

Departament de Medicina
Universitat Autònoma de Barcelona

ASPECTES IMMUNOPATOGÈNICS DE
LES MIOPATIES INFLAMATÒRIES

Eduard Gallardo Vigo

Desembre 2001

INDEX

I.INTRODUCCIÓ.....	4
I.1 ESTRUCTURA DEL MÚSCUL ESQUELÈTIC I ORGANITZACIÓ DE LA SEVA MICROVASCULATURA.....	5
I.2 CARACTERÍSTIQUES DE LA BIÒPSIA MUSCULAR NORMAL.....	7
I.3 MIOPATIES INFLAMATÒRIES: ASPECTES CLÍNICS I IMMUNOLÒGICS.....	8
I.3.1 Miositis per cossos d' inclusió	14
<u>Quadre clínic</u>	14
<u>Biòpsia muscular</u>	15
<u>Estudi immunohistoquímic</u>	16
<u>Patogènia</u>	17
I.3.2 Polimiositis	20
<u>Quadre clínic</u>	20
<u>Biòpsia muscular</u>	20
<u>Estudi immunohistoquímic</u>	21
<u>Patogènia</u>	21
I.2.3 Dermatomiositis	23
<u>Quadre clínic</u>	23
<u>Biòpsia muscular</u>	23
<u>Estudi immunohistoquímic</u>	24
<u>Patogènia</u>	26
I.3.4 Inflamació a les distròfies musculars	28
I.4 CITOQUINES I STATS.....	31
I.4.1 Expressió de citokines en el múscul esquelètic en miopaties inflamatòries	31
I.4.2 Transductors de senyal i activadors de la transcripció	33
II. RESUM DE RESULTATS I DISCUSSIO.....	36
Article I "Inclusion Body Myositis and Paraproteinemia: Incidence and Immunopathologic correlations" Annals of Neurology 1997; 41: 100-104.....	38
<u>Hipòtesi</u>	38
<u>Resultats</u>	38

<u>Discussió</u>	40
Article II "Signal Transducer and Activator of Transcription 1 in Human Muscle. Implications in Inflammatory Myopathies." American Journal of Pathology 1997; 151: 81- 88.....	44
<u>Hipòtesi</u>	44
<u>Resultats</u>	44
<u>Discussió</u>	47
Article III "Cathepsins Are Upregulated by IFN- γ /STAT1 in Human Muscle Culture: A Possible Active Factor in Dermatomyositis" Journal of Neuropathology and Experimental Neurology 2001; 60: 847-855.....	52
<u>Hipòtesi</u>	52
<u>Resultats</u>	52
<u>Discussió</u>	55
Article IV " Inflammation in Dysferlin Myopathy: An Immunohistochemical Characterization of 13 Patients" Neurology 2001; 57: 2136-2138.....	61
<u>Hipòtesi</u>	61
<u>Resultats</u>	61
<u>Discussió</u>	62
III. CONCLUSIONS.....	65
IV. REFERÈNCIES.....	69

I.INTRODUCCIÓ

1.1 ESTRUCTURA DEL MÚSCUL ESQUELÈTIC I ORGANITZACIÓ DE LA SEVA MICROVASCULATURA

El múscul esquelètic és un òrgan dissenyat de tal manera que pugui generar, de forma ràpida, força i moviment en una direcció determinada. Això s'aconsegueix mitjançant un sistema de filaments contràctils, principalment l'actina i la miosina, que es troben disposats de forma ordenada formant miofibrilles de 1-3 μ m de diàmetre. Aquestes es col·loquen paral·leles a l'eix longitudinal de la fibra muscular i estan envoltades per la membrana del reticle sarcoplàsmic. La seva aparença és estriada degut a la repetició regular de 2-3 μ m de la sarcòmera o unitat fonamental de contracció i que va de banda Z a banda Z (Figura 1).

El múscul esquelètic està format per fibres musculars que són sincitis que poden arribar a tenir una longitud de fins a 10 cm i que contenen milers de miofibrilles. El diàmetre d'aquestes fibres oscil·la entre 20 i 50 μ m. Els nuclis de les fibres musculars es disposen a la perifèria de les mateixes. El teixit muscular es troba organitzat en fascicles que estan rodejats de teixit connectiu o epimisi. A la vegada cada fascicle està organitzat en grups de fibres o fascicles de menor tamany i que estan recoberts d'una capa de teixit connectiu anomenat perimisi. Finalment, cada fibra muscular està també envoltada de teixit connectiu que anomenem endomisi. En condicions normals l'endomisi pràcticament no s'observa al microscopi òptic.

El múscul esquelètic, degut a la seva funció locomotriu, necessita una abundant

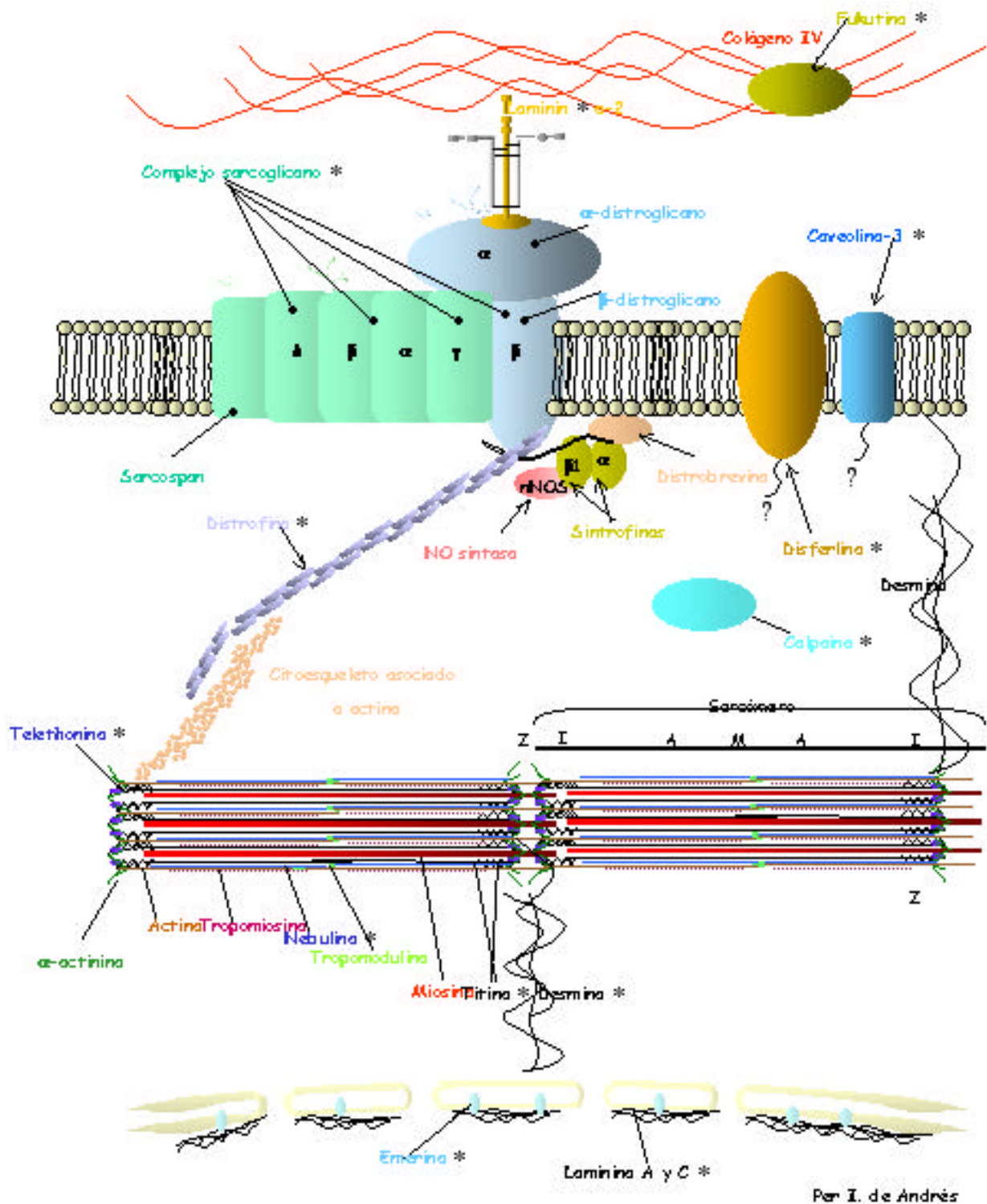


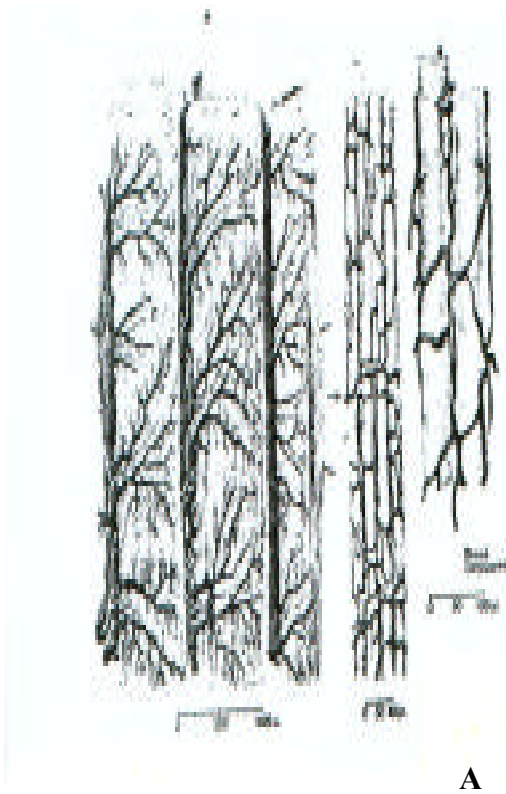
Figura 1. Esquema de les proteïnes que formen part de la matriu extracel·lular, sarcòlemma, sarcòplasma, sarcòmer i envolta nuclear del múscul esquelètic. Amb un asterisc s'indiquen aquelles proteïnes en les que mutacions en el seu gen s'han associat a patologia muscular.

Per I. de Andrés

vascularització que a més ha d'estar molt ben regulada, ja que en un moment donat la demanda d'oxigen i nutrients pot arribar a ésser 100 vegades superior a la basal.

Les artèries que irriguen el múscul es ramifiquen a nivell de perimisi en arterioles cap a l'endomisi i posteriorment en capil·lars. Es a dir, que l'aport sanguini al teixit muscular va des de l'exterior del teixit cap a l'interior. Aquesta observació és rellevant a l'hora de discutir els mecanismes immunopatogènics que es donen en la dermatomiositis, on s'observa una lesió a nivell de capil·lars i on es postula un fenomen d'isquèmia.

La vasculatura del múscul s'agrupa en: arterioles i arterioles terminals, vènules i petites venes col·lectores i capil·lars. El terme arteriola s'utilitza per referir-se a petites artèries d'un diàmetre d'entre 50-100 μm . Les arterioles tenen varies capes de múscul llis, mentre que les arterioles terminals tenen una sola capa i fan menys de 50 μm de diàmetre. A les vènules (8-100 μm) i petites venes col·lectores (100-300 μm) les cèl·lules de les fibres de múscul llis es distribueixen de forma més irregular. Els capil·lars són els segments de vas que es troben entre les arterioles i esfínters precapil·lars per una banda i les vènules a l'altre. El seu diàmetre va des de 4 a 15 μm . Les fibres musculars reben oxigen dels capil·lars per difusió a través d'una distància que va des de 50 μm en repòs a pocs μm durant l'esforç. Els capil·lars es disposen al voltant de la fibra muscular en un número que oscil·la entre 5-8, estan anormalment alterat a la dermatomiositis (Figura 2 A, B i C) (1).



A

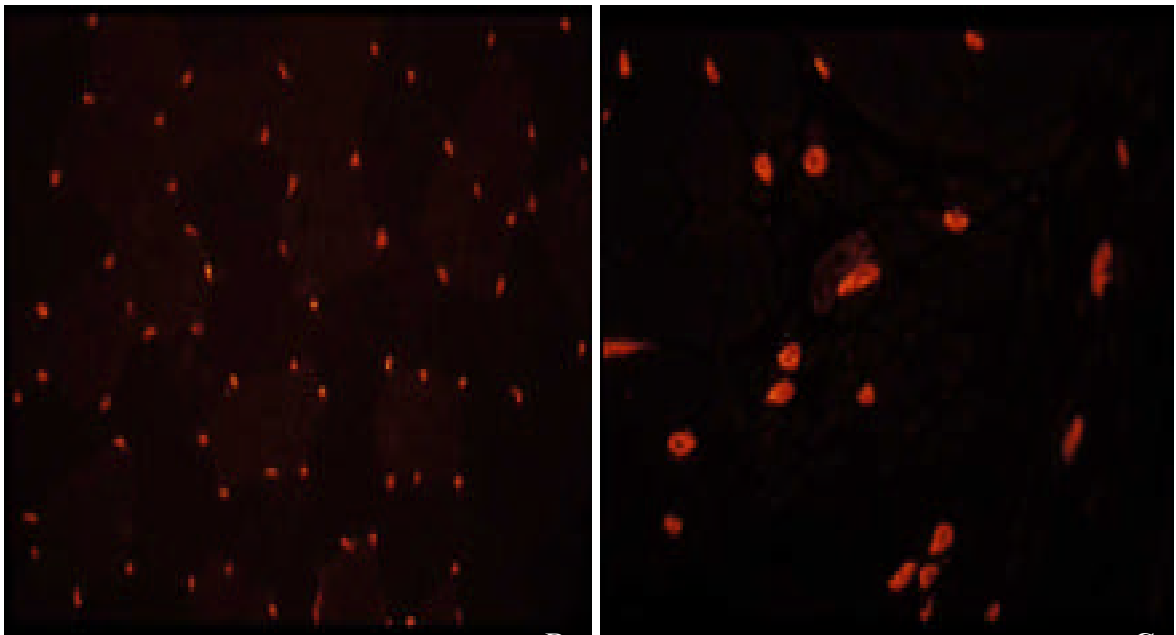


Figura 2. A. Esquema de la vascularització del múscul esquelètic. B. Tinció amb lectina d' *Ulex europaeus* marcada amb biotina mostrant la distribució de capil·lars en una biòpsia normal i C. en la biòpsia d'un malalt amb dermatomiositis. En aquest darrer cas el nombre de capil·lars es troba disminuït i el seu diàmetre és major.

1.2 CARACTERÍSTIQUES DE LA BIÒPSIA MUSCULAR NORMAL

Per poder definir la presència d'anomalies en observar una secció de múscul esquelètic al microscopi i poder establir finalment un diagnòstic concret, és important conèixer bé quines són les característiques d'una biòpsia muscular normal. Una sèrie de tincions histoquímiques ens permeten objectivar totes aquestes característiques de forma precisa. Així doncs una tinció amb hematoxilina-eosina ens permet veure de forma relativament ràpida si el múscul té un aspecte normal o, si ben al contrari, hi ha anomalies que cal estudiar amb detall. Aquesta tinció ens permet veure si els nuclis es disposen a la perifèria de la fibra, si les miofibrilles es disposen de forma ordenada, si el tamany de les fibres és homogeni, si hi ha fibres partides (fenomen de *splitting*) o si, per exemple, hi ha infiltrats inflamatoris. Molt breument, una tinció amb tricròmic de Gomori modificat ens permetrà veure la presència d'anomalies mitocondrials en forma de fibres vermelles trencades (*ragged-red fibers*), un augment del teixit connectiu o si s'observen vacuoles a l'interior de les fibres musculars. La tinció histoquímica d'ATPasa ens permet veure la distribució dels tipus de fibra muscular. Si la tècnica es realitza a un pH de 9.4, les fibres de tipus II o de contracció ràpida es veuen d'un color marró fosc, mentre que les tipus I o de contracció lenta es veuen clares. Es poden fer tincions per ATPasa a altres pH (4.3, 4.6) que mostren un patró, bàsicament invers respecte al observat a pH 9.4 i que serveixen per complementar-lo. La disposició de fibres en un múscul normal recorda un taulell d'escacs. Aquesta distribució també s'observa al realitzar altres tincions per enzims del metabolisme

muscular com ara la nicotín adenosín deshidrogenasa (NADH) o la àcid succínic deshidrogenasa (SDH) que intervenen en la generació d'energia a nivell de mitocondries. Hi ha altres tincions que ens indiquen si hi ha una acumulació anormal de cadenes de sucres com ara el PAS, o un increment en la concentració de greixos (oil-red), que en condicions normals no s'observen (Figura 3).

Així doncs, les tincions histoquímiques ens permeten una aproximació acurada al tipus de miopatia que pateix un malalt. Però aquestes tincions es complementen en el cas que ens ocupa amb tincions immunohistoquímiques, com veurem més endavant.

1.3 MIOPATIES INFLAMATÒRIES: ASPECTES CLÍNICS I IMMUNOLÒGICS

El concepte de *miopaties inflamatòries (MI)* inclou un grup heterogeni de malalties musculars que clínicament es manifesten amb debilitat muscular de curs subagut o crònic i histològicament es caracteritzen per la presència d' infiltrats inflamatoris en el múscul (2-4). Aquest grup engloba tres entitats : La *Polimiositis (PM)*, la *Dermatomiositis (DM)* i la *Miositis per Cossos d' Inclusió (MCI)* La etiologia és desconeguda i en la patogènia d' aquestes miopaties s' han implicat mecanismes d' autoimmunitat i infeccions virals del múscul esquelètic.

