

**UNIVERSIDAD DE MÁLAGA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Departamento de Fisiología Humana, Histología Humana, Anatomía  
Patológica y Educación Física Deportiva**



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

**TESIS DOCTORAL**  
**MECANISMOS BIOLÓGICOS DE LA**  
**ENFERMEDAD INTERSTICIAL PULMONAR**  
**DIFUSA. VALORACIÓN DE MEDIADORES**  
**PROFIBRÓTICOS COMO POTENCIALES**  
**BIOMARCADORES**

**Programa de Doctorado en Biomedicina, Investigación  
Traslacional y Nuevas Tecnologías en Salud**

**LIDIA LÓPEZ LÓPEZ**

**DIRECTORAS:**

**MARIA INMACULADA GARCÍA FERNÁNDEZ**

**ELISA MARTÍN MONTAÑEZ**

**MÁLAGA, 2020**





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

AUTOR: Lidia López López

 <http://orcid.org/0000-0001-9629-4119>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): [riuma.uma.es](http://riuma.uma.es)





## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña LIDIA LÓPEZ LÓPEZ

Estudiante del programa de doctorado BIOMEDICINA INVESTIGACION TRASLACIONAL Y NUEVAS TECNOLOGÍAS EN SALUD de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: MECANISMOS BIOLÓGICOS DE LA ENFERMEDAD INTERSTICIAL PULMONAR DIFUSA. VALORACIÓN DE MEDIADORES PROFIBRÓTICOS COMO POTENCIALES BIOMARCADORES.

Realizada bajo la tutorización de MARIA INMACULADA GARCÍA FERNÁNDEZ y dirección de MARIA INMACULADA GARCÍA FERNÁNDEZ Y ELISA MARTÍN MONTAÑEZ (si tuviera varios directores deberá hacer constar el nombre de todos)

DECLARO QUE:

La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo.

Igualmente asumo, ante a la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse en caso de plagio de contenidos en la tesis presentada, conforme al ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a 22 de FEBRERO de 2021

Fdo.: LIDIA LÓPEZ LÓPEZ



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

**Dña. María Inmaculada García Fernández**, Profesora Titular de Fisiología de la Universidad de Málaga y **Dña. Elisa Martín Montañez**, Profesora Titular de Farmacología de la Universidad de Málaga,

INFORMAN

Que el trabajo de investigación que presenta **Dña. Lidia López López**, titulado “Mecanismos biológicos de la enfermedad intersticial pulmonar difusa. Valoración de mediadores profibróticos como potenciales biomarcadores” ha sido realizado bajo nuestra dirección y consideramos que tiene el contenido y rigor científico necesarios para ser sometido al superior juicio de la comisión que nombre la Universidad de Málaga para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes y surta los efectos oportunos, firmamos el presente documento en Málaga, a 22 de febrero de 2021

Fdo: Dra. María Inmaculada García Fernández

Fdo: Dra. Elisa Martín Montañez



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

*No tengáis miedo. No os conforméis con la mediocridad. Remad mar adentro  
y echad vuestras redes para pescar*

**San Juan Pablo II**

*Nada es imposible, sólo matemáticamente improbable*

**Los vengadores, 1998**



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# AGRADECIMIENTOS

A las Dras. M<sup>a</sup> Victoria Hidalgo y Concepción Parrado Romero, que concibieron en origen este proyecto y generosamente nos embarcaron en él.

A mis directoras de tesis, las Dras. María Inmaculada García y Elisa Martín, por su dedicación sin horarios, su infinita paciencia, la ayuda incondicional prestada y el ánimo constante que me han infundido para que esta tesis viera la luz. Gracias de corazón.

A la Dra. Francisca Rius, por su colaboración en el análisis estadístico.

Al servicio de Neumología del Hospital Virgen de la Victoria (Málaga), donde inicié mi formación en esta maravillosa especialidad y los cuales acogieron este proyecto poniendo a mi alcance los medios y ayuda necesarios. En especial, al Dr. José Luis Velasco por introducirme en el mundo de la investigación y a la Dra. Eva Cabrera, ejemplo de entusiasmo y entrega, compañera indispensable en esta tesis.

A las grandes mujeres que me rodean en esta profesión y han sido modelo e inspiración en mi trabajo, entre ellas las Dras. M<sup>a</sup> Carmen Fernández e Isabel Utrabo.

A mi familia, en especial mis padres y mi hermano, que me han enseñado el valor del esfuerzo y la importancia de hacer todo con amor y dedicación. A Fran, por su apoyo en cada aventura que emprendo y el regalo que supone tenerlo como compañero de vida.

A todos los pacientes que formaron parte del estudio, por el gran esfuerzo que hicieron para colaborar, y a los familiares que les animaron a hacerlo y cuidan con entrega y generosidad.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN TESIS</b>	<b>5</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
Definición	7
Epidemiología	7
Clasificación y etiología	8
Clínica	10
Diagnóstico	11
Tipos de enfermedad pulmonar intersticial (EPID)	17
Fibrosis pulmonar idiopática (FPI)	17
Neumonía Intersticial No Específica (NINE)	18
Asociada a enfermedades del tejido conectivo (EPID-CTD)	19
Patogenia	20
Mediadores celulares en fibrosis	22
Proteínas del surfactante	23
Eje autotaxina/ ácido lisofosfatídico y fibrosis pulmonar	24
Factor de crecimiento transformante beta y fibrosis pulmonar	28
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
Objetivo principal	34
Objetivos secundarios	34
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>35</b>
Población de estudio	35
Determinación en suero de marcadores celulares profibróticos	37
Determinación de niveles de proteína surfactante A y D (SP-A y SP-D)	39
Determinación de niveles de receptores de ácido lisofosfatídico (RLPA <sub>1</sub> )	39
Determinación de niveles de ácido lisofosfatídico (LPA)	39
Determinación de niveles de autotaxina (ATX)	40
Determinación de niveles de factor de crecimiento transformante beta (TGF- beta)	40
Análisis estadístico	40

<b>4. RESULTADOS</b>	<b>43</b>
<b>4.1. Características clínicas</b>	<b>43</b>
4.1.1. Variables epidemiológicas	43
4.1.2. Variables clínicas	45
Parámetros de exploración	45
Parámetros de función respiratoria	45
Patrón radiológico	46
Tratamiento	47
<b>4.2. Factores solubles profibróticos</b>	<b>47</b>
4.2.1. SP-A y SP-D: diferencias entre enfermos de EPID y voluntarios sanos	47
4.2.2. Sistema LPA: diferencias entre enfermos de EPID y voluntarios sanos	49
4.2.3. Autotaxina: diferencias entre enfermos de EPID y voluntarios sanos	51
4.2.4. TGF-beta: diferencias entre enfermos de EPID y voluntarios sanos	52
4.2.5. Balance final entre los productos resultados de TGF-beta/ LPA: diferencias entre enfermos de EPID y sanos	53
<b>4.3. Análisis de curvas ROC para diferenciar pacientes con EPID (FPI y EPID-CTD) respecto a voluntarios sanos</b>	<b>53</b>
4.3.1. Curva ROC para SP-A y SP-D	54
4.3.2. Curva ROC para sistema LPA	54
4.3.3. Curva ROC para ATX	55
4.3.4. Curva ROC para TGF-beta	56
4.3.5. Curva ROC para balance TGF-beta/ LPA	56
<b>4.4. Relación entre los biomarcadores séricos y la clínica de los pacientes con EPID</b>	<b>56</b>
4.4.1. Factores séricos y función pulmonar	57
4.4.2. Factores séricos y evolución de la enfermedad	59
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>61</b>
<b>5.1. Generalidades</b>	<b>61</b>
<b>5.2. Niveles de SP: aumento de SP-A en pacientes con EPID</b>	<b>63</b>
<b>5.3. Sistema LPA: niveles de LPA y RLPA<sub>1</sub> aumentados en pacientes con EPID</b>	<b>66</b>

5.4. Niveles de ATX elevados en pacientes con EPID	67
5.5. Niveles de TGF-beta aumentados en pacientes con EPID	68
5.6. Cociente TGF-beta/ LPA elevado en pacientes con EPID	70
5.7. Posibles biomarcadores de EPID: TGF-beta, LPA y cociente TGF-beta/ LPA	70
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>75</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>77</b>
<b>8. ANEXOS</b>	<b>87</b>
Certificado comité de ética	87
Hoja de información al paciente. Consentimiento informado	89
Hoja de recogida de datos	93
Publicaciones aval	95
Trabajos relacionados con la tesis	101



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# ABREVIATURAS

ACAs: Anticuerpos AntiCentrómero

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AECs: Alveolar Epithelial Cells (Células Epiteliales Alveolares)

ALAT: Asociación LatinoAmericana del Tórax

ANAs: Anticuerpos AntiNucleares

ANCAs: Anticuerpos Anticitoplasma de Neutrófilos

AUC: Area Under Curve (Área Bajo la Curva)

ATS: American Thorax Society

ATX: Autotaxina

BIR-EPID: Bronquiolitis Respiratoria con Enfermedad Pulmonar Intersticial Difusa

BLM: Bleomicina

BTB: Biopsia TransBronquial

CD20: Cluster of Differentiation 20 (grupo de diferenciación 20)

CCL18: C-C Motif Chemokine Ligand 18

CTGF: Connective Tissue Growth Factor (Factor de Crecimiento de Tejido Conectivo)

Curva ROC: Receiver Operating Characteristic (Curva Característica Operativa del Receptor)

CV: Coeficiente de Variación

CVT: Cirugía VideoToracoscópica

DLCO: Diffusion Lung Capacity for Carbon Monoxide (Capacidad de Difusión Pulmonar del Monóxido de Carbono).

DO: Densidad Óptica

ECM: Extracellular Matrix (Matriz Extracelular)

EDTA: Ácido Etileno Diamina Tetra-acético

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas)

EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition (Transición Epitelio-Mesenquimatoso)

ENAs: Anticuerpos Anti-Antígenos Extraíbles de Núcleo

EPID: Enfermedad Pulmonar Intersticial Difusa

EPID-CTD: EPID Asociada a Conectivopatías

EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

ERS: European Respiratory Society

ESM: Error Standard de la Media

ETC: Enfermedades del Tejido Conectivo

FEV1: Forced Expiratory Volume in 1 Second (Volumen Espiratorio Forzado en el Primer Segundo)

FEPPI: Fibroelastosis Pleuroparenquimatoso Idiopático

FPI: Fibrosis Pulmonar Idiopático

FVC: Forced Vital Capacity (Capacidad Vital Forzada)

GCL: Grandes Complejos Latentes

GPR87: Receptor 87 acoplado a proteína G

HRP: Horseradish Peroxidase (Peroxidasa de Rábano Picante)

HTAP: Hipertensión Arterial Pulmonar

IGBPs: Insulin-like Growth Factor Binding Proteins (Proteínas de unión al factor de crecimiento similar a insulina)

IL-8: Interleucina 8

JRS: Japanese Respiratory Society

LBA: Lavado BroncoAlveolar

LCAT: Lecitina Colesterol Acil Transferasa

LDH: Lactato Deshidrogenasa sérica

LLSS: Lóbulos Superiores

LP: Lisofosfolípido

LPA: Ácido Lisofosfatídico

MMP-1: Metaloproteinasa de la Matriz 2

MMP-2: Metaloproteinasa de la Matriz 2

MMP-7: Metaloproteinasa de la Matriz 7

MMP-9: Metaloproteinasa de la Matriz 9

NIA: Neumonía Intersticial Aguda

NID: Neumonía Intersticial Descamativa

NIL: Neumonía Intersticial Linfoide

NINE: Neumonía Intersticial No Específica

NIU: Neumonía Intersticial Usual

NOC: Neumonía Organizada Criptogenética

NYHA: New York Heart Association

OMS: Organización Mundial de la Salud

P(A-a)O<sub>2</sub>: gradiente alveolo-arterial de oxígeno

P2Y<sub>10</sub>: Miembro 10 de la familia de receptores P2Y

PAL: Péptido Asociado a Latencia

PCL: Pequeños Complejos Latentes

PDGF: Platelet-derived Growth Factor (Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas)

PFR: Pruebas de Función Respiratoria

PPAR $\gamma$ : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (receptor gamma del proliferador activado de peroxisoma)

RAGE (o AGER): Receptor for Advanced Glycation End Products (Receptor para Productos Finales de la Glicación Avanzada)

RLPA: Receptor de LPA

SAHS: Síndrome de Apneas-Hipopneas del Sueño

SEPAR: Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica

SP-A: Surfactant Protein- A (proteína del surfactante A)

SP-D : Surfactant Protein- D (proteína del surfactante D)

TACAR: Tomografía Axial Computerizada de Alta Resolución

TGF-beta: Transforming Growth Factor Beta (Factor de Crecimiento Transformante Beta)

TIMP: Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (Inhibidores Tisulares de Metaloproteinasas)

TMB: Tetrametilbenzidina

TLCO: Transfer Factor for Lung Carbon Monoxide (Capacidad de Transferencia Pulmonar del Monóxido de Carbono).

V/Q: Ventilación/ Perfusión

El trabajo presentado en esta tesis doctoral sobre biomarcadores profibróticos en la enfermedad pulmonar intersticial difusa, forma parte de un proyecto de investigación principal denominado *Biomarcadores en enfermedad pulmonar intersticial difusa*, el cual ha dado lugar previamente a la tesis doctoral titulada *Biomarcadores en las enfermedades pulmonares intersticiales difusas* (1) defendida en el año 2017. La presente tesis doctoral es por tanto un estudio complementario a la anterior tesis, con la que comparte la población y las muestras analizadas.

## RESUMEN TESIS

Las enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID) conforman un grupo heterogéneo de patologías que afectan de forma predominante al parénquima pulmonar compartiendo similares características etiopatogénicas, clínicas, radiológicas y funcionales, lo que hace compleja su clasificación, la cual se encuentra en constante actualización y revisión para un correcto diagnóstico. En las últimas décadas se han publicado estudios que han ayudado a entender mejor los procesos moleculares involucrados en las EPID, especialmente en fibrosis pulmonar idiopática, sin embargo, ninguno de ellos ha podido explicar totalmente los complejos mecanismos inherentes a esta patología ni encontrar moléculas o marcadores que definitivamente la identifiquen y permitan un seguimiento de los pacientes. La fibrosis, característica de estos procesos, se asocia a una alteración en la matriz extracelular (ECM), lo que sugiere que los factores implicados en su remodelación y la reparación del daño tisular podrían considerarse biomarcadores para la EPID. Estos marcadores mejorarían en gran medida el diagnóstico y el seguimiento de los pacientes mediante técnicas menos invasivas, más fáciles de realizar y de menor coste de las que actualmente se disponen. Sería igualmente deseable que estos marcadores ayudasen a establecer y monitorizar estrategias terapéuticas en las entidades patológicas incluidas en las EPID.

En este trabajo se realizó un estudio unicéntrico consistente en la medición de los niveles en suero de mediadores profibróticos en pacientes diagnosticados de EPID en el servicio de Neumología del Hospital Universitario Virgen de la Victoria, comparado con los niveles encontrados en voluntarios sanos. Su objetivo fue determinar la validez de estos mediadores implicados en la remodelación de la ECM como biomarcadores para EPID.

Los niveles de SP-A, SP-D, LPA, RLPA1, ATX y TGF-beta en suero se llevó a cabo a través de ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas, o técnica ELISA, cuantitativos tipo sándwich. Se realizaron cálculos estadísticos de tendencia central y de dispersión para variables cuantitativas, y se expresó la frecuencia absoluta y el porcentaje para variables cualitativas. Para identificar el poder discriminatorio de los diferentes mediadores se aplicaron curvas ROC y el índice de Youden para determinar el mejor punto de corte para el diagnóstico. Se requirió una significancia del 5% ( $p < 0,05$ ) para considerar una diferencia estadísticamente significativa.

Los valores séricos de los factores estudiados en los pacientes con EPID, se encuentran aumentados al compararlos con los valores encontrados en individuos sanos, con la excepción de SP-D. Los análisis de las curvas ROC permiten considerar a TGF-beta, LPA y su cociente como potenciales biomarcadores diagnósticos para esta enfermedad. Además, la modificación en los niveles séricos de estos dos biomarcadores podría también ayudar a la elección de un determinado tratamiento dirigido y/o a la monitorización de su respuesta, principalmente en el contexto de las nuevas terapias antifibróticas relacionadas con la inhibición del eje ATX/ LPA y TGF-beta.

# 1. INTRODUCCIÓN

## DEFINICIÓN

Las enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID) conforman un grupo heterogéneo de patologías que afectan de forma predominante al parénquima pulmonar (2). Donde aparece el daño en primer lugar es en el intersticio, comprendiendo éste el espacio entre el epitelio y la membrana basal del endotelio. Las alteraciones presentes se caracterizan por una infiltración de materia tanto celular como no celular a nivel del parénquima pulmonar y puede afectar también a los espacios alveolares, endotelio capilar y vías aéreas distales (3). Las EPID comparten similares características etiopatogénicas, clínicas, radiológicas y funcionales, lo que hace compleja su clasificación, que se encuentra en constante actualización y revisión para un correcto diagnóstico (4).

## EPIDEMIOLOGÍA

Los datos epidemiológicos son escasos dadas las dificultades para obtener un diagnóstico específico en estas patologías poco frecuentes (5). Hay registros realizados en diversos países europeos, recogidos en publicaciones de la *European Respiratory Society* (ERS), entre ellos España. En muchos casos estos registros no son representativos de la población real de pacientes o de la incidencia y prevalencia globales, pero permiten comparar frecuencias relativas entre las diferentes EPID. Las más frecuentes son la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) y la sarcoidosis, que comprenden aproximadamente el 50% de la patología.

La tasa de prevalencia de las EPID en España es de 8,5 casos/100.000 habitantes. La *Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica* (SEPAR) realizó un registro entre los años 2000-01, con un posterior estudio (Grupo EPID) en 2004, siendo la patología más frecuente la FPI con una incidencia de 1,6 casos/100.000 habitantes/año. A nivel

autonómico, el estudio REINA realizado en Andalucía entre los años 1998-2000 estimó la incidencia de EPID en 7,2 casos/100.000 habitantes/año (6) (7).

En cuanto a la distribución por edad y sexo, la FPI y las neumopatías inducidas por fármacos tienen una mayor prevalencia en sujetos de edad avanzada (8). La sarcoidosis predomina en adultos jóvenes de ambos sexos y mujeres de mediana edad. La FPI, la alveolitis por hipersensibilidad y las neumoconiosis son más frecuentes en hombres, mientras que la sarcoidosis y las asociadas a conectivopatías lo son en mujeres (9).

La información disponible en lo referente a la mortalidad en las EPID es bastante deficiente y limitada debido a diversos motivos, entre ellos las diversas clasificaciones usadas en las bases de datos, la poca exactitud de los datos de incidencia y prevalencia de las patologías o la falta de información en cuanto a la contribución directa de las EPID en el fallecimiento de los pacientes (8). En los datos disponibles por parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS), España se encuentra dentro del grupo de países con una tasa de mortalidad estandarizada por edad debida a EPID mayor al 2,5/100.000 habitantes (9), siendo la FPI y otras formas de alveolitis fibrosante las de mayor mortalidad.

## CLASIFICACIÓN Y ETIOLOGÍA

La clasificación de las EPID vigente actualmente se basa en los consensos elaborados por la *American Thoracic Society (ATS)* y la *European Respiratory Society (ERS)* en el año 2002 (10), revisada posteriormente en su actualización del año 2013 (11) con el objetivo de aunar términos y criterios diagnósticos. En este sentido, el *gold standard*, tradicionalmente otorgado al diagnóstico histológico, ha sido reemplazado por un abordaje multidisciplinar, herramienta para una aproximación dinámica e integradora de estas patologías para alcanzar un diagnóstico definitivo.

Esta nueva clasificación divide a las EPID en cuatro grupos (tabla 1) (11): a) de causa conocida o asociada, b) neumopatías intersticiales granulomatosas, c) entidades con histología propia, y d) neumonías intersticiales de causa desconocida o idiopáticas. Siendo

las patologías más importantes la sarcoidosis, la FPI, la alveolitis extrínseca, la enfermedad pulmonar intersticial asociada a colagenopatías, las inducidas por fármacos y las neumoconiosis.

<b>De causa conocida o asociada</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Asociadas a enfermedades del colágeno</li> <li>▪ Neumoconiosis</li> <li>▪ Inducida por fármacos y radioterapia</li> <li>▪ Neumonitis por hipersensibilidad</li> <li>▪ Asociadas a enfermedades hereditarias</li> </ul>
<b>Neumopatías intersticiales granulomatosas</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Sarcoidosis</li> <li>▪ Secundarias a micobacterias u hongos</li> </ul>
<b>Enfermedades con histología propia y otras enfermedades no bien definidas</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Proteinosis alveolar</li> <li>▪ Microlitiasis alveolar</li> <li>▪ Linfangioleiomiomatosis</li> <li>▪ Eosinofilia pulmonares</li> <li>▪ Histiocitosis de células de Langerhans</li> <li>▪ Amiloidosis</li> <li>▪ EPID no clasificada</li> </ul>
<b>Neumonías intersticiales idiopáticas (NII)</b>
<p>PRINCIPALES NII</p> <p><u>Fibrosantes crónicas</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Fibrosis pulmonar idiopática (FPI)</li> <li>▪ Neumonía intersticial no específica (NINE)</li> </ul> <p><u>Relacionadas con el tabaco</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Bronquiolitis respiratoria con enfermedad pulmonar intersticial difusa (BIR-EPID)</li> <li>▪ Neumonía intersticial descamativa (NID)</li> </ul> <p><u>Agudas/ subagudas</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Neumonía organizada criptogénica (NOC)</li> <li>▪ Neumonía intersticial aguda (NIA)</li> </ul> <p>NII RARAS</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Neumonía intersticial linfoide (NIL)</li> <li>▪ Fibroelastosis pleuroparenquimatosa idiopática (FEPI)</li> </ul> <p>NII NO CLASIFICABLES</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Neumonía organizada aguda fibrosante</li> </ul>

Tabla 1: Clasificación de las enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID).

Modificada de Rodríguez Portal et al. (12)

La causa subyacente a la aparición de una EPID es desconocida hasta en el 65% de los pacientes (9). Existe, sin embargo, un aumento de la evidencia en cuanto a la participación de factores exógenos en la patogenia de estas enfermedades. Es el caso de la exposición elevada a metales (cobre, plomo y acero) y polvo de madera, que produce un aumento del riesgo para FPI.

Las existencia de causas exógenas se identifica hasta en el 35% de los pacientes con EPID, sobre todo relacionadas con materia orgánica e inorgánica, reacciones a fármacos e infecciones (9). Actualmente se realizan estudios genéticos centrados en asociaciones entre determinados fenotipos y *loci* genéticos conocidos implicados en procesos de inflamación y fibrogénesis. Probablemente, con los avances relacionados con el mapeo del genoma humano y la genómica funcional, se puedan resolver los interrogantes relacionados con enfermedades complejas como es el caso de la EPID (9).

## CLÍNICA

Son pocos los signos físicos que ayudan a distinguir entre las EPID. Los pacientes suelen referir inicialmente disnea, acompañada de tos y aumento de la misma con el ejercicio (6). A nivel de la exploración física, es frecuente la presencia de crepitantes a la auscultación y acropaquias. Estas últimas son un hallazgo sugerente de FPI (49-66% de los pacientes, con una mayor frecuencia en varones), asbestosis (43%), neumonitis por hipersensibilidad crónica o artritis reumatoide asociada a EPID. Aunque la EPID está presente en el 40% de los pacientes con polimiositis/ dermatomiositis, las acropaquias en este contexto son infrecuentes. Los crepitantes basales tipo “velcro” son característicos de la FPI (90% de los casos) así como en fibrosis pulmonar asociada a enfermedades del colágeno y asbestosis (60%). Los crepitantes son menos frecuentes en sarcoidosis y neumonitis por hipersensibilidad, siendo la auscultación de sibilancias inspiratorias reflejo de procesos de bronquiolitis. Los sibilantes pueden indicar también asma asociado a vasculitis tipo Churg-Strauss o neumonitis eosinófila.

