



LOS ANTICUERPOS ANTICÉLULA ENDOTELIAL EN LA ESCLEROSIS SISTÉMICA

PALOMA GARCÍA DE LA PEÑA LEFEBVRE

Servicio de Reumatología. Hospital Ramón y Cajal. Madrid. España.

RESUMEN

Los anticuerpos anticélula endotelial (AACE) son un grupo heterogéneo de anticuerpos (Ac) dirigidos contra diferentes antígenos (Ag). Su prevalencia en la esclerosis sistémica (ES) es variable e inespecífica, pues pueden aparecer en otras enfermedades. Pese a ello, cada vez son más numerosos los estudios que apuntan hacia un papel destacado de estos Ac en la etiopatogenia de esa enfermedad, en la que el daño vascular es uno de los pilares fundamentales.

Las técnicas utilizadas para su detección, los Ag diana, su relación con ciertas manifestaciones de la enfermedad o los diferentes tipos de ésta son algunos de los aspectos que se tratará a lo largo de este artículo.

Palabras clave: Esclerodermia. Esclerosis sistémica. Anticélula endotelial.

ABSTRACT

Anti-endothelial cell antibodies (AECA) are heterogenous group of antibodies (Ab) against different antigens (Ag). Their prevalence in Systemic Sclerosis (SSc) is variable and no specific and they can be detected in other diseases. Many studies show the essential role of AECA in the pathogenesis of the disease, where vascular injury is a main stone.

Determination methods, Ag targets and their relationships with clinical features and disease subtypes will be some subject approached in this article.

Key words: Scleroderma. Systemic sclerosis. Anti-endothelial cells antibodies.

INTRODUCCIÓN

La esclerosis sistémica (ES) es una enfermedad de etiología desconocida en la que se producen alteraciones del tejido conectivo, el endotelio y la inmunidad celular y humoral. Para muchos autores, el inicio de todas estas alteraciones sería vascular, y los anticuerpos anticélula endotelial (AACE) podrían tener un papel fundamental en la activación de una cascada de interacciones. La ES se caracteriza por una alteración en el equilibrio entre las prostaglandinas vasodilatadoras y vasoconstrictoras. Durante la evolución de la enfermedad se produce una proliferación de las células endoteliales (CE) con un engrosamiento de la íntima, lo cual lleva a un estrechamiento de la luz de los vasos. Las CE sufren el fenómeno de vacuolización, cambios en su fenotipo, y todo ello lleva a una alteración de la permeabilidad celular. Se cree que uno de los facto-

res que podrían contribuir a la activación de las CE son los AACE, de los que trataremos abiertamente en este artículo. Para mejor comprensión, se hace un breve resumen sobre algunos conceptos de la CE.

La célula endotelial

El endotelio está constituido por una única capa celular continua que tapiza la luz de las arterias, las venas, los vasos capilares y los vasos linfáticos. Las CE son unas células grandes, de 40-50 nm, y alargadas que presentan una polaridad particular, con una cara luminal en contacto directo con la sangre y una cara basal en contacto con los componentes de la matriz extracelular. Su citoplasma contiene unas vacuolas llamadas cuerpos de Weibel-Palade, que actúan como reservorio de una serie de factores: el factor Von Willebrand (FVW), el factor acti-



vador de las plaquetas (PAF), la P-selectina, la endotelina y la interleucina (IL) 8. Estas sustancias pueden ser secretadas por efecto de ciertos estímulos como la histamina, la trombina y la IL-1. La membrana plasmática de las CE presenta unas invaginaciones llamadas caveolas, constituidas en su mayoría por las proteínas caveolina 1 y 2, donde se encuentra trombomodulina, factor tisular y óxido nítrico (NO)¹.

Las CE están recubiertas de un glucocálix rico en proteoglicanos cargados negativamente, de cuya producción también se encargan, principalmente, heparán y dermatán sulfatos². Algunos de estos proteoglicanos presentan sitios de fijación para ciertos factores de crecimiento como el factor transformador del crecimiento beta (TGFβ) y el factor de crecimiento de los fibroblastos básico (bFGF)³.

El tejido endotelial tiene unas características que lo hacen peculiar: a diferencia de otros tejidos, permanece en relativa quietud, ya que las CE sólo se dividen dos veces en toda la vida, lo cual no impide que tengan la capacidad de multiplicarse rápidamente si la situación lo requiere. Posee una gran heterogeneidad antigénica, y entre los marcadores endoteliales se encuentran: EN4, vWf, Pal-E, 44G4, ICAM-1, VCAM, PECAM, OKM5 (*monocyte/endothelial marker*) y HLA⁴.