Per a establir el diagnòstic d' aquestes malalties ens basem en:

- 1) *Característiques clíniques* (s'aniran indicant per cada entitat durant la introducció).

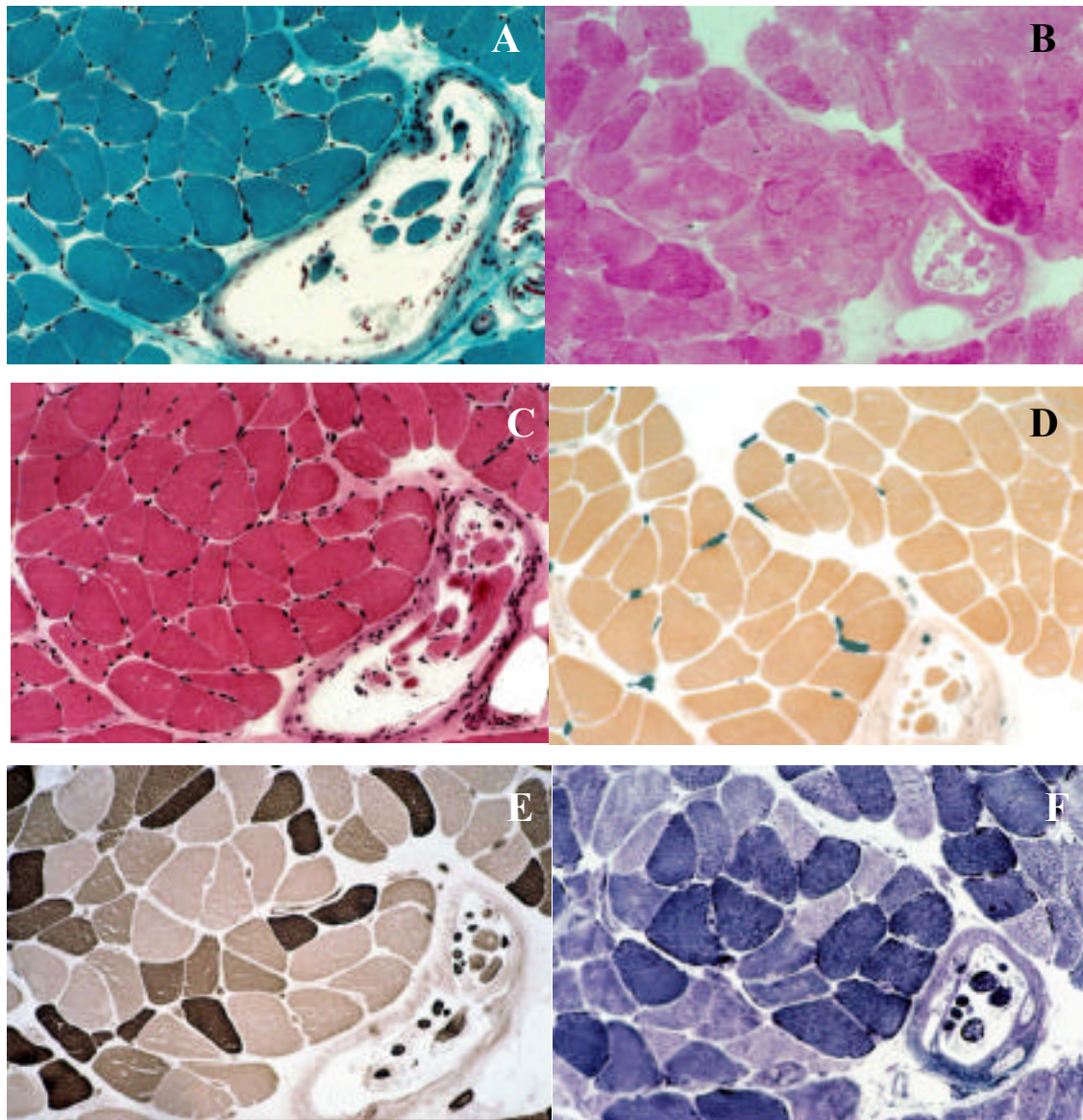


Figura 3. Tincions histoquímiques en crioseccions seriades de múscul esquelètic **A.** Tricròmic modificat de Gomori, **B.** PAS, **C.** H&E, **D.** Colinesterasa, **E.** ATPasa pH 9.4, **F.** NADH

2) *Determinació d'enzims musculars.*

L'enzim més sensible és la creatin quinasa (CK), la qual pot estar aixecada fins a 50 vegades el valor normal en les fases actives de la malaltia. Encara que habitualment els nivells de CK segueixen l'activitat de la malaltia, poden ser normals en una MI activa. A la MCI els nivells no solen ser més de X10, i en alguns pacients poden romandre normals des de l'inici de la malaltia. Els nivells de CK també poden ser normals en pacient amb DM infantil sense tractament fins i tot activa, així com en malalts amb DM i PM associades a malaltia del teixit connectiu. A més de les CK, també es poden trobar aixecades en el sèrum: la transaminasa del glutàmic-oxalacètic (SGOT), la transaminasa del glutamat-piruvat (SGPT), la lactat deshidrogenasa (LDH) i la aldolasa (5).

3) *Determinació d'autoanticossos*

Els autoanticossos que es poden detectar a les miositis es poden agrupar en tres categories (6): Els autoanticossos específics de miositis (AEM), els autoanticossos associats a miositis (AAM) i autoanticossos específics de teixits. Dins dels AEM trobem els anti-ARNt sintetases: Jo-1, PL-7, PL-12, EJ, OJ i KS. A més també s'han trobat KJ, SRP, Mi-2, Ku, Fer, MAS i PMS1. Entre els AAM trobem anticossos que s'associen a miositis però que també es troben en altres patologies i que hi poden estar més estretament associades: PM-Scl, 56kD, SSa/Ro, U1-nRNP i U2-nRNP. No

s'han identificat anticossos específics de teixit amb alta especificitat a la PM o a la DM.

4) *Electromiografia (EMG)*

La electromiografia (EMG) d'agulla mostra un augment d'activitat espontània amb fibrilacions, descàrregues repetitives complexes i ones positives en repòs, potencials miopàtics caracteritzats per una durada curta i unitats polifàsiques de baixa amplitud durant l'activitat voluntària. Aquest patró d'EMG es pot trobar en processos miopàtics aguts, tòxics i actius i no és específic de les miopaties inflamatòries. Una barreja de potencials neurògens i miopàtics és més comuna en la MCI, encara que es pot observar a la DM o PM, sobretot en fases tardanes de la malaltia. Els estudis d'EMG són útils per excloure processos neurògens i confirmar la miopatia (5).

5) *Biòpsia muscular* (s'aniran indicant per cada entitat durant la introducció).

El diagnòstic cert i la diferenciació entre cadascuna de les entitats es realitza mitjançant la biòpsia muscular, que prèviament congelada, s'estudiarà amb tècniques d'histoquímica i immunohistoquímica i, en cas necessari microscopia electrònica. Donat que el patró del teixit muscular normal a nivell microscòpic, varia d'uns músculs a altres, es recomana realitzar la biòpsia d'un múscul amb el que s'estigui familiaritzat. Els músculs que es biopsien habitualment són el bíceps, el tríceps, el quadríceps o el bessó. A més ha de tractar-se d'un múscul afectat clínic o electrofisiològicament, encara que no ha de ser ni molt atròfic ni molt dèbil. En

malalties agudes o subagudes la biòpsia s'ha de realitzar d'un múscul bastant afectat, mentre que en el cas de processos més crònics ha de tractar-se d'un múscul poc afectat, perquè sinó es corre el risc de trobar només teixit adipós o fibrós, fent difícil el poder establir un diagnòstic. També és important realitzar la biòpsia en una àrea que no s'hagi punxat a l'hora de fer el EMG, ja que podria donar falsos positius en valorar una possible reacció inflamatòria. La orientació de les fibres musculars és molt important per a la interpretació posterior, de tal manera que el múscul ha de estar orientat de forma que les fibres musculars es vegin en tall transversal. A més de processar-la en parafina, que és molt útil per el diagnòstic de determinades condicions patològiques, com sarcoidosi o vasculitis, la biòpsia muscular ha de ser congelada amb molta cura (isopentà refredat en nitrogen líquid) per evitar artefactes de congelació que fan molt difícil la seva interpretació posterior i tenen que estudiar-se mitjançant histoquímica, immunohistoquímica, microscopia electrònica i en ocasions bioquímica. Es important assenyalar que les biòpsies haurien de congelar-se en els 30 minuts posteriors a la seva realització. El mínim de tincions que han de realitzar-se inclouen les esmentades prèviament a la pàgina 7. Aquestes tincions donen informació sobre morfologia, patró intermiofibrilar, etc. La lectura de les biòpsies seguint una determinada sistematització assegura no només el diagnòstic de les MI sinó que a més descarta l'existència d'altres processos que formen part del seu diagnòstic diferencial (malalties neurògenes, miopaties de tipus distròfic, metabòlic o d'altres).

Per altre banda, la realització de tincions immunohistoquímiques pot donar molta informació sobre la patogènia de la malaltia, com s'anirà indicant al llarg de la introducció. Per a realitzar aquesta tècnica s'utilitzen anticossos monoclonals dirigits

contra molècules específiques per a les diferents poblacions limfocitàries (CD4, CD8, CD20, CD68) i el complex d'histocompatibilitat de classe I (MHC-I) entre d'altres. La detecció es realitza sobre seccions (entre 5 i 10 μm) congelades de la biòpsia muscular. Per visualitzar el marcatge s'utilitzen anticossos secundaris marcats amb peroxidasa i posterior revelat amb diaminobenzidina, o bé amb secundaris marcats amb molècules fluorescents (fluoresceïna, rodamina) i posterior observació al microscopi de fluorescència convencional o amb un microscopi confocal. En condicions normals no s'observen cèl·lules infiltrant la biòpsia i la expressió de MHC-I es restringeix als capil·lars, mentre que a les MI, com ja veurem més endavant, s'observa expressió de MHC-I a les fibres musculars i les cèl·lules infiltrants. En situacions d'inflamació també es troba un augment d'expressió de molècules d'adhesió. Aquestes proteïnes, sovint glicosilades, estan implicades en el tràfic de cèl·lules des de el torrent sanguini als llocs on hi ha inflamació. S'expressen tant a nivell de les cèl·lules infiltrants (VLA-4, LFA-1, L-selectina...) com a nivell de cèl·lules endotelials (ICAM-1 i 2, VCAM-1...). En condicions normals aquestes molècules no s'expressen (o ho fan a nivells molt baixos) a les cèl·lules endotelials que es troben al múscul. La seva expressió però, és induïda, incrementada o regulada per citoquines, chemoquines, hormones o contactes entre cèl·lules.

A continuació faré una descripció de les característiques clíniques, troballes patològiques, immunohistoquímica i descripció dels mecanismes immunopatogènics que es postulen per a cadascuna de les miopaties inflamatòries (PM, DM, MCI), així com de les distròfies musculars amb inflamació.

I.3.1 Miositis per cossos d'inclusió

Quadre clínic

El terme miositis per cossos d'inclusió (MCI) va ésser introduït l'any 1971 per Yunis i Samaha (7) per descriure un grup de pacients amb polimiositis crònica, la biòpsia muscular dels quals presentava fibres musculars anormals que contenien vacuoles i inclusions filamentoses característiques al nucli i al citoplasma. La MCI esporàdica (MCIE) és una malaltia muscular adquirida comú als Estats Units (8), però la seva incidència a Europa és encara incerta. Molts pacients inicien el quadre després de la cinquena dècada de la vida. Cal distingir la MCIE de les miopaties amb cossos d'inclusió hereditàries (MCIh). Aquest terme va ésser introduït el 1993 (9) per referir-se a malalties musculars hereditàries amb una patologia molt semblant a la MCIE, és a dir presència de vacuoles i d'inclusions tubulofilamentoses al citoplasma, però amb història familiar i, en general, sense presència d'infiltrats inflamatoris. D'aquí la denominació miopatia i no miositis. La MCIE es dona més freqüentment en homes, que inicien un quadre subagut de debilitat muscular proximal més acusada en extremitats inferiors, amb creatin quinasa (CK) normal o discretament augmentada, o en pacients diagnosticats de PM que no responen a la corticoteràpia.

La debilitat i atrofia muscular, que poden ser asimètriques, són lentes i progressives, afectant inicialment a la musculatura proximal de les extremitats inferiors per a després generalitzar-se de forma més greu que en les altres MI als músculs quadríceps, ileopsoas, tríceps i bíceps. Es característica l'afectació dels músculs flexors dels dits a les EESS. El component distal, el fet que la distribució de la debilitat i la atrofia poden

ésser asimètriques i una pèrdua al inici del reflex patelar, mimetitzen en alguns casos una enfermetat de les neurones motores, especialment quan els nivells de CK al sèrum són baixes (2). Un 60% dels malalts presenten disfàgia, especialment en fases avançades de la malaltia (4). En un 15% de casos, la MCIe pot estar associada a altres malalties autoimmunes sistèmiques o del teixit connectiu (10). En alguns grups ètnics s'han descrit casos de formes hereditàries recessives i dominants amb patrons específics (11).

Biòpsia muscular

La histoquímica de les biòpsies musculars de pacients amb MCIe mostra a més de la presència d'infiltrats inflamatoris endomisials amb un patró idèntic a la PM, una sèrie de característiques que la defineixen. Una de les més importants és la presència de vacuoles de tamany variable en una o més fibres. En contra del que es diu en la literatura moltes d'aquestes vacuoles o no estan ribetejades o ho estan tant sols parcialment. Són característiques les fibres vermelles trencades, fibres citocrom oxidasa C negatives i mitocondries anormals amb inclusions paracrystal·lines. També s'observen fibres angulades o arrodonides formant petits grups.

Un percentatge de fibres musculars vacuolades, que segons els autors pot arribar des de el 10% al 70%, presenten focus d'amiloide.

Per a establir el diagnòstic de MCIe diferenciant-lo de la polimiositis (PM) el grup de la Dra Askanas (8) suggereix realitzar una sèrie de proves: 1) Una tinció de tricròmic Engel-Gomori per a visualitzar vacuoles, infiltrats inflamatoris i fibres vermelles trencades. 2) Una tinció amb Vermell Congo (12) o cristall violeta per a detectar dipòsits d'amiloide en algunes fibres vacuolades. 3) Una reacció amb fosfatasa

alcalina per a avaluar la tinció del teixit connectiu perimisial que és típicament negatiu o molt dèbil en la MCIE, però de moderat a prominent en la PM activa. 4) immunohistoquímica amb SMI-31 per detectar la proteïna tau fosforilada dels filaments helicoidals aparellats (FHA) tant en la MCIE com en la MCih . 5) Si no es disposa de SMI-31 pot utilitzar-se un anticòs anti-ubiquitina ja que s'han trobat inclusions d'aquesta proteïna en la MCIE però no en altres miopaties inflamatòries.

A nivell ultraestructural el criteri diagnòstic per a la MCIE és la presència de FHA en el citoplasma de 15 a 21nm de diàmetre molt sovint formant grups. Aquests FHA són molt semblants als que es troben en els cervells de pacients amb malaltia d' Alzheimer (AD) ja que també contenen la proteïna tau fosforilada, el que confereix un valor afegit a l'estudi d'aquestes miopaties.

Estudi immunohistoquímic

Existeix un infiltrat de limfòcits T, amb un clar predomini de limfòcits CD8+ que pot observar-se en els talls criostàtics de les biòpsies musculars d'aquests malalts, processades mitjançant tècniques immunohistoquímiques i utilitzant diferents anticossos monoclonals. Aquests limfòcits es troben invadint fibres musculars tant amb signes de degeneració com en fibres musculars normals. En les mateixes àrees d'infiltrats s'observen a més macròfags i una expressió anormalment incrementada d'antígens d'histocompatibilitat de classe I (HLA I) en el sarcolema de les fibres musculars. L'increment de HLA I es demostra no només en aquelles fibres musculars que són objecte de l' atac immune sinó que s'observa distribuït de forma homogènia en tot el teixit i es suposa secundari a la presència de citoquines circulants. Els estudis

realitzats en les demás estructures musculars incloent el teixit connectiu, la microvascularització i els nervis intramusculars són normals.