A nivel sistémico hay que prestar especial atención a signos específicos que pueden contribuir al diagnóstico diferencial como son presencia de adenopatías, hepatomegalia, esplenomegalia, uveítis y erupciones cutáneas. La búsqueda de signos físicos de hipertensión pulmonar e insuficiencia ventricular derecha es necesario ya que pueden indicar presencia de hipoxia en FPI o esclerosis sistémica (13).

## DIAGNÓSTICO

Como se ha comentado, el diagnóstico en EPID requiere un abordaje multidisciplinar donde además de la evolución clínica del paciente, se tienen en cuenta diversas pruebas complementarias que se describen a continuación. El proceso diagnóstico incluye:

### **Anamnesis**

En la aproximación a los pacientes con EPID es fundamental la realización de una historia clínica completa que incluya las características de los primeros síntomas (disnea o tos generalmente), su progresión, curso clínico y la presencia de comorbilidades como enfermedades asociadas a tejido conectivo, vasculitis o alteraciones inmunológicas (por ejemplo, infección por virus de la inmunodeficiencia humana). También debería registrarse la exposición ambiental ya sea ocupacional (trabajos en empresas que operan en el sector de las infraestructuras, transporte y servicios a ciudades), por consumo de tóxicos (cocaína, crack, heroína) o de tabaco, haciendo especial hincapié en la fecha y duración de la exposición, así como de la toma de fármacos de forma continuada (amiodarona o nitrofurantoínas como los implicados con mayor frecuencia). Los antecedentes familiares de patología tumoral o enfermedad respiratoria pueden ser relevantes (10).

### **Exploración funcional respiratoria**

El estudio funcional del paciente con EPID es fundamental como prueba complementaria para establecer el diagnóstico, grado de severidad, pronóstico y como marcador evolutivo en el seguimiento del paciente.

Las alteraciones secundarias a EPID comprenden: a) disminución de la distensibilidad pulmonar y volúmenes pulmonares estáticos; b) disminución de la difusión pulmonar; c) desequilibrios en la relación ventilación/ perfusión (V/Q), además de la existencia de un cortocircuito derecha-izquierda; d) disminución del tiempo de tránsito de la sangre que circula en el lecho capilar pulmonar; y e) alteraciones del intercambio gaseoso con hipoxemia e incremento del gradiente alveolo-arterial de oxígeno ( $P(A-a)O_2$ ) (6). Por tanto, la evaluación funcional del paciente con sospecha de EPID deberá incluir espirometría, determinación de la capacidad de difusión pulmonar del monóxido de carbono (TLCO, de sus siglas en inglés *transfer factor for lung carbon monoxide*), volúmenes pulmonares y oximetría (saturación de oxígeno en reposo y con ejercicio).

Los resultados de las pruebas de función respiratoria (PFR) revelarán en estos pacientes un patrón restrictivo con una reducción de la capacidad de difusión. En las etapas iniciales de la EPID, la única alteración manifiesta puede ser una difusión ligeramente reducida. Patrones obstructivos son pocos frecuentes en EPID, pero pueden aparecer en sarcoidosis, neumonitis por hipersensibilidad, silicosis, histiocitosis por células de Langerhans y linfangioleiomiomatosis. En pacientes con una patología pulmonar obstructiva previa (como EPOC o enfisema) pueden presentar un patrón obstructivo, restrictivo o volúmenes pulmonares normales por los efectos opuestos a nivel de la distensibilidad pulmonar. En FPI y presencia de enfisema, los volúmenes pulmonares pueden ser normales, pero la capacidad de difusión es baja y suele acontecer en varones fumadores que sufren mayor grado de disnea y peor pronóstico que si sólo concurriera FPI o enfisema de forma aislada.

La gasometría arterial es un complemento muy útil sobre todo en paciente con deterioro funcional moderado a severo y disnea de esfuerzo significativa (3). En la FPI y la neumonía intersticial no específica (NINE), el nivel de TLCO en el momento del diagnóstico es un factor fiable del pronóstico en comparación con otras variables de función pulmonar en reposo. De este modo, un nivel de TLCO menor del 40% indica un grado avanzado de enfermedad en las neumonías intersticiales idiopáticas. Concretamente en FPI, una caída

mayor del 10% de la capacidad vital forzada (FVC, de sus siglas en inglés *forced vital capacity*) desde la línea basal o de la TLCO mayor del 15% en los primeros 6-12 meses tras el diagnóstico, indica una mayor mortalidad en dichos pacientes.

La presencia de desaturación en el test de marcha de los 6 minutos en el momento del diagnóstico en FPI, es un factor pronóstico muy importante igualmente.

No obstante, se requiere la realización de estudios complementarios para concretar el papel del test de esfuerzo realizado de rutina en el seguimiento de FPI y otras EPID ya que aportan poco a las PFR en reposo en la evaluación de la gravedad de dichas patologías (13).

### **Biomarcadores y análisis de laboratorio**

Numerosas publicaciones hacen referencia a la repercusión del análisis de marcadores séricos en EPID a nivel diagnóstico, pronóstico y de respuesta al tratamiento. Se valoran determinaciones como el número de eosinófilos, lactato deshidrogenasa sérica (LDH), niveles de calcemia y calciuria, creatinquinasa, aldolasa, anticuerpos anti-Jo1, factor reumatoideo, anticuerpo citrulinado, anticuerpos antinucleares (ANAs), anti-antígenos extraíbles de núcleo (ENAs), antitopoisomerasa 1 (Scl 70), anticentrómero (ACA), anticitoplasma de neutrófilos (ANCA) o precipitinas séricas (42). Es decir, mediadores proinflamatorios y profibróticos que se encuentran elevados en suero debido a las alteraciones en la integridad de la membrana alveolo-intersticial. Hay que tener en cuenta que la mayor parte de ellos no son específicos de ninguna EPID y están presentes en otras patologías, por lo que se necesitan urgentemente biomarcadores específicos. Para FPI se han propuesto como biomarcadores proteasas (MMP-1, MMP-7), factores de crecimiento (IGBPs) o quimiocinas (IL-8, CCL18) pero sin llegar a establecerse en la práctica clínica (15). En este sentido, actualmente, se puede considerar como potencial biomarcador para FPI la lisofosfatidilcolina, precursor del ácido lisofosfatídico (LPA) (16).

## Estudio radiológico

La radiografía de tórax sigue siendo hoy en día el método de elección para una primera valoración en paciente con EPID así como para su seguimiento. Su importancia radica en que, hasta en un 90% de los casos, los pacientes presentan alteraciones radiográficas en el momento del diagnóstico y la localización y extensión del patrón intersticial presente orienta el propio diagnóstico. Por ejemplo, la afectación predominante de los campos inferiores es frecuente en FPI, NINE y asbestosis mientras que hay mayor afectación en campos superiores en el caso de la silicosis, sarcoidosis, neumonitis por hipersensibilidad o granulomatosis de células de Langerhans. Generalmente, los patrones presentes en EPID son el vidrio deslustrado, el nodulillar, el reticular, el reticulonodulillar y el panal de abeja (14).

La tomografía axial computerizada de alta resolución (TACAR) torácica es una técnica muy valiosa en la detección de EPID en paciente con radiografía de tórax normal, ya que es más sensible en el estudio del intersticio pulmonar. Junto con la clínica de presentación, las alteraciones a nivel de TACAR son suficientemente características para evitar la necesidad de toma de un lavado broncoalveolar (LBA) o biopsia pulmonar con confirmación histológica. Tal es el caso de la FPI, granulomatosis de células de Langerhans, asbestosis y linfangioleiomiomatosis, donde los hallazgos de la TACAR son considerados criterios diagnósticos. Como valor añadido, esta técnica nos permite seleccionar la localización más adecuada para la realización de un LBA y la toma de biopsias transbronquiales y quirúrgicas. Los hallazgos de fibrosis pulmonar en la TACAR incluyen presencia de reticulación, distorsión del parénquima pulmonar, hallazgo de bronquiectasias y bronquiolectasias de tracción y panalización (5). El valor de la interpretación de la TACAR debe estar respaldado por radiólogos con experiencia en dicha técnica y en el seno de un comité multidisciplinar que además incluya a neumólogos y patólogos (13).

En la tabla 2 se resumen las características radiológicas de las principales EPID.

	<b>Patrones TACAR torácica</b>
FPI	Lesiones en panal Bronquiectasias por tracción Reticulación periférica
Sarcoidosis	Micromódulos periflinfáticos Patrón reticular Predominio en LLSS
Enfermedad del colágeno	Predominio patrón reticular Afectación pleural Bronquiectasias lejos de zonas de panal
Neumonitis por hipersensibilidad	Predominio en LLSS Patrón vidrio deslustrado Nódulos centrolobulillares
Asbestosis	Placas pleurales Engrosamiento pleural
Exposición a fármacos	Predominio patrón reticular sobre panalización Otras EPID concomitantes

*Tabla 2: Características radiológicas de EPID más frecuentes.*

## **Fibrobroncoscopia**

La técnica de la fibrobroncoscopia permite la toma de dos tipos de muestras para estudio histológico en las EPID: el LBA y la biopsia transbronquial (BTB).

Como se acaba de comentar, el LBA no se requiere como necesario para el diagnóstico cuando la clínica y los hallazgos del TACAR son característicos de EPID. Cuando el diagnóstico es incierto, el LBA es orientativo y permite establecer un diagnóstico provisional o diferencial y debe realizarse siempre antes de iniciar un tratamiento. En algunas situaciones, puede evitar la realización de una biopsia pulmonar quirúrgica. Patologías como la neumonitis por hipersensibilidad o la sarcoidosis tienen perfiles celulares en LBA muy característicos, y en la proteinosis alveolar, granulomatosis de células de Langerhans o eosinofilia pulmonares su resultado tiene valor diagnóstico. La realización seriada de LBA no ha demostrado que aporte información relevante en cuanto al pronóstico o respuesta al tratamiento de las EPID. La limitación principal del LBA es principalmente que se extrae de una sola región pulmonar por lo que no es representativo de la afectación difusa de las EPID. Se está valorando el uso de técnicas de proteómica para establecer los

diferentes perfiles de proteínas en LBA que existen en sarcoidosis, FPI y EPID asociada a esclerosis sistémica. En un futuro podrán definirse perfiles específicos para cada EPID (17) (18).

La BTB mediante broncoscopia tiene utilidad en determinadas EPID donde la afectación se produce a nivel peribroncovascular como la sarcoidosis, neumonitis por hipersensibilidad, granulomatosis por células de Langerhans, linfangioleiomiomatosis, amiloidosis, proteinosis alveolar, neumonía organizada, algunas neumoconiosis y eosinofilia pulmonar. No es rentable para el diagnóstico en el caso de las idiopáticas. Su principal limitación, al igual que el LBA, es la escasa representatividad del conjunto de parénquima pulmonar, por lo que una BTB normal no descarta EPID. Durante la técnica, se deben tomar entre 4-6 muestras y, si en las pruebas radiológicas se observan infiltrados pulmonares, su rendimiento se aproxima al 90% (6). En la actualidad se está usando una técnica denominada como “criobiopsia” que consiste en la extracción de muestras de tejido congelado del árbol bronquial a través de una sonda de frío mediante broncoscopia flexible. Al parecer se mejora la rentabilidad en el estudio de las muestras obtenidas por dicho procedimiento y no hay mayores complicaciones en comparación con el método tradicional. La evidencia es aún limitada y se precisan más estudios al respecto (19).

### **Biopsia pulmonar quirúrgica**

En determinados casos donde es imperioso un diagnóstico anatomopatológico preciso, se impone la necesidad de realizar una biopsia pulmonar quirúrgica. Esta técnica se realiza mediante abordaje abierto o toracotomía y abordaje videotoracoscópico, conocido como cirugía videotoracoscópica (CVT) (esta última cada vez más utilizada de elección si el paciente no tiene contraindicación) (5).

Con la ayuda de la realización de un TACAR preoperatorio, se puede decidir cuál es la mejor localización para la toma de la biopsia (zonas que contengan áreas afectadas del parénquima y sanas). No se ha demostrado que existan diferencias entre la toma de una o varias muestras para el aumento de la rentabilidad de la técnica (20).

El proceso puede realizarse bajo anestesia general, regional o local, o bajo sedación. Cada vez es más corta la estancia que requiere el paciente para este tipo de intervención, enmarcándose la técnica dentro de un programa de cirugía mayor ambulatoria en algunos centros.

## TIPOS DE ENFERMEDAD PULMONAR INTERSTICIAL

Este apartado pretende ampliar información referente a las tres EPID principales en las que se centra el presente estudio: fibrosis pulmonar idiopática, neumonía intersticial no específica (NINE) y EPID asociadas a conectivopatías (EPID-CTD).

### **Fibrosis Pulmonar Idiopática**

La FPI se define como una forma específica de neumonía intersticial fibrosante crónica de causa desconocida, que afecta generalmente a adultos mayores, limitada a los pulmones, y asociada al patrón radiológico y/o histológico de la Neumonía Intersticial Usual (NIU) (21). Es la EPID más frecuente y su etiología, aunque desconocida, se cree relacionada con diversas agresiones exógenas sobre una susceptibilidad genética (22).

En España, la incidencia varía entre 4,6-7,4 /100.000 habitantes, y se estima su prevalencia en 20 casos/100.000 habitantes/año en varones y de 13 casos/100.000 habitantes/año en mujeres; sin observarse diferencias significativas de dichas cifras a nivel de Andalucía (7) (8). No se han realizado hasta el momento nuevos estudios en España utilizando los criterios del consenso internacional ATS/ERS/JRS/ALAT del año 2011. En la fecha actual, tampoco se han señalado diferencias epidemiológicas en cuanto a raza o grupo étnico.

Para el diagnóstico de la FPI se requiere: 1) excluir otras EPID de causa conocida o entidades clínicas bien definidas, y 2) patrón histológico de NIU bien en tejido pulmonar obtenido por biopsia quirúrgica, bien por presencia radiológica de dicho patrón en la TACAR o ambas (23)(22).

En general, la supervivencia media es de 2-5 años desde el inicio de los síntomas. La mayor parte de los pacientes presentan un lento y progresivo deterioro clínico y funcional que conduce a una insuficiencia respiratoria crónica (22). Esto explica la importancia de un diagnóstico preciso en el ámbito de una valoración multidisciplinar, un seguimiento acorde con la evolución de cada paciente y la instauración del tratamiento más adecuado en cada caso teniendo en cuenta el estadio clínico del paciente y el posible desarrollo de complicaciones secundarias.

Hasta hace relativamente poco tiempo, se asumía que la FPI no contaba con ningún tratamiento que modificara su pronóstico. En el consenso ATS/ERS de 2011 (23) y, pese a la baja evidencia en cuanto a la eficacia en la mayoría de los casos, las recomendaciones terapéuticas aún incluían el esquema clásico de tratamiento basado en el uso de inmunosupresores (azatioprina o ciclofosfamida), glucocorticoides y n-acetilcisteína. No es hasta la revisión de dicho consenso y actualización en el año 2015 (21) donde aparece la recomendación del uso de los nuevos antifibróticos (pirfenidona- inmunosupresor- y nintedanib- inhibidor directo de la proteínquinasa) así como el tratamiento del reflujo gastroesofágico que se identifica hasta en el 80% de los pacientes con FPI como factor potenciador de la transformación fibrótica pulmonar. Se abre, por tanto, una nueva etapa en el pronóstico y evolución de la enfermedad.

### **Neumonía Intersticial No Específica**

La NINE es una enfermedad pulmonar intersticial crónica caracterizada por la homogeneidad espacial y temporal de la afectación del parénquima pulmonar. Presenta alteraciones anatomopatológicas que no son características de otros tipos de neumonías intersticiales idiopáticas. Inicialmente se englobó bajo el término genérico de FPI, aunque actualmente se sabe que es una entidad totalmente diferenciada (11).

La presentación de la enfermedad es insidiosa o subaguda, con tos y disnea de esfuerzo. El 50% de los pacientes presentan síntomas sistémicos, y el 30%, acropaquias. La NINE puede ser idiopática en el 60% de los casos o estar asociada con los efectos tóxicos de los fármacos, la exposición ocupacional, hipersensibilidad, infecciones, aspiración

crónica, con enfermedades granulomatosas o con la enfermedad pulmonar intersticial crónica.

La histología se extiende como un proceso predominantemente inflamatorio (NINE celular) o con predominio de fibrosis (NINE fibrótica). La radiografía de tórax y la TACAR muestran características inespecíficas, no diagnósticas. En la TACAR la presencia de vidrio deslustrado es la alteración más frecuente. La distribución de las opacidades es a menudo simétrica con afectación de las zonas medias e inferiores. Es rara la presencia de imágenes en panal de abeja (10).

El pronóstico es mejor que en el caso de la FPI. El tratamiento es con corticoides (prednisona o equivalente), por vía oral a la dosis de 1 mg/kg de peso (máximo 80 mg), durante un mes, que se disminuye a razón de 10 mg cada 15 días, hasta 20 mg/día con reducción progresiva posterior. En casos de ausencia de respuesta a los corticoides, se añadirá un inmunosupresor como azatioprina o ciclofosfamida y colchicina (13). Las terapias antifibróticas pueden aportar un valor en el tratamiento de la NINE fibrótica rápidamente progresiva, aunque la evidencia aún es limitada en este sentido (24).

### **Asociada a enfermedades del tejido conectivo**

Las enfermedades del tejido conectivo (ETC) conforman un grupo amplio de patologías inflamatorias con mediación inmunológica, que afectan a múltiples órganos y sistemas, entre ellos el pulmón. La aparición de alteraciones a nivel pulmonar suele acompañarse de un aumento de la morbilidad y mortalidad de estos pacientes.

En líneas generales existen dos escenarios posibles: los pacientes diagnosticados de una ETC que desarrollan EPID (secundarios a extensión de enfermedad, estados de inmunodepresión o reacciones adversas a fármacos) y, por otro lado, los pacientes que son estudiados por una EPID como primera manifestación bajo la que subyace una ETC (aproximadamente en un 15% de las EPID) (25). En pacientes mujeres menores de 50 años y con patrón compatible con NINE, debería considerarse el diagnóstico de ETC.

La artritis reumatoide y la esclerodermia son las dos patologías que con mayor frecuencia se asocian a fibrosis pulmonar (6). La supervivencia es mayor en estos casos de

EPID que en la FPI. Otras conectivopatías que pueden desarrollar afectación pulmonar son el lupus eritematoso sistémico, la polimiositis/ dermatomiositis, síndrome de Sjögren o la enfermedad mixta del tejido conectivo (26).

Para establecer un diagnóstico, se precisa una cuidadosa historia clínica personal y familiar, además de una completa exploración física. Suele precisarse la valoración multidisciplinar junto con reumatólogos, dermatólogos y radiólogos. Dentro de las pruebas complementarias, las determinaciones de autoanticuerpos (ANA, ANCA, factor reumatoide, anti Ro-SSA- contra el antígeno A relacionado con el síndrome de Sjögren, anti La-SSB- contra la proteína La, etc.), la valoración del patrón radiológico mediante TACAR y la toma de biopsia quirúrgica en los casos inciertos, son la base para definir el diagnóstico. Los hallazgos radiológicos en EPID-CTD se caracterizan por el predominio de patrones sugestivos de NINE, neumonía organizada y, ocasionalmente, neumonía intersticial linfoide mientras que en la FPI el patrón característico es el de NIU (25). Mientras que existen varios sistemas de estadificación radiológica en FPI, son escasos los validados en EPID-CTD.

Los tratamientos más frecuentemente utilizados son los glucocorticoides, los inmunosupresores (azatioprina, ciclofosfamida, micofenolato de mofetilo, tacrólimus), metotrexato (antimetabolito análogo del ácido fólico), y agentes biológicos (rituximab - anticuerpo monoclonal hacia el antígeno CD20 de los linfocitos B- e imatinib – inhibidor directo de la proteinquinasa. Actualmente también se ha incorporado el uso como terapia del tocilizumab (inhibidor de la interleucina 6) (27) y, en menor medida, eculizumab y alemtuzumab) (28).

## PATOGENIA

Las EPID representan un conjunto amplio de entidades clinicopatológicas que comparten la afectación del intersticio pulmonar, pero se diferencian en los mecanismos celulares y moleculares implicados en su patogenia.

Los hallazgos patológicos en la fibrosis pulmonar son secundarios a un cúmulo excesivo de la matriz extracelular (ECM, de sus siglas en inglés *extracellular matrix*) y un remodelado anormal de la arquitectura pulmonar. En estas alteraciones fibróticas pulmonares, se aprecia una acumulación de fibroblastos, miofibroblastos y ECM que conducen a la insuficiencia respiratoria crónica (29) (30).

En general, se acepta que en las EPID existe un cambio en el fenotipo de células epiteliales alveolares (AECs, del inglés *alveolar epithelial cells*) secundario al daño que se produce mediante múltiples mecanismos. Como consecuencia de dicho daño, tiene lugar el reclutamiento y la proliferación de los fibroblastos y su diferenciación a miofibroblastos. Estos pueden inducir la apoptosis de las células epiteliales y desembocar en una fibrogénesis aberrante (31).

Es posible que las células epiteliales puedan sufrir una transición epitelio-mesenquimatosas (EMT, del inglés *epithelialmesenchymal transition*), durante la cual, las células perderían sus características epiteliales y adquirirían características de células mesenquimatosas. Otra hipótesis contempla que el daño de las AECs tipo II provoca una falta de control sobre los fibroblastos y la síntesis de colágeno. La importancia de cada mecanismo en la fibrogénesis no está totalmente definida, pero cada uno de los mecanismos que explican la fibrosis no son excluyentes y todos pueden dar lugar a una respuesta fibroproliferativa (30).

En las últimas décadas se han publicado estudios que han ayudado a entender mejor los procesos moleculares involucrados en las EPID, especialmente en FPI (32) (33) (34) (35) (36) (37) (38), sin embargo ninguno de ellos ha podido explicar totalmente los complejos mecanismos inherentes a esta patología ni encontrar moléculas o marcadores que definitivamente la identifiquen y permitan un seguimiento de los pacientes.

Se sabe, por tanto, que existe una interacción anómala entre las distintas estirpes celulares con la mediación de distintos factores implicados a nivel de crecimiento celular, estrés oxidativo, actividad procoagulante y angiogenia; todo ello da lugar a una incontrolada fibrosis del parénquima pulmonar. Existen tres grandes áreas que se postulan como las

responsables de la combinación de alteraciones en los fibroblastos pulmonares, pérdida de células del epitelio alveolar y acumulación excesiva de ECM: 1) la inflamación y los mecanismos inmunes, con el papel dominante de la inflamación aguda y crónica impulsada por citoquinas, células o moléculas de la superficie celular; 2) estrés oxidativo y señalización de vía oxidativa, con el papel de las especies reactivas al oxígeno como protagonistas; y 3) el medio procoagulante pulmonar y el papel de las proteasas de la coagulación y sus receptores tisulares de eje central (39).

