



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

**Biomarcadores para el diagnóstico diferencial de
Fibrosis Pulmonar Idiopática**

TESIS

QUE PARA OPTAR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA

Ivette Buendía Roldán

TUTOR

Dr. Moisés Selman

COMITE TUTORIAL

Dr. Victor Manuel Ruiz López

Dr. Mario H Vargas Becerra

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

INDICE

Resumen	1
Introducción	3
Planteamiento del Problema	9
Pregunta de Investigación	9
Justificación	9
Objetivos	10
Hipótesis	10
Material y métodos	14
Resultados	19
Discusión	29
Bibliografía	34

Resumen

Antecedentes La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una enfermedad de causa desconocida, crónica, progresiva y letal, con una elevada mortalidad (50%) a 3 años posterior al diagnóstico. Debido a su alta letalidad y a que su velocidad de progresión es muy heterogénea, es muy importante determinar el diagnóstico preciso de una manera rápida y lograr diferenciarla de otras enfermedades fibrosantes del pulmón que son frecuentes, potencialmente tratables y que suelen confundirse con esta enfermedad. Entre estas destacan las enfermedades colágeno-vasculares con afección pulmonar (n-ECV) y la neumonitis por hipersensibilidad crónica (NHc). En este contexto, el encontrar marcadores que ayuden al diagnóstico diferencial es muy importante. Dado que la FPI, es una enfermedad caracterizada por una reacción aberrante del epitelio, y las otras enfermedades por una respuesta predominantemente inmunoinflamatoria, consideramos que la búsqueda de biomarcadores relacionados con daño epitelial puede contribuir al diagnóstico específico de FPI. **Objetivo** Determinar los valores séricos de Sonic Hedgehog, proteína A del surfactante (SP-A), metaloproteasas de matriz MMP-1 y MMP-7, factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β) y CC16, una proteína secretada por las células bronquiolares "Club". **Métodos** Se realizó un estudio transversal en 3 grupos con diagnóstico incidente de: FPI (n=85), NHc (n=85), n-ECV [artritis reumatoide y Sjogren (n=85)] y en 30 sujetos sanos en los cuales se determinaron los biomarcadores mencionados por ELISA. Además de su utilidad en el diagnóstico diferencial, las concentraciones séricas de los biomarcadores se correlacionaron con los valores de pruebas de función respiratoria (FVC, DLCO, TLC, Sat reposo) al momento del diagnóstico. **Resultados** Los resultados mostraron que MMP-7 y CC16 permiten diferenciar a la FPI de las otras 2 enfermedades fibrosantes. La MMP7 estuvo incrementada significativamente en FPI (10.3 ± 4 pg/ml) versus no-FPI (8 ± 4.4 ; $p < 0.01$), CC16 también se encontró significativamente elevada en FPI comparada con las otras dos enfermedades, FPI (31.2 ± 10.8 ng/ml versus No FPI (23.1 ± 13 ng/ml y versus controles (10.7 ± 7.6 ng/ml, ANOVA, $p < 0.001$). Se identificó para CC16 un punto de corte de 16 ng/ml con una sensibilidad del 96% y especificidad 92% y para MMP7

sensibilidad de 87% y especificidad 92%. No se encontraron correlaciones entre las concentraciones séricas de estos biomarcadores y PFR al momento del diagnóstico. Se evaluaron las concentraciones de CC16 en lavado bronquio-alveolar de paciente con FPI y sujetos sanos encontrándose estadísticamente elevados en FPI ($10,317 \pm 8,075$ ng/ml versus 5622 ± 2767 ng/ml; $p < 0.03$). Se realizó por inmunohistoquímica la localización de CC16 encontrándose en las células del epitelio alveolar para corroborar este hallazgo se colocó con Proteína C del surfactante.

Conclusiones Los hallazgos de este estudio indican que CC16 y MMP-7 son útiles para el diagnóstico diferencial de FPI con respecto a dos padecimientos pulmonares fibrosantes con los que suele confundirse, CC16 se expresa en epitelio alveolar de pacientes con FPI y sus concentraciones están elevadas en suero y lavado bronquiolo-alveolar.

Introducción

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una enfermedad crónica, progresiva y letal, de causa desconocida, con una elevada mortalidad (50%) a 3 años posterior al diagnóstico. La FPI es provocada probablemente por la convergencia en un individuo de factores genéticos y ambientales, es también una enfermedad asociada al envejecimiento ya que en general se presenta en sujetos mayores de 50 años y alcanza su pico de frecuencia después de los 60 años de edad. Sin embargo, los mecanismos que asocian el envejecimiento a la FPI no se conocen con precisión¹.

De acuerdo a las guías clínicas determinadas por consenso de las sociedades neumológicas (American Thoracic Society/European Respiratory Society/Japanese Respiratory Society/ Asociación Latinoamericana del Tórax)², el diagnóstico de FPI requiere:

- a) Exclusión de otras causas conocidas de enfermedad intersticial pulmonar (por ejemplo exposiciones ambientales ocupacionales o domésticas).
- b) Presencia de patrón neumonía intersticial usual (NIU) en tomografía de alta resolución (TACAR) en pacientes a quienes no se realizó biopsia pulmonar (Valor predictivo positivo de 90-100%).
- c) Combinaciones específicas de patrones de tomografía y biopsia pulmonar en pacientes sometidos a esta última.

Dada la evidencia de la alta especificidad de la TCAR para el reconocimiento de patrones UIP en relación al histopatológico, la biopsia quirúrgica de pulmón no es esencial. En el contexto clínico apropiado (una historia médica completa, ocupacional / del medio ambiente y de la familia, el examen físico, pruebas fisiológicas, y evaluación de laboratorio), la presencia de un patrón de UIP en TCAR es suficiente para el diagnóstico de la FPI ².

Debido a que en la FPI la velocidad de progresión en cada paciente es diferente y a su alta letalidad, es importante determinar el diagnóstico preciso, de una manera rápida y lograr diferenciarla de otras patologías pulmonares potencialmente curables que desarrollan fibrosis, por ejemplo: enfermedades colágeno-vasculares

con afección pulmonar (n-ECV), neumonitis por hipersensibilidad (NHc), entre otras.

Se ha reportado que algunas variables clínicas [empeoramiento de la disnea], fisiológicas [declinación de la capacidad vital forzada (CVF)], radiológicas [puntuación de fibrosis en la tomografía computarizada de alta resolución (HRCT)] y biomarcadores, se correlacionan con la progresión de la enfermedad y la supervivencia.³ Sin embargo, dado que todas estas variables son similares en los diferentes tipos de fibrosis pulmonar no son útiles para el diagnóstico diferencial con FPI.

Los mecanismos patogénicos de la FPI no se conocen con precisión, pero en los últimos años se ha postulado por nuestro grupo que la secuencia de los eventos fisiopatológicos iniciaría con la activación aberrante de las células del epitelio alveolar las que producen los mediadores responsables de la migración, proliferación y activación de fibroblastos y finalmente del depósito exagerado de matriz extracelular con destrucción del parénquima⁵⁻⁸.

Para tener una mejor comprensión de los mecanismos moleculares implicados en los fenotipos pulmonares en la FPI, NHc y neumonitis no específica se identificaron y compararon sus firmas de expresión genética, con base en el análisis global de expresión de genes por microarreglos⁹, para entender mejor la naturaleza de los genes que distinguieran FPI de NH, se buscó en las anotaciones funcionales de ontología de genes usando *the National Institutes of Health DAVID and EASE online* (<http://apps1.niaid.nih.gov/david/>). Este análisis fue solo realizado en las transcripciones que pudieron encontrarse en *LocusLink* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/LocusLink/>), se encontró que los pulmones con FPI están significativamente enriquecidos con genes de componentes de matriz extracelular y genes músculo-específicos, genes que participan en la motilidad celular y contracción muscular, lo que sugiere una actividad incrementada en el remodelamiento y reorganización, de igual manera muchos de estos genes están implicados en la adhesión/migración de células epiteliales.

Los genes que codifican moléculas de la matriz extracelular que están más expresados en las muestras de FPI incluyen muchos tipos de colágena (tipo III,

IV, VII, XIV, XV, XVII, XVIII y XXVII), tenascina N, aspirina, desintegrina-like y metaloproteasas. Dos genes que participan en la vía Wnt, también estuvieron incrementados: el de la proteína 1 de la vía de señalización WNT1-inducible (WISP-1) y la proteína 2 frizzled-related. La N-cadherina un miembro de una gran familia de moléculas de adhesión celular dependiente de calcio que media la adhesión célula-célula y modula la migración celular e invasión tumoral también están incrementada, entre otros. Todos estos hallazgos en conjunto indican que la FPI envuelve cambios profundos entre las células epiteliales y el tejido conectivo que juntos modifican la reestructuración morfológica del pulmón. Actualmente se ha planteado una hipótesis de que la función de estos genes se encuentra activo en el desarrollo embrionario que generalmente se apagan en la vida adulta, indicando que estos genes podrían estar anormalmente activados durante el desarrollo de esta enfermedad al igual que se ha presentado en la transformación de tumores benignos a malignos.

En relación con estos avances en el conocimiento patogénico de la FPI, se están llevando a cabo por varios grupos diferentes estudios para determinar potenciales biomarcadores que permitan de una manera eficaz y poco invasiva apoyar el diagnóstico y pronóstico de pacientes con FPI, tales como IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL-18, MMP-3, MMP-9, TNF- α , VCAM1, Proteína D y A del factor surfactante, entre otros. Sin embargo, a nuestro conocimiento ninguno de estos grupos ha explorado su uso para diagnóstico diferencial con otras enfermedades fibrosantes del pulmón, por lo que es de interés de nuestro grupo estudiar algunos biomarcadores relacionados con la hipótesis de genes activos en el desarrollo embrionario, como se explica a continuación.

