

11262



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

11262

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
MEDICAS, ODONTOLOGICAS Y DE LA SALUD

NIVELES DE OSTEOPONTINA EN PACIENTES CON FIBROSIS PULMONAR IDIOPATICA

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS



PRESENTA

DRA. CAROLINA GARCIA DE ALBA RIVAS

TUTOR: DR. MOISES SELMAN LAMA

M352283

2005



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

***AGRADEZCO A LAS SIGUIENTES
INSTITUCIONES POR EL APOYO BRINDADO
PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO
DE MAESTRÍA:***

***AL INSTITUTO NACIONAL DE
ENFERMEDADES RESPIRATORIAS***

AL CONACYT (PROYECTO No 43832.)

AGRADECIMIENTOS:

- A Germán, por ser “mi amor, mi cómplice y todo”
a Pablo y Andrea por existir, por su amor, su paciencia y
por ser mis mas fieles admiradores.
A mamá y papá por su apoyo y por haberme enseñado que
el cielo es el límite.
- A Moisés Selman por creer en mi, y porque ser su alumna
me ha abierto muchas puertas, principalmente la del
razonamiento.
- A Annie Pardo, por ayudarme siempre a dar mas de lo que
creo que puedo.
- A los demás miembros de mi jurado: Dra. Rocío Chapela,
Dra. Teresa Fortoul, Dr. Julio Granados y Dr. Francisco
Flores por sus observaciones y comentarios.
- A Roberto Mejía por ser mi maestro y amigo.
- A mis amigos y compañeros del INER y de la Facultad de
Ciencias por su apoyo y su ayuda: Pepe, Victor, Marco,
Nacho, Carmen, Martha, Carina, Miguel, Martha Livier,
Sandra, Iliana, Carlos, Adriana, Jorge, Remedios.
- A Olimpia, Bárbara y Karime, por el mejor semestre de la
Maestría.
- A Chema, Andrés, Aldo, Dan, Cristy y Mario por hacer
divertido el camino y por retarme continuamente.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	4
Mecanismos moleculares involucrados en la fibrosis pulmonar	7
La vía epitelial.....	9
Fibroblastos y fibrosis pulmonar.....	10
Osteopontina.....	13
Regulación transcripcional de la OPN.....	14
Actividad de la OPN.....	15
Osteopontina e inflamación.....	16
Osteopontina y fibrosis.....	17
JUSTIFICACIÓN	19
HIPÓTESIS	20
OBJETIVOS	21
MATERIAL Y MÉTODOS	22
Diseño del estudio.....	22
Población de estudio.....	22
Criterios de inclusión.....	22
Criterios de exclusión.....	22
Criterios de eliminación.....	23
Definiciones operacionales.....	23
Métodos.....	25
Lavado bronquioalveolar.....	25
Cuantificación de proteínas.....	25
Cuantificación de OPN por ELISA.....	26
Análisis Estadístico.....	27
RESULTADOS	28
Osteopontina en el lavado bronquioalveolar.....	28
Correlación de los niveles de Osteopontina con las pruebas de función pulmonar y curso clínico de la enfermedad.....	29
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	31
TABLA 1	36
TABLA 2	37
GRÁFICA 1	38
GRÁFICA 2	39
GRÁFICA 3	39
TABLA 3	40
GRÁFICA 4	41
BIBLIOGRAFÍA	42
ANEXOS	51

RESUMEN

Título: Niveles de Osteopontina en pacientes con Fibrosis Pulmonar Idiopática.

Antecedentes: La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una de las enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID) más frecuentes y representa una forma específica de neumonía intersticial fibrosante crónica, de etiología desconocida, caracterizada por daño y activación epitelial, migración, proliferación de fibroblastos y acumulación exagerada de matriz extracelular en el parénquima pulmonar. El diagnóstico definitivo de FPI se hace basado en cuadro clínico, TCAR y biopsia pulmonar, sin embargo, con la TCAR y aún con la biopsia se tienen diagnósticos erróneos. El diagnóstico diferencial de la FPI con otros desórdenes intersticiales del pulmón es fundamental ya que, en términos generales, las EPID, con excepción de la FPI, responden parcial o totalmente al uso sistémico de corticoesteroides y están asociadas con una mejor evolución y un mejor pronóstico. En este contexto, es esencial que el diagnóstico se realice con el mayor nivel de certeza. La osteopontina (OPN) es una glicoproteína hidrofílica, fosforilada de aproximadamente 314 residuos de aminoácidos, es sintetizada por una gran variedad de tipos celulares como macrófagos, células epiteliales, endoteliales, de músculo liso, fibroblastos, osteoclastos/osteoblastos y células tumorales. Se ha observado expresión de OPN en algunas respuestas patológicas caracterizadas por fibrosis tisular significativa incluyendo algunos modelos de fibrosis pulmonar. Asimismo, mediante el uso de microarreglos con oligonucleótidos se demostró en un trabajo reciente, que el gen de la OPN está muy sobre-expresado en el pulmón de pacientes con FPI comparado con pulmones de pacientes con neumonitis por hipersensibilidad y neumonía intersticial inespecífica. En un estudio piloto realizado en nuestro laboratorio se observó una importante elevación de OPN en el líquido de LBA de pacientes con FPI comparado con pacientes con NH. Estos resultados sugirieron que los niveles de OPN podrían ser diferentes en estas (y probablemente otras EPID) y nos pareció pertinente evaluar si pudiese ser una prueba auxiliar en el diagnóstico diferencial algunas de estas enfermedades.

Objetivos: *General:* Cuantificar los niveles de OPN en LBA de pacientes con diagnóstico confirmado de FPI, NINE, NH y controles sanos para establecer si existe diferencia significativa entre las ellas. *Particular:* Explorar el nivel de correlación entre los valores de OPN en LBA y las pruebas de función pulmonar de pacientes con FPI, NINE y NH, y con diferentes variables clínicas así como el curso clínico de la FPI.

Material y métodos. *Población de estudio:* Pacientes de la Clínica de Enfermedades Intersticiales del Pulmón con diagnóstico de fibrosis pulmonar idiopática, neumonía intersticial inespecífica o neumonitis por hipersensibilidad y controles sanos. *Métodos:* Se hizo una revisión de los expedientes clínicos de pacientes que fueron sometidos a biopsia pulmonar a cielo abierto y que contaban con diagnóstico histopatológico de NIU, NINE ó NH y se tomaron en cuenta las pruebas de función pulmonar del inicio del estudio clínico del paciente. La concentración de proteínas en los sobrenadantes del LBA se determinó utilizando el método de Bradford. La cuantificación de OPN se realizó en los sobrenadantes de lavado bronquioalveolar con un estuche comercial de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (*Enzime-Linked ImmunoSorbent Assay*, ELISA) específico para OPN.

Resultados. Se revisaron 109 expedientes, de los cuales 61 cumplieron con los criterios de inclusión. Como se esperaba se encontró una diferencia significativa en la edad del grupo de pacientes con FPI comparado con el resto de los grupos de estudio que en general eran más jóvenes ($p < 0.0001$). También se encontró diferencia en los niveles de OPN por género, siendo más elevados en los hombres que en las mujeres ($p < 0.05$) además de una moderada correlación positiva de OPN con la edad ($r = 0.58$, $p < 0.01$). Los valores de proteínas totales en los LBA mostraron un incremento significativo entre el grupo de pacientes con NH y el resto de los sujetos ($p < 0.05$). Los niveles de OPN en el LBA en los pacientes con FPI fueron significativamente mayores que en los pacientes con NH y sujetos sanos ($p < 0.0001$) así como en pacientes con NINE ($p < 0.05$). No se encontró diferencia entre los promedios de estos tres últimos grupos. No se encontró correlación alguna entre los niveles de OPN con las pruebas de función pulmonar ni asociación entre los niveles de OPN y el tipo de curso clínico de la FPI. Como

hallazgo interesante se encontró una asociación significativa entre los niveles elevados de OPN y la presencia de hipocratismo digital (RM = 6.69 IC = 1.25 – 10.76; $p < 0.05$).

Conclusiones. En este trabajo hemos demostrado que la OPN se encuentra elevada en el lavado bronquioalveolar de los pacientes con fibrosis pulmonar idiopática por lo que podría considerarse como una prueba auxiliar de diagnóstico diferencial de las EPID.

Introducción.

Con el término de enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID) se agrupa un complejo y heterogéneo conjunto de padecimientos subagudos y crónicos que afectan con grados variables de inflamación y fibrosis al parénquima pulmonar. La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una de las más frecuentes y representa una forma específica de neumonía intersticial fibrosante crónica, de etiología desconocida, caracterizada por daño y activación epitelial, migración, proliferación, y activación de fibroblastos y acumulación exagerada de matriz extracelular en el parénquima pulmonar (1, 2). La FPI es la más agresiva de las EPID, siendo habitualmente progresiva, irreversible y letal a pesar del tratamiento con altas dosis de corticoesteroides e inmunosupresores (2-4).

Estudios recientes han demostrado que la FPI se caracteriza por presentar un patrón histopatológico denominado neumonía intersticial usual (NIU); esta descripción es importante ya que anteriormente se designaba como FPI a un espectro de cuando menos cuatro formas morfológicas distintas, entre ellas la neumonía intersticial descamativa y la neumonía intersticial inespecífica (NINE) que actualmente se consideran entidades independientes (5). La NIU es la única de las neumopatías intersticiales idiopáticas que presenta una distribución heterogénea de las lesiones, con zonas alternadas de pulmón normal, fibrosis, inflamación y lesiones en panal de abeja.

Recientemente, se realizó un consenso internacional para definir el diagnóstico, evaluación y tratamiento de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática, este esfuerzo fue una colaboración entre la Asociación Americana de Tórax, la Sociedad Europea de Enfermedades Respiratorias y el Colegio Americano de

Especialistas en Tórax; el propósito de este consenso fue asistir a los médicos clínicos en el diagnóstico y manejo de esta enfermedad. En éste se establece que el diagnóstico definitivo de FPI, en ausencia de una biopsia pulmonar a cielo abierto con diagnóstico histológico de neumonía intersticial usual (NIU), incluye los siguientes criterios:

1. Exclusión de otras causas conocidas de enfermedad intersticial pulmonar (incluyendo por lavado bronquioalveolar y biopsia transbronquial).
2. Pruebas de función pulmonar alteradas con evidencia de restricción y/o alteraciones del intercambio de gases.
3. Anormalidades compatibles en la radiografía convencional de tórax o en tomografía computada de alta resolución (TCAR) (5).