Es evidente que no existe un mecanismo único responsable de la patogenia de las enfermedades fibróticas intersticiales, sino que es la consecuencia de un proceso multifactorial en el que la interacción entre sí provoca la enfermedad. En algunos tipos de EPID sí se ha observado un mayor peso de unos mecanismos sobre otros; así, por ejemplo, en el caso de la sarcoidosis y la neumonitis por hipersensibilidad, la alteración principal es la inflamatoria, mientras que en la FPI predomina la fibrogénesis (17).

### Mediadores celulares en fibrosis

Los mediadores o factores celulares pueden considerarse biomarcadores, es decir, indicadores objetivos de procesos fisiológicos/ patológicos o de respuesta a intervenciones terapéuticas. En las EPID su utilización como herramientas para el diagnóstico diferencial, predictores de la progresión de la enfermedad así como en la monitorización de la respuesta al tratamiento es muy necesaria. Para esta función, lo ideal es que estos factores puedan determinarse y analizarse de forma sencilla. Razón por la cual la investigación se centra preferentemente en la búsqueda de moléculas presentes en suero o células circulantes(15). A continuación, se detallan mediadores implicados en procesos relacionados con el desarrollo de las EPID y que pueden ser estudiados en suero o plasma.

## Proteínas del surfactante

Las proteínas del surfactante o SP (de sus siglas en inglés *surfactant proteins*) son proteínas tensioactivas hidrófilas que pertenecen a la superfamilia de las lectinas de tipo C (40). Son sintetizadas principalmente a nivel pulmonar por neumocitos tipo II, células bronquiales no ciliadas, glándulas submucosas y células epiteliales de otros tejidos respiratorios que incluyen tráquea y bronquios (41). Dichas proteínas son secretadas en una capa fluida que recubre el epitelio. Además, los componentes tensioactivos más hidrófilos participan en los mecanismos de defensa a nivel pulmonar y modifican la respuesta inmune. En concreto, SP-A y SP-D se unen y participan en la eliminación de una variedad de patógenos bacterianos, fúngicos y virales, y pueden disminuir la función de las células efectoras inducidas por antígenos. Dichas proteínas presentan actividad microbicida al aumentar la permeabilidad de la membrana celular del patógeno. SP-A y SP-D colaboran en la opsonización de microorganismos (principalmente bacterias y hongos) mejorando su unión a las células fagocíticas (macrófagos y neutrófilos) y su eliminación (42). Datos recientes también muestran acciones inmunosupresoras de algunos lípidos asociados a surfactantes, como el fosfatidilglicerol, que desempeñan un papel importante en la defensa del huésped contra los patógenos y son componentes importantes de la inmunidad innata del pulmón (41).

Con respecto al papel de las proteínas tensioactivas SP-A y SP-D en las enfermedades pulmonares crónicas, incluidas las producidas por patógenos, es escasa la información referida al respecto. A nivel de la producción de citocinas inflamatorias y especies reactivas, ejercen como regulador al alza en el equilibrio entre mediadores inflamatorios, con objeto de proteger al huésped. Así mismo, previenen una respuesta inflamatoria exagerada que podría dañar el epitelio pulmonar y comprometer el intercambio gaseoso (43).

La expresión abundante y restringida a nivel pulmonar hace que estas proteínas se consideren marcadores específicos para las enfermedades pulmonares. De hecho, las concentraciones séricas de SP-A y SP-D aumentan en diferentes enfermedades

pulmonares, incluida la FPI (41). Los mecanismos subyacentes a la elevación de dichas proteínas probablemente incluyen una combinación de lesión epitelial y descomposición junto con una mayor acumulación de células epiteliales alveolares tipo II secundaria a hiperplasia del tejido. El procesamiento aberrante de las SP por el retículo endoplasmático ha estado involucrado en la patogénesis de la FPI (44) (45).

### **Eje autotaxina/ ácido lisofosfatídico y fibrosis pulmonar**

Los lisofosfolípidos (LP), son estructuras lipídicas muy simples formadas por una cadena de ácidos grasos y un grupo fosfato como cabeza polar. El LPA (1-acetil-sn-glicerol-3-fosfato, ácido lisofosfatídico) es uno de los LP biológicamente más importantes. Se encuentra presente en la mayoría de tejidos y fluidos biológicos de mamíferos, incluyendo la sangre, y tiene un papel crucial en la biosíntesis *de novo* de fosfolípidos, así como función de intermediario metabólico para la formación de ácidos fosfatídicos. Participa en diversos procesos como angiogénesis, fibrosis pulmonar, hepática o renal, reparación de daño tisular, inmunidad, inflamación entre otros (46) (47) (48) (49) (50), en los que actúa mediante receptores específicos acoplados a proteína G de los que se conocen 6 subtipos hasta el momento (46). Además, no se descarta la implicación de los receptores huérfanos GPR87 y P2Y10 (51) (52), el receptor para productos finales de glicación avanzada (RAGE) (53) y el receptor del proliferador activado de peroxisoma intracelular (PPAR $\gamma$ ) (54) en la señalización de LPA. En cuanto a la síntesis intracelular de LPA, se distinguen dos líneas principales en la producción de LPA: la hidrólisis de ácidos fosfatídicos que se encuentran en las membranas celulares mediante la acción de fosfolipasas A1 y A2; la escisión de lisofosfolípidos (lisofosfatidilcolina y lisofosfatidilserina) por la actividad lisofosfolipasa D de la enzima autotaxina (ATX) (55) (figura 1). Por otra parte, su degradación implica varias categorías de enzimas como la LPA-aciltransferasa, fosfato lípido fosfatasa y lisofosfolipasa (46).

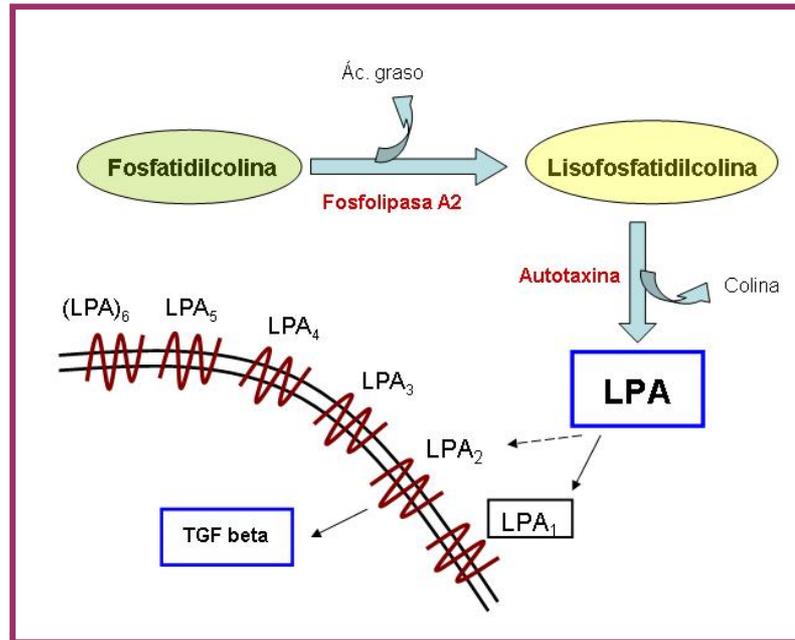


Figura 1: Proceso de síntesis de LPA.

La mayor parte de la producción de LPA en sangre periférica se debe a la actividad de la ATX (56) y sus niveles se correlacionan fuertemente con la concentración de LPA. El eje ATX/ LPA es considerado como un objetivo terapéutico en diferentes trastornos crónicos inflamatorios y fibroproliferativos, incluida la FPI. En este sentido, la producción de LPA mediada por ATX promueve efectos pleiotrópicos en las células pulmonares que estimulan el desarrollo de este tipo de fibrosis (57) (58), mientras que la inhibición de ATX atenúa la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina (BLM) (59) (60) (61) confirmando así el papel del eje en la patogenia de la enfermedad y su potencial terapéutico con el desarrollo de nuevos agentes que planteen como dianas LPA o ATX. Actualmente se están desarrollando en paralelo dos ensayos clínicos aleatorizados en fase III idénticos a nivel internacional con el inhibidor de ATX GLPG1690 (Galápagos NV, Mechelen, Bélgica) (62). En los estudios en fase I sobre voluntarios sanos, el inhibidor presentó una buena biodisponibilidad por vía oral sin interacción con alimentos y un buen perfil PK/PD así como una reducción máxima en los niveles de LPA en plasma de aproximadamente el 80% (63). En el estudio exploratorio de fase IIa, realizado en 23 sujetos con FPI, GLPG1690 mostró un perfil de seguridad similar a placebo y se observaron señales de

eficacia preliminares con el efecto favorable en el cambio promedio en la FVC tras 12 semanas en comparación con placebo (25 mL frente a -70 mL) (64).

Con respecto al papel de los subtipos receptoriales de LPA en FPI, parecen estar más relacionados los receptores LPA<sub>1</sub> (RLPA<sub>1</sub>) principalmente y LPA<sub>2</sub> (RLPA<sub>2</sub>), aunque no se pueda descartar el posible papel del receptor LPA<sub>6</sub>, el de mayor expresión en el pulmón, pero cuyo posible papel en la fisiopatología pulmonar y la fibrosis aún no se ha explorado. Tras la interacción de LPA con sus receptores y activar las correspondientes cascadas de transducción de señales mediadas por la proteína G, LPA induce apoptosis epitelial, el evento patogénico iniciador en la fibrosis pulmonar modelada y posiblemente en la FPI, así como la secreción de IL-8 de las células epiteliales, promoviendo inflamación, mientras que también se estimula la permeabilidad endotelial, promoviendo edema pulmonar. Las células epiteliales de las vías respiratorias expresan predominantemente RLPA<sub>1-3</sub> (65), siendo el primer receptor identificado y el mejor estudiado de los seis el RLPA<sub>1</sub>.

La señalización de LPA- RLPA<sub>1</sub>, podría regular la migración, diferenciación y apoptosis de las células madre mesenquimales (66) e incluso procesos necróticos y apoptóticos a través de la regulación del estrés oxidativo. La expresión de RLPA<sub>1</sub> está aparentemente controlada por complejos mecanismos reguladores influenciados por sustancias activadores e inhibidoras aún no conocidas en su totalidad (67) y su activación se relaciona con efectos profibróticos en células epiteliales, endoteliales y fibroblastos (figura 2).

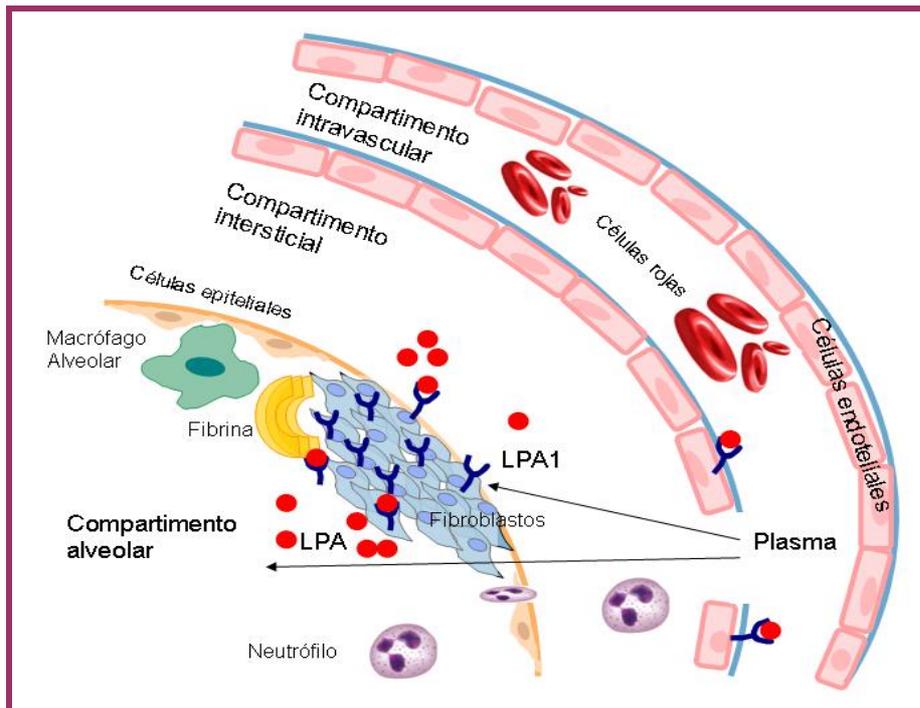


Figura 2: Interacción de LPA con receptores  $LPA_1$ , y sus efectos a nivel del intersticio pulmonar.

A través de la señalización de LPA-  $RLPA_{1,2}$  se puede contribuir al desarrollo de fibrosis pulmonar tras una lesión pulmonar, promoviendo la activación de la apoptosis de células epiteliales e induciendo resistencia a la misma en el caso de los fibroblastos, denominándose *apoptosis paradójica* a este efecto. De hecho, se sugiere que los fibroblastos en FPI son anormalmente resistentes a la apoptosis. Aunque los mecanismos moleculares responsables de la diferente susceptibilidad de las células epiteliales y los fibroblastos a la apoptosis en FPI aún no se han identificado completamente, los datos obtenidos en el estudio de Funke y colaboradores sugieren que la señalización de LPA a través de  $RLPA_1$  estaría implicada (65). Además, la activación en células mesoteliales puede conducir a estimular la migración, proliferación celular y sobreexpresión de un factor profibrótico llamado *factor de crecimiento del tejido conectivo*, que contribuye a la remodelación pulmonar mediante los efectos en fibroblastos pulmonares (a través de  $RLPA_1$ ) y células epiteliales ( $RLPA_2$ ) (48).

Los  $RLPA_1$  son los receptores LPA con mayor expresión en fibroblastos pulmonares en pacientes con FPI. En modelos animales se ha observado que tras la exposición a

bleomicina (BLM), se produce un acúmulo de fibroblastos en ratones dando lugar al desarrollo de fibrosis inducida, mientras que dicho efecto no se presenta tras la exposición a BLM de ratones con déficit de RLPA<sub>1</sub>. Por tanto, se puede afirmar que la pérdida de los efectos de la señalización de LPA- RLPA<sub>1</sub> representa un mecanismo de protección frente al desarrollo de fibrosis inducida por BLM en el caso de modelos animales (68) (69). En este sentido, se encontró que la administración oral del antagonista selectivo de RLPA<sub>1</sub>, AM095, en ratones previene el desarrollo de fibrosis pulmonar inducida por BLM y la distorsión de la arquitectura pulmonar a través de la modulación de mediadores inflamatorios y profibróticos, inhibiendo así el estatus inflamatorio y la fibrogénesis.

En cuanto al papel de LPA en la activación de TGF-beta (de sus siglas en inglés *transforming growth factor beta*) en células epiteliales bronquiales (figura 1), dicho efecto conduce a la activación y la transdiferenciación de los fibroblastos pulmonares, para los cuales el LPA es además un factor pro-supervivencia y quimiotáctico. En este caso, parece desempeñar un papel fundamental el RLPA<sub>2</sub>, como indican los estudios llevados a cabo en células epiteliales humanas y ratones con fibrosis pulmonar inducida (70) o deficiencia de RLPA<sub>2</sub> donde la ausencia del receptor confiere protección contra la lesión pulmonar inducida por BLM y la fibrosis posterior (71).

### **Factor de crecimiento transformante Beta y fibrosis pulmonar**

La familia de proteínas de TGF-beta comprende varios factores de crecimiento pleiotrópicos que desempeñan papeles cruciales en numerosos procesos fisiológicos que incluyen embriogénesis, el desarrollo y la diferenciación celular, el desarrollo del sistema inmunitario, las funciones de respuesta inflamatoria y la reparación de heridas, siendo esencial para la cicatrización de las mismas. Estimula el depósito de ECM y angiogénesis y es un mediador imprescindible en el proceso de cicatrización patológica en trastornos fibróticos (36). El origen de TGF-beta en un tejido dañado puede estar en los polimorfonucleares, células epiteliales y parenquimatosas y en los propios miofibroblastos

(72). Este factor activa la expresión de los receptores del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF, de sus siglas en inglés *platelet-derived growth factor*) y la secreción del factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF, de sus siglas en inglés *connective tissue growth factor*), provocando proliferación y diferenciación celular (73).

Las distintas isoformas de TGF-beta son secretadas como pequeños complejos latentes (PCL) en el que los péptidos de TGF-beta bioactivos forman asociaciones no covalentes con un péptido asociado a latencia (PAL). Los PCL junto con sus proteínas de unión dan lugar a los grandes complejos latentes (GCL), que se secuestran en la ECM y superficie de algunas células a través de la unión covalente de las proteínas de unión con las proteínas de la ECM (fibrina y fibronectina) (74).

Para ejercer su acción biológica, el TGF-beta debe liberarse de dichos complejos bien por mecanismos físicos, como la acidificación y la oxidación, que pueden ser provocados por una lesión tisular, bien por escindirse a través de la acción de proteasas como la MMP-2 y MMP-9. En consecuencia, la mayoría de la regulación de la función del TGF-beta ocurre a nivel de la activación de estos complejos latentes (75) (76). Sin embargo, la activación no proteolítica del TGF-beta por las células epiteliales y la presentación de la forma activa a los fibroblastos parece ser el mecanismo central para el desarrollo de fibrosis en los tejidos (77).

Las células epiteliales inducen activación de cambios conformacionales en los complejos latentes de TGF-beta a través de sus integrinas. Concretamente la señalización de LPA a través de su receptor RLPA<sub>2</sub> induce la activación de TGF-beta latente por células epiteliales del pulmón, mediando dicho proceso la integrina  $\alpha\text{v}\beta_6$ . Como resultado, se genera una interacción profibrótica que aumenta la producción de colágeno por parte de fibroblastos y miofibroblastos (figura 3). Este proceso es un requerimiento fundamental para el desarrollo de fibrosis a nivel pulmonar. La supresión genética de la subunidad  $\beta_6$  o el bloqueo de dicha integrina mediante anticuerpos, suprime la señalización de TGF-beta en el pulmón tras la lesión y protege de la fibrosis que se induce en modelos con ratones (77).

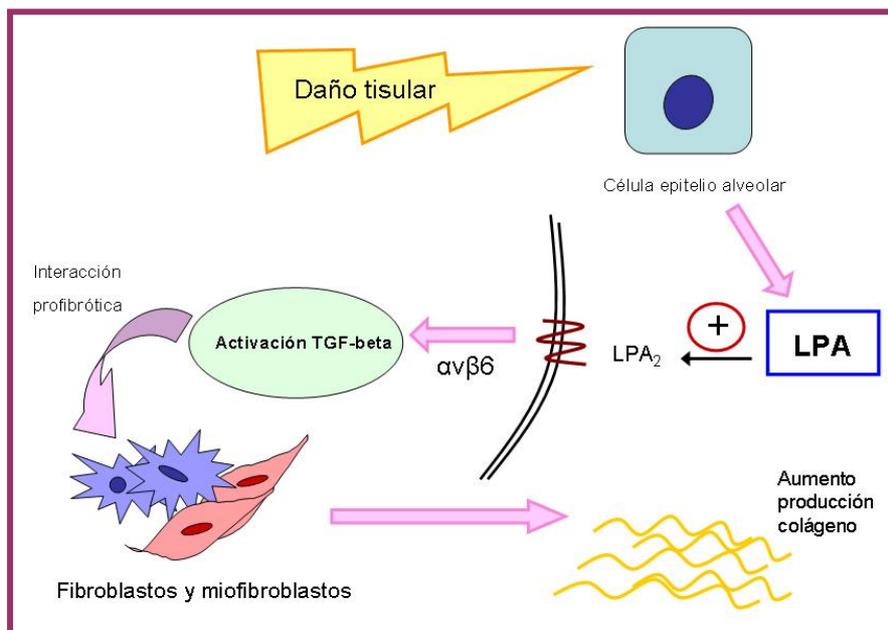


Figura 3: Cadena de activación del TGF-beta a partir del daño tisular y sus efectos a nivel de la producción de colágeno.

Recientemente se han publicado resultados prometedores para el tratamiento de FPI relacionados con la inhibición de la vía de TGF-beta (78) (79). En el caso de la supresión de TGF-beta con GSK3008348, un inhibidor de la integrina  $\alpha v \beta 6$  administrado en solución inhalada, fue bien tolerado sin informes de eventos adversos graves o anomalías clínicamente significativas atribuibles al tratamiento (78).

Existe evidencia sobre el papel que además ejerce el TGF-beta1 en el mantenimiento del proceso fibrogénico mediante cierto efecto “protector” contra la apoptosis de los miofibroblastos pulmonares. Se trata del hallazgo de alta actividad de las telomerasas en este fenotipo celular que lleva a mantener una activación de la duplicación celular y producción de ECM (80) (81). El TGF-beta promueve la producción de diversas citocinas profibróticas e inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMP, de sus siglas en inglés *tissue inhibitors of metalloproteinases*) e inhibe proteasas que degradan la matriz (82) (83).

Por el contrario, TGF-beta promueve la apoptosis de células epiteliales pulmonares como se ha observado en modelos de ratón donde se logró una protección frente a fibrosis inducida por BLM en aquellos animales que portaban una delección epitelio-específica del receptor tipo II de TGF-beta (84). Por tanto, se puede afirmar que TGF-beta es un modulador que afecta tanto a células epiteliales (retardando los procesos normales de reparación de la barrera epitelial y promoviendo la inflamación submucosa y remodelación) como a fibroblastos en procesos fibróticos como la FPI (75). En el caso concreto de la FPI, el alelo Pro en el codón 10 del gen para TGF-beta se ha asociado con un aumento de la producción de dicho factor, acelerando el ritmo de progresión de la enfermedad (85). En modelos animales, además, se observa un bloqueo del desarrollo de fibrosis cuando se administran anticuerpos e inhibidores que tiene como diana las vías de señalización del TGF-beta (85).



## 2. OBJETIVOS

Las EPID representan un grupo heterogéneo de trastornos respiratorios, en su mayoría crónicos y asociados a una alta morbilidad y mortalidad. La clasificación descrita por la ATS/ERS (11) ha ayudado a diferenciar con mayor precisión este tipo de patologías, sin embargo a pesar de múltiples ensayos e investigaciones siguen siendo un reto por su dificultad diagnóstica y su manejo terapéutico.

Pese a que cada vez se conocen más los mecanismos moleculares involucrados en las enfermedades pulmonares intersticiales, especialmente en la fibrosis pulmonar idiopática (86), ninguno de ellos ha podido explicar totalmente los complejos procesos inherentes a esta patología ni encontrar moléculas o biomarcadores que definitivamente la identifiquen y permitan una mejoría en la asistencia de los pacientes.

Se describen tres mecanismos que podrían ser los responsables de la alteración de los fibroblastos, la pérdida de las células epiteliales alveolares y la acumulación excesiva de la matriz extracelular (39), causantes de la enfermedad. Los tres mecanismos son la inflamación y los mecanismos autoinmunes, la existencia de un medio procoagulante en el pulmón y la alteración en la ECM.

La fibrosis, característica de estos procesos, se asocia a una alteración en la ECM. Actualmente se hace hincapié en los marcadores relacionados con la alteración de dicha matriz en diferentes patologías incluyendo la patología fibrótica pulmonar.

Todos estos hechos sugieren que los factores implicados en la remodelación de la ECM y la reparación del daño tisular podrían considerarse marcadores para las EPID. Estos marcadores mejorarían en gran medida el diagnóstico y el seguimiento de los pacientes mediante técnicas menos invasivas, más fáciles de realizar y de menor coste de las que actualmente se disponen. Sería igualmente deseable que estos marcadores ayudasen a

establecer y monitorizar estrategias terapéuticas en las entidades patológicas incluidas en las EPID.

## **OBJETIVO PRINCIPAL**

Determinar la validez de los niveles séricos de factores implicados en la remodelación de la ECM como biomarcadores de la enfermedad pulmonar intersticial difusa.

