

## 4. DISCUSION

### 4.1. ESCLERODERMIA

Analizando de forma global los pacientes con esclerodermia (preesclerodermia, esclerodermia limitada y difusa) no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los fenotipos respecto la población control y respecto los pacientes con fenómeno de Raynaud primario. Esto hallazgos son similares a los descritos en la literatura previamente<sup>86,100,101</sup>, pero en ninguno de estos estudios se realizó un análisis específico del subgrupo de esclerodermia difusa, donde nosotros hemos encontrado un 50% de fenotipos deficitarios. Además, es importante reseñar que en nuestra serie, si excluimos aquellos enfermos con fenómeno de Raynaud primario, el 55,5% de los fenotipos anómalos acaban desarrollando una afectación difusa de su enfermedad, mientras esto ocurre en sólo el 15,1% de los fenotipos PiMM. Estos interesantes datos nos podrían sugerir que el hecho de presentar un fenotipo Pi no MM podría ser un marcador de ayuda para los clínicos con el fin de evaluar que grupo de pacientes con fenómeno de Raynaud tiene un riesgo más elevado de desarrollar, en su evolución, una esclerodermia difusa. En nuestro estudio, hemos observado que aquellos pacientes portadores de un fenotipo Pi no MM presentan un riesgo 5,75 mayor de desarrollar esclerodermia difusa.

Por otro lado, estos hallazgos apoyarían la idea que la forma difusa y la limitada podrían tener una fisiopatología diferente. Es bien conocido que su curso clínico y la asociación con determinados autoanticuerpos es diferente. Así la esclerodermia limitada, a parte de la extensión de la induración, acostumbra a presentarse en mujeres de edad más avanzada, con un periodo de tiempo entre el inicio del fenómeno de Raynaud y la esclerosis más prolongado (10-15 años), con mayor tendencia a desarrollar hipertensión pulmonar y se asocia en aproximadamente un 50-70 % con los anticuerpos anticentrómero. En cambio, la esclerodermia difusa suele presentarse en

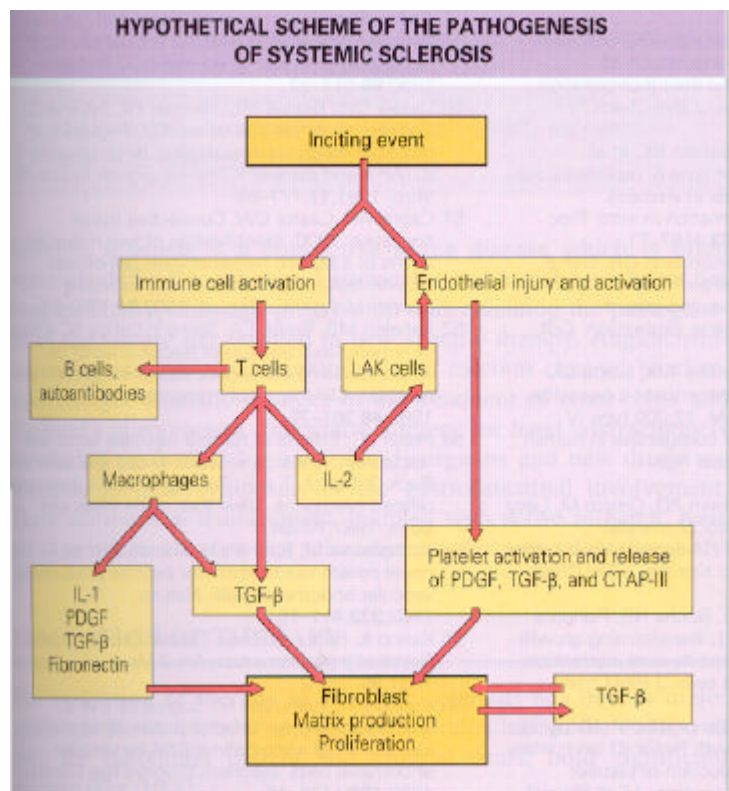
mujeres más jóvenes, el periodo entre la aparición del Raynaud y la esclerosis cutánea acostumbra a ser más corto, los síntomas constitucionales, la afectación renal y la afectación intersticial pulmonar son más frecuentes y se detecta aproximadamente en el 20-30 % anticuerpos anti-Scl-70<sup>136</sup>.

Las dos claves en la afectación orgánica de la esclerosis sistémica son el depósito excesivo de colágeno y el daño en la circulación microvascular. Aunque la patogénesis de esta enfermedad es desconocida, es probable que un estímulo (genético<sup>137</sup> o ambiental) provoque una disregulación del sistema inmune que lesione las células endoteliales. Varias sustancias se han implicado en el desarrollo de esclerodermia y pseudoesclerodermia como los implantes de silicona, el L-triptófano (síndrome de mialgia-eosinofilia), la Bleomicina y la intoxicación por el aceite de colza<sup>138-140</sup>. Por otro lado se ha identificado en algunos estudios la presencia de los antígenos de histocompatibilidad HLA A1, B8, DR3 asociados a esta patología<sup>136</sup>.

Hay evidencias de activación endotelial que viene determinadas por la presencia de valores plasmáticos elevados del factor VIII-factor von Willebrand<sup>141</sup>. La activación de las plaquetas provoca agregación plaquetar y liberación de mediadores inflamatorios<sup>142</sup>. Otras células que se activan en esta patología son las células T, los macrófagos tisulares y los fibroblastos<sup>143</sup>. Hay un aumento resultante en la producción de proteínas de la matriz extracelular, incluyendo colágeno tipo I, III, V y VII, fibronectina y proteoglicanos<sup>143</sup>. También se encuentran aumentadas las citoquinas proinflamatorias como la IL-1, IL-2, IL-8, tumor necrosis-alpha, factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), “transforming growth factor-beta” (TGF- $\beta$ ), gamma-interferon y endotelina<sup>143-144</sup>. La IL-1, producida por los macrófagos, es capaz de estimular la proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágeno tipo I y III<sup>145</sup>. La IL-2 es un producto de las células T activadas y puede activar los “limphokine-activated killer” (LAK) que pueden lesionar, entre otras, las células endoteliales. La IL-2 se encuentra aumentada en el suero de los pacientes con esclerosis sistémica y parece correlacionarse con la progresión de la induración cutánea<sup>146</sup>.

La proliferación de los fibroblastos esta aumentada en respuesta a ciertos mitógenos (TGF- $\beta$ ) y estas células muestran una anormal respuesta a los factores de crecimiento con un permanente estado de competencia<sup>136</sup>.

Se desconoce si la producción de autoanticuerpos tienen un papel en la patogénesis de la enfermedad o es simplemente un epifenómeno asociado a la enfermedad. Alguno de los antígenos frente a los que reaccionan los pacientes con esclerosis sistémica tienen respuesta autoinmune (colágeno tipo I, colágeno tipo IV y laminina) son componentes de la lámina basal, de la cual la lámina basal endotelial es el prototipo<sup>136</sup>.



**FIGURA 31.** Esquema hipotético de la patogénesis de la esclerodermia.

Hipotéticamente, los pacientes con déficit moderado de  $\alpha$ -1-AT podrían tener una menor inhibición de la IL-1 y podría provocar una mayor proliferación de los fibroblastos. Por otro lado, sería posible que un déficit parcial de la función de la  $\alpha$ -1-AT produjera un aumento en la actividad de los linfocitos T Helper y, en consecuencia, que los valores de IL-2 fueran mayores provocando mayor daño epitelial y presentando una mayor progresión de la induración cutánea. Estos datos vendrían reforzados por la constatación, de forma estadísticamente significativa, que los pacientes con fenotipos deficitarios presentan con más frecuencia induración cutánea en los primeros 5 primeros años desde la aparición del Raynaud. No obstante, el hecho de encontrar un índice CD4/CD8 inferior (aunque no estadísticamente significativo) en los pacientes Pi no MM no apoyaría este atractivo mecanismo fisiopatológico. En este sentido, sería interesante realizar un estudio en el que se valoraran si hay diferencias en el valor sérico de IL-1 y IL-2 en ambos grupos (Pi MM y Pi no MM) de pacientes con esclerosis sistémica.

La esclerosis sistémica se asocia con frecuencia a enfermedad pulmonar intersticial, que puede provocar una progresiva insuficiencia respiratoria y constituye una de las causas principales de muerte en esta enfermedad, sin que se disponga en la actualidad de ningún tratamiento efectivo que cambie su curso clínico. En nuestro estudio no hemos podido demostrar globalmente que los enfermos con esclerosis sistémica y fenotipos deficitarios presenten de forma estadísticamente significativa una mayor frecuencia afectación pulmonar. No obstante, nuestros datos difieren sustancialmente del trabajo de Michalski et al.<sup>101</sup> donde no encontraron ningún paciente con afectación pulmonar y fenotipo Pi no MM en 28 pacientes estudiados.

En cambio sí que hemos podido constatar una afectación pulmonar más grave, valorada mediante las pruebas funcionales respiratorias (VEMS, capacidad vital y estudio de la DLCO), y una peor evolución funcional en aquellos pacientes con fenotipos moderadamente deficitarios. Así, ningún paciente Pi no MM del que disponíamos PFR iniciales presentaba unos valores espirométricos normales y, en su evolución posterior, únicamente uno de ellos presentó una mejoría

en su valoración funcional. Resultados que no parecen estar relacionados con el hábito tabáquico. No obstante, sería necesaria una valoración de un número más amplio de enfermos con fenotipos deficitarios para confirmar estos datos.

La patogénesis de la enfermedad pulmonar intersticial es desconocida. Se sugiere que la inflamación crónica del tracto respiratorio inferior, con acumulación local de células efectoras inflamatorias pudiera provocar la fibrosis pulmonar<sup>147-148</sup>. En este sentido, se ha objetivado alveolitis neutrofílica en aproximadamente el 50% de los pacientes con esclerosis sistémica correlacionándose con una mayor depresión de la función pulmonar y un aumento de las anomalías en la Rx de tórax<sup>148</sup>. El mecanismo mediante el cual los neutrófilos se acumulan en el espacio alveolar es poco conocido. Si tomamos como modelo la fibrosis pulmonar idiopática, una enfermedad morfológicamente indistinguible de la fibrosis debida a la esclerodermia, parece ser que tiene un papel fundamental la IL-8 que es un importante activador y tiene actividad quimiotáctica para los neutrófilos<sup>149</sup>. La acumulación crónica de neutrófilos en el espacio aéreo que provoca un daño persistente en la barrera epitelial mediante los enzimas proteolíticos y los radicales derivados del oxígeno, con una reparación posterior anormal, se ha planteado como la causa de la fibrosis pulmonar idiopática<sup>150</sup>. El efecto nocivo de los neutrófilos es mediado, parcialmente, por la liberación local de elastasa que supera la defensa anti-elastasa local que depende fundamentalmente de la presencia de  $\alpha$ -1-AT funcionando en el espacio aéreo<sup>151</sup>.

Crestani et al.<sup>152</sup> estudiaron 11 pacientes con esclerosis sistémica y enfermedad pulmonar intersticial encontrando que la alveolitis neutrofílica se asociaba con un incremento de la elastasa total y de la actividad de la elastasa detectable en el BAL, a pesar del incremento local de las concentraciones de  $\alpha$ -1-AT. Por otro lado, detectaron que la secreción “in vitro” de IL-8 por los macrófagos alveolares se encontraba aumentada. Estos hallazgos sugerirían que en el pulmón de los pacientes con esclerodermia los neutrófilos alveolares liberaban elastasa, que podría ser la causa de la lesión de las estructuras pulmonares, y que la atracción de los neutrófilos al espacio alveolar era

debida, en parte, a la secreción de IL-8 por los macrófagos alveolares. La concentración de  $\alpha$ -1-AT, el principal inhibidor de las elastasas, en el BAL de estos pacientes fue paradójicamente elevado sugiriendo que esta  $\alpha$ -1-AT podría ser inactiva y en consecuencia no actuar eficazmente contra las elastasas. Así el resultado del desequilibrio elastasa-antielastasa podría inducir una alteración crónica de la barrera epitelial con reparación anormal y, posteriormente, provocar una fibrosis pulmonar.

Aunque la fibrosis pulmonar idiopática y la fibrosis pulmonar de los pacientes con esclerodermia son indistinguibles histopatológicamente, ambas entidades tienen un pronóstico claramente diferenciado. La fibrosis pulmonar secundaria a la esclerodermia tiene una supervivencia mucho mayor que la de etiología idiopática. En este sentido Cailes et al.<sup>153</sup> realizaron un estudio en ambas patologías observando diferencias significativas en el número de neutrófilos en el BAL y en la actividad de las enzimas colagenasa y mieloperoxidasa (incrementadas en la fibrosis pulmonar idiopática) a pesar de tener una similar disminución de los índices de función pulmonar. Estos datos sugerirían que las diferencias entre la migración de neutrófilos y su activación podrían tener importancia en el pronóstico de la enfermedad.

Estos autores encontraron en la afectación pulmonar secundaria a la esclerodermia un aumento de los complejos elastasa/ $\alpha$ -1-AT, detectándose en pocos pacientes colagenasa y mieloperoxidasa con lo que sugerían que el mecanismo de activación de los neutrófilos era diferente y que ésta podía ser una de las causas de su mejor pronóstico. En este sentido probablemente jugaría un papel importante la menor producción de IL-8 en la fibrosis pulmonar secundaria a la esclerodermia respecto la fibrosis pulmonar idiopática, con lo que disminuiría el nivel de neutrófilos y, por lo tanto, la liberación de enzimas en el tracto respiratorio inferior.

