



ALFA 1 ANTITRIPSINA Y ALFA 2 MACROGLOBULINA EN ESPUTO INFECTADO Y NO INFECTADO DE PACIENTES CON ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRONICA. SIGNIFICACION FISIOPATOLOGICA DE AMBAS PROTEINAS EN EL PULMON

L. OTEO OCHOA, M. MATIES PRATS, M. DIAZ ENRIQUEZ*, J.L. DE LA CRUZ RIOS, A. IZQUIERDO DEL AMO, J.L. CRUZ RAMOS, C. MARTIN SERRANO, J. PICHER NUÑEZ y A. SUEIRO BENDITO

Servicio de Neumología. C.E. Ramón y Cajal de la S.S. Madrid.

Alfa 1 antitripsina (α_1 AT) y alfa 2 macroglobulina (α_2 MG) son inhibidores enzimáticos con importantes funciones en la protección del tejido conectivo pulmonar.

En el presente trabajo se determinaron ambas proteínas a nivel sérico y en fase sol de esputo en dos grupos de pacientes portadores de enfermedad pulmonar obstructiva crónica con y sin infección respiratoria del tracto inferior.

Durante los períodos de infección pulmonar, los niveles séricos de α_1 AT aumentaron significativamente probablemente por incremento del metabolismo proteico, mientras que la concentración de α_2 MG durante este mismo período decreció de forma significativa, sugiriendo bien un aumento del catabolismo proteico, una reducción de la capacidad de síntesis o la formación de complejos estables α_2 MG-endopeptidasas bacterianas. Por otra parte, las tasas de α_1 AT y α_2 MG en esputo y su relación (esputo/suero) aumentaron significativamente en el transcurso de las infecciones pulmonares, evidenciando un importante aumento de la difusión pasiva pro-

teica desde el plasma a la secreción bronquial. Cuando la relación esputo/suero de ambas macromoléculas fue corregida para la albúmina, no existieron diferencias significativas al comparar las distribuciones de ambas poblaciones analizadas, sugiriendo un mecanismo de génesis común en los grupos con y sin infección pulmonar. La buena correlación existente entre α_1 AT y albúmina en presencia de infección respiratoria del tracto inferior confirma que la trasudación proteica es un mecanismo fisiopatológico preferencial.

Las bajas concentraciones detectadas de α_1 AT y α_2 MG en la secreción bronquial en el grupo de sujetos sin infección pulmonar, son indicativas de su limitada contribución antiproteasa en este medio biológico. Durante la infección pulmonar la proteína α_2 MG aumentó significativamente en esputo por efecto de la difusión pasiva desde el plasma y quizá por estimulación inespecífica de la producción local, pudiendo en esta circunstancia desarrollar una importante función inhibidora de la actividad enzimática libre. Sin embargo, a pesar de la contribución de α_2 MG a la corrección del desbalance entre proteasas neutras e inhibidores, los sujetos portadores de EPOC con infección pulmonar intercurrente mantienen un estado de desequilibrio enzimático con elevado riesgo para la integridad del tejido conectivo pulmonar.

* Servicio de Bioquímica.
Recibido el 14-12-82 y aceptado el 24-9-83.

Alpha 1-antitrypsin and alpha 2-macroglobulin in infected and non-infected sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease. Physiopathological significance of the two proteins in the lung.

Both proteins were determined in this study in the serum and in a colloidal solution of sputum in two groups of patients with chronic obstructive lung disease (COLD) with infection and without lower respiratory infection.

The serum levels of α_1 AT augmented significantly during pulmonary infection probably due to protein metabolism, while α_2 MG concentration decreased significantly during the same period suggesting either an increase in the protein catabolism, a reduction of the synthetic capacity, or the formation of stable complexes of α_2 MG-bacterial endopeptidases. On the other hand, the levels of α_1 AT and α_2 MG in sputum and their ratio (sputum/serum) augmented markedly during pulmonary infection, demonstrating a significant increase in the protein passive diffusion from the plasma to the bronchial secretions. There were no significant differences in the

ratio sputum/serum of both macromolecules when comparing the 2 groups analyze after correcting for the albumin. This suggests a common original mechanism in the groups with and without pulmonary infection. The strong correlation between α_1 AT and albumin with lower respiratory infection confirms that protein transudate is a preferential physiopathological mechanism.

The low concentrations of α_1 AT and α_2 detected in bronchial secretions of patients without pulmonary infection indicate their limited contribution to antiprotease activity in this biological medium. α_2 MG protein increased in the sputum significantly during pulmonary infection due to the passive diffusion from the plasma and perhaps too to the nonspecific stimulation of local production. An important inhibitory function of the free enzyme activity could be developed in this case. Nevertheless, patients with COLD and recurrent pulmonary infections maintain a state of enzymatic disequilibrium in spite of the contribution of α_2 MG in the correction of the disequilibrium between neutral proteases and inhibitors. This constitutes an important risk for the integrity of the pulmonary connective tissue.

Introducción

La integridad del tejido conectivo pulmonar depende fundamentalmente del mantenimiento de un equilibrio crítico entre las proteasas celulares inflamatorias y los inhibidores presentes en el tracto respiratorio inferior.

Aunque la patogénesis del enfisema pulmonar en el hombre sigue siendo incierta, se ha sugerido como posible mecanismo causal un desbalance proteasas-antiproteasas con predominio de la actividad enzimática elastolítica libre, el cual genera un proceso de digestión crónica e incontrolada del tejido conectivo pulmonar^{1,2}.

Dos tipos celulares diferentes han sido implicados como origen de las proteinasas; los granulocitos polimorfonucleares (pmn) y los macrófagos alveolares. Las células pmn son «reclutadas» a nivel del tracto respiratorio inferior principalmente en sujetos con exposición crónica a polutantes aéreos y/o consumo de cigarrillos³. Este acúmulo celular está probablemente mediatizado por la liberación de un factor quimiotáctico procedente de los macrófagos alveolares. Los granulocitos pmn contienen poderosas enzimas hidrolíticas⁴ (tabla I) con

capacidad para degradar elastina humana y otros componentes del tejido conectivo pulmonar⁵. Por otra parte, los macrófagos presentes a nivel alveolar segregan pequeñas cantidades de actividad proteolítica en cultivos celulares, presentando un comportamiento biológico diferente al de los enzimas de origen pmn⁶.

Los macrófagos alveolares se acumulan en gran número tanto en los sujetos fumadores crónicos de cigarrillos como en los procesos inflamatorios pulmonares⁷, creando en consecuencia un estímulo enzimático permanente que conduce a la secreción de actividad proteolítica, como bien ha sido demostrado en cultivos celulares.

La proteína alfa 1 antitripsina (α_1 AT) es el mejor inhibidor sérico de los enzimas proteolíticos¹. Debido a su bajo peso molecular se encuentra localizada principalmente a nivel extravascular y más concretamente en el medio biológico intersticial. Por otra parte, la proteína alfa 2 macroglobulina (α_2 MG), además de su papel antiproteasa presenta una función reguladora de las actividades fisiológicas e interacciona con la elastasa pmn, colagenasa, etc.^{8,9} Debido a su elevado peso molecular su presencia prima a nivel intravascular. Ambas antiproteasas difieren en su mecanismo de acción, presentando la α_2 MG una mayor actividad enzimática contra los sustratos de bajo peso molecular. En la tabla II se refiere la selectividad de acción de ambos inhibidores de proteinasas granulocíticas^{5,10}.