## **OBJETIVOS SECUNDARIOS**

1. Determinar en suero los mediadores celulares de fibrosis para valorar su poder diagnóstico en cada una de las patologías motivo de estudio: fibrosis pulmonar idiopática (FPI), neumonía intersticial no específica (NINE) y enfermedad pulmonar intersticial difusa asociada a conectivopatías (EPID-CTD).
2. Establecer la relación entre los niveles séricos de los mediadores de fibrosis y la clínica del paciente.
3. Valorar los niveles séricos de los mediadores de fibrosis en cada uno de los tipos de EPID.
4. Establecer si los niveles de los mediadores discriminan entre enfermos y personas sanas.
5. Valorar el papel como posibles biomarcadores de los mediadores de fibrosis pulmonar estudiados.

# 3. MATERIAL Y MÉTODOS

## POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se realizó un estudio unicéntrico consistente en la medición de los niveles en suero de mediadores profibróticos en pacientes diagnosticados de EPID en el servicio de Neumología del Hospital Universitario Virgen de la Victoria, comparado con los niveles encontrados en voluntarios sanos. Este centro es un hospital de referencia que cubre aproximadamente el 100% de los pacientes con EPID de la región con más de 1,5 millones de habitantes. El servicio de Neumología cuenta con una consulta monográfica para el seguimiento de pacientes con EPID, en coordinación con otras especialidades como Medicina Interna, Nefrología o Reumatología.

El protocolo del estudio principal del cual forma parte este trabajo sobre biomarcadores profibróticos presentado en este manuscrito, así como el trabajo presentado en la tesis doctoral sobre biomarcadores derivados del daño oxidativo y de las defensas antioxidantes (1), fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación Provincial de Málaga en la sesión de fecha 25/6/2016.

Se analizó a una población de 55 pacientes con diagnóstico establecido de EPID (en seguimiento en consulta externa del hospital) y 30 controles sanos, que aceptaron participar en el estudio y autorizaron la extracción de una muestra de sangre periférica.

Las variables demográficas y clínicas analizadas en el estudio se muestran en la siguiente tabla:

VARIABLE	Tipo	Características
Edad	Cuantitativa	Unidad: años
Sexo	Cualitativa	Hombre Mujer
Hábito tabáquico	Cuantitativa	Fumador No fumador Exfumador Unidad: porcentaje e índice acumulado paquetes/ año
Exposición factores riesgo para EPID	Cualitativa	Exposición sustancias inorgánicas Exposición sustancias orgánicas Exposición fármacos Antecedentes familiares
Presencia comorbilidades	Cualitativa	Hipertensión arterial Diabetes mellitus Dislipemia EPOC Cardiopatía SAHS HTAP secundaria
Ingresos hospitalarios	Cuantitativa	Unidad: nº ingresos desde diagnóstico de EPID
Tiempo seguimiento consulta	Cuantitativa	Unidad: meses de seguimiento desde diagnóstico de EPID

Tabla 3: Variables demográficas y clínicas de los participantes en el estudio.

A los pacientes se les explicaron los procedimientos a realizar:

- Recogida de datos clínicos mediante historia clínica previa (sistema informático Diraya) y mediante entrevista médica directa.
- Exploración física que incluye auscultación cardiorrespiratoria y determinación de saturación de O<sub>2</sub> basal.

- Realización de espirometría forzada en el caso de los controles sanos. Obtención de último control mediante pruebas de función respiratoria completas en el caso de los pacientes.
- Extracción de muestra de sangre periférica mediante venopunción directa.

Se incluyeron aquellos sujetos que, tras recibir la información y leer el consentimiento informado, aceptaron participar y firmaron dicho consentimiento. Se excluyeron pacientes que no firmaron el consentimiento.

Las muestras obtenidas de sangre periférica tras 8 horas de ayuno se procesaron de la siguiente forma: La sangre completa se recogió en tubos que contenían EDTA (ácido etileno diamina tetra-acético) a una concentración de 50 mM. Para la preparación del suero o plasma, las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 1.200 g y a una temperatura de 4°C. Se extrajo el sobrenadante cuidadosamente y se almacenó en tubos siliconizados en alícuotas a -80°C hasta su uso.

## DETERMINACIÓN EN SUERO DE MARCADORES CELULARES PROFIBRÓTICOS

La determinación de los distintos factores a estudio se llevó a cabo a través de ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas o técnica ELISA (de sus siglas en inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*) cuantitativos tipo sándwich.

El ELISA tipo sándwich es un método ampliamente utilizado para la cuantificación de proteínas y otros analitos en solución de forma específica y con alta sensibilidad, como por ejemplo, para la detección de biomarcadores en suero. Se basa en la detección de la proteína a estudio a través de su captura con la utilización de 2 anticuerpos frente a epítomos específicos de dicha proteína. El primer anticuerpo es un anticuerpo monoclonal específico que está adherido en la placa de microtitulación. Después de la adición de la

muestra en la placa, este anticuerpo captura a la proteína a estudio presente en la muestra inmovilizándola en la placa (unión específica del anticuerpo a uno de los epítomos de la proteína). Seguidamente, la proteína inmovilizada se unirá específicamente (a través de otro epítomo) al segundo anticuerpo, el cual está conjugado a una enzima capaz de generar un producto detectable y cuantificable por diferentes métodos, fundamentalmente, la espectrofotometría (figura 4).

Este segundo anticuerpo o anticuerpo de detección está marcado, por ejemplo, con biotina, que permite la unión posterior de una enzima conjugada con estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante HRP (de sus siglas en inglés, *horseradish peroxidase*). Así, una vez lavado el pocillo con el tampón adecuado para eliminar reactivos no unidos, y tras la adición de un sustrato se desarrolla una reacción colorimétrica directamente proporcional a la cantidad de proteína unida en la placa, determinándose la concentración de la proteína a estudio en la muestra por comparación con una curva patrón de concentraciones conocidas de proteína. Esta reacción enzima-sustrato se detiene mediante la adición de una solución específica y el cambio de color se mide mediante espectrofotometría a una determinada longitud de onda.

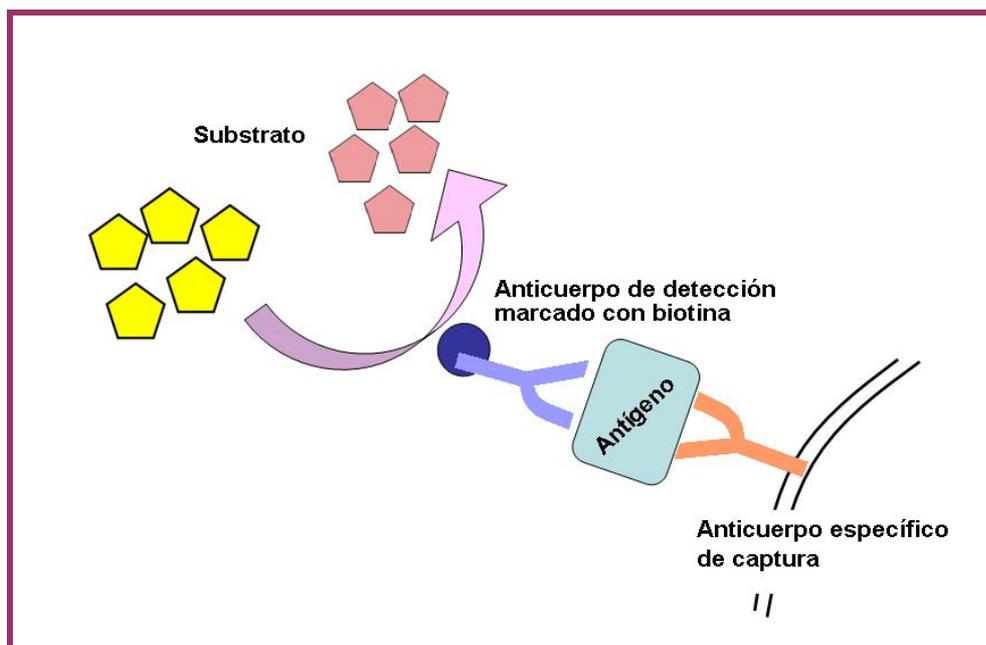


Figura 4: Detección de una proteína antigénica mediante técnica ELISA tipo sándwich.

## DETERMINACIÓN DE NIVELES DE PROTEINA SURFACTANTE A Y D (SP-A Y SP-D)

Se utilizaron los kits comerciales SP-A NBP2-76692 y SP-D DSFPD0 (Novus Biologicals®) para determinar las concentraciones de SP-A y SP-D en suero humano, siguiendo las instrucciones del fabricante. El rango de detección de estos kits es de 15.625pg/mL – 1000pg/mL para SP-A y de 0,02ng/mL – 0,37ng/mL para SP-D. La sensibilidad para el kit de detección de SP-A es de 9,375 pg/mL (Intraensayo: CV 5,03%; Interensayo: CV 4,83%) y para el kit de SP-D de 0,11 ng/mL (Intraensayo: CV 6,2-8,2%; Interensayo: CV 8,7-9,3%).

## DETERMINACIÓN DE NIVELES DE RECEPTORES DE ÁCIDO LISOFOSFÁTICO (RLPA<sub>1</sub>)

Para ello se utilizó el kit ELISA cuantitativo tipo *sándwich* (*Human Lysophosphatidic Acid Receptor 1 (LPA<sub>1</sub>) ELISA Kit*, Cat.No MBS070242, MyBiosource) que determina las concentraciones de RLPA<sub>1</sub> en suero humano (en nuestro caso, sin dilución previa). La sensibilidad para este kit es 0,1µmol/L (Intraensayo e interensayo CV: <15%) y el rango de detección de 0,625µmol/L - 20µmol/L.

## DETERMINACIÓN DE NIVELES DE ÁCIDO LISOFOSFÁTICO (LPA)

Se realizó dicha determinación mediante el LPA Assay Kit II (K-2800S, de Echelon®), utilizando las muestras de plasma humano sin dilución previa según las instrucciones del

fabricante. Rango de detección: 0,064 $\mu$ M - 1000 $\mu$ M; sensibilidad: 24nM (Intraensayo: CV 6,5-8,7%; Interensayo: CV 8,9-15,33%).

## DETERMINACIÓN DE NIVELES DE AUTOTAXINA (ATX)

Se realizó mediante el kit comercial ELISA tipo *sándwich* cuantitativo Echelon® para la medición *in vitro* de los niveles de ATX en plasma humano (producto con número K-5600).

Se diluyeron las muestras en diluyente 1x (constituido por 10mL de diluyente 5x (K-PBSTB) con 40mL de agua pura) y se mezcló suavemente. La dilución fue de 1/40 en nuestro estudio. La sensibilidad para el kit es de 3,21ng/mL (Intraensayo: CV 3%; Interensayo: CV 9%) y el rango de detección 589ng/mL – 1135ng/mL.

## DETERMINACIÓN DE FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA (TGF-BETA)

Para ello se utilizó el kit ELISA tipo *sándwich* para la medición *in vitro* cuantitativa de TGF-beta1 (SEA124Hu 96Tests, Cloud-Clone Corp). Se utilizó una dilución final de 1/40 y se siguieron las instrucciones del fabricante. La sensibilidad para el kit es <6,3pg/mL y su rango de detección 15,6pg/mL-1000pg/mL (Intraensayo: CV <10%; Interensayo: CV <12%).

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se introdujeron todas las variables recogidas en una base de datos mediante

Microsoft Excel y se revisaron los datos para la detección de posibles errores de transcripción.

Se realizaron cálculos estadísticos descriptivos de tendencia central (media aritmética y mediana) y de dispersión (error estándar de la media) para variables cuantitativas, y se expresó la frecuencia absoluta (n) y el porcentaje para variables cualitativas.

En el análisis inferencial se han utilizado los tests de *t*-Student y análisis de la varianza (ANOVA) para el caso de variables resultado cuantitativas (dependiendo de que la variable factor tuviese dos o más niveles) y Chi cuadrado para las relaciones de variables cualitativas entre sí. En el caso de *t*-Student y ANOVA se comprobó previamente la homocedasticidad (igualdad de varianzas) y normalidad. Cuando las condiciones de normalidad no se cumplían se realizaron tests no paramétricos (U de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis) para la comparación de la distribución de los niveles séricos de los biomarcadores en pacientes frente a controles, y entre los diferentes tipos de EPID y controles, respectivamente.

Para evaluar la fuerza de asociación entre las variables se realizó la correlación de Pearson (*r*) o Spearman (*Rho*) en la regresión lineal simple. Si el valor de *r* fue menor de 0,30, la asociación se consideró débil, si se obtuvo un valor entre 0,30 y 0,70 la asociación se consideró moderada y si fue superior a 0,70 la asociación se consideró como fuerte.

Para identificar el poder discriminatorio de las diferentes variables medidas en suero y su valor como posible biomarcador, se calcularon las curvas ROC (del inglés *receiver operating characteristic*), determinando el área bajo la curva AUC (del inglés *area under the curve*), la sensibilidad y especificidad de cada marcador. La sensibilidad y la especificidad fue calculada para los puntos de corte usando el índice de Youden ( $J_{max}$  [sensibilidad especificidad-1]) estableciendo el mejor punto de corte o *cutoff* para el diagnóstico.

En todos los casos se consideró como índice de confianza el 95% y el criterio para la significación estadística cuando la significación obtenida fue inferior al 5% ( $p < 0,05$ ).

Todos los cálculos se han realizado mediante el software estadístico SPSS versión 22 licenciado para la Universidad de Málaga.



## 4. RESULTADOS

### 4.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

#### 4.1.1. Variables Epidemiológicas

Así como se mencionó en el apartado de “Material y métodos”, la población comprende un total de 55 individuos con diagnóstico de EPID (29 pacientes con FPI, 12 pacientes con NINE y 14 pacientes con EPID-CTD) y 30 individuos sanos como controles (1). La edad media del grupo con EPID fue de 62,64 años y de 58,33 para el grupo control, sin diferencias significativas entre ambos así como tampoco entre los distingos subgrupos de EPID (tabla 4).

El 61,82% de los pacientes fueron hombres, con un porcentaje similar en el grupo control (60% hombres y 40% mujeres).

En cuanto al hábito tabáquico, la dosis acumulada media fue de  $37,6 \pm 4,14$  paquetes/año en el grupo de pacientes y de  $34,23 \pm 6,19$  en el grupo control. El porcentaje de fumadores activos fue del 13,79% en FPI, 33,33% en NINE y 14,28% en EPID-CTD. Este factor se tuvo en cuenta para el estudio de todas las variables serológicas medidas.

Se analizó la exposición a factores de riesgo relacionados con el desarrollo de patología pulmonar. Un 4,44% de los pacientes referían exposición a sustancias inorgánicas e igual porcentaje a exposición de sustancias orgánicas o exposición a fármacos. Respecto a antecedentes de familiares de EPID, sólo se registraron respuesta afirmativa en un 11,11% de los pacientes.

Parámetro	FPI (n= 29)	NINE (n= 12)	EPID-CTD (n= 14)	Control (n= 30)	P
Edad (años)	63,33 ±2,74	62,71 ±3,78	60 ± 2,94	58,33 ± 3,46	NS
Hombres	19 (65,52%)	7 (58,34%)	6 (42,86%)	18 (60%)	NS
Mujeres	10 (34,48%)	5 (41,66%)	8 (57,14%)	12 (40%)	
Fumadores	4 (13,79%)	4 (33,33%)*	2 (14,28%)	5 (16,66%)	
Exfumadores	17 (58,62%)	4 (33,33%)*	3 (21,43%)*	15 (50%)	
No fumadores	8 (27,59%)	4 (33,33%)	9 (64,29%)*	10 (33,3%)	

Tabla 4: Variables epidemiológicas de los grupos de EPID y voluntarios sanos. Valores expresados como media ± ESM y número de sujetos %. \*  $p < 0.05$  vs control. (1)

En cuanto a la presencia de comorbilidades, se observaron antecedentes de hipertensión arterial en un 38,70%, de diabetes mellitus en el 25,80% y de dislipemia en el 35,50%. Tenían diagnóstico previo de enfermedad pulmonar obstructiva (EPOC) el 6,50% de los pacientes y de cardiopatía el 22,60%. Se detectó un 9,70% de pacientes con síndrome de apnea-hipopneas del sueño (SAHS), así como hipertensión arterial pulmonar (HTAP) secundaria a la EPID en el 9,70% de los casos.

El 25,90% de los pacientes había requerido un ingreso hospitalario o más en el curso evolutivo de la EPID, siendo mayor el porcentaje dentro del grupo de FPI (un 9,70%). El tiempo medio de seguimiento en consulta desde el diagnóstico de los pacientes era de  $38,93 \pm 6,65$  meses en el grupo de FPI,  $43,71 \pm 7,88$  meses en NINE y  $44,77 \pm 12,81$  meses en los pacientes con EPID-CTD, sin que existiesen diferencias significativas en el tiempo de seguimiento.

Estas variables también se tuvieron en cuenta en la valoración de los posibles biomarcadores.

### 4.1.2. Variables Clínicas

En el momento de la extracción de la muestra de sangre periférica, se realizó una evaluación de factores clínicos en cada paciente, como control evolutivo de su patología (1). Dichos factores evaluados fueron el grado de disnea, la saturación de oxígeno basal, la presencia de tos, existencia de crepitantes a la auscultación, presencia de acropaquias, parámetros de función respiratoria, patrón radiológico y tratamiento recibido.

#### Parámetros de exploración

Se describen a continuación los datos referentes a la exploración registrada en el grupo de pacientes, ya que el grupo control no presentaba ninguna alteración en dicha exploración (1).

El *grado de disnea* basal fue valorado tomando como referencia la escala de disnea de la NYHA (New York Heart Association). En el momento de la extracción de la muestra, de grado más leve a más severo, el 23,30% de los pacientes presentaba una clase funcional I, el 33,30% clase II, el 16,70% clase III y finalmente un 16,70% presentaba clase IV.

El 35,50% de los pacientes presentaban *insuficiencia respiratoria* en el momento de su valoración.

En cuanto a la exploración, un 45,20% refería presencia de *tos crónica*, evidenciándose *crepitantes* a la auscultación en un 67,70% de los casos. Un 19,40% presentaban *acropaquias*.

#### Parámetros de función respiratoria

Las pruebas funcionales respiratorias se realizaron al total de la población estudiada (enfermos y controles sanos) en la visita para la extracción de la muestra de sangre periférica. En cuanto a los sujetos sanos, se le realizó una espirometría simple; sin embargo, los pacientes con EPID fueron sometidos a una evaluación mediante pruebas funcionales completas (que incluyen además pletismografía y determinación de la DLCO).

En el análisis, se detectaron valores de FVC y FEV1 (de sus siglas en inglés *forced expiratory volume in the first second*) significativamente más bajos en aquellos sujetos enfermos respecto a los controles sanos (p 0,006 y p 0,001, respectivamente) (tabla 5). No hubo diferencias entre FPI, NINE y EPID-CTD, aunque se observa una tendencia a valores más bajos, incluyendo la DLCO, en sujetos con diagnóstico de EPID-CTD.

Parámetro	Enfermos (n= 55)	Controles (n= 30)	P
FVC mL	2257 ± 166	3141 ± 263	0,006
FVC %	66 ± 3	102 ± 5	
FEV1 mL	2021 ± 147	2543 ± 236	0,001
FEV1 %	74 ± 4	99 ± 5	
DLCO%	46 ± 4	NE	
DLCO/ VA	74,32 ± 23,58	NE	

Tabla 5: Valores obtenidos en pruebas de función respiratoria en la población estudiada. Valores expresados como media ± ESM. (%): porcentaje del valor predicho. NE: no evaluado. (1)

### Patrón radiológico

Los pacientes son sometidos a control radiológico periódico en el seguimiento en consulta, mediante la realización de un TACAR valorado e informado por el grupo de radiólogos especialistas en tórax de la Unidad de Radiología del hospital. Se tomaron como referencia los resultados obtenidos en los TACAR realizados en los seis meses previos al momento de la extracción de muestra de sangre para el estudio.

Se agruparon los patrones radiológicos en tres categorías (1):

- Patrón de NIU, que incluye como hallazgos radiológicos más frecuentes una disminución global del volumen pulmonar, presencia de opacidades pulmonares de tipo reticular y localización basal y periférica, además de la existencia de

panalización (87). En nuestra muestra se caracterizaron 29 pacientes con dicho patrón (52,73%).

- Patrón de NINE, caracterizado por presencia de “vidrio deslustrado” periférico, en las zonas medias y basales de ambos pulmones (87). Detectado en 12 pacientes de la muestra (21,81%).
- Patrones con características no exclusivas de NIU o NINE y que incluían panalización, patrón quístico y de consolidación, representando el 25,45% de la muestra (14 pacientes).

## **Tratamiento**

Se registraron los tratamientos farmacológicos prescritos a los pacientes en el momento de la visita para la extracción de la muestra de sangre periférica (1). Dichos tratamientos fueron instaurados durante el seguimiento habitual en consulta, según las características de cada paciente y el estadio clínico y radiológico de la enfermedad. Así, el 38,7% de los sujetos se encontraban en monoterapia con n-acetilcisteína, el 9,7% con corticoides sistémicos y un 3,2% con anticuerpos monoclonales. El 29,0% recibían un tratamiento combinado de estos tratamientos descritos, que en algunos casos también incluía inmunosupresores (azatioprina y ciclofosfamida, descritos en tres pacientes).

## **4.2. FACTORES SOLUBLES PROFIBRÓTICOS**

### **4.2.1. SP-A Y SP-D: Diferencias entre enfermos de EPID y voluntarios sanos**

El estudio de los niveles séricos para los diferentes mediadores fibróticos se ha llevado a cabo en el grupo control y pacientes de FPI y EPID-CTD. Los pacientes con NINE han sido excluidos al ser insuficientes en número las muestras válidas. Este hecho se debe a los defectos irreparables producidos a nivel del procesamiento en la mayoría de las muestras de sangre del grupo NINE. El procesamiento de todas las muestras se realizó una vez terminada la parte clínica del estudio, no siendo por ello viable la comparación de los

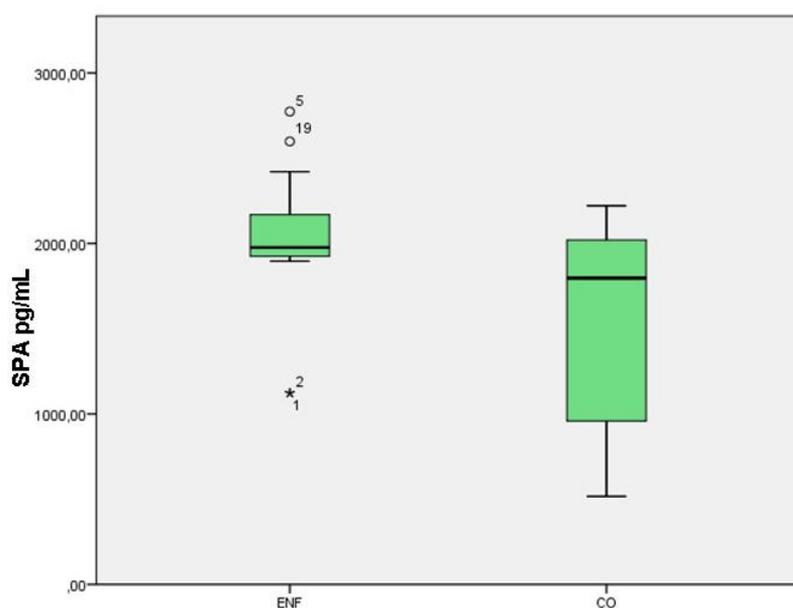
datos obtenidos en los grupos control, FPI y EPID-CTD con nuevos datos obtenidos a partir de nuevas muestras en el grupo NINE.