En estadios tempranos de FPI, se ha encontrado que la función pulmonar o los estudios de imagen pueden estar normales o solo ligeramente alterados lo que indudablemente dificulta el diagnóstico.

En años recientes, la TCAR ha pasado a ocupar un lugar fundamental en el diagnóstico de este padecimiento. Así, diferentes estudios han demostrado que la certeza diagnóstica por medio de TCAR en FPI puede alcanzar hasta del 80%, si la evaluación la hace un especialista altamente entrenado en este tipo de patologías, ya que incluso neumólogos o radiólogos con poco entrenamiento en EPID, muestran una certeza diagnóstica substancialmente menor (6-10).

Sin embargo, es importante destacar que con la TCAR y aún con la biopsia se tienen diagnósticos erróneos y la FPI se puede confundir con otras neumopatías intersticiales idiopáticas como la neumonía intersticial inespecífica (NINE) o con

otras EPID de causa conocida como la neumonitis por hipersensibilidad crónica avanzada (5,11).

El diagnóstico diferencial de la FPI con otros desórdenes intersticiales del pulmón es fundamental ya que, en términos generales, las EPID, con excepción de la FPI, responden parcial o totalmente al uso sistémico de corticoesteroides y están asociadas con una mejor evolución y un mejor pronóstico. En este contexto, es esencial que el diagnóstico se realice con el mayor nivel de certeza (12).

Así, es importante la búsqueda de nuevos métodos auxiliares, en especial no invasivos, que permitan discriminar entre los diferentes tipos de enfermedades intersticiales difusas del pulmón, y en especial que ayuden al diagnóstico de la FPI.

Mecanismos moleculares involucrados en la fibrosis pulmonar.

Aunque la causa de la FPI se desconoce, los avances en biología molecular y celular han incrementado nuestro conocimiento en los procesos biológicos involucrados en su inicio y progresión. Existen nuevas hipótesis relacionadas con su patogénesis en las cuales se sugiere que la FPI es una enfermedad de origen epitelial/fibroblástico más que inflamatoria (1). Por ejemplo, la revisión cuidadosa de las biopsias pulmonares de un gran número de casos demostró que el componente inflamatorio es usualmente leve o moderado y, lo más importante, que ocurre principalmente en áreas de donde ya se observa depósito de colágeno o cambios estructurales en panal de abeja (3). Otro punto a favor de esta hipótesis es que la mayoría de las EPID, en las cuales la inflamación es una característica prominente en especial en los estadios tempranos (por ejemplo la neumonitis por hipersensibilidad) frecuentemente responden al tratamiento anti-inflamatorio y no progresan a estadios terminales de fibrosis (1). En cambio, la FPI no ha mostrado respuesta al tratamiento con altas dosis de corticoesteroides y otros inmunosupresores (2, 4). Finalmente, una serie reciente de estudios han demostrado que en el caso de la FPI, las células epiteliales producen la mayoría de las citocinas y factores de crecimiento que favorecen la fibroproliferación y la fibrosis.

Así, aunque los mecanismos patogénicos de la fibrosis pulmonar no se conocen con precisión, un creciente número de evidencias sugieren al menos dos rutas diferentes para su desarrollo:

1. La vía inflamatoria, donde el cambio al tipo de respuesta Th (*T-helper*) 2 parece ser crítico; un ejemplo de ésta podría ser la neumonitis por

hipersensibilidad (NH), que representa una alveolitis difusa linfocítica, granulomatosa, provocada por la exposición a una gran variedad de partículas orgánicas y que se considera que es debida a una respuesta predominantemente Th 1 (13). La mayor parte de los pacientes con NH mejoran o curan después del tratamiento; sin embargo, cerca de 30% de ellos progresan a fibrosis aun si evitan la exposición posterior al agente causal (11). En estos casos, la respuesta fibrótica está acompañada por un cambio en el infiltrado inflamatorio, con elementos compatibles con una respuesta inmune tipo Th-2, y con un incremento de neutrófilos cargados con colagenasa-2 y gelatinasa B y la enfermedad usualmente progresa (11,14). Por esto, puede especularse que en esta enfermedad intersticial, la reacción del huésped a la partícula orgánica, o la cronicidad de la patología o algún evento desconocido pueda provocar el cambio a una respuesta dominada por el fenotipo de citocinas Th-2, cuya consecuencia es el desarrollo de fibrosis progresiva (15).

2. La vía epitelial, representada por la fibrosis pulmonar idiopática (1, 15). En esta vía, el proceso inflamatorio es irrelevante, y la fisiopatología parece ser dominada por lesión y activación epitelial. Una característica distintiva de los pulmones con FPI es una marcada disrupción de la integridad del epitelio con presencia de varios fenotipos alterados que incluyen:

- a) hiperplasia de neumocitos tipo 2
- b) células epiteliales grandes y elongadas (probables células transicionales entre neumocitos tipo 2 y tipo 1), y
- c) células epiteliales tipo bronquiolares que cubren las áreas de lesiones quísticas terminales.

Ambas vías, la inflamatoria y la epitelial, pueden estimular la secreción de un gran número de factores de crecimiento y citocinas que inducen la migración y proliferación de fibroblastos y el cambio de su fenotipo a miofibroblastos, con la consecuente acumulación de matriz extracelular (15).

La vía epitelial.

La disfunción epitelial en FPI se demuestra en diversas facetas. Por ejemplo, en los últimos 10 años se ha hecho evidente que las células alveolares tipo 2 sintetizan una gran variedad de citocinas, factores de crecimiento y enzimas involucradas en la matriz extracelular, que sugieren que la contribución del epitelio en la remodelación de la matriz extracelular es mayor de lo que se hubiera esperado (1).

Se ha aceptado tradicionalmente que son las células inflamatorias, principalmente macrófagos alveolares, la fuente de la mayoría de las moléculas solubles implicadas en la fibrogénesis; sin embargo, existe cada vez más evidencia que muestra claramente que, por lo menos en la FPI, las células del epitelio alveolar lesionado/activado desempeñan un papel esencial en el proceso de sintetizar citocinas y factores de crecimiento involucrados en la migración y proliferación de fibroblastos así como en la inducción de su diferenciación a miofibroblastos (15). Numerosos estudios realizados por hibridación *in situ* e inmunohistoquímica han revelado que en la FPI, las células epiteliales alveolares son el principal sitio de síntesis de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), todos ellos esenciales para el desarrollo de fibrosis pulmonar (16-20). Pan y colaboradores (21) demostraron a su vez que el TGF- β activa la transcripción del

factor de crecimiento del tejido conjuntivo (CTGF), que es un mediador que induce la quimiotaxis y proliferación de fibroblastos. Este factor de crecimiento se encuentra muy aumentado en el tejido pulmonar de pacientes con FPI, donde es producido principalmente por células epiteliales tipo 2 y fibroblastos activados. Por otro lado, es importante enfatizar que las células epiteliales de la superficie alveolar pueden contribuir a la fibrogénesis no solo porque sobre-expresan citocinas pro-fibróticas sino también porque muestran una alteración en su capacidad fisiológica de secretar moléculas inhibitoras de la proliferación de fibroblastos (15).

La integridad de la membrana basal del epitelio alveolar es crítica para preservar la estructura alveolar normal y su función. En este contexto, se sabe que las células epiteliales alveolares son capaces de producir un cierto número de moléculas de matriz extracelular del tipo de la colágena IV, laminina, fibronectina, entactina y trombospondina directamente relacionadas a la formación de su propia membrana basal (20, 22, 23). En cambio, durante el desarrollo de la FPI las células epiteliales sintetizan dos metaloproteinasas de matriz, la gelatinasa A y la B, las cuales pueden degradar a los componentes de la membrana basal contribuyendo a su ruptura y a una mayor desorganización de la arquitectura pulmonar (1).

Fibroblastos y fibrosis pulmonar

Una característica esencial en el desarrollo de fibrosis pulmonar es la activación de fibroblastos, que es seguida de remodelación anormal de la matriz extracelular y la subsiguiente destrucción de la arquitectura pulmonar. La activación/proliferación de fibroblastos, dispersos ampliamente a través del

parénquima pulmonar, generalmente precede a la acumulación de moléculas de matriz extracelular en los alvéolos dañados, y se considera como un paso clave en la transformación de un desorden potencialmente reversible a uno progresivo e irreversible; de hecho, la cantidad de focos de fibroblastos/miofibroblastos en la biopsia pulmonar es considerada como uno de los principales factores pronóstico en los pacientes con FPI (24).

La migración de los fibroblastos a los sitios de lesión desempeña un papel importante en el desarrollo de fibrosis, y existe evidencia que sugiere que los fibroblastos obtenidos de pulmones fibróticos migran de manera más rápida que aquellos obtenidos de pulmones normales (25); aun más, en este estudio la migración de los fibroblastos de pacientes con FPI se incrementó significativamente cuando las células fueron estimuladas con PDGF. Este mediador se encuentra entre los más potentes inductores de la migración de fibroblastos, y parece ser uno de los factores implicados en la quimiotaxis de estas células durante la fibrosis pulmonar. Como ya se mencionó, el PDGF se encuentra muy sobre-expresado en pulmones fibróticos y es sintetizado principalmente por células del epitelio alveolar (16).

Después de migrar y proliferar en los sitios de lesión, los fibroblastos adquieren el fenotipo de miofibroblastos y gradualmente cambian sus principales funciones a la síntesis de proteínas y contractilidad. De hecho, tanto en fibrosis pulmonar humana y experimental así como en fibrosis de hígado y otros órganos, el incremento en la población de miofibroblastos es un paso esencial de la respuesta fibrótica al daño (26-29); Los mediadores responsables de esta diferenciación no se conocen con precisión pero uno de ellos es el TGF- β 1. Este factor ha sido

implicado en la patogénesis de la fibrosis no solo por su capacidad de estimular la acumulación de moléculas de matriz extracelular sino también por su capacidad de promover la diferenciación de los fibroblastos a miofibroblastos (30, 31). Se ha reportado también que en algunas condiciones experimentales que se asume ocurren *in vivo*, la producción de TGF- β 1 puede conducir a la selección y propagación de miofibroblastos resistentes a apoptosis, lo que contribuiría a la supervivencia de esta subpoblación celular (32, 33).