Aunque son varios los posibles mecanismos por los cuales estas proteínas llegan a la secreción bronquial (fig. 1), el fenómeno de trasudado desde la sangre es sin duda el de mayor importancia porcentual, dependiendo fundamentalmente de las concentraciones séricas de las proteínas, de su

TABLA I

Proteasas neutras de los granulocitos humanos

Proteasas neutras	pm	Probables fuentes pulmonares
Elastasa	32.000	Neutrófilo Macrófago alveolar
Colagenasa	60.000	Neutrófilo Macrófago alveolar
Proteasa neutra	76.000	Fibroblasto
Catepsina G	25.000	Neutrófilo

Peso molecular (pm) en dalton.

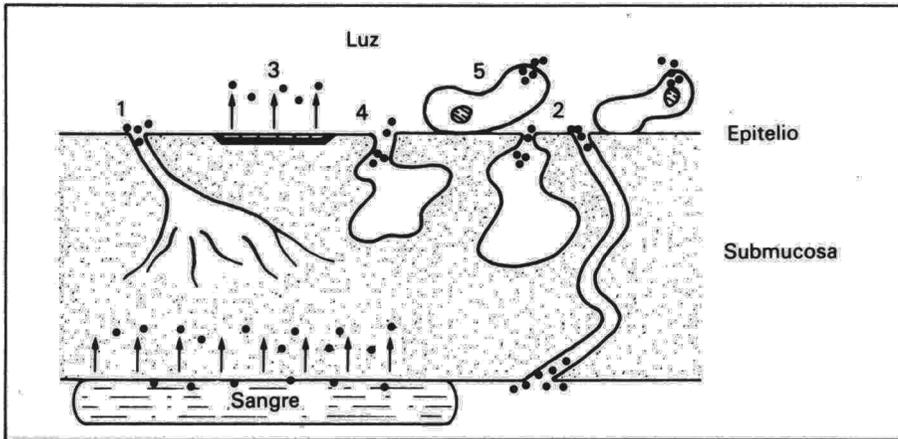
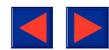


Fig. 1. Mecanismos posibles por los cuales las proteínas inhibidoras llegan a la secreción bronquial: 1. difusión pasiva desde la sangre; 2. alteraciones y difusión dentro de las secreciones bronquiales; 3. síntesis por células de epitelio; 4. producción por las glándulas submucosas; 5. síntesis por macrófagos alveolares y células plasmáticas.

tamaño molecular y del diámetro del llamado «poro efectivo», nivel anatómico de la difusión.

Especial atención ha merecido la asociación existente entre el déficit de α_1 AT y el enfisema pulmonar¹¹. La hipótesis más comúnmente aceptada para explicar la patogénesis de esta enfermedad destructiva, refiere que su desarrollo sería debido a una inhibición de la actividad proteolítica, generando en consecuencia daño tisular pulmonar¹². Los estudios mediante la utilización del método de lavado broncoalveolar (LBA), tanto en las formas hereditarias (déficit sérico de α_1 AT) como en las formas adquiridas (consumo de cigarrillos) de enfisema pulmonar, han demostrado una alteración del equilibrio elastasa-antielastasa a nivel de las estructuras alveolares, bien por pérdida de la «pantalla» de protección antielastásica o por incremento de la carga enzimática elastolítica¹. Estas secuencias patogénicas dan soporte a la teoría proteasa-antiproteasa^{5,13}, cuyo desarrollo se apoya en análisis epidemiológicos, estudios en sujetos con déficit congénito de α_1 AT y en la experimentación animal¹⁴⁻²⁴.

Los poderosos enzimas hidrolíticos (elastasa, colagenasa, proteasa-neutra, y catepsina D) incluyen entre sus sustratos todos los componentes del tejido conectivo pulmonar (fibras elásticas, colágeno, proteoglicanos y otras glicoproteínas) (fig. 2)²⁵⁻²⁹.

La deficiencia heredada de α_1 AT en individuos PiZ se manifiesta a nivel alveolar por una altera-

ción de la actividad antielastasa detectada inmunológica y funcionalmente, confirmando de hecho la ausencia de una alternativa contraenzimática significativa dentro de la matriz pulmonar. Es de resaltar, que aún en presencia de déficit de α_1 AT, el riesgo de desarrollar enfisema pulmonar es mucho más bajo si los sujetos afectados no son fumadores crónicos, estando probablemente en relación con la mínima liberación enzimática en ausencia de acúmulo de células inflamatorias³⁰⁻³³. Por otra parte, los sujetos fumadores de cigarrillos sin déficit hereditario de α_1 AT, parecen ser un grupo de alto riesgo por se al daño del tejido conectivo pulmonar, máxime, al haber sido recientemente demostrado «in vitro» la interacción existente entre algunos componentes químicos del tabaco y la α_1 AT, reduciendo por tanto la capacidad funcional inhibitoria de la proteína³⁴.

Dado el elevado peso molecular de la proteína α_1 MG (725.000 dalton) no es probable su transporte a través del lecho endotelial vascular del pulmón normal. La producción a nivel local de esta antiproteasa ha podido ser demostrada cultivando macrófagos alveolares incluyendo en el medio un marcador (35,-metionina), lo cual permite mediante radioinmuno-electroforesis la detección del inhibidor³⁵. De igual forma ha podido ser identificada por radioinmuno-electroforesis formando complejos con las proteasas segregadas en el cultivo de macrófagos³⁶. Recientemente se ha sugerido

TABLA II

Proteasas granulocíticas versus inhibidores endógenos. Perfiles de actividad antiproteasa

Inhibidores endógenos	PROTEASAS GRANULOCITICAS			
	Elastasa	Colagenasa	Proteasa neutra	Catepsina G
α_1 AT (pm: 55.000)	+++	—	+	?
α_2 MG (pm: 725.000)	+	+++	+++	+++

Grado de actividad (+); peso molecular (pm).

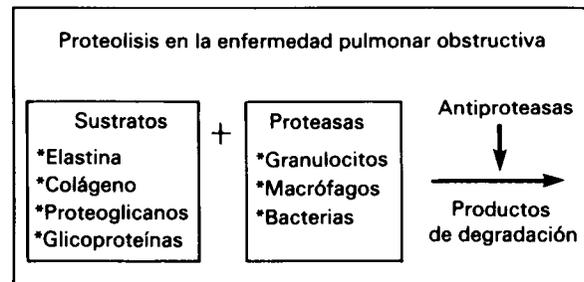


Fig. 2.



la posible síntesis de la α_2 MG a nivel de los fibroblastos humanos³⁷. Siendo esta antiproteasa el principal inhibidor de la colagenasa, su potencial protector sobre las estructuras alveolares en el hombre, aunque no bien conocido, es probablemente inferior al desarrollado por la α_1 AT³ y por el recientemente identificado «inhibidor de bajo peso molecular»³⁸. Además, el LBA en sujetos normales no detecta niveles significativos de α_2 MG³⁹. Ha sido recientemente demostrado que el contenido de antielastasa sérica de α_2 MG en su base molar (1:2) es aproximadamente un 10 % del total. La restante actividad inhibidora sérica de la elastasa funcional, aproximadamente un 90 %, corresponde a la α_1 AT que difunde con facilidad dentro del fluido alveolar debido fundamentalmente a su bajo peso molecular. Por otra parte, la falta evidente de difusión para la α_2 MG a través de las estructuras alveolo-capilares en el pulmón normal, hace que su papel de protección antielastasa sea muy bajo a nivel del tracto respiratorio inferior, habiendo sido cuantificado en < 1 % del total. La contribución de α_2 MG en la capacidad inhibitoria proteasa de las secreciones bronquiales es probablemente < 10 % de la correspondiente a α_1 AT. Este pequeño porcentaje, no es bien conocido si procede del suero por trasudado o se sintetiza a nivel local (macrófagos y/o fibroblastos)³⁷.