Los niveles serológicos de SP-A en el grupo de enfermos fueron significativamente superiores a los obtenidos en los sujetos sanos ( $p$  0,09), sin embargo, no mostraron diferencias significativas en la determinación de SP-D ( $p$  0,693) (tabla 6).

Los niveles séricos medios de SP-A (expresados en pg/mL) en los pacientes con EPID fueron de  $2030,47 \pm 60,2$  frente a  $1497,98 \pm 168,2$  en los controles sanos. Los niveles de SP-D (expresados en ng/mL) para pacientes con EPID y sujetos sanos fueron  $12,98 \pm 0,9$  y  $18,68 \pm 4,5$  respectivamente (tabla 6) (figura 4).

Parámetro	Enfermos (n= 55)	Controles (n= 30)	P
SP-A (pg/mL)	$2030,47 \pm 60,2$	$1497,98 \pm 168,2$	0,009
SP-D (ng/mL)	$12,98 \pm 0,9$	$18,68 \pm 4,5$	0,693

Tabla 6: Valores medios de SP-A y SP-D en sujetos con EPID y controles sanos. Valores expresados como media  $\pm$  ESM.



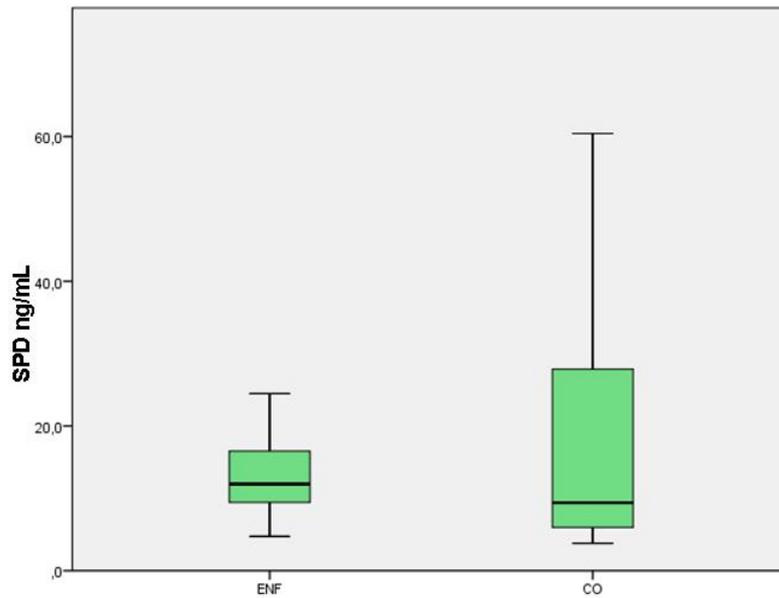


Figura 4: Niveles séricos totales de SP-A y SP-D en sujetos con EPID (ENF) y controles sanos (CO).

### Diferencias entre enfermos de FPI Y EPID-CTD

En cuanto a los niveles del grupo de FPI para SP-A ( $2029,98\text{pg/mL} \pm 28,5$ ) y SP-D ( $12,71\text{pg/mL} \pm 1,2$ ) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto a los valores del grupo de EPID-CTD (SP-A  $2031,17\text{pg/mL} \pm 1,2$ ; SP-D  $13,01\text{pg/mL} \pm 0,5$ ) ( $p$  0,96 y  $p$  0,94 respectivamente). Para SP-A, ambos grupos mostraron diferencias estadísticamente significativas frente al grupo control ( $p < 0,01$ ).

#### 4.2.2. SISTEMA LPA: Diferencias entre enfermos de EPID y voluntarios sanos

Los niveles serológicos de LPA en el grupo de enfermos fueron significativamente superiores a los obtenidos en los sujetos sanos ( $p < 0,001$ ).

Los niveles séricos medios de LPA (expresados en nM) en los pacientes con EPID fueron de  $393,46 \pm 34$  frente a  $122,94 \pm 13$  en los controles sanos. Los niveles de RLPA<sub>1</sub> (expresados en  $\mu\text{mol/L}$ ) para pacientes con EPID e individuos sanos fueron  $5,63 \pm 0,8$  y  $3,31 \pm 0,6$  respectivamente ( $p$  0,05) (tabla 7) (figura 5).

Parámetro	Enfermos (n= 55)	Controles (n= 30)	P
LPA (nM)	393,46 ± 34	122,94 ± 13	< 0,001
Receptor LPA <sub>1</sub> (μmol/L)	5,63 ± 0,8	3,31 ± 0,6	0,05

Tabla 7: Valores medios de LPA y RLPA<sub>1</sub> en sujetos con EPID y controles sanos. Valores expresados como media ± ESM.

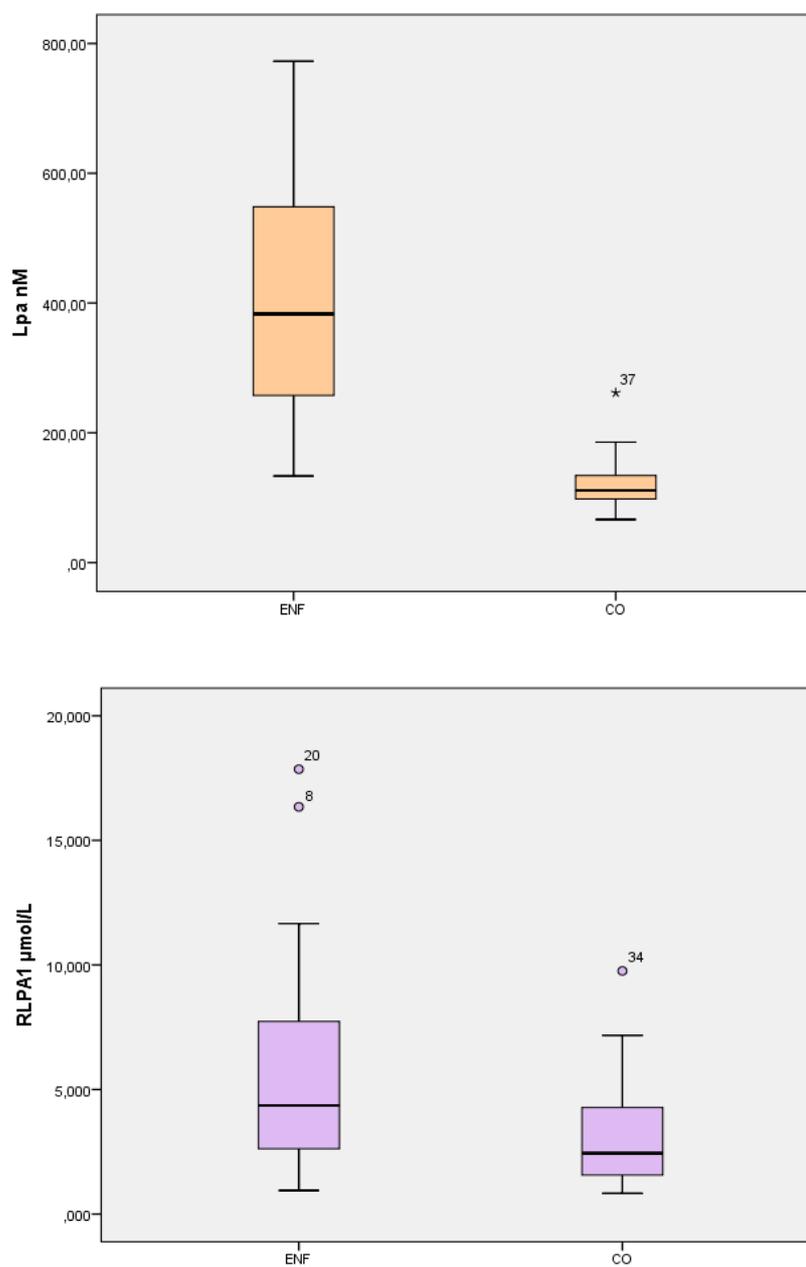


Figura 5: Niveles séricos totales de LPA y RLPA<sub>1</sub> en sujetos con EPID (ENF) y controles sanos (CO).

## Diferencias entre enfermos de FPI y EPID-CTD

En cuanto a los niveles del grupo de FPI para LPA ( $388,18\text{nM} \pm 21$ ) y RLPA<sub>1</sub> ( $5,69\mu\text{mol/L} \pm 1,2$ ) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto a los valores del grupo de EPID-CTD (LPA  $401,23\text{nM} \pm 11$ ; RLPA<sub>1</sub>  $5,57\mu\text{mol/L} \pm 0,7$ ) ( $p$  0,37 y  $p$  0,18 respectivamente). En estos dos parámetros, ambos grupos mostraron diferencias estadísticamente significativas frente al grupo control ( $p < 0,05$ ).

### 4.2.3. AUTOTAXINA: Diferencias entre enfermos de EPID y voluntarios sanos

En cuanto a la determinación de ATX, se obtuvieron niveles significativamente mayores en los enfermos de EPID respecto a los controles. Los niveles séricos de ATX en los enfermos fue de  $1204,26\text{ ng/mL} \pm 97$  y en controles sanos de  $792,55\text{ ng/mL} \pm 89$  ( $p$  0,01). (tabla 8) (figura 6).

Parámetro	Enfermos (n= 55)	Controles (n= 30)	P
Autotaxina (ng/mL)	$1204,26 \pm 97$	$792,55 \pm 89$	0,01

Tabla 8: Valores medios de autotaxina en sujetos con EPID y controles sanos. Valores expresados como media  $\pm$  ESM.

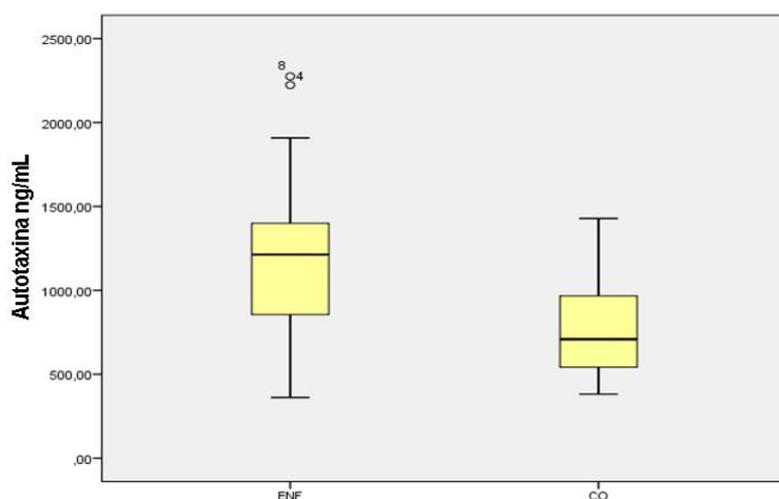


Figura 6: Niveles séricos totales de autotaxina en sujetos con EPID (ENF) y controles sanos (CO).

## Diferencias entre enfermos de FPI y EPID-CTD

En cuanto a los niveles del grupo de FPI para ATX ( $1198,72\text{ng/mL} \pm 82$ ) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto a los valores del grupo de EPID-CTD ( $1210,13\text{ng/mL} \pm 79$ ) ( $p = 0,69$ ). Ambos grupos mostraron diferencias estadísticamente significativas frente al grupo control ( $p < 0,01$ ).

### 4.2.4. TGF-BETA: Diferencias entre enfermos de EPID y voluntarios sanos

En el caso de la determinación de TGF-beta, se obtuvieron niveles significativamente mayores en los enfermos de EPID respecto a los controles. La concentración sérica de TGF-beta en los enfermos fue de  $18,49\text{ ng/mL} \pm 1,1$  y en controles sanos de  $10,47\text{ ng/mL} \pm 0,3$  ( $p < 0,001$ ). (tabla 9) (figura 7).

Parámetro	Enfermos (n= 55)	Controles (n= 30)	P
TGFbeta (ng/mL)	$18,49 \pm 1,1$	$10,47 \pm 0,3$	$< 0,001$

Tabla 9: Valores medios de TGF-beta en sujetos con EPID y controles sanos. Valores expresados como media  $\pm$  ESM.

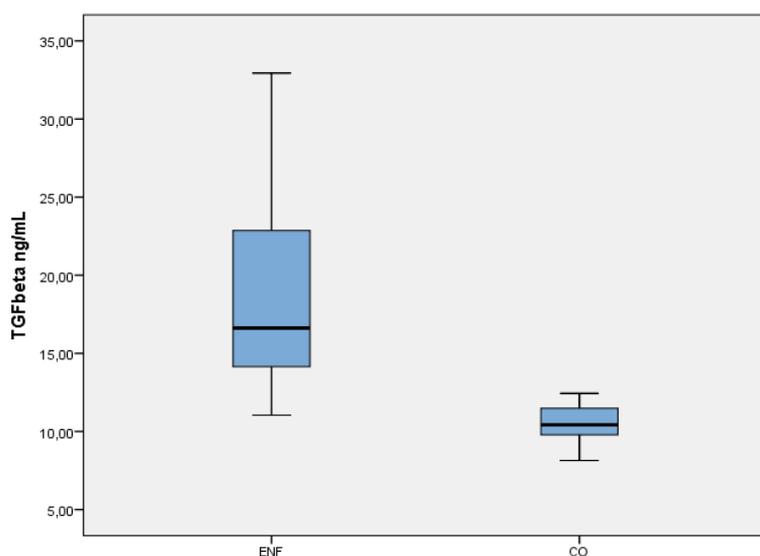


Figura 7: Niveles séricos totales de TGF-beta en sujetos con EPID (ENF) y controles sanos (CO).

## Diferencias entre enfermos de FPI y EPID-CTD

En cuanto a los niveles del grupo de FPI para TGF-beta ( $19,98\text{ng/mL} \pm 2,3$ ) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto a los valores del grupo de EPID-CTD ( $18,20\text{ng/mL} \pm 1,9$ ) ( $p = 0,26$ ). Ambos grupos mostraron diferencias estadísticamente significativas frente al grupo control ( $p < 0,001$ ).

### 4.2.5. BALANCE FINAL ENTRE LOS PRODUCTOS RESULTADOS DE TGF-BETA/ LPA: Diferencias entre enfermos de EPID y voluntarios sanos

Dado que TGF-beta realiza sus funciones de aumento de producción de colágeno en la ECM tras la activación de la vía de señalización mediada por LPA, se evaluó el cociente TGF-beta/ LPA del grupo de pacientes con EPID en comparación con el grupo de controles sanos. El valor del cociente TGF-beta/ LPA en los enfermos fue de  $195,75 \pm 17$  y en controles sanos de  $66,90 \pm 6$  ( $p < 0,001$ ). (Tabla 10).

Parámetro	Enfermos (n= 55)	Controles (n= 30)	P
TGF-beta/ LPA	$195,75 \pm 17$	$66,90 \pm 6$	$< 0,001$

Tabla 10: Valores medios de TGF-beta/ LPA en sujetos con EPID y controles sanos. Valores expresados como media  $\pm$  ESM.

### 4.3. ANALISIS DE CURVAS ROC PARA DIFERENCIAR PACIENTES CON EPID (FPI Y EPID-CTD) RESPECTO A VOLUNTARIOS SANOS

El análisis de las curvas ROC (del inglés *receiver operating characteristic curve*), se utilizó para evaluar la capacidad de discriminación de los distintos biomarcadores séricos entre pacientes con EPID y sujetos sanos.

### 4.3.1. Curva ROC para SP-A y SP-D

La estimación puntual del AUC para SP-A y SP-D en sujetos enfermos se expone a continuación:

- SP-A de 0,74 (95% CI = 0,53-0,95). Valor óptimo de SP-A en 1922,98 pg/mL, con una sensibilidad del 88,9% y especificidad del 66,7%.
- SP-D de 0,61 (95% CI = 0,36-0,86). Valor óptimo de SP-D en 10,01 ng/mL, con una sensibilidad del 68,4% y especificidad del 66,7%.

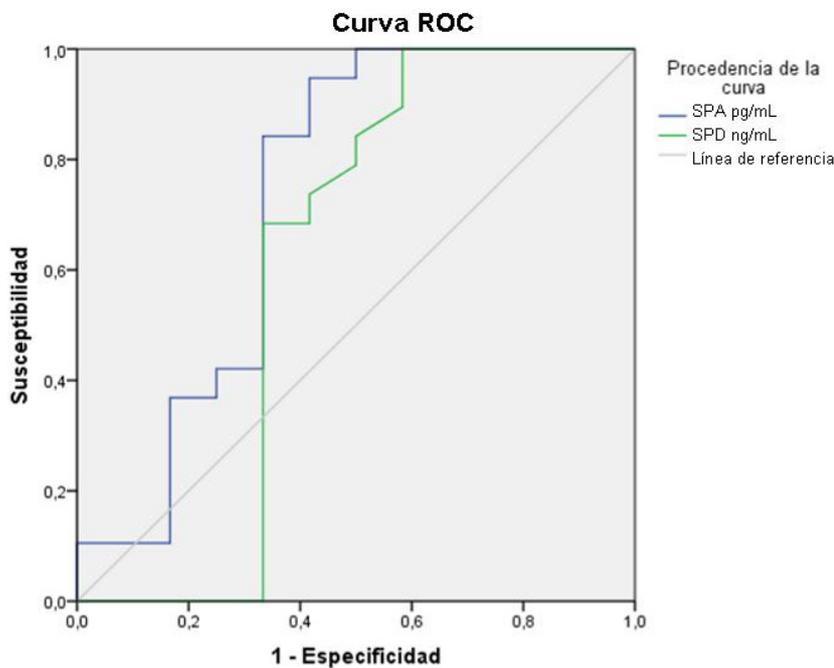


Figura 8: Poder discriminante de SP-A y SP-D.

### 4.3.2. Curva ROC para sistema LPA

Las AUCs para LPA y RLPA<sub>1</sub> en sujetos enfermos se exponen a continuación:

- LPA de 0,97 (95% CI = 0,94-1). Valor óptimo de LPA en 173,21 nM, con una sensibilidad del 90,9% y especificidad del 86,7%.
- Receptores de LPA1 de 0,67 (95% CI = 0,50-0,89). Valor óptimo de receptores de LPA en 3,34  $\mu$ mol/L, con una sensibilidad del 68,2% y especificidad del 60,0%.

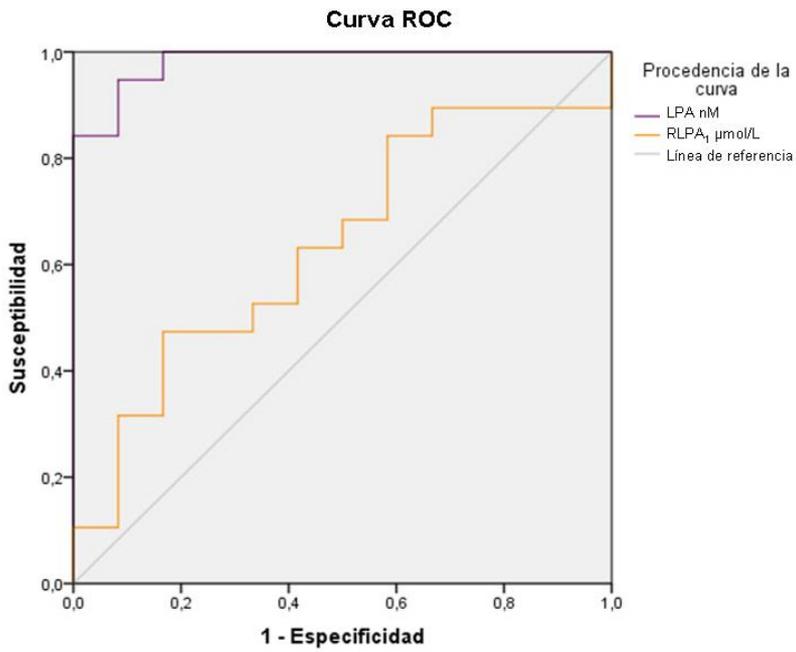


Figura 9: Poder discriminante de LPA y RLPA1.

#### 4.3.3. Curva ROC para ATX

La estimación puntual del AUC para ATX en sujetos enfermos fue de 0,77 (95% CI = 0,59-0,94). El valor óptimo de corte para ATX se estableció en 873,12 ng/mL, con una sensibilidad del 72,2% y especificidad del 83,3%.

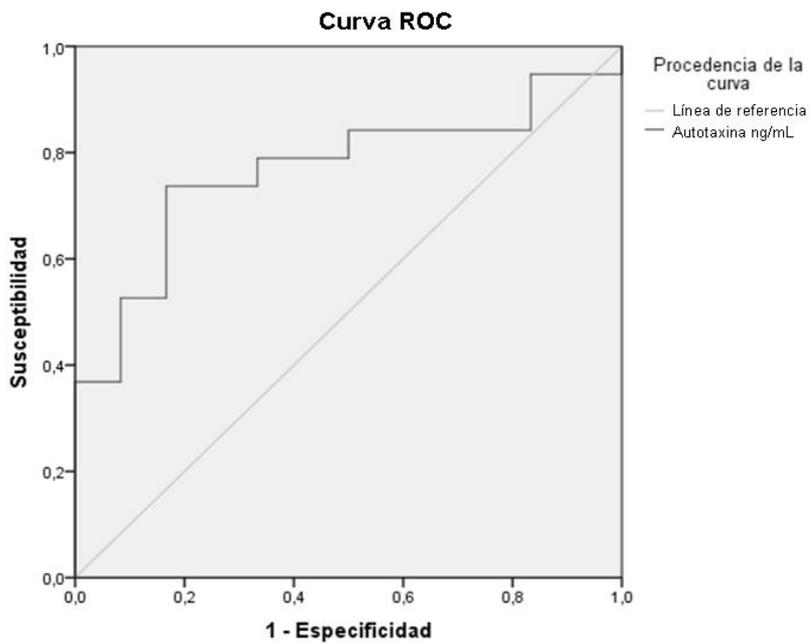


Figura 10: Poder discriminante de ATX.

#### 4.3.4. Curva ROC para TGF-beta

Para TGF-beta se estableció un valor óptimo de corte en 11,59 ng/mL, con una sensibilidad del 90,9% y especificidad del 80,0%. El AUC para TGF-beta fue de 0,95 (95% CI = 0,89-1).

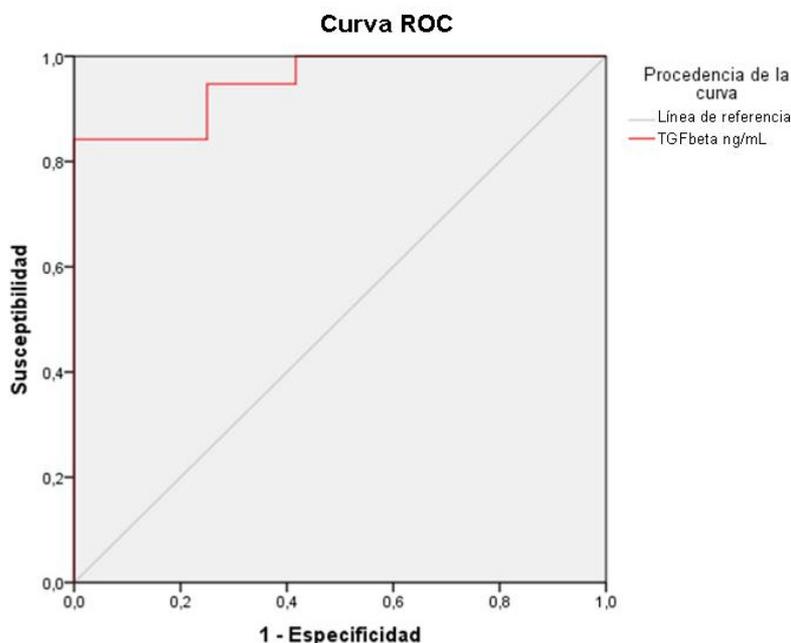


Figura 11: Poder discriminante de TGF-beta.

