1 receptor antagonist gene polymorphisms. *Eur J Clin Invest* 1998;28: 214-219.

546. Plevy SE, Targan SR, Yang H, Fernandez D, Rotter JJ, Toyoda H. Tumor necrosis factor microsatellites define a Crohn's disease-associated haplotype on chromosome 6. *Gastroenterology* 1996;110: 1053-1060.
547. Annese V, Piepoli A, Andriulli A, Napolitano G, Biesceglia L, Zelante L, Gasparini P. Polymorphism of motilin gene in patients with Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1998;43: 715-719.
548. Lee YT, Sung JY, Poon P, Lai KN, Li PKT. Association of HLA class-II genes and anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in Chinese patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1998;33: 623-627.
549. Plevy SE, Taylor K, DeWoody KL, Schaible TF, Shealy D, Targan SR. Tumor necrosis factor (TNF) microsatellite haplotypes and perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (pANCA) identify Crohn's disease (CD) patients with poor clinical responses to anti-TNF monoclonal antibody (cA2). *Gastroenterology* 1997;112: A1062.