Las proteasas elastolíticas presentes en el suero sanguíneo sintetizadas por fibroblastos y células musculares lisas, son transportadas por medio de lipoproteínas utilizando vías de escape para con los inhibidores α_1 AT y α_2 MG⁴⁰.

En condiciones fisiológicas, la elastasa es una enzima que una vez liberada en forma activa desde los granulocitos, está presente en el suero formando complejos con la α_1 AT. Es muy posible que tanto en presencia de inactividad funcional permanente de la α_1 AT, como en procesos inflamatorios pulmonares, el potencial protector inhibitorio de las estructuras alveolares del hombre contra la elastasa neutrófila sufra cambios en su difícil equilibrio enzimático. En estas circunstancias, el inhibidor de bajo peso molecular y la α_2 MG podrían jugar papeles biológicos más determinantes^{38,41}.

En los sujetos normales, la α_1 AT representa aproximadamente un 90 % de la actividad inhibitoria sérica de la elastasa funcional, decreciendo muy rápidamente en los fumadores crónicos. La capacidad inhibitoria funcional de la α_1 AT contra las proteasas séricas está en una relación (1:1) de su base molar. Se sabe además que la afinidad de esta proteína inhibidora con las proteasas intracelulares y en particular para con la elastasa, se establece mediante la formación de complejos estables que conducen a un bloqueo o inhibición de la actividad enzimática. La eliminación de estos complejos desde el espacio extracelular pulmonar está influenciada por la concentración local de α_1

AT libre, por la eficacia de la patología implicada en la captación de complejos α_1 AT-proteasas, por la funcionalidad de los macrófagos alveolares y por el promedio de disociación de los complejos⁴².

La función inhibidora de α_1 AT y α_2 MG a nivel alveolar no ha sido definitivamente establecida. Dada la falta de actividad elastolítica y colagenótica en fluidos broncoalveolares de sujetos normales, es probable que su función fisiológica, principalmente de la α_1 AT, se desarrolle con eficacia⁴³.

Las proteínas inhibidoras séricas, aunque son encontradas regularmente dentro de las secreciones bronquiales, su papel a este nivel no es bien conocido. La presencia de α_1 AT en el fluido biológico bronquial dependería de su concentración sérica y del grado de inflamación de la pared bronquial.

En pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) e infección pulmonar intercurrente, se detecta en secreción bronquial un gran incremento de proteasas granulocíticas en forma libre y activa, mientras son de difícil identificación los inhibidores libres. Esta detección de actividad enzimática, podría ser en parte explicada por el agotamiento de las antiproteasas, dada su facilidad para la formación de complejos. Sin embargo, se ha sugerido que en estas circunstancias el papel inhibidor de la α_1 AT no sería primordial, dada su capacidad funcional limitada y la inestabilidad de los complejos por ella formados.

El presente trabajo analiza los cambios cuantitativos de α_1 AT y α_2 MG en suero y fase sol de esputo en pacientes portadores de EPOC con y sin infección pulmonar intercurrente. Además se estudia si la concentración de ambas proteínas obtenidas en el fluido biológico bronquial, viene determinada exclusivamente por un fenómeno de trasudado desde el suero, o bien, si por otra parte, existe una producción local significativa. Finalmente, se valora la función biológica de estas proteínas en presencia o ausencia de infección pulmonar en relación con la patogénesis de la enfermedad pulmonar destructiva (EPD).

Material y métodos

Selección de sujetos

Las características clínicas y funcionales de los sujetos estudiados se expresan en la tabla III. Dos grupos diferentes de 24 sujetos cada uno fueron seleccionados; 1.º grupo (n = 24), portadores de bronquitis crónica (MER - 1965)⁴⁴ con obstrucción fija al flujo aéreo (EPOC), considerando FEV₁/FVC < 70 %. En ellos, no existía evidencia clínica, analítica ni bacteriológica de infección pulmonar; 2.º grupo (n = 24), de características similares al anterior, pero con la presencia de un proceso de infección respiratoria aguda intercurrente, caracterizado por tos productiva e incremento de la disnea, requiriendo por ello admisión hospitalaria. De forma adicional, fueron exigidos para su diferenciación y posterior clasificación todos los criterios referidos en la (tabla IV).

1. Concentración de LDH (mU/ml) en fase sol de secreción bronquial. Para el grupo sin infección pulmonar se consideraron niveles de LDH < 300 (mU/ml) y para el grupo con infección valores de LDH > 600 (mU/ml); (medidas con método standard optimado: Boehringer-Manheim).

TABLA III

Características clínicas y funcionales de los sujetos estudiados

Grupo de pacientes	N.º	Edad (años ± DE)	Sexo (% varón)	FEV ₁ /FVC (%)
1 EPOC (infectados)	24	63,38 ± (10,50)	100 %	59,16 ± 14,22
2 EPOC (no infectados)	24	64,92 ± (9,21)	100 %	59,14 ± 13,69

TABLA IV

Criterios para la selección de los grupos de sujetos afectos de enfermedad pulmonar obstructiva crónica con y sin infección pulmonar

Parámetros de selección	Infectados (n = 24)	No infectados (n = 24)
LSD en fase sol de esputo (mU/ml)	1427,00 ± 405,73 r (812-2050)	90,77 ± 99,86 r (1-293)
PMN neutrófilos en esputo (%)	77,00 ± 6,00 r (71-89)	49,00 ± 19,00 r (30-55)
Celularidad total en esputo (c/mm ³)	3010,00 ± 628,00 r (2560-5400)	760,00 ± 208,00 r (260-915)
Aspecto macroscópico del esputo	Mucoide	Mucopurulento o purulento

r = rango.

Los valores de LDH (mU/ml), neutrófilos polimorfonucleares (%) y la celularidad total (cels/mm³) son referidos como $\bar{X} \pm DE$. La secreción traqueobronquial fue valorada como criterio subjetivo macroscópico.

2. El conteo celular (previa homogeneización por laminación capilar), fue estimado en fresco con cámara de Fuchs Rosenthal, tomando una muestra de 1 ml de esputo. Para la valoración de la celularidad total fueron contados leucocitos y macrófagos. Se consideraron < 1000 células/mm³ para los sujetos sin infección y < 2500 células/mm³ para los portadores de infección pulmonar.

3. El porcentaje del tipo celular pmn de una misma alicuota de esputo, fue determinado usando la técnica de Papanicolau. Un mínimo de 200 células fueron contadas para su identificación. Un valor de < 60 % de pmn se exigió para el grupo sin infección y > 70 % de pmn para el grupo con infección respiratoria del tracto inferior.

4. Aspecto macroscópico del esputo. Fue graduado subjetivamente como mucoide para los sujetos no infectados y como mucopurulento o purulento para los infectados.