Patogènia

La MCI és la causa més comuna de miopatia adquirida en pacients més grans de 50 anys als Estats Units. La causa/es no és clara però es suposa que els mecanismes d'autoimmunitat hi juguen un paper important i existeix una miocitotoxicitat mitjançant limfòcits T citotòxics que detecten antigens encara desconeguts en la membrana muscular presentats per molècules d' histocompatibilitat de classe I. Aquesta hipòtesi és defensada pels Drs AG Engel i MC Dalakas. Estudis experimentals, en els que el múscul procedent de biòpsies es va cocultivar amb limfòcits T, recuperats de la pròpia biòpsia muscular, van demostrar que algunes subclones d'aquests limfòcits eren citotòxiques per aquell múscul, corroborant la hipòtesi de la toxicitat. A més, l'estudi del TCR dels infiltrats de biòpsies de MCIe van mostrar un patró oligoclonal amb un predomini dels gens V 3, V 2 i V 6. La regió CDR3 però, era heterogènia, la qual cosa fa pensar que es tracta d'una resposta contra un superantigen més que contra un antigen específic de múscul (13). El fet que a la MCI es trobin acúmuls de proteïnes característics del cervell de pacients amb malaltia d'Alzheimer (MA), com per exemple el β -amiloide, fa que es postuli un mecanisme neurodegeneratiu en la seva patogènesi. Al 1991 Mendell et al van descriure la presència anòmla de β -amiloide en fibres musculars vacuolades tant en MCIe com MCIh (12). Posteriorment, es va demostrar la presència d' altres epítops de APP així com el seu ARNm (14). Era el primer indicati de que aquestes proteïnes podrien tenir un paper patogènic no només en el cervell, sinó també en el múscul. A partir d'aquí

s'ha observat la presència d'altres "proteïnes característiques de la MA" en fibres musculars vacuolades tant de MCIe com MCIh incloent la 1-antiquimiotripsina, apoliproteïna E, ubiquitina i la proteïna tau fosforilada. També s'ha descrit la presència de presenilina-1 en les MCI. S'han detectat prions en el múscul de MCI i no en el cervell de pacients amb AD. A més s'ha detectat la presència de ARNm priònic, no demostrat en les malalties cerebrals per prions. Els tubulofilaments de 15-21nm que es troben a la MCI són molt similars als filaments helicoidals aparellats que es troben a la MA. Donat que la proteïna tau no es troba en fibres musculars normals, la immunoreactivitat que s'observa a la MCIe té una importància potencial. Experiments *in vitro* realitzats en els darrers 4 anys en els que es va transfectar múscul humà normal amb el gen de la APP provocant la seva sobreexpressió, donava lloc a l'aparició, en les fibres musculars en cultiu, de vacuoles, dipòsits d'amiloide i inclusions paracristal·lines en mitocòndries anormals. A més les fibres musculars no podien ésser innervades apropiadament en cocultius amb neurones d'embrió de pollastre, el que suggeria que aquest mecanisme era el responsable de la denervació observada a la MCIe. Totes aquestes són característiques molt semblants a les detectades a la MCI, representant un valuós model experimental per a posteriors estudis moleculars, no només de MCI sinó potser també d' MA. Donat que varies proteïnes es troben acumulades de forma anòmala en la MA i en les MCI, les hipòtesis que es proposen en aquest moment suggereixen que poden compartir mecanismes patogènics. En ambdues es dona un envelliment cel·lular i la presència d'estrès oxidatiu. Així doncs, si es confirma la teoria de que l'estrès oxidatiu és el factor que més contribueix a la patologia, es podrien dissenyar estratègies terapèutiques dirigides cap a la reducció de radicals lliures o prevenció de la seva formació en les fibres musculars afectades (8).

A la MCIE i MCIh s'observen alteracions dels mionuclis, com ara acúmuls de filaments tubulars de 15-18nm, diferents dels observats a la distròfia oculo-faríngea on tenen un tamany de 8.5nm. També s'observen acúmuls d'una proteïna d'unió a ADN de cadena senzilla (15). Donat que a la MCI els nuclis tendeixen a desintegrar-se i descarregar el seu contingut al citoplasma, els filaments que es veuen acumulats en aquest i les vacuoles podrien ser conseqüència de la destrucció dels mionuclis. Aquest dany de la matriu nuclear pot afectar la organització genòmica del ADN i com a conseqüència a una expressió gènica aberrant, donant lloc a la acumulació de proteïnes "estranyes" a zones llunyanes de la unió neuromuscular com ja hem descrit anteriorment (16).

Finalment, a la MCI s'han descrit també anomalies mitocondrials, com ara un augment del seu número contenint algunes d'elles inclusions paracristal·lines. A més s'han descrit múltiples deleccions del ADN mitocondrial en 3 pacients amb MCIE (17). En pacients amb PM i DM aquest fet és molt menys freqüent. El seu significat no és clar ja que en les miopaties mitocondrials no es dona ni el patró de distribució de la debilitat de la MCI ni les vacuoles i inclusions intranuclears. A més les deleccions múltiples del ADN mitocondrial s'associen a oftalmoplegia externa progressiva que no s'observa a la MCIE. Es creu que a la MCIE hi ha una afectació de la comunicació entre els genomes del nucli i de la mitocondria. Mutacions de l'ADN nuclear podrien fer que el genoma mitocondrial fos més sensible a patir deleccions o a eliminar reordenaments anòmals del seu ADN. Tant si aquests canvis són primaris o secundaris, les deleccions del ADN mitocondrial podrien jugar un paper en la via patogenètica que portaria a la degeneració muscular i a la debilitat (16).

I.3.2 Polimiositis

Quadre clínic

Aquesta malaltia, que es dona habitualment en adults, compleix amb les manifestacions clíniques comunes a totes les MI no té, però, característiques clíniques diferencials com tenen les altres dues integrants del grup, DM i MCIe.

Per aquesta raó la millor manera de definir la PM és dient que és una entitat en la que no s'observen: afectació cutània, debilitat dels músculs de oculars i facials, història de malaltia neuromuscular familiar, signes d'endocrinopatia, miositis per cossos d'inclusió o història d'exposició a drogues miotòxiques i toxines. La PM es pot donar aïllada o solapada amb altres malalties autoimmunes o infeccions virals, especialment per HTLV-I o VIH (18).

Biòpsia muscular

La PM es caracteritza per la presència d'infiltrats inflamatoris endomisials que en general es distribueixen de forma molt similar a com ho fan en la MCI, és a dir, al voltant de fibres musculars d'aspecte normal o de fibres amb característiques de necrosi muscular. No s'observen troballes com les que es donen a la DM o MCI, de tal forma que la seva característica és l'absència dels signes descrits en les altres miopaties en presència d'infiltrats inflamatoris. Per tant, l'estudi histològic mostra fibres necròtiques i infiltrats inflamatoris. No obstant això, en alguns pacients amb una miopatia adquirida que compleix els criteris de PM no es troben infiltrats inflamatoris, encara que sí s'observen fibres necròtiques o degenerants. En aquests casos poden adoptar-se dues actituds, o bé catalogar al pacient de probable PM, o bé

repetir la biòpsia muscular en una altre àrea. Alguns autors recomanen la realització d'una RMN amb contrast per a determinar àrees anòmales i realitzar en elles la biòpsia muscular.

Estudi immunohistoquímic

A la PM l' estudi immunohistoquímic té unes característiques pràcticament idèntiques a les observades a la MCI. Així, els infiltrats són predominantment de limfòcits T citotòxics. S' observa a més un gran nombre de macròfags activats i hi ha també un increment en l'expressió d'antígens d'histocompatibilitat de classe I a les fibres musculars. Així doncs, aquesta malaltia es suposa mediada per immunitat cel·lular contra antígens encara desconeguts de la fibra muscular. S'ha descrit un pacient en el que la caracterització immunohistològica de l'infiltrat inflamatori va demostrar que estava format per limfòcits que expressaven el receptor de cèl·lules T amb les cadenes α / β . A més totes les fibres expressaven nivells molt alts d'antigen MHC de classe I antigen i la proteïna de shock tèrmic de 65-kd. El malalt va presentar una resposta molt bona al tractament amb corticoesteroids (19). Aquest cas és de moment l'únic, ja que la caracterització del receptor dels limfòcits T dels infiltrats inflamatoris en la PM és de tipus α / β .

Patogènia

La citotoxicitat mediada per cèl·lules T CD8+ sembla ser antigen específica perquè està associada amb l'expressió de HLA I, condició indispensable per a que un antigen sigui reconegut per les cèl·lules T CD8+. Aquestes i els macròfags activats expressen integrines (LFA-1, VLA-4) en la seva superfície que els permeten accedir al teixit

muscular a través de les cèl·lules endotelials gràcies als receptors per a integrines que aquestes expressen (VCAM-1, ICAM-1). Les cèl·lules CD8⁺ reconeixien sobre la fibra muscular un antigen desconegut en el context de HLA de classe I. Les citokines alliberades al torrent circulatori (possiblement per una infecció viral) facilitarien la extravasació de cèl·lules inflamatòries i la expressió de HLA de classe I a les fibres musculars. La interleuquina-1 (IL-1), tumor necrosis factor (TNF- α) i interferó (IFN- γ) secretades per part dels macròfags i cèl·lules T CD8⁺ activats afavoririen la miocitotoxicitat i incrementarien la expressió de HLA de classe I. En algun cas, les cèl·lules T / γ que reconeixien proteïnes de shock tèrmic, com ja hem mencionat anteriorment, podrien tenir també un efecte miotòxic. Una de les molècules implicades en el dany que es produeix a la fibra muscular en les reaccions de citotoxicitat mediades per cèl·lules és la perforina (Figura 4). En un estudi realitzat per Goebels et al utilitzant microscopia confocal, van demostrar que el 43% de limfòcits T CD8⁺ en biòpsies de malalts amb PM presentaven una expressió de perforina localitzada vectorialment cap a la fibra muscular diana. Això indicaria un reconeixement específic a través del receptor de la cèl·lula T d'un antigen de la superfície muscular. En canvi a la DM, la perforina es distribuïa a l'atzar pel citoplasma de les cèl·lules T infiltrants, reflexant una activació no específica (20). Els macròfags activats també expressen receptor Fc per a IgG i complement, podent unir-se a la fibra muscular a través del receptor Fc, exercint així un efecte citotòxic directe.

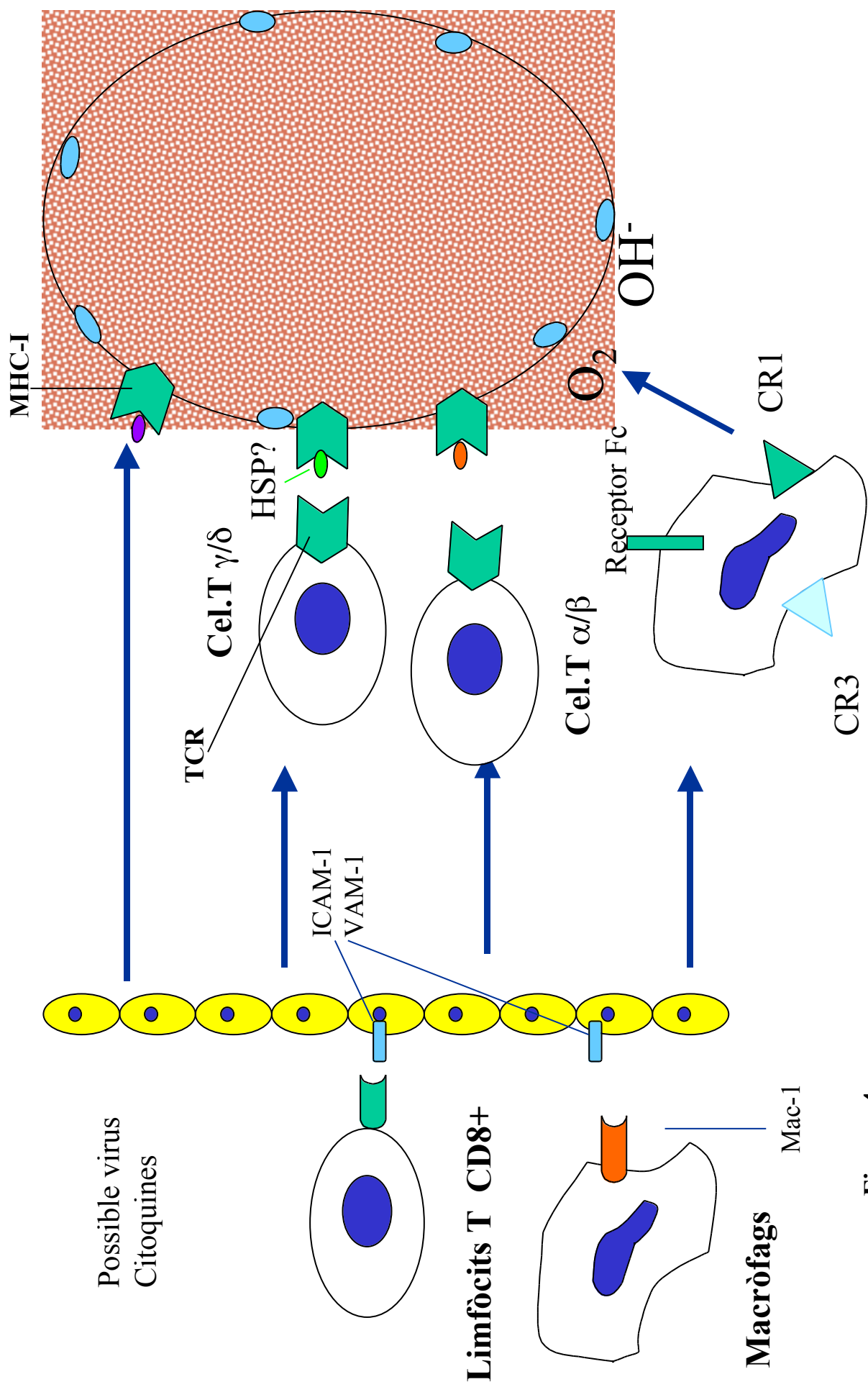


Figura. 4

I.2.3 Dermatomiositis

Quadre clínic

La característica clínica que distingeix aquesta entitat és la presència d'exantema cutani, que acompanya o, més freqüentment, precedeix a la debilitat muscular. El grau de debilitat i afectació cutània varia de cas a cas. Aquesta pot manifestar-se com una erupció heliotròpica a les parpelles, amb edema, eritema dels artells acompanyat d'una erupció escamosa violàcia (signe de Gottron). Les lesions eritematoses inicials poden acabar en una escamació de la pell amb pigmentació i despigmentació, donant a vegades un aspecte brillant. L'erupció eritematosa pot donar-se també als genolls, colzes, malèols, coll, part superior del pit (en forma de V) i a l'esquena o espatlles. Les cutícules poden ser irregulars, engruixides i distorsionades, podent les àrees palmar i plantar presentar un aspecte aspre amb línies irregulars fosques que recorden les mans d'un mecànic. També és característica la presència de capil·lars dilatats a la base de les ungles. L'enfermetat s'inicia amb una varietat de símptomes sistèmics, que inclouen febre, adinàmia o símptomes gastrointestinals lleus. La debilitat és d'inici subagut i afecta a les cintures escapular i pèlvica, produint les mateixes dificultats en les activitats diàries esmentades prèviament. Les mialgies són més comuns que en la PM.

Biòpsia muscular

A la DM s'observen infiltrats inflamatoris que poden ser poc marcats i que es localitzen predominantment en àrees perivasculars o en les regions de teixit connectiu perifascicular o interseptal. El marcador histològic que diferencia la DM de les altres

MI és la presència de fibres atrofiques amb una distribució perifascicular. Batten al 1912 va descriure i il·lustrar fibres musculars, totes en una fase d'atròfia a la perifèria del fascicles en un nen amb DM (21). L'atròfia perifascicular, que afecta tant fibres tipus I com tipus II, pot ser molt clara en ocasions però pot ser molt poc evident en altres, per la qual cosa ha de ser sistemàticament buscada ja que és una de les claus del diagnòstic histopatològic, fins i tot en absència d'infiltrats inflamatoris. En adults es troba present en al voltant del 40-50% de les biòpsies, mentre que en nens està present pràcticament sempre. L'atròfia en ella mateixa és el resultat final de la necrosi de fibres i una regeneració insuficient o bé, segueix a episodis repetits de degeneració i reparació incompleta. Aquesta distribució particular de l'atròfia de fibres musculars també s'interpreta com secundària a microinfarts per oclusió vascular.

Estudi immunohistoquímic

L'estudi immunohistoquímic a la DM té parts diferenciades com són la caracterització dels infiltrats inflamatoris, utilitzant diferents anticossos monoclonals front a molècules que són específiques de cada subtipus cel·lular que ha demostrat, que a la DM, l'infiltrat inflamatori endomisial està format sobre tot per limfòcits B i limfòcits T, amb un predomini de cèl·lules T CD4+. En menor proporció es poden veure limfòcits CD8+ i macròfags. Aquests infiltrats poden localitzar-se esporàdicament al voltant de fibres musculars, però és molt més típic que es trobin en zones perimisials al voltant dels vasos generalment de calibre mitjà, o escampats de forma difosa. A més, s'ha observat un augment d'expressió de les molècules d'adhesió ICAM-1 i VCAM-1 a la microvasculatura dels músculs de pacients amb

DM i PM i no en controls. Aquesta expressió es trobava també en capil·lars que no estaven envoltats de cèl·lules inflamatòries. En el cas de la DM aquest fenomen es podria explicar perquè el complement activat dipositat als vasos, com veurem més endavant, és capaç d'induir l'expressió de ICAM-1 i VCAM-1. En alguns casos també s'observava expressió d'aquestes molècules en les fibres musculars a DM i PM. Aquest fet es podria explicar per la mateixa reacció inflamatòria, ja que IFN- γ i TNF- α són capaços d'induir la expressió de ICAM-1 i VCAM-1 en miotubs en cultiu (22). Per altre banda, els mateixos autors detectaren expressió dels lligands naturals d'aquestes molècules d'adhesió, LFA-1 i VLA-4, en les cèl·lules infiltrants a la PM i a la DM. Així doncs, tot i que aquestes entitats tenen mecanismes immunopatogènics diferenciats, les vies d'adhesió i migració dels infiltrats inflamatoris són comunes.