Las CE se dividen en dos grandes grupos: las de la macrocirculación y las de la microcirculación. Ambos tipos celulares tienen características que las diferencian, como la distinta proporción de marcadores endoteliales, las CE de los capilares tienen mayor expresión de HLA I y II, ICAM y OKM5; en cambio, el endotelio de los grandes vasos expresa mayoritariamente vWf y ELAM-1⁴. Todas estas cualidades hacen del endotelio un tejido muy activo que participa en múltiples procesos fisiológicos como son:

- El control del tono vascular mediante la secreción de múltiples factores vasodilatadores y vasoconstrictores: NO, prostaciclina (PGI₂ que inhibe la agregación plaquetaria), PAF (vasoconstricción y activación de la adhesión leucocitaria), endotelina, enzima de conversión de la angiotensina (ECA), que cataliza el paso de angiotensina I a angiotensina II, que produce una vasoconstricción y estimulación de la producción de aldosterona con retención sódica.

- Regulación de la homeostasis y al mismo tiempo propiedades trombóticas y antitrombóticas, con predominio de las segundas.

- Participa en la inflamación y la inmunidad celular a través de sus interacciones con los leucocitos. Las CE expresan moléculas del sistema HLA tipo I, pero bajo el efecto del interferón gamma también pueden expresar de tipo II.

Los cultivos in vitro de las CE de grandes vasos, como la arteria aorta y la vena umbilical, han sido una herramienta fundamental para el conocimiento del metabolismo endotelial. Desde que en 1878 Karasek et al desarrollaran los primeros cultivos de CE de microcirculación de piel de conejo, se han producido grandes avances gracias al estudio de la microcirculación⁵.

En los estudios realizados en la ES, los tres tipos de CE más utilizados son las de vena umbilical de recién nacido (HUVEC), de microcirculación humana de piel (HMVEC-d) y de pulmón (HMVEC-l). De los tres, las HUVEC son las más fáciles de conseguir tanto técnica como económicamente, pero presentan la desventaja de la gran heterogeneidad de sus donantes. Las HMVEC-d y las HMVEC-l son mucho más difíciles de cultivar; en el caso de las primeras el paso más “delicado” es el aislamiento de la primera población celular y no se debe realizar más de 8 o 10 pases porque las CE se vuelven fibroblastoides y pierden sus marcadores. Las HMVEC-l tienen características particulares cuando se las compara con las de la circulación sistémica: sometidas a bajas presiones, la delgadez de sus paredes, alta densidad capilar y escaso porcentaje de músculo liso en sus paredes. Aunque son células difíciles de cultivar in vitro, actualmente se dispone de CE de microcirculación de pulmón de conejos, ratas, vacas y humanos. Son dos las técnicas que se utilizan para aislarlas, la de Carley y la de Hewett-Murray⁶.

Anticuerpos anticélula endotelial

Los AACE son un grupo de anticuerpos dirigidos contra diferentes antígenos y cuya heterogeneidad, entre los individuos que presentan una misma enfermedad, dificulta su clasificación. Además, la especificidad de un AACE por su antígeno no depende solamente del carácter propiamente endotelial, sino también del tipo de CE estudiada. De tal modo

que una CE de microcirculación puede presentar “dianas” ausentes en CE de macrocirculación y viceversa. Estas proteínas pueden formar parte de los componentes de la membrana plasmática de la CE, en cuyo caso pueden expresarse de manera constitutiva o expresarse tras la activación de citoquinas como la IL-1. Estos antígenos también pueden corresponder a moléculas presentes en el plasma y que se han “depositado” en la CE, en cuyo caso no serían verdaderos AACE. Por último, estos antígenos pueden corresponder a proteínas citoplásmicas “expuestas” de forma transitoria en la superficie celular o “alcanzadas” por AACE con capacidad de penetrar en el interior de la CE.

Los antígenos contra los que van dirigidos los AACE comprenden desde proteínas de la matriz extracelular y moléculas que se adhieren a la CE, como el ADN en el lupus eritematoso sistémico (LES), glucoproteína β_2 o fosfolípidos en el síndrome antifosfolípido, mieloperoxidasa o proteinasa 3 en las vasculitis y alfaenolasa en la enfermedad de Behçet⁷⁻¹¹.