Selección de esputo

Tras una sesión de fisioterapia respiratoria, muestras de esputo fresco procedentes de los sujetos de ambos grupos, fueron coleccionadas en recipientes de polietileno estériles con cierre hermético. Previa higiene bucal, un período de cuatro horas (8 a 12 de la mañana) fue requerido para obtener un volumen de espécimen bronquial > 15 cc, durante el cual se obtuvo una muestra de sangre venosa que fue enviada para estudio de proteínas al Laboratorio Central de Bioquímica.

El esputo original obtenido fue manipulado de forma inmediata. Una alicuota de espécimen fue requerida para rutina bacteriológica y lo restante (~ 10 cc), se procesó mediante ultracentrifugación a 160.000 g durante 120 minutos a 4° C sistema Beckman L5-75), obteniendo el sobrenadante (fase sol de esputo), el cual era congelado a -20° C hasta su posterior procesamiento.

Medida de proteínas

Concentraciones de α_1 AT, α_2 MG y albúmina fueron obtenidas en las muestras de suero y esputo mediante la técnica de inmunodifusión radial (Mancini et al 1965)⁴⁵. Fueron consideradas como rangos de normalidad sérica; α_1 AT (200-400 mg/100 ml), α_2 MG (♀ 150-350 mg/100 ml, ♂ 170-420 mg/100 ml) y albúmina (3,5-5 g/100 ml). Para las medidas en fase sol de esputo fue requerida una concentración previa utilizando membranas tipo Amicón (Minicón - B15).

El límite bajo de detección para α_1 AT y α_1 MG fue de 0,01 mg/100 ml. La relación esputo/suero fue obtenida para todos los especímenes biológicos. En ambos grupos se detectó en cada muestra de esputo niveles significativos de α_1 AT. Sin embargo, la proteína α_2 MG no fue siempre obtenida en el fluido bronquial, considerando en estos casos a efectos estadísticos un valor de cero. La relación esputo/suero para ambas proteínas fue corregida (dividida) para la albúmina (relación esputo/suero), al ser ésta considerada como variable sérica de referencia.

Exploración estadística

Las medias y desviaciones standard (\pm DE) de α_1 AT y α_2 MG en suero y esputo para los dos grupos de pacientes, fueron analizadas mediante el test de Student. Al valorar las medias y desviaciones standard (\pm DE) de las relaciones α_1 AT (esputo/suero), α_2 MG (esputo/suero), $\frac{\alpha_1 \text{ AT (esputo/suero)}}{\text{albúmina (esputo/suero)}}$ y $\frac{\alpha_2 \text{ MG (esputo/suero)}}{\text{albúmina (esputo/suero)}}$ en ambas poblaciones de sujetos, fue aplicado el test de Wilcoxon.

Las diferencias en la relación esputo/suero de α_1 AT y α_2 MG entre pacientes infectados y no infectados y sus respectivos valores corregidos para la albúmina (esputo/suero), se analizaron mediante el test de comparación de distribuciones, Chi cuadrado.

En los dos grupos de pacientes las proteínas α_1 AT (esputo/suero) y α_2 MG (esputo/suero) fueron correlacionadas linealmente con la albúmina (esputo/suero).

En todas las exploraciones estadísticas se preestableció una significación de $p < 0,05$.

Resultados

Estudio sérico

Las concentraciones medias de α_1 AT y α_2 MG séricas en los dos grupos de sujetos analizados son expuestas en la tabla V y cada uno de los parámetros individuales quedan significados en la (figura 3). El valor medio de α_1 AT en los sujetos

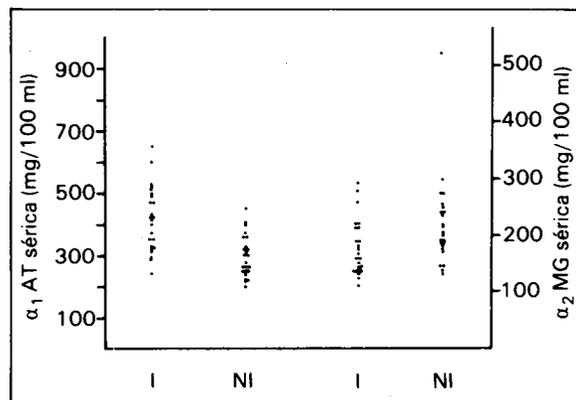


Fig. 3. Concentraciones de α_1 AT y α_2 MG séricas para muestras biológicas infectadas (I) y no infectadas (NI). Cada punto (.) representa una muestra.

L.A. OTEO OCHOA ET AL.—ALFA 1 ANTITRIPSINA Y ALFA 2
MACROGLOBULINA EN ESPUTO INFECTADO Y NO INFECTADO
EN PACIENTES CON ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRONICA.
SIGNIFICACION FISIOPATOLOGICA DE AMBAS PROTEINAS EN EL PULMON

TABLA V

Parámetros analíticos	PACIENTES EPOC		
	Infectados (n = 24)	No infectados (n = 24)	Significación (valor p)
α_1 AT sérica (mg/100 ml)	425,28 ± 115,82	291,50 ± 62,89	< 0,05
α_1 AT esputo (mg/100 ml)	14,14 ± 11,45	2,20 ± 1,17	< 0,05
α_1 AT esputo/suero ($\times 10^2$)	3,27 ± 2,06	0,72 ± 0,27	< 0,05
α_1 AT esputo/suero/ Albúmina esputo/suero	1,93 ± 0,96	1,62 ± 1,11	N.S.
α_2 MG sérica (mg/100 ml)	225,09 ± 107,69	180,39 ± 48,82	< 0,05
α_2 MG esputo (mg/100 ml)	0,54 ± 0,83	12,86 ± 20,50	< 0,05
α_2 MG esputo/suero ($\times 10^2$)	0,23 ± 0,36	5,93 ± 11,94	< 0,05
α_2 MG esputo/suero/ Albúmina esputo/suero	0,58 ± 0,99	5,86 ± 13,08	<
Albúmina esputo (mg/100 ml)	61,87 ± 43,14	29,15 ± 24,36	< 0,5
Albúmina esputo/suero ($\times 10^2$)	1,85 ± 0,80	0,73 ± 0,55	< 0,05

Los datos son referidos como $\bar{X} \pm DE$. Las concentraciones de α_1 AT y α_2 MG en suero y esputo son expresadas en mg/100 ml; la concentración de albúmina en esputo en mg/100 ml. La relación esputo/suero para α_1 AT, α_2 MG y albúmina ($\times 10^2$ por conveniencia) y los valores resultantes para α_1 AT y α_2 MG corregidos (divididos) por la relación esputo/suero de albúmina son expuestos. A efectos estadísticos fueron considerados valor cero de los niveles de α_2 MG en esputo < 0,01 mg/100 ml.

infectados ($425,28 \pm 115,82$ mg/100 ml) fue significativamente superior al de los sujetos sin infección pulmonar ($291,50 \pm 62,89$ mg/100 ml) ($p < 0,05$). El valor medio de α_2 MG en los sujetos con infección respiratoria ($180,39 \pm 48,82$ mg/100 ml) fue significativamente inferior al valor medio del grupo sin infección ($225,09 \pm 107,69$ mg/100 ml) ($p < 0,05$).