La acumulación anormal de moléculas de matriz extracelular es la característica final común en cualquier desorden fibrótico. En este proceso de remodelación aberrante, desempeña un papel fundamental un desequilibrio entre metaloproteinasas de matriz (MMPs por sus siglas en inglés) (15).

El posible papel tanto de las MMPs y los TIMPs en el desarrollo de fibrosis pulmonar se ha analizado en humanos y en modelos experimentales donde en general lo que se ha encontrado es una sobre-expresión de MMPs (34-36). Esta observación en enfermedades fibróticas, donde la principal característica es el depósito exagerado de matriz extracelular es paradójica ya que las MMPs son enzimas que contribuyen a la degradación de matriz extracelular. Sin embargo, esta contradicción puede entenderse, al menos parcialmente, si se analiza la localización de las MMPs y los TIMPs en FPI. Selman y cols (36) demostraron que aunque la MMP-1 estaba altamente expresada en tejido con FPI, la enzima se localizaba en macrófagos alveolares, células epiteliales alveolares reactivas así como en células epiteliales bronquiales, pero estaba prácticamente ausente en el compartimiento intersticial donde la colágena se está acumulando (36). Asimismo, la colagenasa-2 se expresaba en neutrófilos, que no son muy

abundantes en FPI, y la colagenasa-3 no se encontró. Considerando que uno de los principales sustratos de las colagenasas son las colágenas fibrilares, la falta de expresión de esta enzima en fibroblastos intersticiales puede explicar en una forma simplista la presencia de cicatrices que no se reabsorben (15).

Por el contrario, en otro estudio se encontró una sobre expresión de los 4 TIMPs tanto en fibroblastos y miofibroblastos *in vitro* como en tejido pulmonar de pacientes con FPI (34, 36). Pero lo más importante es que varios de estos inhibidores se expresaban en células intersticiales (fibroblastos/miofibroblastos) asociadas a tejido fibroso y asociados a matriz (36). De esta manera, la mayor expresión intersticial de los TIMPs comparada con las colagenasas intersticiales, apoya el concepto de que en FPI existe un microambiente profibrosante que favorece la progresión y perpetuación del proceso fibrótico (15, 37, 38).

Osteopontina.

La osteopontina (OPN) es una glicoproteína hidrofílica, fosforilada de aproximadamente 314 aminoácidos. Su peso molecular oscila entre 41 y 75 kDa debido a diferentes modificaciones post transcripcionales, las cuales dependen del tipo celular; por ejemplo, la proteína que ha sido aislada en hueso, se encuentra glicosilada y fosforilada y tiene un peso molecular de 41.5 kDa; en cambio en endometrio se ha aislado un fragmento de osteopontina de 45 kDa, que tiene mayor afinidad con las integrinas y mayor actividad biológica que la forma nativa de OPN. (39-44).

La OPN es rica en aspartato, glutamato y residuos de serina, y contiene dominios funcionales para unión con calcio, glicosilación, fosforilación y adhesión con

moléculas de matriz extracelular. La estructura secundaria predicha para la OPN consiste de ocho α -helices y seis segmentos β -plegados (42). Contiene un sitio de unión con una secuencia arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) que se ha encontrado también en varias proteínas de matriz extracelular y que interactúa con la familia de moléculas de adhesión de las integrinas (45, 46).

La OPN es sintetizada por una gran variedad de tipos celulares incluyendo células relacionadas con la respuesta inmune como células T y macrófagos (alveolares, peritoneales), así como células epiteliales, endoteliales, de músculo liso, fibroblastos, osteoclastos/osteoblastos y células tumorales (46). Los monocitos no la producen, pero su expresión se inicia rápidamente cuando estas células son estimuladas a diferenciarse en macrófagos (47). La OPN secretada se distribuye ampliamente en plasma, orina, leche y bilis (48-50).

Regulación transcripcional de la OPN.

Existe una gran variedad de estímulos involucrados en la regulación de la expresión de OPN, lo cual sugiere que está controlada por vías regulatorias muy complejas (51-54). Se han clonado los promotores de la OPN humana, porcina y murina y exhiben un diverso número de secuencias regulatorias consenso (40, 42, 51, 55, 56).

Las primeras investigaciones de los promotores de OPN humana, descubrieron múltiples elementos regulatorios potenciales para los factores de transcripción, incluyendo secuencias de unión parecidas a la TATA (-27 a -22nt) y CCAAT (-73 a -68); GATA-1 (-851 a -847), AP-1 (TGACACA, -78 a -72nt) y Ets-1 (-47 a -39nt) (51). En la tabla 1 se muestran algunos de los reguladores transcripcionales conocidos.

Actividad de la OPN.

La molécula de OPN pasa por considerables modificaciones post-transcripcionales y presenta un sitio de unión para el calcio y dos dominios para unión con heparina (45). Después de secretada puede ser fragmentada por la trombina lo que resulta en la exposición de sitios de unión crípticos adicionales así como producción de otros fragmentos quimiotácticos (46). La mayoría de las actividades biológicas reconocidas de la OPN residen en el fragmento N-terminal (47).

Ya que la proteólisis por trombina desenmascara sitios crípticos alternos, se ha sugerido que la OPN puede participar en los mecanismos que coordinan la inflamación con la coagulación. La cascada de la coagulación se activa en los sitios de inflamación, lo que incluye la activación de la trombina, la cual puede actuar sobre la OPN. De esta manera, el grado de actividad de la cascada de la coagulación puede influenciar la severidad de la inflamación, tal vez mediado por OPN. Se ha observado que ratones deficientes en actividad procoagulante muestran disminución en la formación de granulomas durante la respuesta de hipersensibilidad retardada (47, 53).

La OPN se ha involucrado en diversos eventos fisiológicos y patológicos incluyendo mantenimiento o reconfiguración de la integridad tisular durante procesos inflamatorios; normalmente existe tanto como molécula de matriz extracelular inmovilizada en tejidos mineralizados, como citocina en fluidos corporales (53).

Puede también unirse a un gran número de receptores, incluyendo a las integrinas α_v (β_1 , β_3 o β_5) y (α_4 , α_5 , α_8 y α_9) β_1 . Estos receptores, directa o indirectamente

activan vías de señalización celular permitiendo a la OPN mediar interacciones célula-matriz y posiblemente célula-célula. (57).

Osteopontina e inflamación

La OPN tiene tanto acción pro-inflamatoria como anti-inflamatoria. Desempeña un papel importante durante la inflamación tanto aguda como crónica, donde puede ser expresada por células epiteliales, endoteliales y de músculo liso así como por macrófagos infiltrativos y células T (46).

La OPN se expresa en respuestas granulomatosas de diversa etiología (46, 47). En este contexto, se ha encontrado incrementada en una gran variedad de enfermedades infecciosas y no infecciosas incluyendo sarcoidosis, tuberculosis, silicosis, histoplasmosis, arteritis temporal, nódulos reumáticos y granulomas por cuerpo extraño (58).

En contraste con la inflamación granulomatosa, la OPN no se encuentra en parénquima pulmonar normal o en enfermedades pulmonares mediadas por neutrófilos tales como el síndrome de insuficiencia progresiva del adulto o las neumonías bacterianas (47,59).

Recientemente se publicó un estudio en el que se midieron los niveles de OPN en plasma de pacientes con sarcoidosis, tuberculosis y controles sanos (60, 61). Se demostró que la OPN se encuentra significativamente más elevada en tuberculosis que en sarcoidosis y en ambas comparadas con controles sanos (60, 61).

Osteopontina y fibrosis

Se ha mencionado que la OPN se expresa en algunas respuestas patológicas caracterizadas por fibrosis tisular significativa incluyendo algunos modelos de fibrosis pulmonar (por ejemplo, la inducida por bleomicina); en estos modelos la OPN se expresa predominantemente en estadios tempranos caracterizados por neumonitis intersticial (62-64).

En un estudio con un modelo de fibrosis por bleomicina en ratones, se mostró que la OPN promueve la migración, adhesión y proliferación de fibroblastos. Asimismo, se ha demostrado que se une directamente a colágenas de tipo I, II, III, IV y V y forma un complejo estable con la fibronectina. Estos resultados sugieren que también desempeña un papel importante en el comportamiento de fibroblastos y el metabolismo de componentes de matriz extracelular (65).

Se ha encontrado también que la OPN induce activación de la MMP-2 (gelatinasa A) a través del factor nuclear NFκB. La MMP-2 degrada varias proteínas de matriz extracelular como la fibronectina, laminina, colágena tipo IV, y proteoglicanos (66).

Asimismo, mediante el uso de microarreglos con oligonucleótidos se demostró en un trabajo reciente, que el gen de la OPN está muy sobre-expresado en el pulmón de pacientes con FPI comparado con pulmones de pacientes con neumonitis por hipersensibilidad y neumonía intersticial inespecífica (Pardo et al, manuscrito en preparación). En este mismo trabajo se demostró que la OPN induce la migración de fibroblastos humanos, incrementa la síntesis de colágena tipo I y de TIMP-1, y disminuye la expresión de MMP-1 (colagenasa-1). Se observó también, por inmunohistoquímica, que en el tejido pulmonar de los pacientes con FPI existe

abundante expresión de OPN, la cual se confinó casi exclusivamente a las células epiteliales (epitelio bronquiolar y alveolar) y ocasionalmente a macrófagos alveolares. En conjunto, estos resultados sugieren que la expresión de OPN se asocia con señales fibrogénicas importantes en el pulmón.