L'estudi de la microvasculatura del múscul ha donat molta informació, ja que utilitzant marcadors d'endoteli capil·lar com la lectina de *Ulex europeus* i anticossos front el complex membranolític del complement C5b-9 (MAC de membrane attack complex) es detecta una clara disminució en el número dels capil·lars i dipòsits de complement (MAC) en ells. Els estudis quantitius realitzats han mostrat que la disminució en el número de capil·lars és tant per àrees de múscul com per fibra muscular estant en moltes ocasions a més a més dilatats.

L'anàlisi de biòpsies de pell de malalts amb DM va demostrar que a la pell lesionada també es troba un elevat percentatge de dipòsits de MAC a nivell de vasos de la dermis i a la unió dermo-epidèrmica, en comparació en zones de pell no lesionada on no s'observaven aquests dipòsits (23).

Els estudis de microscopia electrònica demostren que els capil·lars endomisials de malalts amb DM presenten estructures microtubuloreticulars, pèrdua de membrana plasmàtica endotelial i organel·les citoplasmàtiques d'aparença anormal. A més l'endoteli està més engruixit que a la PM. Aquests canvis a nivell d'endoteli són menys prominents a la DM paraneoplàsica (24).

S'ha vist que els malalts amb MI en que no s'observen lesions als capil·lars tenen una forma més indolent amb una resposta retardada al tractament. En canvi, els malalts en que hi ha un dany a nivell de capil·lars, presenten una major morbiditat i mortalitat, però amb una resposta més ràpida al tractament immunosupressor (25).

El tractament amb immunoglobulines endovenoses, exerceix el seu efecte beneficiós en la DM (26) precisament perquè intercepta l'ensamblatge i deposició de MAC als capil·lars endomisials, mitjançant la formació de complexos entre les immunoglobulines injectades i C3b, prevenint d'aquesta forma la incorporació de molècules C3 activades a la C5 convertasa (27).

Patogènia

La tipificació limfocitària suggereix que en la DM existeix un component immunològic caracteritzat fonamentalment per immunitat humoral, i l'estudi capil·lar apunta que aquest procés immune està dirigit contra components de la microvasculatura del múscul i mediada per complement. També és possible que els immunocomplexos afectin la fibra muscular directament. La successió d'esdeveniments que s'admet que poden tenir lloc a la DM, és que després de la reacció antígen-anticòs a l'endoteli capil·lar, es produeix el dipòsit de complement i la lesió tisular isquèmica amb

reducció en el nombre de capil·lars (Figura 5). Per això, la distribució de la isquèmia és en microinfarts amb l'aparició d'inflamació. L'atrofia perifascicular probablement reflexaria una hipoperfusió lògicament més prominent a les àrees més distals. Això vol dir que donat que la irrigació muscular va del exterior a l'interior del múscul, les zones abans afectades haurien d'ésser les més endomisials i no les perifasciculars. És possible que la isquèmia no sigui l'únic factor que intervingui en aquest fenomen, com ja veurem en els articles 2 i 3 que es presenten en aquesta tesi. A més la presència d'infiltrats inflamatoris és freqüent a la DM i al menys part del dany a les fibres musculars podria estar causat per les cèl·lules inflamatòries.

Tot i que es suposa que l'antigen que desencadena aquesta enfermetat deu estar localitzat en l'endoteli capil·lar, encara no ha pogut ser identificat. Existeixen diversos estudis en els que, utilitzant endotelis extrets de cordó umbilical humà, suggereixen la presència d'anticossos anti-cèl·lula endotelial en pacients amb DM (28, 29).

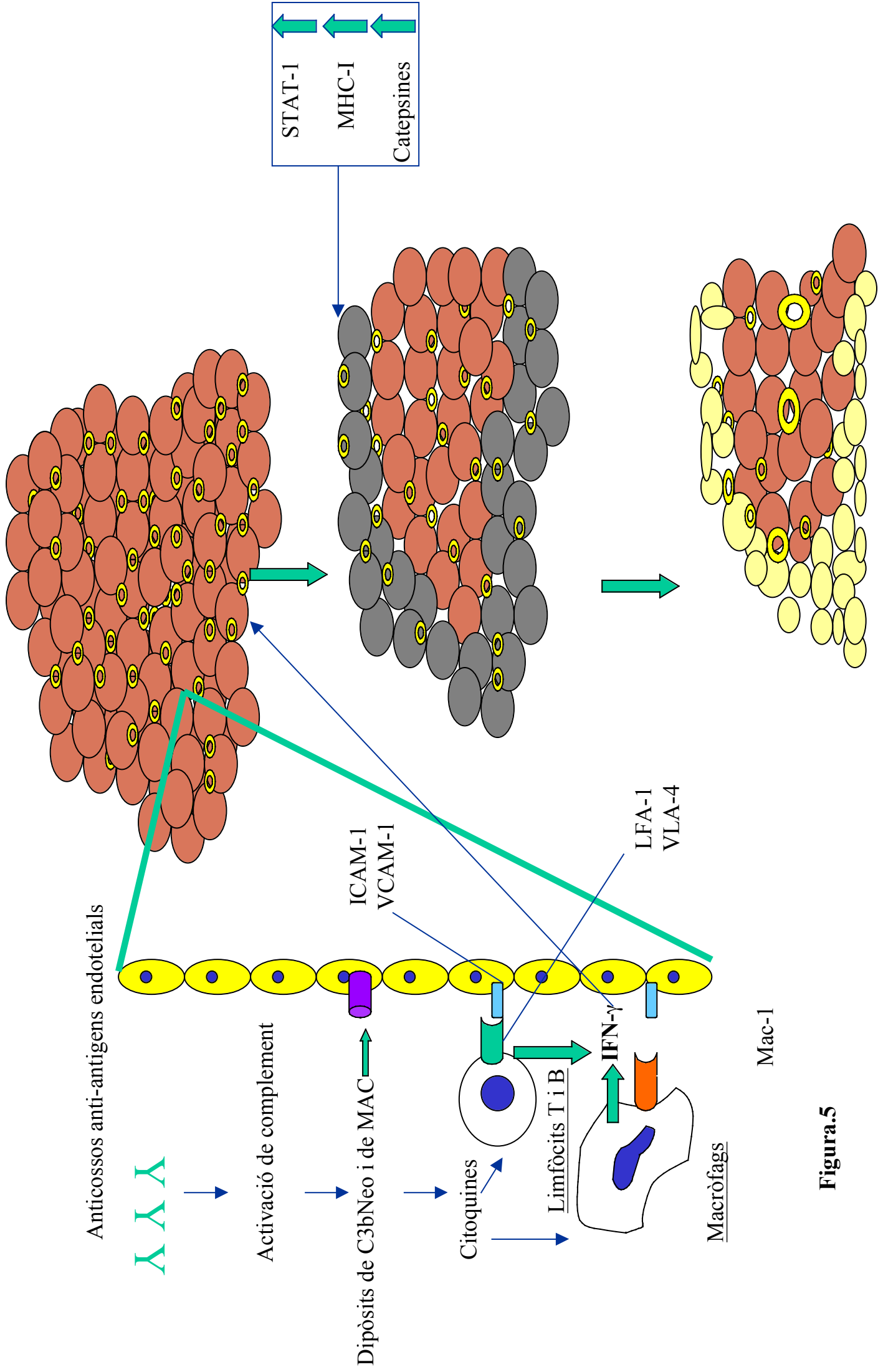


Figura.5

I.3.4 Inflamació a les distròfies musculars

La presència d' inflamació pot esdevenir una característica important en algunes distròfies musculars, com s'ha descrit a la facioscapulohumeral (FSHD) i al Duchenne (DMD). Per exemple, a la FSHD, s'ha observat un nombre elevat de cèl·lules B, proporció CD4/CD8 aixecada a fibres necròtiques (30) i infiltrats perivasculars de CD4>CD8, troballes similars a les observades a la DM. En canvi no es detecten les característiques típiques de la PM o la MCI com són cèl·lules T CD8+ positives per a perforina o granzyme A infiltrant fibres no necròtiques. Això indicaria que a la FSH no hi ha un mecanisme immunològic contra les fibres musculars mediat per cèl·lules T citotòxiques.

Per altre banda, l'estudi de la inflamació a la DMD va mostrar que els limfòcits T es trobaven majoritàriament a les fibres necròtiques i també en un petit nombre de fibres no necròtiques (31).

Recentment s'han descrit un grup de distròfies musculars que presenten una mutació al gen de la disferlina. Les disferlinopaties poden presentar tres fenotips: miopatia de Miyoshi (MM), distròfia muscular de cintures 2B (LGMD2B) i miopatia distal del compartiment anterior (DACM) (32-34).

La presència d'inflamació a la biòpsia muscular en pacients amb disferlinopatia ja ha estat descrita prèviament (35) i, recentment, s'han descrit una família amb disferlinopatia i inflamació amb una mutació puntual específica (36). En aquest darrer cas els infiltrats eren principalment perivasculars i formats per cèl·lules CD3+ i alguna cèl·lula B. No s'observava un augment d'expressió de MHC de classe I.

El gen de la disferlina es localitza al cromosoma 2p13 i codifica una proteïna de 230kD associada al sarcolema (35, 37). La funció de la proteïna és encara desconeguda, però donada la seva elevada homologia amb un gen del nemàtode *Caenorhabditis elegans*, *fer-1*, es creu que la seva funció està relacionada amb fusió de membranes. A més, donat que la proteïna es troba ancorada a la membrana i té una llarga cua citoplasmàtica amb sis dominis d'unió a Ca^{2+} deu actuar com a transductor de senyal associada a altres possibles proteïnes de membrana.

Per altre banda, la soca de ratolí SJL, àmpliament utilitzada com a model animal de miopatia inflamatòria, s'ha vist que presenta una mutació en el gen de la disferlina que consisteix en una delecció de 171pb (38). Molt recentment, per aclarir les troballes publicades fins ara en relació al model de miopatia inflamatòria, s'ha fet un estudi comparant la presència d'infiltrats inflamatoris i de marcadors d'activació immunològica (TNF- α , STAT1, IRF1) en ratolins SJL abans i després d'immunitzar-los amb miosina B de múscul esquelètic de conill (39). Els animals no immunitzats presentaven alguns infiltrats, principalment de macròfags. Algunes cèl·lules eren positives per IFN- γ . Al analitzar els animals immunitzats però, el número total de cèl·lules infiltrants va augmentar de forma aguda, en un principi més macròfags i limfòcits T CD4+ i en fases posteriors un increment de cèl·lules T CD8+. Així doncs, hi havia diferències, a nivell histològic, entre els animals immunitzats i els no immunitzats. Aquestes diferències, però no es traduïen en una simptomatologia clínicament apreciable, ja que, per exemple cap dels animals de l'estudi presentava debilitat. No obstant això, el SJL pot esdevenir un bon model per al assaig de noves teràpies antiinflamatòries per les disferlinopaties, monitoritzant, per exemple la evolució de la inflamació muscular al llarg del possible tractament.

En aquest apartat faré una revisió dels treballs més importants realitzats fins ara dedicats a l'estudi de l'expressió de citoquines en biòpsies musculars de malalts amb miopaties inflamatòries. Com ja anirem veient, aquests estudis presenten algunes contradiccions. És per això que vàrem decidir estudiar els mecanismes de transducció de senyal utilitzats pels receptors de citoquines, concretament la família dels transductors de senyal i activadors de la transcripció (STAT). En la segona part d'aquest apartat faré una revisió d'aquest grup de factors de transcripció.

1.4 CITOQUINES I STATS

1.4.1 Expressió de citoquines en el múscul esquelètic en miopaties inflamatòries

S'han realitzat un nombre important d'estudis per entendre el paper de les citoquines en la patogènesi de les MI, no obstant, els resultats demostren ser contradictoris en alguns casos (40). Per exemple, es va trobar una expressió anormal de IL-1 en fibres musculars (41), més concretament en malalts amb DM i PM inactiva crònica en les fases tardanes de la enfermetat amb debilitat muscular persistent (42), mentre que altres només van observar expressió en cèl·lules inflamatòries (43, 44). A més es va detectar expressió de TNF- en les fibres musculars de malalts amb DM (43), mentre que altres autors només van detectar expressió en cèl·lules inflamatòries (45). L'estudi de la expressió de TNF- per uns altres autors va mostrar que aquest es troba augmentat en macròfags, cèl·lules CD3+ i en cèl·lules endotelials rodejades d'infiltrats a la PM/IBM. A la DM, a més, també en cèl·lules endotelials lluny dels infiltrats. El mateix treball descriu també que van detectar nivells alts de receptor de TNF de 75kDa (TNF-R75) en endotelis tant perifasciculars com perimisials a la DM, mentre que a la PM/IBM només hi havia reactivitat anti-TNF-R75 a la superfície luminal d'alguns capil·lars, suggerint un paper del TNF- en la degeneració de les cèl·lules endotelials en aquesta miopatia inflamatòria. A més els autors troben que a totes les MI hi ha un augment d'expressió de receptor de TNF de 55kDa (TNF-R55), que és present a nivells basals en els controls, en els mionuclis a l'interior o a la perifèria de

fibres regenerants, el que donaria a aquest receptor un paper important en la regeneració muscular (46). També, utilitzant tècniques immunohistoquímica s'ha detectat IL-4 en pacients amb DM (43) mentre que altres autors van trobar que l'expressió de ARNm de IL-4 a DM i MCI era dèbil i poc consistent (47).

Estudis previs van demostrar expressió de IFN- en biòpsies musculars en dos de cinc pacients amb DM utilitzant tècniques de transcriptasa reversa i reacció en cadena de la polimerasa (RT-PCR) (47) i en un altre treball van trobar que en sis de deu malalts amb DM les biòpsies musculars presentaven cèl·lules positives per IFN- en els infiltrats inflamatoris utilitzant immunohistoquímica (43). Aquests autors suggereixen algunes raons per explicar la expressió restringida d'aquesta i altres citocines a les miopaties inflamatòries: a) O bé el IFN- és degradat ràpidament o és absorbit per inhibidors específics quan és alliberat al medi o b) els casos estudiats ja havien assolit un estat inflamatori actiu amb la qual cosa les citocines pro-inflamatòries ja havien disminuït la seva expressió.

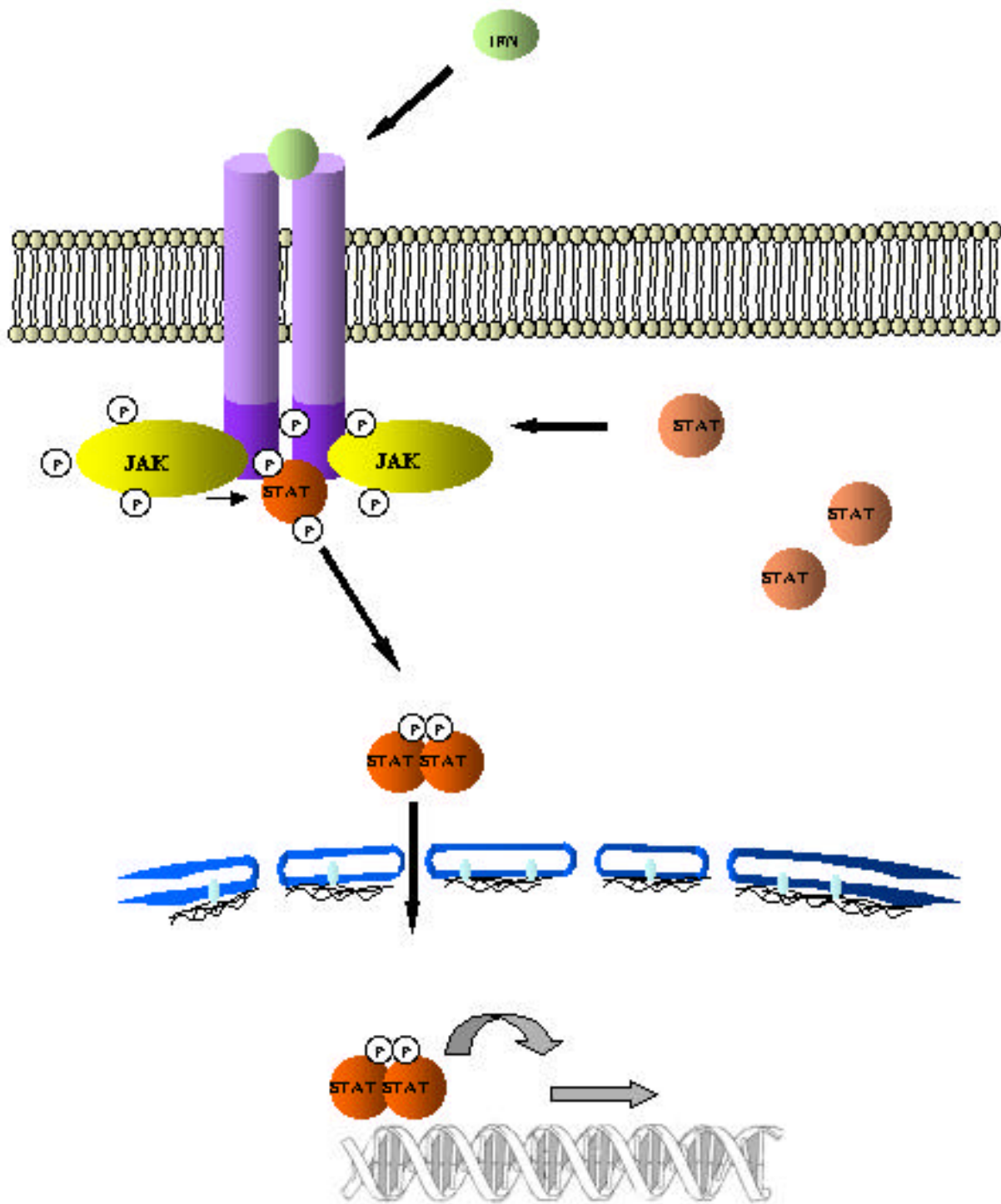
I.4.2 Transductors de senyal i activadors de la transcripció