En consecuencia, es probable que el déficit parcial de  $\alpha$ -1-AT provoque una disminución de su actividad contra la elastasa causando un desequilibrio elastasa-antielastasa, favoreciendo una alteración crónica de la barrera epitelial con reparación anormal y, posteriormente, provocando una

fibrosis pulmonar<sup>152</sup> con peor pronóstico funcional. De hecho, es conocido que los pacientes con fenotipo PiSS tiene una menor capacidad para inhibir las elastasas aunque se considera que es suficiente para no provocar enfisema<sup>154</sup>.

No obstante, es posible que una situación con persistente actividad neutrofílica, inducida por la IL-8, con la consiguiente liberación de elastasa pudiera “superar” la capacidad antiproteasa de un paciente con esclerodermia y un fenotipo moderadamente deficitario.

En consecuencia, en un futuro si nuestros datos se confirmaran en series más amplias debería plantearse un estudio valorando el tratamiento sustitutivo con  $\alpha$ -1-AT en aquellos pacientes con esclerodermia, afectación pulmonar y fenotipos deficitarios. Esta idea podría apoyarse con un estudio de laboratorio en hámsters donde la infusión de  $\alpha$ -1-AT atenuaba el desarrollo de fibrosis pulmonar inducida por la bleomicina<sup>155</sup>.

Otro dato sorprendente de nuestro trabajo es la relación que hemos encontrado entre los anticuerpos anti-SCL 70 y los fenotipos Pi no MM. De los 10 pacientes que presentaban dichos anticuerpos la mitad de ellos tenían fenotipos moderadamente deficitarios para la  $\alpha$ -1-AT. Los anticuerpos anti-SCL 70 son anticuerpos que reconocen el enzima nuclear topoisomerasa I y se encuentran en un 20-30% de pacientes con esclerodermia difusa. Estos anticuerpos se han asociado con la afectación cutánea difusa y la enfermedad pulmonar intersticial<sup>136</sup>. No obstante, en la actualidad se desconoce si estos anticuerpos tienen un papel en la patogénesis de la enfermedad o simplemente son un epifenómeno.

Por lo tanto también es difícil dilucidar en la actualidad si la asociación, entre los anticuerpos anti-SCL 70 y los fenotipos moderadamente deficitarios, puede ser simplemente el reflejo de una mayor frecuencia de estos fenotipos en la forma difusa de la esclerodermia o que pueda tener implicaciones fisiopatológicas. Otro dato destacable es que ningún paciente con fenotipos Pi no MM han presentado Ac. anticentrómero positivos aunque no ha tenido repercusión estadísticamente significativa.

Los hallazgos capilaroscópicos en ambos grupos de paciente (PiMM y Pi no MM) no han mostrado diferencias en los patrones analizados, presentando pérdida difusa de capilares y megacapilares con una frecuencia similar.

En resumen, podemos concluir que los pacientes con fenotipos Pi no MM y esclerodermia son pacientes con un inicio precoz de la enfermedad, con aparición de induración cutánea en los primeros años desde el inicio de la sintomatología, con una afectación pulmonar que cursa con un pronóstico funcional peor, habitualmente con Ac anti SCL-70 positivos y sin que acostumbre a asociarse un síndrome seco o afectación cardíaca. Muchos de estos datos son comunes a la presentación de la forma difusa de la esclerosis sistémica por lo que es difícil precisar si el fenotipo deficitario de la  $\alpha$ -1-AT es la causa de alguna de estas alteraciones o simplemente es la consecuencia de estar asociado a esta forma clínica. En todo caso estos hallazgos apoyarían la idea que esta forma de esclerodermia tiene un curso clínico y, probablemente, una base fisiopatológica diferenciada.

Finalmente reseñaremos que en esta patología la determinación sérica de  $\alpha$ -1-AT sería una buena prueba de cribado para la detección de los fenotipos deficitarios en esta patología.



## 4.2 LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO

En una investigación realizada en Suecia sobre 246 individuos PiZZ se detectaron un 0,8% de enfermos con Lupus eritematoso sistémico<sup>40</sup>. Por lo que se podía suponer que los fenotipos deficitarios podían tener un papel en la patogenia de esta enfermedad. Esta hipótesis vendría reforzada por los resultados de Breit al.<sup>86</sup> que en un estudio de 58 enfermos afectados de LES encontraron diferencias estadísticamente significativas en la presencia del fenotipo PiMS (14%) respecto el grupo control. Estos autores, aunque no diseñaron el estudio para valorar variaciones en el comportamiento clínico, sugerían que no parecía que tuvieran un peor curso clínico los pacientes con LES y fenotipos moderadamente deficitarios.

En nuestro estudio, que dispone de un número de enfermos discretamente superior, no hemos podido demostrar que ninguno de los fenotipos se encuentre aumentado de forma estadísticamente significativa. De hecho, la distribución de los diferentes fenotipos en los pacientes con LES es prácticamente idéntica a los de la población control. No obstante, debemos reseñar que hemos detectado 10 pacientes (12,04% del total) que presentan unos valores séricos de  $\alpha$ -1-AT inferiores a 120 mg/dl y 3 de ellos menores de 110 mg/dl a pesar de ser catalogados como portadores de un fenotipo PiMM. Es conocido que algunos alelos infrecuentes se han relacionado con una disminución de la síntesis de  $\alpha$ -1-AT y algunos de ellos son de difícil identificación mediante la técnica de isoelectroenfoque como el Pi Plovel, Pi Pduarte o Pi Mpalermo. En concreto este último alelo, que produce un déficit de  $\alpha$ -1-AT, presenta un punto isoeléctrico similar al de la variante normal PiMM, por lo que tiene la misma migración electroforética y no pueden diferenciarse<sup>156</sup>. Por este motivo quizás sería interesante en estos pacientes la caracterización molecular del gen con la finalidad de descartar estos alelos deficitarios.

No obstante, en un trabajo de Mackiewick et al.<sup>157</sup> se encontraron diferencias en el patrón de glicosilación de las proteínas de la fase aguda en los pacientes con LES activo respecto a los

pacientes con artritis reumatoide activa. Estos hallazgos sugerían que la actividad de la artritis reumatoide, pero no la del LES, estaba en relación con la activación de los monocitos. Estos datos podrían explicar el hecho de que en el suero de los pacientes con LES con diferentes grados de actividad de la enfermedad no existe una elevación o aparece una elevación discreta de las proteínas de fase aguda. También parece que en estos enfermos podría haber una producción defectuosa de IL-1<sup>158</sup>. Quizás por este motivo la  $\alpha$ -1-AT (que actúa principalmente a nivel de los monocitos inhibiendo, probablemente, la IL-1) y, en consecuencia, su déficit no juegue un papel relevante en la patogénesis de esta enfermedad.

En referencia al estudio del comportamiento clínico en el Lupus eritematoso sistémico no se han objetivado diferencias entre los portadores de fenotipo normal respecto aquellos que son portadores de fenotipos deficitarios. El número de órganos afectados en los dos grupos era similar lo que va definitivamente en contra de una mayor multiorganidad en la afectación de los pacientes Pi no MM. En el análisis de los diferentes órganos dianas tampoco se han detectado diferencias estadísticamente significativas. Únicamente se ha evidenciado una mayor relación del síndrome seco con el fenotipo Pi MM y de la púrpura vasculítica con los fenotipos Pi no MM pero sin alcanzar repercusión estadística. Esta relación entre vasculitis y LES, en el contexto de un fenotipo deficitario, podría sugerir la posibilidad que el déficit de  $\alpha$ -1-AT este implicado en esta asociación; pero sería preciso un estudio más amplio y específico para demostrar este hecho.

Tampoco parece que los dos grupos difieran sustancialmente tanto en los datos analíticos como inmunológicos.

Finalmente con los datos que disponemos, la evolución y la agresividad de los pacientes con LES que presentan fenotipos deficitarios es similar al grupo de pacientes con fenotipo PiMM valorados tanto en el número de recaídas anuales como en la necesidad de tratamientos agresivos para controlar la enfermedad.

Por todo ello podemos concluir, en vista a lo referido anteriormente, que el déficit

moderado de  $\alpha$ -1-AT en los enfermos con Lupus eritematoso sistémico no parece influir ni en la patogénesis de la enfermedad ni parece tener un curso clínico más agresivo o multisistémico.

### 4.3. MIOPATIA INFLAMATORIA IDIOPATICA

La distribución por fenotipos en los pacientes con miopatía inflamatoria idiopática no ha mostrado diferencias estadísticamente significativas respecto la población control.. Tampoco hemos encontrado un patrón fenotípico diferente en los tipos de miopatías inflamatorias analizados: polimiositis (PM) y dermatomiositis (DM) del adulto, PM/DM asociada a neoplasia y PM/DM asociadas a otras conectivopatías. La distribución de los pacientes con miopatía inflamatoria idiopática, según la clasificación de Bohan y Peter, no es diferente a la encontrada por Miró et al.<sup>159</sup> en un estudio de 135 pacientes realizado en nuestro medio.

En cambio, si que hemos detectado que el número de órganos afectados era mayor de forma estadísticamente significativa en los pacientes con fenotipos moderadamente deficitarios.

Existen un amplio espectro de agentes tóxicos e infecciones que puede desencadenar una miositis. La lista de drogas que pueden causar esta enfermedad es larga e incluye, entre otras, los esteroides, la lovastatina, la zidovudina y la D-penicilamina<sup>160</sup>. Por otro lado, las miositis virales son entidades bien definidas, los virus influenza, coxsackie y echo son los implicados con mayor frecuencia. Hay, además, varias razones para relacionar las infecciones víricas con las miopatías inflamatorias idiopáticas. En primer lugar, en algunos enfermos con miositis idiopáticas se han detectado títulos elevados de anticuerpos contra los virus coxsackie<sup>161</sup>. En segundo lugar, partículas similares a los picornavirus se han observado en el estudio ultraestructural del músculo miosítico<sup>162</sup>. En tercer lugar, varios picornavirus se han identificado interaccionando con las sintetasas RNAt-aminoacetil que se trata de un blanco de varios autoanticuerpos específicos de miositis, sugiriendo la posibilidad que el virus inicie una miositis viral y la producción de autoanticuerpos<sup>163,164</sup>. En cuarto lugar, los adenovirus han sido identificados como una de las causas de miositis por cuerpos de inclusión<sup>165</sup>. Y en quinto lugar, los retrovirus, incluyendo el HIV el HTLV-1, han sido asociados con miositis<sup>166</sup>. No obstante, a pesar que en algunos casos se ha podido identificar la causa de la

miositis en la mayoría de casos la causa sigue siendo desconocida.

También parece que factores genéticos como el HLA-DR3 y el DRw52 se han asociado con la miositis juvenil y del adulto<sup>167</sup>.

Las biopsias de las miopatías inflamatorias idiopáticas evidencian una distribución diferente de los linfocitos. Así en las regiones perivasculares se observan una predominancia de células B, las células T tienden a localizarse en la zona del endomisio y los macrófagos se encuentran tanto en las regiones perivasculares, en el endomisio y en el perimisio<sup>168</sup>. Por otro lado, también se detectan diferencias en la distribución de las subpoblaciones de los linfocitos en los diferentes grupos clínicos.

En la dermatomiositis, las células B son relativamente abundantes, especialmente en las regiones perivasculares. También hay células T activadas en el endomisio, siendo principalmente CD8. En las regiones perivasculares y en la zona del perimisio aparece un aumento de células T CD4<sup>169</sup>.

En contraste, la polimiositis presenta escasas células B y el examen ultraestructural muestra que las fibras musculares se encuentran aplanadas de cavidades llenas de macrófagos y células T CD8. En el perimisio y en la región perivascular aumentan los CD4<sup>170</sup>.

Los marcadores de la activación de las células mononucleares, IL-2 e IL-1 $\alpha$  se han encontrado elevados en los pacientes con miositis activa, considerándose que pueden ser útiles como marcadores de actividad<sup>171</sup>. En este sentido, recientemente se ha publicado un trabajo en el que se ha observado una predominancia de IL-1  $\alpha$  y  $\beta$  en el estudio del tejido muscular de las miopatías inflamatorias idiopáticas<sup>172</sup>.

A pesar de tener evidencias convincentes que los linfocitos se encuentran implicados en la patogénesis de las miositis su papel exacto es todavía desconocido.

Nosotros consideramos que probablemente los portadores de un fenotipo con un déficit moderado de  $\alpha$ -1-AT, tras la agresión inicial que pudiera ser de etiología vírica, tóxica u otra no identificada en la actualidad, son incapaces de producir la cantidad suficiente de  $\alpha$ -1-AT capaz de

inhibir probablemente la IL-1 con lo que se provocaría una respuesta inflamatoria excesiva mediada por los CD4, mediante la IL-2, causando finalmente la citotoxicidad directa de las células T sobre el músculo y otros órganos diana.

A parte de este mecanismo patogénico mediado por la inmunidad celular se han detectado autoanticuerpos en esta enfermedad. El reciente descubrimiento de una familia de autoanticuerpos que casi exclusivamente aparecen en los pacientes con miositis (autoanticuerpos específicos-miositis) ha obligado a profundizar en el estudio de la inmunidad humoral en esta familia de enfermedades heterogénea<sup>173</sup>. El más prevalente de estos anticuerpos es el Anti-Jo-1 (15-40%) cuyo blanco antigénico es el enzima histidil-tRNA sintetasa y que se ha asociado con la enfermedad pulmonar intersticial<sup>174</sup>. En general, se sugiere que estos autoanticuerpos son la “huella” de otro acontecimiento, como podía ser una infección viral previa de los miocitos, y que no participan directamente en la lesión de las células musculares<sup>175</sup>.