En apoyo al papel profibrosante de la OPN, en un estudio reciente se observó que ratones deficientes en este mediador (ratones OPN $-/-$), muestran una disminución de TGF- β 1 activo así como de la expresión de MMP-2 activa (67). Los autores sugieren que aunque previamente se ha mostrado que la OPN es un gene de respuesta para el TGF- β 1, la OPN podría a su vez funcionar como reguladora, hacia arriba, de la expresión del TGF- β 1.

Justificación.

La determinación de OPN en diferentes enfermedades pulmonares ha mostrado niveles plasmáticos elevados en algunas de ellas. Sin embargo, la proteína no ha sido cuantificada en lavados bronquioalveolares, fluido que refleja de manera más cercana lo que está ocurriendo en pulmón. En un estudio piloto previo (n = 6 por grupo) realizado en nuestro laboratorio se observó una importante elevación de OPN en el líquido de LBA de pacientes con FPI comparado con pacientes con NH. Estos resultados sugirieron que los niveles de OPN podrían ser diferentes en estas (y probablemente otras EPID) y nos pareció pertinente evaluar si pudiese ser una prueba auxiliar en el diagnóstico diferencial algunas de estas enfermedades.

Hipótesis

Primaria:

Los niveles de OPN en el lavado bronquioalveolar se encuentran incrementados en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática en comparación con pacientes con neumonía intersticial inespecífica, pacientes con neumonitis por hipersensibilidad y en controles sanos.

Secundarias, a nivel exploratorio:

1. Existe correlación entre los niveles de OPN en LBA con pruebas de función pulmonar de pacientes con FPI, NINE y NH.
2. Existe correlación entre los niveles de OPN en LBA con el curso clínico de la FPI.

Objetivos.

*** General.**

Cuantificar los niveles de OPN en LBA de pacientes con diagnóstico confirmado de FPI, NINE, NH y controles sanos para establecer si existe diferencia significativa entre las ellas.

*** Particular.**

Explorar el nivel de correlación entre los valores de OPN en LBA y las pruebas de función pulmonar de pacientes con FPI, NINE y NH, y con diferentes variables clínicas así como el curso clínico de la FPI.

Material y métodos.

Diseño del estudio: Estudio transversal, observacional, descriptivo.

Población de estudio:

Pacientes de la Clínica de Enfermedades Intersticiales del Pulmón con diagnóstico confirmado por histopatología de fibrosis pulmonar idiopática, neumonía intersticial inespecífica, neumonitis por hipersensibilidad, a los cuales se les haya desarrollado lavado bronquioalveolar y que cuenten con sobrenadantes del mismo en el Banco de Material Biológico Ultracongelado.

Controles sanos de los cuales se cuente con muestra de LBA en el Banco de Material Biológico Ultracongelado.

El protocolo fue aprobado por el Comité Científico y de Bioética del Instituto Nacional de Enfermedades respiratorias.

Criterios de inclusión:

- Pacientes con diagnóstico clínico e histopatológico comprobado de FPI/NIU, NINE y NH, de los cuales se cuente también con lavado bronquioalveolar.

Criterios de exclusión:

- Pacientes con enfermedades adicionales como tuberculosis, neumonías bacterianas, infección sistémica, otros procesos inflamatorios, cáncer, diabetes mellitus.
- Pacientes que hayan estado recibiendo tratamiento con corticoesteroides sistémicos u otros medicamentos inmunosupresores cuando se realizó el lavado bronquioalveolar.

Criterios de eliminación:

- Pacientes cuya muestra de lavado bronquioalveolar no sea adecuada para el análisis.

Definiciones operacionales:

1. **Diagnóstico de FPI:** Este se basó en el cuadro clínico, examen físico, pruebas de función pulmonar, TCAR, y hallazgos en el lavado bronquioalveolar, y fue corroborado por las características histopatológicas de la biopsia pulmonar a cielo abierto, de acuerdo a los criterios del consenso de la Sociedad Americana de Tórax y la Sociedad Europea Respiratoria (5). El diagnóstico morfológico de FPI se basa en hallazgos microscópicos típicos de neumonía intersticial usual, con distribución en parches y temporalidad heterogénea de focos de fibroblastos, inflamación, fibrosis y lesiones quísticas (5, 68).
2. **Diagnóstico de NH:** Se estableció de acuerdo a los siguientes criterios (9, 11, 69): a) Exposición a antígeno aviario antes del inicio de la enfermedad con anticuerpos séricos positivos detectado por ELISA, o exposición a otro antígeno reconocido. b) Características clínicas, radiológicas y funcionales de enfermedad pulmonar intersticial; c) Más de 40% de linfocitos en el

lavado bronquioalveolar; d) Tomografía axial computada de alta resolución de tórax con micronódulos pobremente definidos, centrilobulares, imagen de vidrio despolido, atrapamiento focal de aire y cambios fibróticos leves; e) Histología de pulmón. Los hallazgos morfológicos se caracterizan por inflamación de predominio mononuclear, bronquiolocéntrica, con la formación de granulomas intersticiales.

3. **Diagnóstico de NINE:** Este diagnóstico se basa principalmente en la evaluación histopatológica en pacientes con datos clínicos, radiológicos y funcionales de una neumonía intersticial idiopática que no cumplan con los criterios para el diagnóstico de FPI (5, 12).
4. **Controles sanos:** Son sujetos sin antecedentes familiares ni personales patológicos de enfermedad pulmonar. Sin enfermedad pulmonar actual, sin estados co-mórbidos (diabetes, hepatopatías, etc.) corroborado por historia clínica, examen físico y con radiología de tórax normal.

Métodos

Se hizo una revisión de los expedientes clínicos de pacientes que fueron sometidos a biopsia pulmonar a cielo abierto y que contaban con diagnóstico histopatológico de NIU, NINE ó NH. Se tomaron en cuenta las pruebas de función pulmonar del inicio del estudio que tuvieran como límite un mes o menos de diferencia con la biopsia pulmonar: los estudios comparativos se realizaron con tres pruebas de función respiratoria: 1) capacidad vital forzada, 2) capacidad de difusión del monóxido de carbono y 3) saturación de oxígeno en reposo y ejercicio.

Lavado bronquioalveolar:

El LBA se realizó utilizando una técnica estándar. Brevemente, el broncoscopio de fibra óptica se introdujo en dos segmentos del lóbulo medio derecho o llingula y se instilaron 300 ml de solución salina en alícuotas de 50 ml, con un promedio de recuperación de 65-70%. El líquido recuperado se filtró a través de una gasa estéril, se midió y centrifugó a 250 X g por 10 minutos a 4°C. El concentrado celular se resuspendió en 1 ml de solución salina amortiguada con fosfato. Una alícuota fue utilizada para evaluar el número total de células. Otras alícuotas se fijaron en carbowax y tres laminillas por muestra se tiñeron con hematoxilina y eosina y se usaron para conteo diferencial de las células inflamatorias. El sobrenadante se congeló de inmediato a -70°C hasta que se midió la OPN.

Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas en los sobrenadantes del LBA se determinó utilizando el método de Bradford (70). Primero se preparó una curva estándar con

albúmina de suero bovino (Sigma) con un rango de concentración de 1 μg a 10 μg . Después se tomaron 2 μl de cada muestra y se llevaron a un volumen de 800 μl con PBS 1x, inmediatamente se agregaron 200 μl de reactivo de Bradford (Sigma) concentrado, tanto a la curva como a las muestras problema, cada muestra se agitó en un vórtex y pasados 3 minutos a temperatura ambiente se determinó su absorbancia a una longitud de onda de γ de 545 nm, la concentración de proteínas de cada una de las muestras se obtuvo interpolando las densidades ópticas obtenidas con respecto a las obtenidas en la curva estándar. Los resultados se expresan como miligramos de proteína por ml de fluido en LBA (mg/ml).

Cuantificación de OPN por ELISA.

La cuantificación de OPN se realizó en los sobrenadantes de lavado bronquioalveolar con un estuche comercial de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, ELISA) específico para OPN, siguiendo las recomendaciones del fabricante (Calbiochem, La Jolla, CA).

Antes de hacer el ELISA, se descongelaron gradualmente alícuotas de 10ml de cada uno de los lavados bronquioalveolares y fueron colocados en membranas de celulosa (MWCO 3000; Spectrum, CA), para ser dializados durante 48hs en una solución con los siguientes inhibidores de proteasas:

- Fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF) 0.1 mM / L.
- N etil maleimida (NEM) 25mM/ L.
- Tetra acetato de etilen diamida (EDTA) 10mM/L.
- Azida de sodio (NaN_3) .02% / 1L.

Posteriormente, las muestras fueron liofilizadas y resuspendidas en 1ml de agua para proceder a realizar el ELISA. Se utilizaron 200 microlitros de muestra para el ELISA y otros 200 microlitros para la cuantificación del contenido de proteínas totales en el LBA. El resultado del coeficiente de correlación intraclase para el ELISA fue de 0.96.

Los resultados están expresados en ng de OPN / mg de proteína.

Análisis Estadístico.

Se utilizó estadística descriptiva con promedio y desviación estándar, así como mediana y valores mínimo – máximo según correspondiera. Todos los datos de OPN y proteínas fueron probados para homogeneidad y normalidad de varianza y dado que los resultados obtenidos no mostraban una distribución normal se decidió realizar una transformación logarítmica. Para evaluar las diferencias entre grupos, se utilizó prueba de ANOVA con *post hoc* de Bonferroni, así como la prueba de Kruskal Wallis para variables que no tuvieron distribución normal. Se evaluó la asociación entre variables dicotómicas mediante tablas de contingencia de 2 x 2 para prueba Chi cuadrada de Pearson y en la sección exploratoria se analizó la correlación de los valores de OPN con las variables clínicas utilizando la prueba de correlación de Pearson.

Resultados

Se revisaron 109 expedientes, de los cuales 61 cumplieron con los criterios de inclusión. Las características demográficas y clínicas de los sujetos incluidos se resumen en la tabla 2.

Como se esperaba, dado que la FPI ocurre en general en pacientes mayores de 50 años, se encontró una diferencia significativa en la edad de este grupo de pacientes con el resto de los grupos de estudio que en general eran más jóvenes ($p < 0.0001$). Se encontró también diferencia en los niveles de OPN por género, siendo más elevados en los hombres que en las mujeres ($p < 0.05$) además de una moderada correlación positiva de OPN con la edad ($r = 0.58$, $p < 0.01$).