Estudio de esputo

Tanto la α_1 AT como la albúmina en esputo fueron detectadas en todos los especímenes analizados. El valor medio de α_1 AT en el grupo con infección fue ($14,14 \pm 11,45$ mg/100 ml) y sin infección ($2,20 \pm 1,17$ mg/100 ml). El valor medio de la albúmina en el grupo con infección fue ($61,87 \pm 43,14$ mg/100 ml) y sin infección ($29,15 \pm 24,36$ mg/100 ml).

La proteína α_2 MG no fue detectada (< 0,01 mg/100 ml) en 15 (62,50 %) de los 24 esputos simples no infectados. En los 9 restantes (32,50 %) los valores medios fueron ($1,56 \pm 0,60$ mg/100 ml). En el grupo de pacientes con infección pulmonar, α_2 MG en esputo simple no fue detectada en 3 (12,50 %) de las 24 muestras procesadas. En las 21 restantes, los valores medios fueron ($14,70 \pm 21,30$ mg/100 ml).

Las concentraciones medias de α_1 AT, α_2 MG (considerando valor cero a efectos estadísticos niveles < 0,01 mg/100 ml) y albúmina en fase sol de esputo de los sujetos infectados, fueron significativamente superiores a las concentraciones medias de los sujetos sin infección pulmonar ($p < 0,05$) (tabla V). De forma análoga, las concentraciones medias de la relación esputo/suero para α_1 AT, α_2 MG y albúmina, estuvieron significativamente aumentadas en los especímenes infectados ($p < 0,05$) (tabla V). La concentración media de la

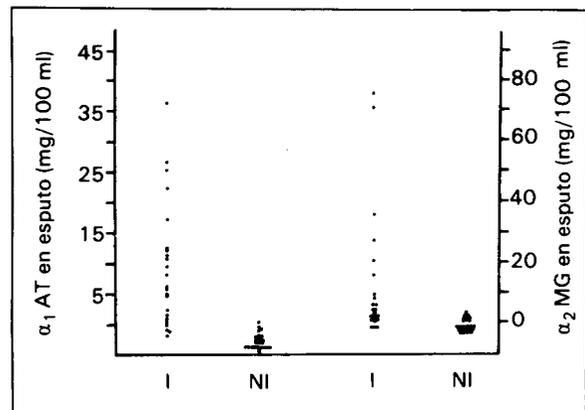


Fig. 4. Concentraciones de α_1 AT y α_2 MG en esputo para muestras biológicas infectadas (I) y no infectadas (NI). Cada punto (.) representa una muestra.

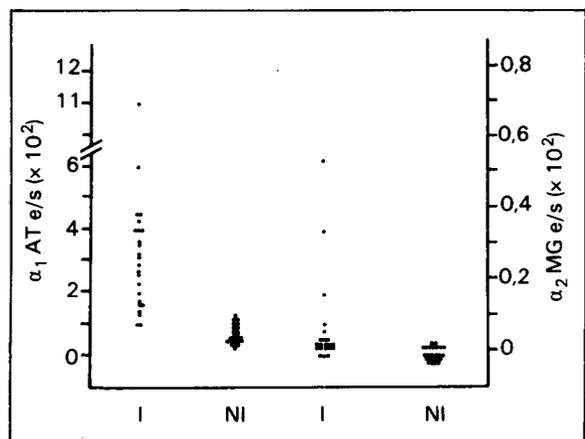


Fig. 5. Concentraciones de la relación esputo/suero para α_1 AT y α_2 MG son mostradas para ambas poblaciones de sujetos, infectados (I) y no infectados (NI). La multiplicación por 10^2 se efectuó por conveniencia. Los valores individuales marcados por debajo de la línea discontinua representan concentraciones de α_2 MG en esputo inferiores al límite de detección (< 0,01 mg/100 ml).

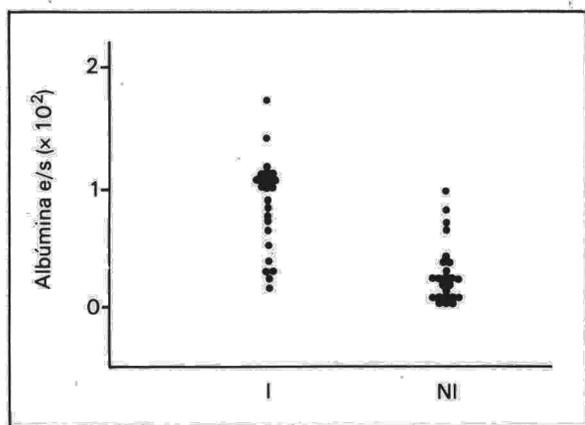


Fig. 6. Concentración de la relación esputo/suero para la albúmina en muestras biológicas infectadas (I) y no infectadas (NI). La multiplicación por 10^2 se efectuó por conveniencia.

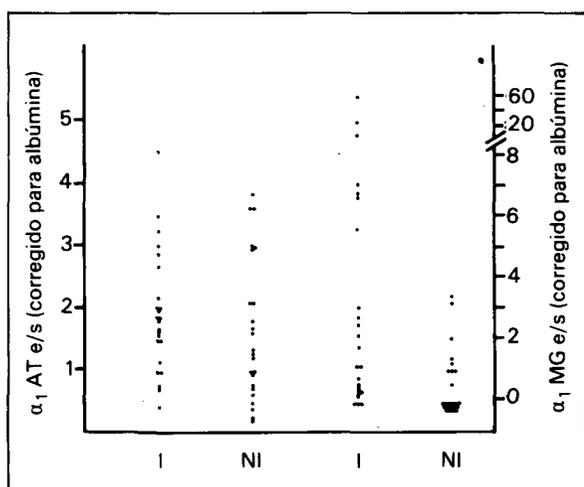


Fig. 7. Concentraciones de la relación esputo/suero para α_1 AT y α_2 MG corregidas (divididas) por la correspondiente relación esputo/suero de la albúmina en ambos grupos de sujetos, infectados (I) y no infectados (NI). Los valores individuales marcados por debajo de la línea discontinua representan las concentraciones de α_2 MG en esputo inferiores al límite de detección ($< 0,01$ mg/100 ml).

relación α_1 AT (esputo/suero) corregida para la albúmina (esputo/suero) no mostró diferencias significativas al comparar ambas poblaciones de sujetos ($p > 0,05$). Por contra, este mismo análisis para la proteína α_2 MG evidenció diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$).

Los valores individuales de α_1 AT y α_2 MG en esputo; α_1 AT, α_2 MG y albúmina relación (esputo/suero) corregidas para la albúmina (esputo/suero), para ambos grupos de pacientes se expresan en las figuras 4-7.

Al comparar mediante el test Chi cuadrado para α_1 AT y α_2 MG las concentraciones de la relación (esputo/suero), existieron diferencias significativas entre ambas poblaciones de sujetos ($p < 0,05$). Sin embargo, cuando esta relación fue corregida para la albúmina (esputo/suero), no se evidenció signi-

ficación estadística entre las dos distribuciones ($p > 0,05$). Estos resultados sugieren un mecanismo preferencial de génesis común tanto para la α_1 AT como para la α_2 MG en ambas poblaciones de sujetos.

En el análisis de regresión lineal entre α_1 AT y α_2 MG respecto a la albúmina para los grupos de pacientes con/sin infección pulmonar, únicamente se evidenció correlación significativa entre α_1 AT y albúmina para la población con infección ($r = 0,43$, $p < 0,05$) (fig. 8).