Com ja s'ha esmentat en l'apartat anterior, l'estudi de les citoquines en el múscul esquelètic, i per extensió en qualsevol teixit, presenta dificultats com es demostra en la disparitat de resultats obtinguts per diferents autors. Això pot ser degut a una sèrie de factors com ara que es tracta de molècules amb una vida mitja curta, es troben en concentracions baixes i a més els nivells d'expressió del seu ARNm no sempre es correlacionen amb els nivells de citoquina secretada. Una possibilitat per intentar evitar aquests problemes és estudiar els efectes de l'acció de les citoquines en el teixit diana, enlloc d'intentar detectar la pròpia citoquina. A principis dels anys 90 es va descriure el primer membre d'una família de factors de transcripció que es van anomenar STATs. Aquests factors es caracteritzen perquè, un cop la citoquina o lligand interacciona amb el seu receptor es produeix la dimerització d'aquest i la seva part citoplasmàtica provoca l'activació d'una quinasa anomenada JAK. Aquesta es fosforila i a la vegada fosforila el receptor. El receptor fosforilat es converteix en un lloc d'unió per el STAT que a l'interaccionar amb el receptor és també fosforilat per la mateixa JAK quinasa. Els STATs fosforilats formen homodímers o heterodímers i són aleshores capaços de translocar-se al nucli i unir-se als promotors de diversos gens, entre ells el propi STAT, activant la seva transcripció. Les seqüències d'unió dels STATs al promotor dels seus gens diana s'anomenen GAS en el cas dels interferons. Per la resta de citoquines s'han descrit unes seqüències palindròmiques del tipus TTNNNNNAA que són similars a GAS. Fins a l'actualitat s'han descrit set

proteïnes STAT en mamífers que s'han anomenat Stat1, Stat2, Stat3, Stat4, Stat5a, Stat5b i Stat6.

Les proteïnes STAT tenen diversos dominis conservats que són crítics per a la seva doble funció de transductors del senyal i activadors de la transcripció. Per una banda un domini d'unió al ADN que es troba en tots els membres de la família exceptuant Stat2. Per una altra banda hi ha un domini SH2 i un residu tirosina conservat proper a l'extrem carboxil. Els STAT són activats per les quinases JAK que els fosforilen en aquest residu tirosina. Així, els homo/heterodímers entre STATs es produeixen per unions entre el residu tirosina fosforilat d'un i el domini SH2 de l'altre. Un cop formats els dímers aquests es transloquen al nucli, on regulen la transcripció de diferents gens (figura 6).

	Lligands
Stat1	IFN α/β, γ, GH, EGF, PDGF
Stat2	IFN α/β
Stat3	IL-6, família EGF, GH, G-CSF, IL-2, IL-10, IL-11, IL-12, LIF, CNTF, PDGF, CSF-1
Stat4	IL-12
Stat5a	IL-2, IL-7, IL-9, IL-15, IL-3, IL-5, GM-CSF, prolactin,
/b	GH, eritropoietina
Stat6	IL-4, IL-13



Per I. de Andrés

Figura 6. Esquema de la transducció de senyal via STAT provocada per la unió d'IFN al seu receptor. Aquesta unió provoca la dimerització del receptor i activació de JAK. Aquesta tirosín quinasa fosforila al receptor, afavorint la unió de STAT. Aquest és fosforilat per JAK, es dimeritza i es transloca al nucli. Un cop al nucli s'uneix a seqüències específiques en els promotors de diferents gens regulant la seva transcripció.

L'activitat de les proteïnes STAT es veu regulada negativament per diversos mecanismes (48). En primer lloc, la desfosforilació del residu tirosina crític per la activació mitjançant una tirosin-fosfatasa porta a la inactivació de STAT1. En segon lloc, la via de degradació de la ubiquitina-proteasoma també s'ha demostrat implicada en la inactivació de STAT1. Per últim, s'han descrit dues famílies de factors reguladors negatius de la via JAK/STAT. Per una banda la dels supressors de la senyalització per citoquines (SOCS)/ proteïna d'unió a JAK (JAB)/ inhibidor de STAT induït per STAT (SSI), que consta de vuit membres. Aquestes proteïnes també tenen un domini SH2 i la seva expressió està afavorida per la activació mediada per citoquines. Entre els membres de la família, SOCS1 i SOCS3 s'uneixen directament al domini quinasa de JAK inhibint la seva activitat.

Per una altre banda, trobem la família de proteïnes inhibidores de STAT1 activat (PIAS), que està formada per PIAS1 i PIAS3. PIAS3 interacciona amb STAT3 fosforilat, inhibint la seva activitat de unió a ADN. De la mateixa manera PIAS1 interfereix en la expressió gènica induïda per STAT1.

Així, les proteïnes SOCS modulen la via JAK/STAT a nivell de JAK, mentre que les proteïnes PIAS semblen regular la via a nivell de STAT.

II. RESUM DE RESULTATS I DISCUSSIÓ

Article I "Inclusion Body Myositis and Paraproteinemia: Incidence and Immunopathologic correlations" *Annals of Neurology* 1997; 41: 100-104

Marinos C Dalakas, Isabel Illa, Eduard Gallardo, Cándido Juárez

Article I "Inclusion Body Myositis and Paraproteinemia: Incidence and Immunopathologic correlations" Annals of Neurology 1997; 41: 100-104

Hipòtesi

La presència d'infiltrats inflamatoris i augment de MHC de classe I a la MCI, com els que s'observen a la PM, afavoreix, d'entre les diverses hipòtesis patogèniques de la MCI, una patogènia autoimmune. Els malalts amb MCI i paraproteinèmia podrien aportar més informació sobre possibles antígens diana del atac immunològic.

Resultats

Del 70 pacients amb MCI analitzats, 16 (22,8%) presentaven una gammapatia monoclonal: IgG en 9, IgG en 4, IgM en 2 i IgA en un. La mitjana d'edat dels malalts amb banda monoclonal era de 60.6 anys (35-77), en comparació amb 66.1 (42-80) en els altres 54 malalts amb MCI sense gammapatia. Clínica i histològicament no hi havia diferències entre els pacients amb banda i sense paraproteinèmia. Un 75% d'individus d'ambdós grups presentaven dipòsits d'amiloide amb la tinció de vermell Congo o cristall violeta. Dels 80 controls de les mateixes edats, un 2% presentava gammapatia, resultat que està d'acord amb estudis previs (49). La gammapatia era benigna ja que les altres dues classes d'immunoglobulines eren presents i no s'observaven signes de proteinúria, malaltia limfoproliferativa, anèmia o lesions òssies. La IgG biotinitada de 4 de 9 pacients analitzats (3 amb IgG i un amb IgG) immunoreaccionava amb antígens nuclears sobre seccions congelades de múscul

esquelètic tant homòleg com heteròleg. La IgG biotinilada de 4 de 10 pacients amb MCI sense banda monoclonal i de 3 de 6 pacients controls amb neuropatia i paraproteinèmia també va reconèixer mionuclis.

Els sèrums es van analitzar mitjançant tècnica de Western-blot utilitzant extractes de múscul esquelètic humà separat en diferents fraccions: membranes, citoplasma i nuclear. Cinc de 9 pacients amb MCI i paraproteinèmia (2 IgG , 2 IgG , 1 IgM) i un de 6 malalts amb neuropatia i paraproteinèmia van reaccionar amb varies proteïnes d'entre 40 i 60 kda. A la fracció citoplasmàtica, 8/9 malalts amb MCI i banda monoclonal, 2/10 MCI sense banda i 2/6 controls amb banda monoclonal van reconèixer antigens d'entre 30 i 60 kda.

Finalment, respecte a la fracció nuclear 7/9 malalts amb MCI i paraproteinèmia reconeixien bandes de 35-50 kda (3 pacients), 55-95 kda (2 pacients) i 145 kda (2 pacients). Cinc de 15 malalts amb MCI sense paraproteinèmia i 1/6 controls amb gammapatia van reconèixer antigens de l'extracte nuclear. En conjunt, un 50% de malalts amb MCI amb o sense banda monoclonal reconeixien nuclis per immunohistoquímica. A més, un 77,7% de MCI amb paraproteinèmia comparat amb un 22,8% de malalts amb MCI sense banda monoclonal i un 16.6% de controls amb paraproteinèmia reconeixen antigens a membrana, citoplasma i nucli en extractes de múscul esquelètic.

Només 2/11 malalts amb MCI i banda monoclonal presentaven títols >1:80 al analitzar la presència d' anticossos antinuclears tradicionals.

A més es van analitzar tots els sèrums mitjançant immunoprecipitació d'ARN per veure si s'observava algun patró concret. Del grup de malalts amb MCI i banda

monoclonal un malalt va presentar un anti-ARNt, un era positiu per ribosomal, encara que dèbil, i un tercer malalt presentava un Sm baix i U1/U2. Del grup control un presentava un ribosomal, un altre un Ro dèbil i per últim un presentava un ARNt.

Discussió

En aquest treball vàrem estudiar la presència de possibles autoanticossos en el sèrum de malalts amb MCI i que presentaven una banda monoclonal. El treball es va plantejar per la elevada freqüència de gammapatia monoclonal en pacients amb MCI (22,7%). Aquesta associació no és a l'atzar o relacionada amb l'edat dels malalts per diverses raons: 1) la sèrie de malalts analitzats és gran, 2) l'edat dels malalts amb MCI i banda monoclonal era menor que la dels que no presentaven banda, 3) no hi havia una altra causa associada per explicar-ho, 4) la incidència de paraproteinèmia en pacients sense neuropatia de la mateixa edat era del 2%, 5) en pacients de la mateixa edat no s'observa una freqüència de paraproteinèmia tant aixecada (49), o en pacients amb neuropaties on la incidència de gammapatia és del 10% (50). Tot i que el significat patogènic d'aquesta banda monoclonal no és clar, la seva elevada freqüència en els pacients amb MCI suggereix que hi ha una activació crònica de cèl·lules B, el que a la vegada indicaria una patogènia autoimmune com s'ha suggerit en altres malalties.

La gammapatia més comuna que vàrem trobar era de la cadena lleugera λ , que és el tipus més freqüent associat a amiloidosi per discràsia de cèl·lules plasmàtiques (51, 52). No obstant, no vàrem veure signes de que la IgG fos amiloidegènica, ja que no s'unia a dipòsits intracel·lulars d'amiloide. A més, la incidència d'amiloide

observat a l'interior de fibres vacuolades en pacients amb MCI era igual en pacients amb i sense banda monoclonal (12).

La unió de la IgG a nuclis del teixit muscular (mionuclis), observada fins i tot en pacients amb MCI sense banda monoclonal, no era artefactual ja que es detectava per immunohistoquímica amb la IgG purificada i no amb el sèrum total, que es pot unir de forma inespecífica als mateixos nuclis o al voltant de les fibres musculars. A més, mitjançant Western-Blot amb extractes nuclears, la unió era molt més freqüent amb el sèrum de malalts amb MCI que amb el de controls de malalts amb neuropatia associada a paraproteinèmia. Només vàrem trobar anticossos anti-nuclears en 2/11 malalts amb MCI i gammapatia monoclonal. Això està d'acord amb la observació reportada de que les paraproteinèmies no tenen una incidència elevada d'autoanticossos anti-nuclears o anti-DNA (53).

Les immunoglobulines dels pacients amb MCI reconeixien també antigens citoplasmàtics, això es deuria, probablement, a una separació incompleta de diverses organel·les en les fraccions cel·lulars extretes, o a contaminació de les citomembranes contigües amb continguts nuclears descarregats durant la desintegració dels mionuclis.

No és del tot clar, si el reconeixement d'antígens nuclears per les immunoglobulines monoclonals juga un paper en la patogènesi de la MCI, o si el patró d'immunoreactivitat té relació amb el procés immunopatològic restringit per MHC de classe I i mitjançat per cèl·lules T que s'observa en el múscul d'aquests malalts (54, 55). En pacients amb MCI s'ha suggerit una implicació primària dels nuclis, basant-se en la unió de sondes de cDNA als mionuclis (15). A més, en aquesta malaltia sovint s'observen acúmul·ls de tubulofilaments dins dels mionuclis que

rebenen cap al citoplasma. Si la MCI comença als mionuclis, com s'ha suggerit (15), és possible que les proteïnes nuclears alliberades al citoplasma y la membrana puguin servir com a autoantígens que units al MHC de classe I siguin presentats als limfòcits T CD8+.

Encara que l'associació de la MCI amb una gammapatia monoclonal no defineix un subgrup diferent clinicopatològicament, suggereix que en alguns malalts hi ha una desregulació del sistema immunològic que resulti en una activació de cèl·lules B. Aquestes observacions recolzen la idea de que a la MCI, hi està implicat un component immunològic.

Article II "Signal Transducer and Activator of Transcription 1 in Human Muscle. Implications in Inflammatory Myopathies."

American Journal of Pathology 1997; 151: 81-88

Isabel Illa, Eduard Gallardo, Ramón Gimeno, Carmen Serrano, Isidre Ferrer, Cándido Juárez

Article II "Signal Transducer and Activator of Transcription 1 in Human Muscle. Implications in Inflammatory Myopathies." American Journal of Pathology 1997; 151: 81-88

Hipòtesi

L'estudi de citoquines/factors de creixement "in situ" en teixits congelats és difícil perquè són molècules solubles i de vida mitja curta. L'estudi de factors de transcripció intracel·lulars que són activats per citoquines/factors de creixement, com ara la família dels STAT, podria ser un bon mètode per analitzar l'acció de possibles citoquines/factors de creixement sobre el múscul esquelètic, evitant els handicaps anteriorment indicats.

Resultats

Utilitzant un anticòs monoclonal contra STAT1 vàrem observar un patró d'expressió diferencial a les fibres musculars i als infiltrats inflamatoris mentre que utilitzant un anticòs control del mateix isotip era negatiu en els mateixos camps en talls seriats. En totes les mostres de DM estudiades (10/10), es van observar fibres musculars STAT1+. La tinció era sarcoplàsmica, i es localitzava de forma predominant en fibres petites perifasciculars. La tinció amb H&E en talls seriats va mostrar que la majoria d'aquestes fibres eren pàl·lides o presentaven rarefaccions en el sarcoplasma, com correspon a fibres atrofiques o malmeses, mentre que algunes fibres regenerants,

basofíliques amb nuclis grans, també eren positives per STAT1. No s'observava tinció dels mionuclis.

En canvi, la majoria de fibres de mostres de malalts amb PM, incloent les rodejades o invadides per infiltrats inflamatoris foren STAT1 negatives. En 2/10 malalts amb PM, STAT1 només es va detectar en algunes fibres necròtiques, confirmat per la tinció amb H&E. En els músculs control no es van observar fibres STAT1+. En pacients amb distròfies, tant les fibres d'aspecte normal, com les hipertròfiques o regenerants eren STAT1-. Només algunes fibres aïllades, totes elles necròtiques segons la H&E, es varen tenyir dèbilment en 2/10 biòpsies (1 malalt amb distròfia de Duchenne i 1 amb distròfia facio-escàpulo-humeral). En ambdós casos hi havia infiltrats inflamatoris. En pacients amb malalties neurògenes, tant les fibres d'aspecte normal com les angulades eren STAT1-(10/10). Les fibres musculars de 7 mostres de músculs isquèmics, estudiades perquè es creu que la isquèmia juga un paper important en l'atrofia perifascicular de la DM, eren totes STAT1- (2, 3, 56).

La majoria de cèl·lules dels infiltrats inflamatoris eren STAT1+, no només en les biòpsies de PM i DM sinó també en les de malalts amb distròfies musculars. Mitjançant immunofluorescència doble es va detectar expressió de STAT1 a cèl·lules T CD8 + i CD4+ i macròfags. No hi havia diferències en el percentatge de cèl·lules STAT1 + que es trobaven rodejant o infiltrant fibres musculars i les localitzades en el perimisi o al voltant dels vasos.

En cultiu, tant els miotubs humans com la línia TE671 mostraven una dèbil expressió de STAT1 al citoplasma mentre que els controls d'isotip eren negatius. La estimulació amb IFN- durant 90 minuts va provocar la entrada de STAT1 als

mionuclis. A les 24 hores el citoplasma es marcava positivament. Aquest augment d'expressió de STAT1 es va mantenir durant 6 dies. Per altre banda no es va observar un increment d'expressió de STAT1 en cultius no tractats o estimulats amb EGF, PDGF or IL-2.