Los pacientes con las diferentes neumopatías intersticiales mostraron en las pruebas de función respiratoria, alteraciones de tipo restrictivo, con disminución de la capacidad vital forzada, y de intercambio gaseoso, con disminución de la capacidad de difusión y de la saturación de oxígeno. Sin embargo, no se encontraron diferencias en los promedios de estas variables entre los 3 grupos. Las alteraciones fueron significativas en comparación con el grupo control ($p < 0.001$).

Por otro lado, el análisis de los valores de proteínas totales en los LBA mostró un incremento significativo entre el grupo de pacientes con NH y el resto de los sujetos ($p < 0.05$) (Gráfica 1).

Osteopontina en el lavado bronquioalveolar

Para tener una distribución normal, se obtuvo el logaritmo de los valores de OPN ajustado por proteínas totales en el LBA. Se observó que los niveles de OPN en el

LBA en los pacientes con FPI fueron significativamente mayores que en los pacientes con NH y sujetos sanos ($p < 0.0001$) así como en pacientes con NINE ($p < 0.05$). No se encontró diferencia entre los promedios de estos tres últimos grupos (Gráfica 2).

Mediante la utilización de curvas de características operativas del receptor (ROC) se determinó que cuando el logaritmo de OPN es ≥ 2.0 , esta prueba presenta una sensibilidad de 80% y una especificidad del 75% para el diagnóstico de FPI. (Tabla 4, Gráfica 3).

Correlación de los niveles de Osteopontina con las pruebas de función pulmonar y curso clínico de la enfermedad.

No se encontró correlación alguna entre los niveles de OPN con las pruebas de función pulmonar (FVC, saturación de oxígeno en reposo y ejercicio, difusión de monóxido de carbono).

Tampoco encontramos asociación entre los niveles de OPN y el tipo de curso clínico de la FPI. Para esto, los pacientes fueron separados de acuerdo al tiempo transcurrido entre el inicio de síntomas y el diagnóstico, en menores de 12 meses y mayores de 24 meses, dado que hemos encontrado que los pacientes que consultan con menos de 8 meses de síntomas presentan una forma acelerada de la enfermedad (Selman, manuscrito en preparación).

Se exploró también la correlación entre el número absoluto y porcentaje de células en el lavado bronquioalveolar (macrófagos y linfocitos) y la cantidad de OPN ajustado por proteínas sin encontrar ningún tipo de asociación.

Un hallazgo interesante en el análisis de las variables clínicas fue encontrar una asociación significativa entre los niveles elevados de OPN y la presencia de

hipocratismo digital. Esta asociación se observó cuando se analizaron todos los sujetos como grupo (RM = 6.69 IC = 1.25 – 10.76; $p < 0.05$).

Esta asociación se perdió en los pacientes con FPI dado que en la mayoría de ellos existe presencia de hipocratismo digital (RM = 3.3, IC95% 0.23 – 37.1, $p = 0.64$). El análisis de esta asociación en los otros dos grupos de pacientes mostró una RM = 21, IC 95% 1.50 – 293.26, $p < 0.05$ para el grupo de pacientes con NH, y una RM de 0.16, IC 95% .0010 – 2.82. $p = 0.26$ en el grupo de pacientes con NINE.

Se exploró también las posibles asociaciones de género y tabaquismo con la cantidad de OPN en LBA. Para el grupo completo de sujetos estudiado se observó una tendencia hacia una asociación positiva entre el hábito tabáquico y cantidades elevadas de OPN en LBA (RM de 3.0, IC95% 0.99 – 9.06, $p = 0.087$).

Por otro lado, en la gráfica que muestra los niveles de OPN ajustada por proteínas es evidente que dentro del grupo de pacientes con FPI existen diferencias en la cantidad de OPN cuantificada por ELISA dando la apariencia de formar dos grupos diferentes. En este contexto, se realizó un modelo de regresión lineal múltiple para tratar de definir cuales son los parámetros que influyen en la variación de las cantidades de OPN en el lavado de estos pacientes. Al modelo se ingresaron todas aquellas variables que fueron consideradas de importancia clínica y biológica en el padecimiento. Con este análisis se obtuvo un modelo que incluyó 6 parámetros que fueron, PaO₂ en ejercicio, FVC%, DLCO%, edad, género y tabaquismo, con una R² ajustada de .94 y $p = .012$.

Discusión

Las neumopatías intersticiales muestran rasgos clínicos, radiológicos y funcionales similares. Es por esto que a pesar de ser muy heterogéneas en su etiología y patogénesis pueden agruparse en conjunto bajo el término de EPID. En general, los pacientes con cualquiera de estos padecimientos presentan disnea de esfuerzo progresiva, tos con expectoración escasa, imágenes radiológicas bilaterales y difusas, y alteraciones funcionales de tipo restrictivo con hipoxemia en reposo que empeora con el ejercicio.

Dos de las EPID que con mayor frecuencia se observan en México son la fibrosis pulmonar idiopática y la neumonitis por hipersensibilidad inducida por la exposición prolongada a diferentes tipos de aves, como palomas, canarios o pericos australianos. La forma crónica de la NH puede progresar hacia la fibrosis y ser indistinguible de la FPI (11, 71). Asimismo, la neumonía intersticial idiopática inespecífica (NINE) suele confundirse, incluso en los hallazgos histopatológicos con la FPI y la NH (72, 73).

En este contexto, el principal objetivo de este estudio fue evaluar si los niveles de OPN en el lavado bronquioalveolar podría ser utilizada como una prueba auxiliar en la caracterización de estas EPID, particularmente si podía discriminar a la FPI, que representa uno de los mayores retos de diagnóstico y tratamiento en este grupo de enfermedades.

Con este propósito cuantificamos los niveles de OPN en los LBA de pacientes con FPI, NH, NINE y sujetos sanos. Decidimos usar lavado bronquioalveolar por dos razones: a) es un método rutinario en el estudio de estos

pacientes y b) puede reflejar de manera más apropiada lo que está ocurriendo en el tejido pulmonar dañado.

Nuestros resultados mostraron una marcada diferencia en los promedios de OPN presentes en los lavados de los pacientes con FPI en comparación con los demás grupos, en quienes además no se observaron diferencias intergrupales. De manera interesante, nuestros datos mostraron una sensibilidad de 80% y especificidad del 75% para el diagnóstico de FPI cuando el resultado de logaritmo de OPN es ≥ 2.0 , lo cual podría hacer de esta técnica una buena opción para ser utilizada como prueba auxiliar en el diagnóstico diferencial de estas enfermedades.

También encontramos una diferencia significativa en los niveles de OPN entre hombres y mujeres, siendo más alto el promedio en los hombres; y una correlación positiva de los niveles de OPN con la edad. No existen reportes previos en la literatura donde se mencionen diferencias en los niveles de OPN por género, y con respecto a la edad encontramos solo dos estudios, contradictorios entre sí, de trabajos donde se midieron cantidades de OPN en plasma de pacientes con tuberculosis y controles sanos así como con hiperlipidemia y controles sanos (61, 74). En el primero de ellos, no encontraron correlación entre la edad y los niveles de OPN y en el segundo reportan una correlación positiva entre los niveles de OPN y la edad, resultados similares a los nuestros; es importante destacar que nuestro trabajo es el primero que ha sido realizado midiendo concentraciones de OPN en sobrenadante de LBA, y a diferencia de los anteriores, esta puede ser una aproximación más directa de los eventos patológicos que están ocurriendo en el pulmón de estos pacientes.

Consideramos que la participación del género y la edad pueden ser debidos principalmente a que los sujetos con FPI que mostraron niveles más elevados de OPN son predominantemente del género masculino y mayores de 60 años, por esto es importante mencionar que la incidencia de esta enfermedad es mayor en hombres que en mujeres, así como en individuos mayores de 50 años (74, 75).

Como se mencionó previamente, se observaron diferencias en los niveles de OPN en los LBA de los pacientes dentro del grupo con FPI por lo que se realizó un modelo de regresión lineal múltiple tratando de definir los parámetros clínicos y/o biológicos que influyen en la variación de las cantidades de OPN en LBA en estos pacientes. En el modelo obtenido, quedaron incluidas 6 variables que fueron, PaO₂ en ejercicio, FVC%, DLCO%, edad, género y tabaquismo. Este modelo es congruente con nuestros resultados ya que se observaron diferencias en los niveles de OPN según el género así como asociación con los niveles de OPN y edad y una tendencia hacia una asociación con el tabaquismo. Aunado a esto, la PaO₂ en ejercicio, FVC%, DLCO% son variables que se relacionan con la progresión de la enfermedad, lo que nos puede estar indicando que las diferencias en los niveles de OPN en LBA que existen en este grupo de pacientes pueden estar asociadas al grado de progresión de la enfermedad.

Por otro lado, es de gran interés el hallazgo de la fuerte asociación entre los niveles elevados de OPN y la presencia de hipocratismo digital, ya que se sabe que la presencia de este signo esta asociado de manera importante con procesos fibrosantes avanzados, en especial en la FPI (75); además de esto, en un estudio realizado en el INER se demostró que el hipocratismo digital es relativamente frecuente en pacientes con neumonitis por hipersensibilidad crónica y que predice

un mal pronóstico (76). Esto podría indicar que los pacientes con mayores niveles de OPN son también aquellos que presentan enfermedad más avanzada y/o una presentación clínica más agresiva. Esta hipótesis está basada no solo en nuestros hallazgos actuales sino también en la teoría de que la OPN es una proteína pro fibrosante (67), y que puede participar activamente en la progresión de estas enfermedades. Es importante señalar que los mecanismos involucrados en el desarrollo de hipocratismo digital no se conocen con precisión; éste consiste en la deformación bulbosa de las puntas de los dedos que se desarrolla como resultado de edema y depósito excesivo de colágena, además de activación de las células endoteliales e hiperplasia vascular. Se ha sugerido que algunos mediadores como el factor de crecimiento derivado de plaquetas así como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), pueden tener participación en la patogénesis del hipocratismo digital; se plantea que en patologías donde se genera el paso de megacariocitos y conglomerados de plaquetas a través de cortocircuitos en la red capilar pulmonar, estas células liberan al factor de crecimiento derivado de plaquetas así como al factor de crecimiento vascular endotelial. Además, se ha probado que el VEGF y el PDGF, se incrementan en procesos hipóxicos y que conducen al incremento en la vascularidad, permeabilidad y cambios en el tejido conectivo característicos del hipocratismo digital (77, 78).