Otro resultado destacable de nuestro trabajo es la asociación estadísticamente significativa que hemos encontrado entre los fenotipos Pi no MM y la afectación pulmonar de las miopatías inflamatorias idiopáticas. Esta relación es independiente de la presencia de anticuerpos anti-Jo-1 y quizás puede ser debidos a dos mecanismos fisiopatológicos diferentes. No obstante, es probable que el hecho de tener anticuerpos anti-Jo-1 positivos y/o ser portador de un fenotipo deficitario sean datos complementarios que puede ayudar a los clínicos a definir que grupo de pacientes con miopatías inflamatorias idiopáticas tienen un riesgo más elevado de presentar afectación pulmonar. Así, en nuestro estudio el riesgo ha sido de 49 veces mayor, aunque son datos que deben interpretarse prudentemente dado el escaso número de pacientes y creemos que serían precisos estudios más amplios para confirmar esta observación.

La enfermedad pulmonar intersticial es una complicación que ocurre en el 10-30% de los pacientes y que se ha asociado recientemente con las células T citotóxicas<sup>176</sup>. Este hallazgo nos refuerza nuestra hipótesis que la alteración en la inmunoregulación debida al déficit moderado de  $\alpha$ -

1-AT en los pacientes con miopatías inflamatorias determina una mayor citotoxicidad directa de las células T en los órganos diana.

Finalmente hemos observado una mayor mortalidad en aquellos pacientes con fenotipo Pi no MM comparándolo con Pi MM (28,6% y 11,8% respectivamente) pero sin alcanzar significación estadística.

#### 4.4. VASCULITIS

Dentro del grupo de vasculitis hemos encontrado una incidencia de fenotipos moderadamente deficitarios elevada de forma estadísticamente significativa respecto la población control. En todos síndromes vasculíticos hemos encontrado fenotipos deficitarios en más de un 40% de los casos, excepto en la panarteritis nodosa. Aunque, como hemos comentado en la introducción, existen diferentes estudios en que se valoraban los fenotipos en vasculitis cANCA y pANCA positivos no existe ningún trabajo que analice la incidencia de los diferentes fenotipos en las vasculitis de forma global. Para su estudio no hemos contemplado dentro de este grupo las vasculitis secundarias a otros procesos autoinmunes para evitar posibles interferencias en los resultados de ambas enfermedades.

La relación entre el déficit de  $\alpha$ -1-AT y las vasculitis sistémicas difícilmente puede ser accidental. La incidencia anual de vasculitis sistémicas (excluyendo la arteritis de Horton) es de 3,9 por 100.000, la incidencia de granulomatosis de Wegener es muy baja (0,4 por 100.000 en Minnesota,USA), al igual que la PAN y la poliangeitis microscópica (0,46 por 100.000 en Inglaterra). Así la frecuencia esperada de esta combinación debería ser baja<sup>177</sup>.

La patogénesis de las vasculitis es compleja y engloba una variedad de mecanismos que actúan comúnmente provocando una inflamación necrotizante en la pared de los vasos sanguíneos. El acontecimiento inmunopatogénico primario que inicia el proceso de inflamación vascular es desconocido en la actualidad y las causas de que existan diferentes procesos vasculíticos con diferentes presentaciones clínicas sigue siendo un misterio.

La adhesión de células a las proteínas de la matriz extracelular es de vital importancia en la generación de una respuesta inmune normal. Cambios cuantitativos y cualitativos de las moléculas de adhesión presentes en el endotelio vascular y en los leucocitos son importantes en las células que median la respuesta inmune específica e inespecífica en los lugares con inflamación extravascular<sup>178</sup>.



Las mismas moléculas de adhesión parece que median en las respuestas inmunes patológicas en las vasculitis y otras enfermedades autoinmunes.

La  $\beta_1$  y  $\beta_2$  integrinas son los subgrupos de moléculas de adhesión más abundantemente expresados en los leucocitos y los más directamente implicados en la patogénesis de las vasculitis. Las  $\beta_2$  integrinas tienen un papel clave en la unión de los leucocitos con las células endoteliales y con la migración transendotelial de los leucocitos hacia la localización de la inflamación. La  $\beta_2$  integrina LFA-1 es también importante en las funciones efectoras del linfocito incluyendo la activación del linfocito T y la citotoxicidad del “natural killer” y el linfocito T<sup>179</sup>. El “ligand” de la LFA-1 en las células endoteliales y otras células es el ICAM-1, que es un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas<sup>180</sup>.

Las  $\beta_1$  integrinas VL-4 y VL-5 se encuentran presentes en los linfocitos, monocitos y eosinófilos y actúan en la interacción de estas células con las proteínas de la matriz extracelular (ej. Fibronectina) y las células endoteliales. El “ligand” endotelial del VL-4 es el VCAM-1, otro miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas. La unión del VL-4, VCAM-1 y la fibronectina puede jugar un importante papel en la acumulación y activación de las células T en la localización de la inflamación<sup>181</sup>.

Son muy interesantes los hallazgos de que el desarrollo de vasculitis hemorrágica tras una inyección intraepidérmica de endotoxina puede ser bloqueada si tratamos el animal previamente con anticuerpos contra el ICAM-1 y la observación de que el incremento de la expresión de las moléculas de adhesión en los leucocitos circulantes se relaciona con vasculitis asociadas con enfermedades autoinmunes<sup>182</sup>.

El  $\alpha$ -TNF y la IL-1 son las citoquinas con efectos biológicos particularmente relevantes en la patogénesis de las vasculitis. Sus efectos incluyen:

- La promoción de la adhesión leucocitaria, su activación y la migración, mediante la inducción de la expresión de las moléculas de adhesión, hacia las células endoteliales.
- La inducción de la secreción de IL-6 e IL-8 por las células endoteliales, las cuales facilitan la estimulación local de las células endoteliales vecinas y los leucocitos.
- Efectos pro-coagulantes, inhibiendo la regulación del complejo antitrombótico proteína C/proteína S<sup>183</sup>.

En este sentido, se han detectado concentraciones séricas elevadas de IL-1, IL-2, IL-6 y  $\alpha$ -TNF en pacientes con vasculitis sistémica<sup>184</sup>.

Desde hace años se conoce que el anormal depósito de complejos inmunes antígeno-anticuerpo en la pared de los vasos era clave para la patogénesis de varios síndromes vasculíticos. El modelo animal conocido como la reacción de Arthus desarrolla una vasculitis cutánea focal en el lugar donde se ha inyectado en el animal un antígeno previamente inmunizado. Los inmunocomplejos formados en la pared del vaso provocan una cascada de respuesta inflamatoria que determina la lesión del vaso. La habilidad de los inmunocomplejos para activar el complemento, sea mediante la vía clásica o alternativa aumenta la permeabilidad vascular y provoca la producción de factores quimiotácticos que reclutan neutrófilos y monocitos dentro del área. Esta interacción produce la activación celular y la liberación de citoquinas, radicales oxígeno y enzimas proteolíticos que causa una escalada adicional en el daño vascular. La formación de inmunocomplejos juega claramente un papel fundamental en síndromes vasculíticos como la panarteritis nodosa asociada a la hepatitis B, la vasculitis cutánea aislada, la púrpura de Schönlein-Henoch y la crioglobulinemia mixta esencial o recientemente asociada al VHC<sup>185</sup>. En cambio, en otros tipos de vasculitis hay poca evidencia que los inmunocomplejos estén implicados en su patogénesis. Es el caso de la granulomatosis de Wegener, la poliangeitis microscópica, la arteritis de Takayasu y la arteritis de células gigantes<sup>186</sup>.

Una de las características histológicas de la lesión vascular en la granulomatosis de Wegener, la arteritis de Takayasu y la arteritis de células gigantes es la presencia de inflamación granulomatosa con células gigantes multinucleadas. La inflamación granulomatosa se trata de un proceso mediado por los linfocitos CD4 y los macrófagos y se caracteriza por una acumulación focal de macrófagos, células epiteloides, linfocitos y células gigantes multinucleadas. Los estudios inmunohistoquímicos han mostrado que los infiltrados celulares en las lesiones renales y pulmonares de la granulomatosis de Wegener y las lesiones de la arteria temporal en la arteritis de células gigantes contienen principalmente macrófagos y células T CD4<sup>187,188</sup>.

Es posible que los pacientes con déficits moderados de  $\alpha$ -1-AT, cuando aparece el evento inmunopatogénico primario que inicia la patogenia de las vasculitis, no consigan alcanzar los niveles óptimos de  $\alpha$ -1-AT suficientes para inhibir la IL-1 de los macrófagos con lo cual se provocaría un aumento de la migración, activación y adhesión de los leucocitos, un aumento de la secreción de IL-6 e IL-8 por las células endoteliales y aumentaría los efectos procoagulantes.

En el caso de la arteritis de la arteria temporal, que se caracteriza histológicamente por una infiltración de células mononucleadas, la presencia de células gigantes multinucleadas y la destrucción de la lámina elástica interna donde parece desempeñar un papel relevante la elastasa del neutrófilo humano<sup>189,190</sup>. Este enzima, que se libera bajo la acción de diferentes estímulos (interleukina 1, tumor necrosis factor- $\alpha$ , endotoxinas), es uno de los pocos enzimas que son capaces de hidrolizar la elastina y destruir las fibras elásticas<sup>189</sup>. Cuando se libera en la sangre rápidamente se une a su principal inhibidor, la  $\alpha$ -1-AT<sup>190</sup>. En este sentido Génereau et al.<sup>191</sup> observaron, en todos los casos estudiados con esta vasculitis, niveles significativamente elevados del complejo elastasa- $\alpha$ -1-AT. Nuestros datos sobre este tipo de arteritis, donde hemos detectado un 50% de fenotipos deficitarios, sugeriría la hipótesis que una menor inhibición de la elastasa favorecería la hidrólisis de la elastina y la destrucción de la lámina elástica interna de las arterias.

Esta hipótesis vendría reforzada por el hecho que, en los estudios experimentales con ratas, la elastasa puede inducir aneurismas vasculares y que el aumento de la actividad de la elastasa puede provocar rotura espontánea de la lámina elástica interna<sup>192</sup>. Por otro lado, algunos autores han encontrado concentraciones de  $\alpha$ -1-AT bajas en aquellos pacientes con múltiples aneurismas y con roturas de aneurismas comparándolas con aquellos con enfermedad aórtica oclusiva<sup>193</sup>. También se ha establecido una posible relación entre déficits heterocigotos y aneurismas aórticos abdominales<sup>194</sup>.

Otra interesante posibilidad que planteamos es el potencial rol que puede jugar la  $\alpha$ -1-AT en la fibrinólisis extravascular. Aunque la contribución de la elastasa en la fibrinólisis es difícil de calcular, parece claro que tiene un importante papel en la degradación de la fibrina y el fibrinógeno en el espacio extravascular. Los leucocitos podrían facilitar la fibrinólisis en los tejidos mediante la expresión de activadores del plasminógeno y la liberación de proteasas lisosomales. De hecho, en muchas enfermedades inflamatorias y tumorales se puede detectar marcadores de la actividad fibrinolítica en el plasma: como son el D-dímero, los complejos plasmina-antiplasmina (PAP) y los complejos elastasa-antitripsina (EAT). Además en las enfermedades del tejido conectivo y en las vasculitis se objetivan marcadores que podrían sugerir que la fibrinólisis extravascular puede estar implicada en su patogénesis. Así en la púrpura de Schönlein-Henoch se encuentran concentraciones elevadas de EAT y D-dímero junto con disminución del factor XIII<sup>195</sup>. Quizás el déficit moderado de  $\alpha$ -1-AT y la falta de inhibición de la elastasa consecuente podría favorecer una mayor fibrinólisis extravascular.

Por otro lado, hemos encontrado una relación estadísticamente significativa entre las vasculitis PR3-ANCA y el alelo Z, pero esta asociación no se ha detectado en aquellos con alelo PiS . De hecho, todos los pacientes que eran portadores del alelo Z en nuestra serie de vasculitis han sido PR3-ANCA positivos lo que podría sugerir que los enfermos PiZ tienen una especial predisposición a desarrollar vasculitis PR3-ANCA positivas y que el desequilibrio proteasas-antiproteasas puede ser un mecanismo fisiopatológico importante en este tipo de vasculitis. No obstante se pueden plantear otras posibilidades teóricas.

Aunque el PR3 es el mayor autoantígeno de los c-ANCA, otras proteasas localizadas dentro de los gránulos de los neutrófilos (elastasa, Cathepsina G, lactoferrina, lisozima o  $\beta$ -glucuronidasa) han sido descritos como blancos de los ANCA. Por otro lado, también se han descrito antígenos relacionados con infecciones como blancos de los ANCA como la "bactericidal/permeability increasing protein (BPI) y el lisosoma asociado a la proteína de membrana 2 (h-lamp-2)<sup>196</sup>. Estos datos apoyan la idea que los ANCA pueden asociarse a varias infecciones. La mayoría de los antígenos de los ANCA son componentes utilizados por los neutrófilos en la defensa del huésped, pero el papel en la generación de una respuesta inmune y el rol de las infecciones no está determinado. Ciertamente hay evidencias que una infección intercurrente puede provocar una exacerbación de las vasculitis sistémicas y que los portadores crónicos nasales de *Staphylococcus aureus* predispone a las recaídas en los pacientes con vasculitis sistémicas<sup>197</sup>. Además hay datos que apoyan que el cotrimoxazol puede ser un tratamiento válido en aquellos pacientes con enfermedad de Wegener limitada y que disminuye las recaídas en las formas multisistémicas<sup>198</sup>.