Análisis bacteriológicos

Los cultivos bacteriológicos de todas las muestras de esputo sin infección fueron negativos. Sin embargo, resultaron positivos 19 especímenes de sujetos con infección del tracto respiratorio inferior.

Discusión

La teoría proteolítica de la EPD (proteasas-antiproteasas), predice que el mantenimiento de las estructuras alveolares del pulmón humano, depende fundamentalmente de un equilibrio homeostático dinámico entre las proteasas inflamatorias de origen celular y las antiproteasas que proceden principalmente del suero y llegan por difusión al tracto respiratorio inferior. El mantenimiento de un equilibrio enzimático intrapulmonar, por la adecuada disponibilidad de una pantalla antiproteasa frente a las proteasas con capacidad degradativa del tejido conectivo extracelular, trae como resultado la ausencia de actividad elastolítica libre.

El papel antiproteasa de la proteína α_1 AT a nivel sérico ha sido bien documentado. Su capacidad inhibitoria de la elastasa funcional ($100-200 \mu\text{g/l}$),

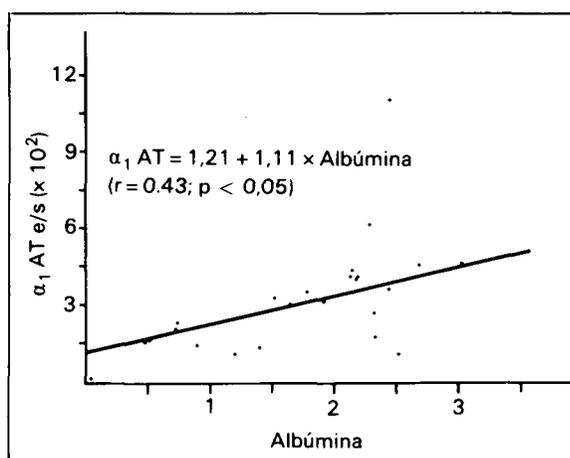


Fig. 8. Correlación lineal entre la concentración de α_1 AT (esputo/suero) y la albúmina (esputo/suero) para muestras infectadas. La línea de regresión y su ecuación correspondiente son mostradas; (r) es el coeficiente de correlación y (p) la significación.

ha sido graduada aproximadamente en un 90 % para los sujetos normales no fumadores. Esta actividad enzimática detectada en el suero en forma de complejos, decrece de forma rápida en los sujetos fumadores de cigarrillos.

La función biológica de la α_2 MG como antiproteasa protectora es en gran medida desconocida. No obstante merece señalar, su gran capacidad de interacción-enlace con las proteinasas mediante la formación de complejos irreversibles que retienen actividad enzimática. Este mecanismo fisiológico de control enzimático es más relevante para con los sustratos de bajo peso molecular.

La eliminación de los complejos formados desde el espacio extracelular pulmonar, está influenciada por la concentración local de α_2 MG libre, por la eficacia funcional de los macrófagos alveolares en la captación de complejos (α_2 MG-proteasas) y por el promedio de disociación de éstos. Por otra parte ha merecido creciente interés el papel que desempeña esta proteína en relación con la elastasa pmn, tropoelastina, colagenasa, precursores de la elastina, etc.^{8,46}

Aunque la proteína α_1 AT ha sido considerada como antielastasa principal por estudios de LBA en sujetos normales, sus funciones íntimas a nivel alveolar no han sido definitivamente establecidas. Se sabe no obstante de su capacidad de neutralización y clearance de proteinasas en los estados inflamatorios pulmonares. Además, tiene personalidad propia en la prevención de los procesos autodigestivos tisulares y en las reacciones locales de los sistemas de coagulación. Así en los pacientes con EPOC, han sido analizados algunos de los mecanismos biológicos por los cuales α_1 AT protege las estructuras alveolares, primando el factor de formación de complejos estables con capacidad inhibitoria de actividad enzimática.

Las proteínas inhibitoras son encontradas de forma regular en las secreciones traqueobronquiales⁴⁷. Aunque las funciones biológicas a este nivel no son bien conocidas, se ha sugerido que la capacidad de formación de estructuras complejas estables sería elevada exclusivamente en los esputos sin infección, en los cuales quedaría establecida una dinámica enzimática compensada. En los fluidos bronquiales con infección, además de la presencia de concentraciones elevadas de elastasa leucocitaria, existen alteraciones en la estructura bioquímica de la α_1 AT que la incapacitan para la formación de complejos, existiendo en consecuencia actividad elastolítica libre. Se ha demostrado que en presencia de infección pulmonar, existe actividad libre enzimática en más de un 70 % de los especímenes bronquiales, denotando, tanto un agotamiento del sistema inhibitor α_1 AT por exceso enzima libre procedente de los leucocitos pmn y macrófagos alveolares⁴, como un comportamiento bioquímico deficiente (movilidad electroforética alterada) que incapacita a la molécula para formar

complejos enzimáticamente activos, que neutralicen los procesos de autodigestión tisular. Si a la infección del tracto respiratorio acompaña el factor de consumo de tabaco, lo cual incrementa la liberación de enzimas por «sensibilización» del macrófago alveolar, el estado de desbalance enzimático es más marcado³³.

En nuestros días, se atribuye importancia creciente al papel que puedan desempeñar en el equilibrio enzimático pulmonar otros enzimas como la colagenasa procedente de los granulocitos, la catepsina D originada en los macrófagos alveolares y otras proteasas (bacterianas, etc.)⁴⁸. En presencia de infección pulmonar, es posible que estas proteasas puedan contribuir a limitar la función antielastasa leucocitaria de la α_1 AT mediante un mecanismo de competición enzimática.

Un cambio en la estructura bioquímica de α_1 AT, ha podido ser demostrado «in vivo» por transferencia enzimática desde esta proteína a α_2 MG. Por ello, y dado el espectro inhibitor de α_2 2 MG y su capacidad de formación de complejos estables y clearance⁸, el balance final de esta transformación, sería favorable una vez completada la secuencia enzimática.

La secreción bronquial contiene un potente inhibidor de bajo peso molecular que ha sido descrito recientemente por Hochstrasse et al³⁸. Se trata de una proteína ácido estable, con un peso molecular de 10.500 dalton y con un origen preciso a nivel de las membranas mucosas del tracto respiratorio superior, principalmente en las glándulas serosas submucosas. Se ha revelado en el fluido traqueobronquial de los sujetos normales, como el más potente inhibidor de la elastasa y de las proteínas catiónicas de los granulocitos (quimotripsina-like, etc.), en una relación molar 1/1^{38,41}. Sin embargo, mientras que en los fluidos normales del LBA su capacidad inhibitoria molar es de aproximadamente un 90 % contra las proteasas granulocíticas, en lavados bronquiales de procesos infecciosos y en esputos de pacientes con bronquitis purulenta no ha podido ser identificado. En plasma de individuos normales, han podido ser detectados indicios de este inhibidor del moco (aproximadamente 100 $\mu\text{g}/\text{l}$) procedente del tracto respiratorio superior.

Actuales investigaciones, han puesto de manifiesto la existencia de producción local respiratoria de la proteína alpha 1 antiqumotripsina (α_1 ACh) en sujetos con infecciones agudas pulmonares, existiendo una concentración preferente a nivel de la secreción bronquial³⁷. Este hecho sugiere que en los procesos inflamatorios pulmonares la α_1 ACh en complemento con la α_2 MG podrían desempeñar un papel relevante en los mecanismos de neutralización de enzimas libres³⁶.