La OPN se produce normalmente en huesos y dientes donde se ha sugerido que desempeña un papel importante en adhesión, migración y supervivencia celular (79, 80). Se ha reportado que el gen de la OPN, es uno de los genes sobre expresados en pulmones de ratas sometidas a hipoxia hipobárica (81). Asimismo, en un trabajo reciente con un modelo de hipoxia normobárica en

ratas, se demostró que además de que la OPN se incrementa en pulmón debido a la hipoxia *per se* puede ser *sobre regulada* por factores de crecimiento que responden a hipoxia, tales como la angiotensina II y el factor de crecimiento para fibroblastos ácido en células de músculo liso de arterias pulmonares con lo cual se sugiere que la OPN puede desempeñar también un papel en la remodelación vascular (82). En este contexto, podemos especular en base a nuestros hallazgos, que OPN puede contribuir al desarrollo del hipocratismo digital.

Las características del presente estudio no nos permiten hacer inferencias en cuanto a la correlación de los resultados de la cuantificación de OPN con la progresión de la enfermedad y supervivencia de los pacientes, pero consideramos que sería de gran importancia e interés realizar un estudio prospectivo con la intención de probar éstas hipótesis.

La ausencia de correlación de los niveles de OPN con las pruebas de función pulmonar, podría considerarse algo esperado, ya que las anomalías en las pruebas de función pulmonar en estas patologías no muestran, característicamente, diferencias entre sí, siendo esta una de las razones por las que estas pruebas no son de ayuda en el diagnóstico diferencial de estas enfermedades. (68, 83).

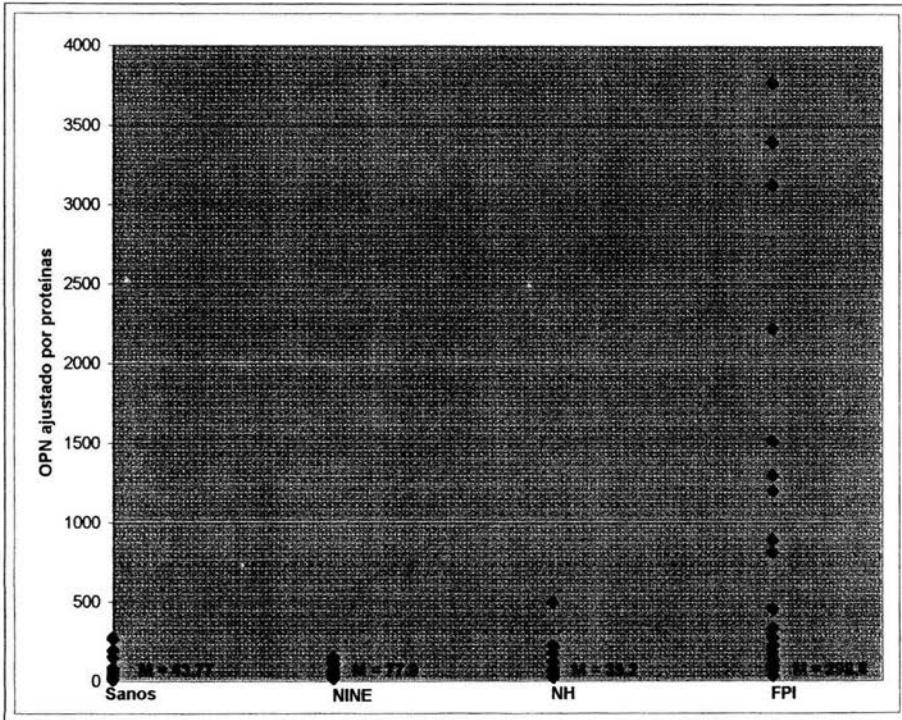
En resumen, en este trabajo hemos demostrado que la OPN se encuentra elevada en el lavado bronquioalveolar de los pacientes con fibrosis pulmonar idiopática por lo que podría considerarse como una prueba auxiliar de diagnóstico diferencial de las EPID.

Tabla 1. Reguladores transcripcionales de OPN. Indicando la localización de los dominios de unión en la OPN. Promotor (h= humano, m= ratón, r= rata) y el correspondiente tipo celular utilizado en el estudio del promotor.

Factores de regulación transcripcional de la expresión de OPN	Sitio de reconocimiento del promotor de OPN	Tipos celulares
OCT-1	-45 a -22 (h)	Células de astrocitoma maligno humano U-251MG, U-87MG y U-373MG.
Factor v- <i>Src</i> /CBF-like	-65 a -38 (m)	Células de fibrosarcoma HT1060.
AP-1	-76 (r)	Células de musculo liso de aorta de rata.
Myc	-86 a -55 (h)	Células de astrocitoma maligno humano U-251MG, U-87MG y U-373MG.
USF	-80 a -72 (m), -101 a -96 (r)	Células de musculo liso de aorta de rata.
TGF- β / Smad 3	-229 a -179 (m)	Células epiteliales de pulmón Mv1Lu.
TGF- β / Hoxa-9	-198 a -195 (m)	Células epiteliales de pulmón Mv1Lu.
Ras/RRF	-725 a -717 (m), -99 a +79 (m)	Células de cancer de mama MDA-MB-231.

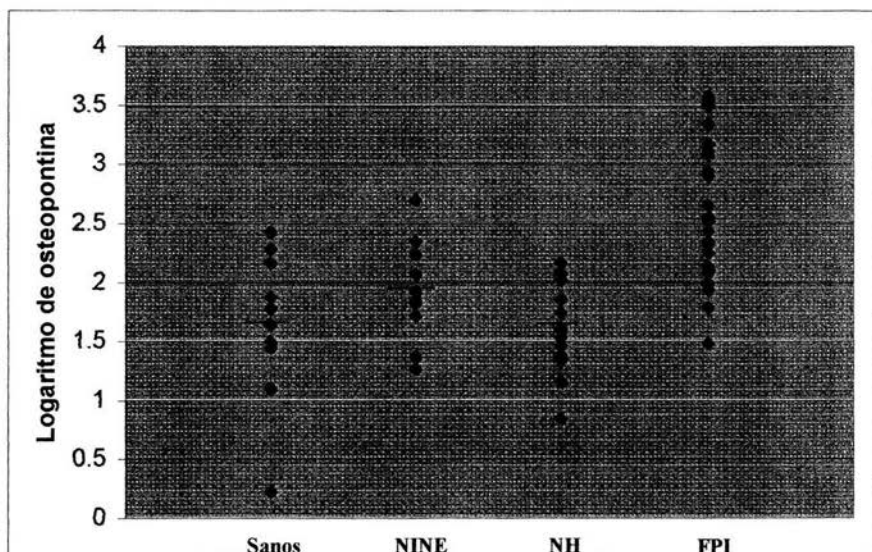
Tabla 2. Características de la población de estudio

Diagnóstico	FPI	NH	NINE	Controles
Número de Pacientes	25	16	10	10
Edad, años	61 (26 - 48)	43 (35 - 59)	45 (35- 59)	35 (26 - 48)
Hombre / mujer	14 / 11	7 / 9	0 / 10	7 / 3
Fumadores	6	2	1	0
Ex fumadores	5	2	2	0
No fumadores	14	12	7	10
FVC %, predicho	67.29 ± 24.28	65.4 ± 19.05	58.7 ± 18.9	102.5 ± 4.24
DLCO %, predicho	67.14 ± 21.18	62.7 ± 22.7	73.5 ± 29.6	100.77 ± 1.7
PaO2 mmHg, reposo	52.46 ± 7.6	56.31 ± 6.7	51.3 ± 5.7	No se hizo
PaO2 mmHg, ejercicio	40.7 ± 6.16	42.87 ± 4.71	39.55 ± 4.65	No se hizo
Total de células x 10⁵	13.34 ± 12.42	23.20 ± 14.64	23.28 ± 11.28	4.88 ± 3.45
Macrófagos en LBA	79.52 ± 9.37	30.81 ± 16.94	51.70 ± 16.71	89.10 ± 4.38
Linfocitos en LBA	16.36 ± 8.47	67.44 ± 17.13	46.10 ± 18.53	9.9 ± 3.73
Neutrófilos en LBA	1.6 ± 3.0	.56 ± .81	.80 ± 2.2	.10 ± .32
Eosinófilos en LBA	2.8 ± 2.96	.66 ± .88	1.5 ± 1.78	.10 ± .32

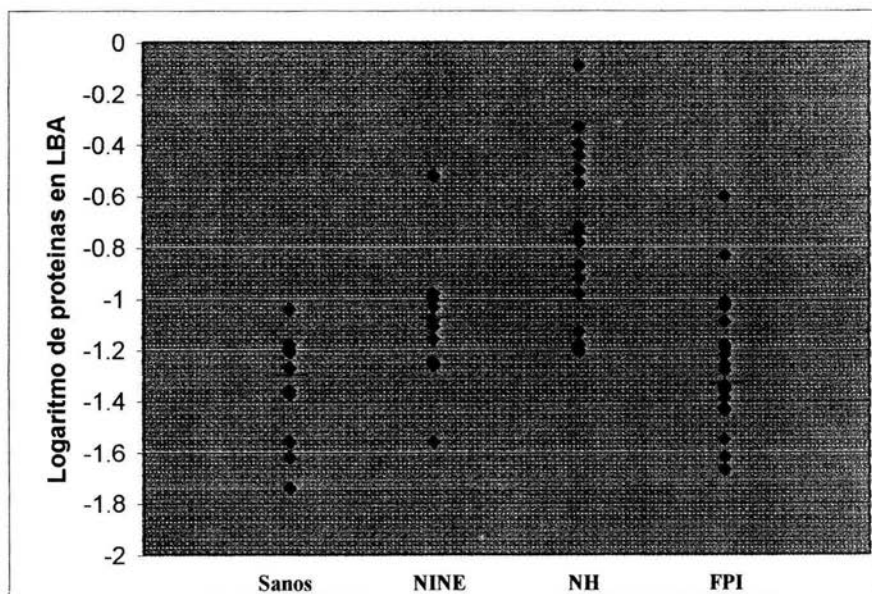


Gráfica 1. Niveles de OPN ajustado por proteínas totales en el LBA por grupo.