Anticuerpos anticélula endotelial en la esclerosis sistémica

La prevalencia de los AACE en la ES varía entre un 44% en la ES cutánea limitada (EScl) al 88% de la ES cutánea difusa (EScd)¹². No son específicos de la enfermedad, y se puede detectarlos en el LES, la dermatomiositis, la artritis reumatoide y las vasculitis¹³⁻¹⁷. Estudios recientes indican que la presencia de los AACE se asocia con mayor incidencia de manifestaciones vasculares, como la hipertensión arterial pulmonar (HAP), la isquemia digital y la fibrosis pulmonar y que su título estaría en relación con la actividad de la enfermedad^{18,19}.

Para Renaudineau et al²⁰, en la ES podemos encontrar dos tipos de AACE: de afinidad débil (*low affinity AECA*), que se puede considerar un epifenómeno, y de afinidad fuerte (*high affinity AECA*), que tendrían una participación en la patogenia de la enfermedad. Ese mismo grupo estudió la presencia de AACE en 478 pacientes diagnosticados de ES utilizando diferentes fuentes de CE. Hallaron AACE en el 48,5% de los pacientes, el 34,3% contra CE de médula ósea; el 27,1% contra HUVEC; el 26,3% contra CE de hibridoma, y el 22,7% contra CE de sarcoma de Kaposi. También observaron una asociación entre la presencia de AACE y otro

tipo de anticuerpos, como los antiheparina y anti-iruvato deshidrogenada, entre los que hay reactividad cruzada. Concluyeron que para detectar la presencia de AACE en suero de pacientes con ES es necesario usar diferentes fuentes de CE y éstas deben incluir CE de microcirculación²¹.

En otro estudio posterior, Sakly et al²² analizaron y compararon la presencia de AACE en 60 pacientes con conectivopatías, y entre ellas 6 con ES, utilizando el cito-ELISA con diferentes fuentes de antígenos de CE (HMVEC-l y CE de médula ósea) y como control, células epiteliales de adenocarcinoma de mama. Los pacientes se clasificaban en 3 grupos en función de la densidad óptica obtenida: pacientes sin ningún anticuerpo, pacientes con AACE no específicos y pacientes con AACE específicos; encontraron que el 43,3% presentaba AACE específicos y 28,3%, AACE no específicos.

Se ha demostrado que algunos de los antígenos contra los cuales están dirigidos los AACE se localizan en el citoplasma y tienen diferentes pesos moleculares: 60, 90, 110 y 140 kDa, aunque lo más frecuente es que estén dirigidos contra el antígeno de 90 kDa²³.

El grupo austríaco de Sgonc et al^{24,25} demostró que la apoptosis de las CE es uno de los principales fenómenos que tienen lugar en la piel de los enfermos con ES y en los pollos UCD-200/206 (modelo experimental de la esclerodermia) y señalan que los AACE podrían tener un papel fundamental en su inducción. Dicha apoptosis se produciría por citotoxicidad mediada por AACE vía *Fas* (CD95). También observaron que la totalidad de los pacientes con ES, en la fase temprana de la enfermedad, presentaban AACE de tipo IgG dirigidos contra HMVEC-d, pero sólo el 50% presentaba anticuerpos contra HUVEC. Analizaron el efecto de los AACE y de las NK en las HMVEC-d y las HUVEC, y observaron que en los pacientes con AACE la activación de los linfocitos NK por IL-2 es necesaria para que se produzca la citotoxicidad mediada por anticuerpos en las HMVEC-d.

Más recientemente ese mismo grupo ha demostrado in vivo que la transferencia de AACE de pollos UCD-200 a embriones de pollos sanos induce la apoptosis de las CE. Para ello realizaron dos tipos de experimentos: por un lado se inyectó por vía intravenosa los AACE a embriones de 13 días de po-



los sanos y, por otro, se depositó AACE en la membrana corioalantoidea (MCA) de embriones de 10 días de pollos sanos. Posteriormente, mediante una técnica de TUNEL se estudiaba la presencia de apoptosis en las CE en las crestas de los polluelos de 1 semana de edad en el caso de la vía intravenosa y en las MCA de los embriones tras haber transcurrido 6 días del depósito de AACE²⁶.