#### 4.3.5. Curva ROC para balance TGF-beta/ LPA

Para el cociente TGF-beta/ LPA se estableció el valor óptimo de corte en 80,07, con una sensibilidad del 100% y especificidad del 91,7%. El AUC para el cociente TGF-beta/ LPA fue de 0,99 (95% CI = 0,97-1).

### 4.4. RELACIÓN ENTRE LOS BIOMARCADORES SÉRICOS Y LA CLÍNICA DE LOS PACIENTES CON EPID

A excepción de la función pulmonar, no se ha encontrado relación entre los marcadores séricos y las variables clínicas a estudio, tal y como se desprende del análisis estadístico.

Se muestran a continuación los resultados obtenidos del análisis de la relación existente entre los biomarcadores estudiados y la función pulmonar además del curso evolutivo de la enfermedad. En este último caso, el análisis de la evolución objetiva de la enfermedad incluye otros factores como el grado de disnea, deterioro de la función respiratoria y hallazgos en la TACAR.

#### 4.4.1. Factores séricos y función pulmonar

En el análisis, sólo se han encontrado diferencias significativas entre la función pulmonar y el nivel sérico determinado en dos de los biomarcadores estudiados (tabla 11).

Se dividieron a los pacientes en dos grupos en función del FVC%, según valor superior o igual al 55% o inferior. En el caso de los niveles de LPA (p 0,004) y el cociente TGF-beta/LPA (p 0,005) se apreció una relación entre la función pulmonar y la determinación del biomarcador, de modo que los niveles de LPA y del cociente TGF-beta/ LPA eran significativamente mayores en el grupo con FVC  $\geq$  55%.

Parámetro	FVC% $\geq$ 55%	FVC% < 55%	P
SP-A	1969,83 $\pm$ 107,2	2088,44 $\pm$ 73,5	0,42
SP-D	13,50 $\pm$ 1,5	11,05 $\pm$ 1,2	0,18
TGF-beta	19,43 $\pm$ 1,6	17,37 $\pm$ 1,7	0,57
LPA	446,71 $\pm$ 59,9	377,91 $\pm$ 29,93	<b>0,004</b>
RLPA <sub>1</sub>	5,12 $\pm$ 1,3	6,43 $\pm$ 1,5	0,55
ATX	1225,60 $\pm$ 124,3	1131,04 $\pm$ 202,6	0,53
TGF-beta/LPA	221,60 $\pm$ 29,8	188,24 $\pm$ 16,0	<b>0,005</b>

Tabla 11: Valores medios  $\pm$  ESM de los niveles séricos de los biomarcadores estudiados atendiendo a la capacidad pulmonar evaluada por el FVC%.

En cuanto al análisis de correlación (Spearman), no se encontró ninguna asociación entre los biomarcadores estudiados y los parámetros de función pulmonar (tabla 12).

Parámetro	Rho de Spearman	FVC mL	FEV1 mL
SP-A	Coef correlación	-0,012	0,099
	P	0,941	0,533
SP-D	Coef correlación	-0,019	-0,008
	P	0,903	0,958
TGF-beta	Coef correlación	-0,326	-0,248
	P	0,037	0,118
LPA	Coef correlación	-0,286	-0,216
	P	0,073	0,180
RLPA <sub>1</sub>	Coef correlación	-0,383	-0,351
	P	0,012	0,023
ATX	Coef correlación	-0,244	-0,230
	P	0,130	0,153
TGF-beta/LPA	Coef correlación	-0,263	-0,190
	P	0,111	0,253

*Tabla 12: Valores del coeficiente de correlación y significación (P) para la correlación de Spearman entre parámetros de función pulmonar y factores séricos.*

Al dividir a los pacientes en dos subgrupos según su nivel de DLCO% (mayor o igual al 45%, o inferior), no se apreciaron diferencias significativas (tabla 13).

Parámetro	DLCO% ≥ 45%	DLCO% < 45%	P
SP-A	1862,92 ± 251,2	2016,68 ± 85,4	0,31
SP-D	11,21 ± 2,8	13,37 ± 1,2	0,76
TGF-beta	17,40 ± 2,4	19,33 ± 1,5	0,63
LPA	380,65 ± 126,2	427,39 ± 49,0	0,95
RLPA <sub>1</sub>	4,84 ± 1,8	5,31 ± 1,3	0,46
ATX	1475,36 ± 119,8	1169,09 ± 149,1	0,11
TGF-beta/LPA	192,83 ± 54,8	212,09 ± 24,4	0,84

Tabla 13: Valores medios ± ESM de los niveles de los biomarcadores estudiados atendiendo a la capacidad de difusión del monóxido de carbono (DLCO %).

Los puntos de discriminación indicados para FVC y DLCO que se muestran en las tablas 11 y 13 son usados habitualmente en la práctica clínica dentro de la consulta monográfica de EPID para diferenciar a aquellos pacientes con un grado leve-moderado de la enfermedad (FVC ≥55%, DLCO ≥45%) de los que presentan un grado severo, que además condiciona un aumento de la mortalidad en pacientes con esta patología al ser factores predictores de mal pronóstico (5), la presencia de insuficiencia respiratoria grave (5), la exclusión del paciente para entrar como candidato en lista de espera para trasplante pulmonar (88) y el límite para la prescripción e inicio de terapia antifibrótica (89).

#### 4.4.2. Factores séricos y evolución de la enfermedad

Dado que los niveles de biomarcadores estudiados se encuentran significativamente elevados en pacientes con EPID respecto a controles sanos, se realizó un análisis para comprobar si existían igualmente diferencias entre dichos niveles atendiendo como variable principal al curso evolutivo de la enfermedad. Se establecieron dos grupos: sujetos que mantenían estabilidad o discreta mejoría y aquellos que presentaban empeoramiento. En el

test de comparación de muestras, no se obtuvieron diferencias entre pacientes con estabilidad/ mejoría de la EPID respecto a los que habían experimentado un empeoramiento de la misma. Los resultados del análisis se muestran en la tabla 14.

Los dos grupos respecto a la evolución de la enfermedad se configuraron a través de los criterios de la ATS/ERS establecidos para la FPI y que son aplicables al conjunto de las EPID. Se valoran el grado de disnea, variaciones en volúmenes pulmonares (pruebas de función pulmonar), nivel de saturación de oxígeno y grado de extensión de afectación parenquimatosa en TACAR (90).

Parámetro	Estabilidad/ mejoría	Empeoramiento	P
SP-A	2028,17 ± 79,4	2020,94 ± 115,7	0,65
SP-D	14,67 ± 1,2	10,77 ± 1,2	0,64
TGF-beta	18,46 ± 1,3	17,3 ± 2,2	0,20
LPA	372,19 ± 47,9	420,70 ± 43,5	0,47
RLPA <sub>1</sub>	4,74 ± 0,9	7,02 ± 1,6	0,15
ATX	1150,65 ± 130,6	1239,79 ± 193,8	0,56
TGF-beta/LPA	183,05 ± 77,1	209,40 ± 23,6	0,97

*Tabla 14: Valores medios ± ESM de los niveles de los biomarcadores estudiados atendiendo a la evolución objetiva de la enfermedad (estabilización o empeoramiento).*

# 5. DISCUSIÓN

## 5.1. GENERALIDADES

Como se describió en la introducción, las EPID son un grupo muy heterogéneo de patologías pulmonares con afectación predominante del intersticio pulmonar, así como de otras estructuras tales como las células epiteliales alveolares, las vías respiratorias pequeñas y la vasculatura asociada. Las alteraciones presentes se caracterizan por una infiltración de materia tanto celular como no celular a nivel del parénquima pulmonar.

Desde los cambios iniciados en 2001 para la nueva clasificación de las EPID en el consenso de la ATS/ERS, ha existido una mejora exponencial en la comprensión de los mecanismos patogénicos clave implicados en el desarrollo y la progresión de la FPI, por ejemplo. Sin embargo, esta mejora en la clasificación de las patologías no elude la realidad de la superposición de características a nivel clínico, radiológico e histológico que se produce entre las distintas entidades. Todo ello requiere la utilización de múltiples recursos para la obtención de un diagnóstico definitivo, que será establecido por un equipo multidisciplinar compuesto por expertos en EPID de distintas especialidades (radiología, anatomía patológica y neumología) (11).

En el siglo pasado, fue ampliamente aceptado que el *gold standar* para el diagnóstico de las EPID era la confirmación histológica mediante una biopsia histológica; la clínica y hallazgos radiológicos eran considerados como insatisfactorios o que aportaban sólo una información parcial para la clasificación. Sin embargo, en la actualidad, se reconocen las limitaciones de un diagnóstico puramente histológico además del hecho de que muchos pacientes, dado el estadio de su enfermedad o la comorbilidad, no son candidatos a la realización de una biopsia quirúrgica. Por otra parte, un factor de confusión adicional en la evaluación histológica de las biopsias es el problema del *error de muestreo* o la posibilidad de que la muestra obtenida pertenezca a un área no representativa del proceso de enfermedad predominante (13).

Por todo lo expuesto hasta el momento, se pone de manifiesto la importancia de herramientas que permitan establecer un diagnóstico lo más fiable posible de cara también al manejo del curso evolutivo de la enfermedad y de la instauración o monitorización de un tratamiento, sobre todo en el panorama terapéutico actual con la aparición de nuevos fármacos.

El papel de los biomarcadores en las EPID podría llegar a ser fundamental para ayudar al diagnóstico, identificar los subgrupos de enfermedades y determinar la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento (44). El paradigma actual sobre los mecanismos que conducen desde un pulmón normal a uno fibrótico, postula que un mecanismo lesional crónico conduce a la activación aberrante de un proceso de reparación caracterizado por la proliferación y activación de fibroblastos junto con una síntesis de ECM no controlada. Precisamente a este nivel, en la formación y remodelación de la matriz, se encuentran implicadas las moléculas más estudiadas actualmente.

Como se ha reflejado en los objetivos expuestos en este trabajo, se evaluaron factores asociados con la remodelación de la ECM y la reparación del daño tisular para distinguir entre pacientes con EPID y controles sanos, así como estudiar diferencias entre FPI, NINE y EPID-CTD. La FPI fue una de las patologías referenciadas dado que es la más frecuente de las enfermedades pulmonares parenquimatosas difusas, con un diagnóstico de exclusión, y cuenta con un pronóstico devastador. A su vez, es de las EPID en la que más se ha avanzado desde el punto de vista de la terapéutica con la aparición de fármacos como pirfenidona y nintedanib (91) y los actualmente en estudio relacionados con el eje ATX/ LPA y TGF-beta (63) (64) (78) (79).

Así, se han determinado los valores serológicos de los siguientes factores como posibles biomarcadores:

- Proteínas del surfactante (SP-A y SP-D).
- Sistema LPA (LPA, receptor y autoxaxina).
- TGF-beta.

- Cociente TGF-beta/ LPA.

Las dos poblaciones a estudio, pacientes de EPID y voluntarios sanos, presentaron similares características demográficas y muy similar hábito tabáquico, principalmente en FPI. En el caso de EPID-CTD, para el número de fumadores actuales, y en NINE en el número de no fumadores (tabla 4). En cambio, los parámetros de función respiratoria fueron significativamente menores en los pacientes comparado con los controles (FVC%, p 0,006; FEV1%, p 0,001. Tabla 5).

## 5.2. NIVELES DE SP: AUMENTO DE SP-A EN PACIENTES CON EPID

En la determinación de los niveles de las proteínas del surfactante, sólo obtuvimos un aumento significativo de la concentración de SP-A de los sujetos con EPID (2030,47pg/mL  $\pm$  60,2) respecto a los sanos (1497,98 pg/mL  $\pm$  168,2). El incremento fue de un 34%. En la determinación de SP-D no se encontraron diferencias entre ambos grupos (12,98  $\pm$  0,9 en sujetos con EPID y 18,68 pg/mL  $\pm$  4,5 en el grupo de controles sanos). Tampoco en el análisis entre pacientes de FPI y EPID-CTD.

El incremento de las concentraciones séricas de SP-A y SP-D queda patente en diferentes EPID, incluyendo la FPI, respecto a controles sanos (92) (93) (94). Debido a que las proteínas surfactantes son sintetizadas y secretadas por las células del epitelio alveolar tipo II, sus niveles séricos pueden reflejar alteraciones en la producción y secreción de dichas proteínas, aumentando la permeabilidad de la barrera endotelial. Los mecanismos que subyacen a esta elevación, probablemente incluyen una combinación de lesión epitelial y ruptura junto con una mayor acumulación de ECM por hiperplasia. El procesamiento aberrante de las SP por el retículo endoplásmico, ha estado involucrado en la patogénesis de la FPI al igual que defectos genéticos en los genes codificadores para las SP (como la sobreexpresión del gen SPA1), que se ha identificado en algunos pacientes con progresión de la enfermedad en comparación con aquellos con enfermedad relativamente estable (95). La diferencia de concentración entre el espacio aéreo alveolar y el sanguíneo y la reducción

de la depuración de las SP, contribuye a la elevación de los niveles séricos de SP-A y SP-D. En el caso concreto de la FPI, la elevación de estas proteínas puede ser resultado de la susceptibilidad genética y ambiental. Takahashi y colaboradores sugieren que las SP-A y SP-D son objeto de una sobreproducción a nivel de los alvéolos, siendo transferidas posteriormente a la sangre circulante, y que su concentración en suero aumenta en presencia de cambios inflamatorios activos (alveolitis) pero no aumenta en presencia sólo de fibrosis (96). En los hallazgos de TAC torácico realizados en su estudio, la elevación en suero de SP-A y SP-D se relacionó con la extensión de la opacidad del vidrio deslustrado pero no con la panalización (97).

Por otro lado, se han realizado estudios sobre los niveles de estas proteínas y su correlación con la progresión de la enfermedad o mortalidad, encontrándose que los niveles elevados de SP-A se asocian a un incremento del riesgo de mortalidad, sin encontrarse dicha relación con los niveles de SP-D (98).

En revisiones sistemáticas de la literatura, se destaca que los niveles de SP-D pueden ser útiles para diferenciar los pacientes con FPI de aquellos con infecciones respiratorias o controles sanos, pero no para diferenciarlos de pacientes con otra EPID distinta (99). Ishii y colaboradores presentaron un estudio donde obtuvieron niveles séricos de SP-A en pacientes con patrón NIU significativamente más altos que en pacientes con otros patrones (como el NINE) (94), aunque afirman que la evidencia disponible no es suficiente para usarlo como marcador discriminativo entre grupos de EPID. El hecho de que SP-A se encuentre más elevado en FPI (patrón NIU) puede ser uno de los factores que influya en que en nuestro estudio exista elevación de SP-A sérica significativa y no de SP-D, ya que el grupo de pacientes tiene una alta representación de FPI respecto a EPID-CTD. Sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas entre los niveles de SP-A y SP-D determinados y analizados por grupos de EPID.

El proceso de exacerbación aguda en la FPI se caracteriza por un empeoramiento agudo de la disnea, desarrollo potencial de insuficiencia respiratoria hipoxémica y aparición de nuevos o progresión de los ya presentes infiltrados pulmonares en las pruebas de

imagen. Según el estudio realizado por Kim y colaboradores (100), existen diferencias entre los niveles séricos de SP-A y SP-D en la FPI estable y en la agudización, de modo que en esta última se observan niveles más elevados en comparación con los pacientes que presentan una situación basal estable. Este hecho, puede ser resultado de anomalías funcionales de las células epiteliales alveolares tipo II, incluidas las lesiones de las células endoteliales y las anomalías en la coagulación. La combinación de las SP en suero con otros predictores puede mejorar la precisión para el diagnóstico de exacerbaciones de la FPI.

Este hallazgo, junto con lo expuesto respecto a la relación establecida con los patrones de extensión del vidrio deslustrado, podría justificar el uso de las SP como marcadores evolutivos de enfermedad y/o de respuesta a tratamientos antifibróticos. Así, cambios observados en los niveles séricos de SP-A podrían utilizarse en la monitorización de la terapia con fármacos antifibróticos como pirfenidona o nintedanib en pacientes con FPI (101). En nuestro estudio, los pacientes que participaron se encontraban en fase estable de la enfermedad, sin criterios clínicos en el momento de la valoración de exacerbación en curso. Sería de interés realizar la comparación de los niveles de las SP séricas en la fase estable de la EPID en relación con los presentes en episodio de exacerbación aguda.

En cuanto a la supervivencia en FPI, no existen hallazgos concluyentes para SP-A ni SP-D sobre la mejora de la determinación de los tiempos de la misma cuando se incorpora su determinación a modelos clínicos (incluyendo edad o parámetros de función pulmonar como FVC o TLCO) (102). Los resultados obtenidos en el presente trabajo, tampoco muestran relación entre los niveles de las SP y los parámetros de función pulmonar o evolución de la enfermedad.

### 5.3. SISTEMA LPA: NIVELES DE LPA Y RLPA<sub>1</sub> AUMENTADOS EN PACIENTES CON EPID

Tantos los niveles de LPA en suero como los de su receptor RLPA<sub>1</sub> eran mayores en los pacientes con EPID (393,46 nM ± 34 para LPA y 5,63 μmol/L ± 0,8 para su receptor) que en los controles sanos (122,94 nM ± 13 para LPA y 3,31 μmol/L ± 0,6 respectivamente). Hay que destacar especialmente el papel del LPA con un AUC de 0,97 (95% CI = 0,94-1), estableciéndose una sensibilidad del 90,9% y especificidad del 86,7% para el valor óptimo de 173,21 nM. Esto determinaría la importancia de LPA para ser considerado como biomarcador en este tipo de patologías.

Dado que el LPA tiene funciones a nivel de promoción de la activación de la apoptosis de células epiteliales y la remodelación parenquimatosa por acción de los fibroblastos, estos resultados coinciden con los descritos en otros estudios en los que los niveles de LPA se encuentran aumentados en pacientes con patologías fibróticas a nivel pulmonar. La estimulación mediante LPA de las células epiteliales bronquiales normales humanas, aumenta la formación de fibras de estrés y reorganiza la integrina αvβ6 en sus extremos, lo que conduce a la activación de TGF-beta. TGF-beta tiene una participación, como factor profibrótico, bien establecida en la patogénesis de las EPID por sus efectos sobre la lesión de las células epiteliales alveolares, la diferenciación de miofibroblastos, la transición epitelio-mesenquimal y el depósito y remodelación de ECM. Esta vía, la de la activación del TGF-beta, es otro mecanismo importante a través del cual LPA promueve la fibrosis pulmonar (103). De hecho, dentro de las nuevas terapias que se encuentran en ensayos fase II, encontramos el BG00011 (anticuerpo monoclonal anti-integrina αvβ6) que produce una supresión de TGF-beta mediante el bloqueo de la fosforilación de SMAD2 en lavado broncoalveolar. Su administración es semanal y por vía subcutánea, mostrándose segura y bien tolerada salvo la dosis más alta de 3mg/kg semanal (estudio SPIRIT, NCT03573505) (104). O la administración inhalada de GSK3008348, inhibidor de la integrina αvβ6 con resultados prometedores para el tratamiento de IPF (78).

Los niveles de RLPA<sub>1</sub> se encuentran igualmente elevados, pero no presentan un AUC (o poder discriminativo del test) tan favorable como para LPA. Esto puede ser debido, en parte, a que los niveles de RLPA<sub>1</sub> no son directamente proporcionales a los de LPA (105). Además, los mecanismos de expresión de los receptores se ven influidos por mecanismos reguladores que no son del todo bien conocidos. A nivel clínico, el antagonista del RLPA<sub>1</sub> BMS-986020, ha demostrado su eficacia y seguridad en un ensayo fase II (NCT01766817) con la dosis de 600mg cada 12 y 24 horas durante 26 semanas. Como eventos adversos se registraron elevaciones de las enzimas hepáticas en relación con la dosis administrada del fármaco, así como tres casos de colecistitis (104).

#### 5.4. NIVELES DE ATX ELEVADOS EN PACIENTES CON EPID

El papel de la ATX en el desarrollo de procesos de fibrosis pulmonar se encuentra íntimamente relacionado con su papel como enzima encargada de la conversión de la lisofosfatidilcolina en una molécula bioactiva como es el LPA. De hecho, ATX es considerado en la actualidad el responsable de la síntesis de la mayoría de LPA extracelular. El eje ATX/ LPA juega un papel muy importante en la etiopatogenia de las EPID, como ponen de manifiesto los numerosos estudios acerca del aumento de los niveles de ATX en líquidos biológicos de pacientes con EPID (60). Oikonomou y colaboradores examinaron el posible papel de ATX en el desarrollo de FPI realizando un análisis de su expresión en muestras de biopsias pulmonares de pacientes con fibrosis pulmonar y en modelo animal con fibrosis inducida por BLM. La eliminación genética de la expresión de ATX de las células epiteliales bronquiales y los macrófagos inflamatorios pusieron en valor el papel de ATX en el desarrollo de la fibrosis pulmonar al producirse como resultado la disminución de la gravedad de la enfermedad. Por otro lado, la inhibición farmacológica de ATX en ratones demostró ser eficiente en la atenuación del remodelado pulmonar que se desarrolla en el proceso de fibrosis (59).

Por ello, la literatura señala a la ATX como probable diana terapéutica, principalmente por los estudios que demuestran su aumento en pacientes con FPI a nivel de células epiteliales bronquiales, epiteliales alveolares y macrófagos (106). En nuestra muestra de pacientes se observa dicho aumento significativo de los niveles de ATX en suero en pacientes con EPID respecto a los controles sanos. Teniendo en cuenta la relación de la ATX en la generación del LPA, los resultados obtenidos para ambas determinaciones séricas coinciden con lo referido anteriormente en los estudios realizados hasta el momento (en los enfermos fue de 1204,26 ng/mL  $\pm$  97 y en controles sanos de 792,55 ng/mL  $\pm$  89).

GLPG1690 es un inhibidor selectivo de la ATX que se administra por vía oral (dosis 600mg/día). Reduce la migración celular y producción de tenascina-C y colágeno, actuando directamente sobre las concentraciones séricas del eje ATX/ LPA. En el ensayo clínico FLORA (fase II), el fármaco se mostró seguro y bien tolerado y en la actualidad se evalúa en combinación con nintedanib o pirfenidona (ensayo clínico ISABELA, fase III) (89).

## 5.5. NIVELES DE TGF-BETA AUMENTADOS EN PACIENTES CON EPID

El análisis de nuestros resultados evidenció un incremento de los niveles de TGF-beta séricos en pacientes con EPID (18,49 ng/mL  $\pm$  1,1) respecto a los controles sanos (10,47 ng/mL  $\pm$  0,3;  $p < 0,001$ ). Al igual que en el caso de LPA, hay que destacar el papel de TGF-beta con un AUC de 0,95 (95% CI = 0,89-1), estableciéndose una sensibilidad del 90,9% y especificidad del 80,0% para el valor óptimo de 11,59 ng/mL. Esto determinaría la importancia de TGF-beta para ser considerado también como biomarcador en este tipo de patologías.