Se han planteado varios mecanismos para explicar como la interacción de los antígenos con los ANCA pueden provocar una vasculitis necrotizante. Una teoría sugiere que los neutrófilos pueden activarse por estímulos pro-inflamatorios como la IL-1, el TNF o productos microbianos provocando una translocación de pequeñas cantidades de antígenos ANCA en la superficie de los neutrófilos, favoreciendo su accesibilidad a los ANCA. Probablemente los ANCA facilitarían la adherencia de los neutrófilos a las células endoteliales vasculares e, indirectamente, mediaría la lesión de las células endoteliales y la transmigración de los neutrófilos dentro del espacio perivascular<sup>199</sup>.

Estos anticuerpos tienen un valor en el diagnóstico de la granulomatosis de Wegener ya que los cANCA se encuentran aproximadamente en el 95% de los pacientes con enfermedad generalizada en fase activa. Además, la elevada frecuencia de ANCA y el hecho de que el título se correlacione con la actividad de la enfermedad en algunos pacientes sugiere que estos anticuerpos participan en la patogénesis de la enfermedad<sup>200</sup>.

Los ANCA interfieren con la proteasa 3, principal antígeno de los cANCA, en la granulomatosis de Wegener. Existe una teoría que sugiere que los ANCA interfieren en la función de la proteasa 3 formando complejos PR3-ANCA que podrían estar controlados por la  $\alpha$ -1-AT<sup>201</sup>. En este sentido, Baslund et al.<sup>202</sup> realizaron un estudio donde examinaron los complejos PR3/ $\alpha$ -1-AT, detectados mediante ELISA, en pacientes con granulomatosis de Wegener que presentaban PiZ y no PiZ. No encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en la media de los niveles de los complejos PR3/ $\alpha$ -1-AT que atribuyeron a que las concentraciones séricas de  $\alpha$ -1-AT en pacientes PiZ fueron normales como resultado de la actividad de la enfermedad y sugirieron que era preciso una escasa cantidad de  $\alpha$ -1-AT para inactivar la PR3 en la circulación sistémica.

Callea et al.<sup>203</sup> encontraron en un 8% el alelo PiMZ en 84 pacientes c-ANCA y p-ANCA positivos. Todos los pacientes heterocigotos tenían unos valores de  $\alpha$ -1-AT superiores al rango normal durante la fase aguda de la enfermedad, que se correlaciona con nuestros resultados, lo que confirma que la determinación de la  $\alpha$ -1-AT no es válida para la determinación de los fenotipos deficitarios en estas patologías. Estos autores detectaron que paradójicamente el 29,6% de los pacientes con fenotipo PiMM presentaban unos valores de  $\alpha$ -1-AT bajos ( $< 190$  mg/dl) durante la fase aguda y normales en fase de remisión. En uno de ellos se detectó una mutación a nivel de una secuencia de 8 nucleótidos (octámero) en una región próxima al extremo 3' AAT, con lo que plantearon que otros mecanismos que no son los fenotipos PiZ, deben estar implicados en esta respuesta anormal en la fase aguda de la enfermedad. En aproximadamente el 40% de estos pacientes se detectaron también unos valores séricos de PCR anormales en la fase aguda, por lo que se podía plantear que existen alteraciones en diferentes niveles de la cascada implicada en la respuesta de la fase aguda: citoquinas, receptores de la membrana celular y proteínas nucleares. El grupo de pacientes que tenían en fase aguda unos valores séricos de  $\alpha$ -1-AT menores presentaban con menor frecuencia afectación renal, siendo la mortalidad similar en ambos grupos. Este hecho aparentemente contradice la teoría de que es necesaria un aumento de la  $\alpha$ -1-AT para proteger el organismo de las proteasas séricas liberadas por la degranulación de los leucocitos. Una explicación de este fenómeno podría recaer en las diferentes fuentes de síntesis extrahepática en los PMN, macrófagos y túbulos renales que no contribuyen en el nivel de  $\alpha$ -1-AT circulante y que sus mecanismos de regulación de la síntesis son diferentes a los de los hepatocitos<sup>204</sup>. En nuestro trabajo, aunque no estaba diseñado para valorar este punto, hemos detectado 3 pacientes (16,7%) con vasculitis y PiMM que presentaban valores séricos de  $\alpha$ -1-AT  $< 190$  mg/dl asociados a un VSG  $> 60$ .

Los cANCA pueden inducir a los monocitos a liberar la IL-8 y esta puede tener un importante papel regulador en el proceso de la enfermedad. Los monocitos expresan en la superficie la PR-3 después del estímulo del  $\alpha$ TNF y liberan IL-8 en respuesta probablemente a la interacción con los anti-PR3-IgG que se encuentra mediada por receptores Fc $\gamma$ . La  $\alpha$ -1-AT puede inhibir la liberación de la IL-8 ligándose a la superficie que expresa el PR3 evitando la unión antígeno-anticuerpo. Es interesante la hipótesis que una interacción defectuosa entre PR3- $\alpha$ -1-AT puede favorecer la interacción del cANCA con la PR3 liberándose IL8 por el monocito y, en consecuencia, el reclutamiento de neutrófilos y el daño tisular mediado por radicales oxígeno y enzimas lisosomales<sup>205</sup>.

Haubitz et al.<sup>206</sup> determinaron los complejos elastasa- $\alpha$ -1-AT en plasma de pacientes con vasculitis ANCA positivos objetivando unos valores elevados en relación con la actividad de la enfermedad, decreciendo en paralelo con la mejoría clínica tras iniciar el tratamiento inmunosupresor. Estos datos apoyarían la idea de la degranulación de los leucocitos y, posiblemente de los monocitos, en la patogénesis de las vasculitis ANCA positivas. La elastasa podría provocar efectos citotóxicos y lisis de las células endoteliales. Por otro lado, podrían aumentar la expresión del RNA mensajero y la producción de IL-8 de las células endoteliales causando una respuesta quimotáctica de los granulocitos. Finalmente, estos autores no observaron diferencias en el comportamiento de estos complejos en pacientes con Granulomatosis de Wegener y Poliangiitis Microscópica (PAM), lo que podría sugerir un mecanismo patogénico similar.



Dahouk et al.<sup>207</sup> demostraron que el estudio de la inhibición de la proteasa 3 por el ANCA podía ser un mejor marcador de la actividad de la granulomatosis de Wegener comparándolo con el estudio del título absoluto de PR3-ANCA y que la determinación de los niveles de los complejos PR3- $\alpha$ -1-AT se encuentran disminuidos en los pacientes con granulomatosis de Wegener y alelos PiZ.

En relación a la presentación clínica de los pacientes con fenotipos moderadamente deficitarios para la  $\alpha$ -1-AT hemos observado que el número de órganos afectados es superior respecto a aquellos con fenotipo normal aunque sin ser estadísticamente significativo.

También hemos evidenciado una mayor afectación pulmonar en los fenotipo Pi no MM (54,5% vs 40%) pero sin alcanzar repercusión estadística y tampoco se ha podido asociar con una peor capacidad espirométrica ni con ningún tipo de patrón radiológico probablemente por el número de pacientes de la muestra. No obstante, cabe destacar que todos los pacientes que cursaron con bronquiectasias, nódulos pulmonares y hemorragia pulmonar presentaban un fenotipo deficitario.

La afectación pulmonar en las vasculitis es frecuente, especialmente en la Granulomatosis de Wegener. Puede presentarse como un nódulo solitario o múltiples nódulos con tendencia a la cavitación, infiltrados pulmonares difusos o localizados, atelectasias o hemorragia pulmonar. La manifestación clínica pulmonar asociada a un peor pronóstico inicial es la hemorragia alveolar que posteriormente puede provocar una fibrosis pulmonar<sup>208</sup>.

Recientemente, se ha publicado un artículo en el que se describe dos casos en pacientes transplantados de pulmón con déficit de  $\alpha$ -1-AT que presentaron una hemorragia pulmonar ANCA negativo sugiriendo que esta capilaritis pulmonar podría tratarse de una forma de rechazo vascular agudo y que el déficit de este inhibidor de las proteasas podría aumentar la susceptibilidad de provocar capilaritis en los pacientes transplantados de pulmón<sup>209</sup>.

La Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) se encuentra en los gránulos azurófilos de los neutrófilos y es un importante mecanismo de defensa del huésped contra los lipopolisacáridos de las bacterias gram negativas. Los autoanticuerpos contra esta proteína se han detectado, recientemente, asociados con vasculitis, fibrosis quística y enfermedad inflamatoria intestinal. Mahadeva et al.<sup>196</sup> describieron la asociación entre ANCA que reconocía el BPI como antígeno específico y bronquiectasias en un paciente con déficit de  $\alpha$ -1-AT. Estos autores sugerían que la infección por *P. Aeurogenosa*, en presencia de un déficit  $\alpha$ -1-AT, producía un exceso de proteasas libres dentro del pulmón provocando un daño adicional pulmonar y podía aumentar el efecto de los anticuerpos anti-BPI y que la infección podía tener un papel en el desarrollo de vasculitis debido a la presencia de Ac anti-BPI.

Paradójicamente en nuestro estudio la afectación renal ha sido más frecuente en los pacientes con fenotipo normal (53,3% frente 36,4%) aunque sin significación estadística. Estos hallazgos concuerdan con los encontrados por Callea et al.<sup>203</sup> quienes evidenciaron que los pacientes con niveles séricos de  $\alpha$ -1-AT bajos durante la fase aguda presentaban una menor afectación renal. Una explicación de este fenómeno podría recaer en las diferentes fuentes de síntesis extrahepática en los túbulos renales que no contribuyen en el nivel de  $\alpha$ -1-AT circulante y que sus mecanismos de regulación de la síntesis son diferentes a los de los hepatocitos<sup>204</sup>. Quizás esta  $\alpha$ -1-AT podría constituir una protección adicional y suficiente, en los fenotipos moderadamente deficitarios, contra la agresión renal en las vasculitis.

Un dato destacable de nuestro análisis es la asociación estadísticamente significativa, encontrada entre la afectación hepática y los fenotipos Pi no MM. Según nuestros resultados los portadores de un fenotipo moderadamente deficitario tienen un riesgo 11,2 veces superior de presentar alteraciones hepáticas en el contexto de una vasculitis. Esta relación no parece asociarse a la infección por hepatitis B y C ni con la presencia de anticuerpos anti-mitocondria (en todos los casos fueron negativos) ni con patología orgánica hepática (la ecografía abdominal fue normal).

En un paciente con cirrosis hepática y fenotipo PiMS se han identificado, mediante el estudio inmunohistoquímico y la microscopía electrónica, en el hepatocito cuerpos de inclusión con material PAS positivo que fue identificado como  $\alpha$ -1-AT. Además, los datos del HLA, la presencia de anticuerpos séricos y el infiltrado linfocítico (células T) en el estudio histológico indicaban que la respuesta celular inmunológica podía contribuir en la patogénesis de estas lesiones hepáticas<sup>210</sup>. Por otro lado, las observaciones en ratones transgénicos prueban que ni la transcripción ni la traslación de la variante Pi Z es defectuosa, sugiriéndose que las mutaciones Pi Z presentan una conformación diferente de la  $\alpha$ -1-AT que impide su transporte normal a través del retículo endoplásmico<sup>211</sup>. Por lo tanto, es probable que los trastornos inmunológicos propios de la fase aguda de un brote de vasculitis, que causan un aumento en la necesidad de producción hepática de  $\alpha$ -1-AT, faciliten la acumulación de  $\alpha$ -1-AT defectuosa dentro de los hepatocitos provocando una afectación hepática similar patogénicamente a la que presentan los pacientes con déficits graves. En este sentido sería atractivo realizar un estudio inmunohistoquímico de biopsias hepáticas de estos pacientes para confirmar esta hipótesis.

En otro sentido destacamos que hemos detectado 4 pacientes con fenotipos moderadamente deficitarios (25%) en los que coexisten afectación pulmonar y hepática. Estos resultados contradicen el concepto clásico de que raramente coinciden ambas manifestaciones en los pacientes deficitarios de  $\alpha$ -1-AT<sup>8,9</sup>.

Los parámetros analíticos de la bioquímica y la hematología no han sido significativamente diferentes. Destaca los valores de  $\alpha$ <sub>1</sub>-globulina que se encuentran elevados en los fenotipos Pi no MM al nivel de aquellos con PiMM. Lo que confirma que ni esta determinación ni el valor sérico de la  $\alpha$ -1-AT son buenos parámetros de screening en esta patología.

En relación con el estudio de los datos inmunológicos de estos pacientes no hemos encontrado diferencias en la positividad de los ANA, p-ANCA y factor reumatoide. El hecho de detectar un 37,5% de pacientes Pi no MM con factor reumatoide positivo va en contra de la teoría

de Segelmark et al.<sup>121</sup> que planteaba que las vasculitis asociadas a fenotipos deficitarios no se asociaban al factor reumatoide .

Los datos respecto al p-ANCA, que concuerdan con los de Esnault et al.<sup>118</sup> inducen a pensar que la  $\alpha$ -1-AT probablemente no tiene un papel tan destacado en la fisiopatogénesis de las vasculitis p-ANCA positivas.

Respecto al pronóstico de los pacientes con fenotipos moderadamente diferenciados no hemos podido constatar un peor pronóstico, tanto en el número de recaídas anuales como en la mortalidad. Aunque esta observación viene limitada por el número de pacientes y el relativo corto seguimiento de los pacientes Pi no MM.