Fundamento para los biomarcadores seleccionados

a) La familia de proteínas Hedgehog en mamíferos comprende a *Shh* (**Sonic Hedgehog**), *Ihh* (*Indian hedgehog*) y *Dhh* (*Desert hedgehog*). *Shh* es la más ampliamente expresada y la más activamente investigada¹⁰⁻¹². *Shh* se expresa en el epitelio pulmonar en el desarrollo y su principal receptor *Patched1* (*Ptc*) se encuentra en células mesenquimales. Estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado que

Shh aumenta la proliferación de las células mesenquimatosas pulmonares, e induce la expresión de actina de músculo liso y miosina¹³. En ratones en desarrollo, la sobre-expresión de Shh provoca un incremento descontrolado de mesénquima intersticial en relación al epitelio tubular, esto es, una reacción tipo fibrótica¹⁴. En este contexto, se ha identificado la expresión de Shh en células epiteliales alveolares de pulmones con FPI, mientras que análisis por microarreglos indican una sobre-expresión de su receptor primario Ptc, sugiriendo que la ruta Shh esta activada en esta patología^{9,15,16}.

b) SP-A (Proteína A del surfactante) y SP-D (Proteína D del surfactante) son proteínas hidrófilas surfactantes segregadas por las células epiteliales alveolares tipo II. Estas proteínas pueden detectarse en suero y están elevadas en pacientes con ciertas enfermedades pulmonares inflamatorias inclusive en la FPI^{17,18}, en estos últimos pacientes se ha demostrado que la SP-D se correlaciona con anomalías radiográficas¹⁹, recientemente se ha demostrado que las concentraciones de SP-D circulante son predictivos de la supervivencia en pacientes con FPI²⁰. También se ha reportado que las concentraciones séricas de SP-A es posible que identifiquen a un subgrupo de pacientes con enfermedad más “activa”, que aumenta el riesgo de muerte en el año siguiente y que no es pronosticada por otros parámetros iniciales o factores de predicción no invasivos, como los resultados de las pruebas de función pulmonar²¹.

c) MMP-1 y MMP-7 (metaloproteinasas de matriz) y los inhibidores específicos de metaloproteinasas (TIMPs) han mostrado su participación en la destrucción del parénquima pulmonar y procesos de reparación resultantes de la remodelación de la matriz extracelular en enfermedades intersticiales pulmonares. El balance entre MMPs y sus inhibidores es crítico en la reparación tisular y remodelamiento y su homeostasis juega un papel importante en la ruptura y depósito de matriz extracelular en la pared de la vía aérea²². MMP-7 y MMP-1 son 2 MMPs que han sido implicadas en la patogénesis de FPI, se han reportado incrementada en plasma, suero, líquido de lavado bronquioalveolar y en tejido pulmonar de pacientes sugiriendo que el incremento de sus concentraciones en sangre periférico son indicativos de los cambios patológicos que caracterizan el

microambiente alveolar, combinadas, pueden algunas veces distinguir FPI de neumonitis. El incremento de MMP7 se ha reportado en pacientes con fibrosis pulmonar familiar subclínico y se han asociado los niveles mayores con la gravedad de la enfermedad²³.

d) TGF- β (factor de crecimiento transformante beta) es una citocina crítica que promueve la fibrosis pulmonar, es producido por una variedad de células, incluyendo plaquetas, neutrófilos, eosinófilos, fibroblastos y células endoteliales. En pacientes con FPI los niveles de TGF- β correlacionan con mortalidad, una isoforma predominantes en FPI es TGF- β 1²⁴.

e) **CC16** es una pequeña proteína de 16kDa que es el producto principal de la secreción de las células “Club” ubicadas en las vías respiratorias terminales²⁵, se ha postulado que cuando se produce un incremento en la permeabilidad de la membrana alveolo-capilar esta proteína es secretada entre otras como la proteína D del surfactante a la circulación. Se ha reportado niveles plasmáticos incrementados de CC16 en pacientes con daño pulmonar agudo/ síndrome de insuficiencia respiratoria aguda, más aún los niveles de CC16 plasmático se han asociado con pronóstico en este tipo de enfermedades²⁶.

En este contexto, consideramos que la búsqueda de estos biomarcadores pueden ayudar al diagnóstico específico de FPI y por lo tanto a diferenciarla de otras neumonitis crónicas. En este estudio determinamos los valores de Sonic Hedgehog, proteína A del factor surfactante, MMP-1, MMP-7, TGF- β y CC16 para identificar si podían ser biomarcadores séricos diferenciales.

Problemática del diagnóstico diferencial

En la práctica clínica, un problema al que es frecuente enfrentarse, es diferenciar de manera objetiva diferentes tipos de neumonitis crónica de la fibrosis pulmonar idiopática, debido a que, en las formas crónicas, los cambios tomográficos pierden su sensibilidad y especificidad, más aún se ha reportado por estudios morfológicos²⁷, cambios parecidos a neumonitis intersticial usual en pacientes con neumonitis por hipersensibilidad crónica y neumonitis no específica, la importancia

real de hacer el diagnóstico preciso, es que mientras que para la FPI no existe un tratamiento específico curativo, en los casos de neumonitis por hipersensibilidad crónica o los secundarios a enfermedad colágeno-vascular el tratamiento farmacológico adecuado conlleva a una mejoría clínica y de las pruebas funcionales respiratorias.

En el 2014 se autorizaron por parte de la FDA dos medicamentos “antifibróticos” con indicación precisa para Fibrosis Pulmonar idiopática: Pirfenidona²⁸ y Nintedanib²⁹ las cuales disminuyen la progresión de la enfermedad sin lograr la curación, estas dos moléculas no se han utilizado en ningún otro tipo de fibrosis en parte debido a los efectos adversos que presentan. Por otro lado, la triple terapia (azatioprina, prednisona y n-acetilcisteína), que habitualmente se utiliza para los otros tipos de enfermedades fibrosantes pulmonares, fue contraindicado para el tratamiento de FPI en octubre del 2011, durante el desarrollo del estudio PANTHER³⁰, ya que comparado con los pacientes que recibían placebo, los pacientes con FPI que recibieron la triple terapia tuvieron un incremento en la mortalidad (11% versus 1%), más hospitalizaciones (29% versus 8%) y una alta prevalencia de efectos adversos serios (31% versus 9%), por lo que actualmente el confirmar el diagnóstico de FPI tiene relevancia para decidir el mejor tratamiento entre las enfermedades fibrosantes del pulmón.

En conclusión, se han determinado los valores y presencia de algunas proteínas como biomarcadores para el diagnóstico de FPI, pero comparándolos solo con muestras control, sin embargo no se han investigado para determinar su utilidad en el diagnóstico diferencial con otras neumonitis crónicas que pueden presentar características tomográficas y morfológicas similares al patrón usual, y más aún debido a que actualmente contamos con terapia específica para FPI y dado que se ha demostrado que el tratamiento efectivo para los otros tipos de neumonitis crónicas puede ser incluso peligroso para los pacientes con FPI, su diagnóstico correcto adquiere mayor importancia.

Planteamiento del Problema

Al ser la Fibrosis Pulmonar Idiopática una enfermedad con mal pronóstico, con una alta letalidad en poco tiempo después del diagnóstico (3 a 5 años), es necesario contar con estudios poco invasivos que permitan corroborar el diagnóstico preciso de la enfermedad de manera oportuna.

No hay al momento un biomarcador que permita realizar el diagnóstico preciso de esta enfermedad, por lo que, al identificar biomarcadores específicos en pacientes con FPI podría ayudar al diagnóstico diferencial con otros tipos de neumonitis crónicas. Por otro lado, la presencia de biomarcadores en los pacientes con FPI podrían permitir agruparlos y conocer si hay diferencia en la gravedad de la enfermedad al momento del diagnóstico y por lo tanto ayudar al pronóstico de estos pacientes.

Pregunta de Investigación

¿Cómo se encuentran las concentraciones de los biomarcadores Sonic Hedgehog, proteína A del factor surfactante, MMP-1, MMP-7, TGF- β y CC16 en los pacientes con FPI?

¿Hay diferencia en las concentraciones de biomarcadores Sonic Hedgehog, proteína A del factor surfactante, MMP-1, MMP-7, TGF- β y CC26 en pacientes con FPI y otras neumonitis crónicas, que permitan realizar diagnóstico diferencial entre ellas?

¿La concentración de los biomarcadores tendrán correlación con la gravedad de la enfermedad al momento del diagnóstico?

Justificación

Debido a que la Fibrosis Pulmonar Idiopática es una enfermedad crónica, con una alta letalidad de al menos 50% a los 3 años del diagnóstico y sin un tratamiento efectivo, es importante realizar un diagnóstico certero y oportuno que permita descartar otro tipo de fibrosis que pueden tener un mejor pronóstico. Aunque se ha reportado elevación de diversos biomarcadores en pacientes con FPI, ninguno de ellos se ha podido corroborar en diferentes poblaciones, ni se ha comprobado su

eficacia para diagnóstico diferencial, por lo que contar con biomarcadores específicos que apoyen el diagnóstico de FPI permitirá a partir de ellos, realizar diagnóstico diferencial con otras neumonitis crónicas, impactando en la elección del tratamiento adecuado.