Son numerosos los estudios que ponen de manifiesto el papel primordial del TGF-beta en el proceso fibrótico, interviniendo en la fibrosis parenquimatosa e intersticial, así como en la remodelación vascular y de las vías respiratorias (107) (108) (109) (110). La participación de TGF-beta en la fibrosis pulmonar ha sido ampliamente documentada con

niveles elevados del factor de crecimiento tanto en modelos animales de fibrosis pulmonar como en pacientes con FPI o asma bronquial (85). Los resultados obtenidos en nuestro estudio son consecuentes con los reflejados en la bibliografía existente. Sin embargo, no se han referenciado en la literatura estudios que comparen los niveles de TGF-beta en distintas EPID para ver si existe un poder discriminativo de este factor. En el trabajo presentado no hemos hallado diferencias entre los niveles obtenidos en pacientes FPI y EPID-CTD.

Es este factor, por tanto, un objetivo terapéutico a tener en cuenta en las EPID. Concretamente la pirfenidona, indicada en el tratamiento de la FPI, atenúa la producción y acción del TGF-beta, reduciendo la disminución del FVC en pacientes con dicha patología (111) (112). Parece que dicho factor podría ser no solo un buen biomarcador a determinar en el estudio de las EPID, sino que podría ser indicativo de la respuesta favorable del paciente a un determinado tratamiento, como es el caso de la pirfenidona.

TGF-beta se encuentra relacionado con otros marcadores séricos estudiados en el presente trabajo, las SP. Debido al efecto que TGF-beta tiene sobre el epitelio alveolar (concretamente las células alveolares tipo II), influye sobre el sistema productor de surfactante y más concretamente, disminuye la expresión de SP-A, SP-B y SP-C. En pacientes con FPI, las células alveolares tipo II son una abundante fuente de TGF-beta y, el surfactante producido en ellas, tiene alterada la composición proteica y de fosfolípidos provocando una reducción de la tensión superficial así como el colapso y pérdida de unidades alveolares (113). Menos conocidos son los efectos de TGF-beta sobre la regulación de SP-D. En el estudio realizado por Correll y colaboradores sobre los efectos de TGF-beta en células alveolares tipo II de pulmones de donantes humanos (no candidatos para ser transplantados), se observó que esta citoquina reducía los niveles de mRNA de SP-A y SP-B pero no los de SP-D (113). Probablemente este hecho responda a que SP-D se encuentra regulado por otras vías además de por TGF-beta.

## 5.6. COCIENTE TGF-BETA/ LPA ELEVADO EN PACIENTES CON EPID

La relación establecida entre TGF-beta y LPA ha sido detallada anteriormente en este documento, encontrándose LPA directamente relacionado con la activación del TGF-beta a nivel tisular y el desarrollo de procesos profibróticos. Se decidió, por tanto, valorar el cociente TGF-beta/ LPA en la población estudiada, obteniéndose que dicho cociente se encontraba significativamente elevado en paciente con EPID ( $195,75 \pm 17$ ) respecto a voluntarios sanos ( $66,90 \pm 6$ ).

En la literatura no se han hallado descripciones previas sobre este cociente, siendo por tanto este trabajo el primero en el que se estudia y valora su utilidad. Como se desprende del resultado de la curva ROC para este cociente (AUC 0,99; 95% CI = 0,97-1. Punto de corte 80,07; S 100%, E 91,7%), y al igual que ocurre con TGF-beta y LPA, este cociente puede considerarse un buen biomarcador.

## 5.7. POSIBLES BIOMARCADORES DE EPID: TGF-BETA, LPA Y COCIENTE TGF-BETA/ LPA

Tras los resultados obtenidos en este trabajo, se proponen como biomarcadores séricos capaces de diferenciar pacientes de FPI y EPID-CTD de individuos sanos a TGF-beta, LPA y cociente TGF-beta/ LPA.

Los valores séricos de estos biomarcadores en pacientes con EPID fueron todos más elevados que los valores de los mejores puntos de corte para TGF-beta, LPA y cociente TGF-beta/ LPA (11,59 ng/mL, 173,21 nM, 80,07 respectivamente), mientras que en los voluntarios sanos fueron menores (tablas 7, 9 y 10). Como se observa en las curvas ROC, los valores de AUC mostraron una excelente capacidad predictiva (AUC > 0,9) al comparar pacientes con voluntarios sanos, con puntos de corte con una alta sensibilidad y especificidad: TGF-beta: *cutoff* 11,59 ng/mL, S 90,9%, E 80,0%; AUC de 0,95 (95% CI = 0,89-1). LPA: *cutoff* 173,21 nM, S 90,9%, E 86,7%; AUC de 0,97 (95% CI = 0,94-1). Cociente TGF-beta/ LPA: *cutoff* 80,07, S 100%, E 91,7%; AUC de 0,99 (95% CI = 0,97-1).

Con respecto al resto de mediadores analizados, SP-A y ATX, también presentaron niveles séricos significativamente más elevados que los encontrados en el grupo control (tablas 6 y 8), pero con un valor predictivo menor, aunque bueno, como se desprende del análisis de las curvas ROC; valores de AUC en torno al 0,75: SP-A 0,74 (95% CI = 0,53-0,95); ATX: AUC de 0,77 (95% CI = 0,59-0,94) y puntos de corte con menor sensibilidad y especificidad. Al igual que observamos con los biomarcadores TGF-beta, LPA y cociente TGF-beta/ LPA, los valores séricos de ATX en pacientes con EPID fueron más elevados que el valor óptimo del punto de corte (872,12 ng/mL, S 72,2%, E 83,3%), hecho que no ocurrió con el punto de corte de SP-A, cercano a los valores encontrados en los pacientes (1922,98 pg/mL, S 88,9%, E 66,7%). Finalmente, el análisis de las curvas ROC para SP-D y RPLA<sub>1</sub>, mostraron que la capacidad predictiva de estos parámetros fue baja con valores de AUC < 0,75 y puntos de corte con sensibilidad y especificidad < 70%: SP-D: *cutoff* 10,01 pg/mL, S 68,4%, E 66,7%; AUC de 0,61 (95% CI = 0,36-0,86). RLPA<sub>1</sub>: *cutoff* 3,34 μmol/L, S 68,2%, E 60,0%; AUC de 0,67 (95% CI = 0,50-0,89).

Por tanto, según esta serie de casos TGF-beta, LPA y cociente TGF-beta/ LPA pueden considerarse biomarcadores potenciales para el diagnóstico de FPI y EPID-CTD frente a individuos sanos. La determinación de estos dos factores profibróticos podría incluirse en el diagnóstico de pacientes seleccionados con sospecha de EIPD o bien con patologías relacionadas con el desarrollo de EPID en su curso evolutivo. De esta forma obtendríamos, unido a la determinación del cociente entre ambos, un mayor poder discriminativo para el diagnóstico de EPID. Además, ambos mediadores podrían utilizarse como herramientas útiles en el seguimiento de los nuevos tratamientos antifibróticos principalmente de la FPI, proporcionando nuevos conocimientos para futuras investigaciones en el contexto de las terapias antifibróticas.

Por otro lado, no se ha encontrado correlación de los diferentes mediadores estudiados para la diferenciación de FPI respecto de EPID-CTD, y tampoco a nivel de los valores funcionales de FVC% y DLCO%.

En el caso de los niveles de LPA ( $p$  0,004) y el cociente TGF-beta/ LPA ( $p$  0,005) se apreció una relación entre la función pulmonar y la determinación del marcador, de modo que los niveles de LPA y del cociente TGF-beta/ LPA eran significativamente mayores en el grupo con FVC%  $\geq 55\%$ . Si tenemos en cuenta que los niveles de estos marcadores séricos son mayores en pacientes con EPID, en cuya evolución se produce un deterioro de la función pulmonar con una reducción progresiva de la FVC, no está clara la importancia de este hallazgo en los resultados. Para establecer si mejores niveles de FVC se corresponden con mayores niveles de LPA y TGF-beta/ LPA, sería preciso aumentar la población de estudio y realizar análisis por subgrupos atendiendo a la gravedad o extensión de la enfermedad (clasificando por clase funcional, por ejemplo, o bien por extensión del patrón fibrótico a nivel radiológico). De este modo podría aclararse si pacientes con menor grado de afectación pulmonar por EPID y que, por tanto, tienen valores de FVC más altos, disponen de unos mecanismos de producción de marcadores séricos conservados y mayores niveles de los mismos respecto a pacientes con mayor progresión de la enfermedad.

En este sentido, son cada vez más los autores que destacan la importancia de plantear la asociación de distintos marcadores junto con otros valores clínicos (edad, valores de pruebas funcionales o alteraciones de la TACAR) para alcanzar mayor nivel de significación en la aplicación de estos parámetros.

Este estudio no está exento de limitaciones, primero, es un estudio unicéntrico, lo que limita la validez externa del trabajo. Segundo, el pequeño tamaño de la muestra no nos permite estudiar el efecto de diferentes variables (tabaco, edad, clase funcional, tiempo desde el diagnóstico, etc.) sobre los niveles encontrados de estos mediadores o su relación con la función pulmonar.

Teniendo en cuenta los resultados de este trabajo, las determinaciones de los niveles séricos de FGF-beta y LPA en pacientes con EPID, podrían postular a estos mediadores profibróticos como potenciales biomarcadores en el estudio y diagnóstico de dichas patologías, pero también, podrían ayudar a monitorizar la respuesta a un determinado tratamiento, principalmente en el contexto de las nuevas terapias antifibróticas.



## 6. CONCLUSIONES

1. Los valores séricos de los factores asociados con la remodelación de la matriz extracelular y la reparación del daño tisular estudiados en los pacientes con enfermedad pulmonar intersticial difusa, se encuentran aumentados al compararlos con los valores encontrados en individuos sanos, con la excepción de SP-D.
2. Los valores séricos de los factores estudiados no muestran diferencias significativas entre pacientes con fibrosis pulmonar idiopática y pacientes con enfermedad pulmonar intersticial difusa asociada a conectivopatías, por lo que no poseen valor diferencial para ambas patologías.
3. Los análisis de las curvas ROC para identificar el poder discriminatorio de los diferentes marcadores entre pacientes con enfermedad pulmonar intersticial difusa y voluntarios sanos, permiten considerar a TGF-beta, LPA y su cociente como potenciales biomarcadores diagnósticos para esta enfermedad.
4. El mediador TGF-beta presentaría una capacidad predictiva excelente, con un área bajo la curva de 0,95, una sensibilidad del 90,9% y una especificidad del 80,0% para el mejor punto de corte (11,59 ng/mL).
5. Asimismo, el mediador LPA presentaría igualmente una capacidad predictiva excelente, con un área bajo la curva de 0,97, una sensibilidad del 90,9% y una especificidad del 86,7% para el punto óptimo de corte de 173,21 nM.
6. La alta sensibilidad y especificidad también presentadas por el cociente TGF-beta/ LPA (sensibilidad del 100% y especificidad del 91,7% para el punto de corte de 80,07) y el área bajo la curva de 0,99, harían de dicho cociente un excelente biomarcador para la enfermedad pulmonar intersticial difusa.
7. La modificación en los niveles séricos de estos dos biomarcadores podría también ayudar a la elección de un determinado tratamiento dirigido y/o a la monitorización de su respuesta, principalmente en el contexto de las nuevas terapias antifibróticas relacionadas con la inhibición del eje autotaxina/ LPA y TGF-beta.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Cabrera César EB. Biomarcadores en las enfermedades pulmonares intersticiales difusas [Internet]. [Málaga]: Universidad de Málaga (UMA); 2017. Disponible en: <https://riuma.uma.es/xmlui/handle/10630/16341>
2. American Thoracic Society, European Respiratory Society. International multidisciplinary consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias: general principles and recommendations. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165:277-304.
3. Ryu JH, Daniels CE, Hartman TE, Eunhee SY. Diagnosis of interstitial lung diseases. En: *Mayo Clinic Proceedings* [Internet]. Elsevier; 2007 [citado 9 de agosto de 2016]. p. 976–986. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025619611613402>
4. Demedts M, Wells AU, Antó JM, Costabel U, Hubbard R, Cullinan P, et al. Interstitial lung diseases: an epidemiological overview. *Eur Respir J*. 2001;18(32):2s-16s.
5. Fibrosis pulmonar idiopática. Barcelona: Respira-Fundación Española del Pulmón- SEPAR; 2015. 300 p.
6. Ancochea Bermúdez J, Miguel Díez J de. Enfermedades pulmonares intersticiales difusas. Majadahonda, Madrid: Ergon; 2008.
7. Lopez-Campos JL, Rodríguez-Becerra E. Incidence of interstitial lung diseases in the south of Spain 1998-2000: the RENIA study. *Eur J Epidemiol*. 2004;19(2):155-61.
8. Libro blanco: la neumología en España. Barcelona: Respira-Fundación Española del Pulmón- SEPAR; 2015.
9. European Respiratory Society. Interstitial lung diseases. En: *European Lung White Book* [Internet]. European Respiratory Society. Lausanne: ERS Ltd; 2013. p. 256-69. Disponible en: <http://www.erswhitebook.org/chapters/interstitial-lung-diseases/>
10. American Thoracic Society/ European Respiratory Society. International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165:277-304.
11. Travis WD, Costabel U, Hansell DM, King TE, Lynch DA, Nicholson AG, et al. An Official American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement: Update of the International Multidisciplinary Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 de septiembre de 2013;188(6):733-48.
12. Rodríguez Portal J, Díaz Baquero A, Rodríguez Becerra E. Enfermedades intersticiales difusas del pulmón. Fibrosis pulmonar idiopática. En: *Manual de*

diagnóstico y terapéutica en Neumología [Internet]. 3ª. Neumosur; p. 419-30. Disponible en: [https://www.neumosur.net/files/publicaciones/ebook/38-FPI-Neumologia-3\\_ed.pdf](https://www.neumosur.net/files/publicaciones/ebook/38-FPI-Neumologia-3_ed.pdf)

13. Interstitial lung disease guideline: the British Thoracic Society in collaboration with the thoracic Society of Australia and New Zealand and the Irish Thoracic Society. *Thorax*. 63(Suppl V):v1-58.
14. Álvarez-Sala JL, Casan P, Rodríguez de Castro F, Rodríguez JL, Villena V. *Neumología clínica*. 1ª. Barcelona: Elsevier España; 2010. 904 p.
15. Guiot J, Moermans C, Henket M, Corhay J-L, Louis R. Blood Biomarkers in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Lung*. junio de 2017;195(3):273-80.
16. Rindlisbacher B, Schmid C, Geiser T, Bovet C, Funke-Chambour M. Serum metabolic profiling identified a distinct metabolic signature in patients with idiopathic pulmonary fibrosis – a potential biomarker role for LysoPC. *Respir Res*. diciembre de 2018;19(1):7.
17. Xaubet A, Molina-Molina M, Sánchez M. Enfermedades pulmonares intersticiales difusas. *Arch Bronconeumol*. 2007;43:24–30.
18. Nguyen EV, Gharib SA, Schnapp LM, Goodlett DR. Shotgun MS proteomic analysis of bronchoalveolar lavage fluid in normal subjects. *PROTEOMICS - Clin Appl*. octubre de 2014;8(9-10):737-47.
19. Hernández-González F, Lucena CM, Ramírez J, Sánchez M, Jimenez MJ, Xaubet A, et al. Utilidad de la criobiopsia en el diagnóstico de la enfermedad pulmonar intersticial difusa: análisis de rentabilidad y coste. *Arch Bronconeumol*. junio de 2015;51(6):261-7.
20. Fibla JJ, Molins L, Blanco A, Royo Í, Martínez Vallina P, Martínez N, et al. Biopsia pulmonar por videotoracoscopia en el diagnóstico de la enfermedad pulmonar intersticial. Estudio prospectivo y multicéntrico en 224 pacientes. *Arch Bronconeumol*. marzo de 2012;48(3):81-5.
21. Raghu G, Rochweg B, Zhang Y, Garcia CAC, Azuma A, Behr J, et al. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline: Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Update of the 2011 Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 de julio de 2015;192(2):e3-19.
22. Xaubet A, Ancochea J, Bollo E, Fernández-Fabrellas E, Franquet T, Molina-Molina M, et al. Normativa sobre el diagnóstico y tratamiento de la fibrosis pulmonar idiopática. *Arch Bronconeumol*. agosto de 2013;49(8):343-53.
23. Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, et al. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Statement: Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Evidence-based Guidelines for Diagnosis and Management. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 de marzo de 2011;183(6):788-824.
24. Torrisi SE, Kahn N, Wälscher J, Sarmand N, Polke M, Lars K, et al. Possible value of antifibrotic drugs in patients with progressive fibrosing non-IPF interstitial lung diseases. *BMC Pulm Med*. diciembre de 2019;19(1):213.

25. Cottin V. Idiopathic interstitial pneumonias with connective tissue diseases features: A review: Interstitial pneumonia with CTD features. *Respirology*. febrero de 2016;21(2):245-58.
26. Vij R, Strek ME. Diagnosis and Treatment of Connective Tissue Disease-Associated Interstitial Lung Disease. *Chest*. marzo de 2013;143(3):814-24.
27. Fernández-Codina A, Fernández-Fernández J, Fernández-Pantiga A. Utilización de tocilizumab en la esclerosis sistémica: breve revisión de la literatura. *Rev Clínica Esp*. agosto de 2018;218(6):298-304.
28. Mathai SC, Danoff SK. Management of interstitial lung disease associated with connective tissue disease. *BMJ*. 24 de febrero de 2016;h6819.
29. Bagnato G, Harari S. Cellular interactions in the pathogenesis of interstitial lung diseases. *Eur Respir Rev*. marzo de 2015;24(135):102-14.
30. Marchal-Sommé J, Uzunhan Y, Marchand-Adam S, Kambouchner M, Valeyre D, Crestani B, et al. Dendritic cells accumulate in human fibrotic interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176(10):1007–1014.
31. Waghray M, Cui Z, Horowitz JC, Subramanian IM, Martinez FJ, Toews GB, et al. Hydrogen peroxide is a diffusible paracrine signal for the induction of epithelial cell death by activated myofibroblasts. *FASEB J*. 2005;19:854–856.
32. Marchal-Somme J, Uzunhan Y, Marchand-Adam S, Valeyre D, Soumelis V, Crestani B, et al. Cutting Edge: Nonproliferating Mature Immune Cells Form a Novel Type of Organized Lymphoid Structure in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *J Immunol*. 15 de mayo de 2006;176(10):5735-9.
33. Herazo-Maya JD, Noth I, Duncan SR, Kim S, Ma S-F, Tseng GC, et al. Peripheral Blood Mononuclear Cell Gene Expression Profiles Predict Poor Outcome in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Sci Transl Med*. 2 de octubre de 2013;5(205):205ra136-205ra136.
34. Khanna D, Tashkin DP, Denton CP, Renzoni EA, Desai SR, Varga J. Etiology, Risk Factors, and Biomarkers in Systemic Sclerosis with Interstitial Lung Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 de marzo de 2020;201(6):650-60.
35. Riou M, Alfatni A, Charles A-L, Andrès E, Pistea C, Charloux A, et al. New Insights into the Implication of Mitochondrial Dysfunction in Tissue, Peripheral Blood Mononuclear Cells, and Platelets during Lung Diseases. *J Clin Med*. 26 de abril de 2020;9(5):1253.
36. Parimon T, Yao C, Stripp BR, Noble PW, Chen P. Alveolar Epithelial Type II Cells as Drivers of Lung Fibrosis in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Int J Mol Sci*. 25 de marzo de 2020;21(7):2269.
37. Bargagli E, Refini RM, d'Alessandro M, Bergantini L, Cameli P, Vantaggiato L, et al. Metabolic Dysregulation in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Int J Mol Sci*. 7 de agosto de 2020;21(16):5663.



38. Lucas A, Yasa J, Lucas M. Regeneration and repair in the healing lung. *Clin Transl Immunol* [Internet]. enero de 2020 [citado 1 de octubre de 2020];9(7). Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cti2.1152>
39. Todd NW, Luzina IG, Atamas SP. Molecular and cellular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012;5(1):1.
40. Kuroki Y., Takahashi H., Chiba H., Akino T. Surfactant proteins A and D: disease markers. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis*. 1998;1408(2-3):334-45.
41. Han S, Mallampalli RK. The Role of Surfactant in Lung Disease and Host Defense against Pulmonary Infections. *Ann Am Thorac Soc*. mayo de 2015;12(5):765-74.
42. Pastva AM, Wright JR, Williams KL. Immunomodulatory Roles of Surfactant Proteins A and D: Implications in Lung Disease. *Proc Am Thorac Soc*. 1 de julio de 2007;4(3):252-7.
43. Carreto-Binaghi LE, Aliouat EM, Taylor ML. Surfactant proteins, SP-A and SP-D, in respiratory fungal infections: their role in the inflammatory response. *Respir Res* [Internet]. diciembre de 2016 [citado 20 de junio de 2018];17(1). Disponible en: <http://respiratory-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12931-016-0385-9>
44. Borensztajn K, Crestani B, Kolb M. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: From Epithelial Injury to Biomarkers - Insights from the Bench Side. *Respiration*. 2013;86(6):441-52.
45. Cañadas O, Olmeda B, Alonso A, Pérez-Gil J. Lipid-Protein and Protein-Protein Interactions in the Pulmonary Surfactant System and Their Role in Lung Homeostasis. *Int J Mol Sci*. 25 de mayo de 2020;21(10):3708.
46. Aikawa S, Hashimoto T, Kano K, Aoki J. Lysophosphatidic acid as a lipid mediator with multiple biological actions. *J Biochem (Tokyo)*. 1 de febrero de 2015;157(2):81-9.
47. Alsafadi HN, Staab-Weijnitz CA, Lehmann M, Lindner M, Peschel B, Königshoff M, et al. An ex vivo model to induce early fibrosis-like changes in human precision-cut lung slices. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol*. 1 de junio de 2017;312(6):L896-902.
48. Sakai N, Chun J, Duffield JS, Lagares D, Wada T, Luster AD, et al. Lysophosphatidic acid signaling through its receptor initiates profibrotic epithelial cell fibroblast communication mediated by epithelial cell derived connective tissue growth factor. *Kidney Int*. marzo de 2017;91(3):628-41.
49. Kaffe E, Katsifa A, Xylourgidis N, Ninou I, Zannikou M, Harokopos V, et al. Hepatocyte autotaxin expression promotes liver fibrosis and cancer: Kaffe et al. *Hepatology*. abril de 2017;65(4):1369-83.