Quan es van realitzar immunoblots de cultius musculars es va detectar una banda de 91kD constitutiva corresponent a STAT1 en totes les mostres. Després de 24 hores d'estimulació amb diferents citoquines, es va observar un clar increment de la banda corresponent a STAT1 al carril corresponent al cultiu estimulat amb IFN-humà recombinant, mentre que els cultius no estimulats o estimulats amb EGF, PDGF i IL-2 mantenien nivells basals de STAT1.

Per confirmar els resultats de la immunohistoquímica, i corroborar que els anticossos anti-STAT1 utilitzats no reaccionaven de forma creuada amb altres proteïnes, vàrem analitzar els nivells de ARNm tant en múscul en cultiu com en la línia TE671, després del tractament amb IFN- γ , EGF, PDGF or IL-2 i sense estimular mitjançant RT-PCR semiquantitativa. Es van obtenir dues bandes de 240 pb corresponent a STAT1 i de 218 corresponent a la tirosín quinasa d'Abelson. En cèl·lules no estimulades, la relació entre les dues bandes era 1:1 a 20 i 25 cicles de PCR, mentre que les cèl·lules tractades amb IFN- γ predominava la banda corresponent a STAT1 a 20 i 25 cicles (fase exponencial de la reacció), indicant que el IFN- γ era capaç d'augmentar els nivells de ARNm de STAT1 en cèl·lules musculars, coincidint amb el resultats obtinguts per immunohistoquímica i Western Blot .

Discussió

En aquest segon treball assenyallem una nova aproximació per a l'estudi de citocines implicades en la patogènia de les MI, però no de forma directe sinó analitzant les proteïnes STAT que s'encarreguen de transduir el senyal des de el receptor de la citocina a la membrana cap el nucli de la cèl·lula. Ens hem focalitzat en l'estudi del paper de IFN- γ /STAT1 en la PM i la DM. Aquest és el primer estudi on s'analitza el patró d'expressió de STAT1 en biòpsies musculars de pacients amb PM i DM, així com l'activació de STAT1 en cultius primaris de múscul esquelètic humà. Estudis realitzats en altres teixits han mostrat que STAT1 presenta un augment de la seva expressió després de la estimulació amb IFN- γ . Això el converteix en un bon marcador per analitzar l'efecte d'aquesta citocina en les cèl·lules diana (57). Utilitzant immunohistoquímica, Western blot i RT-PCR semiquantitativa, hem pogut demostrar diferents patrons d'augment d'expressió de STAT1. *In vivo*, s'observa un augment d'expressió de STAT1 en les fibres musculars atrofiques perifasciculars en la DM, mentre que la majoria de fibres, incloent les invadides per limfòcits T CD8+ i macròfags eren STAT1- en els malalts amb PM i en els controls. *In vitro*, només IFN- γ i cap de les altres citocines analitzades, va estimular de forma selectiva la transcripció de STAT1 tant en miotubs humans com en la línia cel·lular de rabdomiosarcoma TE671.

La tinció positiva per STAT1 obtinguda a les fibres atrofiques perifasciculars a la DM indica que aquesta via de transducció de senyal és activada per molècules específiques a nivell de sarcolema de les fibres musculars. D'acord amb els nostres resultats, les citocines alliberades per les cèl·lules de l'infiltrat inflamatori i no factors com la isquèmia o la regeneració muscular són, probablement, les responsables de l'inici de la resposta. De

fet, vàrem observar translocació al nucli tant en miotubs com en la línia cel·lular TE671 després de 90 minuts d'estimular els cultius amb IFN- γ , seguit d'un marcat increment en la quantitat de STAT1 al citoplasma a les 24 hores que es va mantenir després d'una sola estimulació al llarg dels sis dies de l'estudi. L'increment sostingut es va observar emprant tècniques d'immunohistoquímica, Western blot o RT-PCR. El fet de que l'estimulació amb EGF i PDGF, que també activen STAT1 en altres sistemes, no activi STAT1 ni en els miotubs ni en la línia TE671, reforça que IFN- γ tingui un paper important en l'activació del sistema a nivell de múscul esquelètic (58, 59). Aquesta falta d'activació podria explicar-se per una absència de receptors específics en múscul esquelètic o d'una incapacitat d'aquests últims per activar la senyalització via STAT1. Els models murins de *knockout* de STAT1 han clarificat la correlació tant important entre IFNs i STAT1 (60, 61). Encara que STAT1 és activat en moltes cèl·lules per diferents citoquines (62, 63), els ratolins *knockout* indiquen que STAT1 és indispensable per a la via d'IFN, però potser menys important per altres sistemes de senyalització *in vivo*.

Clàssicament s'ha considerat que l'atrofia muscular i degeneració a la perifèria dels fascicles a la DM era deguda a una depleció de la microvasculatura (2, 3, 56). De fet els estudis immunohistoquímics demostren dipòsits d'immunocomplexes i de complex d'atac a membrana C5b-9 del complement a nivell de capil·lars endomisials. Com a conseqüència d'això es produeix una reducció marcada del nombre de capil·lars que podria afectar la perfusió de sang provocant un fenomen d'isquèmia. Per tant, vàrem estudiar la isquèmia com un possible factor activador de STAT1 en les fibres musculars. Contràriament al que vàrem observar en les fibres perifasciculars a la DM, cap dels set músculs isquèmics estudiats va mostrar expressió de STAT1, suggerint que altres factors, junt amb la

isquèmia estan implicats. Per altre banda aquest resultat fa pensar que la atrofia perifascicular que s'observa a la DM ha de estar causada per altres factors diferents a la isquèmia. Per una banda la organització de la vasculatura del múscul esquelètic, tal i com s'indica a la introducció, té una distribució del exterior cap a l'interior del múscul, amb la qual cosa un fenomen purament isquèmic afectaria en primer lloc la regió més interna o endomisi. Per altre banda, tot i que els mecanismes efectors humorals predominen en el procés immunopatològic, una de les característiques de la DM és la presència d'inflamació, principalment perimisial i perivascular. Aquests infiltrats són predominantment de cèl·lules T CD8+ i macròfags. Els nostres resultats recolzen la hipòtesi de que aquestes cèl·lules podrien jugar un paper iniciant l'activació de STAT1 a les fibres perifasciculars mitjançant la secreció local de citocines com ara IFN- γ .

La observació de que cap de les fibres hipertròfiques, atrofiques o regenerants de les biòpsies control expressin STAT1 indica que la expressió augmentada d'aquesta molècula no està relacionada amb desenvolupament, maduració o regeneració muscular. Les fibres musculars perifasciculars a les biòpsies de pacients amb DM són molt actives en l'expressió de molècules, com ara la d'adhesió de cèl·lules neurals (N-CAM) i d'altres (64), que són activades per aquests processos. En el nostre estudi, a més de les fibres musculars de pacients amb DM, algunes fibres degenerants en 2/10 biòpsies de malalts amb PM i 2/10 malalts amb distròfia muscular van presentar un cert marcatge. Encara que no sabem el significat funcional d'aquest increment de STAT1, és possible que aquesta expressió augmentada contribueixi a la degeneració de les fibres musculars.

STAT1 no està, aparentment, activat en les fibres musculars de pacients amb PM. Aquesta interessant troballa suggereix que els mediadors de la inflamació a la DM i a la

PM són diferents. Els infiltrats de cèl·lules mononuclears activades, que són clarament més importants a la PM que a la DM, expressen alts nivells de STAT1. Seria d'esperar que moltes de les cèl·lules T CD4+ i CD8+ segreguessin IFN- γ , que a la vegada activaria STAT1 a les fibres musculars. No obstant, les cèl·lules T activades i els monòcits també segreguen altres citoquines que podrien iniciar vies de senyalització addicionals que interferirien amb l'activació de STAT1 (65, 66). Diversos estudis han mostrat un augment d'expressió de citoquines com IL-4, TGF- β 1, GM-CSF, TNF- α or INF- γ o el seu ARNm, tant a biòpsies de PM com DM, encara que no es va demostrar un perfil clar d'expressió (43, 47). Per tant, l'absència d'activació de STAT1 a la PM, tot i els abundants infiltrats mononuclears, podria explicar-se per l'alliberament de citoquines particular d'aquesta patologia.

Mitjançant l'estudi dels efectors, com ara STAT1, dels senyals iniciats a nivell de membrana per l'acció de citoquines, hem estat capaços de mostrar una expressió diferencial a la DM així com l'activació específica de STAT1 per IFN- γ *in vitro* en cultius primaris de múscul humà. L'anàlisi de l'expressió dels diferents membres de la família STAT utilitzant aquesta aproximació podria ser de gran ajuda per identificar els processos immunològics, mediat per citoquines, implicats en les miopaties inflamatòries. A la vegada contribuiria a aclarir si la inducció de gens específics per aquests factors de transcripció contribueix a la destrucció secundària de les fibres musculars.

Article III "Cathepsins Are Upregulated by IFN- γ /STAT1 in Human Muscle Culture: A Possible Active Factor in Dermatomyositis" Journal of Neuropathology and Experimental Neurology 2001; 60: 847-855

Eduard Gallardo, Irene de Andrés, Isabel Illa

Article III "Cathepsins Are Upregulated by IFN- γ /STAT1 in Human Muscle Culture: A Possible Active Factor in Dermatomyositis" Journal of Neuropathology and Experimental Neurology 2001; 60: 847-855

Hipòtesi

Els resultats obtinguts en el treball anterior, és a dir, un augment d'expressió de STAT1 en les fibres perifasciculars de malalts amb DM, ens va plantejar l'estudi dels possibles gens que, activats per IFN- γ , estarien implicats en la patogènia de la atròfia de les fibres musculars a la DM.

Resultats

En múscul humà en cultiu es van analitzar els ARNm i les proteïnes abans i després del tractament amb IFN- γ a les 24 i 48 hores. Aquest gens i els seus productes proteïcs es varen agrupar en les categories que descrivim a continuació.

Gens implicats en dany a les fibres

Després de 24 hores d'estimulació amb IFN- γ , els nivells de ARNm de les catepsines L i B van augmentar. Donat que STAT1 també es trobava incrementat vàrem realitzar una RT-PCR incloent una tercera parella de primers per β -actina, que no es activada per STAT1, com a control intern i els seus nivells d'ARNm es van mantenir igual després de la estimulació com era d'esperar. El Western blot va mostrar un increment de catepsines L i B a les 48 hores però no a les 24 hores. Els nivells de ARNm i proteïna corresponents a la μ -calpaïna no es varen modificar amb el tractament amb IFN- γ .

Proteïnes implicades en regeneració muscular

Els canvis que impliquen destrucció del múscul sovint s'acompanyen d'intents de regeneració (64, 67-69). Per aquesta raó, hem estudiat marcadors de regeneració i de diferenciació miogènica. Vàrem observar un lleuger increment de ARNm de MyoD, comprovat per Western blot després de 48 hores. Els nivells de ARNm de N-CAM i AchR no varen variar després de 24 de tractament amb IFN- γ .

Proteïnes estructurals

No es va detectar un increment d'expressió de ARNm ni de desmina, ni α -actina o utrofina a les 24 o 48 hores de la estimulació amb IFN- γ .

Proteïnes implicades en apoptosi i cicle cel·lular

La proteïna Fas (CD95/APO-1) transmet senyals cap el nucli que marquen l'inici del procés d'apoptosi i s'ha demostrat que la seva expressió es veu incrementada per l'acció d'IFN- γ en altres sistemes cel·lulars (70, 71). No obstant, els nostres resultats de PCR i Western blot mostraven que no hi havia canvis en l'expressió de Fas. A més, es va detectar un lleuger augment d'expressió de Bclx-l, molècula que protegeix d'apoptosi i que s'activa via STAT1, tant a nivell de ARNm com de proteïna (72).

La P21 és una proteïna que atura el cicle cel·lular inhibint les quinases dependents de ciclins. S'ha vist que l'expressió d'aquesta proteïna augmenta per l'acció d'IFN- γ via STAT1 (73). La RT-PCR semiquantitativa va mostrar un increment del ARNm de P21.

Controls de l'acció d'IFN- γ

IFN- γ induïx l'expressió de MHC-I en cultius de múscul humà (56, 74, 75). Com era d'esperar, els nivells de ARNm de la β -2-microglobulina augmentaren a les 24 hores d'estimulació amb IFN- γ . Aquest resultat es va confirmar per immunohistoquímica.

També es va estudiar STAT3, un altre membre de la família de transductors de senyal i activadors de la transcripció dels seus gens diana, que no és activat per IFN- γ . La RT-PCR va demostrar que la seva expressió no augmentava després de 24 hores. Aquesta dada es va confirmar per Western blot a les 48 hores. Aquests resultats corroboren que l'acció d'IFN- γ és específica de STAT1 a teixit muscular.

Expressió d'IFN- γ per múscul en cultiu després de l'estimulació amb IFN- γ exògen

Els resultats de RT-PCR demostraren que el múscul humà en cultiu no expressa IFN- γ autòleg ni de forma constitutiva ni després de la estimulació amb IFN- γ exògen. Com a control positiu d'expressió de IFN- γ , es varen utilitzar cèl·lules Jurkat estimulades amb PHA i PMA.

Immunohistoquímica de múscul humà en cultiu

La immunohistoquímica en cultius de múscul mostrava un augment d'expressió de STAT1, catepsines B i L i MHC-I (75) després de 24 hores d'estimulació amb IFN- γ , mentre que els nivells de calpaïna es mantien basals. El patró de la tinció era citoplasmàtic i continu a excepció de la catepsina B que mostrava un patró granular. Els resultats de la immunohistoquímica es correlacionaven amb els obtinguts mitjançant RT-PCR i Western blot.

Inhibició de la senyalització via STAT1 induïda per fludarabina

Després de 31 cicles de RT-PCR l'augment d'expressió de catepsina L activada per IFN- γ es va reduir al tractar les cèl·lules amb fludarabina durant 24 hores abans de la estimulació amb IFN- γ . Un tractament perllongat 24 hores més després de la estimulació amb IFN- γ va donar el mateix resultat. La fludarabina també bloquejava la expressió de MHC-I a miotubs estimulats amb IFN- γ .

Immunohistoquímica en biopsies musculars humanes

Els estudis immunohistoquímics en seccions congelades de biòpsies musculars de malalts amb DM mostraven que totes les fibres atrofiques perifasciculars es tenyien intensament per catepsines B i L, STAT1 i calpaïna. Aquests resultats confirmen un estudi previ (76) en que es reportava un augment d'expressió de catepsines B, H i L, així com calpaïna a la DM. En canvi, a les biòpsies de pacients amb PM els infiltrats inflamatoris eren positius per STAT1 però no per catepsina L. Cap dels controls fou positiu ni per STAT1 ni per catepsines B o L. El MHC-I estava augmentat a les fibres perifasciculars a la DM.

Discussió

En el tercer treball, en el que s'aprofundeix en les troballes del segon estudi, s'analitzen diferents gens/proteïnes que es coneix que són activats per IFN- γ en altres sistemes (cèl·lules, teixits), i que poden estar implicats en la atròfia de les fibres musculars. En molts casos, però, encara no es coneix si l'activació per part de l' IFN- γ és via STAT1.

Vàrem estudiar cultius primaris de múscul humà i seccions congelades de biòpsies de pacients amb miopaties inflamatòries i controls. Es va observar un augment d'expressió de proteases lisosomals com ara catepsines L i B, però no de gens implicats en apoptosi, regeneració o proteïnes estructurals. Els experiments utilitzant fludarabina mostraren una reducció de la expressió de STAT1 i cat L induïda per IFN- γ . Aquests resultats indiquen que IFN- γ /STAT1 juguen un paper important en l'increment d'expressió d'alguns enzims proteolítics *in vitro*, i que l'expressió de catepsines en les fibres musculars perifasciculars observada en la DM forma part d'un procés actiu iniciat per IFN- γ /STAT1.

La troballa de que STAT1 està molt expressat a les fibres musculars perifasciculars a la DM i el fet de que IFN- γ és capaç d'activar STAT1 en cultius de múscul humà (77), va obrir un nou camp de recerca en l'estudi d'aquest aspecte de la immunopatologia de la DM.

Vàrem estudiar algunes proteases endògenes com a possibles responsables de l'atrofia perifascicular. Vàrem trobar un augment de ARNm de catepsines però no de calpaïna en els cultius primaris de múscul humà estimulats amb IFN- γ . Els estudis immunohistoquímics mostraren un augment d'expressió de catepsines B i L i de calpaïna principalment en les fibres atrofiques perifasciculars a la DM però no en altres MI, com ja s'havia descrit anteriorment (76). Els nostres resultats en cultiu de múscul humà estan d'acord amb altres que mostren un augment d'expressió de catepsines B i L per IFN- γ en altres sistemes cel·lulars (78). Per altre banda, en els nostres cultius de múscul humà, l'expressió de calpaïna, que pertany a la família de proteases extralisosomals dependents de Ca²⁺, no es veia afectada per IFN- γ , suggerint que altres citoquines alliberades al medi o un fenomen d'isquèmia de baix grau podrien donar lloc a la sobreexpressió d'aquesta proteasa.