Objetivos

Determinar si las concentraciones circulantes de las proteínas Sonic Hedgehog, proteína A del factor surfactante, MMP-1, MMP-7, TGF- β y CC16, pueden funcionar como biomarcadores diferenciales en el diagnóstico de las enfermedades intersticiales crónicas.

Determinar si estos biomarcadores pueden correlacionar con la gravedad de la enfermedad.

Objetivos Específicos

- 1) Determinar las concentraciones circulantes de las proteínas Sonic Hedgehog, proteína A del factor surfactante, MMP-1, MMP-7, TGF- β y CC16 en pacientes con diagnóstico de FPI, neumonitis por hipersensibilidad crónica y neumonitis secundaria a enfermedades colágeno-vasculares.
- 2) Correlacionar las concentraciones de los biomarcadores con las pruebas de función respiratoria en los diferentes grupos al momento del diagnóstico.

Hipótesis

Las concentraciones séricas de las proteínas Sonic Hedgehog, proteína A del factor surfactante, MMP-1, MMP-7, TGF- β y CC16 estarán elevadas en los pacientes con diagnóstico de FPI comparado con otras neumopatías intersticiales crónicas y sanos.

La concentración de las cifras de los biomarcadores tendrán una relación inversa con los valores de las pruebas funcionales respiratorias en todos los grupos.

Diseño del Estudio

Estudio transversal, comparativo, observacional

Criterios de Inclusión para pacientes

- 1) Pacientes del INER con diagnóstico documentado de FPI, Neumonitis por hipersensibilidad crónica o neumopatía secundaria a enfermedad colágeno-vascular según las guías de ATS/ERS/JRS/ALAT².
- 2) Hombres o mujeres de 30 años de edad o mayores.
- 3) Cuenten con Pruebas de función respiratoria al momento del diagnóstico.

Criterios de Exclusión para pacientes

- 1) Cualquier signo de enfermedad aguda (exacerbación aguda) en los 30 días anteriores a la visita 1
- 2) Diagnóstico conocido de otros trastornos respiratorios importantes (tuberculosis, sarcoidosis, aspergilosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica)
- 3) Incapaz de efectuar las pruebas de función respiratoria.

Criterios de Inclusión para sujetos sanos

- 1) Hombres o mujeres de mayores de 30 años
- 2) Que hayan firmado el consentimiento informado
- 3) Que no se conozcan portadores de enfermedad pulmonar

Criterios de Exclusión para sujetos sanos

- 1) Cualquier signo de enfermedad aguda respiratoria en los 30 días anteriores a la visita 1
- 2) Diagnóstico conocido de otros trastornos respiratorios importantes (tuberculosis, sarcoidosis, aspergilosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica)
- 3) Patrón obstructivo o sugerente de restricción pulmonar posterior a la espirometría

Criterios de Valoración principal

Concentraciones circulantes séricas de Sonic Hedgehog, proteína A del factor surfactante, MMP-1, MMP-7 ,TGF- β y CC16.

Tamaño de muestra

Se tomó como base los datos informados por Prasse y cols.³¹, donde las concentraciones séricas iniciales de CCL-18 predijeron el cambio en la FVC en el seguimiento a los 6 meses y en los que las características operativas del receptor (ROC) revelaron una relación significativa entre supervivencia y las concentraciones iniciales de CCL-18.

El primer paso es demostrar que la incidencia de enfermedad progresiva es mayor en el grupo de sujetos con valores iniciales de CCL-18 >150ng/ml que en el grupo de sujetos con CCL-18 <150ng/ml. En el estudio de Prasse y cols.³¹ se incluyeron 72 sujetos, 58% con valores iniciales de CCL-18 <150ng/ml y 42% con valores >150ng/ml. La tasa de sujetos que mostraron progresión de la enfermedad a los 12 meses fue de alrededor del 85% en el grupo CCL-18 >150 y 17% en el grupo CCL-18 <150. Estos porcentajes a los 6 meses estuvieron entre 40% y 70% y entre 2% y 10% respectivamente. La tabla 1 muestra el número de sujetos que se necesita para poder discriminar las tasas de progresión a los 6 meses para cada grupo de valores iniciales de CCL-18, considerando una prevalencia del 40% en el grupo CCL-18 >150ng/ml.

Tabla 1 Pruebas de dos colas. Alfa=5% - Poder estadístico 90% (nQuery 6.01)

Tasa de progresión CCL-18 >150	Tasa de progresión CCL-18 <150	N1 CCL-18 > 150	N2 CCL-18>150	N Total
30%	5%	45	67	112
	10%	76	113	189
	15%	144	216	360
40%	5%	28	41	69
	10%	40	60	100
	15%	60	90	150

En este estudio, suponiendo que se incluye un grupo con proporciones similarmente desequilibradas (1.5), se necesitarían **150** sujetos para demostrar que los porcentajes de pacientes con progresión en el momento de la evaluación son 15% y 40% respectivamente, con un poder estadístico del 90% y una tasa de error tipo 1 de dos colas del 5%.

El segundo paso, es considerar todos los datos hasta un año y estudiar la precisión de la predicción. El objetivo principal del biomarcador predictivo es identificar un subgrupo de sujetos en los que esté aumentada la tasa de progresión de la enfermedad. Usando la eficacia predictiva de CCL-18 se clasifica a los sujetos en aquellos que probablemente tengan una progresión rápida (subgrupo CCL-18 +) y los que no lo tengan (subgrupo CCL-18 -), entonces la proporción de sujetos con CCL-18 >150 ng/ml inicial y un evento de progresión al año es la definición del valor predictivo positivo (VPP). La cantidad de sujetos requerida en el subgrupo CCL-18 (+) puede calcularse como la cantidad de sujetos requerida para alcanzar un poder estadístico predeterminado con una prueba exacta de no inferioridad. En la tabla 2 se muestra el poder estadístico de una prueba binomial exacta de no inferioridad que compare el VPP de 0.75 con un nivel alfa de 0.05, condicionada a la cantidad observada de sujetos CCL-18 (+).

Tabla 2 Poder estadístico de la prueba de no inferioridad del valor predictivo positivo de acuerdo con la cantidad de sujetos CCL-18 (+) observada

Valor verdadero del VPP	Poder condicional	Cantidad de sujetos CCL-18 (+)	Suponiendo prevalencia 30%	Suponiendo prevalencia 40%	Suponiendo prevalencia 50%
0.85	0.82	120	400	300	240
0.90	0.83	54	180	135	108
	0.87	59	197	147	118
	0.92	69	230	172	138

Así, 59 sujetos CCL-18(+) proporcionarían un poder estadístico de 0.87 si el valor verdadero de VPP fuera 0.90. Suponiendo un valor verdadero del VPP de 0.90 y suponiendo una prevalencia de 40% 147 sujetos con FPI proporcionarían un poder estadístico del 87% para demostrar que el VPP es mayor de 0.75.

Además se estudiaron 30 sujetos control

Material y Métodos

Se identificaron a 85 pacientes con diagnóstico de FPI, 85 con diagnóstico de NHc y 85 con diagnóstico de neumonitis secundaria a enfermedades colageno-vasculares [n-ECV] (Síndrome de Sjögren y Artritis reumatoide), de acuerdo a los criterios de la ATS/ERS ², de la clínica de enfermedades intersticiales del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, se identificaron a 30 sujetos controles sin enfermedad pulmonar conocida. Se invitaron a participar a los pacientes y controles en el estudio, y a firmar el consentimiento informado.

Muestras de suero

Se obtuvo 20ml de sangre periférica entera a través de punción directa por técnica de Seldinger en vena del antebrazo por personal capacitado para el procedimiento (enfermera o médico), para efectuar el análisis de biomarcadores proteicos, todas las muestras de sangre se obtuvieron en ayunas y después de por lo menos 10 minutos de descanso sentado, para controlar los efectos posturales sobre las mediciones sanguíneas. Se obtuvieron del expediente clínico de todos los pacientes información demográfica (edad, sexo, evolución en meses, fecha de diagnóstico, estatura y peso, hábito de tabaquismo actual o exfumador), historia clínica (co morbilidades, tratamiento empleado y duración de los mismos, antecedentes familiares de enfermedad pulmonar), exploración física (medición de saturación de oxígeno por oxímetro de pulso en reposo, sin oxígeno suplementario), los resultados de las pruebas de función respiratoria (espirometría, pletismografía, difusión de monóxido de carbono, caminata de 6 min, oximetría post ejercicio) con diferencia hasta de 1 mes de acuerdo a la fecha de toma de la muestra sanguínea. A los sujetos control se les interrogó directamente la información igual que a los pacientes .

Se asignó a la muestra un número de sangre ID (código de desidentificación) consecutivo en relación al número de sujeto para mantener protección de la identidad.

Las determinaciones de las proteínas se hicieron de acuerdo a las instrucciones del fabricante de los estuches de **ELISA** (placa para medir el Sonic Hedgehog, Raybiotech, Norcross, Georgia. USA; placa para medir Human Total MMP7 R&D systems Minneapolis , MN USA; placa Human Surfactant Protein A Biovondor Czech Republic, placa Human MMP1 Abcam, USA; placa Human TGF-b1 Promega Wisconsin USA.R&D, Mineapolis, MN; placa Human Club Cell Protein (CC16) Biovondor Czech Republic).