50. Knowlden S, Georas SN. The Autotaxin–LPA Axis Emerges as a Novel Regulator of Lymphocyte Homing and Inflammation. *J Immunol*. 1 de febrero de 2014;192(3):851-7.
51. Tabata K, Baba K, Shiraishi A, Ito M, Fujita N. The orphan GPCR GPR87 was deorphanized and shown to be a lysophosphatidic acid receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. noviembre de 2007;363(3):861-6.
52. Murakami M, Shiraishi A, Tabata K, Norihisa F. Identification of the orphan GPCR, P2Y10 receptor as the sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. julio de 2008;371(4):707-12.
53. Rai V, Touré F, Chitayat S, Pei R, Song F, Li Q, et al. Lysophosphatidic acid targets vascular and oncogenic pathways via RAGE signaling. *J Exp Med*. 17 de diciembre de 2012;209(13):2339-50.
54. McIntyre TM, Pontsler AV, Silva AR, St. Hilaire A, Xu Y, Hinshaw JC, et al. Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPAR agonist. *Proc Natl Acad Sci*. 7 de enero de 2003;100(1):131-6.
55. Lin M-E, Herr DR, Chun J. Lysophosphatidic acid (LPA) receptors: Signaling properties and disease relevance. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. abril de 2010;91(3-4):130-8.
56. Tokumura A, Majima E, Kariya Y, Tominaga K, Kogure K, Yasuda K, et al. Identification of Human Plasma Lysophospholipase D, a Lysophosphatidic Acid-producing Enzyme, as Autotaxin, a Multifunctional Phosphodiesterase. *J Biol Chem*. 18 de octubre de 2002;277(42):39436-42.
57. Sevastou I, Kaffe E, Mouratis M-A, Aidinis V. Lysoglycerophospholipids in chronic inflammatory disorders: The PLA2/LPC and ATX/LPA axes. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids*. enero de 2013;1831(1):42-60.
58. Zhao J, He D, Su Y, Berdyshev E, Chun J, Natarajan V, et al. Lysophosphatidic acid receptor 1 modulates lipopolysaccharide-induced inflammation in alveolar epithelial cells and murine lungs. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol*. octubre de 2011;301(4):L547-56.
59. Oikonomou N, Mouratis M-A, Tzouvelekis A, Kaffe E, Valavanis C, Vilaras G, et al. Pulmonary Autotaxin Expression Contributes to the Pathogenesis of Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. noviembre de 2012;47(5):566-74.
60. Desroy N, Housseman C, Bock X, Joncour A, Bienvenu N, Cherel L, et al. Discovery of 2-[[2-Ethyl-6-[4-[2-(3-hydroxyazetidín-1-yl)-2-oxoethyl]piperazin-1-yl]-8-methylimidazo[1,2- a ]pyridin-3-yl]methylamino]-4-(4-fluorophenyl)thiazole-5-carbonitrile (GLPG1690), a First-in-Class Autotaxin Inhibitor Undergoing Clinical Evaluation for the Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *J Med Chem*. 11 de mayo de 2017;60(9):3580-90.
61. Kazuki Kato, Hisako Ikeda, Shin Miyakawa, Satoshi Futakawa, Yosuke Nonaka, Masatoshi Fujiwara, et al. Structural basis for specific inhibition of Autotaxin by a DNA aptamer. *Nat Struct Mol Biol*. mayo de 2016;23:395-401.

62. Maher TM, Kreuter M, Lederer DJ, Brown KK, Wuyts W, Verbruggen N, et al. Rationale, design and objectives of two phase III, randomised, placebo-controlled studies of GLPG1690, a novel autotaxin inhibitor, in idiopathic pulmonary fibrosis (ISABELA 1 and 2). *BMJ Open Respir Res.* mayo de 2019;6(1):e000422.
63. der Aar E, Desrivot J, Dupont S, Heckmann B, Fieuw A, Stutvoet S, et al. Safety, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of the Autotaxin Inhibitor GLPG1690 in Healthy Subjects: Phase 1 Randomized Trials. *J Clin Pharmacol.* octubre de 2019;59(10):1366-78.
64. Toby M Maher, Ellen M van der Aar, Olivier Van de Steen, Lisa Allamassey, Julie Desrivot, Sonia Dupont, et al. Safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of GLPG1690, a novel autotaxin inhibitor, to treat idiopathic pulmonary fibrosis (FLORA): a phase 2a randomised placebo-controlled trial. *Lancet Respir Med.* agosto de 2018;6(8):627-35.
65. Funke M, Zhao Z, Xu Y, Chun J, Tager AM. The Lysophosphatidic Acid Receptor LPA<sub>1</sub> Promotes Epithelial Cell Apoptosis after Lung Injury. *Am J Respir Cell Mol Biol.* marzo de 2012;46(3):355-64.
66. Tang N, Zhao Y, Feng R, Liu Y, Wang S, Wei W, et al. Lysophosphatidic acid accelerates lung fibrosis by inducing differentiation of mesenchymal stem cells into myofibroblasts. *J Cell Mol Med.* enero de 2014;18(1):156-69.
67. Wu J, Mukherjee A, Lebman DA, Fang X. Gene expression of the lysophosphatidic acid receptor 1 is a target of transforming growth factor beta. *Oncogene.* 27 de junio de 2013;32(26):3198-206.
68. Swaney J, Chapman C, Correa L, Stebbins K, Bunday R, Prodanovich P, et al. A novel, orally active LPA1 receptor antagonist inhibits lung fibrosis in the mouse bleomycin model: LPA1 antagonist in pulmonary fibrosis. *Br J Pharmacol.* agosto de 2010;160(7):1699-713.
69. JS Swaney, C Chapman, LD Correa, KJ Stebbins, AR Broadhead, G Bain, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic characterization of an oral lysophosphatidic acid type 1 receptor-selective antagonist. *J Pharmacol Exp Ther.* marzo de 2011;336(3):693-700.
70. Xu MY, Porte J, Knox AJ, Weinreb PH, Maher TM, Violette SM, et al. Lysophosphatidic Acid Induces  $\alpha\beta 6$  Integrin-Mediated TGF- $\beta$  Activation via the LPA2 Receptor and the Small G Protein G $\alpha_q$ . *Am J Pathol.* abril de 2009;174(4):1264-79.
71. Huang LS, Fu P, Patel P, Harijith A, Sun T, Zhao Y, et al. Lysophosphatidic Acid Receptor-2 Deficiency Confers Protection against Bleomycin-Induced Lung Injury and Fibrosis in Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* diciembre de 2013;49(6):912-22.
72. Kang H. Role of MicroRNAs in TGF- $\beta$  Signaling Pathway-Mediated Pulmonary Fibrosis. *Int J Mol Sci.* 25 de noviembre de 2017;18(12):2527.



73. Sheppard D. Epithelial–Mesenchymal Interactions in Fibrosis and Repair. Transforming Growth Factor- $\beta$  Activation by Epithelial Cells and Fibroblasts. *Ann Am Thorac Soc.* marzo de 2015;12(Supplement 1):S21-3.
74. Tjin G, White ES, Faiz A, Sicard D, Tschumperlin DJ, Mahar A, et al. Correction: Lysyl oxidases regulate fibrillar collagen remodelling in idiopathic pulmonary fibrosis (doi: 10.1242/dmm.030114). *Dis Model Mech.* 1 de diciembre de 2017;10(12):1545-1545.
75. Camelo A, Dunmore R, Sleeman MA, Clarke DL. The epithelium in idiopathic pulmonary fibrosis: breaking the barrier. *Front Pharmacol* [Internet]. 2014 [citado 5 de septiembre de 2016];4. Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2013.00173/abstract>
76. Giménez A, Duch P, Puig M, Gabasa M, Xaubet A, Alcaraz J. Dysregulated Collagen Homeostasis by Matrix Stiffening and TGF- $\beta$ 1 in Fibroblasts from Idiopathic Pulmonary Fibrosis Patients: Role of FAK/Akt. *Int J Mol Sci.* 16 de noviembre de 2017;18(11):2431.
77. Sakai, N, Tager AM. Fibrosis of two: Epithelial cell-fibroblast interactions in pulmonary fibrosis. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis.* julio de 2013;1832(7):911-21.
78. Maden CH, Fairman D, Chalker M, Costa MJ, Fahy WA, Garman N, et al. Safety, tolerability and pharmacokinetics of GSK3008348, a novel integrin  $\alpha\beta$ 6 inhibitor, in healthy participants. *Eur J Clin Pharmacol.* junio de 2018;74(6):701-9.
79. Maher TM, Simpson JK, Porter JC, Wilson FJ, Chan R, Eames R, et al. A positron emission tomography imaging study to confirm target engagement in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis following a single dose of a novel inhaled  $\alpha\beta$ 6 integrin inhibitor. *Respir Res.* diciembre de 2020;21(1):75.
80. Ramos C, Becerril C, Cisneros-Lira JG, Montaña M. El miofibroblasto, una célula multifuncional en la patología pulmonar. *Rev Inst Nac Enfermedades Respir.* 2004;17(3):215-31.
81. Clarke DL, Carruthers AM, Mustelin T, Murray LA. Matrix regulation of idiopathic pulmonary fibrosis: the role of enzymes. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2013;6(1):20.
82. Wollin L, Wex E, Pautsch A, Schnapp G, Hostettler KE, Stowasser S, et al. Mode of action of nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J.* mayo de 2015;45(5):1434-45.
83. Estany S, Vicens-Zygmunt V, Llatjós R, Montes A, Penín R, Escobar I, et al. Lung fibrotic tenascin-C upregulation is associated with other extracellular matrix proteins and induced by TGF $\beta$ 1. *BMC Pulm Med.* 2014;14(1):120.
84. Li M, Krishnaveni MS, Li C, Zhou B, Xing Y, Banfalvi A, et al. Epithelium-specific deletion of TGF- $\beta$  receptor type II protects mice from bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J Clin Invest.* 4 de enero de 2011;121(1):277-87.

85. Boorsma CE, Dekkers BGJ, van Dijk EM, Kumawat K, Richardson J, Burgess JK, et al. Beyond TGF $\beta$  – Novel ways to target airway and parenchymal fibrosis. *Pulm Pharmacol Ther.* diciembre de 2014;29(2):166-80.
86. Ahluwalia N, Shea BS, Tager AM. New Therapeutic Targets in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Aiming to Rein in Runaway Wound-Healing Responses. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 de octubre de 2014;190(8):867-78.
87. Giménez Palleiro A, Franquet T. Patrones radiológicos en la enfermedad pulmonar intersticial. *Semin Fund Esp Reumatol.* octubre de 2013;14(4):97-105.
88. Román A, Ussetti P, Solé A, Zurbano F, Borro JM, Vaquero JM, et al. Normativa para la selección de pacientes candidatos a trasplante pulmonar. *Arch Bronconeumol.* junio de 2011;47(6):303-9.
89. Molina-Molina M. Futuro del tratamiento farmacológico en fibrosis pulmonar idiopática. *Arch Bronconeumol.* diciembre de 2019;55(12):642-7.
90. American Thoracic Society. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Diagnosis and Treatment. International Consensus Statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161:646-64.
91. Xaubet A, Molina-Molina M, Acosta O, Bollo E, Castillo D, Fernández-Fabrellas E, et al. Normativa sobre el tratamiento farmacológico de la fibrosis pulmonar idiopática. *Arch Bronconeumol.* mayo de 2017;53(5):263-9.
92. Greene KE, King TE, Kuroki Y, Bucher-Bartelson B, Hunninghake GW, Newman LS, et al. Serum surfactant proteins-A and -D as biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J.* 1 de marzo de 2002;19(3):439-46.
93. Ohnishi H, Yokoyama A, Kondo K, Hamada H, Abe M, Nishimura K, et al. Comparative study of KL-6, surfactant protein-A, surfactant protein-D, and monocyte chemoattractant protein-1 as serum markers for interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165(3):378–381.
94. Ishii H. High serum concentrations of surfactant protein A in usual interstitial pneumonia compared with non-specific interstitial pneumonia. *Thorax.* 1 de enero de 2003;58(1):52-7.
95. Boon K, Bailey NW, Yang J, Steel MP, Groshong S, Kervitsky D, et al. Molecular Phenotypes Distinguish Patients with Relatively Stable from Progressive Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF). Eickelberg O, editor. *PLoS ONE.* 6 de abril de 2009;4(4):e5134.
96. Takahashi H, Fujishima T, Koba H, Murakami S, Kurokawa K, Shibuya Y, et al. Serum surfactant proteins A and D as prognostic factors in idiopathic pulmonary fibrosis and their relationship to disease extent. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162(3):1109–1114.
97. Takahashi H, Shiratori M, Kanai A, Chiba H, Kuroki Y, Abe S. Monitoring markers of disease activity for interstitial lung diseases with serum surfactant proteins A and D. *Respirology.* 2006;11(s1).

98. Kinder BW, Brown KK, McCormack FX, Ix JH, Kervitsky A, Schwarz MI, et al. Serum surfactant protein-A is a strong predictor of early mortality in idiopathic pulmonary fibrosis. *CHEST J.* 2009;135(6):1557–1563.
99. Wang K, Ju Q, Cao J, Tang W, Zhang J. Impact of serum SP-A and SP-D levels on comparison and prognosis of idiopathic pulmonary fibrosis: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* junio de 2017;96(23):e7083.
100. Kim DS. Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: frequency and clinical features. *Eur Respir J.* 1 de enero de 2006;27(1):143-50.
101. Yoshikawa T, Otsuka M, Chiba H, Ikeda K, Mori Y, Umeda Y, et al. Surfactant protein A as a biomarker of outcomes of anti-fibrotic drug therapy in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *BMC Pulm Med.* diciembre de 2020;20(1):27.
102. Song JW, Do KH, Jang SJ, Colby TV, Han S, Kim DS. Blood biomarkers MMP-7 and SP-A: predictors of outcome in idiopathic pulmonary fibrosis. *CHEST J.* 2013;143:1422-9.
103. Ninou I, Magkrioti C, Aidinis V. Autotaxin in Pathophysiology and Pulmonary Fibrosis. *Front Med.* 13 de junio de 2018;5:180.
104. Saito S, Alkhatib A, Kolls JK, Kondoh Y, Lasky JA. Pharmacotherapy and adjunctive treatment for idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). *J Thorac Dis.* septiembre de 2019;11(S14):S1740-54.
105. Choi JW, Herr DR, Noguchi K, Yung YC, Lee C-W, Mutoh T, et al. LPA Receptors: Subtypes and Biological Actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* febrero de 2010;50(1):157-86.
106. Tager AM. Autotaxin emerges as a therapeutic target for idiopathic pulmonary fibrosis: limiting fibrosis by limiting lysophosphatidic acid synthesis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2012;47(5):563–565.
107. Fernandez IE, Eickelberg O. The Impact of TGF- $\beta$  on Lung Fibrosis: From Targeting to Biomarkers. *Proc Am Thorac Soc.* 15 de julio de 2012;9(3):111-6.
108. Yoshimura A, Wakabayashi Y, Mori T. Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF-. *J Biochem (Tokyo).* 1 de junio de 2010;147(6):781-92.
109. Li MO, Flavell RA. Contextual Regulation of Inflammation: A Duet by Transforming Growth Factor- $\beta$  and Interleukin-10. *Immunity.* abril de 2008;28(4):468-76.
110. Willis BC. Epithelial Origin of Myofibroblasts during Fibrosis in the Lung. *Proc Am Thorac Soc.* 1 de junio de 2006;3(4):377-82.
111. Noble PW, Albera C, Bradford WZ, Costabel U, Glassberg MK, Kardatzke D, et al. Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): Two randomised trials. *Lancet.* 2011;377(9779):1760-9.

112. Aschner Y, Downey GP. Transforming Growth Factor- $\beta$ : Master Regulator of the Respiratory System in Health and Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* mayo de 2016;54(5):647-55.
113. Correll KA, Edeen KE, Zemans RL, Redente EF, Mikels-Vigdal A, Mason RJ. TGF beta inhibits expression of SP-A, SP-B, SP-C, but not SP-D in human alveolar type II cells. *Biochem Biophys Res Commun.* mayo de 2018;499(4):843-8.

## 8. ANEXOS

CERTIFICADO COMITÉ DE ÉTICA



Dra. Dña. Gloria Luque Fernández, Secretaria del CEI Provincial de Málaga

CERTIFICA:

Que en la sesión de CEI de fecha: 25/06/2015 ha evaluado la propuesta de D/Dña.: Maria Victoria Hidalgo Sanjuan , referido al Proyecto de Investigación: "Biomarcadores en enfermedad pulmonar intersticial difusa".

Este Comité lo considera ética y metodológicamente correcto.

Los datos de los pacientes deberán estar debidamente disociados.

La composición del CEI en esta sesión es la siguiente:

- |   |   |
|---|---|
| Dra. Encarnación Blanco Reina (Farmacología Clínica)        | Dra. Leonor Ruíz Sicilia (UGC Salud Mental)                     |
| Dra. Marta Camacho Caro (UGC Ginecología)                   | Dra. M <sup>a</sup> Victoria de la Torre Prados (UGC UMI)       |
| Dr. Miguel A. García Orodoñez (UGC Med. Interna)            | Dr. Pedro Valdivielso Felices (UGC Med. Interna)                |
| Dra. M <sup>a</sup> Angeles Gertrudis Díez (Médico Familia) | D. José Vallejo Triano (Biblioteca)                             |
| Dr. Antonio E. Guzmán Guzmán (UGC Farmacia Hospitalaria)    | Dra. M <sup>a</sup> Carmen Vela Márquez (Farmacéutica Distrito) |
| Dr. Manuel Herrera Gutiérrez (UGC UMI)                      |   |
| Dr. Carlos Lebrún Bougrat (Laboratorio)                     |   |
| Dr. José Leiva Fernández (Médico Familia)                   |   |
| Dra. Aránzazu Linares Alarcón (UGC Farmacia Hospitalaria)   |   |
| Dr. Antonio López Téllez (Médico de Familia)                |   |
| Dra. Gloria Luque Fernández (Investigación)                 |   |
| Dra. Cristobalina Mayorga Mayorga (Laboratorio)             |   |
| Dra. Eva Mingot Castellanos (UGC Hematología)               |   |
| Dr. Faustino R. Monis Delgado (Médico de Familia)           |   |
| Dr. Victor Navas López (UGC Pediatría)                      |   |
| D. Antonio J. Núñez Montenegro (Subdirección Enfermería)    |   |
| Dra. Blanca O'Donnell Cortés (UGC Med. Preventiva)          |   |
| D. Ramón Porras Sánchez (RRHH-Abogado)                      |   |

Lo que firmo en Málaga, a 26 de Junio de 2015

Fdo.: Dra. Gloria Luque Fernández  
Secretaria del CEI

Título del estudio: ***Biomarcadores en la Enfermedad Pulmonar Intersticial Difusa.***

Investigador principal: *Maria Victoria Hidalgo Sanjuán, Eva Belén Cabrera César, Lidia López López*

Números de teléfono asociados a la investigación: *951032448.*

Lugar: *UGC Neumología. Hospital Universitario Virgen de la Victoria de Málaga.*

Estas hojas de Consentimiento Informado pueden contener palabras que usted no entienda. Por favor, pregunte al investigador principal o a cualquier persona del estudio para que le explique cualquier palabra o información que usted no entienda claramente. Usted puede disponer de una copia de este consentimiento para pensar sobre este estudio o para discutir con su familia o amigos antes de tomar su decisión.

### **INTRODUCCIÓN:**

Usted ha sido invitado a participar en un estudio de investigación. Antes de que usted decida participar en el estudio, por favor lea este consentimiento cuidadosamente. Haga todas las preguntas que usted tenga, para asegurarse de que entienda los procedimientos del estudio, incluyendo los riesgos y los beneficios.

En este estudio pueden participar los pacientes con enfermedad intersticial diagnosticada que son seguidos por la Unidad de Neumología del Hospital Virgen de la Victoria (Málaga). También pueden hacerlo aquellos pacientes sanos para poder así comparar las diferencias que existen entre su muestra de sangre y la de las personas que padecen la enfermedad.

### **PROPÓSITO DEL ESTUDIO:**

Este proyecto pretende estudiar unos “biomarcadores” (sustancia del organismo que se mide para saber el estado de la enfermedad que usted padece) que pueden darnos información sobre cómo ha aparecido su enfermedad intersticial y por qué evoluciona de una determinada manera. Además podrá formar parte de un subestudio se busca analizar el polimorfismo genético que puede estar implicado en dicha enfermedad del que usted puede ser portador. El objetivo de este estudio es identificar si existe una relación entre los biomarcadores que se pueden medir en

sangre de pacientes como usted y la gravedad y evolución que puede seguir la enfermedad. Los resultados podrían ser importantes para desarrollar métodos para prevenir la enfermedad en el futuro y descubrir posibles tratamientos más efectivos.

Las muestras biológicas sobrantes de dicho estudio serán eliminadas al contenedor de residuos biológicos sin ninguna mención identificativa que lo pueda relacionar con usted.

### **PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO:**

En este estudio pueden participar los pacientes con enfermedad intersticial diagnosticada que son seguidos por la Unidad de Neumología del Hospital Virgen de la Victoria (Málaga).

Es posible que de su participación en este estudio no obtenga un beneficio directo. Sin embargo, el estudio de biomarcadores en su organismo podría beneficiar a otros pacientes con la misma enfermedad que sean diagnosticados en el futuro y contribuir a un mejor manejo y toma de medidas preventivas.

El estudio es completamente voluntario, y si usted decide no participar recibirá de igual manera la atención médica que usted precise y la relación con el equipo médico que le atiende no va a verse afectada.

### **PROCEDIMIENTOS:**

Si usted decide participar, se le realizará una historia clínica completa, una exploración física y se le extraerá una muestra de sangre mediante punción venosa (al igual que para cualquier análisis de sangre convencional), que se enviará para análisis y determinación de esas sustancias expuestas anteriormente a las que llamamos “biomarcadores”. La toma de la muestra puede provocarle una leve molestia en ese momento, que desaparecerá minutos después. Este es el único proceso que se le realizará; su tratamiento y revisiones habituales, en caso de que los esté realizando, continuarán sin modificaciones.

### **PRIVACIDAD Y CONFIDENCIALIDAD:**

La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.

## CONSENTIMIENTO INFORMADO

1. Yo \_\_\_\_\_  
declaro bajo mi responsabilidad que he leído la hoja de información sobre el estudio y acepto participar voluntariamente en este estudio.
2. Se me ha entregado una copia de la hoja de información al paciente y una copia de este consentimiento informado, fechado y firmado. Se me han explicado las características y el objetivo del estudio y los posibles beneficios y riesgos que puedo esperar. Se me ha dado tiempo y oportunidad para realizar preguntas. Todas las preguntas fueron respondidas a mi entera satisfacción.
3. Sé que se tratarán mis datos personales y mi historia clínica de forma confidencial por el grupo de investigadores.
4. Soy libre de retirarme del estudio en cualquier momento por cualquier motivo, sin tener que dar explicación y sin que repercuta negativamente sobre mi tratamiento médico actual o futuro.

Fecha:

Firma del paciente:

---

Constato que he explicado las características y el objetivo del estudio y los riesgos y beneficios potenciales al sujeto cuyo nombre aparece escrito al inicio de esta página. El sujeto consiente en participar por medio de su firma fechada en persona.

Fecha:

Nombre del investigador o la persona que proporciona la información y el consentimiento:

Firma:



## HOJA DE RECOGIDA DE DATOS

Nombre \_\_\_\_\_

Nºpaciente \_\_\_\_\_ NUHSA \_\_\_\_\_

Teléfono \_\_\_\_\_

Fecha de nacimiento \_\_\_\_\_ Sexo \_\_\_\_\_ Talla \_\_\_\_\_ cm

Peso \_\_\_\_\_ kg SatO2 \_\_\_\_\_ Grado disnea NYHA \_\_\_\_\_

Independiente para ABVD  Calidad de vida \_\_\_\_\_

### Antecedentes familiares de interés:

### Antecedentes personales:

Tabaquismo  Profesión \_\_\_\_\_

Exposición sustancias inorgánicas  orgánicas  fármacos

HTA  DM  DL  HTP  SAHS  Patología Psiquiátrica

EPOC  Cardiopatía

Otros:

### Fecha diagnóstico:

Tiempo seguimiento consulta (meses):

Ingresos hospitalarios:

Patrón radiológico en Rx tórax al diagnóstico:

Patrón radiológico en TAC de tórax al diagnóstico:

Realización de:  LAB  B. transbronquial  B. quirúrgica

### Informe Anatomía Patológica del diagnóstico:

### Pruebas funcionales respiratorias:

Parámetros	Al diagnóstico (ml y %)	Último control (ml y %)
FVC		
FEV1		
FEV1%		
FEF 25-75		
TLC		
VR		
TLC/VR		
DLCO		
DLCO/ VA		

### Tratamiento para patología pulmonar:

- Acetilcisteína    Corticoides    Anticuerpos monoclonales
- Inmunosupresores: \_\_\_\_\_
- Pirfenidona









UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA