



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Tesis Doctoral
Programa de Doctorado en Medicina
Departamento de Medicina

Autoanticuerpos anti-Ro52

Utilidad como marcador en suero y lavado broncoalveolar en
pacientes con enfermedades del tejido conectivo y en la
enfermedad pulmonar intersticial difusa

Iñaki Salvador Corres

Directores de Tesis

Dr. Alejandro Olivé Marqués

Dr. Karina Portillo Carroz

Tutor de Tesis

Dr. Manuel Monreal Bosch

Barcelona 2020

“Fairy tales are more than true: not because they tell us that dragons exist, but because they tell us that dragons can be beaten.”

Neil Gaiman

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo nace del deseo, de la necesidad y de la locura. En los últimos siete años ha ocupado gran parte de mis sueños y algunas de mis pesadillas. Hoy me siento por última vez delante de mi ordenador para recordar a todos los que me han acompañado a lo largo de este intenso viaje.

Gracias a Ritchie Blackmore y a Johnny Cash, a Richard Wagner y a Isao Tomita, a Robe Iniesta y al Reno Renardo... por inspirarme durante cientos de horas solitarias. La tesis sin música no tendría sentido.

Gracias a Alejandro por creer en un proyecto que no era suyo y por aceptar un alumno que no siempre podría estar disponible. Gracias a Karina por unirme a esta aventura, por tu implicación y por todo lo que me has enseñado.

Gracias a todo el laboratorio de Inmunología del HUGTiP, por haber seguido siendo mi casa mientras vagaba por el mundo. Especialmente a Àlex por ayudarme con los blots, a María y Bibiana por esas preciosas imágenes de IFI y a Aroa, Patricia y Aina por ser las guardianas de los BALs. Gracias a Eva por obligarme a enfrentarme a mis límites.

Gracias a Melania por ayudarme con la revisión de las historias clínicas, por hacer de correo y por todo tu apoyo. Gracias también a la Dra. Bielsa por ayudarnos con las manifestaciones dermatológicas. Gracias a todos los miembros del GECLID por su contribución al estudio en suero. Gracias a la Dra. Centeno, al Dr. Pere Serra y a toda la unidad de broncoscopias por recoger las muestras. Sin vosotros el proyecto no habría podido realizarse.

Gracias a toda mi familia, la de Vitoria y la de Mataró. Por haberme dado apoyo moral, y en ocasiones económico, durante todos estos años. Por todas las veces que me habéis preguntado cuando me quedaba por acabar, por vuestros ánimos y vuestros consejos. Mención especial a Raimon por su excelente trabajo en la portada.

Gràcies a l'Aina, per estar sempre al meu costat.

In memoriam,

Dos de las personas que más influyeron en que estudiara Biología, que decidiera especializarme en Inmunología y que ahora mismo escriba estas líneas, ya no podrán leerlas. A ellas está dedicado este trabajo.

Al hombre recto. Al que habría querido ser ingeniero, al que valoraba la educación de sus nietos por encima de todo. Gracias por enseñarme que la perseverancia es tan importante como el talento. Sé que estarías muy orgulloso de ver donde he llegado.

Al *enfant terrible*. Al coleccionista, al que miraba el mundo a través de lentes y experimentaba con cigüeñinos. Al que me enseñó a cuestionarme siempre todo. Al mejor padre del mundo. Hay más de ti que de ninguna otra persona en este trabajo. Siempre te agradeceré haberme regalado el don del delirio... y nunca me perdonaré no haber llegado a tiempo para que lo vieras terminado.

ABREVIATURAS

Nota: Algunas abreviaturas se usarán en su forma inglesa dado que no existe una versión en castellano internacionalmente aceptada.

ACR	American College of Rheumatology
AGEs	Productos finales de glicosilación avanzada
ALAT	Asociación latinoamericana de tórax
AMA-2	anticuerpo anti-mitocondrial-2
ANA	Anticuerpos anti-nucleares
ANCA	Anticuerpos contra el citoplasma de neutrófilos
AR	Artritis reumatoide
ARS	Aminoacil RNA sintetasas
ATS	American Thoracic Society
BAFF	Factor activador de células B perteneciente a la familia del TNF
BALT	Tejido linfoide asociado a los bronquios
BONO	Bronquiolitis obliterante con neumonía organizada
BR	Bronquiolitis respiratoria
BR-EIP	Bronquiolitis respiratoria asociada a enfermedad intersticial pulmonar
CBP	Cirrosis biliar primaria
CCP	Péptidos cíclicos citrulinados
CD	Cluster of differentiation
CEP	Colangitis esclerosante primaria
CFPE	Combinación de fibrosis pulmonar y enfisema
CLIA	Quimioluminiscencia
CPI	Composite physiologic index
CREST	Calcinosis, Raynaud, dismotilidad esofágica, esclerodactilia y telangiectasias
CSPT	Corporació Sanitària Parc Taulí
DAD	Daño alveolar difuso
DCs	Células dendríticas
DL _{co}	Difusión alveolar del monóxido de carbono
DM	Dermatomiositis
DNAds	DNA de doble cadena
dSSc	Esclerosis sistémica diseminada
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
ELIA	Inmunoensayo enzimático fluorescente
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EMTC	Enfermedad mixta del tejido conectivo
ENA	Anticuerpos nucleares extraíbles
EPID	Enfermedad pulmonar intersticial difusa

EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ERS	European Respiratory Society
ET-1	Endotelina-1
ETC	Enfermedad/es del tejido conectivo
ETC-EPID	EPID asociada a enfermedad del tejido conectivo
ETC-ND	Enfermedad del tejido conectivo no diferenciada
EULAR	European League Against Rheumatism
Fc	Fracción cristalizante de un anticuerpo
FEPP	Fibroelastosis pleuroparenquimatosa
FEV1	Volumen Espiratorio forzado el primer segundo
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FPI	Fibrosis pulmonar idiopática
FR	Factor reumatoide
FVC	Capacidad vital forzada
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
GEAI	Grupo Español de Autoinmunidad
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
HA	Hepatitis autoinmune
HAP	Hipertensión arterial pulmonar
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
HLA	Human leucocyte antigen
HPCL	Histiocitosis pulmonar por células de Langerhans
HSP	Proteína de estrés térmico
HUGTiP	Hospital Universitari Germans Trias i Pujol
ICAP	International consensus for ANA patterns
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IgAm	IgA monomérica
IGFBP-2	Proteína de unión al factor de crecimiento similar a insulina
Igs	Inmunoglobulinas
IL-17RA	Receptor IL-17A
ILCs	Células linfoides innatas
IFN	Interferón
iNKT	NKT invariante
IP10/CXCL10	Proteína inducida por interferón gamma 10
IPAF	Pneumonía intersticial con rasgos autoinmunes
JRS	Japanese respiratory society
KL-6	Proteína de Krebs von den Lungen-6
LAM	Linfangioleiomiomatosis

LBA	Lavado broncoalveolar
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LECS	Lupus eritematoso cutáneo subagudo
LED	Lupus eritematoso discoide
LES	Lupus eritematoso sistémico
LET	Lupus eritematoso túbido
LOXL2	Proteína de unión al factor de crecimiento transformante beta latente
ISSc	Esclerosis sistémica limitada
LTBP	Proteína de unión a TGF- β latente
Lti	Células inductoras del tejido linfoide
m	Metro/s
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosas
MBG	Membrana basal glomerular
MDC/CCL22	Quimiocina derivada de macrófagos
mDCs	Células dendríticas mieloides o convencionales
M_e	Mediana
mmHg	Milímetros de mercurio
min	Minuto/s
mL	Mililitro/s
MMP7	Metaloproteasa de matriz 7
MMPs	Metaloproteasas
$M\emptyset$	Macrófagos
MPO	Mieloperoxidasa
MUC5B	Mucina 5 B
NH	Neumonitis por hipersensibilidad
NIA	Neumonía intersticial aguda
NID	Neumonía intersticial descamativa
NII	Neumonía intersticial idiopática
NIL	Neumonía intersticial linfocitaria
NINE	Neumonía intersticial idiopática no específica
NIU	Neumonía intersticial usual
NK	Linfocito asesino natural
NLR	Nod-like receptor
NO	Neumonía organizada
NOC	Neumonía organizada criptogénica
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PAN	Poliarteritis nodosa
PaO ₂	Presión arterial de oxígeno

PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Proteína C reactiva
pDCs	Células dendríticas plasmacitoides
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PGE2	Prostaglandina E2
pIgA	IgA polimérica
pIgR	Receptor de inmunoglobulinas poliméricas
PM	Polimiositis
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PR3	Proteinasa 3
PRR	Receptores de reconocimiento de patógenos
RAGE	Receptor de AGEs
RGE	reflujo gastroesofágico
RIC	Rango intercuartílico
RNApol	RNA polimerasa
RNP	Ribonucleoproteína
ROS	Radicales libres de oxígeno
RV	Volumen residual
SAS	Síndrome anti-sintetasa
SatO ₂	Saturación arterial de oxígeno
SDRA	Síndrome de distrés respiratorio del adulto
SEPAR	Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica
SIgA	IgA secretora
SIgM	IgM secretora
SP-A	Proteína A del surfactante
SP-D	Proteína D del surfactante
SSc	Esclerosis sistémica
SSp	Síndrome de Sjögren primario
TARC/CCL17	Quimiocina regulada por la activación tímica
Tc	Linfocitos T citotóxicos
TCAR	Tomografía computarizada de alta resolución
TCR	T Cell receptor
TEM	Transición epitelial mesenquimal
Tfh	Linfocitos T foliculares
TGF	Factor de crecimiento tumoral
Th	Linfocitos T colaboradores
TLC	Capacidad pulmonar total
TLR	Toll-like receptor

TM6M	Test de la marcha de 6 minutos
TNF	Factor de necrosis tumoral
Treg	Linfocitos T reguladores
TRIM	Motivo tripartito
UI/mL	Unidades internacionales por mililitro
ul	microlitro/s
VC	Volumen corriente
VEGF-D	Factor de crecimiento vascular endotelial D
VHC	Virus hepatitis C
VRS	Virus respiratorio sincitial
VSG	Velocidad de sedimentación globular
σ	Desviación estándar
\bar{x}	Media

TABLA DE CONTENIDOS

1.	RESUMEN	1
2.	INTRODUCCIÓN	5
2.1.	El sistema inmune pulmonar	7
2.1.1.	Generalidades sobre el sistema inmune asociado a mucosas	7
2.1.2.	Mecanismos de barrera	8
2.1.3.	Componentes del sistema inmune	9
2.1.3.1.	Respuesta innata, células presentadoras de antígeno y liberadoras de gránulos	9
2.1.3.2.	Respuesta adaptativa, linajes linfocitarios T, B y células linfoides innatas (ILC)	11
2.1.3.3.	Subpoblaciones linfocitarias T.....	13
2.1.3.4.	Células linfoides innatas.....	18
2.1.3.5.	Células B y anticuerpos	21
2.1.4.	Ellos y nosotros: el papel del microbioma.	22
2.2.	Enfermedad pulmonar intersticial difusa	25
2.2.1.	Definición y epidemiología	25
2.2.2.	Neumonías intersticiales de causas conocidas y primarias.....	25
2.2.3.	Neumonías intersticiales idiopáticas (NII).....	26
2.2.3.1.	Neumonías intersticiales crónicas fibrosantes.....	26
2.2.3.2.	Neumonías intersticiales relacionadas con el tabaquismo ...	28
2.2.3.3.	Neumonías intersticiales agudas o subagudas.....	28
2.2.3.4.	Neumonías intersticiales idiopáticas infrecuentes.....	29
2.2.4.	Neumonías intersticiales idiopáticas de causa autoinmune	30
2.2.4.1.	Esclerosis sistémica (SSc)	33
2.2.4.2.	Artritis reumatoide (AR).....	37
2.2.4.3.	Miopatías inflamatorias	38
2.2.4.4.	Síndrome de Sjögren (SSp).....	39
2.2.4.5.	Enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC).....	39

2.2.4.6.	Lupus eritematosos sistémico (LES)	40
2.2.4.7.	Conectivopatías indiferenciadas.....	40
2.3.	Herramientas diagnósticas.....	43
2.3.1.	¿Qué es un biomarcador?	44
2.3.2.	Biomarcadores en EPID	45
2.3.2.1.	Marcadores de daño tisular	45
2.3.2.2.	Factores de crecimiento implicados en la fibrosis y remodelación tisular	46
2.3.2.3.	Quimiocinas y citoquinas.....	46
2.3.2.4.	Subpoblaciones linfocitarias.....	47
2.3.2.5.	Productos finales de glicosilación.....	47
2.3.2.6.	Marcadores genéticos	48
2.3.2.7.	Marcadores de exposición	48
2.3.3.	Autoanticuerpos como biomarcadores en EPID.....	51
2.3.3.1.	Antecedentes	51
2.3.3.2.	Breve descripción de los autoanticuerpos estudiados	51
2.3.3.3.	¿Por qué estudiar los autoanticuerpos anti-Ro52 en EPID? .	53
3.	JUSTIFICACIÓN	55
4.	HIPÓTESIS	59
5.	OBJETIVOS.....	63
5.1.	Objetivo principal.....	65
5.2.	Objetivos secundarios	65
6.	MATERIAL Y MÉTODOS	67
6.1.	Utilidad pronóstica de las especificidades SSA/Ro en suero.	69
6.1.1.	Diseño del estudio.....	69
6.1.2.	Sujetos del estudio	69
6.1.3.	Recogida de datos	70
6.1.3.1.	Variables clínicas	70

6.1.3.2.	Determinación de autoanticuerpos	72
6.1.4.	Análisis estadístico.....	73
6.2.	Detección de autoanticuerpos en lavado broncoalveolar	74
6.2.1.	Diseño del estudio	74
6.2.2.	Pruebas de laboratorio	77
6.2.2.1.	Recogida, procesado y conservación de las muestras	77
6.2.2.2.	Estudio de poblaciones leucocitarias en LBA	77
6.2.2.3.	Determinación de autoanticuerpos en suero	78
6.2.2.4.	Determinación de autoanticuerpos en LBA mediante inmunoblot	79
6.2.2.5.	Determinación de autoanticuerpos en LBA mediante ELISA	83
6.2.2.6.	Determinación de ANAs en LBA mediante IFI	84
6.2.3.	Análisis estadístico.....	86
7.	RESULTADOS	89
7.1.	Utilidad pronóstica de las especificidades SSA/Ro en suero.....	91
7.1.1.	Composición de la serie del HUGTiP	91
7.1.2.	Composición de la serie	92
7.1.3.	Prevalencia de las manifestaciones por órganos o sistemas.....	95
7.1.3.1.	Manifestaciones pulmonares.....	95
7.1.3.2.	Fenómeno de Raynaud	96
7.1.3.3.	Manifestaciones articulares	98
7.1.3.4.	Síndrome seco	100
7.1.3.5.	Manifestaciones cutáneas	102
7.1.3.6.	Serositis	104
7.1.3.7.	Manifestaciones renales	105
7.1.3.8.	Tumores.....	107
7.1.3.9.	Manifestaciones cardíacas.....	108
7.1.4.	Resumen resultados estudio en suero.....	109
7.2.	Detección de autoanticuerpos en lavado broncoalveolar	111

7.2.1.	Datos descriptivos basales de los pacientes	111
7.2.2.	Comparativa de los pacientes ENAs positivos en suero y LBA....	116
7.2.3.	Comparativa de los pacientes con ENAs en LBA de clase IgA e IgG	116
7.2.4.	Determinación de otras especificidades.	116
7.2.4.1.	Autoanticuerpos relacionados con esclerosis sistémica, miopatías inflamatorias y vasculitis ANCA positiva mediante immunoblot.....	117
7.2.4.2.	Determinación de autoanticuerpos relacionados con artritis reumatoide mediante ELISA.....	117
7.2.4.3.	Determinación de ANAs de clase IgA e IgG en muestras de LBA.....	119
7.2.5.	Datos comparativos basales de los pacientes	134
7.2.6.	Resumen resultados estudio en LBA	137
8.	Discusión.....	139
8.1.	Utilidad pronóstica de las especificidades SSA/Ro en suero	142
8.1.1.	Diagnósticos asociados a la presencia de especificidades SSA/Ro.....	142
8.1.2.	Anticuerpos anti-Ro60 y afectación cutánea en el LES.....	143
8.1.3.	Anticuerpos anti-Ro52 y artritis en el LES y SSp	143
8.1.4.	Anticuerpos anti-Ro52, EPID y fenómeno de Raynaud.....	144
8.1.5.	Anticuerpos anti-Ro52 y síndrome seco.....	145
8.1.6.	Otras manifestaciones.....	146
8.1.7.	¿Por qué no todos los pacientes desarrollan la misma clínica?..	147
8.2.	Utilidad de la detección de autoanticuerpos en LBA	148
8.2.1.	Necesidad de biomarcadores para ETC-EPID	148
8.2.2.	Utilidad en el diagnóstico diferencial	149
8.2.3.	Características de los pacientes positivos	149
8.2.4.	Especificidades encontradas	150
8.2.5.	Isotipo de los anticuerpos detectados	150

8.2.6.	Utilidad de la determinación de autoanticuerpos en el LBA.....	151
8.3.	¿Porque son tan comunes los anticuerpos anti-Ro52?.....	152
9.	CONCLUSIONES	155
10.	LÍNEAS DE FUTURO.....	159
11.	BIBLIOGRAFÍA	165
	ANEXOS	201
11.1.	ANEXO 1. Descripción de los autoanticuerpos estudiados	203
11.2.	ANEXO 2. Relación de tablas.....	206
11.3.	ANEXO 3. Relación de figuras	208
11.4.	ANEXO 4. Ayudas institucionales	208

1. RESUMEN

Los autoanticuerpos son los principales biomarcadores de enfermedad autoinmune y en ocasiones su presencia se relaciona con el mecanismo etiopatogénico. Los más utilizados definen enfermedades concretas, por lo que son útiles como marcadores diagnósticos. Actualmente, hay un creciente interés en el uso de los autoanticuerpos como marcadores pronósticos o de seguimiento. Los anticuerpos anti-SSA/Ro abarcan dos especificidades dirigidas frente a dos proteínas diferentes, Ro52 y Ro60, que no siempre son estudiadas por separado.

La presente tesis se centra en la detección de anticuerpos frente especificidades SSA/Ro y más concretamente frente a Ro52. La introducción, incluye una descripción detallada del sistema inmune pulmonar, una clasificación de las enfermedades pulmonares intersticiales y una revisión de la literatura sobre biomarcadores en enfermedad pulmonar intersticial. Se ha procurado explicar los mecanismos inmunológicos de una manera profunda pero accesible a facultativos de otras especialidades interesados en la Inmunología.

El presente trabajo, se divide en dos apartados diferenciados. El primer apartado, consiste en la descripción clínica de pacientes con enfermedades del tejido conectivo y anticuerpos frente a especificidades SSA/Ro en suero. Se ha demostrado que la presencia de una especificidad SSA/Ro en sangre se asocia con el desarrollo de manifestaciones concretas independientemente del diagnóstico. En el segundo, se adaptaron métodos utilizados para la detección de autoanticuerpos en suero, para el estudio del lavado broncoalveolar de pacientes con enfermedad pulmonar intersticial difusa (EPID). Hasta nuestro conocimiento, este es el primer estudio donde se detectan autoanticuerpos específicos de enfermedades del tejido conectivo en el pulmón. Estos autoanticuerpos pueden detectarse desde el inicio de la enfermedad, por lo que son susceptibles de ser utilizados como biomarcadores tempranos. Finalmente, creemos que describiendo la síntesis *in-situ* de autoanticuerpos también contribuimos a una mejor comprensión de los mecanismos inmunológicos de la mucosa pulmonar.

Autoantibodies are the main biomarkers in autoimmune diseases and sometimes there are related to the pathogenic mechanism. More used ones can define specific diseases, so they are useful diagnostic markers. There is an increasing interest in the use of autoantibodies as prognosis or follow up markers. Autoantibodies against anti-SSA/Ro span two specificities directed against two different proteins, Ro52 and Ro60, which are not always studied separately.

Present thesis focus on the detection of antibodies against SSA/Ro specificities, and more specifically against Ro52. Introduction includes a detailed description of lung immune system, a classification of the interstitial lung diseases and a review of biomarkers in interstitial lung disease. Attempts have been made to explain the immunological mechanisms in a profound but accessible way to physicians of other specialties interested in Immunology.

The present work is divided into two differentiated sections. First section describes the clinical manifestation present in patients with connective tissue diseases and antibodies against SSA/Ro specificities in serum. It have been demonstrated that the presence of SSA/Ro specificities in the blood is associated with the development of specific manifestations regardless of the diagnosis. In the second section, protocols for the detection of autoantibodies in serum were adapted for the study of bronchoalveolar lavage of patients with interstitial lung disease. To our knowledge, this is the first study were specific autoantibodies for connective tissue diseases have been detected in the lung. Those autoantibodies can be detected from the beginning of the disease, therefore could be used as early biomarkers. Finally, we believe that describing the *in-situ* synthesis of autoantibodies we contribute to a better understanding of the immunological mechanisms in the lung mucosa.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 El sistema Inmune pulmonar

- 2.1.1 Generalidades sobre el sistema inmune asociado a mucosas
- 2.1.2 Mecanismos de barrera
- 2.1.3 Componentes del sistema inmune
 - 2.1.3.1 Respuesta innata, células presentadoras de antígeno y liberadoras de gránulos
 - 2.1.3.2 Respuesta adaptativa, linajes linfocitarios T, B y células linfoides innatas (ILC)
- 2.1.4 Ellos y nosotros, el papel del microbioma

2.1. El sistema inmune pulmonar

Las mucosas comprenden una superficie de 400m^2 , una cuarta parte de los cuales corresponden al pulmón. Son la frontera entre nuestro organismo y el medio exterior. Esto conlleva una relación constante con millones de microorganismos, algunos de los cuales son patógenos, así como el continuo contacto con antígenos capaces de modular la respuesta inmune. El equilibrio entre los mecanismos que regulan la tolerancia y la defensa es por tanto crucial para su homeóstasis.

2.1.1. Generalidades sobre el sistema inmune asociado a mucosas

El sistema inmune asociado a mucosas (MALT), está formado por un conjunto bien organizado de linfocitos T, B, células dendríticas (DCs) y otras células del sistema inmune que presenta una estructura y función similares a las de los ganglios linfáticos.

El prototipo es la placa de Peyer situada bajo la mucosa del intestino delgado. Está compuesta por células epiteliales especializadas en la captación de antígenos (célula M); estructuras semejantes a folículos formadas principalmente por linfocitos B, pero también linfocitos T y células dendríticas. Algunos de estos linfocitos B forman centros germinales y expresan Ki-67 (marcador de proliferación); y áreas de linfocitos T rodeando estos folículos, dispersas en el epitelio y sobre todo en la periferia de las vénulas de endotelio alto. Dentro de este microambiente, las células plasmáticas secretoras de IgA maduran antes de migrar a través de los nódulos linfáticos hacia la lámina propia de todas las mucosas.

El equivalente a nivel pulmonar de la placa de Peyer del intestino es el tejido linfoide asociado a los bronquios (BALT). A diferencia de otras especies como

los conejos y las aves, en humanos el BALT no se expresa de manera constitutiva. Estudios histológicos en pulmones de fetos sin evidencias de infección, solo pudieron detectar estructuras semejantes a BALT en un 10% de los casos ⁽¹⁾ tratándose además de estructuras pequeñas. En neonatos y hasta los cinco años de edad se detecta un aumento progresivo de agregados linfocitarios ⁽²⁾ pero la mayoría de veces no cumplen criterios para poder ser considerados como BALT. Dos estudios que intentaron detectar BALT en el pulmón de un total de 61 pacientes muertos por causas no respiratorias solamente pudieron detectar estructuras pequeñas en tres de ellos ⁽³⁾⁽⁴⁾. Sin embargo, bajo situaciones patológicas se genera un aumento cuantitativo y cualitativo del BALT. Esto ha sido documentado tanto en infecciones respiratorias, como en fumadores⁽⁵⁾, deportistas de élite ⁽⁶⁾ y en enfermedades autoinmunes ⁽⁷⁾.

2.1.2. Mecanismos de barrera

Al igual que el intestino, la mucosa del tracto respiratorio inferior está compuesta por una monocapa de células epiteliales ciliadas y la lámina propia subyacente. Según se profundiza, las células epiteliales reducen su grosor y la densidad de los cilios disminuye hasta desaparecer en los capilares. El epitelio pulmonar no expresa células M de forma constitutiva, pero sí células caliciformes secretoras de moco y células de Club relacionadas con la detoxificación. Más allá de ser una mera barrera pasiva, el epitelio respiratorio secreta moléculas antimicrobianas, es capaz de percibir agentes patógenos mediante diferentes receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) ⁽⁸⁾⁽⁹⁾ como los TLR y NLR, de actuar como células presentadoras de antígenos ⁽¹⁰⁾ y de secretar de forma constitutiva citoquinas como el TGF- β , la IL-2, la IL-6 y la IL-10 ⁽¹¹⁾.

La acción del moco y las células ciliadas se ve reforzada por dos componentes del sistema inmune, los macrófagos (M \emptyset) alveolares y la IgA secretora (sIgA). Los M \emptyset s alveolares, son una población residente en el lumen pulmonar y presentan diferencias funcionales y morfológicas con los M \emptyset s intersticiales ⁽¹²⁾. Dado que el epitelio alveolar carece de cilios, los M \emptyset alveolares son los únicos responsables de eliminar células apoptóticas, restos celulares, microorganismos e inmunocomplejos en este territorio.

La sIgA cubre toda la superficie pulmonar, presenta una altísima tasa de recambio y contribuye a la rápida eliminación de patógenos y otros antígenos

del lumen. Los ratones con déficit en el receptor de inmunoglobulinas poliméricas (plgR), donde la IgA no puede ser transportada de forma normal al lumen, presentan un mayor permeabilidad intestinal que se refleja en la aparición en sangre de anticuerpos de clase IgG frente a cepas de *Escherichia coli* sin capacidad invasiva⁽¹³⁾. Este mecanismo será explicado con más detalle en el apartado referente a los linfocitos B (3.1.3.5).

2.1.3. Componentes del sistema inmune

Los modelos tradicionales del sistema inmune diferencian dos tipos de respuesta: la innata llevada a cabo por las células con capacidad fagocítica (DCs, MØ), los linfocitos asesinos naturales (NK) y los granulocitos; y la adaptativa cuyos representantes son los linfocitos T y B. Estas dos vías están íntimamente conectadas y se comunican a través de factores solubles (citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento), contactos célula a célula a través de proteínas de superficie y otros mecanismos relevantes como la presentación antigénica y la opsonización. Recientemente, se han descrito las células linfoides innatas (ILCs), un nuevo tipo celular de estirpe linfocitaria y con características intermedias entre la respuesta inmune innata y adaptativa. A continuación, se procede a realizar una breve descripción de las funciones y marcadores de cada uno de los componentes del sistema haciendo hincapié en su funcionalidad dentro de la mucosa pulmonar.

2.1.3.1. Respuesta innata, células presentadoras de antígeno y liberadoras de gránulos

Los monocitos, MØs y las DCs son células de línea mieloide que actúan como presentadoras profesionales de antígeno. Son capaces de captar patógenos a través de receptores no específicos, procesarlos y presentar fragmentos de éstos a los linfocitos T a través del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA en humanos) de clase II. Su fenotipo es muy plástico, y pueden modificar su funcionalidad en respuesta a cambios en el microambiente o a los estímulos de otras células, también son capaces de secretar citoquinas y modular a otras células del sistema inmune.

La superficie alveolar es un compartimento expuesto a importantes fluctuaciones ambientales, la presión parcial de oxígeno (PaO₂) puede fluctuar desde los 100-110 mmHg en condiciones normales hasta 2.5 mmHg durante algunas infecciones agudas. En condiciones fisiológicas, aparte de algunos linfocitos circulantes, la única población celular residente en este tejido son los MØs alveolares. Se trata de una población funcional y fenotípicamente muy

plástica, por tanto son difíciles de encajar dentro de la clasificación M1/M2 (activados de manera clásica/alternativa) ⁽¹⁴⁾. La fagocitosis de células apoptóticas induce un perfil antiinflamatorio, mientras que las células necróticas inducen un patrón proinflamatorio ⁽¹²⁾. Y en diferentes enfermedades inflamatorias pulmonares se ha observado una polarización hacia el fenotipo M2 ⁽¹⁵⁾. Estos linfocitos con fenotipo tipo-M2 desempeñan un papel en la resolución de las condiciones inflamatorias, pero también pueden inducir fibrosis mediante la secreción de TGF- β ⁽¹⁶⁾ y de precursores de la síntesis del colágeno como la prolina y las poliamidas ⁽¹⁷⁾.

En la situación basal, y en comparación con los M ϕ s del intersticio pulmonar u otros tejidos, esta población presenta una baja capacidad fagocítica ⁽¹⁸⁾, disminución del estallido oxidativo ⁽¹⁹⁾ y secretan citoquinas antiinflamatorias como el TGF- β ⁽²⁰⁾. Presentan bajos niveles de expresión de moléculas coestimuladoras ⁽²¹⁾ y aunque son capaces de transportar antígenos a los ganglios linfáticos que drenan a los pulmones ⁽²²⁾, realizan una débil presentación antigénica, lo que induce una baja respuesta antígeno específica por parte de los linfocitos T ⁽²³⁾⁽²⁴⁾. Para mantener este estado antiinflamatorio, los M ϕ s alveolares reciben estímulos tolerogénicos del epitelio a través de receptores de superficie, entre los que podemos destacar el CD200R ⁽²⁵⁾ y el receptor de manosa ⁽²⁶⁾. La destrucción del epitelio respiratorio implica la pérdida de la expresión de los ligandos para estos receptores, lo que conlleva el paso a un fenotipo proinflamatorio ⁽¹²⁾.

El epitelio pulmonar alberga tanto células dendríticas convencionales (cDCs) con fenotipo HLA-DR⁺CD11c⁺ como células dendríticas plasmacitoides (pDCs) con fenotipo HLA-DR⁺CD11c⁻CD123⁺, aunque en general, es difícil establecer una relación entre este fenotipo y su funcionalidad ⁽²⁷⁾. Como hemos mencionado, los M ϕ s alveolares presentan pobre capacidad presentadora siendo las cDCs las principales responsables de la presentación antigénica y, por tanto, las inductoras del cambio de clase a IgA por parte de los linfocitos B ⁽²⁸⁾. Experimentos realizados mediante la vacunación por vía respiratoria con toxina colérica inactivada, han demostrado que la acción de los microorganismos puede modular la expresión de TGF- β por parte de las DCs pulmonares. Esto inicia una vía capaz de inducir el cambio de clase a IgA por parte de los linfocitos B. Bajo estas condiciones, los linfocitos B IgA⁺ expresarán CCR9 y la integrina α 4 β 7 en su superficie. Estas moléculas dirigen el "homing"

de los linfocitos B hacia el tubo digestivo donde son capaces de contribuir a la defensa tras un estímulo por vía oral ⁽²⁸⁾. Estos estudios son relevantes porque demuestran la capacidad de inducir respuesta en un órgano lejano a través de un estímulo iniciado a nivel pulmonar. Algunos estudios en artritis reumatoide apuntan en este mismo sentido ⁽²⁹⁾⁽³⁰⁾. Los granulocitos (neutrófilos, basófilos, mastocitos y eosinófilos) pertenecen también a la línea mieloide, como su nombre indica, todas contienen gránulos con capacidad tóxica que liberan tras ser activados y cada uno de ellos está especializado en un tipo de patógeno. También secretan citoquinas capaces de modular la respuesta adaptativa y de desencadenar reacciones alérgicas.

2.1.3.2. Respuesta adaptativa, linajes linfocitarios T, B y células linfoides innatas (ILC)

Los linfocitos son los principales actores en la respuesta inmune adaptativa. Se pueden diferenciar cuatro linajes principales: las células B cuya principal función es la secreción de anticuerpos; las células T citotóxicas (Tc) especializadas en la eliminación de células tumorales o infectadas por patógenos intracelulares; las células T colaboradoras (Th) que modulan la respuesta inmune frente a patógenos intra y extracelulares; y las células T reguladoras (Treg) capaces de controlar la respuesta inflamatoria. Como veremos, cada uno de estos linajes puede subdividirse atendiendo a sus características funcionales y morfológicas en lo que denominaremos subpoblaciones linfocitarias. Además, según el microentorno al que estén expuestas, cada una de estas subpoblaciones podrá presentar diferentes estados de activación que repercutirán en su funcionalidad.

Las diferentes subpoblaciones linfocitarias pueden definirse atendiendo a la expresión de factores de transcripción, a las moléculas que expresan en su superficie, y al perfil de citoquinas que secretan. A continuación, haremos una descripción pormenorizada de las principales subpoblaciones linfocitarias, haciendo énfasis en su función dentro de la mucosa pulmonar. Las células linfoides innatas (ILCs y NK) representan el puente entre la respuesta inmune innata y adaptativa y dado a su relevancia en la respuesta inmune asociada a mucosas serán tratadas en otro apartado. La **tabla 1** resume los marcadores que definen las diferentes subpoblaciones de la respuesta inmune adaptativa.

TABLA 1: Subpoblaciones linfocitarias (respuesta adaptativa)

	Función	Factores de diferenciación	Marcaadores de línea*	Factores secretados
Linfocitos B	Síntesis de Inmunoglobulinas Presentación antígenica		<i>CD19, CD20, CD22</i>	IgG
Linfocitos T				
T colaboradores (Th)				
Th1	Eliminación de virus y bacterias intracelulares	IL-12, INF- γ , IL-18	T-Bet <i>CCR4⁻ CXCR3⁺ CCR6⁻</i>	IFN- γ , IL-2, TNF- α
Th2	Eliminación de helmintos Activación eosinófilos	IL-4	GATA3 <i>CCR4⁺ CXCR3⁻ CCR6⁻</i>	IL-4, IL-5, IL-13
Th17	Eliminación de bacterias extracelulares y hongos en mucosas	TGF- β , IL-6, IL-23	RORγ <i>CCR4⁺ CXCR3⁻ CCR6⁺</i>	IL-17A, IL-17F, IL22, GM-CSF
Th17.1	Relacionados con autoinmunidad	TGF- β , L-12	RORγ, T-Bet <i>CCR4^{+/-} CXCR3⁺ CCR6⁺</i>	IFN- γ , IL-17
Th9	Respuesta antihelmíntica Relacionados con alergia y asma	TGF- β , L-4	PU.1 <i>CCR4-CCR6+</i>	IL-9, IL-10, IL-21
Th22	Eliminación de patógenos extracelulares en la piel Alergia cutánea	IL-6, TNF- α	Ahr	IL-22
iTreg	Control de la inflamación y mantenimiento de la homeostasis de las mucosas	IL-2, TGF- β	<i>CCR4+CCR6+CCR10+</i> FoxP3	IL-10, TGF- β , PDGF-B
Tfh	Regulan la maduración de afinidad de los linfocitos B dentro de los centros germinales	IL-6, IL21	CD3⁺ CD4⁺ CD25⁺ CD127^{-/low} Bcl-6 <i>CD3, CD4, CXCR5</i>	IL-21, IL-4
T citotóxicos (Tc)	Citotoxicidad por contacto, secreción de citoquinas antivirales y moléculas citotóxicas		CD3, CD8, CD28	TNF- α , IL-17, IL-2 Granzima, perforina

*Marcaadores de línea: factores de transcripción en **negrita**, marcaadores de superficie en *cursiva*

2.1.3.3. Subpoblaciones linfocitarias T

Los linfocitos T se caracterizan por la expresión del marcador de superficie CD3 y del receptor de linfocitos T (TCR), un receptor polimórfico capaz de reconocer péptidos presentados a través del complejo HLA de clase II de las células presentadoras profesionales, este proceso induce la activación y polarización de los linfocitos T. En la mucosa pulmonar, la presentación antigénica tiene lugar principalmente en los ganglios linfáticos, donde los linfocitos T *vírgenes* entran en contacto con células dendríticas mieloides (mDCs).

Los linfocitos Tc se definen por la expresión del marcador CD8 en su superficie, y su principal función es la de inducir la muerte de células tumorales o infectadas por patógenos intracelulares. La muerte celular puede inducirse mediante contacto (a través de Fas/FasL) o mediante la liberación de gránulos citotóxicos. Hoy se sabe que también son capaces de modular la acción de otras células del sistema inmune mediante la secreción de citoquinas. En el pulmón, los linfocitos Tc son esenciales para el control de las infecciones por patógenos intracelulares como el virus de la influenza ⁽³¹⁾ y las micobacterias ⁽³²⁾; aunque también colaboran en el control de bacterias extracelulares ⁽³³⁾.

Los linfocitos Th expresan el marcador CD4. Su relevancia en la inmunidad pulmonar queda patente por la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), donde se produce una profunda depleción de esta población que tiene como consecuencia la aparición de patógenos oportunistas con tropismo pulmonar (*Pneumocystis jiroveci*, micobacterias, *Candida*, *Histoplasma*...). Los linfocitos Th pueden diferenciarse en diferentes subpoblaciones según el microentorno de citoquinas. Durante décadas se creyó que solamente existían dos únicos linajes: los Th1 que promovían la respuesta celular y los Th2 que promovían la respuesta humoral. Se pensaba que el tipo de respuesta inmune dependía principalmente del equilibrio entre estas dos subpoblaciones. Posteriormente, el descubrimiento de otras subpoblaciones como las Th17, Treg, Th9, Th22 y T foliculares (Tfh) ha cambiado este paradigma. Las diferentes subpoblaciones Th se diferencian en su función, en los factores de transcripción y marcadores de superficie que expresan así como en las citoquinas que secretan. A continuación, se hará una breve descripción de cada una de estas subpoblaciones.

Los linfocitos Th vírgenes se diferencian a Th1 por acción de la citoquina IL-12. A nivel fenotípico, se pueden caracterizar por expresar el factor de transcripción Tbet o por presentar en su membrana el receptor de quimiocinas CXCR3 en ausencia de CCR4 y CCR6. Secretan citoquinas vinculadas con la respuesta frente a virus y otros patógenos intracelulares, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y sobre todo el interferón gamma (IFN- γ). Estas citoquinas son esenciales en la respuesta frente a tuberculosis, donde contribuyen a la formación del granuloma mediante la activación de los M ϕ infectados ⁽³⁴⁾⁽³⁵⁾. Los linfocitos Th1 también son esenciales en el control de otras bacterias intracelulares como *Francisella tularensis* ⁽³⁶⁾ y *Chlamydomphila pneumoniae* ⁽³⁷⁾ y extracelulares como *Klebsiella pneumoniae* ⁽³⁸⁾ así como hongos ⁽³⁹⁾. Aunque los principales responsables de la respuesta antiviral son los linfocitos Tc, los Th1 también contribuyen especialmente en la respuesta post-vacunal como ha sido demostrado en el caso de la influenza ⁽⁴⁰⁾⁽⁴¹⁾. El IFN- γ presenta un efecto protector en la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, suprimiendo la proliferación y secreción de colágeno por parte de los fibroblastos ⁽⁴²⁾⁽⁴³⁾.

Los linfocitos Th2 se diferencian por acción de la IL-4, expresan el factor de transcripción GATA3 y el receptor de quimiocinas CCR4 en ausencia de CXCR3 y CCR6. Modulan la acción de los eosinófilos, y secretan citoquinas implicadas en la respuesta humoral y antihelmíntica como la IL-4, IL-5 y IL-13. Además de ser un factor autocrino, la IL-4 induce la proliferación de los linfocitos B activados y su diferenciación a células plasmáticas, también desvía el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas hacia la IgE y la IgG4. La IL-13 presenta funciones redundantes con la IL-4, además, a nivel pulmonar también favorece los mecanismos de barrera mediante la hiperactivación de las vías respiratorias, la metaplasia de las células caliciformes y la secreción de moco. La IL-5 induce la proliferación de linfocitos B y polariza el cambio de isotipo hacia la IgA, también induce la proliferación y activación de eosinófilos. En el síndrome de Löffler, además de modular la acción de los eosinófilos, los linfocitos Th2 son responsables de la reparación del tejido dañado por la migración de las larvas de nemátodos y controlar la inflamación producida por los linfocitos Th17 ⁽⁴⁴⁾. En la respuesta antiviral son responsables del control de las reinfecciones al inducir la síntesis de anticuerpos neutralizantes ⁽⁴⁵⁾⁽⁴⁶⁾. Generalmente, las infecciones virales no inducen una respuesta Th2 importante y en las fúngicas la activación de esta vía puede tener efectos

perjudiciales debido a la competencia con la vía Th1 ⁽⁴⁷⁾. Los linfocitos Th2 también pueden estar implicados en mecanismos patológicos. Al inducir el cambio de isotipo hacia IgE están íntimamente relacionados con los mecanismos de hipersensibilidad tipo 1 (la alergia). Y su acción sobre los eosinófilos puede desencadenar reacciones de hipersensibilidad tipo IVb como el asma y la rinitis alérgica.

Debido a sus funciones en la remodelación del epitelio, las citoquinas IL-4, IL-5 y IL-13 son importantes mediadores en la fibrosis pulmonar. Así, el reconocimiento de IL-4 e IL-13 por receptores específicos localizados en la membrana de los fibroblastos, es capaz de inducir la síntesis de matriz extracelular y su diferenciación en miofibroblastos ⁽⁴⁸⁾⁽⁴⁹⁾. Este efecto puede inhibirse mediante el uso de anticuerpos bloqueantes frente a estas citoquinas ⁽⁵⁰⁾. Por otra parte, en ratones tratados con bleomicina se ha visto que la sobreexpresión de IL-5 induce la secreción de altos niveles de IL-13 y TGF- β y de fibrosis ⁽⁴⁸⁾.

La mayoría de linfocitos Th17 están localizados en la lámina propia de las mucosas, se diferencian por la acción conjunta de las citoquinas TGF- β e IL-6, expresan el factor de transcripción ROR $\gamma\delta$ y los receptores de quimiocinas CCR4 y CCR6 en ausencia de CXCR3. Dirigen la respuesta frente a bacterias extracelulares y hongos especialmente en tejidos en contacto con el medio exterior como las mucosas. Esta subpoblación recibe su nombre por su capacidad para secretar IL-17A y IL-17-F. Estas citoquinas promueven la proliferación y reclutamiento de neutrófilos induciendo la secreción del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y de IL-8 por parte de las células epiteliales y células del sistema inmune innato. La IL-17A también refuerza los mecanismos de barrera, al inducir la expresión del péptido antimicrobiano β -defensina-2 y la liberación de bicarbonato en la superficie apical de las células epiteliales del pulmón ⁽⁵¹⁾⁽⁵²⁾. Otros factores secretados por los Th17 son el factor estimulante de colonias granulocito/macrófago (GM-CSF) y la IL-22.

Los ratones con déficit en el receptor de la IL-17A (IL-17RA) son capaces de combatir la mayoría de infecciones intracelulares incluida *Mycobacterium tuberculosis* ⁽⁵³⁾, pero son sensibles a la infección por diferentes patógenos extracelulares como *Klebsiella pneumoniae* ⁽⁵⁴⁾ y *Staphylococcus aureus* ⁽⁵⁵⁾. Como veremos más adelante, parte de esta IL-17 puede ser secretada por

otras células como las NK, las ILCs y los linfocitos $T\gamma\delta$. Los linfocitos Th17 también son necesarios en la respuesta frente a algunas bacterias Gram negativas como *Mycoplasma pneumoniae* ⁽⁵⁶⁾ y *Francisella tularensis* ⁽⁵⁷⁾. Pese a resultar fundamentales en la respuesta frente a hongos a nivel oral y sistémico ⁽⁵⁸⁾, su papel en la respuesta a nivel pulmonar resulta menos claro ⁽⁵⁹⁾⁽⁶⁰⁾. En las infecciones virales su efecto puede ser deletéreo ⁽⁶¹⁾.

Los Th17 están relacionadas con diferentes patologías pulmonares, incluido el asma no alérgico, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y el cáncer de pulmón de células no pequeñas. En lo que se refiere a la EPID, se ha demostrado su implicación en la fibrosis inducida por bleomicina ⁽⁶²⁾⁽⁶³⁾, la neumonitis por hipersensibilidad ⁽⁶⁴⁾ y la sarcoidosis ⁽⁶⁵⁾. Los linfocitos Th17 presentan un fenotipo menos diferenciado que otras subpoblaciones T, lo que favorece su rápida expansión en respuesta a estímulos y su plasticidad. Hoy se sabe que en respuesta a un microambiente con niveles bajos de TGF- β y altos de IL-12 los linfocitos Th17 pueden secretar IFN- γ ⁽⁶⁶⁾. Estas células que se han denominado Th17.1 presentan un fenotipo híbrido entre las Th1 y las Th17 al expresar los factores de transcripción ROR $\gamma\delta$ y/o Tbet y los receptores de quimiocinas CXCR3 y CCR6, con una expresión de CCR4 variable. Estos linfocitos secretan mayoritariamente IFN- γ junto o no a la IL-17. Estudios recientes demostraron que la mayoría de linfocitos Th17 vinculados con la sarcoidosis son en realidad Th17.1 ⁽⁶⁷⁾⁽⁶⁸⁾ y no es descabellado pensar que esta subpoblación se haya confundido con la Th17 en otros estudios.

Los linfocitos Th9 pueden diferenciarse desde linfocitos T vírgenes o a partir de linfocitos Th2 por la acción conjunta de TGF- β e IL-4, dos citoquinas profibróticas. Expresan el factor de transcripción PU.1 y el receptor de quimiocinas CCR6 en ausencia de CCR4. Al igual que los Th2 están relacionados con la respuesta antihelmíntica y el asma. Reciben su nombre por secretar la citoquina IL-9 aunque también pueden secretar IL-10 e IL-21. La IL-9 es una citoquina con funciones pleiotrópicas entre las que se incluyen: estimular la proliferación de linfocitos T activados, aumentar de la secreción de IgE por parte de los linfocitos B, inducir la proliferación y diferenciación de mastocitos y la secreción de proteasas por parte de estos, aumentar la expresión del receptor de IgE ($Fc_\epsilon R$) y la secreción de IL-6. En el pulmón, junto a los ILC-2, median la inflamación relacionada con el asma ⁽⁶⁹⁾ y la fibrosis quística ⁽⁷⁰⁾. La sobreexpresión de IL-9 reduce el daño epitelial en ratones tratados con

bleomicina ⁽⁷¹⁾, probablemente a través de un mecanismo mediado por prostaglandina E2 (PGE2).

Las células Th22 son linfocitos terminalmente diferenciados que se caracterizan por secretar IL-22 en ausencia de IL-4, IL-17 o IFN- γ . Se diferencian por acción conjunta de IL-6 y TNF- α , expresan el factor de transcripción AhR y en su superficie los receptores de citoquinas CCR4, CCR6 y CCR10. Este último, dirige su migración hacia el epitelio de la piel, por lo que no se trata de una población residente en el pulmón. Sin embargo, otras poblaciones linfocitarias como las Th17, los T $\gamma\delta$, las NK y las ILCs también son capaces de secretar esta citoquina. Su función a nivel pulmonar puede ser ambivalente, principalmente se asocia con el mantenimiento de la integridad de la membrana epitelial y la síntesis de péptidos antimicrobianos como la lipocalina-2 (NGAL) por parte de la mucosa pulmonar ⁽⁵³⁾. Así, en la neumonitis por hipersensibilidad parece ser un factor protector ⁽⁷²⁾. Sin embargo, durante las infecciones virales como la influenza, es capaz de promover la inflamación ⁽⁷³⁾. En la fibrosis inducida por bleomicina, su acción es proinflamatoria durante la fase inicial cuando convive con la IL-17. Sin embargo, en ausencia de esta segunda citoquina, su acción es antiinflamatoria ⁽⁷⁴⁾⁽⁷⁵⁾.

En ausencia de un mecanismo de control, la constante exposición de la superficie pulmonar a antígenos desencadenaría un estado proinflamatorio permanente. Los linfocitos T reguladores son los principales encargados de minimizar esta respuesta incontrolada y permitir la tolerancia frente a antígenos inhalados ⁽⁷⁶⁾. La generación de linfocitos T reguladores inducidos (iTreg) requiere la presentación de antígeno por parte de células presentadoras de antígeno en un ambiente rico en TGF- β e IL-2. Estos linfocitos expresan el factor de transcripción FoxP3, pueden caracterizarse por expresar niveles altos del marcador de superficie CD25 en ausencia de CD127, y secretan citoquinas antiinflamatorias como la IL-10 y el TGF- β . Es a través de estas citoquinas y del contacto célula a célula, como son capaces de frenar los efectos perniciosos desencadenados por otras subpoblaciones linfocitarias con carácter proinflamatorio. Un ejemplo de esto es su capacidad para disminuir la respuesta inflamatoria de tipo Th17 en modelos de estimulación con ovalbúmina⁽⁷⁷⁾. Por contrapartida, también pueden ser explotadas por patógenos como la tuberculosis ⁽⁷⁸⁾.

Cabe recordar que además de sus propiedades antiinflamatorias, el TGF- β es uno de los principales reguladores de la fibrosis. Adicionalmente los linfocitos Treg pueden inducir la proliferación de fibroblastos a través de la secreción de PDGF- β ⁽⁷⁹⁾. Experimentos de depleción de los iTreg mediante un anticuerpo anti-CD25 en un modelo de fibrosis inducida por bleomicina muestran que su efecto durante los estadios iniciales favorece la fibrosis ⁽⁸⁰⁾; sin embargo, en la fase de resolución resultan protectores.

Los linfocitos T foliculares (Tfh) se diferencian por acción conjunta de IL-6 y IL-21, expresan el factor de transcripción Bcl-6 y el receptor de quimiocinas CXCR5 que dirige el “homing” hacia zonas propicias para el desarrollo de centros germinales. Estas células son las responsables de promover la diferenciación de las células mesenquimales en células estromales necesaria para la formación de los centros germinales. Y son necesarios para instruir a los linfocitos B para el cambio de isotipo. Representan por tanto uno de los vínculos entre la respuesta inmune humoral y celular ⁽⁸¹⁾. En el pulmón la formación de centros germinales pueden formarse mediante un mecanismo alternativo, Tfh independiente, mediado por IL-17 ⁽⁸²⁾⁽⁸³⁾.

2.1.3.4. Células linfoides innatas

Como se ha mencionado previamente, las ILCs conectan la respuesta inmune innata y adaptativa. Estos linfocitos carecen de receptores específicos de antígeno, sin embargo, son capaces de responder de forma inmediata a las citoquinas secretadas por células del sistema inmune innato (principalmente DCs y M ϕ s) o por las células epiteliales. La mayoría de ILCs tampoco expresan receptores de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Estos linfocitos son muy minoritarios en la sangre periférica pero relativamente frecuentes en la piel y las mucosas. Existen tres grupos que se definen según el patrón de citoquinas que secretan, cada uno de estos grupos se relaciona con una de las subpoblaciones linfocitarias principales. La **tabla 2** resume los marcadores que definen de las diferentes subpoblaciones linfoides innatas.

La población tipo son los linfocitos NK, que forma el grupo 1, aunque todavía son clasificadas como un grupo aparte por algunos autores. Son los únicos frecuentes en la sangre periférica. Están implicados en la respuesta frente a tumores y células infectadas por microorganismos patógenos intracelulares, por lo que comparten su función con los linfocitos Tc. Realizan esta función a través de la secreción de IFN- γ y proteasas y mediante la citotoxicidad por

contacto. Los otros componentes de este grupo son los ILC1, implicados en la respuesta contra patógenos intracelulares que secretan citoquinas de tipo Th1.

El grupo 2 está formado exclusivamente por las ILC2. Estos linfocitos secretan citoquinas de tipo Th2 o Th9, y se relacionan con la respuesta antihelmíntica y la alergia. También se relacionan con el asma ⁽⁶⁹⁾⁽⁸⁴⁾⁽⁸⁵⁾.

El grupo 3 está formado por las células inductoras del tejido linfoide (LTi) y las ILC3 ambas implicadas en el mantenimiento de la homeostasis en los epitelios. Las ILC3 presentan un fenotipo heterogéneo, en humanos se pueden diferenciar dos grupos principales atendiendo al patrón de secreción de citoquinas que puede ser de tipo Th17 o Th22.

Otros linfocitos con características de la respuesta innata son los $\gamma\delta$ y los iNKT. A diferencia de los linfocitos T convencionales que expresan las cadenas α y β del TCR y reconocen péptidos procesados; los linfocitos $\gamma\delta$ son capaces de reconocer antígenos no procesados como los que sobreexpresan las células epiteliales bajo condiciones de estrés, en respuesta a estos estímulos son capaces de secretar citoquinas de tipo Th17. También están implicadas en la respuesta frente a bacterias y virus. Igual que los ILCs, se trata de una población muy minoritaria en sangre periférica, pero sobrerrepresentada en mucosas. En modelos de neumonitis por hipersensibilidad inducida por exposición repetida a *Bacillus subtilis*, se ha demostrado su acumulación en el parénquima pulmonar y la inhibición de la fibrosis mediada por la secreción de IL-22 ^{(72) (86)}.

Los linfocitos NKT son un grupo heterogéneo de linfocitos T que comparten marcadores y propiedades de linfocitos T y NK. Los NKT invariantes (iNKT) presentan un TCR con diversidad limitada (TCR invariante) capaz de reconocer lípidos y glicolípidos presentados a través de CD1d, una molécula no polimórfica relacionada con el HLA. Esto les permite reconocer los glicolípidos de la pared celular de *M. tuberculosis* ⁽⁸⁷⁾. Durante las infecciones virales protegen del daño epitelial mediante la liberación de IL-22 ⁽⁸⁸⁾. También pueden controlar la fibrosis inducida por bleomicina mediante la secreción de grandes cantidades de IFN- γ y modulando la síntesis de TGF- β ⁽⁸⁹⁾.

TABLA 2: Subpoblaciones linfocitarias (respuesta innata)

ILCs	Función	Factores de diferenciación	Marcadores de línea*	Factores secretados
Grupo 1 NK	Respuesta frente a células tumorales y patógenos intracelulares		T-bet CD3 ⁺ , CD16/56 ⁺	INF- γ , granzima, perforina
ILC1	Respuesta frente a virus bacterias y parásitos		T-bet	IFN- γ , TNF- α
Grupo 2 ILC2	Respuesta antihelmíntica Relacionados con la alergia y el asma	IL-7 IL-25, IL-33	GATA3 <i>ST2</i>	IL-5, IL-13, IL-4, IL-9
Grupo 3 I _L i	Homeostasis intestinal		RORγ <i>CCR6</i> ⁺	IL-17A, IL-22, TNF α , TNF β
ILC3	Respuesta antibacteriana, homeostasis epitelial		RORγ <i>CCR6</i> ⁻	IL-17 y INF- γ ó IL-22
Otras subpoblaciones				
iNKT	Respuesta antibacteriana y antiviral temprana Reparación del epitelio pulmonar		CD3 ⁺ , CD16/56 ⁺ CD1d	IFN- γ , IL-22
T γ δ	Respuesta antibacteriana temprana		CD3, TCR γ δ	IFN- γ , TNF- α , IL-17

*Marcadores de línea: factores de transcripción en **negrita**, marcadores de superficie en *cursiva*

2.1.3.5. Células B y anticuerpos

Sorprendentemente, pese a que la inmunoglobulina mayoritaria en sangre es la IgG, la síntesis diaria de IgA es muy superior a la de ésta. Esta aparente incoherencia se explica porque en sangre la IgA se encuentra en forma monomérica (IgAm) y tiene una semivida ocho veces menor a la de la IgG. La mayor parte de la IgA se encuentra en la luz de las mucosas en forma de dímero. A este dímero se le denomina IgA polimérica (pIgA). La relevancia de la pIgA en el sistema respiratorio queda patente en el déficit selectivo de IgA, la inmunodeficiencia primaria con mayor prevalencia en la población general, del 0.125-0.2% ⁽¹⁰⁾. Aunque la mayoría de los portadores son sanos, este déficit se asocia con un aumento en la prevalencia de atopía, con enfermedades autoinmunes y con la aparición de infecciones recurrentes por bacterias extracelulares encapsuladas. Éstas infecciones afectan mayoritariamente al sistema respiratorio y solo ocasionalmente al sistema digestivo ⁽⁹⁰⁾.

Los linfocitos B inmaduros llegan al pulmón a través de las vénulas de endotelio alto. Tras entrar en contacto con los antígenos y con células T en áreas extrafoliculares, estos linfocitos B migran a los centros germinales donde experimentarán procesos de hipermutación somática y cambio de isotipo ⁽¹⁰⁾. Recordemos que en el pulmón la formación de centros germinales puede estar mediada por los linfocitos Tfh o por los Th17 ⁽⁸²⁾⁽⁸³⁾. Los linfocitos Th17 también pueden inducir el reclutamiento de linfocitos B al pulmón y la expresión de pIgR ⁽⁸³⁾. El pIgR que se localiza en la membrana apical de las células epiteliales es capaz de unir tanto la pIgA como la IgM polimérica (pIgM). Una vez unidos los anticuerpos son transportados al lumen mediante transcitosis. En el momento de la liberación, el pIgR se separa de la pIgA dejando un fragmento llamado componente secretor que permanece unido a la inmunoglobulina. Al conjunto de pIgA y componente secretor se le denomina IgA secretora (sIgA), la unión al componente secretor confiere a la sIgA resistencia a la acción de las proteasas bacterianas. Además de la IgA e IgM secretoras (sIgA, sIgM), también es posible encontrar en el lumen pequeñas concentraciones de mIgA, IgG, IgD e IgE, esta última solamente en pacientes atópicos ⁽¹⁰⁾. Estas inmunoglobulinas alcanzan el lumen mediante difusión pasiva a través de las uniones estrechas.

La sIgA es fundamental en la inmunología de los epitelios y especialmente en el pulmón: forma parte de la capa protectora de moco contribuyendo a los

mecanismos de exclusión, neutralizando a los virus ⁽⁹¹⁾ e inhibiendo la adhesión de las bacterias ⁽⁹²⁾; inicia la respuesta de MØs alveolares, DCs, neutrófilos y eosinófilos mediante opsonización y formación de inmunocomplejos ⁽⁹³⁾⁽⁹⁴⁾⁽⁹⁵⁾; pero también mantiene la inmunotolerancia disminuyendo el estallido oxidativo y la liberación de citoquinas proinflamatorias como el TNF- α y la IL-6 por parte de los monocitos ⁽⁹⁶⁾. Para poder contribuir a estas funciones, la sIgA presenta varias peculiaridades que la diferencian del resto de inmunoglobulinas. Para empezar, su estructura dimérica le confiere unas características a medio camino entre la fácil difusión de la IgG (monomérica) y la elevadísima capacidad de entrecruzamientos de la IgM (pentamérica). La sIgA es incapaz de activar la vía clásica del complemento ⁽⁹⁷⁾, lo que evita un estado de inflamación permanente en un entorno permanentemente colonizado por bacterias. Su especificidad es más amplia que la de la IgG e IgA sanguíneas, el alto porcentaje de inmunoglobulinas polireactivas permite una rápida respuesta frente a múltiples infecciones ⁽⁹⁸⁾⁽⁹⁹⁾. Existen dos isotipos diferentes de la IgA, IgA₁ e IgA₂. Mientras que en sangre el isotipo mayoritario es el IgA₁, en la mucosa es mayoritario el IgA₂. Este isotipo presenta una mayor resistencia a la acción de proteasas bacterianas que el IgA₁. Este efecto protector que sinergiza con la unión al componente secretor maximiza la vida media de esta inmunoglobulina.

En la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) se ha demostrado un aumento de la expresión de IgA en los folículos linfoides pulmonares ⁽¹⁰⁰⁾. Sin embargo estos pacientes parecen presentar alteraciones en los mecanismos de transporte, como se desprende de los bajos niveles del componente secretor y pIgR en lavado broncoalveolar (LBA) ^{(101) (102)}. La disminución de la sIgA en el lumen de la mucosa puede debilitar los mecanismos de exclusión bacteriana, permitiendo la colonización y el desarrollo de inflamación crónica. Diferencias en esta vía podrían explicar la evolución desigual de los pacientes de EPOC. Hasta donde conocemos, no hay ningún trabajo que haya estudiado la secreción de IgA en pacientes con EPID.

2.1.4. Ellos y nosotros: el papel del microbioma.

El microambiente del pulmón es nutricionalmente muy pobre, y con una carga bacteriana inferior a las 10 copias/mL, el pulmón se considera un órgano estéril. Sin embargo, el papel del microbioma es fundamental en el mantenimiento de la homeostasis inmunológica del epitelio pulmonar. Tanto los leucocitos residentes como las células epiteliales del pulmón expresan

receptores para PAMPs capaces de desencadenar respuestas tanto proinflamatorias como antiinflamatorias ⁽¹⁰³⁾. Y en ratones libres de gérmenes, la mucosa pulmonar está prácticamente vacía de IgA ⁽¹¹⁾. En individuos sanos, la composición bacteriana de la orofaringe, el árbol bronquial y la superficie alveolar es cualitativamente similar. El microambiente del pulmón es nutricionalmente muy pobre pero rico en agentes bacteriostáticos, por lo que en condiciones fisiológicas el crecimiento bacteriano dentro de las vías respiratorias bajas es mínimo, si no inexistente. La composición bacteriana es estable como resultado de un proceso de colonización mediante la aspiración de secreciones orofaríngeas durante el sueño ⁽¹⁰⁴⁾ y su eliminación por el moco y las vellosidades. Los géneros más representados son *Veillonella*, *Streptococcus* (filo *Firmicutes*) y *Prevotella* (filo *Bacteroidetes*) con una contribución mínima de Proteobacterias patogénicas como *Haemophilus* ⁽¹⁰⁵⁾.

En cambio, bajo situaciones patológicas como el asma, la EPOC, la fibrosis quística o la EPID se producen cambios cuantitativos y cualitativos (disbiosis) en la composición de la microbiota respiratoria. Los cambios más frecuentes incluyen una pérdida de la diversidad, y la sobrerrepresentación de patógenos principalmente del filo Proteobacteria (*Haemophilus*, *Pseudomonas*) ⁽¹⁰⁶⁾⁽¹⁰⁷⁾. La exposición a una carga y diversidad bacteriana elevadas durante la infancia es un factor protector en el desarrollo del asma ⁽¹⁰⁸⁾. Sin embargo, la aparición de ciertas especies patológicas se asocia con el desarrollo de esta enfermedad ⁽¹⁰⁹⁾. Los pacientes asmáticos adultos, incluso si están clínicamente asintomáticos y sin tratamiento, presentan un aumento en la diversidad y enriquecimiento de las proteobacterias patológicas, principalmente *Haemophilus* ⁽¹⁰⁶⁾. En la EPOC la disbiosis solo aparece en los pacientes con afectación grave ^{(110) (111)}, en estos pacientes los géneros más comunes son *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Prevotella* y *Haemophilus* ⁽¹⁰⁷⁾. La colonización pulmonar por bacterias patógenas es la principal causa de las exacerbaciones ⁽¹¹²⁾, y parece estar relacionada con el mecanismo etiopatológico ya que se asocia a un aumento de los marcadores de inflamación independiente del consumo de tabaco ⁽¹¹³⁾.

En la fibrosis quística existe una importante disbiosis tanto durante las fases clínicamente estables como en las exacerbaciones. De nuevo los patógenos implicados (*Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Moraxella*) pertenecen al filo proteobacteria ⁽¹⁰⁷⁾.

El papel de las infecciones virales como promotor e intensificador de la fibrosis pulmonar es bien conocido ⁽¹¹⁴⁾. Un mecanismo que explica este fenómeno tiene que ver con la intensa alteración que provocan en el epitelio pulmonar, que induce la secreción de TGF- β por parte de los M ϕ s alveolares⁽¹¹⁴⁾. A diferencia de los virus, tradicionalmente se había considerado que la flora bacteriana no estaba implicada en la patogénesis de la EPID, sin embargo, estudios recientes demuestran su relevancia en la fibrosis pulmonar idiopática (FPI). Un estudio demostró un aumento de la mortalidad en pacientes con FPI tratados con inmunosupresores ⁽¹¹⁵⁾. Además un ensayo con cotrimoxazol demostró mejoras en el grado de disnea, las escalas de calidad de vida e incluso en la mortalidad independiente de la causa ⁽¹¹⁶⁾. Desafortunadamente, este antibiótico no es tolerado por la mayoría de pacientes y el efecto también podría deberse a sus propiedades antiinflamatorias.

A diferencia de lo observado en asma, EPOC y fibrosis quística, en FPI se ve un decremento del filo Proteobacteria y un aumento del filo Firmicutes. Un estudio relacionó el aumento de los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus* con la progresión de la enfermedad ⁽¹¹⁷⁾. Otro trabajo más reciente observa también una pérdida de la diversidad, disminución de filo Proteobacteria y aumento del filo Firmicutes, en este caso los géneros relacionados fueron *Streptococcus* y *Veillonella* ⁽¹¹⁸⁾. Este mismo trabajo reproduce estos resultados en un modelo de fibrosis inducida por bleomicina ⁽¹¹⁸⁾. Un tercer estudio relaciona la carga bacteriana total con la evolución. También encuentra un aumento de Veillonella y Steptococcus además de otras bacterias de los filos Bacteroidetes (*Prevotella*) y Proteobacteria (*Neissera*), pero no encuentra relación entre el aumento de ninguno de estos y la evolución clínica ⁽¹¹⁹⁾.

La pregunta sobre si es la enfermedad pulmonar crónica la que modifica el microbioma o si son los cambios en el microbioma los que favorecen el desarrollo de enfermedad pulmonar está pendiente de dilucidar.

2.2 Enfermedad pulmonar intersticial

2.2.1 Definición y epidemiología

2.2.2 Neumonías intersticiales de causas conocidas o primarias

2.2.3 neumonías intersticiales idiopáticas (NII)

2.1.4 Neumonías intersticiales idiopáticas de causa autoinmune

2.2. Enfermedad pulmonar intersticial difusa

2.2.1. Definición y epidemiología

El término enfermedad pulmonar intersticial difusa (EPID) engloba un grupo heterogéneo de enfermedades con más de 150 causas conocidas que se caracterizan histológicamente por la presencia de inflamación o fibrosis del intersticio pulmonar. La incidencia anual en España es de 7.6 casos por 100.000 habitantes ⁽¹²⁰⁾. Su clasificación puede realizarse atendiendo a criterios clínicos, radiológicos o histológicos. Basándonos en su etiología podemos distinguir tres grupos: las de causa conocida, las primarias o asociadas a enfermedades no bien definidas y las neumonías intersticiales idiopáticas (NII).

2.2.2. Neumonías intersticiales de causas conocidas y primarias.

Dentro de las neumonías intersticiales de causa conocida (**tabla 3**) se encuentran las que son provocadas por el contacto con polvos orgánicos (neumonitis por hipersensibilidad - NH): como por ejemplo, el pulmón del granjero o del cuidador de aves, o inorgánicos (neumoconiosis) como la silicosis, la asbestosis y la beriliosis; las inducidas por fármacos, radioterapia y las asociadas a enfermedad del tejido conectivo (ETC). El grupo de las primarias aglutina una serie heterogénea de enfermedades, de las cuales la sarcoidosis es la más prevalente.

Tabla 3. Clasificación de la EPID de causa conocida

De causa conocida o asociada a entidades bien definidas

Asociadas a enfermedad del tejido conectivo
Producidas por polvos inorgánicos (neumoconiosis)
Producidas por fármacos o radioterapia
Causadas por polvos inorgánicos: neumonitis por hipersensibilidad (NH)
Neumonía intersticial familiar

Primarias o asociadas a otros procesos no bien definidos

Sarcoidosis
Histiocitosis de células de Langerhans
Microlitiasis alveolar
Linfangioleiomiomatosis
Eosinofiliias pulmonares
Proteinosis alveolar
Amiloidosis

*Adaptado de: Xaubet A, Ancochea J, Morell F, Rodriguez-Arias JM, Villena V, Blanquer R, et al. **ref 120**

2.2.3. Neumonías intersticiales idiopáticas (NII)

Según los criterios de consenso establecidos por la American Thoracic Society (ATS) y la European Respiratory Society (ERS) en 2013 ⁽¹²¹⁾, las NII pueden clasificarse en 5 grupos y 8 entidades diferentes (**tabla 4**). La principal modificación introducida respecto a los criterios anteriores es la aceptación de la neumonía intersticial no específica (NINE) como una entidad diferenciada de la neumonía intersticial usual (NIU), este cambio en la definición resulta relevante porque altera la forma de interpretar las publicaciones más antiguas. Según el libro blanco de la ERS ⁽¹²²⁾ la entidad más frecuente dentro de este grupo es la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) que representa un 55% del total de casos de NII, seguida de la NINE (25%), la bronquiolitis respiratoria asociada a enfermedad intersticial pulmonar (BR-EPID) (10%), la neumonía intersticial descamativa (NID) (5%), la neumonía organizada criptogénica (NOC) (3%), la neumonía intersticial linfocitaria (NIL) (1%) y la neumonía intersticial aguda (NIA) (1%).

A continuación, se hará una descripción de las principales características y diferencias entre las distintas entidades. Al final de esta sección, la **tablas 6 y 7** resumen los principales hallazgos radiológicos y anatomopatológicos encontrados en cada entidad.

Tabla 4. Neumonías intersticiales idiopáticas

Categoría	Diagnóstico clínico/radio/patológico	Patrón radiológico o morfológico
Neumonía intersticial Crónica fibrosante	Fibrosis pulmonar idiopática (FPI) Neumonía intersticial idiopática no específica (NINE idiopática)	Neumonía intersticial usual (NIU) Neumonía intersticial no específica (NINE)
Neumonías intersticiales relacionadas con el Tabaco	Neumonía intersticial descamativa (NID) Bronquiolitis respiratoria asociada a enfermedad intersticial pulmonar (BR-EPID)	Neumonía intersticial descamativa (NID) Bronquiolitis respiratoria (BR)
Neumonías intersticiales agudas o subagudas	Neumonía organizada criptogénica (NOC) Neumonía intersticial aguda (NIA)	Neumonía organizada (NO) Daño alveolar difuso
Neumonías intersticiales idiopáticas infrecuentes	Neumonía intersticial linfocítica idiopática (NIL) Fibroelastosis pleuroparenquimatosa idiopática (FEPP)	
Neumonías intersticiales idiopáticas inclasificables		

Adaptado de: Raghu G, Remy-Jardin M, Myers JL, Richeldi L, Ryerson CJ, Lederer DJ, et al. **Ref 238**

2.2.3.1. Neumonías intersticiales crónicas fibrosantes

La NIU, es el sustrato anatomopatológico de la FPI y representa el 25%-50% de casos de las NII. Afecta principalmente a pacientes entre la quinta y séptima década de edad y es más frecuente en varones. Las manifestaciones clínicas consisten en disnea progresiva, tos seca y fatiga. En la exploración del pulmón,

la auscultación denota presencia de crepitantes inspiratorios en velcro. Aunque históricamente se ha asociado a un mal pronóstico con una mortalidad a los cinco años del diagnóstico del 43% ⁽¹²⁴⁾, el uso de fármacos antifibróticos como la pirfenidona y el nintedanib ha mejorado de manera radical la esperanza de vida ⁽¹²⁰⁾⁽¹²⁵⁾⁽¹²⁶⁾⁽¹²⁷⁾⁽¹²⁸⁾. Los hallazgos histológicos consisten en áreas fibróticas temporalmente heterogéneas, entremezcladas con otras de parénquima normal, mínimo componente inflamatorio y zonas de panalización. La tomografía axial computarizada de alta definición (TCAR) evidencia opacidades pulmonares reticulares basales bilaterales de localización subpleural, con panalización y bronquiectasias de tracción. El hallazgo de un patrón de vidrio deslustrado es atípico en la NIU. La neumonitis por hipersensibilidad crónica y la sarcoidosis de estadio IV pueden presentar un patrón de NIU en ocasiones.

La presentación clínica de la NINE es similar a la de la NIU, pero a diferencia de esta la respuesta al tratamiento con glucocorticoides o ciclofosfamida es buena ⁽¹²⁹⁾. Pese a esto, el pronóstico es variable: algunos pacientes mejoran su función respiratoria, otros permanecen estables y otros evolucionan hasta insuficiencia respiratoria y muerte ⁽¹²⁹⁾⁽¹³⁰⁾. Histológicamente, se puede diferenciar una fase celular (inflamatoria) y otra fibrótica, esta segunda tiene características en común con la NIU. Histológicamente es temporalmente y espacialmente homogénea, los focos fibroblásticos y la panalización son raros. Típicamente, la TCAR muestra un patrón en vidrio deslustrado de localización periférica y perivascular en la zona media y basal de ambos pulmones. Estos hallazgos pueden revertir completamente tras el tratamiento con glucocorticoides. A medida que progresa la fibrosis comienza a detectarse panalización y bronquiectasias. El patrón de NINE puede ser tanto idiopático como secundario a diferentes procesos, incluidos ETCs, fármacos o neumonitis por hipersensibilidad.

En el caso de que en diferentes piezas quirúrgicas de un paciente coexistan patrones de NIU y NINE, el pronóstico y por tanto la actitud terapéutica ha de ser la de la NIU. Tanto la NIU como la NINE pueden presentar una forma aguda o acelerada. Clínicamente se caracteriza por la instauración de un fallo respiratorio agudo con infiltrados pulmonares difusos. La TCAR y la histología muestran un patrón de daño alveolar difuso (DAD). Estas exacerbaciones también se han descrito en la NINE asociada a ETCs ⁽¹³¹⁾⁽¹³²⁾.

2.2.3.2. Neumonías intersticiales relacionadas con el tabaquismo

La NID y la BR-EPID son enfermedades vinculadas al tabaquismo y relacionadas con otros diagnósticos como la histiocitosis pulmonar por células de Langerhans (HPCL). Ambas afectan a pacientes más jóvenes que la FPI y presentan un buen pronóstico. En ambas entidades, la TCAR muestra un patrón en vidrio deslustrado producido por la ocupación alveolar difusa por macrófagos. En el estudio histológico o en la citología del LBA estos macrófagos aparecen pigmentados.

En la NID la distribución es simétrica y basal y viene acompañada de una fibrosis septal discreta, la existencia de opacidades lineares y reticular es frecuente pero su extensión es limitada. También es frecuente la existencia de zonas de enfisema, la panalización es excepcional. En un pequeño porcentaje de pacientes, la NID puede presentarse sin una exposición previa al tabaco.

La bronquiolitis respiratoria es un hallazgo común en fumadores que probablemente representa una adaptación fisiológica a la agresión provocada por el tabaco, el 90% de los casos son asintomáticos y solo en un pequeño porcentaje la enfermedad simula una enfermedad intersticial (BR-EPID). En estos casos, la TCAR muestra áreas multifocales en vidrio deslustrado, pequeños nódulos centrolobulillares mal definidos y enfisema. No existe panalización ni bronquiectasias de tracción. Histológicamente NID y la BR-EPID solo pueden diferenciarse por la distribución bronquiolocéntrica de los macrófagos en la BR-EPID. Además de otras enfermedades relacionadas con el tabaquismo, el diagnóstico diferencial debe excluir la neumonitis por hipersensibilidad.

2.2.3.3. Neumonías intersticiales agudas o subagudas

La NO, previamente denominada bronquiolitis obliterante con neumonía organizada (BONO), puede ser idiopática (neumonía organizada criptogénica - NOC) o secundaria a conectivopatías, infecciones, fármacos o episodios de aspiración. Clínicamente, se caracteriza por la aparición de un cuadro agudo pseudogripal con tos seca, disnea y fiebre. Generalmente, la respuesta al tratamiento con glucocorticoides es buena. La histología muestra tejido de granulación en los bronquiolos, ductos alveolares y espacios alveolares adyacentes. La TCAR muestra condensaciones o zonas en vidrio deslustrado de distribución parcheada y bilateral, nódulos centrolobulillares mal definidos y

signo del halo inverso (opacidades redondeadas con densidad en vidrio deslustrado rodeadas por áreas de mayor densidad).

La neumonía intersticial aguda (NIA) se caracteriza por un desarrollo rápido (menos de una semana) de infiltrados pulmonares difusos acompañado de disnea e hipoxemia. Su mortalidad es superior al 50% y no existe tratamiento probado. Sin embargo, los pacientes supervivientes suelen presentar un buen pronóstico a largo plazo. Los hallazgos histológicos son los de un daño alveolar difuso (DAD) e indistinguibles de los ocasionados por el síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), el diagnóstico de NIA debe considerarse cuando estos hallazgos se den en ausencia de factores de riesgo desencadenantes del SDRA. En la fase inicial se da un engrosamiento de las paredes alveolares debido a la presencia de edema e inflamación, ocupación de los espacios alveolares por un exudado proteico y formación de membranas hialinas. Posteriormente, aparecen cambios proliferativos a nivel bronquial y alveolar. La TCAR muestra áreas multifocales de consolidación que tienden a la coalescencia y progresan hacia un patrón alveolar difuso, finalmente aparecen signos de fibrosis pulmonar: distorsión de la arquitectura del parénquima pulmonar, bronquiectasias de tracción y panalización.

2.2.3.4. Neumonías intersticiales idiopáticas infrecuentes

La neumonía intersticial linfocitaria (NIL) y la fibroelastosis pleuroparenquimatosa (FEPP) son dos entidades infrecuentes. La NIL se caracteriza por la infiltración difusa de linfocitos policlonales. Los síntomas clínicos son disnea, dolor torácico y tos seca. La TCAR muestra áreas multifocales bilaterales de vidrio deslustrado con predominio en los lóbulos inferiores, nódulos centrolobulillares mal definidos y quistes.

La FEPP presenta un patrón de fibrosis pulmonar diferente, caracterizado por la proliferación rápidamente progresiva de fibras elásticas situadas en el margen entre la zona pleuroparenquimatosa fibrótica y el tejido pulmonar subyacente. Los focos fibróticos son escasos, la fibrosis intersticial es moderada y no existe panalización pero si infiltración linfocitaria. La mayoría de casos de FEPP se relacionan con el trasplante de progenitores hematopoyéticos o pulmonar, también puede asociarse a fármacos quimioterapéuticos.

2.2.4. Neumonías intersticiales idiopáticas de causa autoinmune

Se estima que las ETCs son la causa subyacente de un 15% de los casos de EPID (133). Los diagnósticos asociados son la artritis reumatoide (AR), el lupus eritematoso sistémico (LES), el síndrome de Sjögren primario (SSp), la esclerosis sistémica (ES), la poli-dermatomiositis (PM-DM) y la enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC). Un porcentaje significativo de los pacientes presentaran manifestaciones compatibles con la presencia de ETC, pero sin cumplir la totalidad de criterios necesarios para ser catalogado dentro de ninguno de estos. En muchos de estos pacientes la EPID es la primera manifestación de ETCs (134). Así, entre el 10% y el 33% de los pacientes con NINE idiopática acabarán desarrollando una ETC, generalmente durante los dos años posteriores al debut (135)(131). Además, la NINE asociada a ETCs puede presentar exacerbaciones agudas (130)(134). Todo esto justifica la necesidad de buscar biomarcadores que permitan definir el origen autoinmune en el debut. La EPID asociada a ETCs afecta a pacientes más jóvenes y suele presentar patrones radiológicos de NINE, aunque otros patrones como NIU, NO y NIL también son posibles (tabla 5). La excepción a esto es la AR donde el patrón más frecuente es el de NIU (136). Otras manifestaciones pulmonares frecuentes en los pacientes con ETCS son daño alveolar difuso (DAD) y la hipertensión arterial pulmonar (HAP).

Tabla 5. Hallazgos de TCAR característicos de NII

	AR	SSC	PM/DM	SS	EMTC	LES
NINE	+	+++	+++	++	++	++
NIU	+++	+	+	+	+	+
NO	++	+	+++	+	+	+
NIL	+	-	-	+++	-	+
NH	+	++	-	+	+	+
Bronquioectasias	++	-	-	++	-	-
Bronquiolitis obliterante	++	+	-	-	-	-

El número de '+' indica la frecuencia del patrón: +++ = muy común, manifestación mayoritaria, += poco común, - = raro o no descrito

Adaptado de Gutsche M, Rosen GD, Swigris JJ. ref 136

Tradicionalmente, se ha considerado una mejor respuesta al tratamiento que en la FPI (136). Sin embargo, el uso de antifibróticos en la FPI está cambiando este paradigma (137). No obstante, es conocido que en algunas de estas entidades, especialmente en la AR y la SSc, la EPID es una de las principales causas de morbilidad (138)(139)(140).

Tabla 6. Hallazgos radiológicos característicos en la NII

Neumonía intersticial usual (NIU)	<p>Panalización</p> <p>Bronquiectasias de tracción</p> <p>Distribución subpleural y basal</p> <p>Escasa presencia de densidad en "vidrio deslustrado"</p>
Neumonía intersticial no específica (NINE)	<p>Densidad en "vidrio deslustrado"</p> <p>Mínima fibrosis, bronquiectasias de tracción y reticulación</p> <p>Panalización mínima o inexistente</p> <p>Predominio subpleural y basal</p> <p>Respeto de la zoan inmediatamente subpleural</p>
Neumonía intersticial descamativa (NID)	<p>Densidad en "vidrio deslustrado"</p> <p>Mínima fibrosis, bronquiectasias de tracción y reticulación</p> <p>Predominio subpleural y basal</p>
Bronquiolitis respiratoria asociada a enfermedad intersticial (BR-EIP)	<p>Zonas multifocales de "vidrio deslustrado"</p> <p>Nódulos centrolobulillares "mal definidos"</p>
Neumonía organizada (NO)	<p>Condensaciones o zonas de "vidrio deslustrado" de distribución parcheada</p> <p>Signo del halo inverso</p> <p>Fibrosis, generalmente discreta</p>
Neumonía intersticial linfocitaria (NIL)	<p>Zonas multifocales de "vidrio deslustrado"</p> <p>Nódulos centrolobulillares "mal definidos"</p> <p>Quistes</p>

Tomada de Franquet T. Monogr Arch Bronconeumol. 2015;2(1):7-16 ref 123

Tabla 7. Hallazgos histológicos característicos de la NII

Fibrosis pulmonar idiopática (FPI)	Áreas fibróticas temporalmente heterogéneas, entremezcladas con otras de parénquima normal Mínimo componente inflamatorio Panalización
Neumonía intersticial idiopática no específica (NINE idiopática) Forma celular	Temporalmente y espacialmente homogénea Los focos fibroblásticos y la panalización son raros Panalización minina o inexistente
Neumonía intersticial descamativa (NID)	Macrófagos pigmentados, Distribución simétrica y basal Fibrosis septal Zonas de enfisema Panalización excepcional
Bronquiolitis respiratoria asociada a enfermedad intersticial pulmonar (BR-EIP)	Macrófagos pigmentados, Distribución bronquiocéntrica Zonas de enfisema No panalización
Neumonía organizada criptogénica (NOC) Neumonía intersticial aguda (NIA)	Tejido de granulación en los bronquiolos, ductos alveolares y espacios alveolares adyacentes Daño alveolar difuso (DAD), indistinguible de SDRA Ocupación de los espacios alveolares por un exudado proteico Formación de membranas hialinas Cambios proliferativos a nivel bronquial y alveolar
Neumonía intersticial linfocítica idiopática (NIL) Fibrosis pulmonar pleuroparenquimatosa idiopática (FEPP)	Infiltración difusa de linfocitos policlonales Proliferación rápidamente progresiva de fibras elásticas Infiltración linfocitaria Fibrosis moderada No panalización

* Edición propia a partir de datos tomados de Franquet T. Monogr Arch Bronconeumol. 2015;2(1):7–16 ref 123

2.2.4.1. Esclerosis sistémica (SSc)

La SSc es la ETC donde mayor porcentaje pacientes acabarán desarrollando EPID, hasta el 53% de los pacientes con la forma difusa y el 35% con la forma limitada (ISSc) presentaran esta complicación ⁽¹⁴¹⁾. La introducción de los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) ha reducido drásticamente la mortalidad vinculada a la crisis renal esclerodérmica, por lo que actualmente la EPID se ha convertido en la principal causa de mortalidad en SSc, seguida de cerca por la HAP⁽¹⁴⁰⁾. La supervivencia media es de 5-8 años ⁽¹⁴²⁾, con grandes diferencias entre la forma limitada (90% a los 5 años) y difusa (dSSc) (37% a los 5 años)⁽¹⁴³⁾. En ocasiones la afectación pulmonar puede ocurrir en ausencia de la cutánea (esclerodermia sine esclerodermia) ⁽¹⁴⁴⁾. Estos pacientes presentan un peor pronóstico⁽¹⁴¹⁾.

Numerosos estudios apuntan a que la diferencia en la prevalencia entre las distintas formas clínicas puede explicarse por la presencia de autoanticuerpos específicos asociados con cada uno de ellos ⁽¹⁴⁵⁾⁽¹⁴⁶⁾⁽¹⁴⁷⁾. La presencia anticuerpos anti-topoisomerasa (SCL-70) están fuertemente asociada con la forma difusa y la aparición de EPID. En cambio, la aparición de anticuerpos anti-centrómero, característicos de la ISSc y más concretamente del síndrome de CREST, se considera un factor de protección frente a la EPID, pero de riesgo de HAP. Finalmente, los anticuerpos anti-RNA polimerasa-III (RNAPol) se asocian a formas limitadas con escasa afectación pulmonar ⁽¹⁴⁸⁾⁽¹⁴⁹⁾.

Ni el patrón clínico, ni el histopatológico ni la presencia de autoanticuerpos son buenos predictores de progresión. Los principales predictores de mal pronóstico están relacionados con el grado de afectación pulmonar, así el descenso de la difusión alveolar del monóxido de carbono (DL_{CO}) es el principal predictor de mal pronóstico ⁽¹⁴³⁾. Una disminución temprana de la capacidad vital forzada (FVC) también se ha considerado como un predictor de rápida evolución a estadios finales. El riesgo de progresión es mayor durante los cuatro primeros años después del inicio de la enfermedad, especialmente durante los dos primeros ⁽¹⁴¹⁾⁽¹⁴³⁾. Se ha desarrollado un sistema de estadificación basado en la TCAR y la FVC ⁽¹⁴²⁾. Según este algoritmo, los pacientes que presenten una afectación claramente superior al 20% mediante TCAR deberán recibir inmunosupresión; en los pacientes donde la afectación esté en torno al 20% se valorará si ha habido descensos superiores al 70% en el FVC antes de iniciar el tratamiento.

Otros moléculas propuestas como biomarcadores de mal pronóstico son el aumento de la concentración sérica de la proteína de Krebs von den Lungen-6 (KL-6), tenascina-C, quitinasa y lisil oxidasa, así como de diferentes quimiocinas y citoquinas (CCL18, CXCL4, IL-6, IL-33) ⁽¹⁴²⁾⁽¹⁴⁵⁾. En el apartado sobre herramientas diagnósticas, se discutirán en detalle estos marcadores.

La SSc es la ETC donde mejor se ha estudiado el mecanismo etiopatogénico de la fibrosis pulmonar, y puede utilizarse como modelo para las demás. El proceso que desemboca en la fibrosis se inicia con el daño crónico del epitelio alveolar, producido por infecciones, procesos isquémicos, microaspiración de ácido gástrico o alteraciones mecánicas. En respuesta a estos ataques las células epiteliales alveolares y las células del sistema inmune sufrirán cambios en su fenotipo y secretarán citoquinas, quimiocinas, factores de crecimiento y otras moléculas que inducirán un ambiente profibrótico. Además de la activación y proliferación de los fibroblastos residentes y de su transición a miofibroblastos, a consecuencia de un aumento en la secreción de CXCL12 se reclutarán células de origen mesenquimal desde tejidos periféricos como la médula ósea ⁽¹⁵⁰⁾. También aparece el fenómeno de transición epitelio mesenquimal (TEM), un proceso común en SSc donde las células epiteliales pierden su polaridad y desarrollan características de células mesenquimales (**figura. 1**). Todas estas células mesenquimales con fenotipo inflamatorio aumentarán la secreción de la matriz celular desencadenante de la fibrosis, y a diferencia de lo que ocurre en los procesos de cicatrización fisiológica presentarán resistencia a la apoptosis y la eliminación mediante fagocitosis ⁽¹⁵¹⁾.

Los principales moduladores de este proceso son el TGF- β , los ligandos de Wnt, la trombina, la endotelina-1 y el PPAR- γ . El TGF- β es principal regulador tanto de la fibrogénesis (fisiológica) como de la fibrosis. En condiciones fisiológicas se encuentra secuestrado mediante la unión a proteínas del tejido conectivo como la fibrilina y la LTBP. El daño tisular permite su liberación y unión a los receptores de superficie de los fibroblasto, que a consecuencia de esto modificarán su fenotipo y aumentaran la secreción de colágeno⁽¹⁵²⁾. La importancia crucial del TGF- β en la regulación de la homeostasis pulmonar queda patente a través del “knockout” condicional (con pérdida de expresión pulmonar) para el receptor 2 de TGF- β , estos ratones son resistente a la

fibrosis inducida por bleomicina, pero desarrollan enfisema de forma espontánea ⁽¹⁵³⁾. La vía del TGF- β está íntimamente relacionada con la de la Wnt-catenina. Las Wnt son un grupo de proteína solubles capaces de unirse a receptores de superficie de la familia Frizzled, receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G. A consecuencia de esta unión se induce la acumulación citosólica de β -catenina. En ausencia de un receptor para la β -catenina esta es fosforilada y eliminada a través de la vía del proteosoma, en presencia de su receptor transloca al núcleo donde actúa sobre diferentes factores de transcripción⁽¹⁵⁴⁾. Su reactivación en adultos se relaciona habitualmente con procesos patológicos incluida el cáncer y la fibrosis pulmonar, habiendo sido demostrado un aumento en su expresión en FPI y en fibrosis inducida por bleomicina ⁽¹⁵⁵⁾ como en SSc ⁽¹⁵⁶⁾. La expresión aberrante parece promover un proceso de regeneración tisular deficiente cuyo fracaso culmina en fibrosis ⁽¹⁵⁵⁾⁽⁸⁾.

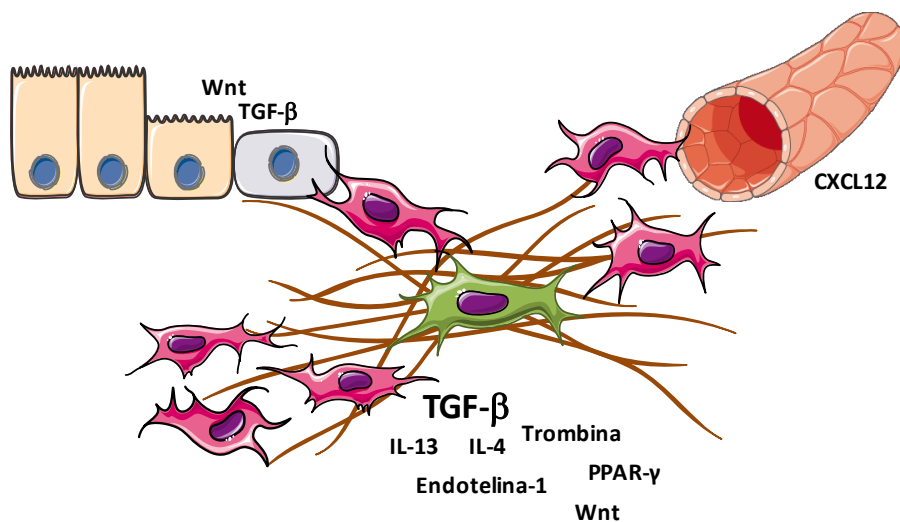


Figura 1. Orígenes de los fibroblastos implicados en la fibrosis pulmonar

Los miofibroblastos pueden originarse a partir de la proliferación y diferenciación de los fibroblastos residentes como resultado de la acción de múltiples citoquinas y factores de crecimiento. Además de estos fibroblastos residentes, se reclutan células de origen mesenquimal de los tejidos periféricos y se generan fibroblastos *de novo* mediante un proceso de transición epitelio mesenquimal.

Elaboración propia a partir de imágenes de uso libre descargadas de la biblioteca <https://smart.servier.com>

La trombina es una serinproteasa implicada en la coagulación, tanto su concentración como su actividad están fuertemente elevados en LBA de pacientes con SSc-EPID ⁽¹⁵⁷⁾ y en el modelo murino de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina ⁽¹⁵⁸⁾. La trombina es capaz de estimular la síntesis de citoquinas fibrogénicas como el TGF- β ⁽¹⁵⁹⁾ y de inducir la proliferación de los fibroblastos y su transición a miofibroblastos ⁽¹⁶⁰⁾.

La ET-1 es secretada por las células endoteliales, sus niveles están aumentados en el plasma y LBA de pacientes con EPID asociada a SSc ⁽¹⁶¹⁾ y en el modelo de fibrosis inducida por bleomicina ⁽¹⁶²⁾. Su unión a los receptores de superficie de los fibroblastos, induce la transición epitelio mesenquimal ⁽¹⁶³⁾ y la expresión de TGF- β ⁽¹⁶⁴⁾. El PPAR- γ es un receptor huérfano vital en el proceso limitador de la fibrosis ⁽¹⁶⁵⁾. El tratamiento de fibroblastos con agonistas de esta proteína es capaz de inhibir la secreción de colágeno inducida por TGF- β a través de un mecanismo competitivo de unión a sus coactivadores ⁽¹⁵⁷⁾. El daño tisular puede producir un descenso en la concentración celular de PPAR- γ tal como ha sido demostrado en la sarcoidosis ⁽¹⁶⁶⁾.

En SSc los linfocitos Th están activados y polarizados hacia un fenotipo profibrótico, se trata de linfocitos Th2 secretores de IL-4 y IL-13. Estas citoquinas inducen la secreción de TGF- β por parte de los macrófagos y promueven la activación de los fibroblastos ⁽¹⁶⁷⁾. La sobreexpresión de IL-13 genera fibrosis pulmonar severa en ratones ⁽¹⁶⁸⁾, y su neutralización inhibe la fibrosis inducida por bleomicina ⁽¹⁶⁹⁾. Se ha detectado una expansión clonal de linfocitos Tc activados en el pulmón de algunos pacientes con SSc ⁽¹⁷⁰⁾, estos pacientes que presentan esta población presentan un mayor riesgo de progresión. El mecanismo de acción tiene que ver con la secreción de citoquinas profibróticas como la IL-4 y la activación del TGF- β . Los linfocitos Treg están aumentados pero su funcionalidad está alterada ⁽¹⁷¹⁾. Los linfocitos B presentan un fenotipo caracterizado por la alta expresión de CD19 asociado a la síntesis de autoanticuerpos, hay un predominio de células vírgenes respecto a las memoria pero estas últimas están hiperactivadas ⁽¹⁷²⁾. Además de secretar autoanticuerpos, los linfocitos B pueden contribuir a la fibrosis promoviendo la polarización Th2. Además de alteraciones en las vías de señalización y en el fenotipo de los componentes celulares, para que el proceso fibrótico se inicie, es necesaria una agresión al tejido pulmonar. Generalmente, se trata de estímulos crónicos como las infecciones, los procesos isquémicos, la microaspiración de ácido gástrico.

Los fibroblastos poseen receptores de TLRs que pueden ser activados por componentes bacterianos pero también por ligandos de TLR de origen endógeno, que se generan como consecuencia del daño tisular, la autoinmunidad y el estrés oxidativo ⁽⁸⁾. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden generarse en SSc en respuesta a procesos isquémicos, principalmente durante fenómeno de Raynaud, o como consecuencia de la estimulación de los fibroblastos por diferentes citoquinas y quimiocinas (PDGF, TGF- β , TNF- α , IL-3, IL-6, GM-CSF, FGF). El estrés oxidativo es capaz de inducir la diferenciación de los fibroblastos en miofibroblastos y de modular la actividad del TGF- β y el PDGF ⁽¹⁷³⁾. Se postula que el daño reiterado del parénquima pulmonar producido por la microaspiración de ácido gástrico debida al reflujo gastroesofágico (RGE) y la hernia de hiato puede estar relacionada con el desarrollo y la progresión de la EPID en pacientes con SSc, otras ETCs y FPI ⁽¹⁷²⁾⁽¹⁷³⁾⁽¹⁷⁴⁾⁽¹⁷⁵⁾. Entre las evidencias a favor de esta hipótesis encontramos la aparición de patrones de fibrosis centrolobulillar con acúmulos de ácido gástrico en el lumen ⁽¹⁷⁸⁾, la detección de pepsina en el LBA de pacientes con RGE ⁽¹⁷⁹⁾, la aparición de marcadores de daño alveolar como KL-6 en el suero de pacientes con SSc ⁽¹⁸⁰⁾, y la reducción en la mortalidad en la FPI vinculada al tratamiento del RGE ⁽¹⁸¹⁾. Ninguno de estos hallazgos ha probado la relación causal y otros autores sugieren que son los cambios en la presión negativa y en las fuerzas de tracción provocados por la fibrosis pulmonar los que resultan en la dilatación del esófago ⁽¹⁸²⁾.

2.2.4.2. Artritis reumatoide (AR)

La prevalencia de la EPID en pacientes con AR puede llegar hasta el 25% ⁽¹⁸³⁾ y la mortalidad asociada está en torno el 6 y el 10% ⁽¹³⁸⁾⁽¹³⁹⁾, se trata de la única manifestación sistémica cuya prevalencia está aumentando ⁽¹⁸⁴⁾. En España, donde la prevalencia es inferior a la encontrada en los países anglosajones y similar a la de otros países mediterráneos, se estima que es del 3.7% ⁽¹⁸⁵⁾. Pese a ser una enfermedad con predominio en mujeres la aparición de fibrosis pulmonar es más frecuente en varones. El tabaquismo es uno de los principales riesgos para el desarrollo de AR ⁽¹⁸⁶⁾⁽¹⁸⁷⁾, y se ha demostrado su capacidad para inducir citrulinización de las proteínas a nivel pulmonar ⁽³⁰⁾⁽¹⁸⁸⁾. En pacientes fumadores con anticuerpos anti-péptidos cíclicos citrulinados, es posible encontrar patrones de NIU en ausencia de manifestaciones articulares típicas de AR ⁽¹⁸⁹⁾. Algunos autores han especulado con la posibilidad de que el pulmón sea el órgano donde se inicia la enfermedad ⁽¹⁹⁰⁾. Aunque esta

hipótesis no ha podido confirmarse, si se ha podido demostrar la formación de centros germinales y la síntesis *in-situ* de anticuerpos contra péptidos cíclicos citrulinados ⁽²⁹⁾. Pacientes con afectación articular moderada pueden presentar EPID grave. Este hecho podría explicarse en parte porque algunos de los fármacos usados para el tratamiento de la AR como le metotrexato ⁽¹⁹¹⁾ y los anti-TNF ⁽¹⁹²⁾ podrían estar relacionados con la fibrosis pulmonar.

2.2.4.3. Miopatías inflamatorias

El síndrome anti-sintetasa (SAS) es un subtipo de miopatía inflamatoria con afectación pulmonar con una frecuencia de aproximadamente el 30% ⁽¹⁹³⁾. Puede ser la primera manifestación de esta enfermedad sobre todo en casos de DM amiopática ⁽¹⁹⁴⁾. Se caracteriza por la presencia de EPID, manos de mecánico y fenómeno de Raynaud que pueden estar acompañados de fiebre, artritis y exantema cutáneo compatible con dermatomiositis. Actualmente se le considera una entidad diferenciada y no una forma clínica de DM/PM ⁽¹⁹⁵⁾. Serológicamente se caracteriza por la presencia de anticuerpos anti-aminoacil RNA sintetasas (anti-RNA). La presencia de estos autoanticuerpos se asocia a un aumento de 3.7 veces en la frecuencia de la EPID ⁽¹⁹³⁾. Su presencia en ausencia de otros síntomas de PM/DM o en otras enfermedades como la AR ⁽¹⁹⁶⁾ también es un predictor de EPID. El anti-RNA más frecuente es el anti-Jo1, La aparición de este autoanticuerpo se correlaciona fuertemente con la aparición de EPID en pacientes con PM-DM. En efecto, entre el 50-70% de pacientes positivos para Jo-1 desarrollaran esta complicación mientras que el la frecuencia disminuye hasta el 10% en pacientes negativos ⁽¹⁹⁷⁾. Otros anti-ARN menos frecuentes como anti-PL-12 y sobre todo PL-7 se asocian con un peor pronóstico ⁽¹⁹⁸⁾⁽¹⁹⁶⁾⁽¹⁹⁹⁾.

Otros autoanticuerpos relacionados con EPID en miopatías inflamatorias son los anti-Ro52 y anti-MDA5. Los anticuerpos anti-Ro52 pueden acompañar a los anti-ARN o aparecer de forma aislada, son los anticuerpos más frecuentes en todas las formas de DM/PM ⁽²⁰⁰⁾ y su presencia se asocia a EPID rápidamente progresiva ⁽¹⁹⁴⁾. Los anticuerpos anti-MDA5 pueden adelantarse a otras manifestaciones presentarse como DM amiopática, se asocian a EPID rápidamente progresiva y mal pronóstico, con una supervivencia a los 5 años de 50.2% frente al 97.7 de los pacientes con anti-ARNs ⁽²⁰¹⁾⁽²⁰²⁾. Los pacientes con estos anticuerpos son resistentes a los tratamientos convencionales, aunque podrían responder a la plasmaféresis ⁽²⁰³⁾. Esto hace pensar que no son simples biomarcadores y que podrían estar implicados en la patogenia. Al igual

que en la AR, los fumadores crónicos (>20 paquetes año) presentan un mayor riesgo de desarrollar PM, EPID y anticuerpos anti-sintetasa (especialmente anti-Jo1) que los no fumadores, especialmente si presenta el haplotipo HLA-DRB1*03:01 ⁽¹⁹³⁾ ⁽²⁰⁴⁾.

2.2.4.4. Síndrome de Sjögren (SSp)

La aparición de manifestaciones pulmonares en SSp se asocia a un mal pronóstico, con un importante aumento de la mortalidad. Así, la supervivencia a los 10 años disminuye en un 92% en los pacientes sin afectación pulmonar a tan solo un 73% en los pacientes afectados ⁽²⁰⁵⁾. Con una prevalencia del 8-20% ⁽²⁰⁴⁾⁽²⁰⁵⁾, la EPID es la principal manifestación pulmonar en pacientes con SSp ⁽²⁰⁸⁾. Es la primera manifestación del SSp, en un 2-4% del total del pacientes ⁽²⁰⁶⁾⁽²⁰⁹⁾ y en el 22-50% ⁽¹³⁶⁾⁽²⁰⁸⁾ de los que desarrollan afectación pulmonar, pudiendo adelantarse al diagnóstico hasta 10 años ⁽²⁰⁸⁾. Aunque tradicionalmente se creía que el patrón radiológico más común era el de NIL, estudios más recientes evidencian que el patrón dominante es de NINE ⁽²⁰⁸⁾⁽²⁰⁹⁾. El principal predictor de la aparición de EPID en pacientes de SSp es la edad avanzada ⁽²⁰⁹⁾⁽²¹³⁾. Otros predictores son el tabaquismo ⁽²¹³⁾ y la aparición de signos/síntomas relacionados con otras ETCs como el fenómeno de Raynaud, la afectación esofágica o la artritis ⁽²⁰⁶⁾⁽²¹⁴⁾. Al igual que en la AR se ha demostrado la formación de centros germinales en el epitelio pulmonar de los pacientes con SSp ⁽²⁹⁾. Sin embargo, varios autores describen un disminución en la presencia de anticuerpos anti-SS-A/Ro en los pacientes con EPID ⁽¹³⁶⁾⁽²⁰⁷⁾. En el apartado referente a los autoanticuerpos relacionados con EPID, se verá que esto podría explicarse por la falta de detección de anticuerpos anti-Ro52.

2.2.4.5. Enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC)

La EMTC se caracteriza por la presencia aislada de anticuerpos anti-ribonucleoproteína (RNP) en ausencia de otros ENAs, y por el solapamiento de síntomas característicos de otras ETCs incluyendo el fenómeno de Raynaud, poliartritis, miositis, esclerodactilia, disfagia e hipertensión pulmonar. La EPID está presente en el 41-66% ⁽²¹⁵⁻²¹⁷⁾ de pacientes con EMTC y puede aproximarse al 90% en algunos subgrupos clínicos ⁽²¹⁸⁾. Su aparición se asocia con la afectación esofágica ⁽¹⁷⁷⁾⁽²¹³⁻²¹⁵⁾ y la ausencia de artritis ⁽²¹²⁾⁽²¹³⁾⁽²¹⁵⁾. Pese a que la definición canónica de EMTC requiere la ausencia de otros ENAs, algunos autores han estudiado la aparición de otros autoanticuerpos diferentes al anti-RNP. Mientras que la aparición de anticuerpos anti-péptidos

cíclicos citrulinados (CCP) se asocia a baja incidencia de EPID en pacientes con EMTC ⁽²¹⁸⁾, los anticuerpos anti-Ro52 se han asociado con un aumento de la incidencia ⁽²¹⁵⁾. Respecto a la etiopatogenia, se postula que al igual que en la SSc el reflujo esofágico relacionado con la disfagia puede estar implicado en la aparición de EPID en pacientes con EMTC. También se ha observado la activación del sistema del complemento, y el aumento de los inmunocomplejos en sangre periférica ⁽²¹⁷⁾ así como el depósito de inmunocomplejos a nivel alveolar ⁽²¹⁸⁾. Esta hiperactivación del sistema del complemento está relacionada con la actividad y se normaliza con el tratamiento, lo que hace pensar que el daño de la membrana alveolar podría desempeñar un papel en la patogénesis.

2.2.4.6. Lupus eritematosos sistémico (LES)

La EPID es una manifestación infrecuente en el LES, con una prevalencia del 4% en la población general que aumenta hasta el 10% en pacientes con debut tardío (>50 años) ⁽²¹⁹⁾. Su gravedad es generalmente inferior a la de otras ETCs ⁽²¹⁴⁾ y presenta una buena respuesta al tratamiento con corticoesteroides ⁽²²⁰⁾. Muchos pacientes de LES y EPID presentan manifestaciones comunes con otras ETCs como síndrome seco ⁽²¹⁹⁾, fenómeno de Raynaud, esclerodactilia o alteraciones en la capilaroscopia ⁽²²¹⁾. También se asocia con la presencia de algunos anticuerpos como SS-A/Ro ⁽²²²⁾⁽²²³⁾ y RNP ⁽²²¹⁾. En otros casos puede tratarse de una complicación secundaria a otras complicaciones del LES, como las infecciones o la neumonitis aguda ⁽²²⁴⁾⁽²²⁵⁾. Al igual que en la EMTC se ha demostrado el depósito de inmunocomplejos a nivel alveolar ⁽²²⁰⁾.

2.2.4.7. Conectivopatías indiferenciadas

Se conoce que la afectación pulmonar puede adelantarse a otras manifestaciones de las ETCs en varios años, lo que dificulta distinguir entre formas idiopáticas y asociadas a colagenopatías. Por otra parte, un porcentaje sustancial (en torno al 25%) de los pacientes con patrón de NINE o NIU muestran signos sugestivos de la presencia de ETC subyacente o concomitante pero sin cumplir la totalidad de criterios del Colegio Americano de Reumatología (ACR) para el diagnóstico de ETCs. Pese a sugerir una etiología autoinmune, estos pacientes con ETC-ND son habitualmente catalogados como NII ^{(226–228)(229)}. Diferentes autores han intentado describir estos pacientes y han propuesto definiciones como EPID asociada a ETC-ND ⁽²²⁸⁾, ETC pulmón dominante ⁽²³⁰⁾ o EPID con características autoinmunes ⁽²²⁹⁾. Debido a la diferencia en los criterios utilizados, los diferentes estudios

presentan conclusiones inconsistentes(134). En 2015 la ERS y el ATS proponen catalogar estos pacientes como una nueva entidad (134), la neumonía intersticial con rasgos autoinmunes (IPAF). Para definirla se utilizaron criterios clínicos, serológicos y morfológicos (tabla 8). Estos criterios no incluyen manifestaciones clínicas inespecíficas utilizadas por algunos autores como la artralgia, mialgia, síndrome de seco, fotosensibilidad, alopecia, úlceras orales, pérdida de peso o astenia; ni criterios demográficos como edad joven o género femenino; ni parámetros de laboratorio diferentes a los autoanticuerpos. Uno de los autoanticuerpos más frecuentes en pacientes con EPID asociada a ETCs es el anti-Ro52. Aunque este autoanticuerpo no está incluido dentro de los criterios serológicos de la IPAF, si lo están los anticuerpos anti-SSA que según el método de detección puede incluir (o no) a los anticuerpos anti-Ro52, además el grupo de expertos se mostró abierto a incluir otros autoanticuerpos específicos de ETCs.

En muchos casos, resulta difícil establecer el diagnóstico de IPAF o EPID asociada a ETCs. La aparición de EPID como primera manifestación de una ETC no es infrecuente ⁽¹³⁴⁾, y los pacientes catalogados como IPAF pueden tardar hasta seis años en cumplir criterios de ETCs ⁽²³¹⁾. Algunos pacientes podrían estar siendo erróneamente clasificados como IPAF cuando realmente se trata de formas tempranas de ETCs. Estos casos representan un reto diagnóstico que podría facilitarse mediante el descubrimiento de nuevos biomarcadores. Aunque todavía no se disponen de estudios prospectivos que hayan aplicado esta clasificación, varios grupos han analizado retrospectivamente sus series. El estudio de Oldham et al. ⁽²³²⁾ que dispone de la mayor serie, estudio 144 pacientes con un claro predominio del patrón NIU y encontró una supervivencia ligeramente superior a la de la FPI pero claramente peor que la de EPID asociada a ETCs. Un análisis estratificado mostro como la presencia de manifestaciones clínicas se asocia a una mejora significativa en la supervivencia y que los pacientes con manifestaciones clínicas y patrón morfológico distinto a NIU mostraron una supervivencia similar a EPID asociada a ETCs. Otros estudios donde el patrón NIU es minoritario presentaron supervivencias similares a las de la EPID asociada a ETCs ⁽²²⁹⁾⁽²³¹⁾. En conjunto, los datos apuntan a que igual que en otras formas de EPID, la presencia de patrones ligados a fibrosis es el principal predictor de mal pronóstico.

Tabla 8. Criterios de clasificación para la neumonía intersticial con características autoinmunes (IPAF)

1. Presencia de neumonía intersticial demostrada mediante TACAR o biopsia pulmonar Y
 2. Exclusión de etiologías alternativas Y
 3. No cumplimiento de criterios de ETC Y
 4. Presencia de al menos una característica de al menos dos de los siguientes tres dominios.
 - A. Dominio clínico
 - B. Dominio serológico
 - C. Dominio morfológico
-
- A. Dominio clínico
1. Manos de mecánico
 2. Ulceraciones digitales distales
 3. Artritis inflamatoria o rigidez poliarticular matutina ≥ 60 min
 4. Telangiectasias palmares
 5. Fenómeno de Raynaud
 6. Edema digital
 7. Signo de Gottron
-
- B. Dominio serológico
1. ANAs con título ≥ 320 y patrón homogéneo (AC-1, AC-2), SCL-70 like (AC-29), granular (AC-4, AC-5)
 - a. ANA con patrón nucleolar (AC-8, AC-9, AC-10) a cualquier título
 - b. ANA con patrón centromérico (AC-3) a cualquier título
 2. Factor reumatoide ≥ 2 veces el límite de normalidad
 3. Anti-CCP
 4. Anti-DNAbs
 5. Anti-SSA
 6. Anti-SSB
 7. Anti-Sm/RNP
 8. Anti-SmB
 9. Anti-Scl-70
 10. Anti-tRNA sintetasa (Jo-1, PI-7, PI-12, EJ, KS, Zo, Ku, tRS, Th/To, OJ, EJ...)
 11. Anti-Pm-Scl
 12. Anti-MDA-5
-
- C. Dominio morfológico
1. Patrón radiológico sugestivo
 - a. NINE
 - b. NO
 - c. Overlap NINE/NO
 - d. NIL
 2. Patrón histopatológico
 - a. NINE
 - b. NO
 - c. Overlap NINE/NO
 - d. NIL
 - e. Agregados linfocitarios con centros germinales
 - f. Infiltrado linfoplasmacítico (con o sin folículos linfoides)
 3. Afectación multisistémica
 - a. Derrame o engrosamiento pleural no explicado
 - b. Derrame o engrosamiento pericárdico no explicado
 - c. Enfermedad de la vía aérea no explicada
 - d. Vasculopatía pulmonar no explicada

Adaptada de: Fischer A, Antoniou KM, Brown KK, Cadranel J, Corte TJ, du Bois RM, et al. **ref 134**

* Se aplica la nomenclatura ICAP para definir los patrones ANA
(<https://www.anapatterns.org>)

** Se amplía el listado de anticuerpos anti-sintetasa

2.3 Herramientas diagnósticas

2.3.1 ¿Qué es un biomarcador?

2.3.2 Biomarcadores en EPID

2.1.3.1 Marcadores de daño tisular

2.1.3.1 Factores de crecimiento implicados en la fibrosis y remodelación tisular

2.1.3.1 Quimiocinas y citoquinas

2.1.3.1 Subpoblaciones linfocitarias

2.1.3.1 Productos finales de glicosilación

2.1.3.1 Marcadores genéticos

2.1.3.1 Marcadores de exposición

2.3.3 Anticuerpos como biomarcadores en ETC-EPID

2.3. Herramientas diagnósticas

Con más de 150 posibles causas, decenas de entidades diferenciadas y un elevado grado de superposición en los síntomas, el diagnóstico de un paciente con una EPID representa un reto clínico que requiere un enfoque multidisciplinario. Actualmente, el peso del diagnóstico recae sobre la TCAR, las técnicas de endoscopia respiratoria y las manifestaciones clínicas, con un menor peso del estudio del LBA y las pruebas funcionales. Entre el 2 y un 20% de los casos habrá discrepancias entre las distintas aproximaciones que solo permitirán un diagnóstico de incertidumbre ⁽²³⁴⁾. Cuando los criterios radiológicos no son concluyentes, se recomienda la realización de una biopsia pulmonar quirúrgica. Se calcula que aproximadamente un tercio de los pacientes con EPID requerirán biopsia pulmonar, si bien solo un 7,5-12% son sometidos a ella ⁽²³⁵⁾.

La TCAR presenta una alta especificidad en el diagnóstico de FPI, pero la sensibilidad es limitada ⁽²³⁶⁾. Los consensos más recientes definen una categoría de patrones indeterminados para NIU (es decir, no compatibles con NIU según la antigua nomenclatura que presentan un patrón de NIU histológico) ⁽²³⁷⁾ ⁽²³⁸⁾. Además, en otras enfermedades intersticiales, presenta una sensibilidad del 59% y una especificidad de tan solo el 40% ⁽²³⁹⁾.

La biopsia transbronquial obtenida mediante fibrobroncoscopia es una técnica segura con raras complicaciones mayores. Resulta útil en el diagnóstico de entidades que pueden ser diagnosticadas con una muestra de tejido reducida, tales como la sarcoidosis, la NO y la NH. En las restantes entidades, alcanzar un

diagnóstico preciso puede requerir una biopsia pulmonar quirúrgica. Esta intervención requiere de anestesia general y presenta una tasa de mortalidad que puede oscilar entre el 2-16% según el procedimiento empleado ⁽²³⁴⁾. Además, la comparación con pulmones explantados muestra que hasta un 10% de los especímenes obtenidos mediante biopsia quirúrgica pueden no ser diagnósticos ⁽²⁴⁰⁾. La criobiopsia es una técnica endoscópica novedosa, resulta menos invasiva que la biopsia pulmonar quirúrgica y que ha demostrado tener una adecuada rentabilidad diagnóstica en varios estudios ⁽²³⁵⁾⁽²⁴¹⁾.

El estudio del LBA puede tener valor diagnóstico en algunas enfermedades tales como la histiocitosis de células de Langerhans y la proteinosis alveolar. En otras el recuento celular puede orientar el diagnóstico, la alveolitis linfocítica aparece en la sarcoidosis y la NH, en la FPI los neutrófilos acostumbran a estar aumentados y en la neumonía eosinofílica los eosinófilos suelen ser superiores al 20%. A diferencia de las piezas quirúrgicas que no son representativas del total del pulmón, el LBA da una idea ponderada del estado del tejido sano y dañado. Esta característica le hace un excelente candidato para la búsqueda de nuevos biomarcadores.

2.3.1. ¿Qué es un biomarcador?

El término biomarcador se desarrolló dentro del ámbito de la Ecología para definir aquellas características (bioquímicas, fisiológicas o etológicas) de los seres vivos que permiten inferir características de su medio ambiente. Se basa en la premisa de que los seres vivos se adaptan a los cambios de su entorno modificando sus propias características. En el ámbito de la biomedicina, este término se aplica a aquellos parámetros (celulares, bioquímicos o genéticos) que resultan útiles para establecer el diagnóstico o pronóstico de una enfermedad o para monitorizar la respuesta a un tratamiento.

Para ser útil en la práctica clínica, un buen biomarcador debe cumplir varios requisitos. En primer lugar, debe ser reproducible por cualquier laboratorio correctamente equipado y no verse alterado por otras condiciones distintas a la estudiada. Debe ser robusto y presentar al menos una de las siguientes características: alta sensibilidad (marcadores de cribado), alta especificidad (marcadores de confirmación), o amplio rango dinámico (marcadores de seguimiento o respuesta al tratamiento). Preferentemente, la muestra utilizada debe poder obtenerse mediante un medio no invasivo. Finalmente, para poder ser utilizados de forma rutinaria, su coste debe ser asequible.

2.3.2. Biomarcadores en EPID

En los siguientes apartados se describen los principales marcadores y autoanticuerpos estudiados hasta ahora en las EPID y su utilidad como biomarcadores en suero. Estos datos se resumen en las **tablas 9.1 y 9.2**. Más adelante se hace una pequeña descripción de los diferentes autoanticuerpos y de su utilidad como biomarcadores en suero.

2.3.2.1. Marcadores de daño tisular

El CC16 o uteroglobina es una proteína con propiedades antiinflamatoria secretada por las células de club. Sus niveles están aumentados en el suero y LBA en diferentes formas de EPID, especialmente en FPI. En estos pacientes la secreción no solamente proviene de las células de Club sino también de las células epiteliales alveolares. Su utilidad como marcador es limitada porque se trata de un marcador inespecífico relacionado con el grado de afectación pulmonar ⁽²⁴²⁾. Esta proteína también parece aumentada en pacientes con SSc, especialmente en aquellos con fibrosis pulmonar activa o extensa ⁽²⁴³⁾⁽²⁴⁴⁾.

La KL-6 y las proteínas A y D del surfactante (SP-A, SP-D) son todas proteínas altamente glicosiladas. Son secretadas de forma constitucional por los neumocitos de tipo II y su expresión aumenta durante el daño y la regeneración del epitelio. Sus niveles en suero están aumentados en distintas formas de EPID, incluidas la FPI ⁽²⁴⁵⁾, la NINE ⁽²⁴⁵⁾⁽²⁴⁶⁾, la NOC ⁽²⁴⁷⁾, la NH ⁽²⁴⁸⁾, la inducida por radiación ⁽²⁴⁹⁾ y la ETC-EPID ⁽²⁵⁰⁾. Aunque los niveles son más altos en las formas con mayor fibrosis, esta inespecificidad hace que carezcan de valor como marcadores diagnósticos. No obstante múltiples artículos apoyan su utilidad como marcadores de mal pronóstico ⁽²⁵¹⁾⁽²⁵²⁾.

Las metaloproteasas (MMP) son enzimas implicados en la ruptura de la matriz extracelular durante procesos fisiológicos. La MMP-7 es secretada por los MØ alveolares y las células epiteliales alveolares y bronquiales. Sus niveles están aumentados en suero y LBA de pacientes con FPI respecto a controles sanos y su nivel basal en suero puede predecir cambios en la FVC en menos de cuatro meses ⁽²⁵³⁾. Se han propuesto varios índices que combinan la MMP-7 con otros parámetros como SP-D y osteopontina, que aumenta la capacidad de discernir entre FPI y otras formas de EPID ⁽²⁵⁴⁾. Del mismo modo, combinando el valor del MMP-7 con el sexo, la FVC y la capacidad de difusión se ha desarrollado un índice que permite predecir la mortalidad ⁽²⁵⁵⁾.

2.3.2.2. Factores de crecimiento implicados en la fibrosis y remodelación tisular

La proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 2 (IGFBP-2) modula la acción de IGF. Es secretado por los miofibroblastos durante el proceso fibrosante y sus niveles están elevados en el suero y LBA de pacientes con FPI. El tratamiento con pirferidona y nintedanib reduce estos niveles sin llegar a alcanzar los valores de la población sana, por lo que podría tratarse de un marcador de respuesta al tratamiento ⁽²⁵⁶⁾.

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es un regulador de la angiogénesis sintetizado por las células epiteliales alveolares, MØ y granulocitos. Se trata de una de las dianas del nintedanib ⁽²⁵⁷⁾. Ha sido implicado en la patogénesis de la EPID y sus niveles están aumentados sus niveles séricos están elevados en pacientes con FPI ⁽²⁵⁸⁾ y NH ⁽²⁵⁹⁾, especialmente en aquellos donde la diferencia alveolo-arterial de oxígeno es elevada. Los niveles basales correlacionan inversamente y el cambio mensual en la capacidad vital (FVC) ⁽²⁵⁸⁾.

YKL-40 es una quitinasa implicada en la regulación de la respuesta inflamatoria y la remodelación tisular. Sus niveles en suero y LBA están aumentados en diferentes formas de EPID, incluidas la FPI, NINE, NOC, EPID asociada al tabaquismo, NH y ETC-EPID ⁽²⁶⁰⁾⁽²⁶¹⁾⁽²⁶²⁾. Los niveles son más elevados en las entidades y pacientes con una fibrosis más extensa.

2.3.2.3. Quimiocinas y citoquinas

La proteína derivada de macrófagos (MDC/CCL22) y la quimiocina regulada por la activación tímica (TARC/CCL17) son dos quimiocinas que comparten como ligando el CCR4. Este receptor se expresa por linfocitos Th2, Th17 y Th22 y por los MØ alveolares de pacientes con FPI ⁽²⁶³⁾ y neumonía eosinofílica ⁽²⁶⁴⁾ y se sospecha que puede ejercer su función mediante el reclutamiento y activación de estos segundos. Su detección en LBA de pacientes con FPI se asocia un mal pronóstico ⁽²⁶⁵⁾. En pacientes con NH, los niveles séricos de CCL17 están aumentados y correlacionan con el grado de fibrosis ⁽²⁶⁶⁾.

El CCL21 es una quimiocina proangiogénica aumentada en los pacientes con FPI y NH. El receptor de esta quimiocina es el CCR7, un marcador de linfocitos vírgenes y memoria central que también expresan los fibroblastos de pacientes con FPI ⁽²⁶⁷⁾. En los pacientes con NH pero no en FPI, se puede detectar

agregados de linfocitos CCR7⁺ alrededor de los linfáticos. Los niveles de esta quimiocina correlacionan con la función pulmonar en pacientes con NH ⁽²⁵⁹⁾. Un polimorfismo en esta citoquina se ha asociado con susceptibilidad a la miositis y desarrollo de EPID ⁽²⁶⁸⁾.

La proteína inducida por INF γ 10 (IP10/CXCL10) es una quimiocina de Th1 secretada por fibroblastos, monocitos y otros tipos celulares en respuesta al INF γ . Su receptor es el CXCR3 y actúa como un inductor de la respuesta Th1 y formación de granulomas a mediante la quimiotaxis de M \emptyset , DC, linfocitos Tc, Th1, Th17.1 y NK. En pacientes con NH producida por aves, sus niveles aumentan tras un test de provocación por inhalación ⁽²⁶⁹⁾.

En pacientes con EPID asociada a SSc, también se han detectado aumentos significativos en los niveles séricos de las citoquinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, CCL-2 y TNF α . Los niveles de IL-4, IL-8 y CCL2 correlacionan negativamente con la función pulmonar pero no han demostrado ser útiles como predictores tempranos de progresión ⁽²⁷⁰⁾.

2.3.2.4. Subpoblaciones linfocitarias

El cociente CD4/CD8 en LBA se ha postulado como una herramienta para diferenciar la sarcoidosis de otras formas de EPID (principalmente de la NH), sin embargo, los estudios son contradictorios. La integrina α E también conocida como CD103 desempeña un papel fundamental en la retención de linfocitos en las mucosas y no está presente en los linfocitos CD4⁺ de sangre periférica. El índice CD103/CD4 en el LBA de pacientes con EPID está elevado respecto a otras enfermedades pulmonares no fibróticas. En sarcoidosis, se ha postulado que los linfocitos presentes en el pulmón provienen de la redistribución de la sangre periférica al pulmón por lo que deberían ser CD103. El índice CD103/CD4 está disminuido en la sarcoidosis frente a otras formas de EPID ⁽²⁷¹⁾, y puede mejorar la eficacia diagnóstica entre en las enfermedades pulmonares granulomatosas difusas ⁽²⁷²⁾

2.3.2.5. Productos finales de glicosilación

Los productos finales de glicosilación avanzada (AGEs) son proteínas o lípidos altamente glicosilados a consecuencia de la exposición a azúcares, pueden ingerirse con la dieta o sintetizarse de forma endógena y actuar como PAMPs. En pacientes sanos, su receptor (RAGE) se expresa en el pulmón en una concentración superior a la de cualquier otro tejido ⁽²⁷³⁾ y se sobre-expresa por

los MØ alveolares como consecuencia de la hipoxia ⁽²⁷⁴⁾. En FPI tanto la forma de membrana como la soluble (sRAGE) están disminuidas ⁽²⁷³⁾. Esta forma soluble actúa como un señuelo que bloquea los AGEs. El ratio AGEs/sRAGE se ha propuesto como un marcador pronóstico en diferentes enfermedades. En EPID se ha visto un aumento de este ratio en distintas formas, especialmente en FPI; y Este aumento correlaciona con la progresión funcional ⁽²⁷⁵⁾.

2.3.2.6. Marcadores genéticos

En pacientes con FPI y formas familiares de EPID, se ha detectado un aumento en un polimorfismo en el promotor del gen de la mucina 5B (MUC5B) ⁽²⁷⁶⁾ que no aparece en otras formas de EPID como la sarcoidosis o la EPID asociada a SSc ⁽²⁷⁷⁾, pero sí en la NH ⁽²⁷⁸⁾ y la IPAF ⁽²⁷⁹⁾. Sorprendentemente, este polimorfismo se asocia a buen pronóstico y aumento de la supervivencia en FPI ⁽²⁸⁰⁾ pero a una rápida evolución en NH e IPAF ^{(278) (279)}.

Polimorfismos en otros genes como TOLLIP y SPPL2C también han sido asociados con susceptibilidad a FPI ⁽²⁸¹⁾. Un estudio reciente ha propuesto que la presencia de un polimorfismo minoritario en el gen TOLLIP puede predecir la respuesta en el tratamiento con n-acetil-cisteína en pacientes con FPI ⁽²⁸²⁾.

Hasta un 30% de los pacientes con FPI familiar y en torno al 10% de los casos de FPI esporádica presentan acortamientos en los telómeros y/o mutaciones relacionadas con la regulación de los telómeros ^{(283) (284)}. Aunque menos frecuentes que en la FPI, también se han detectado mutaciones en otras formas de ETCs incluidas la NH, la FEPP, la NOC, la NIL y la NIA y la IPAF ⁽²⁸⁴⁾⁽²⁸⁵⁾. Se han encontrado mutaciones en un 12% de los pacientes con EPID asociada a AR, pero no en la asociada a otras ETCs ⁽²⁷⁹⁾⁽²⁸⁶⁾. Las mutaciones o una longitud inferior al percentil 10 se asocian con una mala progresión, y diferentes trabajos consideran que deben ser tenidos en cuenta de cara a la introducción del tratamiento antifibrótico o el trasplante pulmonar ⁽²⁸⁴⁾.

2.3.2.7. Marcadores de exposición

Las IgG específicas frente a antígenos fúngicos y aviares son marcadores de exposición útiles en el diagnóstico de la NH. Su presencia no implica la existencia de la enfermedad, pudiendo aparecer en personas sanas expuestas a estos antígenos, pero en un contexto clínico compatible pueden apoyar el diagnóstico. Actualmente se están desarrollando nuevos marcadores en esta línea como el IGLL1 y el ProE ⁽²⁸⁷⁾.

TABLA 9-1: Biomarcadores en EPID (moléculas no relacionadas con la respuesta inmunitaria)

Marcadores de daño epitelial	Origen	Muestra	Utilidad propuesta
CC16	Célula de Club	LBA/suero	Correlaciona con el grado de afectación pulmonar
KL-6	Neumocitos tipo II	Suero	Aumentados en FPI vs otras EPID
SP-A		LBA/suero	Marcadores de mal pronóstico
SP-D		LBA/suero	
MMP-7	MØ alveolares y cls. Epiteliales	LBA/suero	Predictor de descensos en la FVC en menos 4 meses Índice predictor de mortalidad
Factores de crecimiento			
VEGF-D	MØ, granulocitos y cls. Epiteliales	LBA	Correlaciona negativamente con descenso de VC
YKL-40	MØ, neutrófilos y cls. Epiteliales	LBA/suero	Correlaciona con nivel de fibrosis En NH asociado a mala progresión y aumento mortalidad
IGFBP-2	Miofibroblastos	LBA/suero	Respuesta al tratamiento con antifibróticos
Productos finales de glicosilación			
AGE/sRAGE	Dieta o endógeno/ MØ y otros	Suero	En FPI correlaciona con la progresión pulmonar
Marcadores genéticos			
MUC5B	-	-	Buena respuesta en FPI
Marcadores de exposición			
IGL1	Aeroantígeno de origen aviar	Suero	Diagnóstico de NH
ProE	Aeroantígeno de origen aviar	Suero	Diagnóstico de NH
Precipitinas	Linfocitos B	Suero	Diagnóstico de NH

TABLA 9-2: Biomarcadores en EPID (moléculas relacionadas con la respuesta inmunitaria)

Quimioquinas y citoquinas					
TARC/CCL17	Epitelio bronquial	LBA/suero	FPI se asocia un mal pronóstico En NH asociado a mal pronóstico		
CCL18	MØ alveolares	Suero	Correlaciona negativamente con DLCO		
CCL21	Células endoteliales	LBA	En NH correlaciona negativamente con FEV y DL _{co}		
MDC/CCL22	MØ	LBA/suero	FPI se asocia un mal pronóstico		
IP10/CXCL10	Fibroblastos, monocitos y otros	LBA/suero	En NH niveles aumentan tras un test de provocación		
IL-4, IL-8, CCL-2	Diferentes células inmunes	Suero	Correlaciona negativamente con DLCO, TLC, VC		
Subpoblaciones linfocitarias					
Ratio CD4/CD8	-	LBA	Aumentado en sarcoidosis		
CD110	-	LBA	Disminuido en sarcoidosis		
Anticuerpos					
HSP-70 IgG/IgA	Linfocitos B	LBA	En ETC-EPID asociado a mal pronóstico		
BAFF	Linfocitos B	Suero	En ETC-EPID correlaciona negativamente con FVC		
Marcadores de exposición					
Precipitinas	Linfocitos B	Suero	Diagnóstico de NH		

2.3.3. Autoanticuerpos como biomarcadores en EPID

Los autoanticuerpos son los principales biomarcadores en el diagnóstico de enfermedades autoinmunes. Habitualmente se estudian en suero, pero también pueden ser estudiados en otras matrices, por ejemplo en las enfermedades neuroinmunológicas es común estudiar su presencia en el líquido cefalorraquídeo (LCR).

Algunos autoanticuerpos, como los anticuerpos anti-receptor de acetilcolina en la miastenia gravis, están relacionados con la etiopatología. Aunque en las ETCs la mayoría de las veces parecen ser simples epifenómenos, resultan muy útiles tanto en el diagnóstico como en el seguimiento.

2.3.3.1. Antecedentes

Existen dos evidencias que apuntan a la posible utilidad de la detección de autoanticuerpos como biomarcadores en EPID. En primer lugar, el factor activador de células B perteneciente a la familia del TNF (BAFF), es una citoquina fundamental para el desarrollo, supervivencia y síntesis del Igs por parte de los linfocitos B, que también se han relacionado con la producción patológica de IL-17 y autoinmunidad. El LBA de pacientes con FPI y ratones tratados con bleomicina presenta niveles elevados de esta citoquina, y tanto la ablación del gen como el bloqueo de la proteína mediante anticuerpos atenúan la fibrosis en el modelo murino⁽⁶³⁾. Los niveles de BAFF están aumentados en los pacientes con ETC-EPID respecto a pacientes con otras neumopatías fibrosantes crónicas y correlacionan inversamente con la función pulmonar⁽²⁸⁸⁾.

La HSP-70 es una proteína de estrés térmico, el knock-out (ratón modificado genéticamente en el que un gen se bloquea) para esta proteína presenta fibrosis acelerada en el modelo de EPID inducida por bleomicina. Sus niveles están disminuidos en el pulmón de FPI y los fibroblastos de pacientes con FPI secretan niveles disminuidos⁽²⁸⁹⁾. En pacientes con AR-EPID se han detectado anticuerpos de clase IgA e IgG frente a HSP-70 citrulinada⁽²⁹⁰⁾, la presencia de estos se asocia a un mal pronóstico.

2.3.3.2. Breve descripción de los autoanticuerpos estudiados

La **tabla 10** resume las principales características de los autoanticuerpos estudiados en este estudio. Para una descripción más detallada consultar el **anexo 1**.

Tabla 10. Anticuerpos relacionados con autoinmunidad no organo específica y su asociación con EPID

Anticuerpo	Diagnostico asociado	Especificidad	Asociado a EPID
CENP-B	SSc (CREST)	Alta	NO
FR	AR	Baja	NO
histonas	LES	Alta	NO
Ku	SSc-DM	Alta	SI
MBG	Sind. Goodpasture	Alta	NO
MDA5	DM	Alta	SI
Mi-2	DM	Alta	NO
DNAds	LES	Alta	NO
MPO	Vasculitis ANCA+	Alta	SI
NOR-90	SSc	Baja	NO
Nucleosoma	LES	Variable	NO
NXP2	DM	Alta	NO
PCNA	LES	Alta	NO
CCP	AR	Alta	NO
PM-Scl	SSc-PM/DM	Alta	NO
PR3	Vasculitis ANCA+	Alta	NO
ribosomal-P	LES	Alta	NO
RNApol-III	ISSc	Alta	NO
Ro52	LES,SSc,PM/DM,SSc	Baja	Probable
SAE1	DM	Alta	NO
Scl-70	dSSc, dSSc/LES	Alta	SI
sintetasas:			
Jo-1, PL-7, PL-12, OJ, EJ, KS	PM/DM (SAS)	Alta	SI
Smd	LES	Alta	NO
SRP	PM	Alta	NO
SS-A/Ro60	SSc, LES	Media	NO
SS-B/La	SSc, LES	Media	NO
Th/T0	ISSc	Alta	NO
TIF1-γ	DM	Alta	NO
U1-RNP	EMTC	Media	NO
U3-RNP	SSc-DM	Alta	NO

2.3.3.3. ¿Por qué estudiar los autoanticuerpos anti-Ro52 en EPID?

Los anticuerpos frente a SS-A/Ro fueron los primeros en relacionarse con las ETCs, y su prevalencia es superior a la de cualquier otro ENA ⁽²⁹¹⁾. Habitualmente presentan títulos elevados ⁽²⁹²⁾ que no se reducen mediante el tratamiento con rituximab ⁽²⁹³⁾ y su aparición puede adelantarse hasta años al diagnóstico ⁽²⁹⁴⁾⁽²⁹⁵⁾. Aunque inicialmente fueron propuestos como marcadores de LES ⁽²⁹⁶⁾ y SSp ⁽²⁹⁷⁾, pueden encontrarse en muchas otras enfermedades, incluyendo otras ETCs (SSc, PM/DM o AR), hepatopatías autoinmunes (cirrosis biliar primaria, hepatitis autoinmune) ⁽²⁹⁸⁾⁽²⁹⁹⁾ y enfermedades no inmunológicas como la infección por VHC ⁽³⁰⁰⁾⁽³⁰¹⁾; también aparecen en el 0,5-3% de la población general ⁽³⁰²⁾⁽²⁹¹⁾.

El sistema anti-SS-A/Ro está formado por anticuerpos dirigidos frente a dos antígenos diferentes, Ro52 y Ro60, con diferente estructura, función e incluso localización intracelular. Estas dos proteínas pueden formar complejos con RNAs y otras proteínas. Ro60 pertenece a la familia TROVE (Telomerasa, Ro y "Vault"), una familia de ribonucleoproteínas cuyos miembros están implicados en el plegamiento de RNAs no codificantes y en la regulación de la supervivencia celular en tras la exposición a radiación ultravioleta.

En cambio, la proteína Ro52 también conocida como TRIM21 por su pertenencia a la familia TRIM de E3 ligasas. Estructuralmente estas ligasas se caracterizan por presentar el dominio tripartito (TRIM) que está compuesto por un dominio RING un motivo B-Box y una región "coiled-coil". Otras proteínas relevantes de esta familia son el TRIM5 α que restringe la infección por HIV en simios y el TRIM20 o Marenostina cuyas mutaciones provocan la fiebre mediterránea familiar. El dominio TRIM es el responsable de la ubiquitinización, un proceso de modificación transcripcional mediante el cual uno o varios polipéptidos de ubiquitina se unen covalentemente a una proteína a través de un residuo de lisina. Esta modificación puede llevar a las proteínas a la degradación a través de la vía del proteosoma, inducir su internalización en el lisosoma ⁽³⁰³⁾ o modificar su funcionalidad ⁽³⁰⁴⁾. Adicionalmente al dominio tripartito, Ro52 también contiene un dominio B30.2/SPRY que le da la capacidad de unirse a diferentes estructuras incluidos el citoesqueleto ⁽³⁰⁵⁾, la cápside de ciertos retrovirus ⁽³⁰⁶⁾ y especialmente la Fc de las inmunoglobulinas ⁽³⁰⁷⁾.

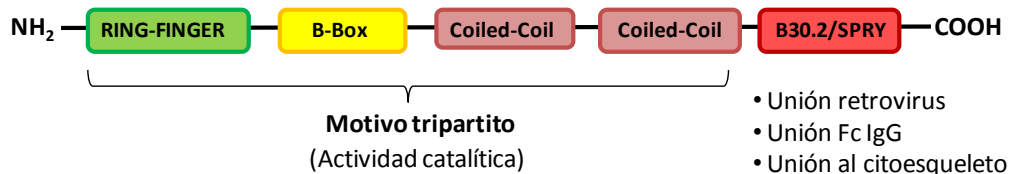


Fig 2. Estructura de la proteína TRIM21/Ro52

Ro52 es una proteína ubicua que en condiciones basales se localiza dentro de los cuerpos citoplasmáticos ⁽³⁰⁵⁾. La expresión de Ro52 puede incrementarse por IFN ⁽³⁰⁸⁾ ⁽³⁰⁹⁾ ⁽³¹⁰⁾, TLRs ⁽³¹⁰⁾ y estrés oxidativo ⁽³¹¹⁾ ⁽³¹²⁾ ⁽³¹³⁾. El IFN y el estrés oxidativo también promueven su traslocación al núcleo donde induce la ubiquitinación de diferentes proteínas, incluyendo factores reguladores del interferón ⁽³¹⁴⁾ y de la apoptosis ⁽³¹³⁾. En cambio, la exposición a agentes proapoptóticos dirige su tránsito hacia las vesículas apoptóticas ⁽³¹⁵⁾⁽³¹⁶⁾ donde queda expuesto al reconocimiento por parte del sistema inmune.

Esta capacidad para actuar sobre diferentes sustratos permite a la proteína Ro52 desarrollar diferentes funciones, incluidas la regulación de la vía del IFN ⁽³¹⁴⁾⁽³¹⁷⁾⁽³¹⁰⁾⁽³¹⁸⁾⁽³¹⁹⁾, la inducción de apoptosis ⁽³¹³⁾⁽³⁰⁴⁾, la eliminación de inmunocomplejos ⁽³⁰⁷⁾ y la respuesta antiviral ⁽³¹⁷⁾⁽³¹⁹⁾.

Los anticuerpos anti-Ro60 pueden detectarse mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) sobre un sustrato de células Hep-2000 ⁽³²⁰⁾, pero ni los anti-Ro52 ni los anti-Ro60 presentan un patrón de tinción de ANA específico en sustratos convencionales. Los anticuerpos anti-Ro52 no son precipitantes y no pueden detectarse cuando se utilizan métodos que empleen sustratos de proteínas nativas ⁽³²¹⁾⁽²⁹¹⁾. Históricamente, esto ha generado un sesgo hacia la detección de anti-Ro60 y a ignorar los anti-Ro52 ⁽²⁹¹⁾.

Diferentes estudios han propuesto que estudiar estas dos especificidades por separado puede tener relevancia diagnóstica como marcador de daño articular, renal, cutáneo o pulmonar en pacientes con LES ⁽³²²⁾, PM-DM ⁽³²³⁾, SSC ⁽³²⁴⁾ o RA ⁽²⁹¹⁾. Los anticuerpos anti-Ro52 también han sido propuestos como un marcador de daño tejido específico independientemente del diagnóstico ⁽³²⁴⁾. De cualquier forma, los resultados de los diferentes estudios no son homogéneos y la utilidad de estudiar las especificidades de los anti-SS-A/Ro por separado es un tema todavía controvertido ⁽³²⁵⁾.

3. JUSTIFICACIÓN

Los anticuerpos anti-SSA/Ro fueron los primeros en ser descritos como biomarcadores de enfermedades del tejido conectivo. Inicialmente, se los relacionó con el lupus eritematoso sistémico y el síndrome de Sjögren primario. Más tarde, su caracterización demostró que podían estar dirigidos frente a dos antígenos no relacionados estructuralmente: Ro52 y Ro60. El estudio de estas dos especificidades por separado evidenció que los anticuerpos anti-Ro52 podían detectarse en otras enfermedades, y por tanto, su valor como marcador diagnóstico es débil. Por otra parte, algunos trabajos han apuntado su posible relevancia como predictores de manifestaciones concretas en ciertas enfermedades tales como las miopatías inflamatorias con afectación intestinal y la esclerosis. La prevalencia de estas manifestaciones no ha sido suficientemente estudiada en otras enfermedades.

La proteína Ro52 está implicada en el control de la inflamación, la respuesta antiviral y la apoptosis. Los procesos inflamatorios inducen su sobreexpresión y la muerte celular facilita su reconocimiento por parte del sistema inmune. El microambiente del pulmón parece un lugar perfecto para la iniciación de la autoinmunidad frente a Ro52. Las infecciones respiratorias son frecuentes en todas las etapas de la vida y el contacto con irritantes es constante. Como cualquier otra mucosa, la tasa de renovación celular es elevada y está densamente poblada por células presentadoras de antígenos. La síntesis *in-situ* de autoanticuerpos ya se ha descrito en la piel, las glándulas salivares, el sistema nervioso central y la membrana sinovial. Pero hasta la fecha, no hay ningún trabajo que haya estudiado la presencia de autoanticuerpos en el lavado broncoalveolar.

Las enfermedades pulmonares intersticiales son un grupo heterogéneo de enfermedades que se caracterizan histológicamente por la presencia de fibrosis o inflamación del intersticio pulmonar. Por su elevada variabilidad y solapamiento, representan un reto diagnóstico que requiere un enfoque multidisciplinar. Actualmente, existe una carencia de biomarcadores capaces de diferenciar las diferentes enfermedades. Si fuera posible detectar la presencia de autoanticuerpos en el lavado broncoalveolar durante el debut de la enfermedad, serviría para establecer una base autoinmunitaria y podría ser una herramienta adicional en el manejo diagnóstico de estos pacientes.

4. HIPÓTESIS

Se establecieron las siguientes hipótesis de trabajo:

1. La presencia de autoanticuerpos dirigidos frente a Ro52 o Ro60 en suero de pacientes con enfermedades del tejido conectivo, se asocia con la aparición manifestaciones clínicas diferentes. Estas manifestaciones siguen un patrón órgano específico independientemente del diagnóstico del paciente.
2. La síntesis de autoanticuerpos relacionada con los procesos autoinmunes puede iniciarse en el parénquima pulmonar. Estos autoanticuerpos pueden ser detectados en el lavado broncoalveolar de pacientes con enfermedades pulmonares intersticiales y pueden ser de utilidad en el diagnóstico diferencial en los pacientes con EPID de debut.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo principal

Determinar el valor de los anticuerpos frente a especificidades SSA/Ro como marcadores diagnósticos en pacientes con enfermedades del tejido conectivo o enfermedades pulmonares intersticiales.

5.2. Objetivos secundarios

1. Estudiar la incidencia de diferentes manifestaciones clínicas en pacientes con ETCs (LES, SSp, SSc y PM-DM) atendiendo a la presencia de anticuerpos dirigidos frente a Ro52 o Ro60. Partiendo de estos datos de incidencia, intentar establecer un patrón de daño órgano/tejido específico relacionado con la aparición de estos autoanticuerpos.
2. Demostrar la presencia de anticuerpos anti-Ro52 y otros autoanticuerpos en LBA de pacientes con EPID durante el debut. En el caso de los ENAs, relacionar su aparición con el diagnóstico y la función respiratoria de los pacientes con parámetros clínicos, funcionales y radiológicos.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo consta de dos partes, cada una de las cuales intenta responder a uno de los objetivos específicos planteados. La primera, es un estudio retrospectivo basado en la revisión de historias clínicas y datos de laboratorio. Se intenta relacionar la presencia de autoanticuerpos con el desarrollo de manifestaciones concretas. La segunda parte, es un trabajo prospectivo en el que intentamos demostrar la presencia de autoanticuerpos en el LBA de pacientes con diversas formas de EPID. Para esto, adaptamos diferentes técnicas comerciales dirigidas a la detección de autoanticuerpos en suero. Paralelamente, se recogen datos clínicos de los pacientes que se relacionarán con la presencia de autoanticuerpos. Los resultados y la discusión se han redactado siguiendo este mismo esquema.

6.1 Utilidad pronóstica de las especificidades SSA/Ro en suero

- 6.1.1 Diseño del estudio
- 6.1.2 Sujetos del estudio
- 6.1.3 Recogida de datos
- 6.1.4 Análisis estadístico

6.1. Utilidad pronóstica de las especificidades SSA/Ro en suero.

6.1.1. Diseño del estudio

Estudio retrospectivo multicéntrico: 21 hospitales en España. La información clínica y los datos de laboratorio fueron obtenidos de la revisión de historias clínicas entre marzo de 2012 y diciembre de 2013.

6.1.2. Sujetos del estudio

La población objeto de estudio incluyó pacientes positivos para anticuerpos anti-SSA/Ro con diagnóstico confirmado de LES, SSp, SSc o PM. A través del sistema de gestión de información de laboratorio del HUGTiP, Modulab Gold (Werfen, Barcelona), se filtró el total de pacientes (n=1100) a los que se les había realizado la determinación de anticuerpos anti-SSA/Ro en el servicio de Inmunología del HUGTiP entre enero de 1999 y febrero de 2012. De estos, 363 fueron positivos para alguna de las especificidades. De los pacientes positivos, 215 cumplían el criterio de presentar un diagnóstico confirmado de LES, SSp, SSc o PM-DM. El resto de pacientes (n=358) se reclutaron a través del Grupo Español de Autoinmunidad (GEAI) vinculado a la Sociedad Española de Inmunología. La **tabla 11** muestra los pacientes aportados por cada uno de los

centros. En todos los casos, el diagnóstico fue establecido por un reumatólogo según los criterios del ACR y la Liga Europea contra el Reumatismo (EULAR)

(326)(327)(328)(329)

Tabla 11. Listado de centros participantes

Hospital	nº pacientes	Método de detección
Hospital Universitario Germans Trias i Pujol	215	Inmunoblot(1,2) + SS-A/Ro ELISA(2) o SS-A/Ro ELIA(3) o Ro-52 ELISA(1)
Complejo Hospitalario de Jaén	12	Inmunoblot (1)
Hospital Universitario Puerta del Mar Cadiz	24	Inmunoblot (1,2,4)
Corporació Sanitària i Universitària Parc Taulí	9	Inmunoblot (1) + SS-A/Ro ELISA (2)
Hospital San Pedro de Alcántara	23	Inmunoblot (1)
Hospital Universitario Nuestra Señora de la Candelaria	20	Inmunoblot (2)
Hospital Universitari Son Espases	20	Inmunoblot (2)+ SS-A/Ro ELISA (2)
Hospital Clínico Universitario de Valladolid	15	Inmunoblot (1) + SS-A/Ro ELISA (1)
Hospital de Sant Pau	16	Inmunoblot (1)
Hospital Infanta Cristina de Badajoz	16	Inmunoblot (1) + SS-A/Ro ELIA (3)
Complejo Asistencial Universitario de León	20	Inmunoblot (1)
Hospital Severo Ochoa Leganés	5	Inmunoblot (5) + SS-A/Ro ELISA (6)
Hospital Clínico Universitario de Valencia	20	Inmunoblot (2) + SS-A/Ro ELISA (2)
Hospital de Mérida	16	Inmunoblot (1,2)
Hospital clínico San Carlos de Madrid	17	Inmunoblot (1) + Luminex (8)
Hospital Fundación Jiménez Díaz	21	SS-A/Ro ELIA (3) + Ro-52 ELIA (3)
CATLAB	10	Inmunoblot (1) +SS-A/Ro ELISA (7) o Ro-52 ELISA (1)
Hospital Universitario Virgen de la Macarena	20	Inmunoblot (1) + SS-A/Ro ELISA (2)
Hospital Universitario Virgen del Rocío	17	Inmunoblot (2)
Hospital Universitario Donostia	20	Inmunoblot (2)
Hospital General de Jerez	37	Inmunoblot (2)
TOTAL=21	573	

Proveedor del reactivo: (1) Euroimmun, (2) Innova, (3) Phadia, (4) Innogenetics, (5) Alpha dia, (6) Menarino, (7) Immunoconcepts, (8) BioRad

6.1.3. Recogida de datos

6.1.3.1. Variables clínicas

Se diseñó una hoja de recogida de datos que incluía las principales manifestaciones clínicas de las enfermedades estudiadas. Las manifestaciones se agruparon según el órgano diana al que afectaban. Esta hoja se distribuyó a todos los centros participantes, y los resultados fueron revisados y transcritos a la base de datos en el HUGTIP. La **tabla 12** indica las manifestaciones estudiadas según órgano diana y enfermedad.

Tabla 12. Listado de las manifestaciones estudiadas

Cutáneas	LES: Eritema en heliotropo, LED*, LET*, LECS*, paniculitis, vasculitis leucocitoclástica, perniosis SS: Lesiones anulares, vasculitis leucocitoclástica SSc: Úlceras digitales PM-DM: Eritema en heliotropo, ulceraciones, signo de Gottron, manos de mecánico, calcificaciones
Hematológicas	LES: Trombosis, abortos, adenopatías, hepato/esplenomegalia, citopenia, anemia hemolítica coombs positiva SS: Anemia SSc: - PM-DM: -
Renales	LES: Hematuria, cilindruria, proteinuria, síndrome nefrótico, insuficiencia renal, diálisis SS: Nefritis intersticial, síndrome de Fanconi, nefrocalcinosis, diálisis SSc: Crisis renal esclerodérmica, diálisis PM-DM: -
Articulares	LES: Artromialgia, artritis, síndrome de Jaccoud, necrosis isquémica SS: Artromialgia, poliartritis SSc: Artritis, síndrome carpiano, miositis, osteolisis distal, calcificaciones PM-DM: Artralgia, artritis
Pulmonares	LES: Neumonía lúpica, enfermedad pulmonar intersticial, hemorragia intraalveolar masiva, síndrome de distres respiratorio del adulto, SS: Bronquiectasias, enfermedad pulmonar intersticial SSc: Enfermedad pulmonar intersticial, hipertensión pulmonar, alteraciones en CV o capacidad de difusión PM-DM: Disnea, neumonía linfocítica, bronquiolitis obliterante, enfermedad pulmonar intersticial
Cardíacas	LES: Miocarditis, endocarditis, arritmias, fallo cardíaco, infarto de miocardio, muerte súbita, bloqueo cardíaco congénito SS:- SSc: Hipertensión, pericarditis, fallo cardíaco, bloqueo cardíaco, arritmias, enfermedad pulmonar isquémica, fibrosis miocárdica PM-DM: Miocarditis, anomalías en el electrocardiograma, arritmias, fallo cardíaco
Tumores	LES: Linfoma SS: Linfoma SSc: Carcinoma alveolar o de células broncogénicas PM-DM: Cualquiera
Síndrome de Sica	En LES o SSc
Raynaud	En SLE, SS, SSc o PM-DM
Serositis	En LES

*LED (lupus eritematoso discoide), LET (lupus eritematosos túbido), LECS (lupus eritematoso cutáneo subagudo)

6.1.3.2. Determinación de autoanticuerpos

Al tratarse de un estudio retrospectivo y multicéntrico, no se pudo utilizar una única metodología para el estudio de anticuerpos anti-Ro52 y Ro60. Cada uno de los centros participantes utilizó su propio protocolo. Diez de los centros realizaron la determinación exclusivamente mediante inmunoblot, otros diez realizaron inmunoblot más una segunda técnica de confirmación (ELISA, ELIA o Luminex) y un único centro realizó únicamente ELISA. El proveedor de los reactivos también difirió según el centro y en algunos casos a lo largo del tiempo dentro del mismo centro. La **tabla 11** muestra el método y proveedor utilizado por cada uno de los centros.

Adicionalmente, se registraron los métodos utilizados para la detección de los autoanticuerpos, la fecha de la primera positividad, el patrón y título de los ANAs (cuando estos eran positivos) y la presencia de otros autoanticuerpos relacionados con ETCs.

6.1.4. Análisis estadístico

Todos los análisis fueron realizados utilizando el paquete estadístico SPSS 14.0. Las manifestaciones clínicas se definieron como variables dicotómicas (presencia o no de la manifestación). Para permitir comparar grupos de pacientes con diferentes diagnósticos y por tanto diferentes manifestaciones clínicas, estas manifestaciones se agruparon según el órgano/tejido al que afectan. De este modo se definió un nuevo grupo de variables dicotómicas que fueron el objeto del análisis estadístico.

Además de los tres grupos recogidos en la base de datos según las especificidades presentadas (Ro52+Ro60-, Ro52+Ro60+ y Ro52-Ro60+), se definieron otros dos grupos que incluyen todos los pacientes positivos para una especificidad concreta. El grupo de pacientes Ro52+ incluye los pacientes Ro52+Ro60- y los Ro52+Ro60+. El grupo de pacientes Ro60+ incluye los pacientes Ro52-Ro60+ y los Ro52+Ro60+.

Para cada uno de los grupos diagnósticos, se realizaron tres contrastes. En primer lugar se excluyeron a los pacientes Ro52+Ro60+ y se compararon los pacientes que solo eran positivos para una especificidad: Ro52+Ro60- frente a Ro52-Ro60+. Seguidamente se compararon los pacientes positivos para una especificidad frente a los negativos para esta: Ro52+ frente a Ro52-Ro60+ y Ro60+ frente a Ro52+Ro60-.

Las diferencias cualitativas entre grupos se estudiaron mediante el test de Chi-cuadrado o el test exacto de Fisher. Un valor de p inferior a 0.05 fue considerado como estadísticamente significativo. Dado que no todas las variables estudiadas eran independientes ⁽³³⁰⁾, no se aplicaron correcciones del valor p para comparaciones múltiples. Se realizó un estudio estratificado para evitar el efecto de posibles factores de confusión.

6.2 Detección de autoanticuerpos en lavado bronquioalveolar

6.2.1 Diseño del estudio

6.2.2 Pruebas de laboratorio

6.2.2.1 Recogida y procesamiento de las muestras

6.2.2.2 Estudio de poblaciones leucocitarias en LBA

6.2.2.3 Determinación de autoanticuerpos en suero

6.2.2.4 Determinación de autoanticuerpos en LBA mediante inmunoblot

6.2.2.5 Determinación de autoanticuerpos en LBA mediante ELISA

6.2.2.6 Determinación de ANAs en LBA mediante IFI

6.2.3 Análisis estadístico

6.2. Detección de autoanticuerpos en lavado broncoalveolar

6.2.1. Diseño del estudio

Estudio prospectivo longitudinal observacional que incluyó a pacientes con sospecha de EPID atendidos en la consulta monográfica de EPID en 2 Hospitales Universitarios (Hospital Universitari Germans Trias i Pujol y la Corporació Sanitària Parc Taulí) entre 2014 y 2019.

La selección de pacientes se realizó mediante un muestreo consecutivo con participación voluntaria. Ningún paciente rechazó participar en el estudio. Se incluyeron todos los pacientes de debut independientemente del patrón radiológico. También se incluyó un grupo de pacientes con diagnóstico establecido de ETC sin evidencia previa de EPID asociada.

La **tabla 13** resume las variables estudiadas. Los parámetros clínicos, radiológicos y anatomopatológicos fueron revisados por facultativos especialistas que conforman el comité multidisciplinar de EPID de los centros participantes ⁽³³¹⁾. El diagnóstico de EPID, se estableció de acuerdo con los documentos de consenso de la ATS /ERS ⁽³³²⁾⁽¹²¹⁾⁽²³⁸⁾⁽¹³⁴⁾.

El diagnóstico de ETC fue establecido por un reumatólogo a partir de un cuestionario clínico y del estudio inmunológico, según los criterios del ACR/EULAR ⁽³²⁶⁾⁽³²⁷⁾⁽³²⁸⁾⁽³²⁹⁾. El diagnóstico de IPAF fue establecido por un neumólogo siguiendo los criterios propuestos por la ERS/ATS/JRS/ALAT ⁽¹³⁴⁾.

Las muestras de LBA en controles fueron procedentes de pacientes que requirieron exploración con fibrobroncoscopia por hemoptisis menor sin evidencia por TCAR de enfermedad parenquimatosa.

La información recogida incluyó datos demográficos, historia de tabaquismo, antecedentes patológicos personales, familiares, laborales, de exposición ambiental, características clínicas funcionales y radiológicas.

La espirometría forzada, la medición de volúmenes pulmonares, la capacidad de difusión del monóxido de carbono (DLco) y la prueba de la marcha de 6 minutos (PM6M) fueron realizadas de acuerdo con las recomendaciones internacionales ⁽³³³⁾⁽³³⁴⁾, utilizando los valores de referencia publicados por Roca y colaboradores ⁽³³⁵⁾. El composite physiologic index (CPI) fue calculado por la siguiente fórmula: $91 - (0.65 \times \text{porcentaje de DLco predicho}) - (0.53 \times \text{porcentaje de la capacidad vital forzada (FVC) predicho}) + (0.34 \times \text{porcentaje del volumen espiratorio en el primer segundo (FEV1) predicho})$ ⁽³³⁶⁾.

Para el análisis de la mortalidad se registró la fecha de diagnóstico de EPID y la fecha de fallecimiento. Esta última se confirmó mediante la historia clínica digitalizada y/o del registro de mortalidad del hospital.

El estudio fue aprobado por el comité ético institucional de cada Hospital y todos los pacientes incluidos firmaron un consentimiento informado. Los derechos de los pacientes han sido protegidos por la declaración de Helsinki.

Tabla 13. Listado de las variables estudiadas

Epidemiológicos

Sexo (hombre/mujer)

Fecha de nacimiento

Tabaquismo (nunca fumador; exfumador; fumador activo)

Pruebas funcionales

FVC (% predicho)

FEV₁ (% predicho)

FEV₁/FVC (% predicho)

TLC (% predicho)

DL_{CO} (% predicho)

CPI

SatO₂ basal (mmHg)

PM6M (metros)

Escale de disnea MRCm (0-4)

Subpoblaciones linfocitarias en LBA (%)

Presencia de enfermedad del tejido conectivo (si/no)

Diagnóstico

Muerte (si/no)

6.2.2. Pruebas de laboratorio

6.2.2.1. Recogida, procesado y conservación de las muestras

El LBA se realizó a través de un fibrobroncoscopio flexible, mediante la técnica estandarizada descrita previamente ⁽³³⁷⁾. Las muestras fueron centrifugadas a 1200 G durante 10 minutos en las 24 horas posteriores a la extracción, el pellet fue descartado y los sobrenadantes se conservaron congelados a -20°C en alícuotas de 1.5 mL hasta su uso.

Las muestras de suero se obtuvieron mediante venopunción tras ayuno nocturno. Para obtener el suero, las muestras de sangre dejaron coagular y se centrifugaron a 1200 G durante 10 min. Se conservaron a 5°C durante una semana y se guardó una alícuota de seroteca a -20°C.

6.2.2.2. Estudio de poblaciones leucocitarias en LBA

Se determinó la concentración celular en un contador CELL-DYN Sapphire (Abbot, Alameda, California, US). Posteriormente se centrifugó la muestra y se estudió la distribución celular en dos frotis del precipitado teñidos mediante May-Grünwald Giemsa. Se cuantificó el porcentaje de MØ alveolares, linfocitos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Cuando el porcentaje de linfocitos superó el 20% se completó el estudio mediante citometría de flujo.

6.2.2.3. Determinación de autoanticuerpos en suero

En todos los pacientes se realizó un estudio de cribado de autoinmunidad que incluía la determinación de anticuerpos anti-nucleares (ANAs), factor reumatoide (FR), anticuerpos anti-DNA de doble cadena (DNADs) y anti-CCP.

- Los ANA se determinaron mediante IFI sobre sustrato Hep-2 (INOVA Diagnostics Inc, Barcelona, Spain) en un equipo QUANTA-Lyser®160 (INOVA Diagnostics Inc, Barcelona, Spain). Se consideraron positivos los títulos de 1/160 o superiores.
- Los ENAs se determinaron mediante CLIA (INOVA Diagnostics Inc, Barcelona, Spain) en un automatizador Bioflash (INOVA Diagnostics Inc, Barcelona, Spain).
- El FR se determinó mediante turbidimetría en un equipo COBAS (Roche Diagnostics GmbH, D-68298 Mannheim, Germany). Se consideran positivos los valores por encima de 20 UI/mL.
- Los anticuerpos anti-DNADs se determinaron mediante ELISA (Euroimmun, Lübeck, Germany) en un automatizador Triturus (Grifols Diagnostic, Barcelona, Spain). Se consideraron positivos los valores superiores a 100 UI/mL.
- Los anticuerpos anti anti-CCP se determinaron mediante ELISA (INOVA Diagnostics Inc, Barcelona, Spain) en un automatizador Triturus (Grifols Diagnostic, Barcelona, Spain). Se consideraron positivos los valores superiores a 20 UI/mL.

Siguiendo el protocolo establecido por el servicio de Inmunología del HUGTiP. En los pacientes con un resultado positivo en el estudio de ANA, se prosiguió con un estudio de especificidades mediante inmunoblot. Según el patrón de los ANAs y la sospecha diagnóstica codificada en la petición se optó por realizar la determinación de ENAs (Euroline ANA profile (IgG) kit. Euroimmun, Lübeck, Germany), anticuerpos relacionados con PM-DM (Euroline Autoimmune Inflammatory Myopathies 16 Ag PLUS. Euroimmun, Lübeck, Germany) o con SSc (Euroline Systemic Sclerosis (Nucleoli) Profile. Euroimmun, Lübeck, Germany). Los ensayos se realizaron en un automatizador de blots modelo EUROBlotMaster (Euroimmun, Lübeck, Germany) y se analizaron con el software EUROLineScan system (Euroimmun, Lübeck, Germany). En los tres casos la normalidad es la ausencia de positividades. En el apartado referente al estudio en LBA se puede ver una descripción del proceso.

6.2.2.4. **Determinación de autoanticuerpos en LBA mediante inmunoblot**

Las muestras se procesaron en un automatizador de blots modelo EUROBlotMaster (Euroimmun, Lübeck, Germany) siguiendo el protocolo del proveedor de las tiras de inmunoblot (**figura 3**). Se hicieron dos modificaciones de este protocolo. El fabricante recomienda utilizar una dilución 1:100 para estudiar muestras de suero y una 1:10 para LCR u otros líquidos biológicos. Sin embargo, para contrarrestar la elevada dilución de la muestra en suero fisiológico durante la broncoscopia se decidió partir de una dilución 1:1. Previamente se verificó la ausencia de un efecto matriz mediante la utilización de un control negativo compuesto por suero fisiológico y un control de diluyente en el que el diluyente de muestra se sustituyó por suero fisiológico. Ninguno de estos controles mostro desviaciones respecto al suero diluido en diluyente ni el control negativo (diluyente de muestra). Para el estudio de anticuerpos de clase IgA, el conjugado IgG suministrado por el proveedor se sustituyó por un conjugado IgA apto para inmunoblots suministrado por el mismo fabricante de los kits Euroimmun (Lübeck, Germany). Los resultados se evaluaron mediante el software EUROLineScan system (Euroimmun, Lübeck, Germany) que escanea las tiras de inmunoblot y valora la intensidad de las bandas positivas en relación a una banda patrón.

Dilución	Las muestras se procesaran sin diluir * Introducir las tiras reactivas en los canales de incubación Añadir 1.5 mL de tampón de muestra a cada canal de incubación Incubar 5 mins a temperatura ambiente (18-25°C) en un agitador de balanceo Tras este proceso la muestras estarán hidratadas y listas para su uso. Eliminar el tampón de muestra con una pipeta Pasteur **
Incubación 1	Añadir 1.5 mL de muestra sin diluir a cada canal de incubación * Incubar 30 minutos a temperatura ambiente (18-25°C) en un agitador de balanceo
Lavado	Extraer todo el líquido de cada canal Lavar 3 veces durante 5 min con 1.5 mL de tampón de lavado en un agitador de balanceo
Incubación 2	Añadir 1,5 mL de conjugado enzimático (anti-IgG o IgA marcado con fosfatasa alcalina) a cada canal de incubación *** Incubar 30 minutos a temperatura ambiente (18-25°C) en un agitador de balanceo
Lavado	Extraer todo el líquido de cada canal Lavar 3 veces durante 5 min con 1.5 mL de tampón de lavado en un agitador de balanceo
Incubación 3	Añadir 1,5 mL de sustrato a cada canal de incubación Incubar 10 minutos a temperatura ambiente (18-25°C) en un agitador de balanceo
Lavado	Extraer todo el líquido de cada canal Lavar 3 veces durante 5 min con 1.5 mL de tampón de lavado en un agitador de balanceo
Parada	Extraer todo el líquido de cada canal de ensayo Lavar 3 veces durante 1 minuto con agua destilada
Evaluación	Dejar secar las tiras, presentar en la plantilla de evaluación Escanear y evaluar el resultado

Fig 3. Procedimiento analítico inmunoblots

Adaptado del insert del producto: El proceso se automatizó mediante el uso de un equipo EUROBlotMaster siguiendo el programa Euro01 AAb EL30 aplicando las siguientes modificaciones

* A diferencia de lo recomendado para suero u otros líquidos biológicos las muestras se procesaron sin diluir

** A diferencia de lo recomendado para suero u otros líquidos biológicos las muestras se procesaron sin diluir

*** A diferencia de lo recomendado para suero u otros líquidos biológicos las muestras se procesaron sin diluir

Las muestras se consideraron positivas para una especificidad cuando el software las evaluó como positividad intermedia (intensidad de la banda 26-50) o positividad alta (intensidad de la banda >50). Adicionalmente, se realizó una inspección ocular de las tiras para descartar posibles tinciones artefactuales y los resultados dudosos fueron reanalizados. Una de las muestras (paciente 48) no pudo ser valorada por presentar repetidamente un exceso de tinción. La **figura 4** muestra un ejemplo de tiras positivas con diferentes intensidades.

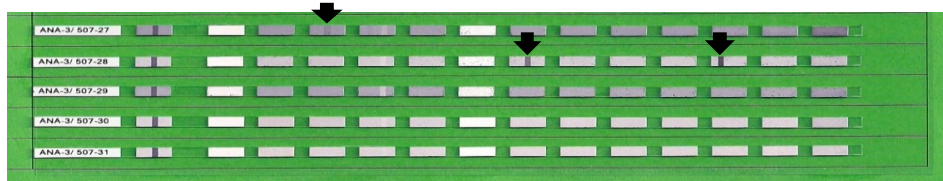


Figura 4. Ejemplo de resultados de blot.

La tira superior muestra una banda de intensidad débil que el software interpreta como +, esta banda fue interpretado como negativo. La segunda tira muestra dos bandas de intensidad fuerte que el software interpreta como ++ (izquierda) y +++ (derecha) estas bandas fueron interpretadas como positivas. Las tres tiras inferiores no presentaron ninguna banda positiva.

En todos los pacientes se realizó un cribado de ENAs de clase IgG mediante inmunoblot utilizando el reactivo Euroline ANA profile (IgG) kit (Lübeck, Germany). Este reactivo permite estudiar simultáneamente los siguientes 15 autoanticuerpos: AMA-2 (anticuerpo anti-mitocondrial-2), ribosomal-p, histonas, nucleosoma, dsDNA, PCNA, CENP-B, Jo-1, Pm100, Scl-70, SSB, Ro-52, SSA, Sm y Sm/RNP. En los primeros 15 pacientes se realizó esta misma determinación con un conjugado de clase IgA. Tras comprobar que los únicos pacientes positivos con este conjugado eran los que presentaban positividad para anticuerpos de clase IgG y que la positividad fue en todos los casos inferior se optó por realizar la determinación con conjugado IgA únicamente en las muestras positivas para anticuerpos de clase IgG. Finalmente, para

cuantificar la concentración de anticuerpo en las muestras con positividad alta, se realizaron diluciones seriadas 1:10 de una muestra que presentaba una positividad muy intensa para un marcador y moderada para otros.

Adicionalmente, en los pacientes en los que posteriormente se diagnosticó PM-DM que presentaron autoanticuerpos relacionados con PM-DM en la tira de ENAs, se realizó un estudio con conjugado IgG y el reactivo Euroline Autoimmune Inflammatory Myopathies 16 Ag PLUS (Euroimmun, Lübeck, Germany). Este reactivo permite determinar simultáneamente los siguientes 16 autoanticuerpos: Ro52, OJ, EJ, PL-12, PL-7, SRP, Jo-1, Pm75, Pm100, Ku, SAE1, NXP2, MDA5, TIF1g, Mi-2b y Mi-2a.

En los pacientes en los que posteriormente se diagnosticó SSc o con autoanticuerpos relacionados con SSc en la tira de ENAs, se realizó un estudio con conjugado IgG y el reactivo Euroline Systemic Sclerosis (Nucleoli) Profile (Euroimmun, Lübeck, Germany). Este reactivo permite determinar simultáneamente los siguientes 13 anticuerpos: Ro-52, PDGFR, Ku, Pm75, Pm100, Th/To, Nor90, fibrilarina, RNAPol155, RNAPol11, CENP-B, CENP-A y Scl-70.

En los pacientes en los que posteriormente se diagnosticó vasculitis ANCA positiva, se realizó un estudio con conjugado IgG y el reactivo Euroline MPO/PR3/GBM Profile (Euroimmun, Lübeck, Germany). Este reactivo permite determinar simultáneamente los siguientes 3 anticuerpos: MPO, PR3 y MBG.

6.2.2.5. Determinación de autoanticuerpos en LBA mediante ELISA

La presencia de anticuerpos anti-CCP, FR-IgM y FR-IgA se estudió mediante ELISA (Euroimmun, Lübeck, Germany) en 7 pacientes con diagnóstico de EPID asociada AR. Como control negativo se utilizaron 17 pacientes con diferentes diagnósticos (2 EPID asociada al tabaquismo; 5 FPI; 3 NINE idiopática; 7 otros diagnósticos). Los ensayos se realizaron manualmente siguiendo el protocolo propuesto en por el fabricante (**figura 5**). Las absorbancias obtenidas se midieron en un automatizador de ELISAs modelo Triturus (Grifols, Barcelona, Spain). Las muestras controles y calibradores se montaron por duplicado. Por el motivo ya expuesto en los ensayos mediante inmunoblot las muestras se procesaron sin diluir en lugar de usar la dilución 1:100 (FR) o 1:200 (CCP) propuestos por el proveedor, no hubo otras desviaciones respecto al protocolo. Para estudiar el efecto matriz se utilizó una muestra de suero altamente positiva para CCP y FR proveniente de un paciente con AR; este suero se diluyó en buffer de dilución y suero salino, no se observaron diferencias entre ambas matrices. Las muestras se consideraron positivas cuando el ratio entre la absorbancia del calibrador 2 (5 UR/mL para anti-CCP; 20 UR/mL para FR-IgA y FR-IgM) y las muestras fue superior a 1,2.

Dilución	Las muestras se procesaran sin diluir *
Incubación 1	Añadir 100 µl de los controles, calibradores y muestras sin diluir a cada canal de incubación * Incubar 30 min (para el FR) o 60 min (para el CCP) a temperatura ambiente (18-25°C)
Lavado	Vaciar los pocillos de reactivo Lavar 3 veces durante 1 min con 300 µl de agua destilada
Incubación 2	Añadir 100 µl de conjugado enzimático (anti-IgG, IgA o IgM humano marcado con fosfatasa alcalina) a cada pocillo Incubar 30 minutos a temperatura ambiente (18-25°C)
Lavado	Vaciar los pocillos de reactivo Lavar 3 veces durante 1 min con 300 µl de agua destilada
Incubación 3	Añadir 100 µl de la solución de sustrato a cada pocillo Incubar a oscuras 15 min (para el FR) o 30 min (para el CCP) a temperatura ambiente (18-25°C)
Parada	Añadir 100 µl de la solución de parada a cada pocillo
Medición	Leer la intensidad de color a través de un fotómetro con una longitud de onda de medición de 450 nm y una longitud de onda de referencia de entre 620 y 650 nm

Fig 5. Procedimiento analítico ELISAs

Adaptado del insert del producto

* A diferencia de lo recomendado para suero las muestras se procesaron sin diluir

6.2.2.6. Determinación de ANAs en LBA mediante IFI

Para validar los hallazgos del estudio mediante inmunoblot se realizó una verificación mediante IFI de algunas de las muestras positivas. Las muestras fueron estudiadas sobre un sustrato Hep-2 (INOVA Diagnostics Inc, Barcelona, Spain) en un equipo QUANTA-Lyser®160 (INOVA Diagnostics Inc, Barcelona, Spain), utilizando un conjugado IgG. En lugar de la dilución 1:80 que está establecida para la determinación de ANAs en suero se utilizaron las diluciones 1:1 y 1:2. Aparte de esto, no se hizo ninguna otra modificación respecto al protocolo para determinar ANAs en suero (**figura 6**). Las imágenes se obtuvieron a través de un microscopio de fluorescencia modelo Axioskop2 (Carl Zeiss Microscopy, NY, USA) conectado a una cámara modelo Ds Vi3 (Nikon, Yokohama, Japan).

Dilución	Las muestras se procesaran sin diluir *
Incubación 1	Dispensar 25 µl de los controles, calibradores y muestras sin diluir en los portaobjetos* Incubar 30 min en una camara húmeda a temperatura ambiente (18-25°C)
Lavado	Lavar con PBS en exceso evitando dañar el sustrato
Incubación 2	Eliminar el exceso de PBS y dispensar inmediatamente 25 µl de conjugado fluorescente a cada pocillo Incubar 30 minutos a temperatura ambiente (18-25°C)
Lavado	Lavar con PBS en exceso evitando dañar el sustrato
Montaje	Dispensar dos gotas de medio de montaje y cubrir las muestras con un cubreobjetos
Lectura	Interpretar el patrón e intensidad de fluorescencia en un microscopio de fluorescencia en las 24h posteriores a la finalización del montaje

Fig 6. Procedimiento analítico IFI

Adaptado del insert del producto.

* A diferencia de lo recomendado para suero las muestras se procesaron sin diluir

Las muestras seleccionadas presentaban especificidades asociadas a patrones ANA características (**Tabla 14**).

Tabla 14. Relación de sueros seleccionados para realizar el estudio mediante IFI

nº de paciente	Anticuerpos detectados	Diagnóstico	Sustrato IFI
Paciente 6	PR3	PAN	ANCA
Paciente 7	Ro52, Jo-1	Polimiositis	ANA
Paciente 12	Ro52, SS-A, SS-B	Síndrome de Sjögren	ANA
Paciente 19	CENP-B	Esclerosis sistémica	ANA
Paciente 27	Ro52, SS-A, SS-B	Polimiositis	ANA
Paciente 30	PR3	Síndrome de Chugstrauss	ANCA
Paciente 54	SAE1	Dermatomiositis	ANA
Paciente 62	Sm/RNP	EMTC	ANA
Paciente 102	Sm/RNP	EMTC	ANA

EMTC: enfermedad mixta del tejido conectivo; PAN: poliarteritis nodosa

6.2.3. Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de los datos en el que las variables categóricas se describieron mediante las frecuencias relativas y las variables continuas

mediante la media (\bar{X}) \pm desviación estándar (σ) y/o la mediana (M_e) y rango intercuartílico (RIQ). Adicionalmente, se realizaron contrastes de hipótesis para buscar diferencias entre los pacientes con ETC-EPID o IPAF. La variable dependiente fue la presencia o no de ENAs en el lavado broncoalveolar, el resto de parámetros fueron las variables independientes. En el caso de las variables cuantitativas o cualitativas ordinales, previamente se realizó un test de normalidad de la varianza (test de Kolmogorov-Smirnov). Cuando la distribución de las variables fue normal se prosiguió con un test de comparación de medias (t de Student para muestras independientes). Cuando la distribución fue no normal, se utilizó el equivalente no paramétrico (U de de Mann-Whitney para muestras independientes). En el caso de las variables cualitativas, se utilizaron tablas de contingencia y el estadístico chi-cuadrado de Pearson. En todos los casos un valor de p inferior a 0.05 fue considerado como estadísticamente significativo. Se aplicó la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples al estudiar varias variables correspondientes a una misma categoría. No disponemos de potencia estadística para buscar relaciones entre el diagnóstico clínico y radiológico y la aparición de autoanticuerpos concretos. Todos los análisis fueron realizados utilizando el paquete estadístico SPSS 14.0. La **tabla 15** resume las variables estudiadas junto a los estadísticos descriptivos y los test usados para su estudio.

Tabla 15. Listado de variables y test estadístico utilizado

Variable	Tipo	Descriptivos	Estadístico
Edad	cuantitativa	$\bar{X} \pm \sigma$	t de student
Sexo (H/M)	cualitativo	frecuencia	χ^2 de Pearson
Tabaquismo (activo/exfumador/nunca)	cualitativo	frecuencia	χ^2 de Pearson
Disnea MRCm (0/1/2/3/4)	ordinal	M_e (RIQ)	U Mann-Whitney
FVC (% predicho)	cuantitativa	$\bar{X} \pm \sigma$	t de student
FEV ₁ (% predicho)	cuantitativa	$\bar{X} \pm \sigma$	t de student
FEV ₁ /FVC (% predicho)	cuantitativa	$\bar{X} \pm \sigma$	t de student
TLC (% predicho)	cuantitativa	$\bar{X} \pm \sigma$	t de student
DL _{CO} (% predicho)	cuantitativa	$\bar{X} \pm \sigma$	t de student
CPI	cuantitativa	$\bar{X} \pm \sigma$	t de student
SatO ₂ basal (mm/Hg)	cuantitativa	M_e (RIQ)	U Mann-Whitney
PM6M (metros)	cuantitativa	$\bar{X} \pm \sigma$	t de student
SatO ₂ final (mm/Hg)	cuantitativa	$\bar{X} \pm \sigma$	t de student
% Macrófagos	cuantitativa	$\bar{X} \pm \sigma$	t de student
% Linfocitos	cuantitativa	M_e (RIQ)	U Mann-Whitney
% Neutrófilos	cuantitativa	$\bar{X} \pm \sigma$	t de student
% Eosinófilos	cuantitativa	M_e (RIQ)	U Mann-Whitney
% Basófilos	cuantitativa	M_e (RIQ)	U Mann-Whitney

En el caso de los ANAs y del resto de especificidades estudiadas, debido al bajo tamaño muestral, nos hemos limitado a realizar un estudio descriptivo.

7. RESULTADOS

7.1 Utilidad pronóstica de las especificidades SSA/Ro en suero

- 7.1.1 Composición de la serie del HUGTiP
- 7.1.2 Composición de la serie
- 7.1.3 Prevalencia de las manifestaciones por órganos o sistemas
 - 7.1.3.1 Manifestaciones pulmonares
 - 7.1.3.2 Fenómeno de Raynaud
 - 7.1.3.3 Síndrome seco
 - 7.1.3.4 Manifestaciones articulares
 - 7.1.3.5 Manifestaciones cutaneas
 - 7.1.3.6 Serositis
 - 7.1.3.5 Manifestaciones renales
 - 7.1.3.5 Tumors
 - 7.1.3.5 Manifestaciones cardiacas

7.1. Utilidad pronóstica de las especificidades SSA/Ro en suero.

7.1.1. Composición de la serie del HUGTiP

La **figura 7** muestra los diagnósticos que presentaron los pacientes del HUGTiP positivos para anticuerpos anti-SSA/Ro en un periodo de 10 años (1999-2009). No todos los pacientes presentaron ETCs, siendo las hepatopatías, el segundo grupo de diagnósticos más frecuentes. Un porcentaje significativo, de los pacientes con rasgos autoinmunes no cumplía criterios de ninguna ETC en el momento del diagnóstico. Esta primera aproximación, nos permitió seleccionar las enfermedades en las que centraríamos nuestra investigación (LES, SSp, SSc y PM-DM).

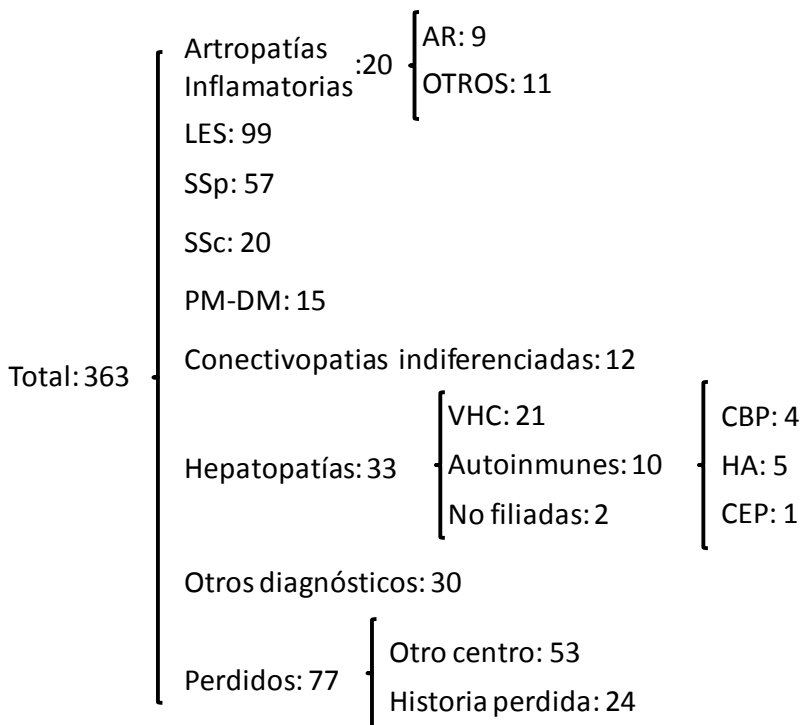


Fig. 7 Diagnósticos asociados a la serie total de pacientes del HUGTiP

CBP: cirrosis biliar primaria; HA: hepatitis autoinmune; CEP: colangitis esclerosante primaria

7.1.2. Composición de la serie

Se analizaron 518 pacientes cuyos sueros presentaron positividad para anticuerpos anti-Ro60 o Ro-52. De estos, sesenta y seis (12.7 %) resultaron positivos únicamente para Ro60 (grupo Ro60+), 163 (31.5%) frente a Ro52 (grupo Ro52+) y 289 (55.8 %) frente a ambas especificidades (grupo Ro52+Ro60+). Los diagnósticos fueron: LES (n=318), SSp (n=133), PM-DM (n=29), SSc (n=38).

El grupo Ro52+ incluyó LES (45.4%, n=74), SSp (23.3%, n=38), SSc (16.0% n=26) y PM-DM (15.3%, n=25). El grupo Ro52+Ro60+ está compuesto principalmente por LES (65.1%, n=188) y SSp (30.8%, n=89) pero también SSc (3.8%, n=11) y PM-DM (0.3%, n=1). El grupo Ro60+ incluye LES (84.8%, n=56), SSp (9.1%, n=6), SSc (1.5%, n=1) y PM-DM (4.5%, n=3). Estos resultados están resumidos en las **figuras 8 y 9**.

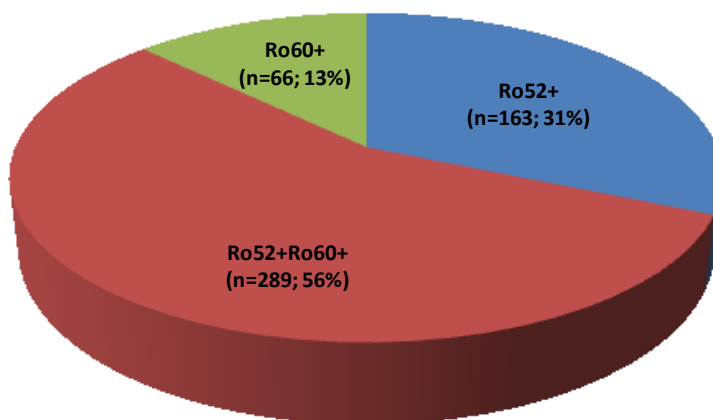


Figura 8. Pacientes según especificidad El gráfico representa el número y porcentaje de pacientes positivos para cada una de las especificidades Ro52 y Ro60 del total de pacientes

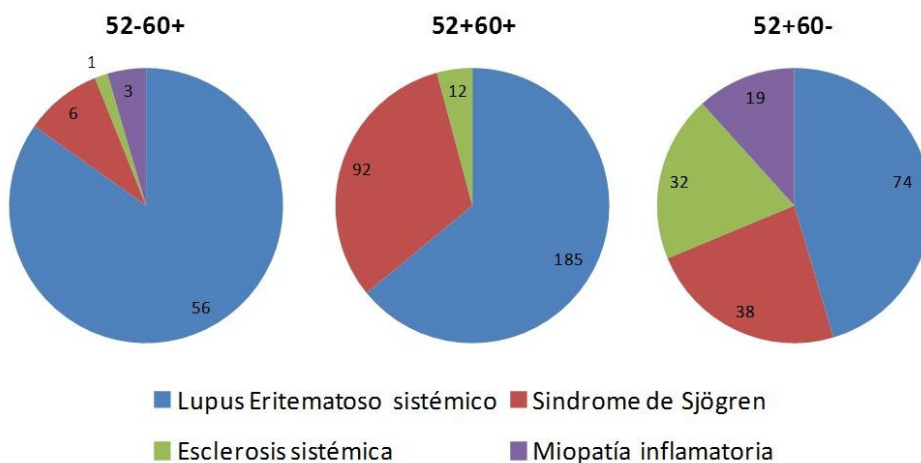


Figura 9. Pacientes según diagnóstico El gráfico representa el número de pacientes según patología positivos para anticuerpos anti-Ro52 o Ro60

La **tabla 16** muestra el total de pacientes estudiados para cada diagnóstico y la especificidad para los que son positivos. La prevalencia de una manifestación o un grupo de manifestaciones se obtiene de dividir el recuento de pacientes positivos para esta manifestación entre el total. Para reflejar las dos etapas del estudio, los datos de la serie del HUGTiP se presentarán en paralelo a los de la serie total.

Tabla 16: Distribución de los pacientes por diagnóstico y especificidad

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
LES	74 (24)	185 (59)	56 (15)	315 (98)
SSp	38 (17)	92 (41)	6 (2)	136 (60)
SSc	32 (14)	12 (3)	1 (0)	45 (17)
PM-DM	19 (14)	0 (0)	3 (0)	22 (14)
Totales	163 (69)	289 (103)	66 (17)	518 (189)

*Entre paréntesis los resultados de la serie del HUGTiP

7.1.3. Prevalencia de las manifestaciones por órganos o sistemas

A continuación, se describe la prevalencia de las diferentes manifestaciones según el diagnóstico y grupo. Aquellas en las que se han observado mayores diferencias son las primeras en enumerarse. Para facilitar su comprensión se unificaron las tablas y diagramas de barras en una única figura. Las tablas de la muestran el número total de pacientes positivos para cada uno de los diagnósticos y grupos, así como el porcentaje respecto al total de pacientes. En los gráficos se representan los porcentajes mediante un diagrama de barras, tanto de la cohorte de pacientes del HUGTiP como del total de centros. Esta estructura se ha utilizado en todas las manifestaciones. Los datos estadísticos para todas las manifestaciones aparecen resumidos al final de esta sección en la **tabla 17**.

7.1.3.1. Manifestaciones pulmonares

La serie de pacientes del HUGTiP, no incluía ningún paciente con afectación pulmonar y anticuerpos anti-Ro60. Esta serie mostró un aumento significativo de las manifestaciones pulmonares en los pacientes entre los Ro52+ respecto a los Ro52-Ro60+, la correlación es todavía mayor al comparar los Ro52+Ro60- respecto a los Ro52-Ro60+. Estos resultados se confirmaron en la serie global.

Los resultados no son consecuencia de la sobrerrepresentación en el grupo Ro52+ del SSc y la PM-DM donde la afectación pulmonar intersticial es muy prevalente. Debido a que en el grupo de los LES, donde la afectación pulmonar intersticial es infrecuente, las diferencias se mantienen. La **figura 10** resume los resultados obtenidos.

Resultados

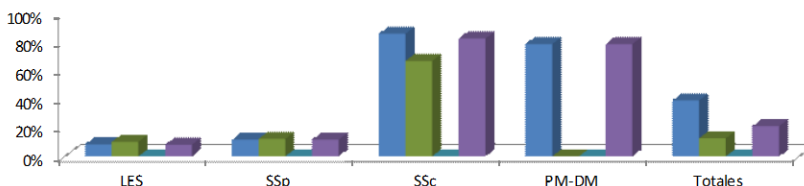
a) Número de pacientes en HUGTiP

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
LES	2	6	0	8
SSp	2	5	0	7
SSc	12	2	0	14
PM-DM	11	0	0	11
Totales	27	13	0	40

b) Porcentaje en HUGTiP

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
LES	8,3%	10,2%	0,0%	8,2%
SSp	11,8%	12,2%	0,0%	11,7%
SSc	85,7%	66,7%	-	82,4%
PM-DM	78,6%	-	-	78,6%
Totales	39,1%	12,6%	0,0%	21,2%

c) Porcentajes HUGTiP



d) Número de pacientes en el total de centros

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
LES	7	19	2	28
SSp	7	10	2	19
SSc	22	6	0	28
PM-DM	18	0	3	21
Totales	54	35	7	96

e) Porcentaje en el total de centros

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
LES	9,5%	10,3%	3,6%	8,9%
SSp	18,4%	10,9%	33,3%	14,0%
SSc	68,8%	50,0%	0,0%	62,2%
PM-DM	94,7%	-	100,0%	95,5%
Totales	33,1%	12,1%	10,6%	18,5%

f) Porcentaje total de centros

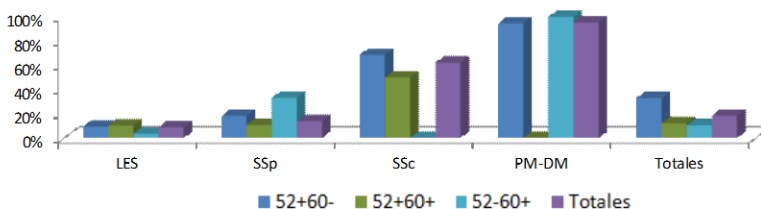


Figura 10. Prevalencia de las manifestaciones pulmonares según su positividad para anticuerpos anti-Ro52 y Ro60 en suero

7.1.3.2. Fenómeno de Raynaud

La serie de pacientes del HUGTiP evidenció un aumento significativo del fenómeno de Raynaud entre los pacientes Ro52+ respecto a los Ro52-Ro60+,

la correlación es todavía mayor al comparar los Ro52+Ro60- respecto a los Ro52-Ro60+. Estos resultados se confirmaron en la serie global. En el grupo de los LES, las diferencias se mantienen. La **figura 11** resume los resultados obtenidos.

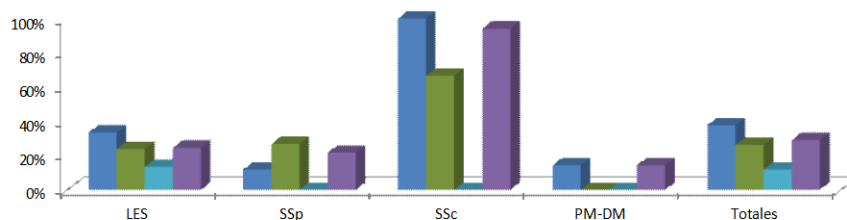
a) Número de pacientes en HUGTiP

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
LES	8	14	2	24
SSp	2	11	0	13
SSc	14	2	0	16
PM-DM	2	0	0	2
Totales	26	27	2	55

b) Percentage en HUGTiP

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
LES	33,3%	23,7%	13,3%	24,5%
SSp	11,8%	26,8%	0,0%	21,7%
SSc	100,0%	66,7%	-	94,1%
PM-DM	14,3%	-	-	14,3%
Totales	37,7%	26,2%	11,8%	29,1%

c) Percentage HUGTiP



d) Número de pacientes en el total de centros

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
LES	18	45	6	69
SSp	9	16	1	26
SSc	28	9	1	38
PM-DM	4	0	0	4
Totales	59	70	8	137

d) Percentage en el total de centros

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
LES	24,3%	24,3%	10,7%	21,9%
SSp	23,7%	17,4%	16,7%	19,1%
SSc	87,5%	75,0%	100,0%	84,4%
PM-DM	21,1%	-	0,0%	18,2%
Totales	36,2%	24,2%	12,1%	26,4%

f) Percentage total de centros

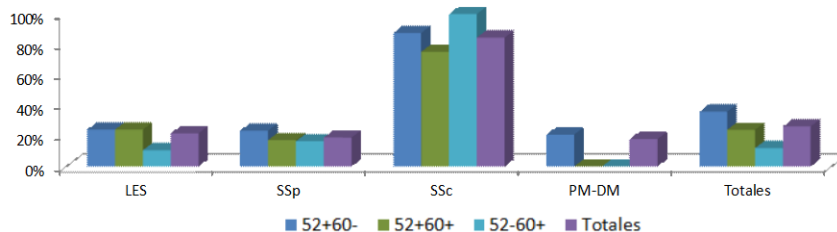


Figura 11. Prevalencia del fenómeno de Raynaud según su positividad para anticuerpos anti-Ro52 y Ro60 en suero

7.1.3.3. **Manifestaciones articulares**

La serie del HUGTiP evidenció un aumento en la aparición de la afectación articular en los pacientes Ro52+ respecto a los Ro52-Ro60+ independientemente del diagnóstico. Aunque estos resultados no pudieron corroborarse en la serie global, si se constató un aumento de las manifestaciones articulares y principalmente de la artritis en los pacientes Ro52+ con LES y en menor medida en el SSp (**figura 12**).

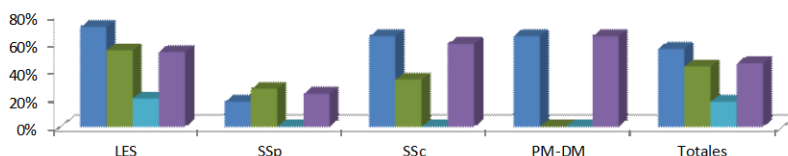
a) Número de pacientes en HUGTiP

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
LES	17	32	3	52
SSp	3	11	0	14
SSc	9	1	0	10
PM-DM	9	0	0	9
Totales	38	44	3	85

b) Porcentaje en HUGTiP

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
LES	70,8%	54,2%	20,0%	53,1%
SSp	17,6%	26,8%	0,0%	23,3%
SSc	64,3%	33,3%	-	58,8%
PM-DM	64,3%	-	-	64,3%
Totales	55,1%	42,7%	17,6%	45,0%

c) Porcentaje HUGTiP



d) Número de pacientes en el total de centros

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
LES	60	151	37	248
SSp	22	61	3	86
SSc	11	5	1	17
PM-DM	18	0	3	21
Totales	111	217	44	372

d) Porcentaje en el total de centros

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
LES	81,1%	81,6%	66,1%	78,7%
SSp	57,9%	66,3%	50,0%	63,2%
SSc	34,4%	41,7%	100,0%	37,8%
PM-DM	94,7%	-	100,0%	95,5%
Totales	68,1%	75,1%	66,7%	71,8%

f) Porcentaje total de centros

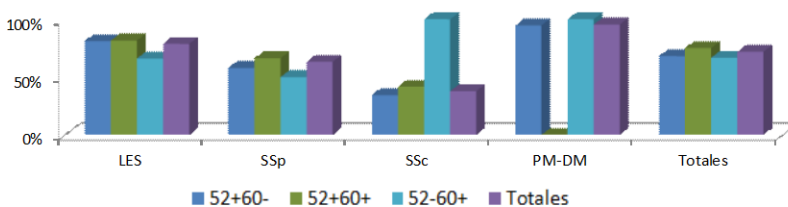


Figura 12. Prevalencia de las manifestaciones articulares según su positividad para anticuerpos anti-Ro52 y Ro60 en suero

En cambio, en los pacientes con SSp encontramos un aumento de la artritis en los pacientes Ro52-Ro60+ respecto a los Ro52+ (**figura 13**). Para valorar esta incongruencia entre los resultados del LES y el SSp hay que tener en cuenta que el grupo de SSp Ro52-Ro60+ solo incluye 6 pacientes.

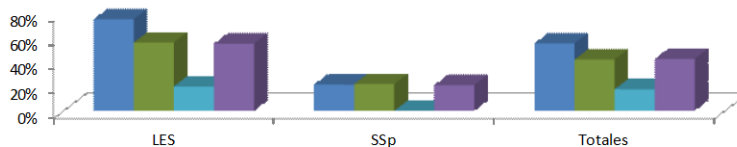
a) Número de pacientes en HUGTiP

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
LES	18	33	3	54
SSp	3	9	0	12
Totales	21	42	3	66

b) Porcentaje en HUGTiP

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
LES	75,0%	55,9%	20,0%	55,1%
SSp	21,4%	22,0%	0,0%	21,1%
Totales	55,3%	42,0%	17,6%	42,6%

c) Porcentaje HUGTiP



d) Número de pacientes en el total de centros

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
LES	36	78	14	128
SSp	6	22	2	30
Totales	42	100	16	158

d) Porcentaje en el total de centros

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
LES	48,6%	42,2%	25,0%	40,6%
SSp	15,8%	23,9%	33,3%	22,1%
Totales	37,5%	36,1%	25,8%	35,0%

f) Porcentaje total de centros

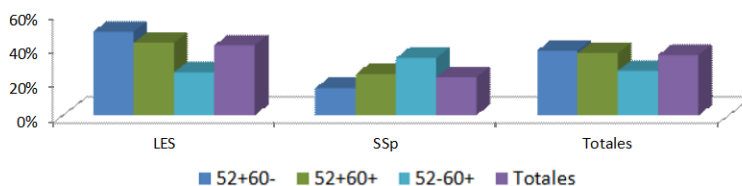


Figura 13. Prevalencia de la artritis según su positividad para anticuerpos anti-Ro52 y Ro60 en suero

La artropatía de Jaccoud solamente está presente en pacientes Ro52+ pero el tamaño muestral es insuficiente para detectar significación estadística (**figura 14**).

a) Número de pacientes en HUGTiP

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
Artropatía de Jaccoud	0	2	0	2

b) Porcentaje en HUGTiP

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
Artropatía de Jaccoud	0,0%	3,4%	0,0%	2,0%

d) Número de pacientes en el total de centros

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
Artropatía de Jaccoud	3	5	0	8

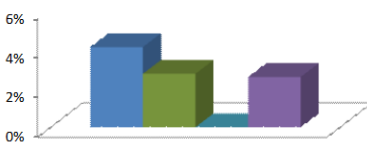
d) Porcentaje en el total de centros

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
Artropatía de Jaccoud	4,1%	2,7%	0,0%	2,5%



c) Percentage HUGTiP

■ 52+60- ■ 52+60+ ■ 52-60+ ■ Totales



e) Percentage en el total de centros

Figura 14. Prevalencia de la artropatía de Jaccoud según su positividad para anticuerpos anti-Ro52 y Ro60 en suero

7.1.3.4. Síndrome seco

La probabilidad de presentar un síndrome seco secundario está aumentada en los pacientes Ro52+ y especialmente en los Ro52+Ro60+ en comparación con los Ro60+ (**figura 15**).

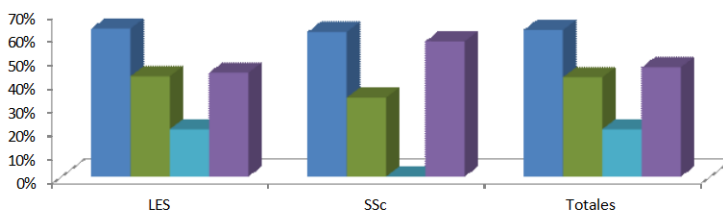
a) Número de pacientes en HUGTiP

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
LES	15	25	3	43
SSc	11	1	0	12
Totales	26	26	3	55

b) Porcentaje en HUGTiP

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
LES	62,5%	42,4%	20,0%	43,9%
SSc	61,1%	33,3%	0,0%	57,1%
Totales	61,9%	41,9%	20,0%	46,2%

c) Porcentaje HUGTiP



d) Número de pacientes en el total de centros

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
LES	29	77	13	119
SSc	18	6	0	24
Totales	47	83	13	143

d) Porcentaje en el total de centros

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
LES	39,2%	41,6%	23,2%	37,8%
SSc	56,3%	50,0%	0,0%	53,3%
Totales	44,3%	42,1%	22,8%	39,7%

f) Porcentaje total de centros

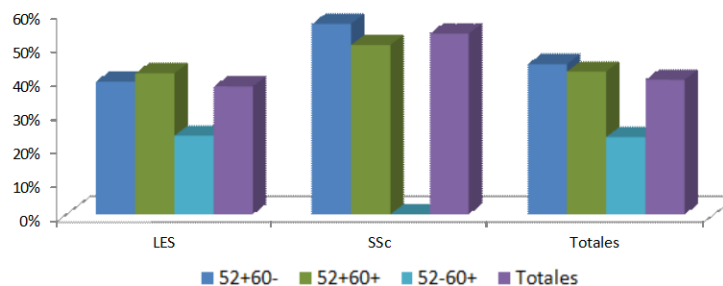


Figura 15. Prevalencia de síndrome seco secundario en otras ETCs según su positividad para anticuerpos anti-Ro52 y Ro60 en suero

Los anticuerpos anti-Ro52 aparecen en la práctica totalidad de pacientes con diagnóstico de síndrome de Sjögren primario. Y si bien la mayoría de los Sjögren fueron positivos para ambas especificidades, menos de un 5% presentaron anticuerpos anti-Ro60 de forma aislada (**figura 16**).

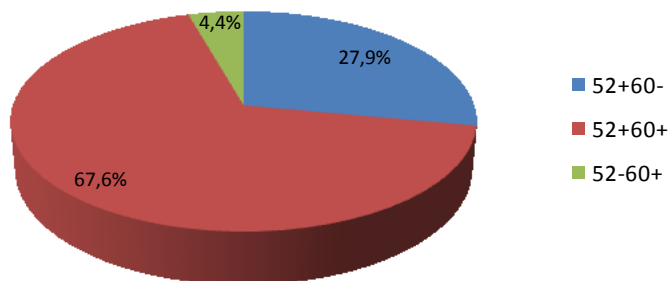


Figura 16. Frecuencia de las diferentes especificidades en los pacientes con SSP

7.1.3.5. Manifestaciones cutáneas

Debido a su especial heterogeneidad, las manifestaciones cutáneas se estudiaron por separado en las cuatro enfermedades. No se encontraron diferencias en la aparición de lesiones anulares ni de vasculitis leucocitoclástica en el SS. Tampoco del eritema en heliotropo, ulceraciones, calcificaciones, manos de mecánico ni signo de Gottron en la DM. En el LES, los pacientes Ro60+ presentaron globalmente más afectación cutánea que los Ro52+Ro60-. Estas diferencias se explican principalmente por el aumento en la aparición de LECS. Cuando se estudiaron por separado la forma anular y papular del LECS no se encontraron diferencias en la frecuencia de aparición. También se aprecia un aumento en la aparición de LED en los pacientes Ro52-Ro60+ y de la perniois en los Ro52+, sin embargo, la baja prevalencia de estas manifestaciones no permite demostrar la existencia de diferencias significativas. Tampoco se encontraron diferencias en la aparición del exantema malar (**figura 17**).

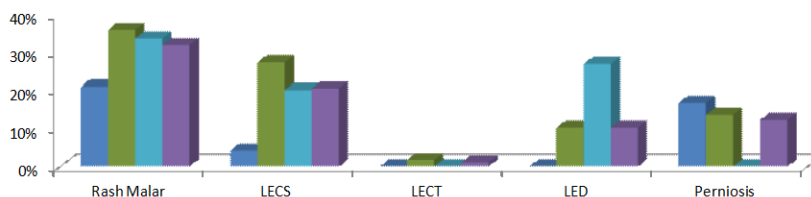
a) Número de pacientes en HUGTiP

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
Rash Malar	5	21	5	31
LECS	1	16	3	20
LECT	0	1	0	1
LED	0	6	4	10
Perniosis	4	8	0	12

b) Porcentaje en HUGTiP

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
Rash Malar	20,8%	35,6%	33,3%	31,6%
LECS	4,2%	27,1%	20,0%	20,4%
LECT	0,0%	1,7%	0,0%	1,0%
LED	0,0%	10,2%	26,7%	10,2%
Perniosis	16,7%	13,6%	0,0%	12,2%

c) Porcentaje HUGTiP



d) Número de pacientes en el total de centros

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
Rash Malar	21	71	18	110
LECS	2	39	12	53
LECT	0	1	1	2
LED	4	11	7	22
Perniosis	5	9	0	14

d) Porcentaje en el total de centros

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
Rash Malar	28,4%	38,4%	32,1%	34,9%
LECS	2,7%	21,1%	21,4%	16,8%
LECT	0,0%	0,5%	1,8%	0,6%
LED	5,4%	5,9%	12,5%	7,0%
Perniosis	6,8%	4,9%	0,0%	4,4%

f) Porcentaje total de centros

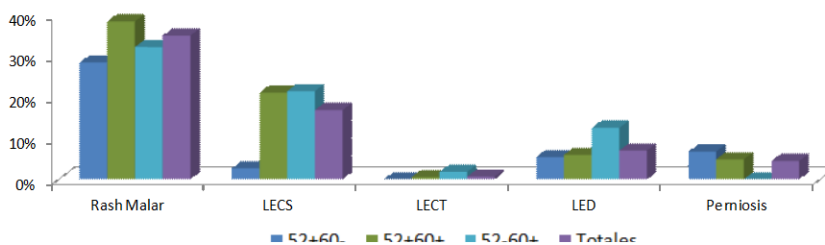


Figura 17. Prevalencia de las manifestaciones cutáneas en LES según su positividad para anticuerpos anti-Ro52 y Ro60 en suero

Resultados

En el SSc, no se detectaron diferencias en la aparición de úlceras digitales ni en la frecuencia de sus formas clínicas: difusa frente a limitada (**figura 18**).

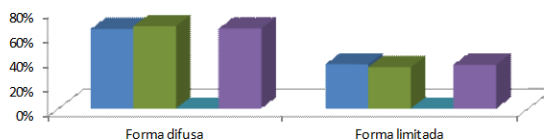
a) Número de pacientes en HUGTiP

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
Forma difusa	9	2	0	11
Forma limitada	5	1	0	6

b) Porcentaje en HUGTiP

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
Forma difusa	64,3%	66,7%	-	64,7%
Forma limitada	35,7%	33,3%	-	35,3%

c) Porcentaje HUGTiP



d) Número de pacientes en el total de centros

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
Forma difusa	8	5	0	13
Forma limitada	19	6	1	26

d) Porcentaje en el total de centros

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
Forma difusa	25,0%	41,7%	0,0%	28,9%
Forma limitada	59,4%	50,0%	100,0%	57,8%

f) Porcentaje total de centros

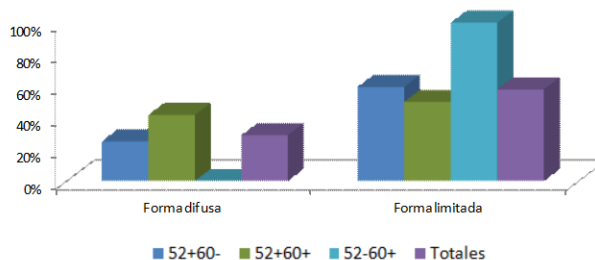


Figura 18. Prevalencia de la forma difusa Vs limitada en SSc su positividad para anticuerpos anti-Ro52 y Ro60 en suero

7.1.3.6. Serositis

No se encontraron diferencias en relación con la positividad de estos autoanticuerpos y la aparición de serositis en los pacientes con LES. La **figura 19** resume los resultados obtenidos.

a) Número de pacientes en HUGTiP

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
LES	6	11	1	18

b) Porcentaje en HUGTiP

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
LES	25,0%	18,6%	6,7%	18,4%

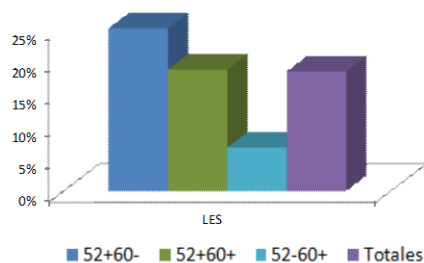
c) Número de pacientes en el total de centros

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
LES	13	24	7	44

d) Porcentaje en el total de centros

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
LES	17,6%	13,0%	12,5%	14,0%

e) Porcentajes HUGTiP



f) Porcentajes total de centros

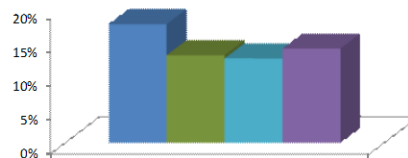


Figura 19. Prevalencia de la serositis en pacientes con LES según su positividad para anticuerpos anti-Ro52 y Ro60 en suero

7.1.3.7. Manifestaciones renales

No se detectaron diferencias significativas para ninguno de los grupos. Como era previsible, dentro del grupo del LES, la práctica totalidad de pacientes con afectación renal son positivos para los autoanticuerpos relacionados como el DNADs y el Sm-D. Coincidiendo con la literatura, los datos presentados indican que la presencia de anticuerpos frente a especificidades Ro no es un factor pronóstico de afectación renal. La **figura 20** resume los resultados obtenidos.

Resultados

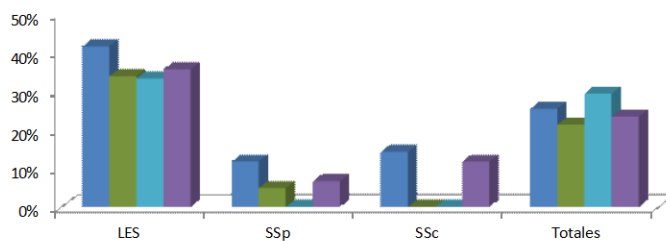
a) Número de pacientes en HUGTiP

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
LES	10	20	5	35
SSp	2	2	0	4
SSc	2	0	0	2
Totales	14	22	5	41

b) Porcentaje en HUGTiP

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
LES	41,7%	33,9%	33,3%	35,7%
SSp	11,8%	4,9%	0,0%	6,7%
SSc	14,3%	0,0%	-	11,8%
Totales	25,5%	21,4%	29,4%	23,4%

c) Porcentaje HUGTiP



d) Número de pacientes en el total de centros

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
LES	19	60	22	101
SSp	3	3	1	7
SSc	4	2	0	6
Totales	26	65	23	114

f) Porcentajes total de centros

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
LES	25,7%	32,4%	39,3%	32,1%
SSp	7,9%	3,3%	16,7%	5,1%
SSc	12,5%	-	0,0%	13,3%
Totales	18,1%	22,5%	36,5%	23,0%

d) Porcentaje en el total de centros

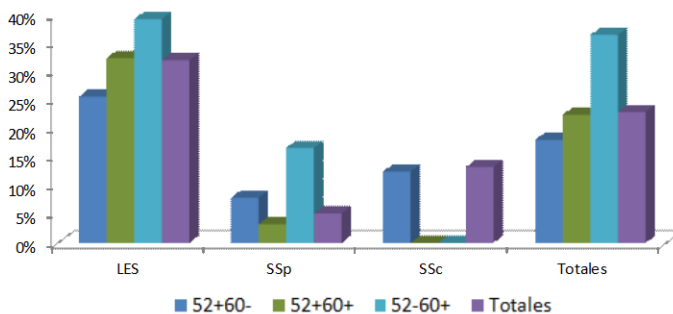


Figura 20. Prevalencia de las manifestaciones renales LES según su positividad para anticuerpos anti-Ro52 y Ro60 en suero

7.1.3.8. Tumores

No se encontraron diferencias en relación con la positividad de estos autoanticuerpos y la aparición de tumores. La **figura 21** resume los resultados obtenidos. Nótese que en este apartado la frecuencia de aparición de la manifestación es muy superior entre la serie del HUGTiP y la del resto de hospitales. Esto podría atribuirse a un mayor tiempo de seguimiento en los pacientes del HUGTiP o a errores en la recogida de datos.

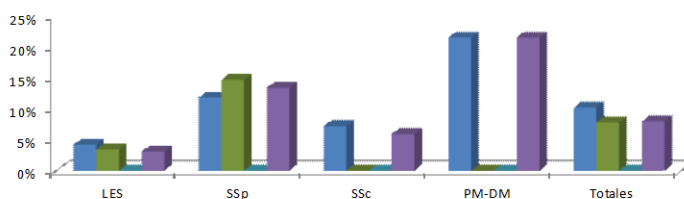
a) Número de pacientes en HUGTiP

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
LES	1	2	0	3
SSp	2	6	0	8
SSc	1	0	0	1
PM-DM	3	0	0	3
Totales	7	8	0	15

b) Porcentaje en HUGTiP

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
LES	4,2%	3,4%	0,0%	3,1%
SSp	11,8%	14,6%	0,0%	13,3%
SSc	7,1%	0,0%	-	5,9%
PM-DM	21,4%	-	-	21,4%
Totales	10,1%	7,8%	0,0%	7,9%

c) Porcentaje HUGTiP



d) Número de pacientes en el total de centros

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
LES	1	2	0	3
SSp	2	6	0	8
SSc	0	0	0	0
PM-DM	3	0	0	3
Totales	6	8	0	14

d) Porcentaje en el total de centros

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
LES	1,4%	1,1%	0,0%	1,0%
SSp	5,3%	6,5%	0,0%	5,9%
SSc	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
PM-DM	15,8%	-	0,0%	13,6%
Totales	3,7%	2,8%	0,0%	2,7%

f) Porcentaje total de centros

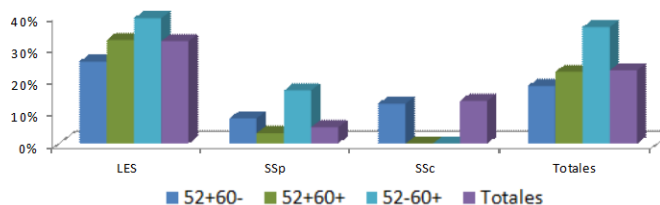


Figura 21. Prevalencia de las manifestaciones renales LES según su positividad para anticuerpos anti-Ro52 y Ro60 en suero

7.1.3.9. **Manifestaciones cardiacas**

No se encontraron diferencias en relación con la positividad de estos autoanticuerpos y la aparición de afectación cardiaca. La **figura 22** resume los resultados obtenidos.

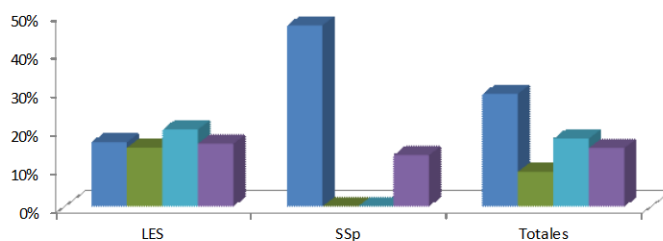
a) Número de pacientes en HUGTiP

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
LES	4	9	3	16
SSp	8	0	0	8
Totales	12	9	3	24

b) Porcentaje en HUGTiP

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
LES	16,7%	15,3%	20,0%	16,3%
SSp	47,1%	0,0%	0,0%	13,3%
Totales	29,3%	9,0%	17,6%	15,2%

c) Porcentaje HUGTiP



d) Número de pacientes en el total de centros

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
LES	9	18	7	34
SSp	12	5	0	17
Totales	21	23	7	51

d) Porcentaje en el total de centros

	52+60-	52+60+	52-60+	Totales
LES	12,2%	9,7%	12,5%	10,8%
SSp	37,5%	41,7%	0,0%	37,8%
Totales	19,8%	11,7%	12,3%	14,2%

f) Porcentaje total de centros

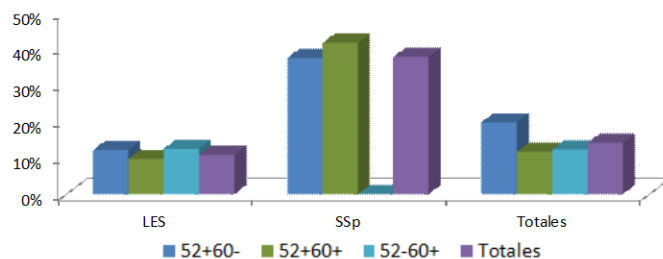


Figura 22. Prevalencia de las manifestaciones renales LES según su positividad para anticuerpos anti-Ro52 y Ro60 en suero

7.1.4. Resumen resultados estudio en suero

En nuestra serie los anticuerpos anti-Ro52 son más frecuentes que los anti-Ro60 y en más del 50% de los pacientes se detectan ambas especificidades. Los anticuerpos anti-Ro60 se asocian casi exclusivamente con LES y SSp, mientras que los anti-Ro52 aparecen en diferentes enfermedades. La presencia de anticuerpos anti-Ro52 se asocia a un peor pronóstico. Estos pacientes presentan mayor incidencia de EPID y de fenómeno de Raynaud independientemente del diagnóstico. También se asocia con un aumento en la artritis en los pacientes con LES. Los pacientes con SSp son mayoritariamente positivos para anticuerpos anti-Ro52, y en otras ETC la presencia de este autoanticuerpo se asocia al desarrollo de SS secundario. En cambio, la presencia de anticuerpos anti-Ro60 parece asociarse únicamente a un aumento en el LECS en los pacientes con LES.

Tabla 17. Resumen estadístico

	Ro52+Ro60- Vs Ro52-Ro60+		Ro52+ Vs Ro52-Ro60+		Ro60+ Vs Ro52+Ro60-	
	p chi ²	RR IC95%	p chi ²	RR IC95%	p chi ²	RR IC95%
Afectación pulmonar	0.000013	23,64(3,18-175,64)	0.0015	0,08(0,01-0,58)	0,00000004	3,81(2,31-6,29)
Afectación pulmonar en LES	0.047	6,64(0.79-53,97)	0.058	0.18(0.02-1,32)	N.S.	N.S.
Raynaud	0.00027	4,11(1,83-9,20)	0.048	2,89(1,34-6,23)	0.00065	0.49(0.33-0.74)
Raynaud en LES	0.048	2,68(0.99-7,28)	0.036	0.39(0.16-0.97)	N.S.	N.S.
SS	0.0058	1,77(1,18-2,66)	0.0057	0.35(0.16-0.76)	N.S.	N.S.
Síndrome seco	0.031	N.C.	0.025	N.C.	0.030	N.C.
Articulares				N.S.		
Artritis				N.S.		
Artritis en LES		N.S.	0.026	0,48(0,25-0,93)	0.017	0,40(0,18-0,85)
Artropatía de Jaccoud				N.S.		
Artritis en SS		N.S.		N.S.	0.00563	1,40(1,01-1,95)
Cutaneas en LES	0.047	0.19(0.24-0.99)	N.S.		0.0058	0.49(0.28-0.81)
Rashmalar				N.S.		
LC	0.00047	0.19(0.068-0.51)	0.025	2,06(1,08-3,91)	0.0018	0.26(0.11-0.64)
LECS	0.0031	0.13(0.03-0.61)		N.S.	0.0015	0.13(0.03-0.57)
LED				N.S.		
cutaneas_SSc				No distingue entre forma limitada y difusa		
Afectación cardiaca				N.S.		
Afectación renal				N.S.		
Serositis				N.S.		
Presencia de tumores				N.S.		

7.2 Detección de autoanticuerpos en lavado bronquioalveolar

- 7.2.1 Datos descriptivos basales de los pacientes
- 7.2.2 Comparativa de los pacientes ENAs positivos en suero y LBA
- 7.2.3 Determinación de otras especificidades
- 7.2.4 Datos comparativos basales de los pacientes

7.2. Detección de autoanticuerpos en lavado broncoalveolar

7.2.1. Datos descriptivos basales de los pacientes

Se incluyeron ciento cincuenta y cinco pacientes, 86 (55.5%) eran varones y la media de edad fue de 66 ± 12 años. De estos, 41 presentaban un diagnóstico de ETC-EPID o IPAF y 114 otros diagnósticos. Entre los pacientes del grupo ETC-EPID/IPAF 20 (41.7%) eran varones y la edad media fue de 64 ± 12 años, 19 presentaron ENAs en el LBA y 29 no.

El ENA más frecuente fue el anti-Ro52 (13 pacientes; 68,4% de los positivos), seguido del anti-Ro60 (5; 26.3%), anti-CENP-B (3; 15.8%), anti-La, Jo-1 y Sm/RNP (2; 10.5%) y anti Scl-70 (1; 5.3%). Ninguno de los pacientes presentó anticuerpos anti-DNA, nucleosoma, histonas, Sm-B, ribosomal-P, PCNA, Pm-100 ni AMA-2. Varios de los pacientes fueron positivos para más de un ENA. Los anticuerpos anti-Jo1, Ro60 y La aparecieron siempre acompañados de anti-Ro52. En tres ocasiones los anticuerpos anti-Ro52 fueron los únicos detectados. El resto de anticuerpos aparecieron siempre de forma aislada. Los datos de cada paciente pueden consultarse en la **tabla 18**.

Tabla 18. Resultados del blot de ENAs en LBA (conjugados IgG e IgA)

	RO52		RO60		LA		JO1		CENP-B		SCL-70		Sm/RNP	
	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA
paciente 1	+++	-												
paciente 3	+++	-												
paciente 7	+++	++					+++	+++						
paciente 12	+++	+++	++	+++	+++	+++								
paciente 19									+++	-				
paciente 26									++	-				
paciente 27	++	-					+++	+++						
paciente 53	+++	+	+	+										
paciente 61													+++	-
paciente 64	++	++												
paciente 70	+++	+++	+	++										
paciente 77	+++	-												
paciente 84	+++	-												
paciente 86											+	++		
paciente 87	+++	++	++	++	++	-								
paciente 101													++	+
paciente 116	+++	-	+++	-	+	-								
paciente 131	++	+++	++	++										
paciente 145									+++	-				

* las cruces indican el grado de intensidad de las bandas: (+) débil; (++) intermedia; (+++) fuerte
 nótese, que las intensidades débiles se interpretaron como negativas

Del total de pacientes, 60 (38.7%) nunca habían fumado, 30 (19.4%) eran exfumadores y 64 (41.4%) fumadores activos. Ente los pacientes con ENAs positivos, 7 (36.6%) nunca habían fumado, un 4 (20.9%) eran exfumadores y 8 (41.9%) fumadores activos. Los datos epidemiológicos, antecedentes patológicos y pruebas de función pulmonar quedan resumidos en la **tabla 19**.

Tabla 19. Variables clínico-epidemiológicas ($\bar{x} \pm \sigma$)

	Controles	No ETC/IPAF	ETC/IPAF
Edad	61 ± 12	67 ± 11	64 ± 12
Sexo (hombre/mujer)	6/4	66/41	20/28
Tabaquismo (activo/exfumador/nunca)	1/4/4	19/51/37	11/14/23
Disnea MRCm (0/1/2/3/4)	5/4/0/0/0	15/49/26/16/0	6/17/22/3/0
FVC (% predicho)	75,6 ± 17,8	68,9 ± 14,4	66,6 ± 17,9
FEV ₁ (% predicho)	76,1 ± 26,4	71,3 ± 18,0	67,4 ± 19,2
FEV ₁ /FVC	63,9 ± 26,1	78,7 ± 11,4	75,1 ± 10,4
TLC (% predicho)	109 ± 17,0	93,6 ± 31,6	86,8 ± 23,0
DL _{CO} (% predicho)	74,3 ± 32,9	64,2 ± 18,5	61,7 ± 21,7
CPI	27,4 ± 19,1	39,2 ± 14,3	42,0 ± 20,5
SatO ₂ basal (mmHg)	97,8 ± 0,9	92,9 ± 6,1	93,0 ± 6,1
PM6M (metros)	-	-	423 ± 109
SatO ₂ final (mmHg)	-	-	90,5 ± 4,7

El LBA de los pacientes contiene una mediana de 73 [50-84] de macrófagos, un 8 [4-19] de leucocitos, un 7 [2.5-16] de neutrófilos, un 0 [0-4] de eosinófilos y un 0 [0-1] de basófilos. En los pacientes ENA positivos, las medianas son de un 68 [47-82] de macrófagos, un 16,6 [6-34.25] de linfocitos, un 12 [6-25.5] de neutrófilos, un 1 [0-1] de eosinófilos y un 0 [0-2.5] de basófilos. Los datos referentes a las poblaciones leucocitarias en BAL están resumidos en la **tabla 20**.

	Me[RIC]		
	Controles (10)	No ETC/IPAF (107)	ETC/IPAF (48)
% Macrófagos	64 [38-78]	73 [50-84]	68 [47-82]
% Linfocitos	6 [3-22]	8 [4-18]	8 [4-24]
% Neutrófilos	15 [2-37]	5 [3-15]	11 [2-21]
% Eosinófilos	0 [0-0]	1 [0-4]	1 [0-3]
% Basófilos	0 [0-0]	0 [0-1]	0 [0-1]

Los diagnósticos más frecuentes fueron ETC-EPID (21%), FPI (20%), NINE idiopática (12.9%) y NH (8.4%). En los pacientes con ENAs positivos, el diagnóstico más frecuente fue ETC-EPID (68.4%). La exposición al polvo de sílice, se considera un factor de riesgo para el desarrollo de ETCs⁽³³⁸⁾, por lo que no se puede descartar un componente autoinmune en el paciente con silicosis. Si contabilizamos también a los pacientes con vasculitis e IPAF, el porcentaje de pacientes con posible origen autoinmune ascendería al 89.5%. Este grupo no contiene ningún paciente con diagnóstico de FPI, NH, NOC ni BR-EPID. La **tabla 21** muestra la distribución de los diagnósticos

Tabla 21. Distribución de los diagnósticos en el total de pacientes y el grupo con ENAs positivos n (%)

	Totales (155)	ENA + (48)
ETC-EPID	34 (21,9)	13 (68,4)
FPI	31 (20)	-
NINE idiopática	20 (12,9)	1 (5,3)
NH crónica	11 (7,1)	-
NH aguda	2 (1,3)	-
IPAF	8 (5,1)	2 (10,5)
NOC	6 (3,9)	-
EPID inducida por fármacos	6 (3,9)	-
Sarcoidosis	6 (3,9)	-
BR-EPID	5 (3,2)	-
Silicosis	4 (2,6)	1 (5,3)
CFPE	3 (1,9)	1 (5,3)
Histiocitosis cls. de Langherhans	2 (1,3)	-
NIL	2 (1,3)	-
Vasculitis	2 (1,3)	1 (5,3)
Linfangioleiomiomatosis	1 (0,6)	-
Otros	3 (1,9)	-
Inclasificable	10 (5,8)	-

*CFPE: combinación de fibrosis pulmonar y enfisema

7.2.2. **Comparativa de los pacientes ENAs positivos en suero y LBA**

Algunos pacientes debutaron con ANAs negativos o con título bajo en el suero, por lo que inicialmente, siguiendo el protocolo del laboratorio de Inmunología del HUGTiP, no se realizó la determinación de ENAs. Posteriormente, cuando estos sueros se estudiaron, todos los pacientes con ENAs en LBA mostraron estos mismos autoanticuerpos en suero. Los pacientes con vasculitis ANCA positivas y en el paciente con dermatomiositis y anticuerpos anti-SAE también presentaron estos anticuerpos en suero (ver punto 7.2.4).

7.2.3. **Comparativa de los pacientes con ENAs en LBA de clase IgA e IgG**

En todos los pacientes que presentaron ENAs de clase IgG positivos en el LBA se realizó la determinación de ENAs IgA. Aproximadamente la mitad (10/19) de estos pacientes fueron negativos para los anticuerpos de clase IgA. De las 28 especificidades encontradas, trece presentaron exclusivamente anticuerpos de clase IgG, cuatro presentaron niveles más bajos de anticuerpos de clase IgA que de IgG, nueve presentaron niveles semejantes y solamente dos presentaron niveles más altos de IgA que de IgG. En uno de estos casos la intensidad de la banda IgG fue baja, por lo que según el punto de corte establecido para el estudio, de no haberse realizado el estudio con anticuerpos IgA este paciente habría sido considerado como negativo. La **tabla 19** (sección 6.4.4.1) resume los resultados expuestos. Debido al pequeño número de eventos no hemos podido realizar inferencia estadística.

7.2.4. **Determinación de otras especificidades.**

El perfil de inmunoblot de ENAs utilizado está diseñado para detectar los autoanticuerpos más frecuentemente asociados con ETCs, pero no cubre todas las especificidades descritas. Por este motivo, en los pacientes donde se estableció un diagnóstico de ETC diferente a LES o SSp (PM-DM, SSc, AR o vasculitis ANCA positiva) se completó el análisis con otras pruebas específicas para estos diagnósticos. Este estudio se realizó independientemente del resultado del inmunoblot de ENAs.

7.2.4.1. Autoanticuerpos relacionados con esclerosis sistémica, miopatías inflamatorias y vasculitis ANCA positiva mediante inmunoblot

Tal como muestra la **tabla 22**, la práctica totalidad de los resultados obtenidos en el inmunoblot para ENAs se confirmaron al ser estudiados mediante otras tiras de inmunoblot. La única discrepancia aparece en un paciente con diagnóstico de NINE idiopática que mostró un positivo intermedio para CENP-B en el estudio de ENAs. La utilización de estos perfiles ampliados en casos altamente sugestivos, ha permitido detectar autoanticuerpos de menor prevalencia como el SAE1 en la dermatomiositis, el CENP-A en la esclerosis sistémica y el PR3 en las vasculitis ANCA positivas.

Tabla 22. Presencia de anticuerpos relacionados con SSc, PM-DM y vasculitis

nº paciente	Diagnóstico	Resultado ENAs	Resultado otros blots
3	Síndrome antisintetasa	Ro52 +++	Ro52++
7	Síndrome antisintetasa	Ro52 +++, Jo1 +++	Ro52+++
27	Síndrome antisintetasa	Ro52 +++, Jo1 +++	Ro52+++
54	Dermatomiositis	Negativo	SAE1+++
14	Esclerosis sistémica	Negativo	Negativo
19	Esclerosis sistémica	Cenp-B +++	Cenp-B+++;Cenp-A+++
26	NINE	Cenp-B ++	Negativo
6	Poliarteritis nodosa	Negativo	PR3++
30	Síndrome de Churg-Strauss	Negativo	PR3++
49	NH*	Negativo	Negativo

* Este paciente mostró una positividad para anticuerpos anti-KU en suero

7.2.4.2. Determinación de autoanticuerpos relacionados con artritis reumatoide mediante ELISA

La **tabla 23** muestra los resultados de los pacientes estudiados y su diagnóstico. Dado que la determinación del FR es una prueba inespecífica, se intentó estudiar la sensibilidad de esta técnica en LBA. Para estudiar la sensibilidad se incluyeron todos los pacientes con EPID asociada a AR. Para estudiar la sensibilidad se incluyeron pacientes con FPI, EPID asociada al tabaquismo y otros diagnósticos.

Tabla 23. Presencia de anticuerpos relacionados con AR según diagnóstico

	Diagnóstico	CCP	FR-IgM	Fr-IgA
P8	Abestosis	1,7 +	0,3 -	2,5 +
P11	NID	3,9 +	4,4 +	>8 +
P20	enfisema + EPID tabaco	0,6 -	0,4 -	0,9 -
P4	EPID asociada a AR	2,9 +	2,7 +	3,2 +
P23	EPID asociada a AR	3,5 +	>7 +	>8,5 +
P29	EPID asociada a AR	6,7 +	>7 +	>8,5 +
P32	EPID asociada a AR	0,8 -	0,6 -	1,2 +/-
T11	EPID asociada a AR	0,9 -	0,3 -	5,8 +
T14	EPID asociada a AR	0,5 -	0,3 -	0,9 -
T7	EPID asociada a AR	0,6 -	0,1 -	1,2 +/-
P14	EPID asociada a SSc	0,5 -	0,3 -	1,1 +/-
P18	FPI	0,5 -	0,3 -	1,2 +/-
P2	FPI	2,6 +	0,4 -	5,1 +
P21	FPI	0,6 -	0,0 -	0,4 -
P28	FPI	0,6 -	0,5 -	1,0 -
P5	FPI	1,2 +/-	0,4 -	4,7 +
P24	neumonía eosinofílica crónica	0,5 -	1,7 +	1,1 +/-
P9	NH	1,0 +/-	0,3 -	2,0 +
P15	NINE	1,2 +/-	0,4 -	2,6 +
P22	NINE	0,6 -	0,5 -	0,8 -
P33	NINE	0,5 -	0,8 -	3,9 +
P31	NIU	0,6 -	0,3 -	1,1 +/-
P13	No clasificable	0,6 -	0,3 -	0,5 -
P25	NOC	0,6 -	0,3 -	0,9 -

*negativo ≤ 1 ; dudoso 1,0-2,0; positivo > 2 ;

los resultados positivos se muestran resaltados

Los anticuerpos anti CCP presentaron una sensibilidad del 42,9% y una especificidad del 82,4%, el FR de clase IgM una sensibilidad del 57,1% y una especificidad del 88,2% y el FR de clase IgA una sensibilidad del 57,1% y una especificidad del 58,8%. Según estos resultados el mejor biomarcador es el FR-IgM. Solamente tres de los pacientes con EPID asociada a AR y un paciente con EPID asociada al tabaquismo fueron positivos para los tres marcadores. Estos datos son preliminares deben verificarse en una serie más amplia.

7.2.4.3. Determinación de ANAs de clase IgA e IgG en muestras de LBA

La **tabla 24** resume los resultados, mientras que las **figuras 23-29** muestran las imágenes obtenidas. Para describir los patrones ANA se ha utilizado la nomenclatura recomendada por el ICAP₍₃₃₉₎. En todos los casos, el patrón de IFI detectado concuerda con el asociado a las especificidades detectadas. Nótese que las especificidades Ro52 y Ro60 no se asocian a ningún patrón en los ANAs.

Tabla 24. Correlación entre los hallazgos del inmunoblot y el patrón ANA o ANCA

nº paciente	Blot IgG	Blot IgA	ANA IgG	ANA IgA
7	Ro52+++; Jo1+++	Ro52+++; Jo1+++	AC-19	AC-19
27	Ro52++; Jo1+++	Jo1+++	Negativo	Negativo
12	Ro52+++; Ro60+++; La +++	Ro52+++; Ro60+++; La +++	AC-4	AC-4
19	CENP-B +++	Negativo	AC-3	AC-3 (límite)
54	SAE-1+++	-	AC-4	Negativo
62	Sm/RNP+++	Negativo	AC-5; AC-19	AC-5; AC-19
102	Sm/RNP+++	Sm/RNP (límite)	AC-4; AC-19	AC-4; AC-19

nº paciente	Blot IgG	Blot IgA	ANCA IgG	ANCA IgA
6	PR3++	-	Negativo	Negativo
30	PR3++	-	Negativo	Negativo

En tres casos encontramos discrepancias en la positividad de la IFI y el inmunoblot:

1. En el paciente 27 los ANAs no fueron capaces de confirmar el resultado del inmunoblot
2. En los pacientes 19 y 102 los ANAs IgA mostraron un patrón concordante con el IgA pero de intensidad muy débil. El inmunoblot IgA fue negativo o presentó una positividad débil que fue interpretada como negativa según los criterios establecidos para el estudio.

Los ANCAs fueron negativos en los dos casos estudiados.