VARIABLES ESTUDIADAS

Variable	Definición	Tipo de variable	Escala de Medición
Niveles séricos de proteínas	Medición por técnica de ELISA de las diferentes proteínas	Cuantitativa Continua	Picogramos/ml Nanogramos/ml
Edad	Años cumplidos de vida al día de la entrevista	Cuantitativa discreta	Años
Género	Condición orgánica que distingue al hombre de la mujer	Nominal	Masculino Femenino
Evolución en meses	Tiempo que determina el paciente del inicio de los síntomas a la fecha	Cuantitativa discreta	Meses
Talla	Talla corporal del paciente al momento de inclusión al estudio	Cuantitativa continua	Metros Centímetros
Peso	Peso corporal del paciente al momento de inclusión al estudio	Cuantitativa continua	Kilogramos gramos
Tabaquismo	Exposición al tabaco reportado por el paciente	Nominal	Fumador activo, pasivo o exfumador
Capacidad Vital Forzada	Medición por espirometría del valor del ingreso de aire en maniobra de inspiración forzada	Cuantitativa continua	Litros
Saturación de Oxígeno	Medición por pulsoximetría en reposo sin oxígeno suplementario	Cuantitativa discreta	Porcentaje
Difusión de monóxido de Carbono	Medición del intercambio gaseoso a través de la difusión de monóxido ajustada por Hemoglobina	Cuantitativa discreta	Porcentaje
Caminata de 6 minutos	Metros caminados durante 6min con uso o no de oxígeno suplementario	Cuantitativa discreta	Metros

Lavado Bronquiolo-alveolar

Como parte del procedimiento diagnóstico en pacientes con enfermedades intersticiales, se realiza lavado bronquiolo-alveolar (LBA), el cual es realizado de manera breve ³², a través de un fibro-broncoscopio flexible con anestesia local, se introduce un total de 300ml de sol. Salina instiladas en alícuotas de 50ml en cada ocasión con una recuperación en promedio del 60-70% del líquido instilado. El líquido obtenido del LBA es centrifugado a 250 g para 10 min at 4 °C y el sobrenadante fue almacenado a -70 °C hasta que se usó para medir las concentraciones de CC16.

Inmunohistoquímica

La localización celular de CC16 fue realizada en biopsias pulmonares de pacientes con FPI y tejido pulmonar de controles del bio-banco de la clínica de enfermedades intersticiales del INER ³³, brevemente, se incubaron secciones de bloques de tejido de muestras de pulmón fijadas con formalina a 4°C durante la noche con el anticuerpo específico para la detección de CC16 (anticuerpo anti-Clara Cell Protein Secretary, Millipore cat 07-623 Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Se utilizó un anti-IgG biotinilado secundario seguido de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (BioGenex, San Ramon, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. 3-amino-9-etil-carbazol en tampón de acetato con 0,05% de H₂O₂ como sustrato. Los experimentos incluyeron controles en los que se omitió el anticuerpo primario o secundario.

Inmuno-colocalización de CC16 y proteína C del surfactante

La tinción con inmunofluorescencia se realizó en secciones de tejido de 3 µm de grosor adheridas a diapositivas. Después de la recuperación de antígeno inducida por calor, las muestras se permeabilizaron y se bloquearon en un solo paso incubándolas durante 30 minutos en PBS con suero de cerdo normal al 2% y Triton X-100 al 0,5% (Research Organic, Cleveland, OH, EE.UU.) a temperatura ambiente RT). Después se lavaron las muestras y se incubaron a 4°C durante la noche con los anticuerpos primarios: anti-CC16 (anti-Clara Cell Protein Secretary

Antibody, Millipore cat 07-623 Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y anti-prosulfactante Proteína C (ab40879, Abcam, Cambridge, REINO UNIDO). Después de la incubación, las muestras se lavaron y se incubaron con anticuerpos secundarios fluorescentes (Alexa Fluor 546 conjugado con Anti-Ratón IgG conjugado con Alexa Fluor 647 y Anti-Rabbit IgG conjugado con Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) durante 1 hora a RT. Las muestras se montaron con medios de montaje ProLong Gold (Life Technologies). Todos los experimentos incluyeron controles con / sin anticuerpo primario o con / sin anticuerpo secundario. La captura de imagen se realizó con un microscopio confocal de escaneo láser FV-1000 (Olympus Corporation, Tokio, Japón) en modo de escaneo secuencial para representar cada fluorocromo individualmente.

Análisis estadístico

Los datos se capturaron en una base de datos utilizando el programa de Excel (version). y se analizaron en el paquete estadístico Stata (versión 11,). Se realizó un análisis exploratorio de los datos para identificar datos inconsistentes y errores de captura. Posteriormente se hizo el análisis univariado de cada variable para calcular las medidas de tendencia central y de dispersión de las variables continuas y las proporciones en las variables categóricas.

En el análisis bivariado se calcularon las diferencias de medias y de proporciones de acuerdo a cada grupo y se aplicaron los estadísticos de pruebas de T-test, Fisher y Chi2 y Anova para la comparación de grupos.

Se definió un valor de $p < 0.05$ como diferencia estadísticamente significativa. La correlación se determinó con la prueba de Spearman. Las diferencias entre los grupos con biomarcador positivo (elevado) y negativo (no elevado) se realizó utilizando la prueba U Mann-Whitney para variables continuas y prueba exacta de Fisher para variables categoricas

Se generaron curvas ROC para determinar el umbral de sensibilidad (eje Y) y especificidad (eje X) de cada biomarcador de diagnóstico y se determinó el área bajo la curva (AUC) (prueba perfecta con ABC de 1.0, prueba no uniforme igual o menor 0.5) para comparar y determinar el poder de discriminación entre los diferentes biomarcadores para diagnosticar FPI, permitiendo así la selección del

biomarcador con mayor sensibilidad y especificidad, ó el panel de biomarcadores con mayor sensibilidad y especificidad con el método propuesto por Hanley & McNeil; se utilizó el índice de Youden para obtener el óptimo punto de corte para cada biomarcador que permita discriminar entre enfermos con FPI y no enfermos.

Consideraciones éticas

El estudio fue aprobado por el comité de bioética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias con fecha 19 de enero del 2013 así como el consentimiento informado, con código C05-13.

Se mantuvo en anonimato los nombres de los pacientes durante todo el estudio.

Resultados

Se determinaron las concentraciones séricas de TGF- β , Proteína A del surfactante, MMP-1 y Sonic sin identificar diferencia entre los grupos de enfermedades intersticiales crónicas, la concentración de MMP-7 y CC16 mostró diferencia por separado para diferenciar FPI de los otros grupos, se calcularon las curvas ROC, sensibilidad y especificidad de cada prueba así como la determinación de punto de corte a partir de ellas, se realizaron correlaciones con el resto de variables y se evaluó mediante regresión que la suma de estos dos últimos biomarcadores incrementara el rendimiento diagnóstico.

Datos demográficos

Se estudiaron 85 pacientes con FPI, y 170 no-FPI (85 NHc y n-ECV), y 30 controles. Las características demográficas y función pulmonar son mostradas en la Tabla 3.

Tabla 3 **Datos demográficos y funcionales de los diferentes grupos**

	FPI n=85	NHc n=85	n-ECV n=85	Control n=30	p
Edad (años)	66 ± 7	51 ± 12	57 ± 10	65 ± 10	0.4
Género (Fem:Masc)	14 : 71	81 : 4	64 : 21	21 : 9	NA
Tiempo síntomas (meses)	20 ± 17	21 ± 20	26 ± 24	NA	0.8
Tabaquismo (%) Exfumador/nunca/ Desconocido	46/30/9	18/63/4	33/45/7	0/0/30	<0.05
FVC (Lts)	2.4 ± 0.7	1.7 ± 0.9	1.7 ± 0.7	3 ± 0.9	<0.001
FVC (%)	72 ± 21	60 ± 20	59 ± 24	90 ± 14	<0.001
TLC (%)	65 ± 3	61 ± 17	61 ± 19	NA	0.09
DLCO (%)	48 ± 25	42 ± 26	42 ± 26	NA	0.14
PaO2	52 ± 11	51 ± 10	54 ± 10	NA	0.2
SO2 reposo (%)	86 ± 7	85 ± 9	86 ± 7	95 ± 3	0.6

Los pacientes con NHc y n-ECV fueron más jóvenes que los pacientes con FPI y controles, pero sin mostrar diferencia significativa, por otro lado se corroboró un predominio femenino en NHc , n-ECV y controles, mientras que en FPI la mayoría fueron del género masculino, como se describe en la literatura. De manera relevante el antecedente de tabaquismo fue mayor en el grupo de FPI comparado con los no-FPI y controles. Todos los pacientes tuvieron un tiempo de evolución similar y los tres grupos mostraron un patrón restrictivo en las pruebas de función respiratoria caracterizado por una disminución en la capacidad vital forzada, así como hipoxemia en reposo y disminución en la difusión de monóxido de carbono sin mostrar diferencia en los 3 grupos, por lo que la gravedad de la enfermedad es comparable entre ellos.

Concentraciones de suero de TGF- β , Proteína A del surfactante, MMP-1 y Sonic

Se evaluaron las concentraciones séricas entre los 3 grupos FPI, no-FPI (NHc, n-ECV) y controles obteniendo los siguientes resultados (Figura 1-4):

SP-A: pacientes con FPI 54 ± 20 pg/ml, NHc 74 ± 30 pg/ml, n-ECV 70 ± 50 pg/ml, controles 35 ± 6 pg/ml.

TGF- β 1: FPI 378 ± 211 pg/ml, NHc 437 ± 210 pg/ml, n-ECV 447 ± 201 pg/ml, controles 301 ± 138 pg/ml.