Carvailho et al²⁷ demostraron que *in vitro* los AACE de tipo IgG de pacientes con ES inducen un aumento de la adhesión de los leucocitos a las CE y de las moléculas de adhesión ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina. Los AACE inducirían la liberación de al menos dos mediadores derivados del endotelio, uno de ellos (todavía no identificado) de liberación rápida y el otro de liberación lenta (IL-1), y ambos estimularían la CE de una manera autocrina. Posteriormente, Stratton et al²⁸ evidenciaron que los patrones de activación de las CE de pulmón y de riñón son distintos. Para ello midieron las concentraciones de ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina en pacientes con y sin afección renal y pulmonar. De las tres moléculas estudiadas, la E-selectina fue la más específica de la activación endotelial. Sus valores fueron normales en pacientes con EScl e HAP y estaban aumentados en pacientes con EScl y crisis renales y en todos los grupos de EScl. Los mayores valores se encontraron en pacientes con forma EScl e HAP. Dichos autores señalan que la afección vascular pulmonar se puede desarrollar sin activación de las CE, como reflejan los valores normales de E-selectina y VCAM-1 en pacientes con EScl e HAP. Por el contrario, las cifras de las tres moléculas estaban elevadas en pacientes con afección renal independientemente del tipo de afección cutánea.

Recientemente, mediante la técnica de inmunoblot cuantitativo, comparó las reactividades de los AACE de los pacientes con EScl y anticuerpos anticentrómero (AAC), que tienen mayor riesgo de desarrollar HAP, y de los pacientes con EScl con anticuerpos antitopoisomerasa (AAT1) y sin AAT1 ni AAC, que tienen mayor riesgo de desarrollar fibrosis pulmonar. Los resultados evidenciaron que las IgG y las IgM de los pacientes con EScl y EScl con o sin anticuerpos antitopoisomerasa 1 expresan patrones de reactividad a antígenos tisulares humanos y de CE específicos y excluyentes entre sí. Las IgG de los pacientes con AAT1 se unían fuertemente a una banda proteínica de

100 kDa en extractos proteínicos de HUVEC, HMVEC-d y HMVEC-l y con menor intensidad a extractos de pulmón, riñón y esófago. Del mismo modo, las IgG del 50% de los pacientes sin AAT1 ni AAC reaccionaban con la misma banda proteínica, mientras que las IgG de los pacientes con AAC y de los controles no lo hacían. Dado que las HUVEC son CE que pertenecen a la macrocirculación y en la ES se afectan principalmente las CE de la microcirculación, se investigó el repertorio de anticuerpos de los mismos pacientes contra extractos proteínicos de dos tipos de CE de microcirculación: HMVEC-d y HMVEC-l. Se escogieron HMVEC-l porque los pacientes con EScl pueden desarrollar HAP y los pacientes con EScl desarrollan a menudo fibrosis pulmonar, y las HMVEC-d como control, ya que la piel se afecta en los dos tipos de ES, aunque varíe el grado de extensión. Los resultados obtenidos mostraron que las reactividades de las IgG de los pacientes con EScl a CE de microcirculación y macrocirculación son diferentes, mientras que no se observaron diferencias entre las reactividades de los pacientes con EScl a HUVEC, HMVEC-d y HMVEC-l. De tal manera que las IgG de los pacientes con AAC reaccionaban específicamente con una banda proteínica de 80 kDa en los 2 extractos de CE de microcirculación realizados. Por este motivo, se cree que el o los antígenos reconocidos por las IgG de los pacientes con EScl son los mismos tanto en las CE de microcirculación como en las de macrocirculación, mientras que el o los antígenos reconocidos por las IgG de los pacientes con EScl son específicos de la microcirculación²⁹. Estos resultados respaldan la clasificación de los AACE en función del tipo de antígeno diana de la CE, recientemente propuesta por Praprotnik³⁰.

Este estudio es el primero que evidencia que los AACE de tipo IgG van dirigidos contra la ADN topoisomerasa 1 en pacientes con EScl. Este hecho no sólo fue observado en pacientes con AAT1 determinados por inmunodifusión y ELISA, sino que las IgG del 50% de los pacientes con EScl sin AAT1 ni AAC también se unía a la misma banda proteínica de 100 kDa. Por ello creen que los epítomos de la topoisomerasa reconocidos por los anticuerpos de estos pacientes son detectados por inmunoblot pero no por inmunodifusión (ID) ni ELISA. De este modo el inmunoblot debe ser más sensible para detectar AAT1 que el ELISA o doble inmunodifusión (DID)²⁹.

Hill et al³¹ encontraron que el 85% de los pacientes con ES tenían anticuerpos antimembrana de HUVEC y de ellos, el 100% de los que padecían una EScl. Dichos anticuerpos estaban formados por un grupo heterogéneo, pero uno de ellos estaba dirigido contra una proteína de 19 kDa que poseía actividad anticentrómero. Sin embargo, las 2 bandas de reactividad de las IgG identificadas en los pacientes con EScl del grupo francés correspondían a proteínas de pesos moleculares más altos (60-80 kDa), como posteriormente se confirmaría en un segundo estudio^{29,32}. En dicho estudio se encontró que los sueros de los pacientes con EScl reconocían al menos una de las 2 bandas de 75 y 85 kDa que no aparecían en los sujetos sanos ni en los pacientes con EScl y evidenciaron que los AACE de tipo IgG iban dirigidos contra la proteína centromérica B (CENP-B)³².

Chanseaud et al³³, usando la misma técnica de inmunoblot cuantitativo en pacientes con vasculitis de mediano y pequeño vaso, demostraron que las IgM y en menor grado las IgG de pacientes con poliangeítis microscópica, pero no aquellas de pacientes con granulomatosis de Wegener, panarteritis nudosa, síndrome de Churg-Strauss, reconocían específicamente múltiples antígenos de CE, diferentes de los observados en el caso de los pacientes con EScl y EScl.

Se ha evidenciado que las IgG con actividad anti-U1-RNP de pacientes con enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC) se unen a antígenos de CE de 68, 48, 43, 38, 33, 29, 28 y 24 kDa. Algunos de esos antígenos corresponden a componentes del U1-RNP, mientras que otros no han sido identificados³⁴. Los autores sugieren que la unión de estos

anticuerpos a las CE de la arteria pulmonar puede ser uno de los desencadenantes del proceso inflamatorio en la EMTC. Es posible que el papel de los AACE dirigidos contra antígenos específicos de las HMVEC-1 identificados hasta ahora esté en relación con la aparición de HAP en pacientes con EScl, pero este aspecto queda aún por demostrar. Recientemente Tamby et al³⁵, mediante la técnica de inmunoblot cuantitativo, compararon los perfiles de reactividad de los pacientes con HAP idiopática (HAPI) con los de los pacientes con EScl asociada o no a HAP y con EScl no asociada a HAP en CE de macrocirculación y microcirculación. Objetivaron que las IgG de los pacientes con HAPI expresan patrones de reactividad específicos frente a extractos proteínicos de HUVEC y de HMVEC y en menor grado frente a antígenos de HMVEC-1 y Hep-2, mientras que las de pacientes con EScl tanto sin HAP como con ella se unen a proteínas de HMVEC-d, HMVEC-1 y Hep2, pero no de HUVEC.

Son muy pocos los trabajos realizados hasta el momento que estudien los antígenos específicos del endotelio. El único estudio de análisis proteómico en el endotelio se ha efectuado en HUVEC y ha identificado 53 proteínas³⁶.

Todos estos resultados deben alentarnos y animar a realizar más experimentos para esclarecer el papel que desempeñan los AACE en la patogenia de la ES e identificar los antígenos implicados con el análisis proteómico. Todo ello con el objetivo final de identificar un factor pronóstico de daño endotelial, que nos permita detectar precozmente a los pacientes con mayor riesgo de desarrollar complicaciones vasculares y, por lo tanto, beneficiarlos de un tratamiento precoz

Bibliografía

1. Scherer PE, Lewis RY, Volonte D, Engelman JA, Galbiati F, Couet J, et al. Cell-type and tissue-specific expression of caveolin. *J Biol Chem.* 1997;272:29337-46.
2. Tanaka Y, Adams DH, Shaw S. Proteoglycans on endothelial cells present adhesion-inducing cytokines to leukocytes. *Immunol Today.* 1993;14:111-5.
3. Iozzo RV, Murdoch AD. Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *FASEB J.* 1996;10:598-614.
4. Bicknell R. Introduction to the endothelial cell. En: Bicknell R, editor. *Handbook in practical animal cell biology. Endothelial cell culture.* Cambridge: Oxford University Press; 1996. p. 1-76.
5. Ruszczak Z. Human skin microvascular endothelial cell. En: Bicknell R, editor. *Handbook in practical animal cell biology. Endothelial cell culture.* Cambridge: Oxford University Press; 1996. p. 77-91.
6. Carley WW. Lung microvascular endothelial cells. En: Bicknell R, editor. *Handbook in practical animal cell biology.*