## **4.5. ENFERMEDADES SISTEMICAS AUTOINMUNES. ASPECTOS GENERALES**

La distribución de los fenotipos de todos los pacientes con enfermedades sistémicas autoinmunes estudiadas no ha mostrado diferencias estadísticamente significativas respecto a la población control. Tampoco se han detectado diferencias relevantes en referencia a los valores séricos de  $\alpha$ -1-AT en los dos grupos.

En relación a la media de edad del inicio de la sintomatología y la distribución de ambos sexos ambos grupos son comparables.

El número de órganos afectados ha sido mayor en los pacientes Pi no MM respecto a los Pi MM y parece que este número es más elevado de forma directamente proporcional al déficit de  $\alpha$ -1-AT. La excepción en nuestro estudio es el fenotipo Pi SS, pero al tratarse de un análisis sobre pocos pacientes ( $n = 5$ ), sería preciso un estudio con un mayor número para valorar esta variable.

Hemos detectado una mayor incidencia de afectación pulmonar en los pacientes con fenotipos moderadamente deficitarios, sin que esta parezca estar influenciada por la presencia de tabaquismo. Así se ha observado, de forma estadísticamente significativa, una mayor frecuencia de alteraciones radiológicas patológicas en aquellos enfermos Pi No MM. En cambio, analizando independientemente cada patrón radiológico pulmonar, únicamente hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la valoración del patrón intersticial probablemente debido, en algunos casos, a la poca  $n$  de la muestra de cada subgrupo.

Además en el análisis de las pruebas funcionales respiratorias hemos detectado un riesgo elevado de desarrollar un patrón obstructivo o restrictivo. Esta afectación parece ser espirométricamente más grave y con un pronóstico funcional peor en aquellos pacientes con enfermedades sistémicas autoinmunes y fenotipos moderadamente deficitarios comparada con aquellos pacientes con fenotipos normales.

En relación a la afectación renal no se ha podido establecer ninguna relación entre ésta y los fenotipos de la  $\alpha$ -1-AT, aunque cabe destacar que ninguno de los pacientes Pi SS y Pi MZ presentó alteraciones renales de sus enfermedades sistémicas. Tampoco se ha demostrado diferencias estadísticamente relevantes en el estudio de la afectación ocular, cutánea, pleural, cardíaca, musculó-articular ni gastrointestinal.

Como hemos comentado en la discusión de las vasculitis, hemos observado una asociación entre la presencia de alteraciones hepáticas, sobretodo la presencia de un patrón de colestasis, y los fenotipos moderadamente deficitarios para la  $\alpha$ -1-AT. Esta asociación no se relaciona con una potencial infección vírica (VHC y VHB) ni con la presencia de anticuerpos antimitocondria.

Finalmente, si que hemos detectado una relación estadísticamente significativa entre la presentación neurológica (fundamentalmente multineuritis y polineuropatía) y los fenotipos moderadamente deficitarios de  $\alpha$ -1-AT. Las neuropatías se encuentran con frecuencia en los pacientes con enfermedades autoinmunes y, en muchos casos, podrían ser debidas a la isquemia secundaria a las vasculitis o a un atrapamiento local del nervio. Aunque su fisiopatología es desconocida probablemente se trata de un proceso mediado por la inmunidad celular. Los linfocitos sensibilizados reaccionan con un antígeno desconocido de la pared del vaso provocando una atracción de macrófagos y otras células inflamatorias a nivel de los nervios periféricos<sup>212</sup>.

En los pacientes con vasculitis sistémicas y déficits graves (PiZZ) de  $\alpha$ -1-AT el curso clínico se manifiesta con una afectación multiorgánica y un peor pronóstico. Así en un estudio sobre 14 pacientes con poliangeitis microscópica, granulomatosis de Wegener, púrpura de Schönlein-Henoch, PAN y vasculitis por hipersensibilidad el 100% presentaban afectación cutánea, el 78% afectación pulmonar en forma de enfisema panlobar fundamentalmente, afectación renal en el 92%, afectación hepática en el 57% y afectación del SNC en el 43%<sup>177</sup>. Nuestros datos con respecto a los fenotipos con déficit moderado de  $\alpha$ -1-AT en las vasculitis muestran una prevalencia inferior de alteraciones orgánicas respecto este trabajo, pero superiores a la población control. En

consecuencia, pensamos que probablemente la afectación de los diferentes órganos diana en estas enfermedades está relacionada con los diferentes grados de déficit de  $\alpha$ -1-AT que vienen determinados por los diferentes fenotipos. Así en los fenotipos moderadamente deficitarios ésta es menor, con lo que se precisa una n mayor para objetivar diferencias estadísticamente significativas y justifica el porqué algunas de ellas únicamente se han objetivado analizando globalmente los resultados de todas las enfermedades autoinmunes. Esta afirmación también es válida en la valoración del pronóstico de los enfermos con fenotipos moderadamente deficitarios y enfermedades sistémicas.

En nuestra opinión probablemente la  $\alpha$ -1-AT influye más en determinar una mayor gravedad de la presentación de la mayoría de las enfermedades autoinmunes que en predisponer a desarrollar estas enfermedades, con la excepción probablemente del grupo de las vasculitis. El incremento en la severidad de las enfermedades autoinmunes en los pacientes con déficits moderados de  $\alpha$ -1-AT creemos que puede explicarse fundamentalmente por dos mecanismos: mediante la alteración en la inmunoregulación de las células T, causada posiblemente por la menor inhibición de a IL-1 liberada por el macrófago, que desencadenaría una mayor activación de los CD4. Y, por otro lado, inhibiendo de forma menos eficaz las proteasas, con lo que se provocaría un desequilibrio proteasa-antiproteasa causando una expresión inflamatoria más agresiva.

Así pues, las conclusiones que pueden derivarse de este estudio son:

1. Las enfermedades autoinmunes sistémicas globalmente no presentan una prevalencia superior de fenotipos deficitarios de  $\alpha$ -1-AT (Pi no MM), ni tampoco difieren las frecuencias de cada uno de los fenotipos comparadas con la población control.
2. En conjunto, los pacientes con enfermedades sistémicas autoinmunes portadores de fenotipos moderadamente deficitarios de  $\alpha$ -1-AT presentan un mayor número de órganos afectados en el curso evolutivo de su patología.

3. La presencia de un fenotipo moderadamente deficitario en los pacientes con enfermedades autoinmunes sistémicas condiciona una mayor frecuencia de afectación pulmonar y neurológica, siendo la primera de un curso clínico más agresivo y con peor pronóstico funcional, y constituyendo la segunda fundamentalmente una polineuropatía y multineuritis.
4. Los pacientes con esclerodermia y fenotipos moderadamente deficitarios presentan con mayor frecuencia induración cutánea en los primeros cinco años de evolución de la enfermedad, una afectación pulmonar más agresiva con peor pronóstico funcional y positividad para los anticuerpos anti-Scl 70.
5. Es posible que la  $\alpha$ -1-AT sea relevante en la fisiopatología de la esclerodermia difusa. El fenotipo de la  $\alpha$ -1-AT puede ser un elemento de ayuda para evaluar qué pacientes con fenómeno de Raynaud tienen una mayor probabilidad de desarrollar la forma difusa de la enfermedad.
6. La  $\alpha$ -1-AT no parece influir ni en la patogenia, ni en la presentación, ni en la gravedad de las manifestaciones clínicas de los pacientes con lupus eritematoso sistémico.
7. En el grupo de pacientes con miopatía inflamatoria idiopática los fenotipos deficitarios (Pi no MM) se asocian con un mayor número de órganos afectados y, especialmente, con la afectación pulmonar donde, junto a los anticuerpos anti-sintetasa, pueden constituir un parámetro predictivo de esta afectación en esta enfermedad.



8. Las vasculitis sistémicas se asocian a una mayor frecuencia de fenotipos moderadamente deficitarios comparadas con la población control. Es manifiesta la asociación entre el alelo Z y las vasculitis c-ANCA (PR3) positivas, así como una mayor afectación hepática en forma de colestasis en los fenotipos moderadamente deficitarios.
  
9. La concentración sérica de  $\alpha$ -1-AT, excepto en el caso de las vasculitis, parece una buena prueba de cribado, ya que existe una buena correlación con el fenotipo de la  $\alpha$ -1-AT.

## 5. BIBLIOGRAFIA

1. - Morse JO. Alpha<sub>1</sub>-antitrypsin deficiency. N Engl J Med 1978; 299:1045-1048, 1099-1105.
2. - Kueppers F, Black LF. Alpha<sub>1</sub>-antitrypsin and its deficiency. Am Rev Respir Dis 1974; 110:176-194.
- 3.- Travis J, Salvesen GS. Human plasma proteinase inhibitors. Annu Rev Biochem 1983; 52:655-709.
- 4.- Perlino E, Cortese R, Ciliberto G. The human alpha<sub>1</sub>-antitrypsin gene is transcribed from two different promoters in macrophages and hepatocytes. EMBO J 1987; 6:2767-2771.
- 5.- Brantly ML, Paul LD, Miller BH, Falk RT, Wu M, Crystal RG. Clinical features and history of the destructive lung disease associated with alpha-1-antitrypsin deficiency of adults with pulmonary symptoms. Am Rev Respir Dis 1988; 138:327-336.
- 6.- Brantly ML, Wittes JT, Vogelmeier CF, Hubbard RC, Fells GA, Crystal RG. Use of a highly purified alpha<sub>1</sub>-antitrypsin standard to establish ranges for the common normal and deficient alpha<sub>1</sub>-antitrypsin phenotypes. Chest 1991; 100:703-708.
- 7.- Beatty K, Bieth J, Travis J. Kinetics of association of serine proteinases with native and oxidized alpha-1-proteinase inhibitor and alpha-1-antichymotrypsin. J Biol Chem 1980; 225: 3931-3934.

- 8.- Crystal RG. Alpha<sub>1</sub>-antitrypsin deficiency, emphysema, and liver disease: Genetic basis and strategies for therapy. *J Clin Invest* 1990; 85:1343-1352.
- 9.- Crystal RG, Brantly ML, Hubbard RC, Curiel DT, States DJ, Holmes MD. The alpha<sub>1</sub>-antitrypsin gene and its mutations. Clinical consequences and strategies for therapy. *Chest* 1989; 95:196-208.
- 10.- Lieberman J, Mittman C, Gordon HW. Alpha<sub>1</sub> antitrypsin in the livers of patients with emphysema. *Science* 1972; 175:63-65.
- 11.- Eriksson S. Liver disease in alpha<sub>1</sub>-antitrypsin deficiency. Aspects of incidence and prognosis. *Scand J Gastroenterol* 1985; 20:907-911.
- 12.- Berg NO, Eriksson S. Liver disease in adults with alpha<sub>1</sub>-antitrypsin deficiency. *N Engl J Med* 1972; 287:1264-1267.
- 13.- Cox DW, Smyth S. Risk for liver disease in adults with alpha<sub>1</sub>-antitrypsin deficiency. *Am J Med* 1983; 74:221-227.
- 14.- Eriksson S, Carlson J, Velez R. Risk of cirrhosis and primary liver cancer in alpha<sub>1</sub>-antitrypsin deficiency. *N Engl J Med* 1986; 314:736-739.
- 15.- Laurell CB, Eriksson S. The electrophoretic alpha<sub>1</sub>-globulin pattern of serum in alpha<sub>1</sub>-antitrypsin deficiency. *Scand J Clin Lab Invest* 1963; 15:132-140.

- 16.- Gross P, Babyak MA, Tolker E, Kaschak M. Enzymatically produced pulmonary emphysema, a preliminary report. *J Occup Med* 1964; 6:481-484.
- 17.- Janoff A, White R, Carp H, Harel S, Dearing R, Lee D. Lung injury induced by leukocyte proteases. *Am J Pathol* 1979; 97:111-136.
- 18.- Seal LA, Carp DA, George RB. Comparison of commercially available radial immunodiffusion kits for the determination of serum alpha1-antitrypsin concentrations. *Am Rev Res Dis* 1975; 111:97-100.
- 19.- Long GL, Chandra T, Woo SLC, Davie EW, Kurachi K. Complete sequence of the cDNA for human alpha1-antitrypsin and the gene for the S variant. *Biochem* 1984; 23:4828-4837.
- 20.- Nukiwa T, Satoh K, Brantly ML, Ogushi F, Fells GA. Identification of a second mutation in the protein-coding sequence of the Z type alpha 1-antitrypsin gene. *J Biol Chem* 1986 ;34:15989-15994.
- 21.- Wewers MD, Casolaro MA, Sellers SE, Swayce SC, McPaul KM, Crystal RG. Replacement therapy for alpha1-antitrypsin deficiency associated with emphysema. *N Engl J Med* 1987; 316:1055-1062.
- 22.- Sefton L, Kelsey G, Kearney P, Povey S, Wolfe J. A physical map of the human PI and AACT genes. *Genomics* 1990; 7:382-388.