MMP-1: FPI 1519 ± 1420 pg/ml, NHc 1398 ± 1216 pg/ml, n-ECV 1838 ± 1832 pg/ml, controles 435 ± 294 .

Sonic Hedgehog: FPI 497 ± 386 , NHc 857 ± 528 , n-ECV 944 ± 605 , controles 870 ± 423 .

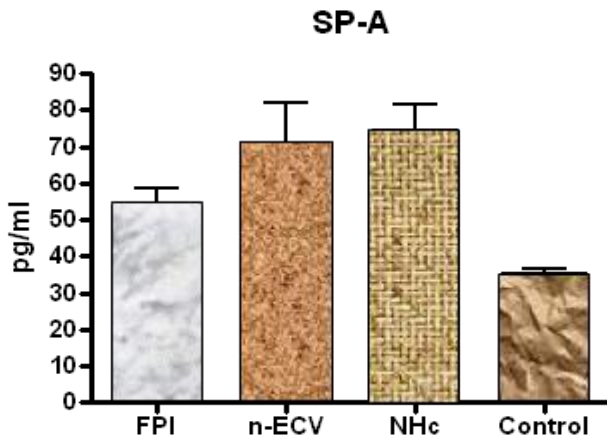


Figura 1

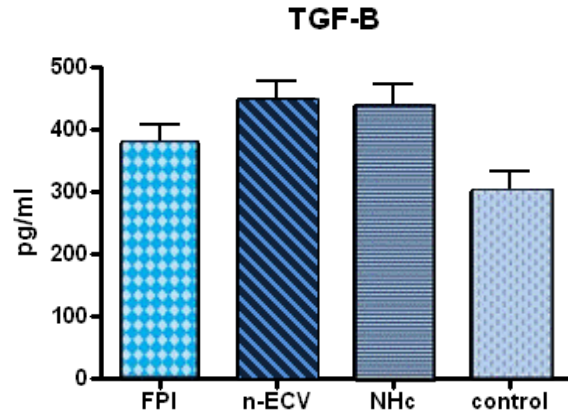


Figura 2

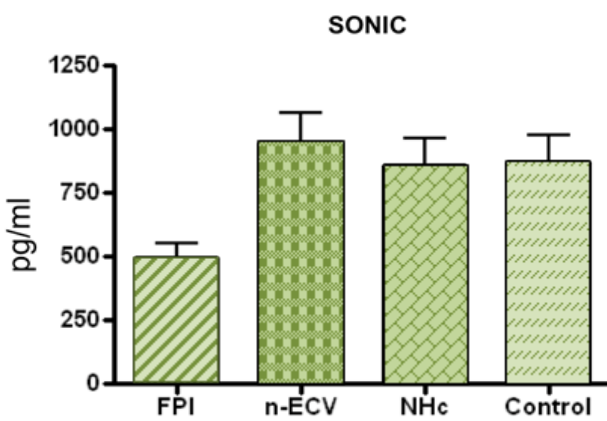


Figura 3

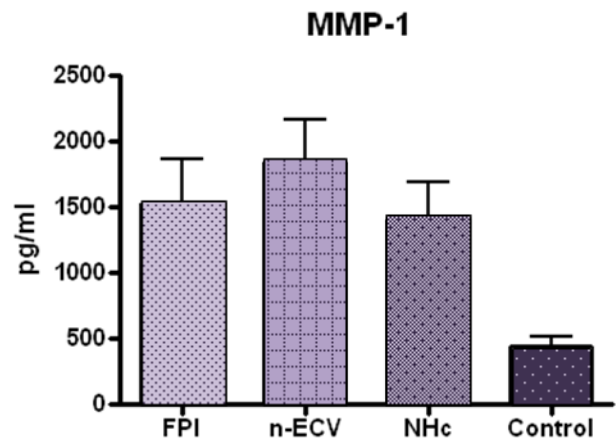


Figura 4

No encontramos diferencia significativa al comparar todos los grupos.

Se realizaron correlaciones entre las concentraciones de estas proteínas con las variables de función respiratoria sin encontrar alguna significativa (gráficas no mostradas).

El MMP-7 sérico está incrementado en pacientes con FPI

Las concentraciones séricas de MMP-7 en esta cohorte se encontraron elevadas de manera significativa en pacientes con FPI, como se ha reportado en otros estudios en que se comparan con controles, en nuestro caso: los pacientes con FPI 10.3 ± 4 pg/ml versus 8.06 ± 4.41 pg/ml en el grupo No FPI ($p=0.00008$) y controles 4.04 ± 0.47 (**Figura 5**).

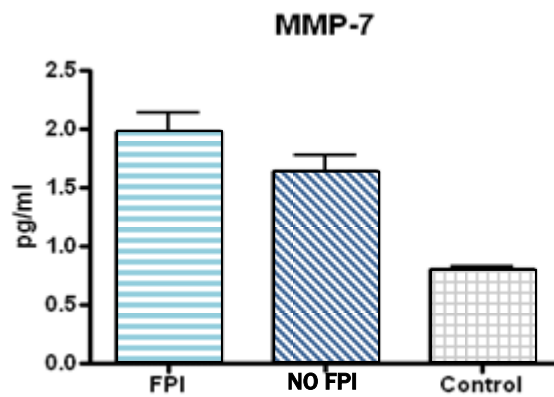


Figura 5

El CC16 está incrementado en suero pacientes con FPI

En relación a las concentraciones séricas de CC16, se encontraron significativamente elevadas en pacientes con FPI comparados con pacientes no-FPI y controles (**Figura 6**). Las concentraciones séricas de CC16 obtenidas en FPI fueron 31.2 ± 10.8 ng/ml versus 23.1 ± 13 ng/ml en no-FPI y 10.7 ± 7.6 ng/ml en voluntarios sanos (ANOVA, $p < 0.0001$). Los niveles séricos de CC16 en pacientes no-FPI también se encontraron significativamente incrementados al compararlos con los controles. ($p < 0.009$).

Para determinar el uso diagnóstico potencial de CC16 como biomarcador, utilizamos análisis ROC (**Figura 6**). De acuerdo a la curva ROC, el mejor valor de punto de corte de CC16 fue 41 ng/mL, el cual muestra sensibilidad del 24% y especificidad del 90% (66.4% de precisión general), con valor predictivo positivo (VPP) de 56% y valor predictivo negativo (VPN) de 69%. El área bajo la curva para FPI versus no-FPI fue 0.68 (95% CI 0.613-0.745) para CC16.

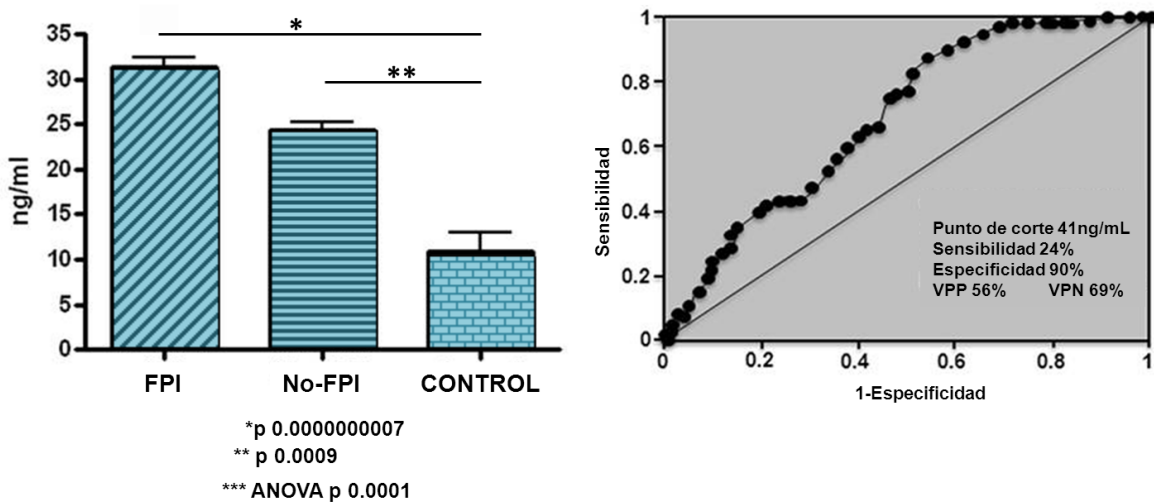


Figura 6

incremento de CC16 fue independiente de estas variables.

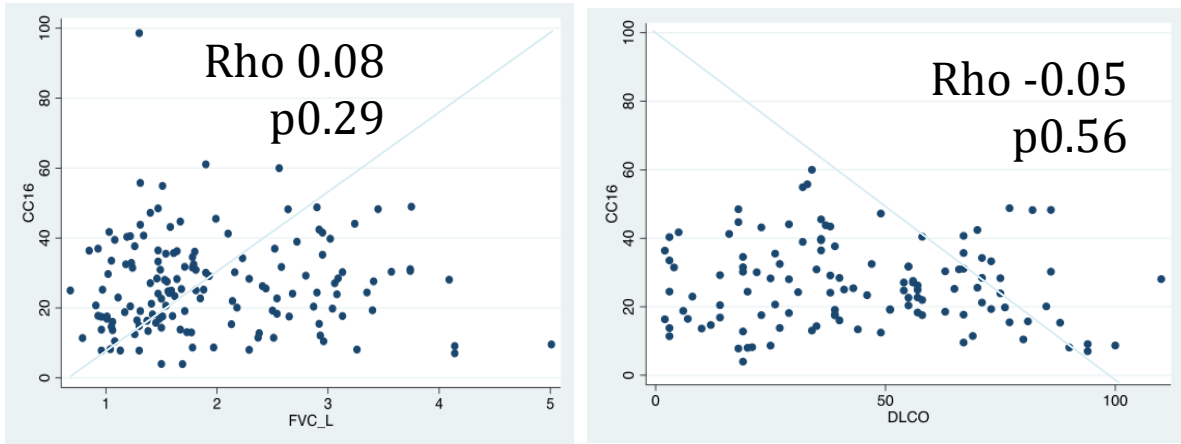


Figura 7.

El CC16 está incrementado en lavado bronquioloalveolar de pacientes con FPI y está expresado en células bronquiolares y epiteliales alveolares

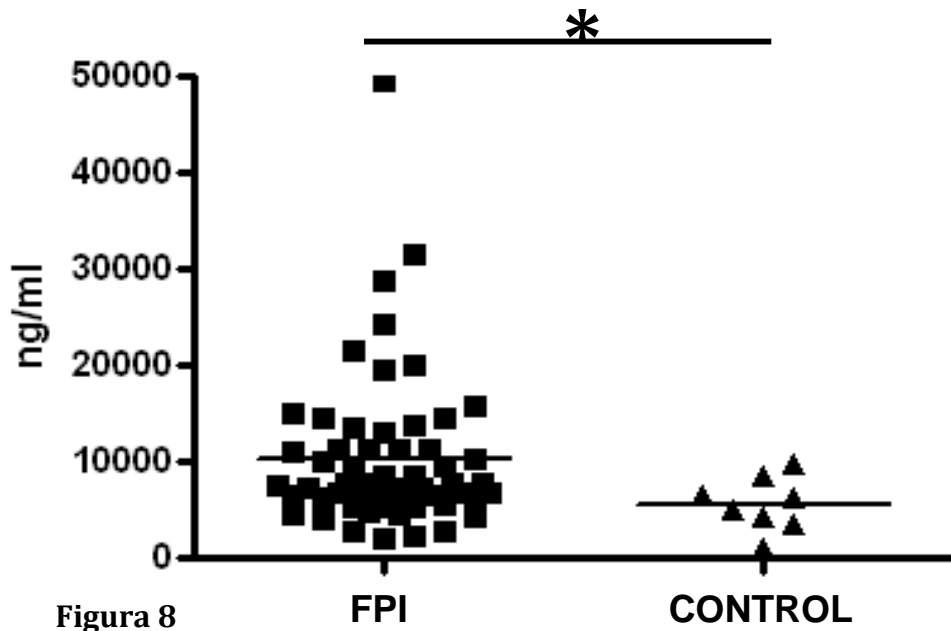


Figura 8

Como se muestra en la **Figura 8**, las concentraciones de CC16 en lavado bronquioalveolar estuvieron significativamente elevadas en pacientes con FPI comparado con sujetos sanos ($10,317 \pm 8,075$ ng/ml versus 5622 ± 2767 ng/ml); $p < 0.03$.

La localización celular de CC16 en los pulmones de pacientes con FPI había sido previamente evaluada en la porción terminal de los bronquiolos, en menores cantidades en la tráquea y a lo largo del árbol bronquial³⁴. En nuestro caso, estudiamos muestras de tejido pulmonar de pacientes con FPI y pulmones normales con inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. Como podemos observar en la **Figura 9** ambos, control (**Figura 9A y B**) y pulmones con FPI (**Figura 9D-F**) muestran señales positivas en células epiteliales de las vías aéreas. No se observa señal específica cuando el anticuerpo primario fue sustituido por suero no inmune (**Figura 9C**). Se obtuvieron resultados similares por inmunofluorescencia (**Figura 10G y H**). En los pulmones de IPF, la proteína inmunorreactiva CC16 también se expresó en células epiteliales alveolares (Figuras 8A y B), lo que fue corroborado por colocalización con SP-C un marcador altamente específico de neumocitos de tipo 2 (**Figure 10C-E**).

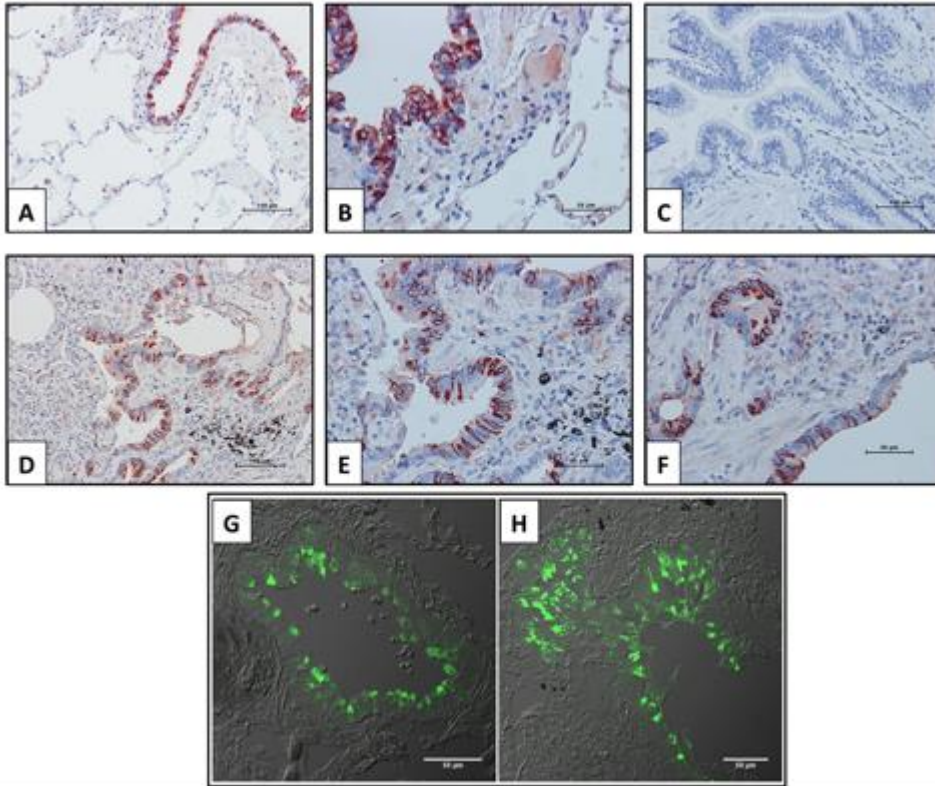


Figura 9

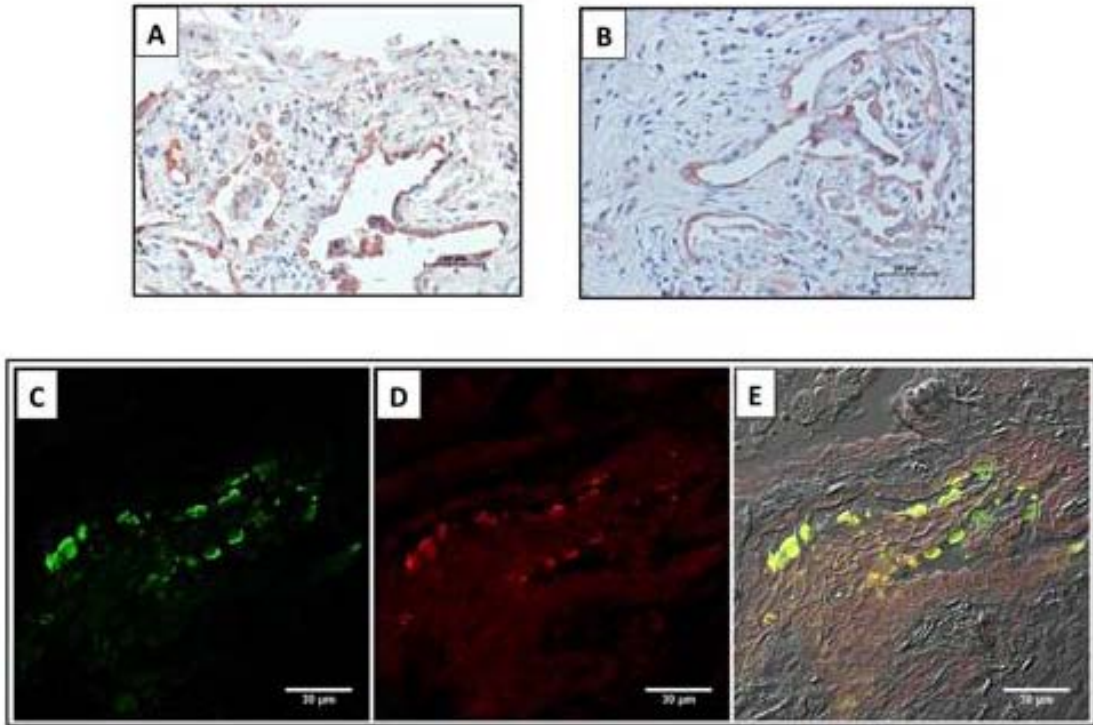


Figura 10

Discusión

La Fibrosis Pulmonar Idiopática es una enfermedad devastadora y altamente letal, de patogénesis incierta. En los últimos 15 años, el paradigma patogénico del FPI ha pasado de uno de inflamación crónica no resuelta a uno de disfunción de células epiteliales alveolares que resulta en la sobreexpresión de casi todos los mediadores responsables de la migración, proliferación y activación de fibroblastos y remodelación tisular ^{35, 36, 5}.

En este estudio, se reveló por primera vez que CC16 también se expresa por células epiteliales en los pulmones de pacientes con FPI y que su concentración es notablemente mayor en el suero y en líquido de lavado broncoalveolar obtenidos de estos pacientes. Además, la concentración sérica de CC16 aumentó significativamente en los pacientes con FPI en comparación con los niveles observados en los trastornos no relacionados con FPI, NHc y n-ECV, dos enfermedades en las que los procesos inmunopatológicos e inflamatorios desempeñan un papel crítico.

CC16 (también conocido como SCGB1A1) es un miembro de la familia de la secretoglobina, proteínas pequeñas producidas principalmente por las células club localizadas en bronquiolos incluyendo los terminales. Se ha sugerido que CC16 tiene propiedades anti-inflamatorias y antioxidantes en los pulmones, y que podría tener un papel protector contra las enfermedades de las vías respiratorias como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y el asma ^{37, 38}. En realidad, la disminución de los niveles de CC16 en el suero se asocia con la reducción de la función pulmonar en la infancia, la disminución de la función pulmonar acelerada en la edad adulta, y el desarrollo de limitación moderada del flujo aéreo en la población adulta en general³⁷. Además, la falta de CC16 exacerba sustancialmente la inflamación de las vías respiratorias inducida por el humo del cigarrillo y la pérdida alveolar. Del mismo modo, menores concentraciones séricas de CC16 se asocian con un mayor riesgo de mortalidad, principalmente por cáncer de pulmón³⁹. En marcado contraste, encontramos que en el lavado bronquioalveolar y en suero, las concentraciones de CC16 aumentan en FPI a pesar de que la mayoría de los pacientes estudiados eran fumadores (en

comparación con los controles no fumadores y el grupo no IPF), un hábito asociado con disminución de los niveles séricos de CC16⁴⁰. La concentración sérica de CC16 también aumentó en otras enfermedades intersticiales como la neumonitis por hipersensibilidad crónica y las asociadas a algunas enfermedades del tejido conectivo, aunque fue significativamente mayor en la FPI. Curiosamente, los niveles más altos de CC16 se han informado también en pacientes con esclerosis sistémica principalmente en aquellos con fibrosis pulmonar activa o extensa ^{41, 42}. Del mismo modo, el aumento de los niveles séricos de CC16 también se informó recientemente en una pequeña cohorte de pacientes con FPI solo y en el síndrome combinado FPI con enfisema ⁴³.

Sin embargo, una de las fortalezas de nuestro estudio es que se realizó con una cohorte más grande de pacientes con FPI (n=85) y de manera importante por primera vez se demostró que esta proteína está elevada en lavado bronquioalveolar, lo que sugiere una mayor producción local. Por otra parte, también se reveló que en la FPI, además de células Club, las células epiteliales alveolares activadas, contribuyen a su producción. Este es un hallazgo importante porque evidencia que el epitelio alveolar disfuncional desempeña un papel crítico en los procesos aberrantes de lesión / remodelación que se producen en FPI esporádica y familiar ³⁵.

El papel putativo del aumento de la producción de CC16 en estos trastornos es actualmente desconocido, y puede ser diferente al relacionado con la inflamación (NHc y n-ECV) y al relacionado con la fibrosis epitelial (FPI). Por lo tanto, el aumento de CC16 en diversos trastornos pulmonares intersticiales puede indicar su participación en diferentes procesos, incluyendo un mecanismo insuficiente y abrumador defensivo o puede contribuir a algunos mecanismos patógenos. Curiosamente, se ha demostrado que el contacto directo de las células del club induce la apoptosis de las células epiteliales de las vías respiratorias distales y alvéolos a través de un factor de necrosis tumoral relacionado con la apoptosis inducida por el ligando (TRAIL) con un mecanismo dependiente, por lo tanto, afectan la reparación de heridas ⁴⁴. Sin embargo, el rol de CC16 en este proceso, si lo hubo, no fue explorado. Además, las células club que expresan TRAIL se han

localizado en los pulmones de pacientes con FPI, cerca de los focos fibroblásticos y la acumulación de colágeno y cerca de las células epiteliales alveolares apoptóticas.

Sin embargo, la causa y efecto del aumento de CC16, así como la notable diferencia observada entre las enfermedades pulmonares intersticiales, principalmente FPI, y los trastornos que afectan a las vías respiratorias, como la EPOC, necesita más estudios de investigación.

Otro objetivo de nuestro estudio fue evaluar si los niveles séricos de CC16 podían ayudar a distinguir la FPI de las otras enfermedades intersticiales como NHc y n-ECV. El diagnóstico diferencial de FPI con otros trastornos pulmonares fibrosantes crónicos que presentan un patrón usual puede ser extremadamente difícil ^{2, 45-47}. En general, los clínicos se enfrentan a dos desafíos para el diagnóstico confiable de FPI: a) el paciente tiene FPI, pero los hallazgos tomográficos y/o morfológicos son atípicos, o b) el paciente tiene otro trastorno pulmonar fibrótico crónico con patrón tipo usual. Esta incertidumbre diagnóstica representa un importante problema terapéutico ya que el abordaje del tratamiento es completamente diferente.

El análisis de perfil molecular de suero/plasma ha revelado varios posibles biomarcadores, y la evidencia sugiere que algunos de ellos, por ejemplo, MMP-7 puede ayudar a predecir la evolución de la FPI. Recientemente, un índice de biomarcadores de SP-D, MMP-7 y osteopontina se reportó para mejorar la precisión diagnóstica en pacientes con FPI en comparación con aquellos con enfermedad intersticial diferente a FPI específicamente secundaria a artritis reumatoide y otras enfermedades intersticiales idiopáticas ⁴⁸, en este estudio la asociación para FPI cuando al menos uno de los biomarcadores de este índice excede el umbral de 4.4, es de OR 4.4 (IC 95% 2.0-9.7, p=0.0003), cuando se elevaban 2 de ellos utilizando mismo umbral, entonces el OR incrementa a 5 (IC 95% 2.2-11.5, p= 0.0002). Por lo que una posibilidad para mejorar la precisión diagnóstica podría ser construir índices a partir de los diferentes biomarcadores séricos de acuerdo a la etiopatogenia conocida de la FPI y sin duda los grupos

para realizar el diagnóstico diferencial deben ser enfermedades intersticiales crónicas que son el reto en la parte clínica.

En general, los biomarcadores moleculares encontrados hasta ahora parecen reflejar la activación aberrante de las células epiteliales alveolares. Con esto en mente, se evaluó el papel de CC16 para distinguir la FPI de las enfermedades pulmonares intersticiales diferentes a FPI. Nuestros resultados mostraron que, aunque el aumento de los niveles de CC16 parece ser un factor de riesgo para FPI, el aumento de esta proteína por sí mismo parece ser insuficiente para diferenciar la FPI de las otras enfermedades intersticiales fibrosantes; Sin embargo, a ciertas concentraciones séricas se puede aumentar la sospecha de FPI y puede complementar otros hallazgos clínicos, radiológicos y morfológicos para mejorar la precisión diagnóstica. Sin duda ante la complejidad de esta enfermedad es necesario continuar estudiando no solo uno sino tal vez un grupo de biomarcadores que dependiendo de sus concentraciones séricas puedan incrementar la sensibilidad para el diagnóstico diferencial en estas enfermedades fibrosantes del pulmón y aunque por factibilidad se prefieren las muestras séricas, es necesario continuar estudios en muestras de lavado broncoalveolar, ya que aunque es un método invasivo, en muchos casos es parte del abordaje diagnóstico de los pacientes, por lo que además del conteo de la celularidad (que es para lo que se realiza como una pieza más al diagnóstico), la búsqueda de biomarcadores directamente en lavado broncoalveolar, podría ser otro uso de la muestra que seguiremos explorando.

La principal limitación de este estudio es la falta de una cohorte de replicación que limita nuestra capacidad para sacar conclusiones definitivas, así como el seguimiento de estos pacientes debido a que muchos de ellos son foráneos y ya no están en posibilidades de acudir a nuestro Instituto a una altura de 2550mts sobre el nivel del mar para continuar su atención. Sin embargo, los resultados obtenidos a nivel pulmonar son una oportunidad para desarrollar estudios posteriores, en que controlemos estas limitantes por parte de nuestro grupo, así

como realizar el estudio de un grupo de biomarcadores que ya hayan mostrado elevación en pacientes con FPI y determinar su certeza diagnóstica o el desarrollo de índices de acuerdo a sus concentraciones, que mejoren su eficacia diagnóstica. Los puntos fuertes de este estudio son el diagnóstico confiable de todos los casos incluidos revisados por un grupo de expertos del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, y el hallazgo de las contribuciones alveolares y el aumento local de CC16.

A partir de los resultados obtenidos, se propone iniciar una línea de investigación para continuar en la búsqueda de biomarcadores para el diagnóstico diferencial de FPI, y analizar además biomarcadores en las otras enfermedades fibrosantes pulmonares, para conocer su papel en el seguimiento de los diferentes tratamientos utilizados en estas enfermedades, así como determinar su impacto pronóstico a diferentes tiempos de tratamiento.

Financiamiento

Por el Laboratorio de Bioquímica del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas", SSA. con apoyo de CONACYT SALUD-2011-1-162010 y recursos propios del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

Bibliografía

1. Selman M, Rojas M, Mora AL, Pardo A. Aging and Interstitial Lung Diseases: Unraveling an old forgotten player in the pathogenesis of lung fibrosis. *Sem Respir Crit Care Med*, 2010; 31: 607-617.
2. 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 American Thoracic Association, Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Evidence-based guidelines for Diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011; 183: 788-824.
3. Ley B, Collard HR, King TE Jr Clinical Course and Prediction of survival in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011; 183: 431-40.
4. Richards TJ, Kaminski N, Barilbaud F, Peripheral Blood Proteins predict mortality in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012; 185: 67-76.
5. Selman M, King T, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: Prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Int Med*, 2001; 134: 136-151.
6. Pardo A, Selman M. Molecular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Front Biosci*, 2002; 7: 1743-1761.
7. Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis: new insights in its pathogenesis. *Int J Biochem Cell Biol*, 2002; 34: 1534-1538.
8. Gross TJ, Hunninghake GW. Idiopathic pulmonary fibrosis. *NEJM*, 2001; 345: 517-525.
9. Selman M, Pardo A, Kaminski N. Idiopathic pulmonary fibrosis: aberrant recapitulation of developmental programs?. *PLoS Med*, 2008; 5(3):e62.
10. Riobo NA, Manning DR. Pathways of Signal Transduction Employed by Vertebrate Hedgehogs. *Biochem J*, 2007; 403: 369-379.
11. Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog Signaling in Animal Development: Paradigms and Principles. *Genes Dev*, 2001; 15: 3059-3087.
12. Hooper JE, Scott MP. Communicating with Hedgehogs. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005; 6: 306-317.

13. Shannon JM, Hyatt BA. Epithelial-Mesenchymal Interactions in the Developing Lung. *Annu Rev Physiol*, 2004; 66: 625-645.
14. Bellusci S, Furuta Y, Rush MG, et al. Involvement of Sonic hedgehog (Shh) in Mouse Embryonic Lung Growth and Morphogenesis. *Development*, 1997; 124: 53-63.
15. Stewart GA, Hoyne GF, Ahmad SA, et al. Expression of the Developmental Sonic hedgehog (Shh) Signalling Pathway is Up-regulated in Chronic Lung Fibrosis and the Shh Receptor Patched I is Present in Circulating T Lymphocytes. *J Pathol*, 2003; 199: 488-495.
16. Coon DR, Roberts DJ, Loscertales M, Kradin R. Differential Epithelial Expression of SHH and FOX1 in Usual and Nonspecific Interstitial Pneumonia. *Exp Mol Pathol*, 2006; 80: 119-123.
17. Ohnishi H, Yokoyama A, Kondo K, Hamada H, et al. Comparative study of KL-6, surfactant protein-A, surfactant protein-D, and monocyte chemoattractant protein-1 as serum markers for interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002; 165:378-81.
18. Takahashi H, Takyta F, Hiroyuki K, 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: 1109-14.
19. Greene KE, King TE Jr, Kuroki Y, et al. Serum surfactant proteins-A and -D as biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*, 2002; 29: 439-46.
20. Barlo NP, Van Moorsel CH, Ruven HJ, et al. Surfactant protein-D predicts survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*, 2009; 26: 155-61.
21. Kinder BW, Brown KK, McCormach FX, et al. Serum surfactant protein-A is a strong predictor of early mortality in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*, 2009; 135: 1557-63.
22. Choi KH, Lee HB, Jeong MY, et al. The Role of Matrix Metalloproteinase-9 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 in Cryptogenic Organizing Pneumonia. *Chest*, 2012; 121: 1478-1485.

23. Rosas I, Richards T, Konishi K, et al. MMP1 and MMP7 as Potential Peripheral Blood Biomarkers in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Plos Med*, 2009; 5: e93.
24. Szlbowski A, Soja J, Grzanka P, et al. TGF- β_1 in bronchoalveolar lavage fluid in diffuse parenchymal lung diseases and high-resolution computed tomography score. *Pol Arch Med Wew*, 2010; 120: 270-275.
25. Determann RM, Millo JL, Waddy S, et. al. Plasma CC16 levels are associated with development of ALI/ARDS in patients with ventilator-associated pneumonia: a retrospective observational study. *BMC Pulmonary Medicine*, 2009; 9:49.
26. Lesur O, Langevin S, Berthiaume Y, et. al. Outcome value of Clara cell protein in serum of patients with acute respiratory distress síndrome. *Intensive Care Med*, 2006; 32: 1167-1174.
27. Gaxiola M, Buendía-Roldán I, Mejia M, Carrillo G, Estrada A, Navarro MC, Rojas-Serrano J, Selman M. Morphologic Diversity of chronic pigeon breeder's disease: Clinical features and survival. *Respir Med*, 2011; 105: 608-14.
28. King T, Bradford W, ASCEND Study Group. A phase 3 Trial of Pirfenidone in patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *NEJM*, 2014; 370: 2083-2092.
29. Richeldi L, Du Bois R, Raghu G, INPULSIS trial Investigators. Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *NEJM*, 2014; 370: 2071-2082.
30. Wells AU, Behr J, Costabel U, Cottin V, Poletti V. Triple Therapy in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: an alarming press release. *Eur Respir J* 2012 39: 805-806.
31. Prasse A, Probst C, Bargagli E, et al. Serum CC- chemokine ligand 18 concentration predicts outcome in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009; 179: 717-23.
32. Pardo A, Gibson K, Cisneros J, Richards TJ, Yang Y, Becerril C, et al. Up-regulation and profibrotic role of osteopontin in human idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS Med*, 2005; 2(9): e251.
33. Selman M, Pardo A, Barrera L, Estrada A, Watson SR, Wilson K, et al. Gene expression profiles distinguish idiopathic pulmonary fibrosis from hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006; 173: 188-198.
34. Donado-More AF, Camargo Mendoza JP, Franco-Maz PG, Malaver-Caicedo LF. La célula de Clara: La biología celular y molecular con implicaciones

fisiopatológicas. Una revisión de la literatura. *Neurología y Cirugía de Tórax (NCT)*, 2013; 72: 306-322.

35. King TE, Jr., Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet*, 2011; 378: 1949-1961.

36. Selman M, Pardo A. Revealing the pathogenic and aging-related mechanisms of the enigmatic idiopathic pulmonary fibrosis. An integral model. *Am J Respir Crit Care Med*, 2014; 189: 1161-1172.

37. Gioldassi XM, Papadimitriou H, Mikraki V, Karamanos NK. Clara cell secretory protein: determination of serum levels by an enzyme immunoassay and its importance as an indicator of bronchial asthma in children. *J Pharm Biomed Anal*, 2004; 34: 823-826.

38. Laucho-Contreras ME, Poverino F, Gupta K, Taylor KL, Kelly E, Pinto-Plata V, et al. Protective role for club cell secretory protein-16 (CC16) in the development of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*, 2015; 45: 1544-1556.

39. Guerra S, Halonen M, Vasquez MM, Spangenberg A, Stern DA, Morgan WJ, et al. Relation between circulating CC16 concentrations, lung function, and development of chronic obstructive pulmonary disease across the lifespan: a prospective study. *Lancet Respir Med*, 2015; 3: 613-620.

40. Robin M, Dong P, Hermans C, Bernard A, Bersten AD, Doyle IR. Serum levels of CC16, SP-A and SP-B reflect tobacco-smoke exposure in asymptomatic subjects. *Eur Respir J*, 2002; 20:1152-1161.

41. Hasegawa M, Fujimoto M, Yamaguchi Y, Matsushita T, Inoue K, Sato S, et al. Use of serum clara cell 16-kDa (CC16) levels as a potential indicator of active pulmonary fibrosis in systemic sclerosis. *J Rheumatol*, 2011; 38: 877-884.

42. Olewicz-Gawlik A, Trzybulska D, Kuznar-Kaminska B, Katulska K, Danczak-Pazdrowska A, Batura-Gabryel H, et al. Serum Clara cell 16-kDa protein levels and lung impairment in systemic sclerosis patients. *Rev Bras Reumatol Engl Ed*, 2016; 56:309-313.

43. Kokuho N, Ishii T, Kamio K, Hayashi H, Kurahara M, Hattori K, et al. Diagnostic values for Club cell secretory protein (CC16) in serum of patients of combined pulmonary fibrosis and emphysema. *COPD*, 2015; 12:347-354.

44. Akram KM, Lomas NJ, Spiteri MA, Forsyth NR. Club cells inhibit alveolar epithelial wound repair via TRAIL-dependent apoptosis. *Eur Respir J*, 2013; 41:683-694.
45. Takemura T, Akashi T, Kamiya H, Ikushima S, Ando T, Oritsu M, et al. Pathological differentiation of chronic hypersensitivity pneumonitis from idiopathic pulmonary fibrosis/usual interstitial pneumonia. *Histopathology*, 2012; 61:1026–1035.
46. Morell F, Villar A, Montero MÁ, Muñoz X, Colby TV, Pipvath S, et al. Chronic hypersensitivity pneumonitis in patients diagnosed with idiopathic pulmonary fibrosis: a prospective case-cohort study. *Lancet Respir Med*, 2013; 1:685-694.
47. Oikonomou A, Prassopoulos P. Mimics in chest disease: interstitial opacities. *Insights Imaging*, 2013; 4: 9-27.
48. White ES, Xia M, Murray S, Dyal R, Flaherty CM, Flaherty KR, et al. Plasma surfactant protein-D, matrix metalloproteinase-7, and osteopontin index distinguishes idiopathic pulmonary fibrosis from other idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med*, 2016; 194: 1242-1251.