- Endothelial cell culture. Cambridge: Oxford University Press; 1996. p. 7-23.
7. Chang TM, Cheng IKP. Identification of endothelial cell membrane proteins that bind anti-DNA antibodies from patients with systemic lupus erythematosus by direct or indirect mechanisms. *J Autoimmunity*. 1997;10:433-9.
 8. Del Papa N, Meroni PL, Tincani A, Harris EN, Pierangeli SS, Barcellini W. Relationship between anti-phospholipid and anti-endothelial cell antibodies: further characterization of the reactivity on resting and cytokine-activated endothelial cell. *Clin Exp Rheumatol*. 1992b;10:37-42.
 9. Savage CO, Pottinger BE, Gaskin G, Lockwood CM, Pusey CD, Pearson JD. Vascular damage in Wegener's granulomatosis and microscopic polyarteritis: presence of anti-endothelial cell antibodies and their relation to anti-neutrophil cytoplasm antibodies. *Clin Exp Immunol*. 1991;85:14-9.
 10. Lee KH, Chung HS, Kim HS, Oh SH, Ha MK, Baik JH, et al. Human alpha-enolase from endothelial cells as a target antigen of anti-endothelial cell antibody in Behcet's disease. *Arthritis Rheum*. 2003;48:2025-35.
 11. McCrae KR, DeMichele A, Samuels P, Roth D, Kuo A, Meng QH, et al. Detection of endothelial cell-reactive immunoglobulin in patients with anti-phospholipid antibodies. *Br J Haematol*. 1991;79:595-605.
 12. Salojin KV, Le Tonqueze M, Saraux A, Nasonov EL, Dueymes M, Piette JC, et al. Antiendothelial cell antibodies: useful markers of systemic sclerosis. *Am J Med*. 1997;102:178-85.
 13. Blank M, Krause I, Goldkorn T, Praprotnik S, Livneh A, Langevitz P, et al. Monoclonal anti-endothelial cell antibodies from a patient with Takayasu arteritis activate endothelial cells from large vessels. *Arthritis Rheum*. 1999;42:1421-32.
 14. Yazici ZA, Behrendt M, Cooper D, Goodfield M, Partridge L, Lindsey NJ. The identification of endothelial cell autoantigens. *J Autoimmun*. 2000;15:41-9.
 15. Ronda N, Leonardi S, Orlandini G, Gatti R, Bellosa S, Bernini F, et al. Natural anti-endothelial cell antibodies (AECA). *J Autoimmun*. 1999;13:121-7.
 16. Direskeneli H, D'Cruz D, Khamashta MA, Hughes GR. Autoantibodies against endothelial cells, extracellular matrix, and human collagen type IV in patients with systemic vasculitis. *Clin Immunol Immunopathol*. 1994;70:206-10.
 17. Hill MB, Phipps JL, Cartwright RJ, Milford Ward A, Greaves M, Hughes P. Further characterization of anti-endothelial cell antibodies in systemic lupus erythematosus by controlled immunoblotting. *Clin Exp Immunol*. 1996;106:491-7.
 18. Ihn H, Sato S, Fujimoto M, Igarashi A, Yazawa N, Kubo M, et al. Characterization of autoantibodies to endothelial cells in systemic sclerosis (SSc) association with pulmonary fibrosis. *Clin Exp Immunol*. 2000;119:203-9.
 19. Negi VS, Tripathy NK, Misra R, Nityanand S. Antiendothelial cell antibodies in scleroderma correlate with severe digital ischemia and pulmonary arterial hypertension. *J Rheumatol*. 1998;25:462-6.
 20. Renaudineau Y, Revelen R, Levy Y, Salojin K, Gilburg B, Shoenfeld Y. Anti-endothelial cell antibodies insystemic sclerosis. *Clin Diag Lab Immunol*. 1999;6:156-60.
 21. Renaudineau Y, Grunebaum E, Krause I, Paprotnik S, Revelen R, Youinou P, et al. Anti-endothelial cell antibodies (AECA) in systemic sclerosis increased sensitivity using different endothelial cell substrates and association with other autoantibodies. *Autoimmunity*. 2001;33:171-9.
 22. Sakly N, Mirshahi P, Soria J, Ghedira I, Mirshahi M. Anti-endothelial cell antibodies determination by cyto-ELISA: a comparative study between three cell types used as substrates. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1050:201-9.