- 23.- Carrell R, Travis J. Alpha<sub>1</sub>-antitrypsin and the serpins: variation and countervariation. *Trends Biochem Sci* 1985; 10:20-24.
- 24.- Johnson D, Travis J. Inactivation of human alpha<sub>1</sub> proteinase inhibitor by thiol proteinases. *Biochem J* 1977; 163: 639-641.
- 25.- Billingsley GD, Walter MA, Hammond GL, Cox DW. Physical mapping of four serpin genes: alpha<sub>1</sub>-antitrypsin, alpha<sub>1</sub>-antichymotrypsin, corticosteroid-binding globulin, and protein C inhibitor, within a 280-Kb region on chromosome 14q32.1. *Am J Hum Genet* 1993; 52:343-353.
- 26.- Byth BC, Billingsley GD, Cox DW. Physical and genetic mapping of the serpin gene cluster at 14q32.1: allelic association and a unique haplotype associated with alpha<sub>1</sub>-antitrypsin deficiency. *Am J Hum Genet* 1994; 55:126-133.
- 27.- Chandra T, Stackhouse R, Kidd VJ, Robson KJH, Woo SLC. Sequence homology between human alpha<sub>1</sub>-antichymotrypsin, alpha<sub>1</sub>-antitrypsin, and antithrombin III. *Biochemistry* 1983; 22:5055-5060.
- 28.- Owen MC, Brennan SO, Lewis JH, Carrell RW. Mutation of antitrypsin to antithrombin. Alpha-1-antitrypsin Pittsburg (358 Met-Arg), a fatal bleeding disorder. *N Engl J Med* 1983; 309:694-698.
- 29.- Hill RE, Shaw PH, Barth RK, Hastie ND. A genetic locus closely linked to a protease inhibitor gene complex controls the level of multiple RNA transcripts. *Mol Cell Biol* 1985; 5:2114-2122.

- 30.- Loebermann H, Tokuoka R, Deisenhofer J, Huber R. Human alpha-1-proteinase inhibitor: crystal structure analysis of two crystal modifications, molecular model and preliminary analysis of the implications for function. *J Mol Biol* 1984; 177:531-556.
- 31.- Brantly M, Nukiwa T, Crystak RG. Molecular basis of alpha-1-antitrypsin deficiency. *Am J Med* 1988; 84:13-31.
- 32.- Curiel DT, Chytil A, Courtney M, Crustal RG. Serum alpha-1-antitrypsin deficiency associated with the common S-type ( Glu<sup>264</sup>-Val ) mutation results from intracellular degradation of alpha-1-antitrypsin prior to secretion. *J Biol Chem* 1989; 264:10477-10486.
- 33.- Okayama H, Holmes MD, Brantly ML, Crystal RG. Characterization of the coding sequence of the normal M4  $\alpha$ 1-antitrypsin gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 162:1560-1570.
- 34.- Castell JV, Gómez-Lechon MJ, David M, Hirano T, Kishimoto T, Heinrich PC, et al. Recombinant human interleukin-6 (IL-6/BSF-2/HSF) regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes. *FEBS lett* 1988; 232:347-350.
- 35.- Perlmutter DH, May LT, Sehgal PB. Interferon B2/interleukin 6 modulates synthesis of alpha-1-antitrypsin in human mononuclear phagocytes and in human hepatoma cells. *J Clin Invest* 1989; 84:138-144.
- 36.- Fagerhol MK. The Pi-system: Genetics variants of serum alpha-1-antitrypsin. *Series Haematologica* 1968; 1:153-161.

- 37.- Gorg A, Postel W, Weser J, Patutschnick W, Cleve H. Improved resolution of PI ( alpha-1-antitrypsin ) phenotypes by a large-scale immobilized pH gradient. *Am J Hum Genet* 1985; 37:922-930.
- 38.- Tobin MJ, Cook PJL, Hutchison DCS. Alpha<sub>1</sub>antitrypsin deficiency: the clinical and physiological features of pulmonary emphysema in subjects homozygous for Pi type Z. *Br J Dis Chest* 1983; 77:14-27.
- 39.- Silverman EK, Miletich JP, Pierce JA, Sherman LA, Endicott SK, Broze GJ, et al. Alpha<sub>1</sub>-antitrypsin deficiency: high prevalence in the St. Louis area determined by direct population screening. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140:961-966.
- 40.- Larsson C. Natural history and life expectancy in severe alpha<sub>1</sub>-antitrypsin deficiency, PiZ. *Acta Med Scand* 1978; 204:345-351.
- 41.- Vidal R, Miravittles M, Jardí R, Torrella M, Rodríguez-Frias F, Moral P, et al. Estudio de la frecuencia de los diferentes fenotipos de la alfa-1-antitripsina en una población de Barcelona. *Med Clin* 1996; 107:211-214.
- 42.- Evans HE, Bognacki NS, Perrot LM, Glass L. Prevalence of alpha-1-antitrypsin Pi Types among newborn infants of different ethnic backgrounds. *J Pediatr* 1977; 90:621-624.
- 43.- Ying QL, Zhang ML, Liang CC, Chjen LC, Chen LF, Huang YW, et al. Alpha-1-antitrypsin types in five Chinese national minorities. *Hum Genet* 1985; 71:225-226.

- 44.- Cox DW, Hoepfner VH, Levison H. Protease inhibitors in patients with chronic obstructive lung disease: the alpha-1-antitrypsin heterozygote controversy. *Am Rev Respir Dis* 1976; 113:601-606.
- 45.- Leiberman J, Winter B, Sastre A. Alpha-1-antitrypsin P<sub>1</sub>-types in 965 COPD patients. *Chest* 1986; 89:370-373.
- 46.- Buist AS, Sexton GJ, Azam AMH, Adam BE. Pulmonary function in heterozygotes for alpha-1-antitrypsin deficiency: a case-control study. *Am Rev Respir Dis* 1979; 120:759-766.
- 47.- Sharp HL, Bridges RA, Krivit W, Freier EF. Cirrhosis associated with alpha-1-antitrypsin deficiency: a previously unrecognized inherited disorder. *J Lab Clin Med* 1969; 72:934-939.
- 48.- Sveger T. The natural history of liver disease in alpha-1-antitrypsin deficient children. *Acta Paediatr Scand* 1988; 77:847-851.
- 49.- Birrer P, McElvaney Ng, Chang-Stroman LM, Crystal RG. Alpha-1-antitrypsin deficiency and liver disease. *J Inher Metab Dis* 1991; 14:512-525.
- 50.- Govindarajan S, Ashcavi M, Peters RL. Alpha-1-antitrypsin phenotypes in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1981; 1:628-631.
- 51.- Feldmann G, Bignon J, Chahinian P, Degott C, Benhamou J. Hepatocyte ultrastructural changes in alpha-1-antitrypsin deficiency. *Gastroenterology* 1974; 74:1214-1224.



- 52.- Roberts EA, Cox DW, Medline A, Wanless IR. Occurrence of alpha-1-antitrypsin deficiency in 155 patients with alcoholic liver disease. *Am J Clin Pathol* 1984; 82:424-427.
- 53.- Carlson JA, Rogers BB, Sifers RN, Finegold MJ, Clift SM, De Mayo FJ, et al.. Accumulation of PiZ alpha-1-antitrypsin causes liver damage in transgenic mice. *J Clin Invest* 1989; 83:1183-1190.
- 54.- Curiel DT, Holmes MD, Okayama H, Brantly ML, Vogelmeier C, Travis WD, et al. Molecular basis of the liver and lung disease associated with the alpha-1-antitrypsin deficiency allele M<sub>malton</sub>. *Biol Chem* 1989; 264:13938-13945.
- 55.- Pittelkow MR, Sith KC, Daniel WP. Alpha-1-antitrypsin deficiency and panniculitis: perspectives on disease relationship and replacement therapy. *Am J Med* 1988; 84:80-86.
- 56.- Buist AS, Burrows B, Eriksson S, Mittman C, Wu M. The natural history of air-flow obstruction in PiZZ emphysema. *Am Rev Respir Dis* 1983; 127:43-45.
- 57.- Wu MC; Eriksson S. Lung function, smoking and survival in severe alpha<sub>1</sub>-antitrypsin deficiency, PiZZ. *J Clin Epidemiol* 1988; 41:1157-1165.
- 58.- Horton FO, Mackenthun AV, Anderson PS Jr; Patterson CN, Hammarsten JF. Alpha<sub>1</sub>-antitrypsin heterozygotes (Pi type MZ): A longitudinal study of the risk of development of chronic air flow limitation. *Chest* 1980; 77:261-264.

- 59.- Horne SL, Tennet RK, Cockcroft DW, Cotton DJ, Dosman JA. Pulmonary function in Pi M and MZ grainworkers. *Chest* 1986; 89:795-799.
- 60.- Carilli AD, Gohd RS, Brown D. A cytologic study of chronic bronchitis. *Am Rev Respir Dis* 1970; 101:696-699.
- 61.- Stockley RA. Chronic bronchitis: The antiproteinase/proteinase balance and the effect of infection and corticosteroids. *Clin Chest Med* 1988; 9:643-656.
- 62.- Fujita J, Nelson N, Daughton D, Dobry C, Spurzem JR, Irino S, et al. Evaluation of elastase and antielastase balance in patients with pulmonary emphysema. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142:471-501.
- 63.- Goldstein W, Doring G. Lysosomal enzymes from polymorphonuclear leukocytes and proteinase inhibitors in patients with cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1986; 134:49-56.
- 64.- Wardlaw AJ, Dunnette S, Gleich GJ, Collins JV, Kay AB. Eosinophils and mast cells in bronchoalveolar lavage in mild asthma: relationship to bronchial hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137:62-69
- 65.- Camusi G, Tatta C, Bussolino F, Baglioni C. Synthesis and release of platelet activating factor is inhibited by plasma  $\alpha_1$  proteinase inhibitor or  $\alpha_1$  antichymotrypsin and is stimulated by proteinases. *J Exp Med* 1988; 168:1293-1306.

- 66.- Nadel JA, Caughney GH. Role of mast cell proteases in airways. *Chest* 1989; 95:1328-1330.
- 67.- Sibille Y, Reynolds HY. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141:471-501.
- 68.- Morrison HM, Kramps JA, Afford SC, Burnett D, Dukman JH, Stockley RA. Elastase inhibitors in sputum from bronchitic patients with or without alpha<sub>1</sub>-proteinase inhibitor deficiency: partial characterization of a hitherto unquantified inhibitor of neutrophil elastase. *Clin Sci* 1987; 73:19-28.
- 69.- Kramps JA, Franken C, Dukman JH. Quantity of antileukoprotease relative to alpha-1-proteinase inhibitor in peripheral airspaces of the human lung. *Clin Sci* 1988; 75:351-353.
- 70.- Wewers M. Pathogenesis of emphysema: Assessment of basic science concepts through clinical investigation. *Chest* 1989; 95:190-195.
- 71.- Linmark B. Asthma and heterozygous alpha<sub>1</sub>-antichymotrypsin deficiency: a possible association. *J Intern Med* 1990; 227:115-118.
- 72.- Colp C, Talavera W, Goldman D, Green J, Multz A, Lieberman J. Profile of bronchospastic disease in Puerto Rican patients in New York City. *Arch Intern Med* 1990; 150:2349.
- 73.- Townley RG, Southard JG, Radford P, Hopp RJ, Bewtra AK, Ford L. Association of MS Pi phenotype with airway hyperresponsiveness. *Chest* 1990; 98:594-599.

- 74.- Gaillard MC, Kilroe-Smith A, Nogueira C, Dunn D, Jenkins T, Fire B, et al. Alpha-1-protease inhibitor in bronchial asthma: Phenotypes and biochemical characteristics. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145:1311-1315.
- 75.- Lieberman J, Colp C. A role for intermediate heterozygous alpha<sub>1</sub>-antitrypsin deficiency in obstructive lung disease. *Chest* 1990; 93:522-523.
- 76.- Esquivel CO, Vicente E, Van Thiel D, Gordon R, Marsh W, Makowka L, et al. Orthoptic liver transplantation for alpha-1-antitrypsin deficiency: an experience in 29 children and 10 adults. *Transplant Proc* 1987; 19:3798-3802.
- 77.- Esquivel CO, Marsh JW, Van Thiel DH. Liver transplantation for chronic cholestatic liver disease in adults and children. *Gastroenterol Clin N Am* 1988; 17:145-155.
- 78.- Kueppers F. Genetically determined differences in the response of alpha-1-antitrypsin levels in human serum to typhoid vaccine. *Humangenetik* 1968; 6:207-214.
- 79.- Laurell CB, Kullander S, Thorell J. Effect of administration of a combined estrogen-progestin contraceptive on the level of individual plasma proteins. *Scand J Clin Lab Invest* 1967; 21:337-343.
- 80.- Gadek JE, Fulmer JD, Gelfand JA, Frank MM, Petty TL, Crystal RG. Danazol induced augmentation of serum alpha-1-antitrypsin levels in individuals with marked deficiency of this antiprotease. *J Clin Invest* 1980; 66:82-87.

81.- Wewers M, Gadek JE, Keogh BA, Fells GA, Crystal RG. Evaluation of Danazol therapy for patients with PiZZ alpha-1-antitrypsin deficiency. *Am Rev Respir Dis* 1986; 134:476-480.

82.- Wewers MD, Brantly ML, Casolaro MA, Crystal RG. Evaluation of Tamoxifen as a therapy to augment alpha-1-antitrypsin concentrations in Z homozygous alpha-1-antitrypsin deficient subjects. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135:401-402.

83.- Gadek JE, Klein HG, Holland PV, Crystal RG. Replacement therapy of alpha-1-antitrypsin deficiency : reversal of protease-antiprotease imbalance within the alveolar structures of PiZZ subjects. *J Clin Invest* 1981; 68:1158-1165.

84.- Breit SN, Robinson JP, Luckhurst E, Dawkins RL, Penny R. Immunoregulation by alpha 1 antitrypsin. *J Clin Immunol* 1982; 7:127-131.

85.- Breit SN, Luckhurst E, Penny R. The effect of alpha 1 antitrypsin on the proliferative response of human peripheral blood lymphocytes. *J Immunol* 1983; 130:681-686.

86.- Breit SN, Wakefield, Robinson JP, Luchurst E, Clark P, Penny R. The role of  $\alpha_1$ -Antitrypsin deficiency in the pathogenesis of immune disorders. *Clin Immunol Inmmunop* 1985; 35:363-380.