La expressió de l'antigen Fas no es veia afectada pel tractament amb IFN- γ utilitzant RT-PCR i W-B. Altres autors han observat una sobreexpressió de Fas després de l'acció d'IFN- γ en queratinòcits transformats amb SV40 i en cèl·lules de moll d'os CD34+ (70, 71). Per una altre banda, sí vàrem observar un augment d'expressió de ARNm de Bcl-x(l) ARNm, que és un protector d'apoptosi del qual es coneix que incrementa la seva expressió per acció d' IFN- γ via STAT1 (72). En els infiltrats inflamatoris de biòpsies musculars de malalts amb MI s'ha observat una sobreexpressió de Bcl-x(l) (79) i també s'ha vist que a la DM, les escasses fibres musculars i cèl·lules inflamatòries que expressen Fas es troben protegides per la proteïna anti-apoptòtica Bcl-2, que pertany a la mateixa família que Bcl-x(l) (80). En la mateixa línia de resultats, s'ha observat que tant les fibres musculars com les cèl·lules infiltrants en biòpsies de MI expressen FLIP (Fas-associated death domain-like IL-1-converting enzyme-inhibitory protein), que és una molècula de protecció d'apoptosi (81). A més, també s'ha descrit l'absència de característiques d'apoptosi tant en els infiltrats inflamatoris com en les fibres musculars de pacients amb MI (82). En resum, els nostres resultats *in vitro* juntament amb els estudis realitzats per altres autors que hem mencionat anteriorment, semblen descartar la implicació d'un procés d'apoptosi en la immunopatogènesi de les MI.

Es conegut que els antigens MHC de classe I estan expressats de forma constitutiva a baixos nivells en mioblastes en cultiu i miotubs i que la seva expressió augmenta després d'una estimulació amb IFN- γ (56). Nosaltres també hem detectat un augment d'expressió de MHC-I en miotubs humans en cultiu després de 48h d'estimulació amb IFN- γ . Vàrem observar una expressió basal de β_2 -microglobulina i un augment d'expressió del seu ARNm després de 24h d'estimulació amb IFN- γ , fet que coincideix amb els treballs que acabem

d'esmentar. Per altre banda, també vàrem observar un augment d'expressió de MHCI a les fibres musculars perifasciculars en les biòpsies musculars de malalts amb DM, com ja s'ha descrit prèviament (83). Així doncs, d'acord amb els nostres resultats, a la DM la sobreexpressió de STAT1 a les fibres musculars perifasciculars reflecteix el senyal d'activació de l'expressió de MHCI provocat per l'acció de citoquines (principalment IFN- γ) alliberades pels infiltrats inflamatoris.

Les cèl·lules musculars tenen la capacitat de segregar algunes citoquines com ara la IL-6 (84). Aquest fenomen de producció autocrina per part de cèl·lules no pertanyents al sistema immune també s'ha descrit en el cas de neurones sensibles de ganglis de l'arrel dorsal de fetus de rata (85). No obstant en el nostre sistema, la estimulació amb IFN- γ no fou capaç d'activar la producció autocrina de més IFN- γ per part de les cèl·lules musculars en cultiu. Això fa pensar que l'IFN- γ que actua sobre les fibres musculars en la DM es produït per els infiltrat inflamatoris perimisials presents en el múscul, i no pas com una producció autocrina del propi múscul. Una altre possible explicació per a l'expressió augmentada de STAT1 en el múscul podria ser que la producció d'IFN- γ tingués lloc a altres llocs distants de la perifèria del fascicle com a part d'una disfunció sistèmica, i que arribés al múscul pel torrent sanguini. Per altre banda, l'activació sostinguda de STAT1 després de que l'IFN- γ ja ha estat degradat, podria explicar l'absència d'infiltrats en alguns casos. De fet, en un estudi realitzat amb malalts amb DM i PM als que es va realitzar dues biòpsies consecutives, abans del tractament i després de dos dies de completar tres tandes d'IVIgs, van observar que l'expressió de STAT1 a la segona biòpsia persistia (86). Un fenomen d'isquèmia per ell mateix no sembla suficient per activar l'expressió de STAT1 a jutjar pels resultats del treball anterior(77). Els nostres resultats suggereixen que l'atròfia

perifascicular observada en les biòpsies musculars de pacients amb DM és multifactorial i inclou l'IFN- γ , entre altres factors com l'activació de calpaïna o potser la isquèmia de forma indirecte.

Els experiments utilitzant fludarabina, un bloquejant de STAT1, varen confirmar que la via de senyalització utilitzada per IFN- γ era l'activació de STAT1. La fludarabina interfereix amb la fosforilació de STAT1 impedit no només la seva translocació al nucli sinó que també, i com a conseqüència l'activació de la transcripció dels seus gens diana, essent el mateix STAT1 un d'ells. Aquesta observació podria tenir implicacions terapèutiques donat que un bloqueig parcial de les proteases com ara la catepsina L a nivells de les fibres perifascicular podria resultar beneficiós en malalts amb DM resistents a altres tractaments.

En resum, aquest estudi indica que l'activació de proteases lisosomals (catepsines B i L) es dona via IFN- γ /STAT1 en múscul humà i és un factor que contribueix al dany secundari de les fibres musculars perifasciculars en malalts amb DM.

En una comunicació presentada a la 53 reunió de la American Academy of Neurology (Philadelphia, Abril 2001), els autors feien una anàlisi d'expressió gènica en els músculs de malalts amb DM juvenil, distròfia muscular de Duchenne i controls utilitzant tecnologia de microarrays d'ADN (87). La tècnica de microarrays d'ADN s'utilitza per fer una anàlisi de l'expressió de milers de gens (ADN complementaris) a la vegada permetent comparar dues mostres diferents (malalt i control, pre i post-tractament...) de forma relativament ràpida. Aquesta tecnologia s'ha desenvolupat molt recentment. Els resultats que varen obtenir recolzen els obtinguts al nostre laboratori. De 58 gens expressats de forma específica a la DM juvenil, 32 estaven relacionats amb una resposta immunològica, i d'aquests, al menys 10 eren gens induïbles per IFN- γ .

Article IV " Inflammation in Dysferlin Myopathy: An Immunohistochemical Characterization of 13 Patients" Neurology 2001; 57: 2136-2138.

Eduard Gallardo, Ricardo Rojas-García, Noemí de Luna, Adolf Pou, Robert H Brown, Isabel Illa

*Article IV " Inflammation in Dysferlin Myopathy: An Immunohistochemical**Characterization of 13 Patients" Neurology 2001; 57: 2136-2138.*Hipòtesi

Donat que l'estudi de marcadors immunològics és de gran ajut per diagnosticar i entendre millor la patogènia de les miopaties inflamatòries, en aquest treball vàrem estudiar aquests mateixos marcadors per aprofundir en els mecanismes patogènics de la inflamació a les disferlinopaties.

Resultats

Es van detectar infiltrats inflamatoris en 9/13 (69%) pacients (3 MM, 1 DACM i 5 LGMD casos esporàdics). Es trobaven bé aïllats o en grups al voltant de fibres necròtiques. Quatre de nou malalts amb inflamació mostraven també infiltrats perivasculars, mentre que quatre malalts no presentaven inflamació. La caracterització immunohistoquímica dels infiltrats endomisials mostrava limfòcits CD8+, CD4+ i macròfags. Aquestes cèl·lules es trobaven invadint només fibres degenerants. En cap malalt es van detectar limfòcits B CD20+. El MHC-I s'expressava en capil·lars i en fibres degenerants/regenerants, però era negatiu en el sarcolema de fibres d'aparença normal. Les fibres no necròtiques no presentaven infiltrats en cap dels 13 malalts estudiats. Els infiltrats al voltant dels vasos estaven formats de limfòcits CD8+ i macròfags però no limfòcits B CD20+.

El comptatge de cèl·lules que formaven part d'agrupaments va mostrar una mitja de 141 ±74 cèl·lules a la PM i 88.6±48 en les disferlinopaties. Les cèl·lules predominants a les disferlinopaties foren CD4+ i M₁, encara que més del 90% de cèl·lules CD4+ corresponien

a macròfags, com s'observava en immunofluorescència amb doble marcatge. Els limfòcits CD8+ representaven un $11.6 \pm 6.6\%$ en comparació amb el $46.5 \pm 10.3\%$ observat en pacients amb PM.

Cinc dels pacients d'aquesta sèrie havien estat diagnosticats prèviament de miopatia inflamatòria i varen ser referits a la nostre hospital per a una segona opinió. El diagnòstic es va realitzar basant-se en la presència d'inflamació a la biòpsia muscular. Tres malalts eren casos esporàdics de debilitat proximal a cames i dos presentaven debilitat proximal i distal a cames. Els nivells de CK eren més de 10 vegades els normals en els 5 casos. La biòpsia muscular mostrava necrosi de les fibres i infiltrats inflamatoris endomisials, perivasculars o ambdós en els cinc casos. No s'objectivava variabilitat en el tamany de les fibres, augment de teixit connectiu o fibres partides en el moment de l'estudi. Tots ells foren tractats amb glucocorticoids durant períodes de temps variables, sense efecte beneficiós en la teràpia a llarg termini, tot i que els malalts referien una millora al principi del tractament.

Discussió

En el quart treball reportem la caracterització de la inflamació que s'observa en malalts amb disferlinopaties. La descripció del gen responsable d'aquesta patologia és recent, i s'anomenat disferlina per la seva alta homologia amb el gen *fer-1* del nemàtode *Caenorhabditis elegans* (32). Les disferlinopaties es poden presentar en diversos fenotips: distròfia de cintures tipus 2B, miopatia distal de Miyoshi i la miopatia distal d'inici en el compartiment anterior (34). Com mostrem en aquest darrer treball en alguns casos de disferlinopatia, la biòpsia muscular presenta uns infiltrats inflamatoris que poden portar al diagnòstic erroni de polimiositis. D'aquí la importància de fer l'estudi immunohistoquímic de marcadors d'inflamació en aquests casos.

Vàrem trobar que la inflamació és una troballa comú en les disferlinopaties, present en un 69% de pacients en la nostra sèrie. Els macròfags eren les cèl·lules inflamatòries predominants i es trobaven invaïnt només fibres degenerants mentre que més del 11% eren cèl·lules T CD8+. No vàrem trobar expressió anormal de l'antigen MHC-I en fibres musculars d'aspecte normal. Aquestes dades suggereixen que els infiltrats cel·lulars no són deguts a un mecanisme immunològic, tot i que l'origen i el paper d'aquestes cèl·lules inflamatòries en les disferlinopaties no són clars encara.

La natura dels infiltrats és diferent de la que s'observa en malalts amb PM, on la principal subpoblació de cèl·lules T són CD8+ i la expressió d'antigen MHC-I s'observa en fibres musculars necròtiques i no necròtiques. De fet, l'absència de MHC-I podria considerar-se una pista important a l'hora de descartar un procés immuno-meditat. Recentment s'ha descrit un model de ratolí transgènic per MHC-I sota el control d'un promotor de la creatin quinasa específic de múscul, que va desenvolupar una malaltia molt similar a una miopatia inflamatòria (81), donant suport a la hipòtesi de que un augment d'expressió de MHC-I és un factor clau per a la immunopatogènesi de les MI.

La inflamació observada en el múscul dels nostres malalts amb disferlinopaties són similars a les observades en altres distròfies musculars. No obstant, un petit nombre de fibres no necròtiques invaïdes per cèl·lules T es van detectar a la distròfia muscular de Duchenne (30, 31), troballa que no s'observa en els malalts amb disferlinopaties. A la distròfia facio-escàpulo-humeral el nombre de cèl·lules CD4+>CD8+ i les cèl·lules B eren les més abundants en els espais perivasculars, suggerint que, en aquesta distròfia muscular es podria donar una resposta immunològica de cèl·lules T contra el teixit connectiu, antigens dels capil·lars o proteïnes alterades de la fibra muscular (30). Es de destacar que quatre dels

nostres malalts amb dèficit de disferlina també presentaven infiltrats perivasculars, que consistien de macròfags i cèl·lules T CD8+ però no cèl·lules B. Totes aquestes troballes indiquen que algunes distròfies musculars però no altres presenten inflamació, no només endomisial sinó també perivascular. Els models animals ajudaran a esbrinar el paper d'aquesta inflamació, en particular el ratolí SJL, que de forma natural té una mutació al gen de la disferlina, en el cas de les disferlinopaties (38). Com ja hem comentat a l'article II, al estudiar la expressió de STAT1 tant a MI com a la FSH, vàrem observar que tant en aquesta darrera com a la PM, STAT1 només s'expressava als infiltrats inflamatoris. A la DM com ja hem vist la seva expressió també es troba a les fibres atrofiques perifasciculars. Al analitzar l'expressió de STAT1 a les disferlinopaties presentava un patró idèntic al de la FSH o la PM (dades no publicades). Aquest fet junt amb la absència d'expressió de MHC de classe I a les disferlinopaties descartaria un fenomen immunològic com a base de la seva patogènia.

La inflamació no està relacionada amb fenotips específics de disferlinopatia ja que en vàrem trobar en pacients amb MM, LGMD2B i DACM. A més, no vàrem poder trobar cap correlació amb el genotip donat que a la mateixa família amb mutació coneguda, es van detectar pacients amb i sense inflamació. Considerem una dada clínica rellevant del nostre estudi, el fet de que un nombre significatiu de pacients foren diagnosticats prèviament de PM degut a la debilitat proximal i l'absència de característiques de distròfia muscular i la presència d'inflamació a les biòpsies musculars

III. CONCLUSIONS

Article I

- 1- La presència de banda monoclonal a la miopatia per cossos d'inclusió (MCI) és més freqüent que en altres malalts d'edat similar o en pacients amb neuropatia.
- 2- A la MCI amb presència de banda monoclonal, els anticossos podrien estar dirigits contra diversos antigens de la fibra muscular, principalment dels mio nuclis.
- 3- Encara que l'associació de MCIe amb una gammapatia monoclonal no defineix un subgrup clínic-patològic, suggereix que en alguns malalts hi ha una desregulació immunològica que resulta en l'activació de cèl·lules B i, com en altres malalties, aquesta associació afavoreix la hipòtesi de la participació d'un component immunològic en la patogènia de la MCI.

Article II

- 4- L'activació de STAT1 per part d'IFN- γ , és funcional en cultius de múscul essent doncs un bon sistema per l'estudi *in vitro* dels efectes específics de les citoquines en el múscul esquelètic.
- 5- L'IFN- γ i no altres citoquines i factors de creixement analitzats (PDGF, EGF, IL-2) activa STAT1 en el múscul esquelètic i per tant sembla ser un factor implicat en la atròfia perifascicular a la DM.

- 6- STAT1 no es troba activat a les fibres musculars de malalts amb PM. Aquesta troballa suggereix que els mediadors de la inflamació a la PM i la DM són diferents. Per tant, l'estudi de la resta de membres de la família de factors de transcripció STAT, pot ésser d'utilitat per conèixer millor els processos immunològics mediat per citoquines, en les diferents MI, així com en altres malalties amb un component inflamatori.

Article III

- 7- L'augment d'expressió de Bcl-x(l) i l'absència de canvis en els nivells de Fas després de l'estimulació amb IFN- γ , descarten el fenomen d'apoptosi en la immunopatogènesi de les MI, com ja ha estat suggerit per altres autors.
- 8- L'activació de proteases lisosomals (catepsines B i L) es dona via IFN- γ /STAT1 en múscul esquelètic humà i l'assenyala com un factor implicat en el dany secundari de les fibres musculars perifasciculars en els pacients amb DM.
- 9- Els nostres resultats suggereixen que l'atròfia perifascicular observada a les biòpsies musculars de malalts amb DM és multifactorial i inclou entre d'altres factors l'IFN- γ de forma prominent.
- 10- El bloqueig de l'activació de STAT1 via IFN- γ amb fludarabina pot tenir implicacions terapèutiques donat que un bloqueig parcial de proteases, com la catepsina L a les fibres musculars perifasciculars podria resultar beneficiós en malalts amb DM resistents al tractament.

Article IV

- 11- La presència d'infiltrats a la biòpsia muscular de les disferlinopaties és freqüent i no es correlaciona amb el genotip o el fenotip de la malaltia.
- 12- L'absència d'expressió augmentada d'antigen MHC-I a les biòpsies de pacients amb disferlinopatia, a excepció de fibres regenerants o invaïdes per macròfags, descarta que la inflamació jugui un paper immunopatogènic.
- 13- En pacients joves amb debilitat de cintures esporàdica, la presència de nivells de CK molt aixecats, fibres necròtiques i/o infiltrats endomisials i/o perivasculars a la biòpsia muscular, s'ha de considerar un diagnòstic de disferlinopatia, donat que a les fases inicials de la malaltia els signes de distròfia muscular poden ser molt lleus.