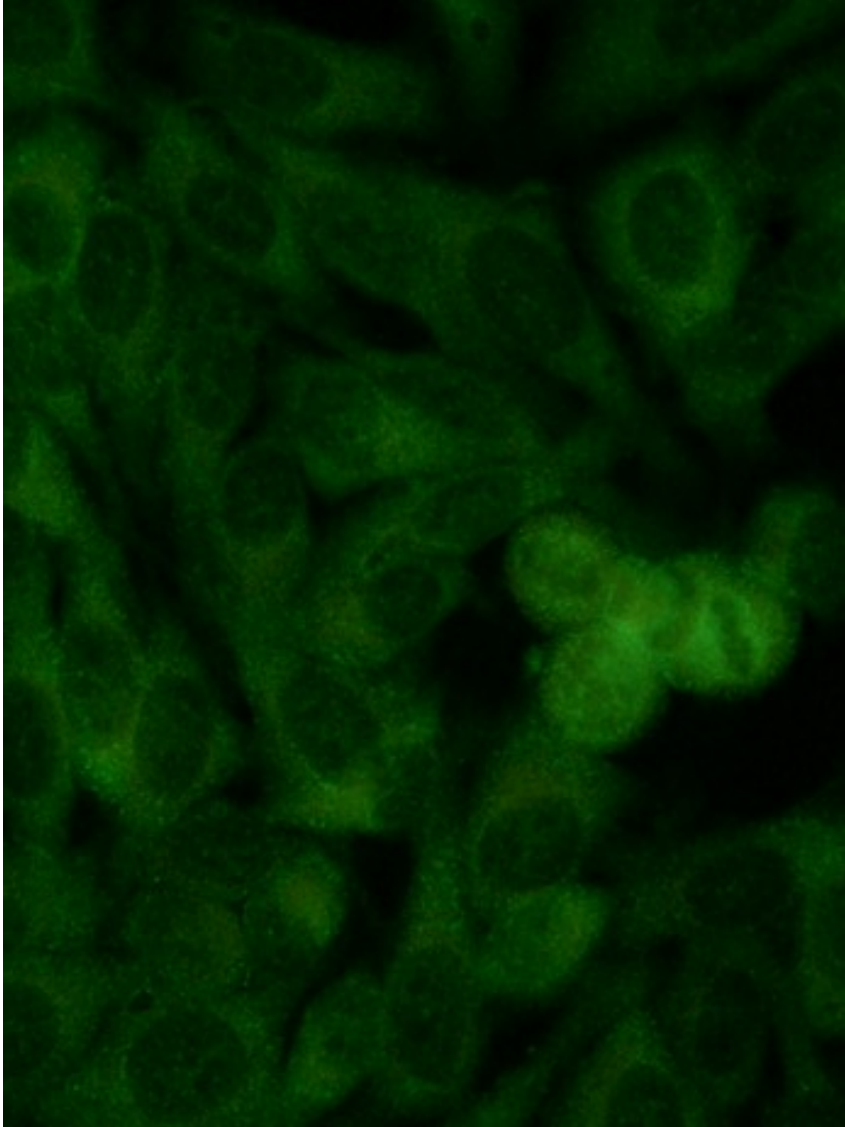


Fig. 23-a Patrón citoplasmático (AC-19) en paciente con PM y anticuerpos anti-Jo1 y anti-Ro52 de clase IgG e IgA (conjugado IgG; dilución 1:1)

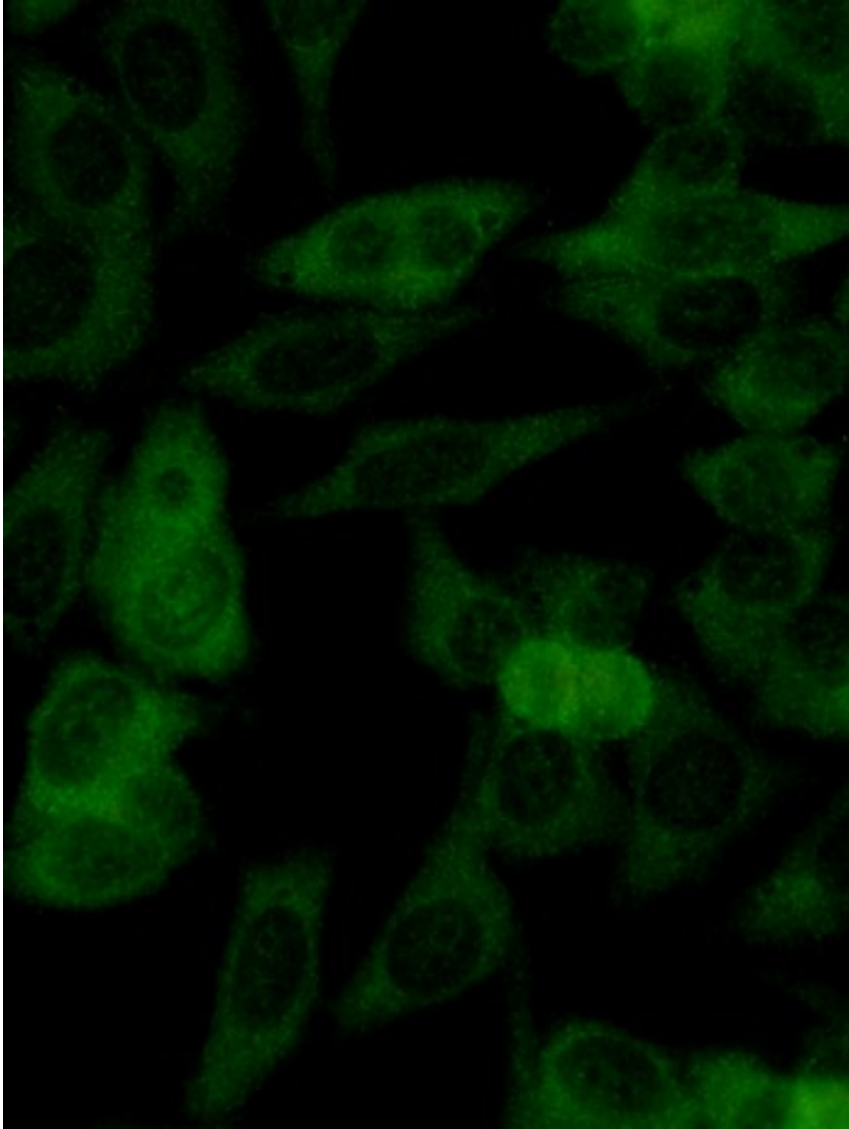


Fig. 23-b Patrón citoplasmático (AC-19) en paciente con PM y anticuerpos anti-Jo1 y anti-Ro52 de clase IgG e IgA (conjugado IgA; dilución 1:1)

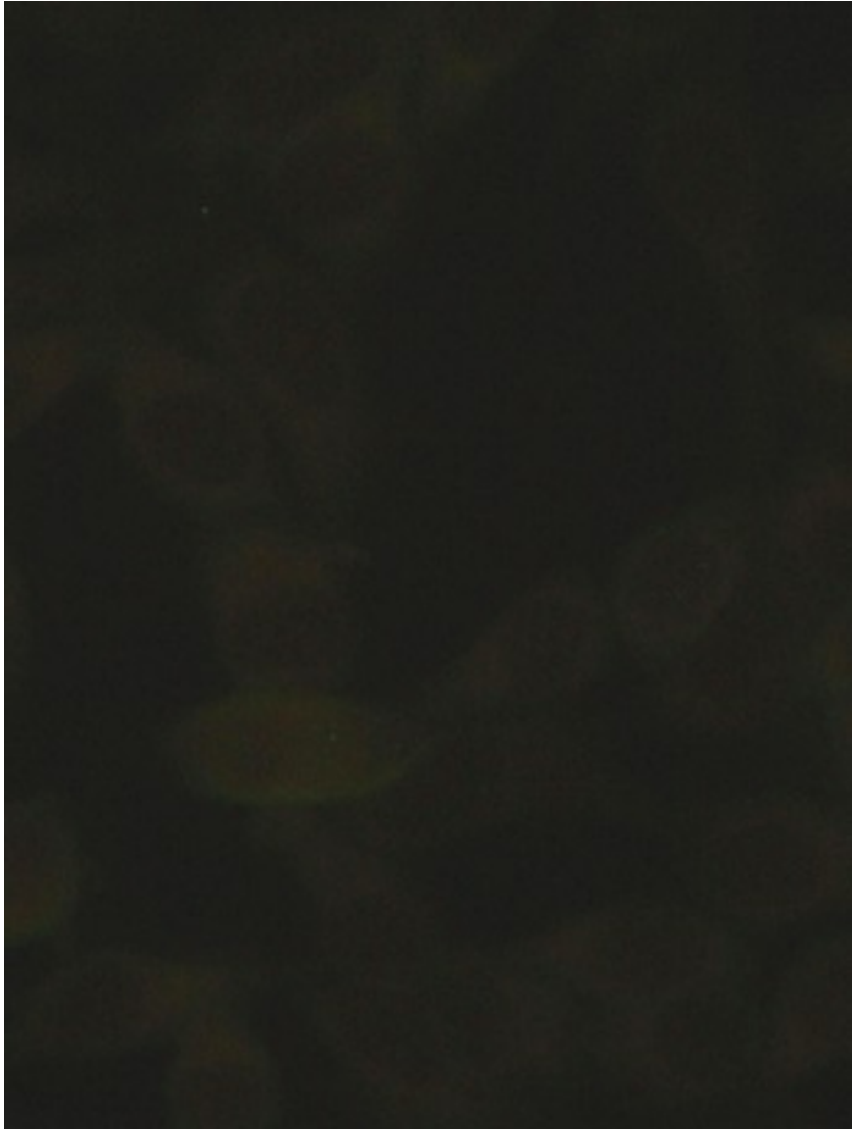


Fig. 24-a ANAs negativos en paciente con PM y anticuerpos anti-Jo1 de clase IgG e IgA (conjugado IgG; dilución 1:1)

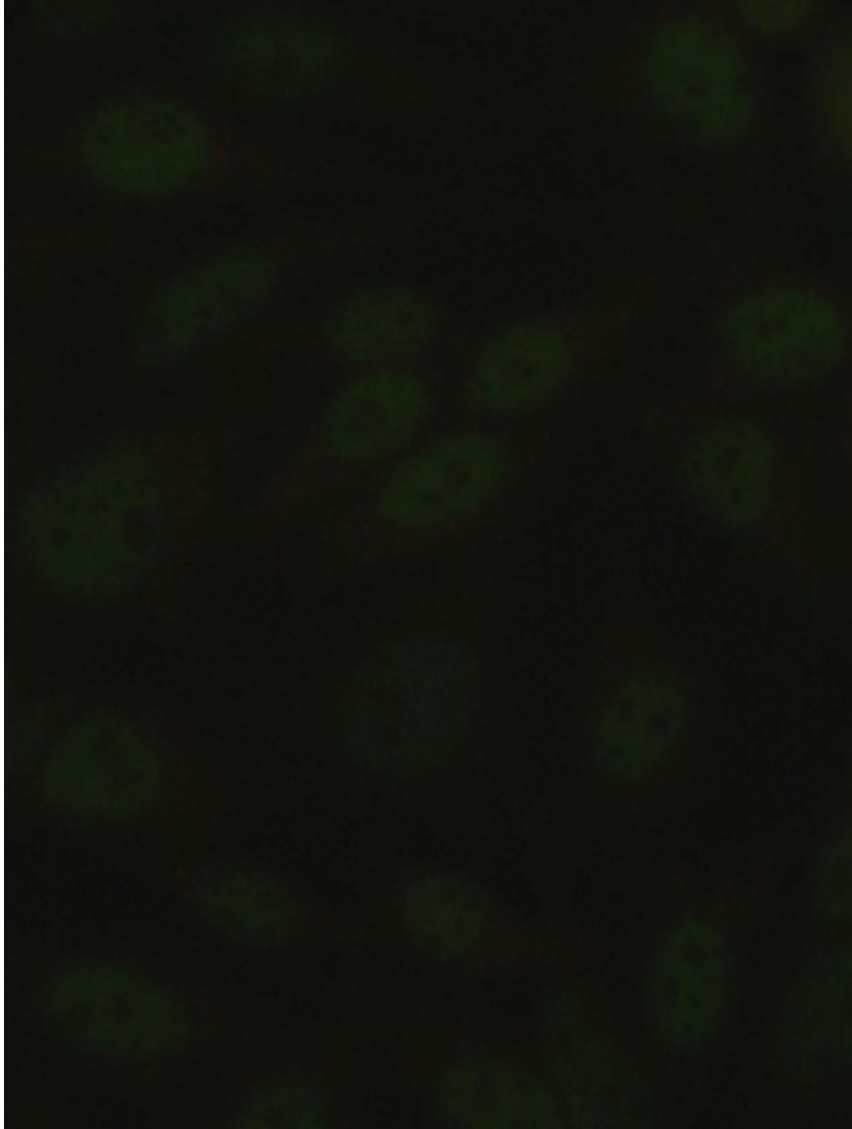


Fig. 24-b ANAs negativos en paciente con PM y anticuerpos anti-Jo1 de clase IgG e IgA (conjugado IgA; dilución 1:1)

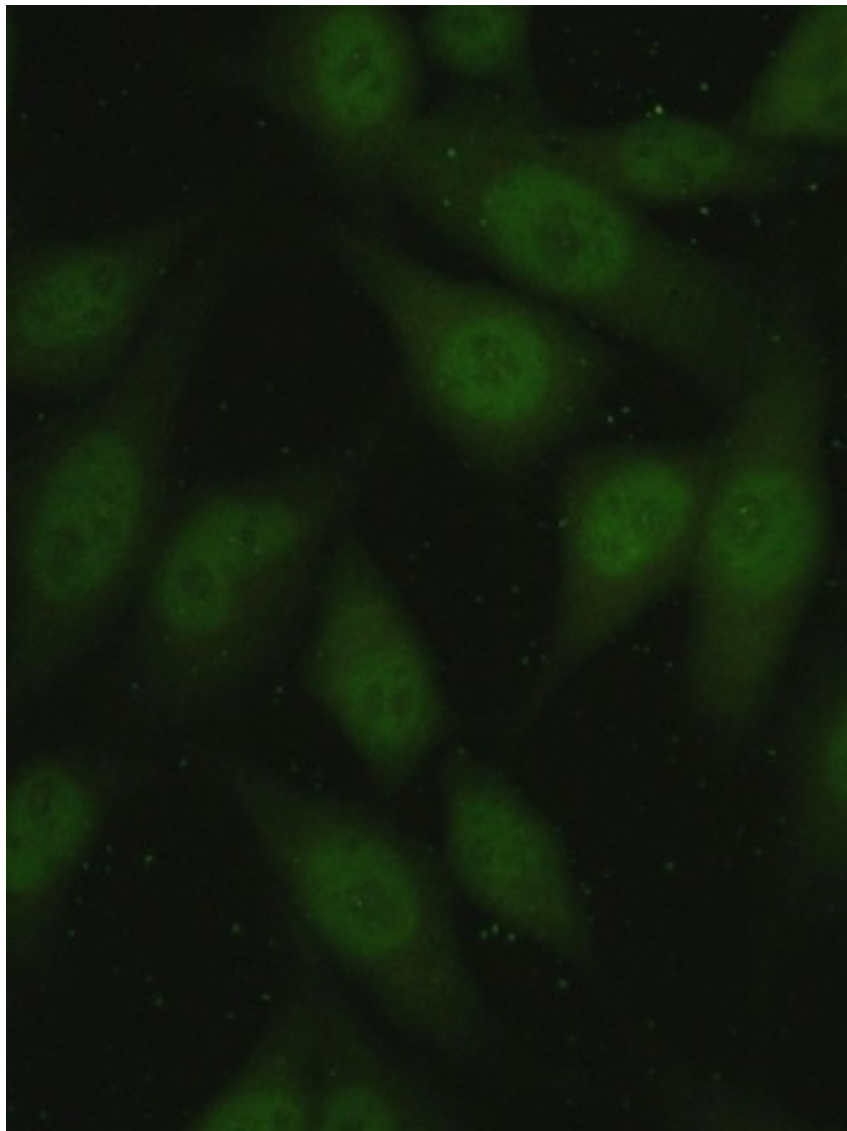


Fig. 25-a Patrón moteado fino (AC-4) en paciente con SS y anticuerpos anti-Ro52, Ro60 y La de clase IgG e IgA (conjugado IgG; dilución 1:1)

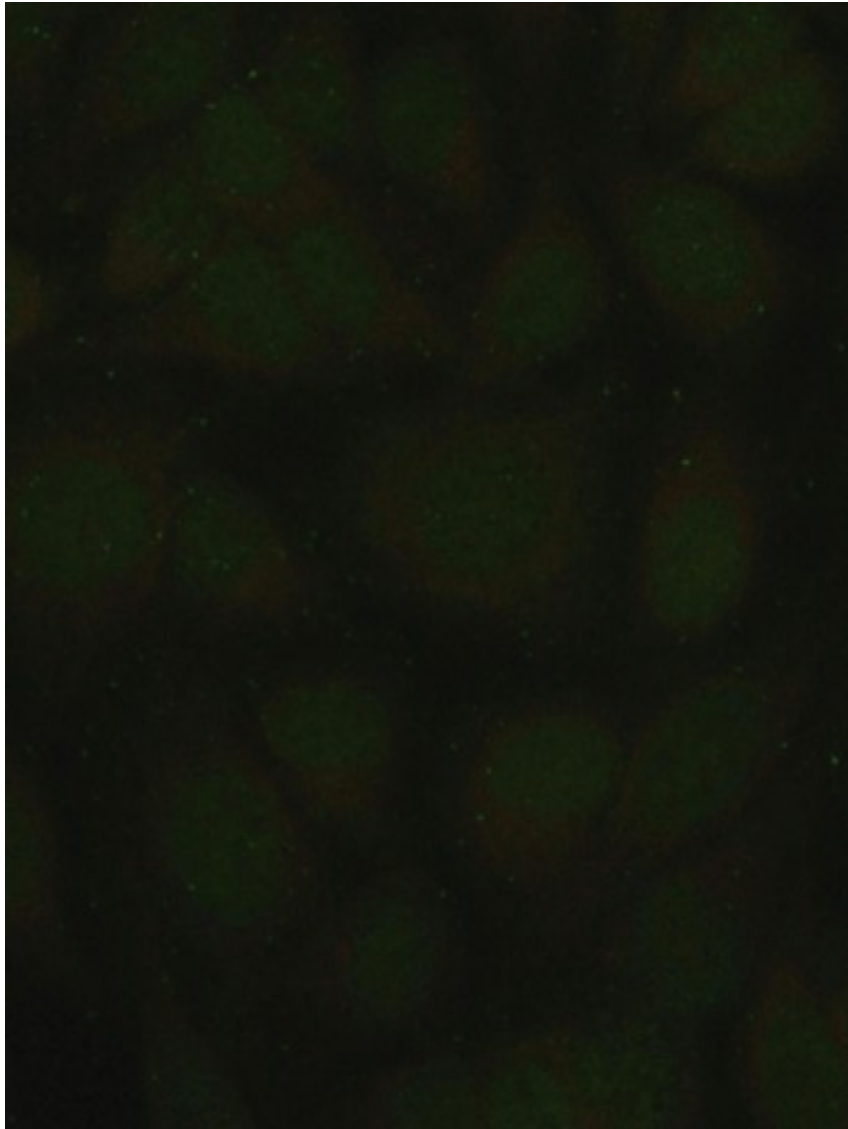


Fig. 25-b Patrón moteado fino (AC-4) en paciente con SS y anticuerpos anti-Ro52, Ro60 y La de clase IgG e IgA (conjugado IgA; dilución 1:1)

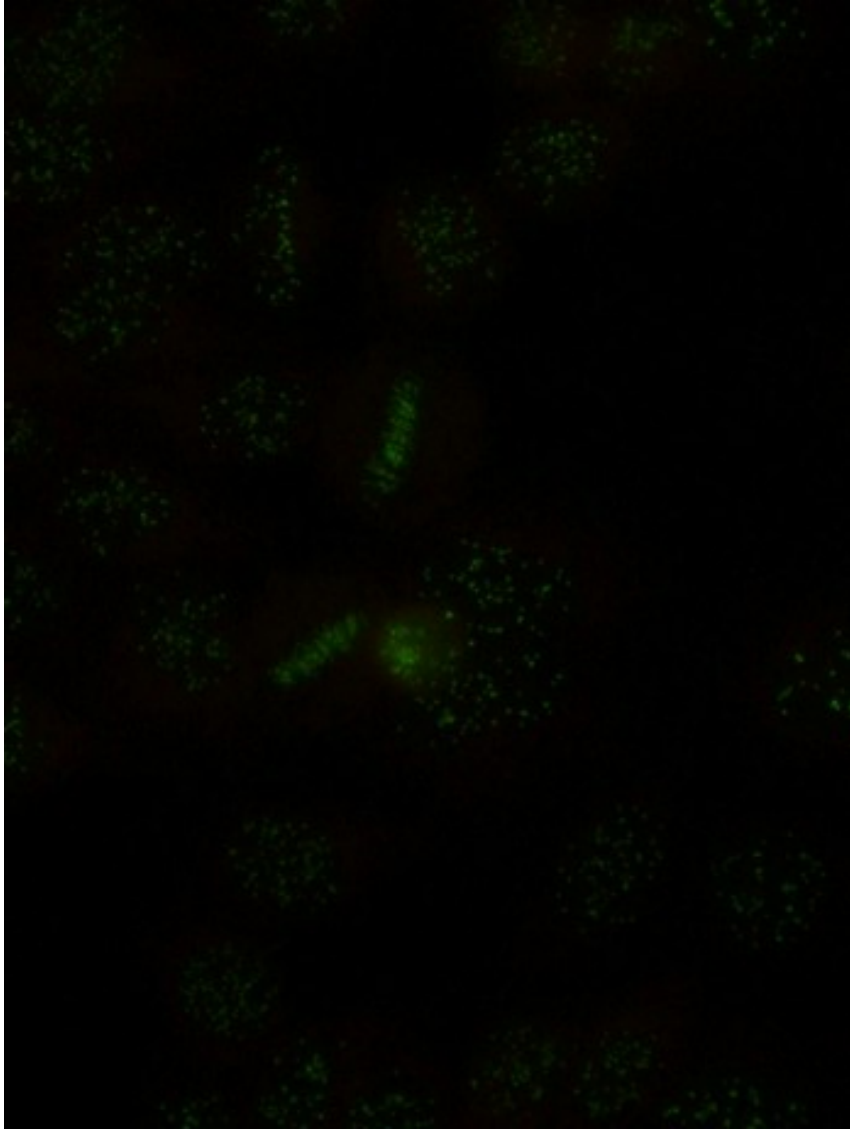


Fig. 26-a Patrón centromérico (AC-3) en paciente con SSc y anticuerpos anti-CENP-B de clase IgG (conjugado IgG; dilución 1:1)

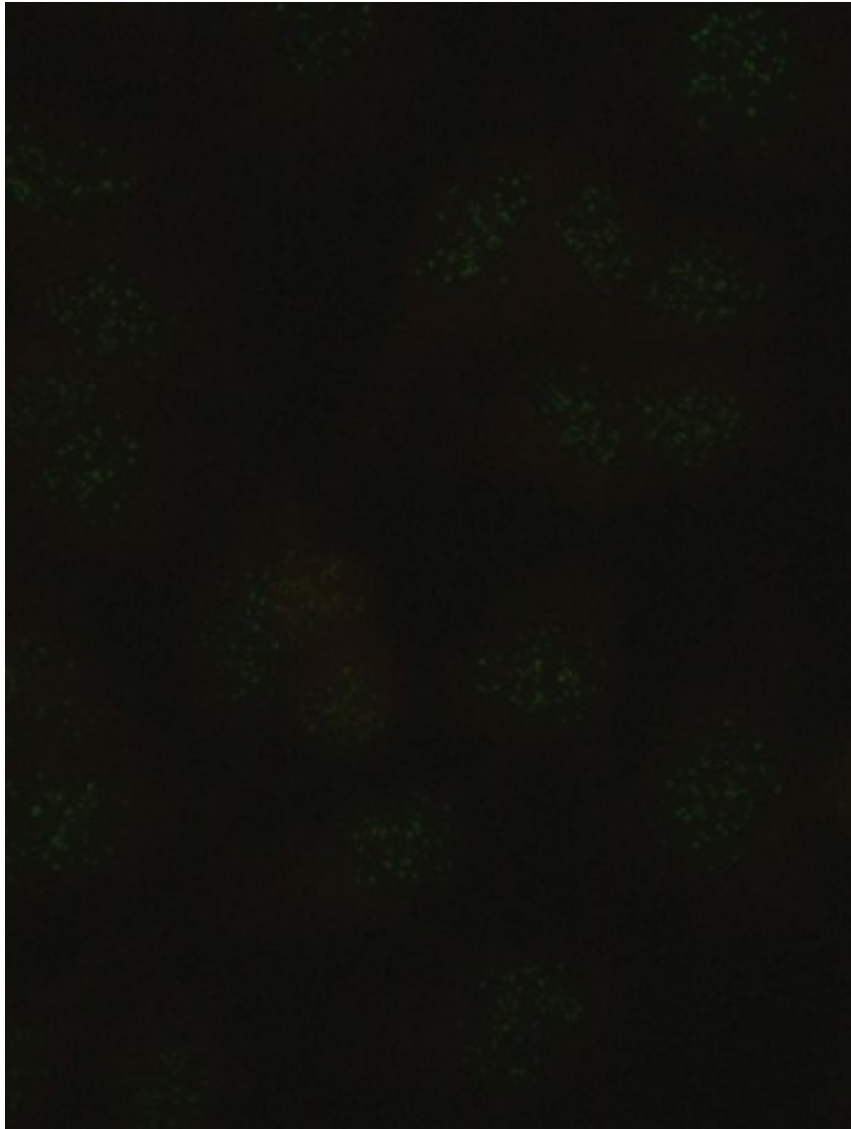


Fig. 26-b Patrón centromérico (AC-3) en paciente con SSc y anticuerpos anti-CENP-B de clase IgG (conjugado IgA; dilución 1:1)

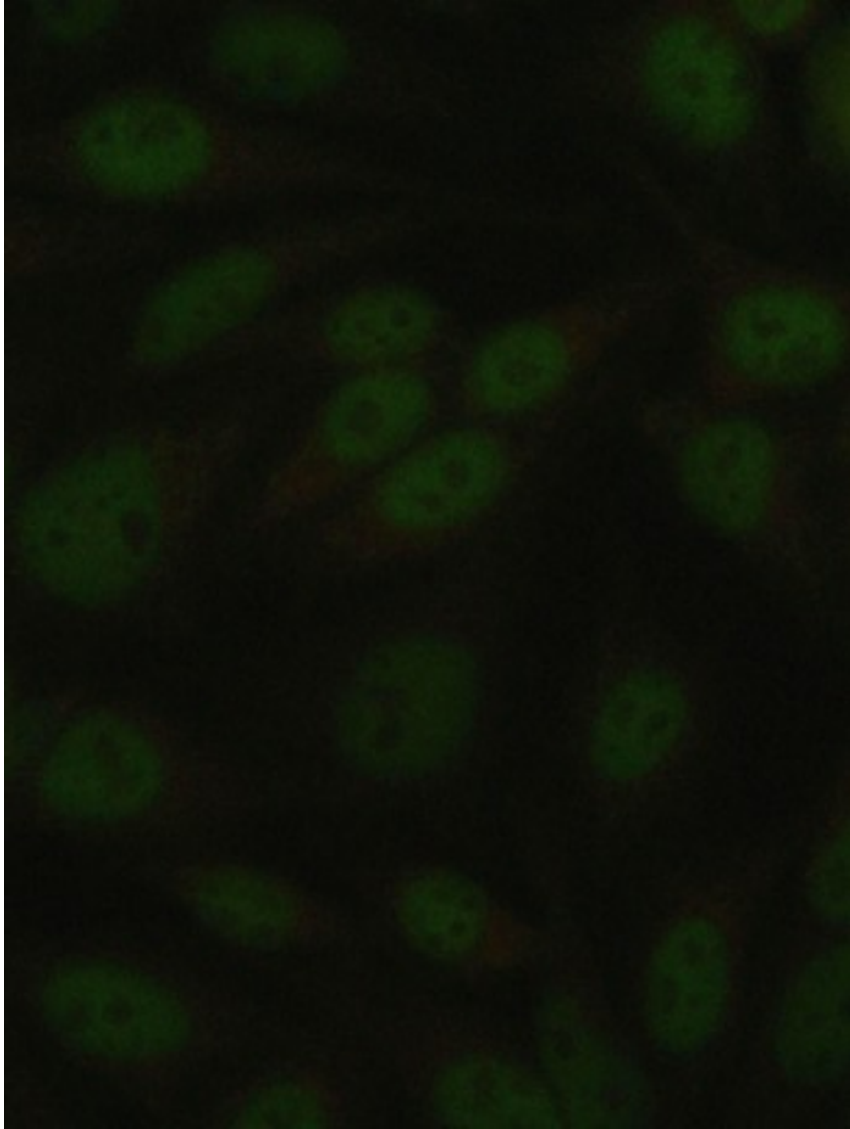


Fig. 27-a Patrón moteado fino (AC-4) en paciente con DM y anticuerpos anti-SAE1 de clase IgG (conjugado IgG; dilución 1:1)

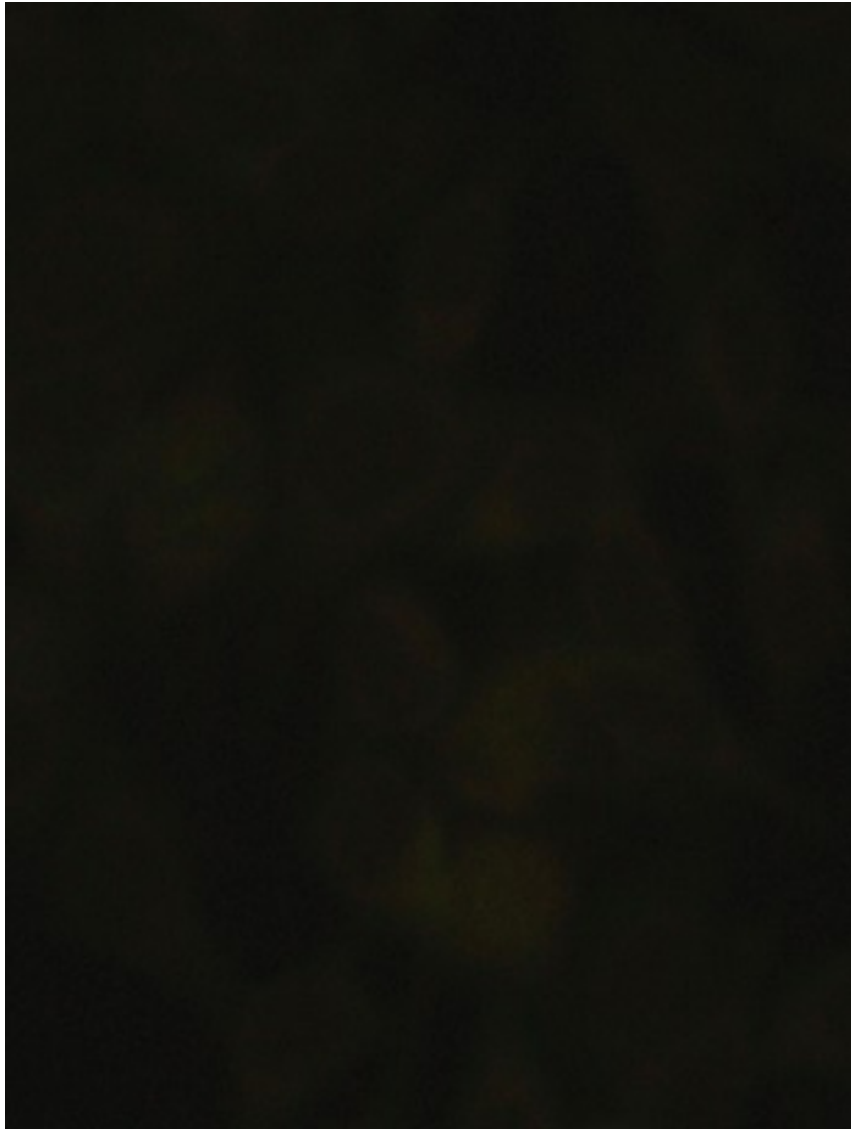


Fig. 27-b ANAs negativos fino en paciente con DM y anticuerpos anti-SAE1 de clase IgG (conjugado IgA; dilución 1:1)

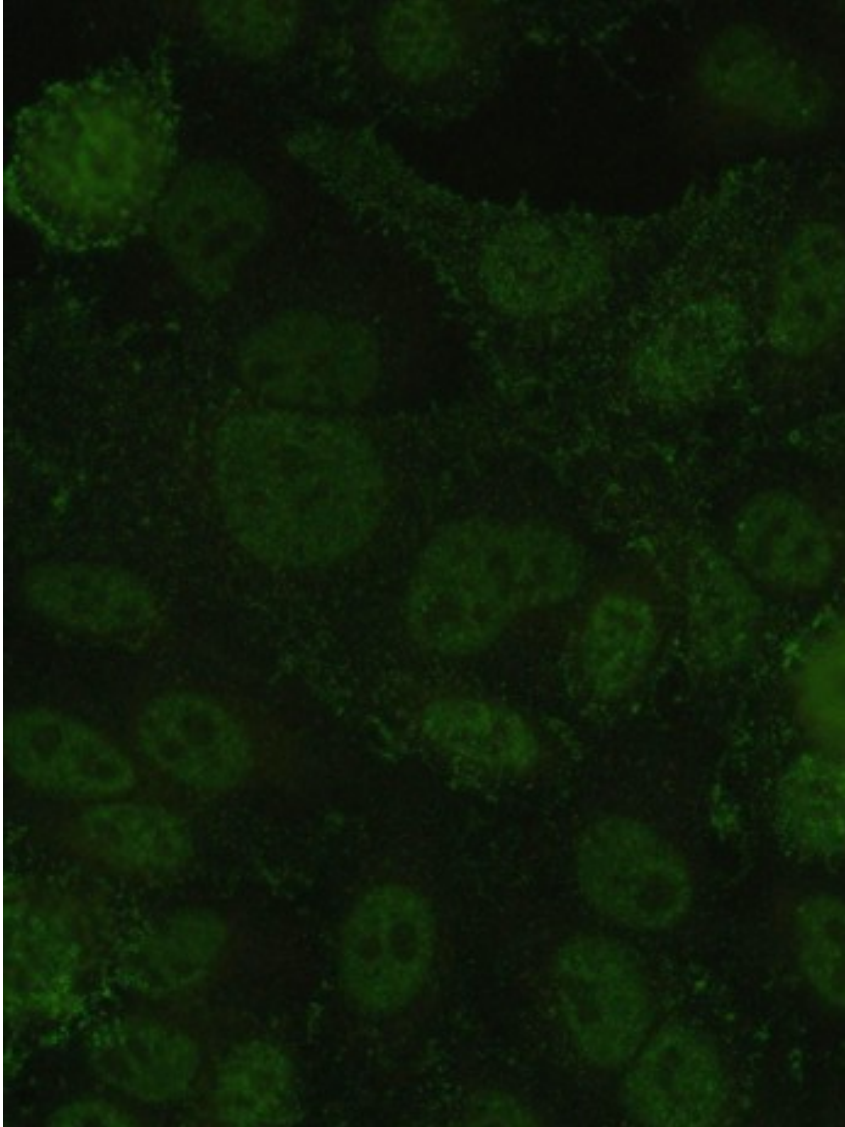


Fig. 28-a Patrón punteado grueso (AC-5) más citoplasmático (AC-19) en paciente con EMTC y anticuerpos anti-Sm/RNP de clase IgG (conjugado IgG; dilución 1:1)

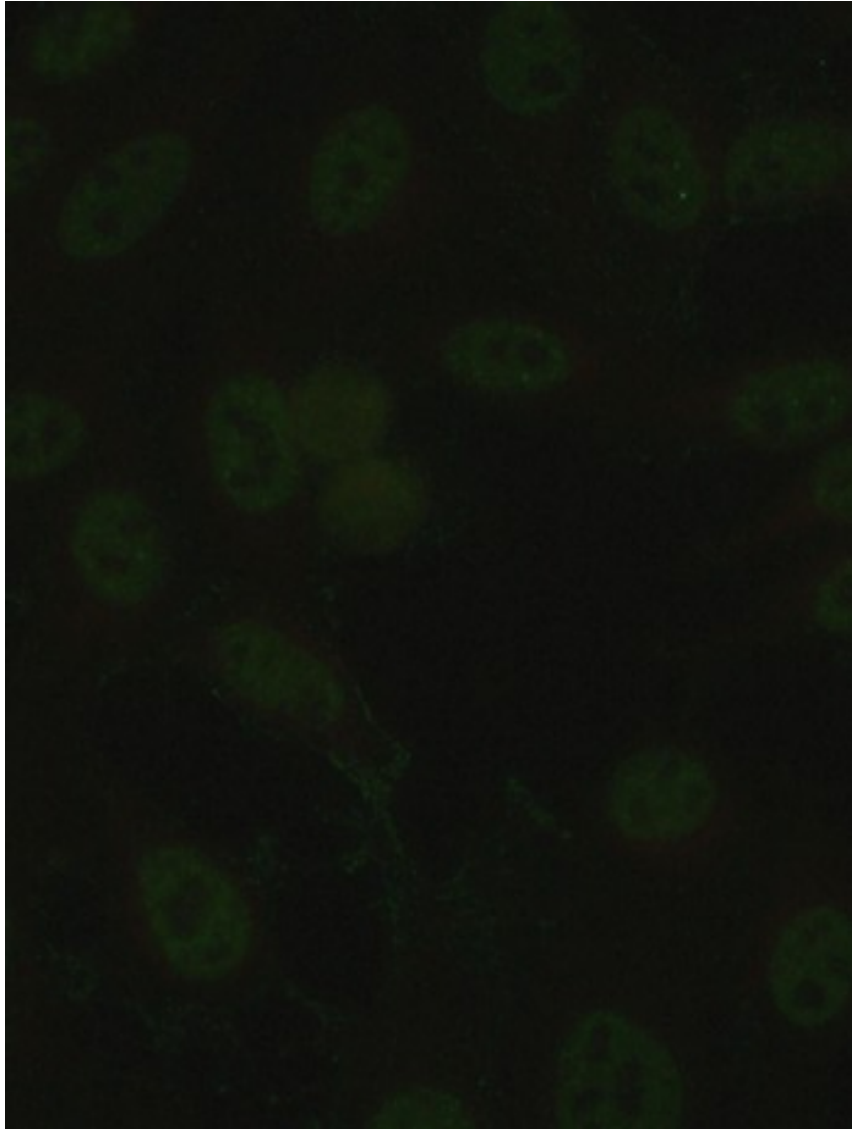


Fig. 28-b ANAs negativos en paciente con EMTC y anticuerpos anti-Sm/RNP de clase IgG (conjugado IgA; dilución 1:1)

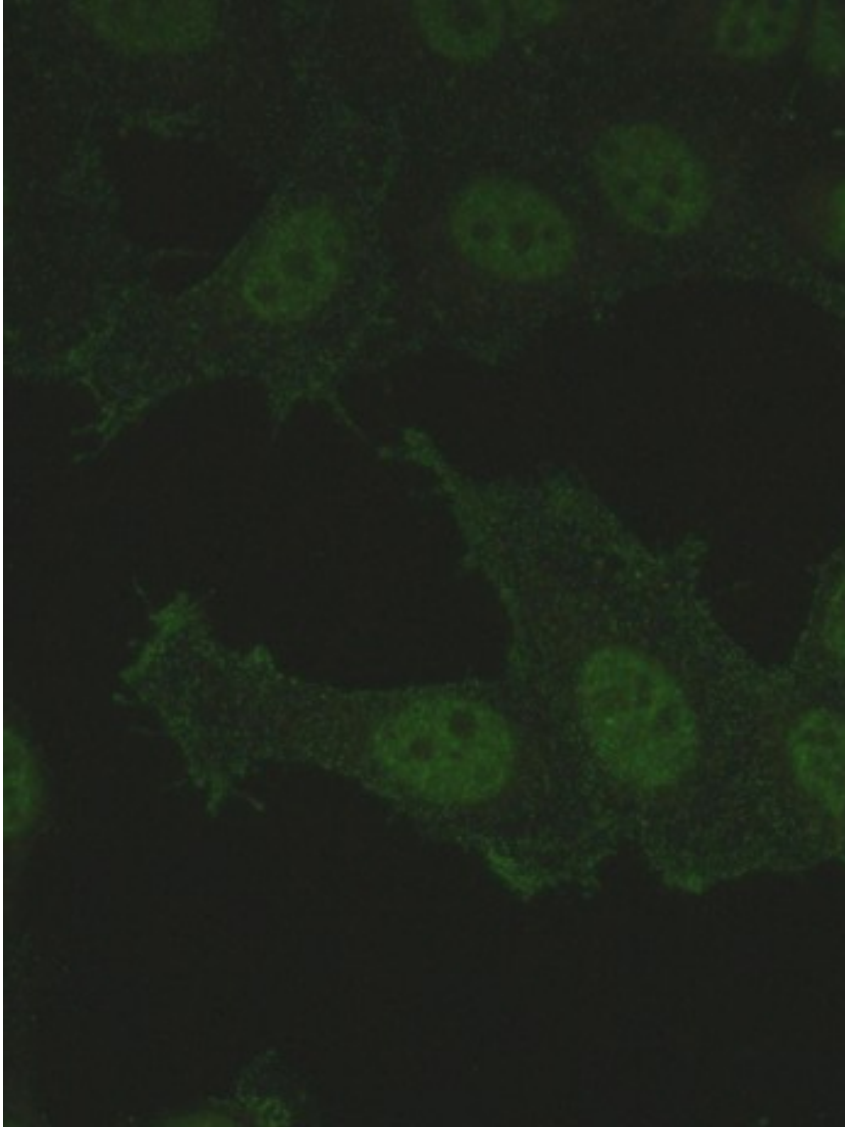


Fig. 29-a Patrón punteado fino (AC-4) más citoplasmático (AC-19) en paciente con EMTC y anticuerpos anti-Sm/RNP de clase IgG e IgA e histonas (conjugado IgG)

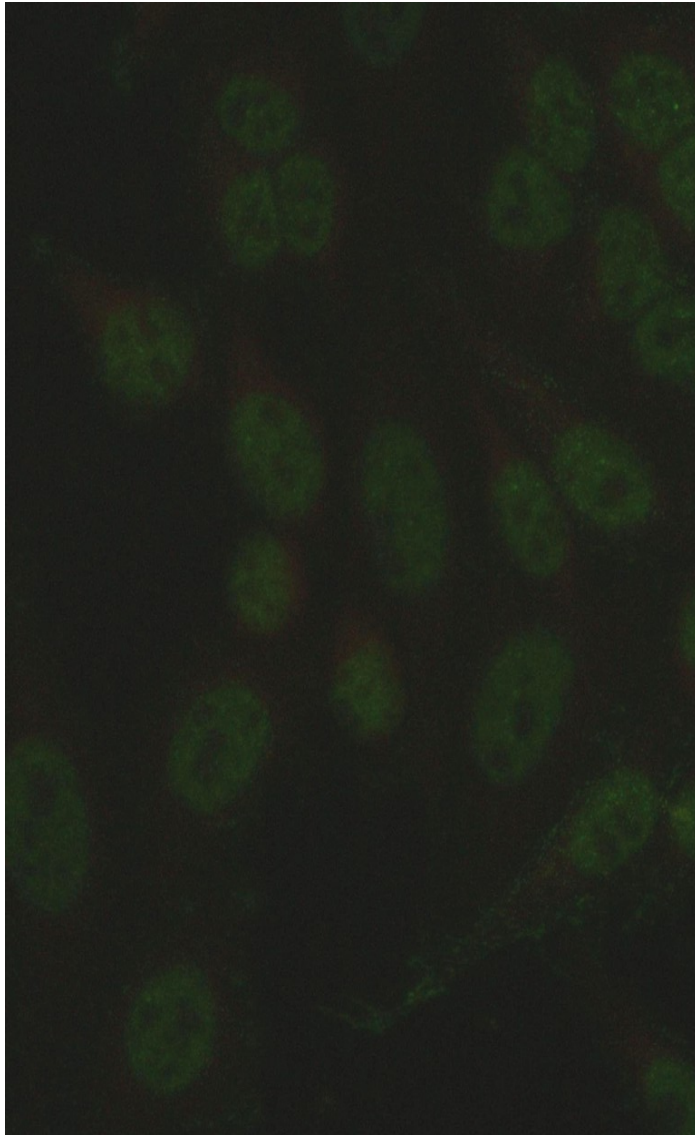


Fig. 29-b Patrón punteado fino (AC-4) más citoplasmático (AC-19) en paciente con EMTC y anticuerpos anti-Sm/RNP e histonas de clase IgG e IgA (conjugado IgA)

7.2.5. Datos comparativos basales de los pacientes

Se realizó un análisis comparativo basal para valorar las diferencias clínicas y analíticas basales entre los pacientes con diagnóstico de ETC-EPID o IPAF atendiendo a si presentaron o no ENAs en LBA. Entre las variables cuantitativas, el grado de disnea, la saturación basal de oxígeno y los porcentajes de linfocitos, eosinófilos y basófilos presentaron una distribución no normal (**tabla 25**).