Las bajas tasas de α_1 AT obtenidas en el fluido traqueobronquial, ponen de manifiesto que a pesar de la capacidad funcional de la proteína, ésta no



desempeña una función inhibitoria relevante a ese nivel. Cuando los especímenes bronquiales se encuentran infectados, la concentración de α_1 AT aumenta por incremento de la trasudación. Por otra parte, en el grupo de sujetos con infección pulmonar, es significativa una reducción de los niveles plasmáticos de α_2 MG en comparación con el grupo sin infección. Esta circunstancia que ha sido referida por Burnett et al⁴⁹, en contra de trabajos previos de Barnett et al⁵⁰, sugiere que sea la propia infección respiratoria la causa de la reducción en las concentraciones séricas de la proteína, verosímilmente como resultado de la formación de complejos estables de α_2 MG con endopeptidasas de origen lisosómico o bacteriano. No obstante, es también probable que una reducción de la capacidad de síntesis de esta proteína esté implicada en este comportamiento.

La relación esputo/suero aumentada para α_1 AT y α_2 MG en los pacientes con infección pulmonar, confirma el importante grado de difusión proteica que ocurre en estas circunstancias desde el suero a la secreción bronquial.

La albúmina llega al fluido bronquial desde la sangre por difusión pasiva dependiendo exclusivamente de su concentración sérica y del grado de inflamación de la pared bronquial⁴⁷. Por este motivo, ha sido comúnmente utilizada como parámetro de referencia para poder catalogar las proteínas séricas y las de producción local pulmonar. En efecto, cuando la relación esputo/suero de α_1 AT es corregida para la albúmina (esputo/suero), las diferencias al comparar las medias y distribuciones entre las poblaciones de sujetos infectados y no infectados quedan eliminadas, confirmando un mecanismo de génesis común para ambos grupos. Más aún, la buena correlación existente entre α_1 AT y albúmina en presencia de infección pulmonar, apoya el origen positivamente sérico de esta proteína. Por otra parte se ha sugerido que los elevados niveles de α_2 MG en la secreción bronquial, pudieran ser debidos fundamentalmente al aumento en la difusión proteica durante las infecciones del tracto respiratorio, junto a un bajo porcentaje de síntesis local cuya fuente principal serían los macrófagos alveolares. Cuando la relación esputo/suero de α_2 MG es corregida para la albúmina (esputo/suero), las diferencias al comparar las distribuciones de ambas poblaciones quedan eliminadas, persistiendo únicamente diferencias significativas al comparar las medias de ambos grupos. Estos resultados, similares a los referidos recientemente por Burnett et al⁴⁹, son indicativos de que la difusión pasiva desde el plasma a la secreción bronquial es el mecanismo dominante, mientras que la producción local, quizás estimulada de forma inespecífica por componentes bacterianos, contribuiría con un bajo porcentaje en presencia de infección pulmonar. Dadas las bajas concentraciones de α_2 MG en esputo no infectado, es pro-

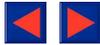
bable que la función protectora del conectivo pulmonar que desempeña en estas circunstancias, dependa en su mayor parte de la fracción de síntesis local.

La gran variabilidad observada en las tasas de α_2 MG para esputos con y sin infección, sugiere la probabilidad de que algunos sujetos bien en condiciones normales o en determinados estados patológicos pulmonares, tuvieran una deficiente producción de esta proteína a nivel local, siendo este grupo de sujetos los que al presentar un mantenido desbalance proteasa-inhibidores con actividad enzimática libre, encontrarían un mayor riesgo para desarrollar EPD, máxime en presencia de hábito del tabaco.

Los inhibidores derivados del plasma en las secreciones no purulentas representan sólo un 10 % de la capacidad inhibitoria elastasa, siendo muy probable que el 90 % restante sea dependiente del inhibidor local de bajo peso molecular. Sin embargo y en ausencia de déficit genético de α_1 AT, el balance proteasas-inhibidores se altera en presencia de infección pulmonar por: 1) excesiva liberación enzimática, 2) pérdida de capacidad funcional de α_1 AT, y 3) ausencia de «inhibidor de moco bronquial». Esta situación de desequilibrio entre fuerzas enzimáticas, ha sido objetivada en los fluidos bronquiales de pacientes con EPOC e infección intercurrente, determinando en tales circunstancias una mayor responsabilidad de las proteínas α_2 MG y α_1 ACh en el control de la actividad enzimática libre³⁶. Sin embargo, la existencia de un permanente desbalance enzimático, condiciona un estado de alto riesgo tanto para la integridad del tejido matriz pulmonar como para la función ciliar. Bajo esta secuencia biológica, la teoría del equilibrio proteasas neutras-inhibidores adquiere su fundamento en la interpretación patogénica de la EPD.

BIBLIOGRAFIA

1. Kuhn C, Senior RM: The role of elastases in the development of emphysema. *Lung* 1978; 155: 185-197.
2. Janoff A, White RK, Carp H, Harel S, Deering R, Lee D: Lung injury by leukocytic protease. *Am J Pathol* 1979; 97: 111-135.
3. Auerbach O, Hammond EC, Garfinkel L, Benante C: Relation of smoking and age to emphysema. *Whole lung study. New Engl J Med* 1972; 286: 853-857.
4. Ohlsson K, Tegner H: Granulocyte collagenase, elastase and plasma protease inhibitors in purulent sputum. *Europ J Clin Invest* 1975; 5: 221-227.
5. Ohlsson K: Polymorphonuclear leukocyte collagenase: En: *Collagenase in normal and pathological connective tissues*. Woolley DE, Evanson JM, New York Ed. Wiley, 1980; 209-222.



L.A. OTEO OCHOA ET AL.—ALFA 1 ANTITRIPSINA Y ALFA 2
MACROGLOBULINA EN ESPUTO INFECTADO Y NO INFECTADO
EN PACIENTES CON ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRONICA.
SIGNIFICACION FISIOPATOLOGICA DE AMBAS PROTEINAS EN EL PULMON