* M = mediana de cada grupo.



Gráfica 2. Logaritmo de la cantidad de OPN ajustado por proteínas en el LBA por grupo. Las líneas rojas identifican la ubicación de los promedios.



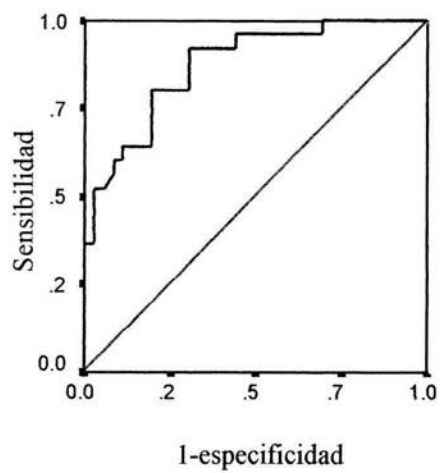
Gráfica 3. Contenido de proteínas totales en el LBA. Las líneas rojas identifican la ubicación de los promedios.

Tabla 3. Coordenadas de la curva ROC

Variable de prueba: Log de OPN

Positivo si es Sensibilidad 1 - Especificidad
mayor ó
igual a:

-.780	1.000	1.000
.530	1.000	.972
.965	1.000	.944
1.120	1.000	.917
1.205	1.000	.889
1.295	1.000	.861
1.340	1.000	.833
1.355	1.000	.806
1.370	1.000	.778
1.410	1.000	.750
1.450	1.000	.722
1.470	1.000	.694
1.485	.960	.694
1.510	.960	.667
1.555	.960	.639
1.585	.960	.611
1.595	.960	.583
1.620	.960	.556
1.675	.960	.528
1.725	.960	.500
1.755	.960	.472
1.775	.960	.444
1.800	.920	.444
1.830	.920	.417
1.845	.920	.361
1.860	.920	.333
1.900	.920	.306
1.950	.880	.306
1.980	.840	.306
2.000	.800	.306
2.035	.800	.250



Gráfica 3. Curva ROC de logaritmo de OPN para FPI.

Bibliografía.

1. Selman M, King TE Jr, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med.* 2001; 134:136-151.
2. Gross TJ, Hunninghake GW. Idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* 2001; 345: 517-525.
3. Katzenstein AL, Myers JL. Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical relevance of pathologic classification. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 157: 1301-1315.
4. Collard HR, King TE Jr. Treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: the rise and fall of corticosteroids. *Am J Med.* 2001; 110: 326-328.
5. American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: diagnosis and Treatment. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 161: 646-664.
6. Grenier P, Valeyre P, Cluzel M, Brauner W, Lenoir S and Chastand C. Chronic diffuse interstitial lung disease: diagnostic value of chest radiography and high-resolution CT. *Radiology.* 1991; 179: 123-132.
7. Mathieson JR, Mayo JR, Staples CA, Muller NL. Chronic diffuse infiltrative lung disease: comparison of diagnostic accuracy of CT and chest radiography. *Radiology.* 1989; 177: 111-116.
8. Tung KT, Wells AU, Rubens MB, Kirk JM, du Bois RM, Hansell DM. Accuracy of the typical computed tomographic appearances of fibrosing alveolitis. *Thorax.* 1993; 48: 334-338.
9. Lynch DA, Newell JD, Logan PM, King TE Jr, Muller NL. Can CT distinguish idiopathic pulmonary fibrosis from hypersensitivity pneumonitis? *Am J Roentgenol.* 1995; 165: 807-811.
10. Swensen S, Aughenbaugh G, Myers J. Diffuse lung disease: diagnostic accuracy of CT in patients undergoing surgical biopsy of the lung. *Radiology.* 1997; 205: 229-234.
11. Perez-Padilla R, Salas J, Chapela R, Sanchez M, Carrillo G, Perez R, Sansores R, Gaxiola M, Selman M. Mortality in Mexican patients with

- chronic pigeon breeder's lung compared with those with usual interstitial pneumonia. *Am Rev Respir Dis.* 1993; 148:49-53
12. Drent M, duBois RM, Poletti Venerino. Recent advances in the diagnosis and management of nonspecific interstitial pneumonia. *Curr Opin Pulm Med.* 2003, 9:411-417.
 13. Yamazaki H, Ando W, Brazer D, Cruikshank J. Polarized type 1 cytokine profile in bronchoalveolar lavage T cells of patients with hypersensitivity pneumonitis. *J Immunol.* 1999; 163: 3516-3523.
 14. Pardo A, Barrios R, Gaxiola M, Segura L, Carrillo G, Estrada A, Mejia M, Selman M. Increase of lung neutrophils in hypersensitivity pneumonitis is associated with lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 161: 1698-1704.
 15. Pardo A, Selman M. Molecular Mechanisms of Pulmonary Fibrosis. *Frontiers in Bioscience.* 2002; 7: d1689-1707.
 16. Antoniadou HN, Bravo MA, Avila RE, Galanopoulos T, Neville J, Selman M. Platelet derived growth factor in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest.* 1990; 86: 1055-1064.
 17. Kapanci Y, Desmouliere A, Pache JC, Redard M, Gabbiani G. Cytoskeletal protein modulation in pulmonary alveolar myofibroblasts during idiopathic pulmonary fibrosis. Possible role of transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995; 152: 2163-2169.
 18. Nash JR, McLaughlin PJ, Butcher D, Corrin B. Expression of tumor necrosis factor alpha in cryptogenic fibrosing alveolitis. *Histopathology.* 1993; 22: 343-347.
 19. Khalil N, O'Connor RN, Unruh HW, Warren PW, Flanders KC, Kemp A, Berezney OH, Greenberg AH. Increased production and immunohistochemical localization of transforming growth factor beta in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Moll Biol.* 1991; 5: 155-162.
 20. Khalil N, O'Connor RN, Flanders KC, Unruh HW. TGF-beta 1 but not TGF-beta 2 or TGF-beta 3 is differentially present in epithelial cells of advanced

- pulmonary fibrosis: an immunohistochemical study. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1996; 14: 131-138.
21. Pan LH, Yamauchi K, Uzuki M, Nakanizhi T, Takigawua M, Inoue H, Sawai T. Type II alveolar epithelial cells and interstitial fibroblasts express connective tissue growth factor in IPF. *Eur Respir J.* 2001; 17:1220-1227.
 22. Simon RH, Scott MJ, Reza MM, Killen PD. Type IV collagen production by rat pulmonary alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1993; 8: 640-646.
 23. Sage H, Farin FM, Striker GE, Fisher AB, Granular pneumocytes in primary culture secrete several major components of the extracellular matrix. *Biochemistry.* 1983; 22: 2148-2155.
 24. King TE Jr, Schwartz MI, Brown J, Tooze JA, Colby TV, Waldron JA, Flint A, Thurlbeck W, Cherniak RM. Extent of fibroblast foci predict mortality in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 163: A982.
 25. Saganuma H, Sato A, Tamura R, Chida K. Enhanced migration of fibroblasts derived from lungs with fibrotic lesions. *Thorax.* 1995; 50: 984-989.
 26. Kuhn C, McDonald JA. The roles of the myofibroblast in idiopathic pulmonary fibrosis. Ultrastructural and immunohistochemical features of sites of active extracellular matrix synthesis. *Am J Pathol.* 1991; 138: 1257-1265.
 27. Adler KB, Callahan LM, Evans JN. Cellular alterations in the alveolar wall in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. An ultrastructural morphometric study. 1986; 133: 1043-1048
 28. Gressner AM. Transdifferentiation of hepatic stellate cells (Ito Cells) to myofibroblasts: a key event in hepatic fibrogenesis. *Kidney Int suppl.* 1996; 54: S39-S45.
 29. Bachem MG, Schneider E, Gross H, Weidenbach H, Schmid RM, Menke M, Siech M, Beger H, Grunert A. Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology.* 1998; 115: 421-432.

30. Desmouliere A, Geinoz A, Gabiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor- β 1 induces a smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultures fibroblasts. *J Cell Biol.* 1993; 122: 103-111.
31. Sime PJ, Xing Z, Graham FL, Czaky GK, Gaudie J. Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor- β 1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung. *J Clin Invest.* 1997; 100: 768-776.
32. Jelaska A, Korn JH. Role of apoptosis and transforming growth factor- β 1 in fibroblast selection and activation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2000; 43: 2230-2239.
33. Zhang HY, Phan SH. Inhibition of myofibroblast apoptosis by transforming growth factor - β 1. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999; 21: 658-665.
34. Ramos C, Montano M, Garcia-Alvarez J, Ruiz V, Uhal VD, Selman M, Pardo A. Fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis and normal lungs differ in growth rate, apoptosis, and TIMP's expression. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001; 24: 591-598.
35. Fukuda Y, Ishizaki M, Kudoh S, Kitaichi M, Yamanaka N. Localization of matrix metalloproteinases-1, -2, and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in interstitial lung diseases. *Lan Invest.* 1998; 78: 687-698.
36. Selman M, Ruiz V, Cabrera S, Segura L, Ramirez R, Barrios R, Pardo A. Localization of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs)-1,-2,-3, and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. TIMPs/collagenases imbalance in the fibrotic lung microenvironment. *Am J Physiol.* 2000; 279: L562-L547.
37. Woesner JF, Nagase H. *Matrix metalloproteinases and TIMPs.* New York: Oxford University Press. 2000
38. Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochem Biophys Acta.* 2000; 1477: 267-283.
39. Johnson GA, Burghardt RC, Joyce MM, Spencer TE, Bazer FW, Gray CA, Pfarrer C. Osteopontin is synthesized by uterine glands and a 45-kDa