87.- Vischer TL, Bretz V, Baggiolini P. In vitro stimulation of lymphocytes by neutral proteinases from human polymorphonuclear leukocyte granules. *J Exp Med* 1976; 144:863-872.

88.- Eskola J, Fraki JE. Lymphocyte stimulation in vitro by proteinases and its augmentation with a proteinase binding factor from human skin. *Arch Dermatol* 1978; 263:223-226.

89.- Cohen SD, Israel E, Spiess-Meier B, Wainberg MA. Plasminogen activator is an apparent lymphocyte mitogen. *J Immunol* 1981; 126:1415-1420.

90.- Redelman D, Hudig D. The mechanism of cell-mediated cytotoxicity killing by murine cytotoxic T lymphocytes requires cell surface thids and activated proteases. *J Immunol* 1980; 124:870-878.

91.- Ades EW, Hinson A, Chapuis-Cellier C, Arnaud P. Modulation of the immune response by plasma protease inhibitors, Alpha 2-macroglobulin and alpha-1-antitrypsin inhibit natural killing and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Scand J Immunol* 1982; 15:109-113

92.- Kueppers F, Bearn AG. A possible experimental approach to the association of hereditary alpha-1-antitrypsin deficiency and pulmonary emphysema. *Proc Soc Exp Biol Med* 1966; 121:1207-1209.

93.- Janoff A, Scherer J. Mediators of inflammation in leukocyte lysosomes.. IX elastinolytic activity in granules of human polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* 1968; 128:1137-1155.

94.- Baumstark JS. Studies on the elastase-serum protein interaction. Molecular identity of the inhibitors in human serum and direct demonstration of inhibitor-elastase complexes by zone and immunoelectrophoresis. *Arch Biochem Biophys* 1967; 118:619-630.

- 95.- McDonald JA, Baum BJ, Rosenberg DM, Kelman JA, Brin SC, Crystal RG. Destruction of a major extracellular adhesive glycoprotein (fibronectin) of human fibroblasts by neutral proteases from polymorphonuclear leukocyte granules. *Lab Invest* 1979; 40:350-357.
- 96.- Malemiud CF, Janoff A. Human polymorphonuclear leukocyte elastase and cathepsin G mediate the degradation of lapine articular cartilage proteoglycan. *Ann N Y Acad Sci* 1975; 256:254-262.
- 97.- Laskowski M, Kato I. Protein inhibitors of proteinases. *Annu Rev Biochem* 1980; 49:593-626.
- 98.- Plow EF. The major fibrinolytic proteases of human leukocytes. *Biochim Biophys Acta* 1980; 630:47-56.
- 99.- Davies M, Barret AJ, Travis J, Sanders E, Coles GA. The degradation of human glomerular basement membrane with purified lysosomal proteinases: evidence for the pathogenic role of the polymorphonuclear leukocyte in glomerulonephritis. *Clin Sci Mol Biol* 1978; 54:233-240.
- 100.- Seibold JR, Iammarino RM, Rodnan GP. Alpha-1-antitrypsin in progressive systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1980; 23:367-370.
- 101.- Michalski JP, McCombs CC, Scopelitis E, Biundo JJ, Medsger TA. Alpha<sub>1</sub>-antitrypsin phenotypes, including M subtypes, in pulmonary disease associated with rheumatoid arthritis and systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1986; 29:586-591.

- 102.- Papiha SS, Pal B, Walker D, Mangion P, Hossain MA.  $\alpha_1$  Antitrypsin (PI) phenotypes in two rheumatic diseases: a reappraisal of the association of Pi subtypes in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1989; 48:48-52.
- 103.- Brewerton DA, Webley M, Murphy AH, Ward AM. The alpha 1-antitrypsin phenotype MZ in acute anterior uveitis. *Lancet* 1978; 1:1103.
- 104.- Brown WT, Nanelok AE, Bearn AG. Anterior uveitis and alpha-1-antitrypsin. *Lancet* 1979; 2:646.
- 105.- Wakefield D, Easter J, Breit SN, Clark P, Penny R. Alpha 1 antitrypsin serum levels and phenotypes in patients with retinal vasculitis. *Br J Ophthalmol* 1985; 69:497-499.
- 106.- Bleumink E, Klokke HA. Protease-inhibitor deficiencies in a patient with Weber-Christian panniculitis. *Arch Dermatol* 1984; 120:936-940.
- 107.- Solans R, Cortés F, Selva A, García-Patos V, Jiménez Moreno J, Pascual C, et al. panniculitis: a cutaneous manifestation of dermatomyositis. *J Am Acad Dermatol* 2000 (en prensa).
- 108.- Guitart J, McGillis ST, Bergfeld WF, Tuthill RJ, Bailin PL, Camisa C. Muir-Torre syndrome associated with  $\alpha_1$ -antitrypsin deficiency and cutaneous vasculitis. *J Am Acad Dermatol* 1991; 24:875-877.



- 109.- Vaillant L, Weisbecker MC, De Muret A, Lorette G. Pemphigus auto-immun associé a un déficit en alpha 1 antitrypsine. *Ann Dermatol Venereol* 1988; 115:1017-1021.
- 110.- Beckman G, Beckman L, Liden S. Association between psoriasis and the alpha 1-antitrypsin deficiency gene Z. *Acta Derm Venereol* 1980; 60:163-164.
- 111.- Teh LG, Steven MM, Capell HA. Alpha-1-antitrypsin associated liver disease in rheumatoid arthritis. *Postgrad Med J* 1985; 61:171-172.
- 112.- Miller F, Kuschner M.  $\alpha_1$ -antitrypsin deficiency, emphysema, necrotizing angiitis and glomerulonephritis. *Am J Med* 1969; 46:615-623.
- 113.- Moroz SP, Cutz E, Cox DW, Sass-Kortsak A. Liver disease associated with alpha 1-antitrypsin deficiency in childhood. *J Pediatr* 1976; 88:19-25.
- 114.- Lewis M, Kallenbach J, Zaltzman M, Levy H, Lurie D, Baynes R, et al. Severe deficiency of alpha<sub>1</sub>-Antitrypsin associated with cutaneous vasculitis, rapidly progressive glomerulonephritis, and colitis. *Am J Med* 1985; 79:489-494.
- 115.- Brandup F, Ostergaard PA. Alpha<sub>1</sub>-antitrypsin deficiency associated with persistent cutaneous vasculitis. *Arch Dermatol* 1978; 114:921-924.
- 116.- Fortin PR, Fraser RS, Watts CS, Esdaile JM.  $\alpha_1$  antitrypsin deficiency and systemic necrotizing vasculitis. *J Rheumatol* 1991; 18:1613-1616.

- 117.- Roge C, Szapiro N. Déficit en alpha-un-antitrypsine et vascularites systémiques: données complémentaires. *Presse Med* 1994; 23:1096.
- 118.- Esnault VLM, Testa A, Audrian M, Roge C, Hamidou M, Barrier JH, et al. Alpha1-antitrypsin genetic polymorphism in ANCA-positive systemic vasculitis. *Kidney Int* 1993; 43:1329-1332.
- 119.- Lhotta K, Vogel W, Meisl T, Buxbaum M, Neyer U, Sandholzer C, et al.  $\alpha_1$ -Antitrypsin phenotypes in patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibody-positive vasculitis. *Clin Sci* 1994; 87: 693-695.
- 120.- Elzouki ANY, Segelmark M, Wieslander J, Eriksson S. Strong link between the alpha<sub>1</sub>-antitrypsin PiZ allele and Wegener's granulomatosis. *J Intern Med* 1994; 236:543-548.
- 121.- Segelmark M, Elzouki AN, Wieslander J, Eriksson S. The PiZ gene of  $\alpha_1$ -antitrypsin as a determinant of outcome in PR3-ANCA-positive vasculitis. *Kidney Int* 1995; 48:844-850.
- 122.- Griffith ME, Lovegrove JU, Gaskin G, Whitehouse DB, Pusey CD. C-antineutrophil cytoplasmic antibody positivity in vasculitis patients is associated with the Z allele of alpha-1-antitrypsin, and P-antineutrophil cytoplasmic antibody with the S allele. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11:438-443.
- 123.- Weidinger S, Jahn W, Cujnik F, Schwarzfisher F. Alpha-1-antitrypsin: evidence for a fifth PiM subtype and a new deficiency allele PiZ Augsburg. *Hum Genet* 1985; 71:27-29.

- 124.- Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980; 23:581-590.
- 125.- Medsger TA Jr. Classification of systemic sclerosis. En: Jasyson MIV, Black CM, editores. *Systemic sclerosis: scleroderma*. Londres: John Wiley & Sons Ltd., 1988:1-6.
- 126.- Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25:1271-1277.
- 127.- Hunder GG, Arend WP, Bloch DA, Calabrese LH, Fauci AS, Fries JF, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of vasculitis. *Arthritis Rheum* 1990; 33:1065-1136.
- 128.- Jennette JC, FalkRJ, Andrassy K, Bacon PA, Churg J, Gross WL, et al. Nomenclature of systemic vasculitides. *Arthritis Rheum* 1994; 37:187-192.
- 129.- Guillevin LG, Durand-Gasselin B, Cevallos R, Gayraud M, Lhote F, Callard P, et al. Microscopic polyangiitis. *Arthritis Rheum* 1999; 42:421-430.
- 130.- Bohan A, Peter JB. A computed-assisted analysis of 153 patients with polymyositis and dermatomyositis. *Medicine (Baltimore)* 1977; 56:255-285.

131.- Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis. *N Engl J Med* 1975; 292:344-347,403-407.

132.- International Study Group for Behçet's Disease. Criteria for diagnosis of Behçet's disease. *Lancet* 1990; 335:1078-1080.

133.- Vitali C, Bombardieri S, Moutsopoulos HM, Coll J, Gerli R, Hatron PY, et al. Assessment of the European Classification Criteria for Sjögren syndrome in a series of clinically defined cases: results of a prospective multicentre study. The European Study Group on Diagnostic Criteria for Sjögren Syndrome. *Ann Rheum Dis* 1996; 55:116-121.

134.- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31:315-324.

135.- Snider GL, Kory RC, Lyons HA. Grading of pulmonary function impairment by means of pulmonary function tests. *Dis Chest* 1967; 52:270-271.

136.- Le Roy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg t, Medsger T, et al. Scleroderma (Systemic Sclerosis): Classification, Subsets and Pathogenesis. *J Rheumatol* 1988; 15:202-205.

137.- McGregor AR, Watson A, Yunis E, Pandey JP, Takehara K, Tidwell JT, et al. Familial clustering of scleroderma spectrum disease. *Am J Med* 1988; 84:1023-1032.

- 138.- Kumagai Y, Shiokawa Y, Medsger TA Jr, Rodnan GP. Clinical spectrum of connective tissue disease after cosmetic surgery: observation on eighteen patients and a review of the Japanese literature. *Arthritis Rheum* 1984; 27:1-12.
- 139.- Hertzman PA, Blevins WL, Mayer J, Greenfield B, Ting M, Gleich GJ. Association of the eosinophilia-myalgia syndrome with the ingestion of L-tryptophan. *N Engl J Med* 1990; 322:869-873.
- 140.- Toxic Epidemic Syndrome Study Group: Toxic epidemic syndrome, Spain, 1981. *Lancet* 1982; 2:697-702.
- 141.- Kahalen MB, Osborn I, LeRoy EC. Increased factor VIII/von Willebrand factor antigen and von Willebrand factor: activity in scleroderma and Raynaud's phenomenon. *Ann Intern Med* 1981; 94:482-484.
- 142.- Kahaler MB, Osborn I, LeRoy EC. Elevated levels of circulating platelet aggregates and betathromboglobulin in scleroderma. *Ann Intern Med* 1982; 96:610-613.
- 143.- Varga J, Jiménez SA. Pathogenesis of scleroderma: cellular aspects. In Clements Pj, Furst DE (eds): *Systemic Sclerosis*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1996, pp 123-152.
- 144.- Kinsella MB, Smith EA, Miller KS, LeRoy EC, Silver RM. Spontaneous production of fibronectin by alveolar macrophages in patients with scleroderma. *Arthritis Rheum* 1989; 32:577-583.

145.- Goldring MB, Krane SM,. Modulation by recombinant interleukin-I of synthesis of types I and III collagens and associated procollagen mRNA levels in cultured human cells. J Biol Chem 1987; 262:16724-16729.

146.- Kahaleh MB, LeRoy EC. Interleukine-2 in scleroderma: correlation of serum level with extent of skin involvement and disease duration. Ann Intern Med 1989; 110:446-450.

147.- Rossi GA, Bitterman PB, Rennard SI, Ferrans VJ, Crystal RG. Evidence chronic inflammation as a component of the interstitial lung disease associated with progressive systemic sclerosis. Am Rev Respir Dis 1985; 131:612-617.

148.- Silver RM, Miller KS, Kinsella M, Smith EA, Schabel SI. Evaluation and management of scleroderma lung disease using bronchoalveolar lavage. Am J Med 1990; 88:470-476.

149.-Leonard EJ, Yoshimura T. Neutrophil attractant/activation protein-1 (NAP-1 (interleukin-8)). Am J Respir Cell Mol Biol 1990; 2:479-486.

150.- Gadek JE, Kelman JA, Fells G, Weinbriger SE, Horwitz AZ, Reynolds HY, et al. Collagenase in the lower respiratory tract of patients with idiopathic fibrosis. N Engl J Med 1979; 301:737-742.

151.- Hubbard RC, Crystal RG. Antiproteases. The Lung-Scientific Foundations. New York: Raven Press, 1991;1775-1787.