6. Baugh RMJ, Travis J: Human leukocyte granule elastase: rapid isolation and characterization. *Biochemistry* 1976; 15: 836-841.
7. Rodriguez RJ, White RR, Senior RM, Levine EA: Elastase release from human alveolar macrophages: comparison between smokers and non-smokers. *Science* 1977; 198: 313-314.
8. Barret AJ, Starkey PM: The interactions of 2-macroglobulin with proteinases. Characteristics and specificity of the reaction and a hypothesis concerning its molecular mechanism. *Biochem J* 1973; 133: 709-724.
9. Twumasi DY, Liener IE, Galdston M, Levytzka V: Activation of human leukocyte elastase by human 2-macroglobulin. *Nature* 1977; 267: 61-63.
10. Ohlsson K: Granulocyte collagenase and elastase and their interactions with alpha 1 antitrypsin and alpha 2 macroglobulin. En: *Proteases and biological control*. Reich E. et al. Cold Spring Harbor, ed. Cold Spring Harbor Laboratory, 1975; 591-602.
11. Eriksson S: Studies in alpha 1 antitrypsin deficiency. *Acta Med Scand* 1965; 177 (suppl): 1-85.
12. Editorial: The pathogenesis of pulmonary emphysema. *Lancet* 1980; 1: 743-745.
13. Gadek JE, Hunninghake GW, Fells GA, Zimmerman RL, Keogh BA, Crystal RG: Evaluation of the protease-antiprotease theory of human destructive lung disease. *Bull Europ Physiopath Resp* 1980; 16 (suppl): 27-40.
14. Eriksson S: Pulmonary emphysema and alpha 1 antitrypsin deficiency. *Acta Med Scand* 1964; 177: 175-179.
15. Kueppers F: Inherited differences in alpha 1 antitrypsin. En: *Genetic determinants of pulmonary disease*. Litwin SD, New York, ed. Dekker, 1978; 23-74.
16. Janoff A, Sloan B, Weinbaum G, Damiano V, Sandhaus RA, Elias J, Kimbel P: Experimental emphysema induced with purified human neutrophil elastase. Tissue localization of the instilled protease. *Am Rev Respir Dis* 1977; 115: 461-478.
17. Senior RM, Tegner H, Kuhn C, Ohlsson K, Starcher BC, Pierce JA: The induction of pulmonary emphysema with human leukocyte elastase. *Am Rev Respir Dis* 1977; 116: 469-475.
18. Lieberman J: Elastase, collagenase, emphysema and alpha 1 antitrypsin deficiency. *Chest* 1976; 70: 62-67.
19. Kobrie V, Hurych J, Holuva R: Changes in pulmonary connective tissue after a single intratracheal instillation of papain in the rat. *Am Rev Respir Dis* 1982; 125: 239-243.
20. Kuhn C, Yu S-Y, Chraplyvy M, Linder HE, Senior RM: The induction of emphysema with elastase. II Changes in connective tissue. *Lab Invest* 1976; 34: 372-380.
21. Karlinsky JB, Sinder GL: State of the art. Animal models of emphysema. *Am Rev Respir Dis* 1978; 117: 1109-1133.
22. Gross P, Pfitzer EZ, Tolker E, Babyak NA, Kaschak M: Experimental emphysema: its production with papain in normal and silicotic rats. *Arch Environ Hlth* 1965; 11: 50-58.
23. Kaplan PD, Kuhn C, Pierce JA: The induction of emphysema with elastase. *J Lab Clin Med* 1973; 82: 349-365.
24. Marco V, Mass B, Meranze DR, Weinbaum G, Kimbel P: Introduction of experimental emphysema in dogs using leukocyte homogenates. *Am Rev Respir Dis* 1971; 104: 595-598.
25. Gadek JE, Kelman JA, Weinberger SE, Horwitz AL, Reynolds HY, Fulmer JD, Crystal RG: Collagenase in the lower respiratory tract of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *New Engl J Med* 1979; 301: 737-742.
26. Horwitz AL, Hance AJ, Crystal RG: Granulocyte collagenase: selective digestion of type I over type III collagen. *Proc Nat Acad Sci Wash* 1977; 74: 897-901.
27. Janoff A, Feinstein G, Malemud CJ, Elias JM: Degradation of a cartilage proteoglycan by human leukocyte granule neutral proteases a model of joint injury. *J Clin Invest* 1976; 57: 615-624.
28. Turino GM, Keller S, Chrzanowski P, Osman M, Cerreta J, Mandl I: Lung elastin content in normal and emphysematous lungs. *Bull Europ Physiopath Resp* 1980; 16 (suppl): 43-56.
29. Hance AJ, Crystal RG: The connective tissue of the lung. *Am Rev Respir Dis* 1975; 112: 657-711.
30. Dunnill MS: Aetiology of emphysema. *Bull Europ Physiopath Resp* 1979; 15: 1015-1029.
31. Hutchinson DCS, Cook PJJ, Barter CE, Harris H, Hugh-Jones P: Pulmonary emphysema and 1-antitrypsin deficiency. *Brit Med J* 1971; 1: 689-694.
32. Thurlbeck WM, Ryder RC, Sternby N: A comparative study of the severity of emphysema in necropsy populations in three different countries. *Am Rev Respir Dis* 1974; 109: 239-248.
33. Janoff A, Carp H: Possible mechanisms of emphysema in smokers. Cigarette smoke condensate suppresses protease inhibition in vitro. *Am Rev Respir Dis* 1977; 116: 65-72.
34. Carp F, Janoff A: Possible mechanisms of emphysema smokers. In vitro suppression of serum elastase inhibitory capacity by antioxidants. *Am Rev Respir Dis* 1978; 118: 617-621.
35. Mosher DF, Saksela O, Valeri A: Synthesis and secretion of alpha 2 macroglobulin by cultured adherent lung cells. *J Clin Invest* 1978; 60: 1036-1045.
36. White RR, Janoff A, Godfrey HP: Secretion of alpha 2 macroglobulin by human alveolar macrophages. *Am Rev Respir Dis* 1980; 121 (suppl): 418 (A).
37. Mosher DF, Wing DA: Synthesis and secretion of alpha 2 macroglobulin by cultured human fibroblast. *J Exp Med* 1976; 143: 462-467.
38. Hochstrasser K: Proteinase (elastase) inhibitor from the ciliated membranes of the human respiratory tract. *Methods Enzymol* 1976; 45: 869-872.
39. Low RB, Davis GS, Giancola MS: Biochemical analyses of bronchoalveolar lavage fluids of healthy human volunteer smokers and non smokers. *Am Rev Respir Dis* 1978; 118: 863-875.
40. Robert B, Robert L: Studies on the structure of elastin and the mechanisms of action of elastolytic enzymes. En: *Chemistry and molecular biology of the intercellular matrix*. Balazs EA, Academic Press vol 1, New York 1970; 665-670.
41. Ohlsson K, Tegner H: Inhibition of elastase from granulocytes by the low molecular weight bronchial protease inhibitor. *Scand J Clin Lab Invest* 1976; 36: 437-445.
42. Ohlsson K, Delshammar M: Interactions between granulocyte elastase and collagenase and the plasma proteinase inhibitors in vitro and in vivo. En: *Dynamics of connective tissue macromolecules*. Ed Burleigh PMC, Poole AR, Amsterdam North-Holland. Publishing Co. 1975; 259-275.
43. Hayem, A, Scharfman A, Laine A, Lafitte JJ, Sablonniere B: Proteases and antiproteases in bronchoalveolar lavage. *Bull Europ Physiopath Resp* 1980; 16 (suppl): 247-258.
44. Medical Research Council. Definition and classification of chronic bronchitis. *Lancet* 1965; 1: 775-799.
45. Mancini G, Carbonara AD, Heremans JF: Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 1965; 2: 235-254.
46. Ohlsson K: Alpha 1 antitrypsin and alpha 2 macroglobulin, interactions with human neutrophil collagenase and elastase. *Ann NY Acad Sci* 1975; 256: 409-419.
47. Stokley RA, Mistry M, Bradwell AR, Burnett D: A study of plasma proteins in the sol phase of sputum from patients with chronic bronchitis. *Thorax* 1979; 34: 777-782.
48. Cohen AB: Interrelationships between the human alveolar macrophage and alpha 1 antitrypsin. *J Clin Invest* 1973; 52: 2793-2799.
49. Burnett D, Stokley RA: Serum and sputum alpha 2 macroglobulin in patients with chronic obstructive airways disease. *Thorax* 1981; 36: 512-516.
50. Barnett TB, Gottovi D, Johnson MA: Protease inhibitors in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1975; 111: 587-593.