- cleavage fragment is localized at the uterine-placental interface throughout ovine pregnancy. *Biol Reprod.* 2003 Jul;69(1):92-98.
40. Smith JH, Denhardt DT. Molecular cloning of a tumor promoter-inducible mRNA found in JB6 mouse epidermal cells: induction is stable at high, but not at low, cell densities. *J Cell Biochem.* 1987; 34(1):13-20.
 41. Patarca R, Freeman GJ, Snigh RP, Wei FY, Durfee T, Blattner F, Regnier DC, Kozak CA, Mock BA, Morse HC. Structural and functional studies of the early T lymphocyte activation 1 (Eta-1) gene. Definition of a novel T cell-dependent response associated with genetic resistance to bacterial infection. *J Exp Med.* 1989; 170(1): 145-163.
 42. Denhart DT, Guo X. Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J.* 1993; 7(15): 1475-1488.
 43. Oldberg A, Frazer A, and Heinegard D. Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (OPN) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986; 83(23): 8819-8826.
 44. Senger DR, Asch BB, Smith BD, Perruzzi CA, Dvorak HF. A secreted phosphoprotein marker for neoplastic transformation of both epithelial and fibroblastic cells. *Nature.* 1983; 302(5910): 714-723.
 45. Mazzali M, Kipari T, Ophascharoensuk V, Wesson JA, Johnson R, Hughes J. Osteopontin- a molecule for all seasons. *QJM.* 2002; 95 (1): 3-13.
 46. O'Regan AW, Nau GR, Chupp GL, Berman JS. Osteopontin (Eta-1) in cell-mediated immunity: teaching an old dog new tricks. *Immunology Today.* 2000; 21(10): 475-78.
 47. O'Regan AW, Chupp GL, Lowry JA, Goetschekes M, Mulligan N, Berman JS. Osteopontin is associated with T cells in sarcoid granulomas and has T cell adhesive and cytokine-like properties in vitro. *J Immunol.* 1999; 162: 1024-1031.
 48. Denger DR, Perruzzi CA, Gracey CF, Papadopoulos A, Tenen DG. Secreted phosphoproteins associated with neoplastic transformation: close homology with plasma proteins cleaved during blood coagulation. *Cancer Res.* 1988; 48(20): 5770-5779.

49. Denger DR, Perruzi CA, Papadopoulos A, Tenen DG. Purification of a human milk protein closely similar to tumor-secreted phosphoproteins and OPN. *Biochim Biophys Acta*. 1989; 996(1-2): 43-50.
50. Bautista DS, Denstedt J, Chambers AF, Harris JF. Low-molecular-weight variants of OPN generated by serine proteinases in urine of patients with kidney stones. *J Cell Biochem*. 1996; 61(3): 402-408.
51. Hijiya N, Setoguchi M, Matura K, Higuchi Y, Akizuki S, Yamamoto S. Cloning and characterization of the human OPN gene and its promoter. *Biochem J*. 1994; 303: 255-264.
52. Denhardt DT, Noda M. Osteopontin expression and function: role in bone remodeling. *J Cell Biochem Suppl*. 1998; 30-31: 92-99.
53. O'Regan AW, Berman JS. Osteopontin: a key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation. *J Exp Pathol*. 2000; 81: 373-390.
54. Weber GF. The metastasis gene OPN: a candidate target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2001; 1552(2): 61-69.
55. Craig AM, Denhardt DT. The murine gene encoding secreted phosphoprotein 1 (OPN): promoter structure, activity, and induction in vivo by estrogen and progesterone. *Gene*. 1991; 100: 163-170.
56. Malyankar UM, Hanson R, Schwartz SM, Ridall AL, Gianchelli CM. Upstream stimulatory factor 1 regulates OPN expression in smooth muscle cells. *Exp Cell Res*. 1999; 250(2):535-542.
57. Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation tissue remodeling, and cell survival. *JCI*. 2001, 107(9): 1055-1061.
58. Nau GJ, Guilfoile P, Chupp GL. A chemoattractant cytokine associated with granulomas in tuberculosis and silicosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94: 6414-6421.
59. Atkins KB, Berry JE, Shang WZ, Harris AF, Chambers RU, Simpson MJ. Coordinate expression of OPN and associated receptors during monocyte/macrophage differentiation of HL-60 cells. *J Cell Physiol*. 1998; 175: 229-337.

60. Maeda K, Takahashi K, Takahashi F, Tamura N, Maeda M, Kon S, Uede T, Fukuchi Y. Distinct roles of osteopontin fragments in the development of the pulmonary involvement in sarcoidosis. *Lung*. 2002; 179: 279 - 291.
61. Kogushi Y, Kawakami K, Uezu K, Fukushima K, Kon S, Maeda M, Nakamoto A, Owan I, Kuba M, Kudeken N, Azuma M, Yara S, Shinzato T. High plasma OPN level and its relationship with interleukin-12-mediated type 1 helper cell response in tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003; 167:1355-1359.
62. Miyasaki Y, Tashiro T, Higuchi Y, Setoguchi M, Yamamoto S, Nagai H, Nasu M, Vassalli P. Expression of osteopontin in a macrophage cell line and in transgenic mice with pulmonary fibrosis resulting from the lung expression of a tumor necrosis factor- α transgene. *Ann N Y Acad Sci*. 1995; 760: 334-341.
63. Nakama K, Miyazaki Y, Nasu M. Immunophenotyping of lymphocytes in the lung interstitium and expression of osteopontin and interleukin-2 mRNAs in two different murine models of pulmonary fibrosis. *Exp Lung Res*. 1998; 24: 57-70.
64. Kaminski N, Allard JD, Pittet JF, Zuo F, Griffiths MJ, Morris D, Huang X, Sheppard D, Seller RA. Global analysis of gene expression in pulmonary fibrosis reveals distinct programs regulating lung inflammation and fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97: 1778-1783.
65. Takahashi F, Takahashi K, Okazaki T, Maeda K, Lenaga H, Maeda M, Kon S, Uede T, Fukuchi Y. Role of Osteopontin in the pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001; 24:264-271.
66. Philip S, Kundu GC. Osteopontin induces nuclear factor κ B-mediated promatrix metalloproteinase-2 activation through I κ B α /IKK signaling pathways, and curcumin (diferulolylmethane) down-regulates these pathways. *JBQ*. 2003; 278(16): 14487-14497.
67. Berman JS, Serlin D, Li X, Whitley G, Hayes J, Rishikof DC, Ricupero DA, Liaw L, Goetschkes M, O'Reagan AW. Altered bleomycin-induced lung fibrosis in OPN-deficient mice. *Am j Physiol Cell Mol Physiol*. 2004; 286: L1311-L1318.

68. Nicholson AG, Fulford LG, Colby T, du Bois RM, Hansell DM, Wells AU. The relationship between individual histologic features and disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 166: 173-177.
69. Ramírez A, Sansores R, Pérez-Padilla R, Carrillo G, Selman M. Utility of a provocation test for diagnosis of chronic pigeon breeder's disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998 ;158(3):862-869.
70. Bradford Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 1976; 72: 248 – 254
71. Lacasse Y, Selman M, Costabel U, Dalphin JC, Ando M, Morell F, Erkinjuntti-Pekkanen R, Muller N, Colby TV, Schuyler M, Cormier Y; HP Study Group. Clinical diagnosis of hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168:952-958.
72. Katzenstein AL, Fiorelli RF. Nonspecific interstitial pneumonia/fibrosis. Histologic features and clinical significance. *Am J Surg Pathol* 1994; 18:136-147.
73. Nicholson AG, Colby TV, du Bois RM, Hansell DM, Wells AU. The prognostic significance of the histologic pattern of interstitial pneumonia in patients presenting with the clinical entity of cryptogenic fibrosing alveolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:2213-2217.
74. Takemoto M, Tada K, Nakatsuka K, Moriyama Y, Kazui H, Yokote K, Matsumoto T, Saito Y, Mori S. Effects of aging and hyperlipidemia on plasma osteopontin level. *Nippon Ronen Igakkai Zasshi.* 1999; 36(11):799-802.
75. Talmadge E. King Jr. MD: Idiopathic Pulmonary Fibrosis. In: *Interstitial Lung Disease.* 1998. Eds: Shuartz M.I., King T.E., B.C. DeCaer Inc, Hamilton, Ontario, 597-644.
76. Sansores R, Salas J, Chapela R, Barquín N, Selman M. Clubbing in hypersensitivity pneumonitis. Its prevalence and possible prognostic role. *Arch Intern Med* 1990; 150: 1849-1854.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

77. Dickinson CJ, Martin JF. Megakaryocytes and platelet clumps as the cause of finger clubbing. *Lancet*. 1987. Dec 19;2(8573):1434-1435.
78. Atkinson S, Fox SB. Vascular endothelial growth factor (VEGF) – A and platelet – derived growth factor (PDGF) play a central role in the pathogenesis of digital clubbing. *J Pathol*. 2004; 203: 721-728.
79. Standal T, Borset M, Sundan A. Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling. *Exp Oncol* 2004; 26:179-184.
80. Sodek J, Zhu B, Huynh MH, Brown TJ, Ringuette M. Novel functions of the extracellular matrix proteins osteopontin and osteonectin/SPARC. *Connect Tissue Res* 2002; 43:308-319.
81. Hoshikawa Y, Nana-Sinkam P, Moore MD, Sotto-Santiago S, Phang T, Keith RL, Morris KG, Kondo T, Tudor RM, Voelkel NF, Geraci MW. Hypoxia induces different genes in the lungs of rats compared with mice. *Physiol Genomics*. 2003 Feb 6;12(3):209-19.
82. Li P, Opharil S, Feng W, Chen Y. Hypoxia – responsive growth factors upregulate periostin and osteopontin expression via distinct signaling pathways in rat pulmonary arterial smooth muscle cells. *J Appl Physiol*. 2004; 97: 1550 – 1558.
83. Shuartz Marvin I: Approach to the understanding, diagnosis, and management of interstitial lung disease. In: *Interstitial Lung Disease*. 1998. Eds: Shuartz M.I., King T.E., B.C. DeCaer Inc, Hamilton, Ontario, 1-30.