- 152.- Crestani B, Seta N, Palazzo E, Rolland C, Venembre P, Dehoux M, et al. Interleukin-8 and neutrophils in systemic sclerosis with lung involvement. *Respir Crit Care Med* 1994; 150:1363-1367.
- 153.- Cailes JB, O'Connor C, Pantelidis P, Southcott AM, Fitzgerald MX, Black CM, et al. Neutrophil activation in fibrosing alveolitis: a comparison of lone cryptogenic fibrosing alveolitis and systemic sclerosis. *Eur Respir J* 1996; 9:992-999.
- 154.- Ogushi F, Hubbard RC, Fells GA, Casoralo MA, Curiel DT, Brantly ML, et al. Evaluation of the S-type of alpha-1-antitrypsin as an *In Vivo* and *In Vitro* inhibitor of neutrophil elastase. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137:364-370.
- 155.- Nagai A, Aoshiba K, Ishihara, Inano H, Sakamoto K, Yamaguchi E, et al. Administration of alpha<sub>1</sub>-proteinase inhibitor ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in hamsters. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145:651-656.
- 156.- Jardí R, Rodriguez-Frias F, Casas F, Cotrina M, Vidal R, Miravittles M, et al. Caracterización molecular de dos variantes deficitarias de la alfa-1-antitripsina: Pi Mpalermo y Pi Plovel. *Med Clin (Barc)* 1997; 109:463-466.
- 157.- Mackiewicz A, Sobieska M, Kapcińska M, Mackiewicz SH, Wiktorowicz KE, Pawlowski T. Different capabilities of monocytes from patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis to induce glycosylation alterations of acute phase proteins in vitro. *Ann Rheum Dis* 1992; 51:67-72.

- 158.- Linker-Israeli M, Bakke AC, Kitridou RC, Gendler S, Gillis S, Horowitz DA. Defective production of interleukin 1 and interleukin 2 in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *J Immunol* 1983; 130:2651-2656.
- 159.- Miró O, Laguno M, Alonso JR, Casademont J, Herrero C, Selva A, et al. Evolución de las miopatías inflamatorias idiopáticas: complicaciones, supervivencia y factores pronósticos. *Med Clin (Barc)* 1999; 112:521-526.
- 160.- Zucker J. Drug-induced myopathies. *Semin Arthritis Rheum* 1990; 19:259-268.
- 161.- Travers RL, Hughes GRV, Cambridge G, Sewell JR. Cocksachie B neutralization titres in polymyositis/dermatomyositis. *Lancet* 1977; 1:1268.
- 162.- Pearson CM. Myopathy with viral-like structures. *N Engl J Med* 1975; 292:641-642.
- 163.- Mathews MB, Bernstein RM. Myositis autoantibody inhibits histidil-tRNA synthetase: a model for autoimmunity. *Nature* 1983; 304:177-179.
- 164.- Gomez A, Solans R, Simeon CP, Selva A, Garcia F, Fonollosa V, et al. Dermatomyositis, hepatocarcinoma, and hepatitis C: comment on the article by Weidensaul et al. *Arthritis Rheum* 1997; 40:394-395.
- 165.- Mikol J, Felten-Papaiconomou A, Ferchal F, Perol Y, Gautier B, Haguenu M, et al. Inclusion-body myositis: clinicopathological studies and isolation of an adenovirus type 2 from muscle biopsy specimen. *Ann Neurol* 1982; 11:576-581.



166.- Morgan OS, Rodgers-Johnson P, Mora C, Char G. HTLV-1 and polymyositis in Jamaica. *Lancet* 1989; 2:1184-1187.

167.- Arnett FC. HLA genes and predisposition to rheumatic diseases. *Hosp Pract* 1986; 21:89-100.

168.- Engel AG, Arahata K. Mononuclear cells in myopathies: quantitation of functionally distinct subsets, recognition of antigen-specific cell-mediated cytotoxicity in some diseases, and implications for the pathogenesis of the different inflammatory myopathies. *Human Pathol* 1986; 17:704-721.

169.- Emslie-Smith AM, Engel AG. Microvascular changes in early and advanced dermatomyositis: a quantitative study. *Ann Neurol* 1990; 27:343-356.

170.- Arahata K, Engel AG. Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies III: immunoelectron microscopy aspects of cell-mediated muscle fiber injury. *Ann Neurol* 1986; 19:112-125.

171.- Wolf RE, Baethge BA. Interleukin-1 alpha, interleukin-2, and soluble interleukin-2 receptors in polymyositis. *Arthritis Rheum* 1990; 33:1007-1014.

172.- Lundberg IE, Nyberg P. New developments in the role of cytokines and chemokines in inflammatory myopathies. *Curr Opin Rheumatol* 1998; 10:521-529.

- 173.- Love LA, Leff RL, Fraser DD, Targoff IN, Dalakas M, Platz PH, et al. A new approach to the classification of idiopathic inflammatory myopathy: Myositis-specific autoantibodies define useful homogeneous patient groups. *Medicine* 1991; 70:360-374.
- 174.- Miller FW, Twitty SA, Biswas T, Platz PH. Origin and regulation of a disease-specific autoantibody response: antigenic epitopes, spectrotpe stability, and isotype restriction of anti-Jo-1 autoantibodies. *J Clin Invest* 1990; 85:468-75.
- 175.- Miller FW, Waite K, Biswas T, Platz PH. The role of an autoantigen, histidil-tRNA synthetase, in the induction and maintenance of autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:9933-9937.
- 176.- Kourakata H, Takada T, Suzuki E, Enomoto K, Saito I, Taguchi Y, et al. Flowcytometric analysis of bronchoalveolar lavage fluid cells in polymyositis/dermatomyositis with interstitial pneumonia. *Respirology* 1999; 4:223-228.
- 177.- Mazodier P, Elzouki NY, Segelmark M, Eriksson S. Systemic necrotizing vasculitides in severe alpha<sub>1</sub>-antitrypsin deficiency. *QJMed* 1996; 89:599-611.
- 178.- Cronstein B, Weissman G. The adhesion molecules of inflammation. *Arthritis Rheum* 1993; 36:147-157.
- 179.- Krensky A, Robbins S, Springer T, Burakoff SJ. LFA1, LFA2, and LFA3 antigens are involved in CTL-target conjugation. *J Immunol* 1984; 132:2180-2182.

180.- Van Seventer GA, Shimizu Y, Horgan KJ, Shaw S. The LFA-1 ligand ICAM-1 provides an important costimulatory signal for T cell receptor-mediated activation of resting T cells. *J Immunol* 1990; 144:4579-4586.

181.- Hemler M. VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes. *Annu Rev Immunol* 1990; 8:365-400.

182.- Argenbright LW, Barton RW. Interactions of leucocyte integrins with intercellular adhesion molecule 1 in the production of inflammatory vascular injury in vivo: the Shwartzman reaction revisited. *J Clin Invest* 1992; 89:259-272.

183.- Haskard D. Cytokines, growth factors, and interferons. In leRoy E (ed): *Systemic Vasculitis*. New York, Marcel Dekker, 1992, p 223.

184.- Grau G, Roux-Lombard P, Gysler C, Lambert C, Lambert PH, Dayer JM, et al. Serum cytokine changes in systemic vasculitis. *Immunology* 1989; 68:196-198.

185.- Theofilopoulos A. Evaluation and clinical significance of circulating immune complexes. *Prog Clin Immunol* 1980; 4:63-106.

186.- Savage C. Pathogenesis of systemic vasculitis. In Churg A, Churg J (eds): *Systemic Vasculitides*. New York, Igazu-Shoin, 191, p 7.

- 187.- Banks PM, Cohen MD, Ginsburg WW, Hunder GG. Immunohistologic and cytochemical studies of temporal arteritis. *Arthritis Rheum* 1983; 26:1201-1207.
- 188.- Rasmussen N, Petersen J. Cellular immune responses and pathogenesis in c-ANCA positive vasculitides. *J Autoimmun* 1993; 6:227-236.
- 189.- Fouret P, Du Bois RM, Bernaudin JF, Takahashi H, Ferrans VJ, Crystal RG. Expression of the neutrophil elastase gene during human bone marrow cell differentiation. *J Exp Med* 1989; 169:833-845.
- 190.- Janoff A. Elastase in tissue injury. *Annu Rev Med* 1985; 36:207-216.
- 191.- G n reau T, Peyri N, Berard M, Ch rin P, Cabane J, Lehoang P, et al. Human neutrophil elastase in temporal (Giant cell) arteritis: plasma and immunohistochemical studies. *J Rheumatol* 1998; 25:710-713.
- 192.- Anidjar S, Sazmann JL, G ntric D, Lagneau P, Camilleri JP. Elastase-induced experimental aneurysms in rats. *Circulation* 1990; 82:973-981.
- 193.- Cohen JR, Mandell C, Margolis I, Chang JB, Wise L. Altered aortic protease and antiprotease activity in patients with ruptured abdominal aortic aneurysms. *Surg Gynecol Obstet* 1987; 164:355-358.

- 194.- Cohen JR, Sarfati I, Ratner L, Tilson D.  $\alpha_1$ - Antitrypsin phenotypes in patients with abdominal aortic aneurysms. *J Surg res* 1990; 49:319-321.
- 195.- Heiden M, Seitz R, Egbring R. The role of inflammatory cells and their proteases in extravascular fibrinolysis. *Semin Thromb Hemost* 1996; 22:497-501.
- 196.- Mahadeva R, Zhao MH, Stewart S, Cary N, Flower C, Lockwood M, et al. Vasculitis and bronchiectasis in a patient with antibodies to Bactericidal/Permeability increasing protein and  $\alpha_1$ -Antitrypsin deficiency. *Chest* 1997; 112:1699-1701.
- 197.- Stegman CA, Cohen JW, Sluiter WJ. Association of chronic nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and higher relapse rates in Wegener's granulomatosis. *Ann Intern Med* 1994; 120:12-17.
- 198.- West BC, Todd JR, King JW. Wegener's granulomatosis and trimethoprim-sulfamethoxazole. *Arch intern Med* 1987; 106:840-842.
- 199.- Savage COS, Pottinger BE, Gaskin G, Pusey CD, Pearson JD. Auto-antibodies developing to myeloperoxidase and proteinase-3 in systemic vasculitis stimulate neutrophil cytotoxicity towards cultured endothelial cells. *Am J Pathol* 1992; 141:335-342.
- 200.- Nolle B, Specks U, Ludemann J, Rohrbach MS, DeRemee RA, Gross WL. Anticytoplasmic autoantibodies: their immunodiagnostic value in Wegener granulomatosis. *Ann Intern Med* 1989; 111:28-40.

- 201.- Van de Wiel BA, Dolman KM, Van der Meer-Gerritsen CH, Harck CE, Von Dem Borne A, Göldschmeding R. Interference of Wegener's granulomatosis autoantibodies with neutrophil Proteinase 3 activity. *Clin Exp Immunol* 1992; 90:409-414.
- 202.- Baslund B, Szpirt W, Eriksson S, Elzouki AN, Wiiz A, Wieslander J, et al. Complexes between proteinase 3,  $\alpha_1$ -antitrypsin and proteinase 3 anti-neutrophil cytoplasm autoantibodies: a comparasion between  $\alpha_1$ -antitrypsin PiZ allele carriers and non-carriers with Wegener granulomatosis. *Eur J Clin Invest* 1996; 26:786-792.
- 203.- Callea F, Gregorini G, Sinico A, Gonzales G, Bassolasco M, Salvidio G, et al.  $\alpha_1$ -antitrypsin deficiency and ANCA-positive systemic vasculitis:genetic andclinical implications. *Eur J Clin Invest* 1997; 27:696-702.
- 204.- Perlmutter DH. The cellular basis for liver injury in  $\alpha$ -1-antitrypsin deficiency. *Hepatology* 1991; 13:172-185.
- 205.- Ralston DR, Marsh CB, Lowe MP, Wewers MD. Antineutrophil cytoplasmic antibodies induce monocyte IL-8 release. *J Clin Invest* 1997; 6:1416-1424.
- 206.- Haubitz M, Schulzeck P, Schellong S, Schulze M, Kochk M, Brunkhorst R. Complexed plasma elastase as an in vivo marker for leukocyte activation in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis Rheum* 1997; 9:1680-1684.
- 207.- Daouk GH, PalssonR, Arnaout A. Inhibition of proteinase 3 by ANCA and its correlation with disease activity in Wegener's granulomatosis. *Kidney Int* 1995; 47:1528-1536.

208.- Burns A. Pulmonary vasculitis. *Thorax* 1998; 53:220-227.

209.- Badesch DB, Zamora M, Fullerton D, Weill D, Tuder R, Grover F, Schwarz MI. Pulmonary capillaritis: a possible histologic form of acute pulmonary allograft rejection. *J Heart Lung Transplant* 1998; 17:415-422.

210.- Löhr HF, Schlaak JF, Dienes HP, Lorenz J, Meyer zum Büschenfelde KH, Gerken G. Liver cirrhosis associated with heterozygous alpha-1-antitrypsin deficiency type PiMS and autoimmune features. *Digestion* 1995; 56:41-45.

211.- Jeppson JO, Larsson C, Eriksson S. Characterization of alpha-1-antitrypsin in the inclusion bodies from the liver in alpha-1-antitrypsin deficiency. *N Engl J Med* 1975; 293:576-579.

212.- Moore PM, Fauci AS. Neurologic manifestations of systemic vasculitis. A retrospective and prospective study of the clinicopathologic features and responses to therapy in 25 patients. *Am J Med* 1981; 71:517-524.