IV. REFERÈNCIES

1. Jerusalem F. The microcirculation of muscle. In: Engel AG, Amstrong F-C, eds. *Myology*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, 1994:361-374. vol 1).
2. Dalakas MC. Polymyositis, dermatomyositis and inclusion-body myositis [see comments]. *N Engl J Med* 1991;325(21):1487-98.
3. Engel AG, Hohlfeld R, Banker BQ. The polymyositis and dermatomyositis syndromes. In: Engel AG, Amstrong F-C, eds. *Myology*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, 1994:1335-1383. vol 2).
4. Illa I, Dalakas MC. Dermatomyositis, polymyositis and inclusion body myositis: current concepts [editorial]. *Rev Neurol (Paris)* 1998;154(1):13-6.
5. Dalakas MC. Immunopathogenesis of inflammatory myopathies. *Ann Neurol* 1995;37(Suppl 1):S74-86.
6. Targoff IN. Update on myositis-specific and myositis-associated autoantibodies. *Curr Opin Rheumatol* 2000;12(6):475-81.
7. Yunis EJ, Samaha FJ. Inclusion body myositis. *Lab Invest* 1971;25(3):240-8.
8. Askanas V, Engel WK. Sporadic inclusion-body myositis and its similarities to Alzheimer disease brain. Recent approaches to diagnosis and pathogenesis, and relation to aging. *Scand J Rheumatol* 1998;27(6):389-405.
9. Askanas V, Engel WK. New advances in inclusion-body myositis. *Curr Opin Rheumatol* 1993;5(6):732-41.
10. Cole AJ, Kuzniecky R, Karpati G, Carpenter S, Andermann E, Andermann F. Familial myopathy with changes resembling inclusion body myositis and periventricular leucoencephalopathy. A new syndrome. *Brain* 1988;111(Pt 5):1025-37.
11. Sivakumar K, Dalakas MC. The spectrum of familial inclusion body myopathies in 13 families and a description of a quadriceps-sparing phenotype in non-Iranian Jews. *Neurology* 1996;47(4):977-84.
12. Mendell JR, Sahenk Z, Gales T, Paul L. Amyloid filaments in inclusion body myositis. Novel findings provide insight into nature of filaments. *Arch Neurol* 1991;48(12):1229-34.

13. O'Hanlon TP, Dalakas MC, Plotz PH, Miller FW. The alpha beta T-cell receptor repertoire in inclusion body myositis: diverse patterns of gene expression by muscle-infiltrating lymphocytes. *J Autoimmun* 1994;7(3):321-33.
14. Askanas V, Engel WK, Alvarez RB, Glenner GG. beta-Amyloid protein immunoreactivity in muscle of patients with inclusion-body myositis. *Lancet* 1992;339(8792):560-1.
15. Nalbantoglu J, Karpati G, Carpenter S. Conspicuous accumulation of a single-stranded DNA binding protein in skeletal muscle fibers in inclusion body myositis. *Am J Pathol* 1994;144(5):874-82.
16. Griggs RC, Askanas V, DiMauro S, et al. Inclusion body myositis and myopathies. *Ann Neurol* 1995;38(5):705-13.
17. Oldfors A, Moslemi AR, Fyhr IM, Holme E, Larsson NG, Lindberg C. Mitochondrial DNA deletions in muscle fibers in inclusion body myositis. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995;54(4):581-7.
18. Illa I, Nath A, Dalakas M. Immunocytochemical and virological characteristics of HIV-associated inflammatory myopathies: similarities with seronegative polymyositis. *Ann Neurol* 1991;29(5):474-81.
19. Hohlfield R, Engel AG, Ii K, Harper MC. Polymyositis mediated by T lymphocytes that express the gamma/delta receptor. *N Engl J Med* 1991;324(13):877-81.
20. Goebels N, Michaelis D, Engelhardt M, et al. Differential expression of perforin in muscle-infiltrating T cells in polymyositis and dermatomyositis. *J Clin Invest* 1996;97(12):2905-10.
21. Batten FE. Case of dermatomyositis in a child with pathological report. *Br J Child Dis* 1912;9:247.
22. Cid MC, Grau JM, Casademont J, et al. Leucocyte/endothelial cell adhesion receptors in muscle biopsies from patients with idiopathic inflammatory myopathies (IIM). *Clin Exp Immunol* 1996;104(3):467-73.
23. Mascaro JM, Jr., Hausmann G, Herrero C, et al. Membrane attack complex deposits in cutaneous lesions of dermatomyositis. *Arch Dermatol* 1995;131(12):1386-92.

24. Estruch R, Grau JM, Fernandez-Sola J, Casademont J, Monforte R, Urbano-Marquez A. Microvascular changes in skeletal muscle in idiopathic inflammatory myopathy. *Hum Pathol* 1992;23(8):888-95.
25. Casademont J, Grau JM, Masanes F, Herrero C, Urbano-Marquez A. Analysis of the outcome of idiopathic inflammatory myopathies with particular emphasis on muscle capillary damage. *Scand J Rheumatol* 1993;22(6):292-8.
26. Dalakas MC, Illa I, Dambrosia JM, et al. A controlled trial of high-dose intravenous immune globulin infusions as treatment for dermatomyositis. *N Engl J Med* 1993;329(27):1993-2000.
27. Basta M, Dalakas MC. High-dose intravenous immunoglobulin exerts its beneficial effect in patients with dermatomyositis by blocking endomysial deposition of activated complement fragments. *J Clin Invest* 1994;94(5):1729-35.
28. Cervera R, Ramirez G, Fernandez-Sola J, et al. Antibodies to endothelial cells in dermatomyositis: association with interstitial lung disease. *Bmj* 1991;302(6781):880-1.
29. Stein DP, Jordan SC, Toyoda M, Gallera O, Dalakas MC. Anti-endothelial cell antibodies (AECA) in dermatomyositis (DM). *Neurology* 1993;43 (Suppl):36a.
30. Arahata K, Ishihara T, Fukunaga H, et al. Inflammatory response in facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD): immunocytochemical and genetic analyses. *Muscle Nerve* 1995;2:S56-66.
31. Arahata K, Engel AG. Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. IV: Cell-mediated cytotoxicity and muscle fiber necrosis. *Ann Neurol* 1988;23(2):168-73.
32. Liu J, Aoki M, Illa I, et al. Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* 1998;20(1):31-6.
33. Bashir R, Britton S, Strachan T, et al. A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor *fer-1* is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nat Genet* 1998;20(1):37-42.
34. Illa I, Serrano-Munuera C, Gallardo E, et al. Distal anterior compartment myopathy: a dysferlin mutation causing a new muscular dystrophy phenotype. *Ann Neurol* 2001;49(1):130-4.

35. Anderson LV, Davison K, Moss JA, et al. Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development [published erratum appears in Hum Mol Genet 1999 Jun;8(6):1141]. Hum Mol Genet 1999;8(5):855-61.
36. McNally EM, Ly CT, Rosenmann H, et al. Splicing mutation in dysferlin produces limb-girdle muscular dystrophy with inflammation. Am J Med Genet 2000;91(4):305-12.
37. Matsuda C, Aoki M, Hayashi YK, Ho MF, Arahata K, Brown RH, Jr. Dysferlin is a surface membrane-associated protein that is absent in Miyoshi myopathy. Neurology 1999;53(5):1119-22.
38. Bittner RE, Anderson LV, Burkhardt E, et al. Dysferlin deletion in SJL mice (SJL-Dysf) defines a natural model for limb girdle muscular dystrophy 2B [letter]. Nat Genet 1999;23(2):141-2.
39. Matsubara S, Kitaguchi T, Kawata A, Miyamoto K, Yagi H, Hirai S. Experimental allergic myositis in SJL/J mouse. Reappraisal of immune reaction based on changes after single immunization. J Neuroimmunol 2001;119(2):223-30.
40. Lundberg IE, Nyberg P. New developments in the role of cytokines and chemokines in inflammatory myopathies. Curr Opin Rheumatol 1998;10(6):521-9.
41. Schubert W, Kontozis L, Sticker G, Schwan H, Haraldsen G, Jerusalem F. Immunofluorescent evidence for presence of interleukin-1 in normal and diseased human skeletal muscle. Muscle Nerve 1988;11(8):890-2.
42. Nyberg P, Wikman AL, Nennesmo I, Lundberg I. Increased expression of interleukin 1alpha and MHC class I in muscle tissue of patients with chronic, inactive polymyositis and dermatomyositis. J Rheumatol 2000;27(4):940-8.
43. Tews DS, Goebel HH. Cytokine expression profile in idiopathic inflammatory myopathies. J Neuropathol Exp Neurol 1996;55(3):342-7.
44. Lundberg I, Ulfgren AK, Nyberg P, Andersson U, Klareskog L. Cytokine production in muscle tissue of patients with idiopathic inflammatory myopathies. Arthritis Rheum 1997;40(5):865-74.
45. Kuru S, Inukai A, Liang Y, Doyu M, Takano A, Sobue G. Tumor necrosis factor-alpha expression in muscles of polymyositis and dermatomyositis. Acta Neuropathol (Berl) 2000;99(5):585-8.

46. De Bleecker JL, Meire VI, Declercq W, Van Aken EH. Immunolocalization of tumor necrosis factor-alpha and its receptors in inflammatory myopathies. *Neuromuscul Disord* 1999;9(4):239-46.
47. Lundberg I, Brengman JM, Engel AG. Analysis of cytokine expression in muscle in inflammatory myopathies, Duchenne dystrophy, and non-weak controls. *J Neuroimmunol* 1995;63(1):9-16.
48. Takeda K, Akira S. STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000;11(3):199-207.
49. Saleun JP, Vicariot M, Deroff P, Morin JF. Monoclonal gammopathies in the adult population of Finistere, France. *J Clin Pathol* 1982;35(1):63-8.
50. Kelly JJ, Jr., Kyle RA, O'Brien PC, Dyck PJ. Prevalence of monoclonal protein in peripheral neuropathy. *Neurology* 1981;31(11):1480-3.
51. Dalakas MC, Fujihara S, Askanas V, Engel WK, Glenner GG. Nature of amyloid deposits in hypernephroma. Immunocytochemical studies in 2 cases associated with amyloid polyneuropathy. *Am J Pathol* 1984;116(3):447-54.
52. Dalakas MC, Cunningham G. Characterization of amyloid deposits in biopsies of 15 with "sporadic" (non-familial or plasma cell dyscrasia amyloid polyneuropathy. *Acta Neuropathol (Berl)* 1986;69(1-2):66-72.
53. Hardiman KL, Horn S, Manoharan A, et al. Rheumatic autoantibodies in the sera of patients with paraproteins. *Clin Exp Rheumatol* 1994;12(4):363-8.
54. Mikol J, Engel AG. Inclusion body myositis. In: Engel AG, Armstrong F-C, eds. *Myology*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, 1994:1384-1398. vol 2).
55. Engel AG, Arahata K. Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. II: Phenotypes of autoinvasive cells in polymyositis and inclusion body myositis. *Ann Neurol* 1984;16(2):209-15.
56. Hohlfeld R, Engel AG. The immunobiology of muscle. *Immunol Today* 1994;15(6):269-74.
57. Gimeno R, Codony-Servat J, Plana M, Rodriguez-Sanchez JL, Juarez C. Stat1 implication in the immune response to superantigens in vivo. *J Immunol* 1996;156(4):1378-86.

58. Silvennoinen O, Schindler C, Schlessinger J, Levy DE. Ras-independent growth factor signaling by transcription factor tyrosine phosphorylation [see comments]. *Science* 1993;261(5129):1736-9.
59. Sadowski HB, Shuai K, Darnell JE, Jr., Gilman MZ. A common nuclear signal transduction pathway activated by growth factor and cytokine receptors [see comments]. *Science* 1993;261(5129):1739-44.
60. Meraz MA, White JM, Sheehan KC, et al. Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell* 1996;84(3):431-42.
61. Durbin JE, Hackenmiller R, Simon MC, Levy DE. Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell* 1996;84(3):443-50.
62. Ihle JN. STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell* 1996;84(3):331-4.
63. Pine R, Canova A, Schindler C. Tyrosine phosphorylated p91 binds to a single element in the ISGF2/IRF-1 promoter to mediate induction by IFN alpha and IFN gamma, and is likely to autoregulate the p91 gene. *Embo J* 1994;13(1):158-67.
64. Illa I, Leon-Monzon M, Dalakas MC. Regenerating and denervated human muscle fibers and satellite cells express neural cell adhesion molecule recognized by monoclonal antibodies to natural killer cells. *Ann Neurol* 1992;31(1):46-52.
65. Feldman GM, Chuang EJ, Finbloom DS. IgG immune complexes inhibit IFN-gamma-induced transcription of the Fc gamma RI gene in human monocytes by preventing the tyrosine phosphorylation of the p91 (Stat1) transcription factor. *J Immunol* 1995;154(1):318-25.
66. Larner AC, Petricoin EF, Nakagawa Y, Finbloom DS. IL-4 attenuates the transcriptional activation of both IFN-alpha and IFN-gamma-induced cellular gene expression in monocytes and monocytic cell lines. *J Immunol* 1993;150(5):1944-50.
67. Moore SE, Walsh FS. Specific regulation of N-CAM/D2CAM cell adhesion molecule during skeletal muscle development. *EMBO J* 1985;4:623-630.
68. Edmondson DG, Olson EN. Helix-loop-helix proteins as regulators of muscle-specific transcription. *J Biol Chem* 1993;268(2):755-8.

69. Cashman NR, Covault J, Wollman RL, Sanes JR. Neural cell adhesion molecule in normal, denervated, and myopathic human muscle. *Ann Neurol* 1987;21:481-489.
70. Maciejewski J, Selleri C, Anderson S, Young NS. Fas antigen expression on CD34+ human marrow cells is induced by interferon gamma and tumor necrosis factor alpha and potentiates cytokine-mediated hematopoietic suppression in vitro. *Blood* 1995;85(11):3183-90.
71. Takahashi H, Kobayashi H, Hashimoto Y, Matsuo S, Iizuka H. Interferon-gamma-dependent stimulation of Fas antigen in SV40-transformed human keratinocytes: modulation of the apoptotic process by protein kinase C. *J Invest Dermatol* 1995;105(6):810-5.
72. Fujio Y, Kunisada K, Hirota H, Yamauchi-Takahara K, Kishimoto T. Signals through gp130 upregulate bcl-x gene expression via STAT1-binding cis-element in cardiac myocytes. *J Clin Invest* 1997;99(12):2898-905.
73. Chin YE, Kitagawa M, Su WC, You ZH, Iwamoto Y, Fu XY. Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 mediated by STAT1. *Science* 1996;272(5262):719-22.
74. Hohlfeld R, Engel AG. Induction of HLA-DR expression on human myoblasts with interferon-gamma. *Am J Pathol* 1990;136(3):503-8.
75. Michaelis D, Goebels N, Hohlfeld R. Constitutive and cytokine-induced expression of human leukocyte antigens and cell adhesion molecules by human myotubes. *Am J Pathol* 1993;143(4):1142-9.
76. Kumamoto T, Ueyama H, Sugihara R, Kominami E, Goll DE, Tsuda T. Calpain and cathepsins in the skeletal muscle of inflammatory myopathies. *Eur Neurol* 1997;37(3):176-81.
77. Illa I, Gallardo E, Gimeno R, Serrano C, Ferrer I, Juarez C. Signal transducer and activator of transcription 1 in human muscle: implications in inflammatory myopathies. *Am J Pathol* 1997;151(1):81-8.
78. Lah TT, Hawley M, Rock KL, Goldberg AL. Gamma-interferon causes a selective induction of the lysosomal proteases, cathepsins B and L, in macrophages. *FEBS Lett* 1995;363(1-2):85-9.
79. Vattemi G, Tonin P, Filosto M, Spagnolo M, Rizzuto N, Tomelleri G. T-cell anti-apoptotic mechanisms in inflammatory myopathies. *J Neuroimmunol* 2000;111(1-2):146-51.

80. Behrens L, Bender A, Johnson MA, Hohlfeld R. Cytotoxic mechanisms in inflammatory myopathies. Co-expression of Fas and protective Bcl-2 in muscle fibres and inflammatory cells. *Brain* 1997;120(Pt 6):929-38.
81. Nagaraju K, Casciola-Rosen L, Rosen A, et al. The inhibition of apoptosis in myositis and in normal muscle cells. *J Immunol* 2000;164(10):5459-65.
82. Schneider C, Gold R, Dalakas MC, et al. MHC class I-mediated cytotoxicity does not induce apoptosis in muscle fibers nor in inflammatory T cells: studies in patients with polymyositis, dermatomyositis, and inclusion body myositis. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996;55(12):1205-9.
83. Emslie-Smith AM, Arahata K, Engel AG. Major histocompatibility complex class I antigen expression, immunolocalization of interferon subtypes, and T cell-mediated cytotoxicity in myopathies. *Hum Pathol* 1989;20(3):224-31.
84. Bartoccioni E, Michaelis D, Hohlfeld R. Constitutive and cytokine-induced production of interleukin-6 by human myoblasts. *Immunol Lett* 1994;42(3):135-8.
85. Neumann H, Schmidt H, Wilharm E, Behrens L, Wekerle H. Interferon gamma gene expression in sensory neurons: evidence for autocrine gene regulation. *J Exp Med* 1997;186(12):2023-31.
86. Matsubara S, Hirai S, Sawa Y. Pulsed intravenous methylprednisolone therapy for inflammatory myopathies: evaluation of the effect by comparing two consecutive biopsies from the same muscle. *J Neuroimmunol* 1997;76(1-2):75-80.
87. Tezak Z, Hoffman E, Pahman LM. Expression profiling in untreated juvenile dermatomyositis. *Neurology* 2001;56 (Suppl 3)(April):A210-A211.