 23. Rosenbaum J, Pottinger BE, Woo P, Black CM, Loizou S, Byron MA, et al. Measurement and characterisation of circulating anti-endothelial cell IgG in connective tissue diseases. *Clin Exp Immunol*. 1988;72:450-6.
 24. Sgonc R, Gruschwitz MS, Dietrich H, Rechels H, Gershwin ME, Wick G. Endothelial cell apoptosis is a primary pathogenetic event underlying skin lesions in avian and human scleroderma. *J Clin Invest*. 1996;98:785-92.
 25. Sgonc R, Gruschwitz MS, Boeck G, Sepp N, Gruber J, Wick G. Endothelial cell apoptosis in systemic sclerosis is induced by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity via CD95. *Arthritis Rheum*. 2000;43:2550-62.
 26. Worda M, Sgonc R, Dietrich H, Niederegger H, Sundick RS, Gershwin ME, et al. In vivo analysis of the apoptosis-inducing effect of anti-endothelial cell antibodies in systemic sclerosis by the chorionallantoic membrane assay. *Arthritis Rheum*. 2003;48:2605-14.
 27. Carvalho D, Savage COS, Black CM, Pearson JD. IgG antiendothelial cell autoantibodies from scleroderma patients induce leukocyte adhesion to human vascular endothelial cells in vitro. Induction of adhesion molecule expression and involvement of endothelium-derived cytokines. *J Clin Invest*. 1996;97:111-9.
 28. Stratton RJ, Coghlan JG, Pearson JD, Burns A, Sweny P, Abraham DJ, et al. Different patterns of endothelial cell activation in renal and pulmonary vascular disease in scleroderma. *QJM*. 1998;91:561-6.
 29. García De La Peña-Lefebvre P, Chanseaud Y, Tamby MC, Reinbolt J, Batteux F, Allanore Y, et al. IgG reactivity with a 100-kDa tissue and endothelial cell antigen identified as topoisomerase 1 distinguishes between limited and diffuse systemic sclerosis patients. *Clin Immunol*. 2004;111:241-51.
 30. Praprotnik S, Blank M, Meroni PL, Rozman B, Eldor A, Shoenfeld Y. Classification of anti-endothelial cell antibodies into antibodies against microvascular and macrovascular endothelial cells: the pathogenic and diagnostic implications. *Arthritis Rheum*. 2001;44:1484-94.
 31. Hill MB, Phipps JL, Cartwright RJ, Milford Ward A, Greaves M, Hughes P. Antibodies to membranes of endothelial cells and fibroblasts in scleroderma. *Clin Exp Immunol*. 1996;106:491-7.
 32. Servettaz A, Tamby MC, Guilpain P, Reinbolt J, Garcia de la Pena-Lefebvre P, Allanore, et al. Anti-endothelial cell antibodies from patients with limited cutaneous systemic sclerosis bind to centromeric protein B (CENP-B). *Clin Immunol*. 2006;120:212-9.
 33. Chanseaud Y, García de la Peña-Lefebvre P, Mahr A, Guillevin L, Uzan M, Boissier MC, et al. IgM and IgG autoantibodies from patients with microscopic polyangiitis but not from patients with other small and medium sized vessels vasculitis specifically recognize multiple endothelial cell antigens. *Clin Immunol*. 2003;109:165-78.
 34. Okawa-Takatsuji M, Aotsuka S, Fujinami M, Uwatoko S, Kinoshita M, Sumiya M. Endothelial cell-binding activity of anti-U1-ribonucleoprotein antibodies in patients with connective tissue diseases. *Clin Exp Immunol*. 2001;126:345-54.
 35. Tamby MC, Chanseaud Y, Humbert M, Fermanian J, Guilpain P, Garcia-de-la-Pena-Lefebvre P, et al. Anti-endothelial cell antibodies in idiopathic and systemic sclerosis associated pulmonary arterial hypertension. *Thorax*. 2005;60:765-72.
 36. Bruneel A, Labas V, Mailloux A, Sharma S, Vinh J, Vaubour-dolle M, et al. Proteomic study of human umbilical vein endothelial cells in culture. *Proteomics*. 2003;3:714-23.