**Tabla 25. Test normalidad variables cuantitativas
(Kolmogorov-Smirnov)**

Variable	Z	p
Edad	0,972	0,301
Disnea MRCm (0/1/2/3/4)	1,886	0,002
FVC (% predicho)	0,831	0,494
FEV ₁ (% predicho)	0,549	0,924
FEV ₁ /FVC (% predicho)	0,816	0,518
TLC (% predicho)	0,575	0,895
DL _{CO} (% predicho)	0,681	0,743
CPI	0,804	0,538
SatO ₂ basal (mmHg)	1,703	0,006
PM6M (metros)	0,820	0,512
SatO ₂ final (mmHg)	1,020	0,250
% Macrófagos	0,787	0,566
% Linfocitos	1,462	0,028
% Neutrófilos	1,183	0,122
% Eosinófilos	2,541	0,000
% Basófilos	2,912	0,000

*Cuando $p < 0,05$ la distribución es no normal y debe aplicarse un test no paramétrico

La distribución por sexo y edad fue similar en los pacientes donde se detectaron ENAs en el LBA y en los que no. Tampoco se encontraron diferencias en la frecuencia de tabaquismo (**tabla 26**).

Tabla 26. Presencia de ENAs en LBA Vs variables clínico-epidemiológicas n(%)

	ENA-	ENA +	estadístico	p valor
Edad	65 ± 13	63 ± 12	t	0,500
Sexo (hombre/mujer)	10/19	10/9	Chi ²	0,870
Tabaquismo (activo/exfumador/nu)	8/9/12	3/5/11	Chi ²	0,149

No se encontraron diferencias en el grado de disnea, la FVC, la FEV₁, la TLC, la DLco, el CPI, ni la saturación de oxígeno. Las únicas variables relacionadas con la funcionalidad que presentaron diferencias significativas fue el ratio FEV₁/FVC (p=0.031), que es ligeramente más bajo en los pacientes positivos para ENAs en LBA, y la distancia recorrida en el PM6M que fue mayor en los pacientes con ENAs en el LBA (p=0.041). Cuando aplicamos la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples, y considerando que se estudian diez variables dentro de esta categoría, ni el ratio FEV₁/FVC ni la PM6M alcanzaron la significación estadística (p corregida<0.005) (**tabla 27**).

Tabla 27. Presencia de ENAs en LBA Vs variables funcionales n(%)

	ENA-	ENA +	estadístico	
Disnea MRCm (0/1/2/3)	2/10/16/1/0	4/7/6/2/0	U	0,300
FVC (% predicho)	65,5 ± 16,5	68,2 ± 20,1	t	0,624
FEV ₁ (% predicho)	68,0 ± 16,8	66,5 ± 22,9	t	0,819
FEV ₁ /FVC (% predicho)	77,8 ± 7,8	70,9 ± 12,6	t	0,031
TLC (% predicho)	91,8 ± 25,4	79,0 ± 17,1	t	0,200
DL _{co} (% predicho)	63,7 ± 21,3	58,9 ± 22,7	t	0,527
CPI	43,0 ± 22,5	40,4 ± 17,6	t	0,720
SatO ₂ basal (mmHg)	94 [91-97]	96 [90-97]	U	0,625
PM6M (metros)	387,1 ± 121,9	472 ± 70	t	0,041
SatO ₂ final (mmHg)	91,5 ± 3,3	89,5 ± 5,8	t	0,308

Resultados

En relación a la composición celular del LBA, tampoco se encontraron diferencias significativas en ninguna de las poblaciones estudiadas (**tabla 28**).

Tabla 28. Presencia de ENAs en LBA Vs poblaciones leucocitarias en LBA Me[RIC]

	ENA-	ENA +	estadístico	
% Macrófagos	65,3 ± 27,5	58.0 ± 21,2	t	0,334
% Linfocitos	8 [4-16]	8 [8-28]	U	0,342
% Neutrófilos	11,9 ± 16,7	18,1 ± 13,6	t	0,202
% Eosinófilos	1 [0-5]	1 [0-3]	U	0,635
% Basófilos	0 [0-1]	0 [0-0,25]	U	0,217

7.2.6. Resumen resultados estudio en LBA

Adaptando diferentes técnicas comerciales diseñadas para el estudio de autoanticuerpos en suero, hemos podido detectar la presencia de estos anticuerpos en LBA. Se ha demostrado la presencia de trece autoanticuerpos diferentes en el LBA de los pacientes así como de diferentes patrones ANA. El más frecuente de todos los ENAs estudiados es el anti-Ro52. Este autoanticuerpo aparece en un 9% de los pacientes. Estos autoanticuerpos están presentes desde el inicio de las manifestaciones clínicas; pueden aparecer exclusivamente en el LBA; y son mayoritariamente de clase IgG y en menor medida IgA e IgM. No hemos podido relacionar la presencia de estos autoanticuerpos con cambios en ninguna variable clínica con respecto a aquellos que no los presentaron.

Estos anticuerpos no estuvieron presentes en pacientes cuyo diagnóstico final fue FPI, NH, EPID por fármacos, sarcoidosis de presentación atípica, entre otros. Tampoco en aquellos que no tenían una EPID sino entidades que pueden cursar con manifestaciones clínicas y radiológicas pulmonares similares (insuficiencia cardíaca, infección en inmunosuprimidos o linfangitis carcinomatosa) que también fueron recogidos en la serie por su frecuencia en la práctica clínica diaria.

8. Discusión

El primer trabajo, analiza la utilización de autoanticuerpos, principalmente de las especificidades SSA/Ro, como biomarcadores en enfermedades autoinmunes sistémicas. En la primera sección se demuestra como la presencia de anticuerpos anti-Ro52 o anti-Ro60 en pacientes con ETCs se asocia con un patrón clínico diferente. Entre todas las diferencias encontradas, la de mayor implicación clínica, fue la fuerte asociación entre la presencia de anticuerpos anti-Ro52 y la aparición de EPID. Atendiendo a este hallazgo, creemos que los anticuerpos anti-Ro52 deberían estudiarse de forma sistemática en el cribado de EPID. La puesta en marcha del segundo trabajo, parte de esta observación. Se pudo demostrar la presencia de diferentes autoanticuerpos en el LBA de pacientes con EPID durante el inicio de la enfermedad. Se detectaron positividad para doce especificidades diferentes, siendo los anti-Ro52 los más frecuentes. Incluso en los pacientes que debutaron con ANAs negativos y que positivizaron meses después, el estudio en LBA mostró concentraciones altas desde el inicio. Estos hallazgos tienen implicaciones tanto clínicas como básicas. La detección de ENAS en LBA es una técnica económica y accesible que permite aumentar la sensibilidad en el cribado de EPID de origen autoinmune cuando se combina con el estudio en suero. Esto es especialmente relevante en las ETCs que debutan con anticuerpos negativos como algunas PM-DM. A nivel básico, la aparición de autoanticuerpos en el parénquima pulmonar refuerza las teorías que apuntan al pulmón como órgano de inicio de la autoinmunidad. Aunque este trabajo no puede ofrecer pruebas directas de este mecanismo, creemos que para generar niveles de autoanticuerpos tan altos como los detectados se requiere de un entorno inflamatorio bien establecido y de alteraciones en los mecanismos regulatorios a nivel local. Además, la elevada prevalencia sugiere que se trata de un mecanismo común. Esta hipótesis es coherente con estudios previos pero deberá ser verificada mediante estudios funcionales.

8.1 Utilidad pronóstica de las especificidades SSA/Ro en suero

- 8.1.1 Diagnósticos asociados a la presencia de especificidades SSA/Ro
- 8.1.2 Anticuerpos anti-Ro60 y afectación cutánea en LES
- 8.1.3 Anticuerpos anti-Ro52 y artritis en LES y SSp
- 8.1.4 Anticuerpos anti-Ro52, EPID y fenómeno de Raynaud
- 8.1.5 Anticuerpos anti-Ro52 y síndrome seco
- 8.1.6 Otras manifestaciones
- 8.1.7 ¿Por qué no todos los pacientes desarrollan la misma clínica?

8.1. Utilidad pronóstica de las especificidades SSA/Ro en suero

El presente estudio, pone de manifiesto los siguientes hallazgos principales: 1) En SSc y PM-DM los anticuerpos anti-Ro52 son los más frecuentes y los anti-Ro60 rara vez se detectan de forma aislada, en LES y SSc se pueden detectar ambos pero la frecuencia de los anti-Ro52 es ligeramente mayor; 2) la presencia de anticuerpos anti-Ro60 se asocia con el LECS; 3) la presencia de anticuerpos anti-Ro52 se asocia con una mayor frecuencia de artritis en los pacientes con LES o SSp y de fenómeno de Raynaud y EPID independientemente del diagnóstico. La mayoría de pacientes con SSp son positivos para Ro52 y la presencia de esta especificidad se asocia con un aumento en el síndrome de Sjögren secundario en el resto de enfermedades; 4) No se ha encontrado ninguna relación con la aparición de complicaciones renales o cardíacas ni con la presencia de serositis o tumores.

8.1.1. Diagnósticos asociados a la presencia de especificidades SSA/Ro

Los autoanticuerpos dirigidos frente a especificidades SSA/Ro pueden aparecer en múltiples enfermedades por lo que carecen de especificidad diagnóstica. Los anticuerpos frente a ambas especificidades pueden aparecer juntos o por separado. La presencia de anticuerpos frente a Ro60, junto o no a los anti-Ro52, se asocia con LES y SSp. Aunque también es posible encontrar pacientes con estos diagnósticos que presenten únicamente anticuerpos anti-Ro52. Los pacientes con PM-DM presentan casi exclusivamente anticuerpos anti-Ro52 de forma aislada. Los pacientes con SSc presentan mayoritariamente anticuerpos anti-Ro52 de forma aislada aunque en ocasiones pueden expresar simultáneamente anticuerpos anti-Ro60. En todos los diagnósticos, los anticuerpos anti-Ro52 son más frecuentes que los anti-Ro60. Por este motivo, recomendamos utilizar un método capaz de detectarlos durante el cribado de

autoinmunidad no órgano específica. Nuestros resultados se alinean con los mostrados por otros autores ⁽³²¹⁾⁽³⁴⁰⁾⁽³⁴¹⁾⁽³⁴²⁾.

8.1.2. Anticuerpos anti-Ro60 y afectación cutánea en el LES

En el LES la aparición de anti-SS-A/Ro se asocia a rash malar, fotosensibilidad y LECS desde hace décadas ⁽³⁴³⁾. La práctica totalidad de pacientes con LECS presentaran estos anticuerpos anti-Ro52 ⁽³⁴⁴⁾ y algunos estudios han relacionado la presencia de títulos elevados con la aparición de manifestaciones extracutáneas en estos pacientes ⁽³⁴⁵⁾⁽³⁴⁶⁾. También se ha visto la asociación de los anticuerpos anti-Ro52 con fotosensibilidad en otras enfermedades, como la PM-DM, donde esta manifestación es menos frecuente ⁽³⁴⁷⁾.

El mecanismo subyacente no está bien definido. Pero se ha demostrado que la expresión de la proteína Ro52 está aumentada en los queratinocitos de pacientes con Lupus cutáneo, y en otras enfermedades inflamatorias de la piel, y que la radiación ultravioleta aumenta los niveles en pacientes sanos ⁽³¹¹⁾. Esta sobreexpresión puede desencadenar la producción de anticuerpos frente a la proteína Ro52 ⁽³⁴⁸⁾⁽³⁴⁹⁾. El knock-out para Ro52 no desarrolla dermatitis de manera espontánea pero si a en respuesta a lesiones ⁽³⁵⁰⁾. La implicación de la proteína Ro60 ha sido menos estudiada, pero algunas cepas murinas desarrollan sensibilidad a la radiación ultravioleta al bloquear el gen Ro60 ⁽³⁵¹⁾. Estos modelos sugieren que ambas especificidades podrían promover la clínica cutánea pero el papel de Ro52 parece mucho más claro. Sorprendentemente, en nuestra serie los anticuerpos anti-Ro60 son los principales implicados y se relacionan con un aumento del LECS.

8.1.3. Anticuerpos anti-Ro52 y artritis en el LES y SSp

Los trabajos que han tratado buscar relaciones entre la presencia de anticuerpos anti-SSA/Ro y daño articular son escasos, y en su mayoría inconcluyentes. Un único trabajo relacionó la presencia de anticuerpos anti-Ro52 con el desarrollo de artritis en pacientes con PM-DM pero ⁽³⁵²⁾ en otras enfermedades como el LES y el SSp donde la afectación articular es mayoritaria, no ha podido confirmarse. Otro trabajo asoció la aparición de anticuerpos anti-Ro52 con la artropatía de Jaccoud ⁽³²²⁾. Nuestro estudio inicial, mostró una posible relación entre los anticuerpos anti-Ro52 y artritis en el LES,

pero no pudo verificarse al ampliar la serie. La relación con artropatía de Jaccoud fue descartada.

8.1.4. Anticuerpos anti-Ro52, EPID y fenómeno de Raynaud

Diferentes estudios han subrayado la relación entre la presencia de anticuerpos anti-Ro52 y EPID en pacientes con SSc⁽³⁵³⁾⁽³⁵⁴⁾ y PM-DM⁽³⁵²⁾⁽³⁵²⁾⁽³⁵³⁾. Un estudio que comparó pacientes con anticuerpos positivos para solo una de las dos especificidades mostró que también los pacientes con SSp y anticuerpos anti-Ro52 podían desarrollar EPID⁽³⁴²⁾. Este mismo estudio encontró anticuerpos anti-Ro52 en algunos pacientes con EPID no asociada a ETCs, pero ninguno de los pacientes con LES presentó EPID. Además de lo ya expuesto por otros autores, este trabajo también demuestra el aumento de la EPID en pacientes con LES y anticuerpos anti-Ro52. Este dato no es sorprendente ya la EPID es una manifestación infrecuente en el LES y nuestro estudio tiene un tamaño muestral tres veces mayor. Creemos que los anticuerpos anti-Ro52 deberían ser considerados como predictores de EPID independientemente del diagnóstico. Así mismo, los pacientes positivos podrían verse beneficiados de un seguimiento mediante pruebas funcionales respiratorias y radiológicas. No conocemos estudios básicos que relacionen la proteína Ro52 ni los anticuerpos frente a ella con los mecanismos fisiopatológicos de la EPID, pero por lo que se desprende de los modelos de LECS y SSp, estos anticuerpos podrían estar involucrados. Serán necesarios estudios futuros que confirmen esta hipótesis.

Pese a que ha habido intentos de estandarizar el estudio inmunológico en el cribado de EPID⁽³⁵⁷⁾, todavía no existen recomendaciones avaladas por las sociedades científicas. Muchos laboratorios realizan únicamente el estudio de ANAs mediante IFI y si estos son negativos no se estudian las especificidades ENA. Dado que los anticuerpos anti-SSA/Ro no presentan un patrón ANA característicos (pudiendo ser negativos)⁽³²⁰⁾, creemos que deberían estudiarse de manera rutinaria.

La aparición de autoanticuerpos anti-Ro52 está fuertemente asociada con la aparición de fenómeno de Raynaud en SSc⁽³²⁴⁾⁽³⁵⁴⁾, LES⁽³⁵⁸⁾, y PM-DM⁽³⁴⁷⁾⁽³⁵²⁾. Nuestro trabajo confirma estos datos y muestra también asociación en el SSp.

8.1.5. Anticuerpos anti-Ro52 y síndrome seco

El síndrome seco es sin duda la manifestación más comúnmente asociada con la presencia de anticuerpos anti-SSA/Ro. Y diferentes publicaciones relacionan alteraciones en la expresión de la proteína Ro52 o a la aparición de anticuerpos frente a ella con la patogénesis. Así, la expresión de la proteína Ro52 correlaciona con la inflamación de las glándulas salivares en pacientes con SS₍₃₅₉₎. Además, la inmunización de ratones con la proteína Ro52 genera inflamación de la glándula salivar inducida por la síntesis de anticuerpos precipitantes ₍₃₆₀₎. Finalmente, en modelos murinos de inmunización pasiva con anticuerpos dirigidos contra el dominio C terminal de la proteína Ro52 se observa también depósito de inmunoglobulinas en la glándula submandibular acompañada de sialodentitis y disminución en la secreción de saliva ₍₃₆₀₎₍₃₆₁₎. En el SSp es frecuente encontrar anticuerpos frente a ambas especificidades, pero dado que las células plasmáticas antígeno específicas para Ro52 duplican a las anti-Ro60 el título de los anti-Ro52 es generalmente más alto ₍₃₆₂₎. La aparición de anticuerpos anti-Ro52 también se ha asociado con el desarrollo de síndrome seco secundario en el SSC ₍₃₆₃₎ y el LES ₍₃₅₈₎.

En concordancia con todos los trabajos mencionados, nuestro estudio muestra una clara prevalencia de los anticuerpos anti-Ro52 frente a los anti-Ro60 en los pacientes con SSp y un aumento en la probabilidad de desarrollar síndrome seco secundario en los pacientes con otros diagnósticos y anticuerpos anti-Ro52.

8.1.6. Otras manifestaciones

En LES, los inmunocomplejos circulantes son más ricos en anticuerpos frente a Ro52 que en anti-DNA ⁽³⁶⁴⁾, recordemos que el depósito glomerular de estos inmunocomplejos se relacionan con el daño renal en el LES. Además, tanto el Knock-out para Ro52 como Ro60 desarrollan glomerulonefritis ⁽³⁵⁰⁾⁽³⁵¹⁾. Sin embargo, en humanos, los anticuerpos anti-SSA/Ro no se asocian con el desarrollo de nefritis lúpica ⁽³⁶⁵⁾. Nuestros resultados se alinean con el resto de estudios al no detectar relación con la presencia de ninguna de las especificidades y el daño renal.

La relación de los anticuerpos anti-Ro52 con el bloqueo cardiaco congénito ha sido ampliamente documentada. Se ha demostrado que anticuerpos dirigidos frente a la región compuesta por los aminoácidos 220-239 (p200) de la proteína Ro52 con capaces de unirse a los cardiomiocitos, alterar la homeostasis del calcio y mediar el bloqueo cardiaco congénito ⁽³⁶⁶⁾. Algunos trabajos sugieren que estos anticuerpos también podrían generar daño cardiaco en niños expuestos durante el embarazo ⁽³⁶⁷⁾ o adultos con LES ⁽³⁶⁸⁾. Sin embargo, en nuestro estudio no hemos podido detectar ninguna relación entre estos anticuerpos y el desarrollo de manifestaciones cardiacas. La baja prevalencia de esta manifestación y el hecho de que no todos los anticuerpos dirigidos frente a Ro52 tengan propiedades cardiotóxicas han podido dificultar su detección.

Algunos autores ha propuesto que el gen SSA/Ro52 podría actuar como un gen supresor de tumores a través de su función putativa como regulador de la transcripción ⁽²⁹¹⁾. Este gen está localizada en el brazo corto del cromosoma 11, una región que parece contener genes relacionados con el desarrollo de neoplasias ⁽³⁶⁹⁾. La proteína Ro52 regula factores de transcripción implicados en el desarrollo de cáncer de mama ⁽³⁷⁰⁾ y ha sido propuesta como un marcador tumoral en linfoma ⁽³⁷¹⁾ y cáncer de ovario ⁽³⁷²⁾. Un pequeño porcentaje de pacientes con anticuerpos anti-Ro52 no presentará signos de ninguna ETC, algunos de estos presentarán tumores ⁽³²¹⁾⁽³⁴¹⁾. Entre los casi 300 pacientes del HUGTiP con anticuerpos anti-SSA/Ro, menos de un 1% presentó estaba diagnosticado únicamente de una neoplasia. Los tumores fueron una manifestación poco frecuente entre los pacientes con ETCs y no se pudo encontrar ninguna relación entre su aparición y la especificidad de los anticuerpos.

8.1.7. ¿Por qué no todos los pacientes desarrollan la misma clínica?

No todos los anticuerpos dirigidos frente a una misma proteína tendrán la misma función biológica. Los anticuerpos frente a una proteína que presenta un paciente rara vez son monoespecíficos, sino que están dirigidos frente a múltiples epítomos. Y el porcentaje de anticuerpos dirigidos frente a un epítomo concreto puede variar dependiendo del paciente. Sin embargo, los métodos comerciales para la cuantificación de anticuerpos, no son capaces de discernir frente a que epítomo de la proteína están dirigidos. En modelos de inmunización pasiva con anticuerpos anti-Ro52, solo los dirigidos frente al dominio C terminal provocan el depósito de inmunoglobulinas en la glándula submandibular ⁽³⁶¹⁾. Y solamente los dirigidos contra el fragmento p200 son capaces de bloquear los canales de calcio ⁽³⁶⁶⁾. Parte de la variabilidad de los síntomas desarrollados por los pacientes con anticuerpos anti-Ro52 podría explicarse por el epítomo al que están dirigidos. Si esto fuera cierto, un mapeo de los anticuerpos podría mejorar el rendimiento diagnóstico. Además, el método de detección también puede distorsionar los resultados. Los anticuerpos dirigidos contra a la fracción C terminal de Ro52 reconocen epítomos conformacionales, que no pueden ser detectados mediante inmunoensayos en fase sólida ⁽³⁷³⁾.

8.2 Utilidad pronóstica de las especificidades SSA/Ro en LBA

- 8.1.1 Necesidad de biomarcadores para ETC-EPID
- 8.1.2 Utilidad en el diagnóstico diferencial
- 8.1.3 Características de los pacientes positivos
- 8.1.4 Especificidades encontradas
- 8.1.5 Isotipo de los anticuerpos detectados
- 8.1.6 Los autoanticuerpos pueden encontrarse exclusivamente en LBA

8.2. Utilidad de la detección de autoanticuerpos en LBA

La detección de autoanticuerpos en el LBA está en consonancia con los resultados obtenidos en la primera parte del trabajo. Nuestro estudio, pone de manifiesto los siguientes hallazgos principales: 1) El LBA de algunos pacientes con EPID contiene autoanticuerpos que son detectables mediante múltiples técnicas. Los ensayos comerciales destinados a la detección de autoanticuerpos en suero son fácilmente adaptables. Por tanto, se trata de una metodología económica, sencilla y fácilmente aplicable a la práctica clínica; 2) Se trata de marcadores tempranos y resultan útiles en el diagnóstico diferencial; 3) La presencia de estos autoanticuerpos no se ha relacionado con diferencias clínicas ni funcionales en el momento del diagnóstico; 4) Es posible detectar múltiples especificidades, la más común es anti-Ro52. 5) Estos anticuerpos son mayoritariamente del isotipo IgG, pero también encontramos anticuerpos de clase IgA lo que demuestra la síntesis *in-situ*; 6) Los autoanticuerpos pueden encontrarse exclusivamente en el LBA.

8.2.1. Necesidad de biomarcadores para ETC-EPID

En general, la mayoría de biomarcadores moleculares para el diagnóstico de EPID estudiados hasta el momento reflejan la activación aberrante de las células epiteliales o la actividad del sistema inmune. Hasta hoy, solamente MUC5B, MMP-7⁽²⁸⁰⁾⁽²⁷⁸⁾⁽²⁷⁹⁾⁽²⁵³⁾ y en menor medida KL-6 y SP-A/D⁽²⁵¹⁾⁽²⁵²⁾⁽²⁵⁴⁾ han sido estudiados en cohortes de validación suficientemente grandes y demostrado utilidad clínica que mejore la obtenida mediante las herramientas diagnósticas convencionales. Además, la mayoría de los biomarcadores descritos están orientados a diferenciar la FPI de otras formas de EPID. Actualmente, se carece de ningún biomarcador que permita diferenciar formas tempranas de ETC-EPID. En este contexto, consideramos que el estudio de autoanticuerpos en LBA puede ser una herramienta útil que complementa a

las pruebas en suero y permite confirmar el origen autoinmune de algunos pacientes con EPID de presentación poco clara. Ha sido posible encontrar autoanticuerpos frente a múltiples especificidades y mediante diferentes técnicas (Inmunoblot, ELISA, IFI) por lo que creemos que se trata de una estrategia robusta que podría incorporarse al diagnóstico de rutina con un mínimo coste económico y aplicarse a otras enfermedades.

8.2.2. Utilidad en el diagnóstico diferencial

La mayoría de los pacientes positivos para algún anticuerpo ya habían sido diagnosticados de ETC pero sin constancia de evidencia previa de EPID, o bien desarrollaron una ETC en los meses subsiguientes. Esto hace útil a este biomarcador en el diagnóstico diferencial de la ETC-EPID frente a otras formas de EPID (como FPI o NH), o de otras enfermedades que se pueden confundir con EPID en la práctica clínica diaria (insuficiencia cardíaca, linfangitis carcinomatosa, etc).

Recordemos que la EPID puede ser la primera manifestación de una ETC, especialmente en el SSp₍₁₃₄₎₍₁₉₄₎₍₂₀₆₎₍₂₀₈₎₍₂₀₉₎₍₂₁₀₎. Varios de los pacientes tuvieron esta presentación, y en todos los casos los autoanticuerpos fueron detectables en el LBA desde el inicio. En estos casos, disponer de un marcador temprano es tremendamente útil ya que justificaría un seguimiento más frecuente.

8.2.3. Características de los pacientes positivos

No hemos podido encontrar diferencias entre los pacientes que presentan autoanticuerpos en LBA y los que no en el momento del diagnóstico. Resultaría conveniente comparar los pacientes con diagnóstico de ETC positivos con los negativos, pero dado que la mayoría de pacientes con ETC son positivos sería necesario aumentar la serie. Debido a la baja prevalencia de la enfermedad, para poder ampliar la cohorte, se requeriría de la colaboración de más centros. Asimismo, sería interesante, estudiar la evolución a largo plazo de estos pacientes.

8.2.4. Especificidades encontradas

En base a la literatura y a los datos del estudio en suero, se planteó que los anticuerpos anti-Ro52 podían ser relevantes en los mecanismos patogénicos de la EPID. Esta hipótesis queda reforzada, ya que fueron detectados a concentraciones altas, y en un número significativo de pacientes con diferentes diagnósticos. Además, como hallazgo no esperado, hemos podido detectar otros doce autoanticuerpos relacionados con siete enfermedades diferentes. Este hallazgo abre la puerta a nuevas investigaciones.

8.2.5. Isotipo de los anticuerpos detectados

Otro hallazgo inesperado, es la mayor prevalencia de anticuerpos de clase IgG sobre los IgA. En las mucosas, los anticuerpos de clase IgA son mayoritarios y la concentración pulmonar de IgG es muy baja, mientras que en sangre periférica las inmunoglobulinas de isotipo IgA tienen una semivida muy corta, por lo que son muy minoritarias ⁽¹⁰⁾. Sin embargo, hemos encontrado pacientes positivos para anticuerpos de clase IgG y negativos para IgA. Además, la concentración de los anticuerpos de clase IgG fue siempre igual o mayor que la de los de clase IgA. Esta aparente incongruencia podría explicarse por una falta de sensibilidad del conjugado IgA, este reactivo está diseñado para detectar anticuerpos en suero donde prevalece la mIgA respecto a la pIgA. También podría deberse a que las pIgA están fuertemente unidos a la capa de moco del epitelio y no llegan a la fase líquida que se recoge en el LBA. Una causa menos probable, sería que en los pacientes con EPID el cambio de isotipo estuviera desplazado de IgA a IgG. No existen datos sobre la composición de las Igs en el LBA de pacientes con EPID, pero esta desviación es poco probable porque la EPID requiere de un microambiente pulmonar rico en citoquinas que promueven el isotipo IgA (TGF- β , IL-5) ⁽¹⁵³⁾⁽⁴⁸⁾ y pobre en el principal promotor del IgG (IFN- γ) ⁽⁴²⁾⁽⁴³⁾. No obstante, este aspecto debería confirmarse en futuros estudios porque una alteración en la composición de las Igs podría tener repercusiones clínicas. A diferencia de la IgA, la IgG es capaz de activar la vía clásica del complemento. Por tanto, un aumento de esta Ig en un tejido expuesto al medio exterior como el epitelio pulmonar podría desencadenar un proceso inflamatorio crónico. Además, una disminución de la pIgA implicaría un fallo en los mecanismos de barrera, lo que facilitaría la aparición de infecciones ⁽⁹¹⁾⁽⁹²⁾.

En sangre periférica las inmunoglobulinas de isotipo IgA tienen una semivida de pocos días, por lo que son muy minoritarias ⁽¹⁰⁾. Por este motivo, es muy improbable que los anticuerpos de clase IgA detectados procedan de una

contaminación con sangre periférica. Y pese a ser minoritarios, su mera presencia de demuestra la síntesis *in-situ*. Esto apoya la hipótesis de que, al menos en algunos pacientes, el pulmón sea el órgano de inicio de la autoinmunidad no órgano específica.

8.2.6. Utilidad de la determinación de autoanticuerpos en el LBA

Aunque todos los pacientes que presentaron autoanticuerpos en LBA mostraron también estos autoanticuerpos en sangre, hay motivos que nos hacen creer que el estudio en LBA puede aportar información relevante. Todos los pacientes se estudiaron al iniciarse las manifestaciones pulmonares, por lo que pensamos que estos autoanticuerpos no son un epifenómeno, sino que probablemente forman parte del proceso patológico. Por otra parte, aunque la matriz de elección para la detección de autoanticuerpos es casi siempre la sangre, en algunas neuropatías que afectan al sistema nervioso central (como la esclerosis múltiple, la neuromielitis óptica y algunos síndromes paraneoplásicos), en las que hay síntesis intratecal de autoanticuerpos, el estudio en LCR es de gran utilidad. En ocasiones, estos autoanticuerpos pueden encontrarse únicamente en el LCR y no en el suero. En base a evidencias, planteamos las siguientes especulaciones.

Está bien establecido, que la aparición de autoanticuerpos en suero puede adelantarse en años a las primeras manifestaciones clínicas ⁽²⁹⁴⁾⁽²⁹⁵⁾. En base a esto, creemos que su aparición en LBA podría servir como marcador temprano de desarrollo de EPID en pacientes con ETCs.

En la AR existen indicios de que la enfermedad podría iniciarse en órganos diferentes al sinovio ⁽³⁷⁴⁾. Se ha propuesto un mecanismo que se inicia con la citrulinización aberrante de diferentes proteínas como consecuencia de alteraciones en el microambiente pulmonar. Estas proteínas modificadas inducen la síntesis de autoanticuerpos relacionados con la AR dentro del pulmón ⁽²⁹⁰⁾ y los LB que secretan estos autoanticuerpos son capaces de circular a la periferia ⁽²⁹⁾. Mecanismos similares, en los que un autoantígeno críptico (aquel que se genera tras una modificación de la proteína) u oculto es reconocido por el sistema inmune pulmonar, generando una respuesta local que posteriormente es capaz de expandirse a otros órganos, podrían contribuir al desarrollo de otras ETCs. Por los motivos que se explicarán a continuación, creemos que la autoinmunidad dirigida frente a la proteína Ro52 es un candidato a seguir esta vía.

8.3. ¿Porque son tan comunes los anticuerpos anti-Ro52?

A lo largo de esta tesis se ha mostrado la ubicuidad de los anticuerpos anti-Ro52 en las ETCs y su relación con el desarrollo de EPID independientemente del diagnóstico. Esto nos sugiere que la proteína Ro52 o los anticuerpos dirigidos frente a ella pueden estar involucrados en un proceso patogénico común. En este último punto, se propone un mecanismo que podría explicar nuestros hallazgos y relacionarlos con la literatura existente.

La proteína Ro52 se expresa de forma ubicua, pero el pulmón es uno de los órganos donde su concentración es más elevada ⁽³⁷⁵⁾. También sabemos que sus niveles aumentan ante estímulos inflamatorios ⁽³⁰⁸⁾⁽³⁰⁹⁾ y el estrés oxidativo ⁽³¹¹⁾⁽³¹²⁾ y que durante la apoptosis migra a la superficie celular ⁽³¹⁵⁾⁽³¹⁶⁾ donde puede ser reconocida por el sistema inmune favoreciendo la síntesis de anticuerpos frente a ella. El estrés oxidativo es una de los factores implicados en el desarrollo de la fibrosis ⁽¹⁷³⁾ y aunque el microambiente del pulmón es eminentemente antiinflamatorio, la colonización por microorganismos es constante. Ambos fenómenos pueden desencadenar apoptosis. Estos factores podrían iniciar eventos en los que la proteína Ro52 se sobreexpresa localmente y se expone al sistema inmune en la superficie de los restos celulares. Estos restos celulares son una fuente de antígeno que permite la producción de anticuerpos frente a la proteína Ro52 ⁽³¹³⁾⁽³¹⁴⁾. Estos autoanticuerpos podrían exacerbar la inflamación y generar un bucle de retroalimentación que perpetuara la inflamación ⁽³⁷⁶⁾. Un estudio in vitro demostró que los anticuerpos anti-Ro52 son capaces de bloquear la ubiquitinización mediada por la proteína Ro52 ⁽³⁷⁷⁾. También ha sido demostrada la capacidad de estos autoanticuerpos para penetrar al interior celular a través de un proceso activo de internalización ⁽³⁶⁰⁾. Por tanto, los anticuerpos anti-Ro52 tienen la potencialidad de interactuar con la proteína Ro52 y modificar su función. Cabe recordar que la proteína Ro52 está implicada en la respuesta antiviral ^{(378) (317) (319)}, es un potente modulador de la vía del IFN ⁽³⁰⁹⁾⁽³¹⁴⁾⁽³¹⁷⁾⁽³¹⁰⁾⁽³¹⁸⁾⁽³¹⁹⁾ y un inductor de la apoptosis ⁽³¹³⁾⁽³⁰⁴⁾. Así que bloqueando su funcionalidad se propician los mismos mecanismos que pueden inducir la síntesis de autoanticuerpos frente a ella, favoreciendo un ciclo vicioso que lleva a la síntesis de más autoanticuerpos y que puede contribuir al desarrollo de la autoinmunidad (**figura 30**).

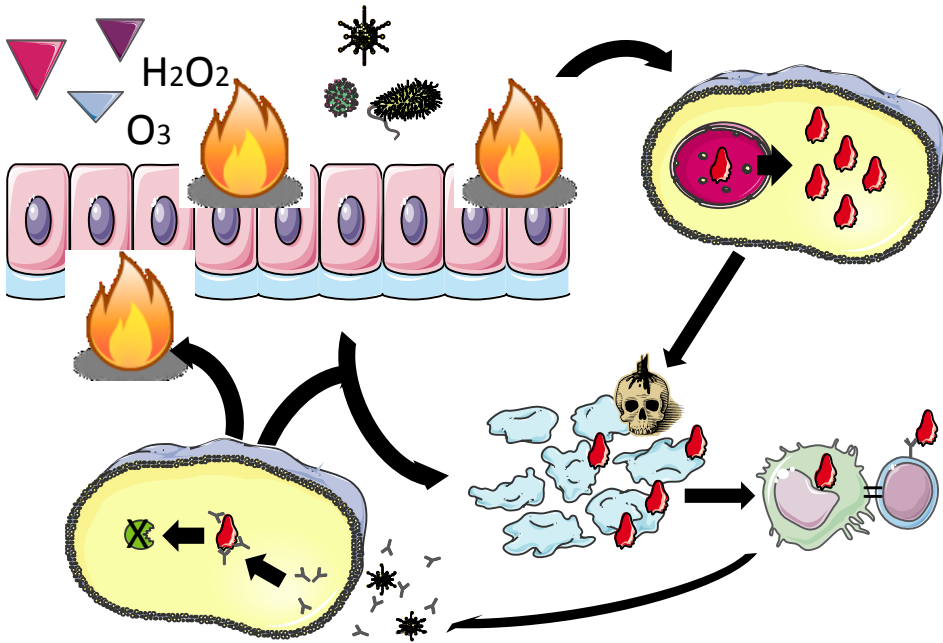


Figura 30. Posible mecanismo de acción de los anticuerpos anti-Ro52 en la EPID

1) Las infecciones, el estrés oxidativo y otros factores que generan apoptosis e inflamación en el epitelio inducen también la síntesis de la proteína Ro52 (●) y su tránsito al citoplasma. 2) Durante la apoptosis la proteína Ro52 migra a la superficie celular donde puede ser reconocida por el sistema inmune. 3) En algunas condiciones los anticuerpos anti-Ro52 pueden penetrar al interior celular, bloqueando la actividad de la proteína. 4) Como consecuencia aumentan la inflamación y la apoptosis perpetuando el mecanismo patológico.

Elaboración propia a partir de imágenes de uso libre descargadas de la biblioteca <https://smart.servier.com>

9. CONCLUSIONES

- I. La determinación de los anticuerpos anti-Ro52 y anti-Ro60 por separado es útil en el diagnóstico de enfermedades del tejido conectivo. Los pacientes con anticuerpos anti-Ro52 presentan un aumento de la enfermedad pulmonar intersticial difusa, fenómeno de Raynaud y síndrome de Sjögren secundario independientemente del diagnóstico.
- II. En la enfermedad pulmonar intersticial difusa, el estudio de cribado de autoinmunidad no está bien estandarizado. La alta prevalencia de los autoanticuerpos anti-Ro52 sugiere que deberían estudiarse de forma rutinaria.
- III. El lavado broncoalveolar de algunos pacientes con enfermedad pulmonar intersticial difusa contiene autoanticuerpos relacionados con múltiples enfermedades del tejido conectivo. Hasta nuestro conocimiento, se trata de un hallazgo novel, no previamente descrito. Estos autoanticuerpos son tanto del isotipo IgG como del IgA y su concentración es elevada. Esto parece indicar una síntesis *in-situ*.
- IV. Estos autoanticuerpos son fácilmente detectables mediante técnicas convencionales que pueden ser incorporadas a la práctica diaria. Estos anticuerpos no aparecen en pacientes con otras formas de enfermedad pulmonar intersticial difusa, por lo cual, su estudio puede mejorar la sensibilidad diagnóstica del estudio en suero y añadir información valiosa en el algoritmo inicial de manejo de la enfermedad pulmonar intersticial difusa.
- V. Los autoanticuerpos están presentes en el pulmón desde el inicio de las manifestaciones de la enfermedad pulmonar intersticial difusa. Por este motivo, podrían ser útiles en el diagnóstico temprano de la enfermedad pulmonar intersticial difusa asociada a enfermedades del tejido conectivo.

10. LÍNEAS DE FUTURO

La presente tesis doctoral pone de manifiesto dos hallazgos principales: En primer lugar, la utilidad de los autoanticuerpos anti-Ro52 como marcador de daño órgano específico en las ETC y en segundo lugar, la detección de autoanticuerpos en el lavado broncoalveolar en pacientes con EPID de debut.

Las líneas futuras que pensamos pueden ser de utilidad son las siguientes:

- 1) Los autoanticuerpos pueden servir como marcadores tempranos del desarrollo de Enfermedad Pulmonar Intersticial difusa (EPID) en pacientes con enfermedades del tejido conectivo (ETCs). Por este motivo se ha planteado realizar un estudio prospectivo en pacientes con ETCs y alto riesgo de desarrollo de EPID como la Esclerosis sistémica y la Artritis reumatoide sin manifestaciones pulmonares previas.
- 2) El estudio no evidencia diferencias significativas en la situación basal de los pacientes con EPID que presentaron anticuerpos en LBA respecto a los que no. Se desconoce si puede haber cambios en la evolución a largo plazo. Actualmente se está haciendo seguimiento de los pacientes para valorar la supervivencia y la evolución de variables clínicas radiológicas y funcionales.
- 3) Este estudio evidencia la utilidad de los antígenos extraíbles del núcleo (ENAs) como marcadores diagnósticos en pacientes con ETC-EPID. Además se ha demostrado la presencia de otros autoanticuerpos, como los relacionados con esclerosis sistémica, polimiositis, artritis reumatoide y vasculitis. Debido a la baja prevalencia de algunos de estos anticuerpos y a su alta asociación con diagnósticos concretos, es necesario plantear estudios multicéntricos para cada uno de las ETCs asociadas a EPID.
- 4) En el diagnóstico serológico de la autoinmunidad no órgano específico se estudian únicamente anticuerpos de isotipo IgG. Se evidencia la síntesis de autoanticuerpos de isotipo IgA en el tejido ergo parece natural valorar la presencia de estos anticuerpos también en el suero. La aparición de este isotipo podría reflejar un origen pulmonar de la enfermedad o anticipar la aparición de manifestaciones pulmonares.

- 5) La elevada prevalencia de los anticuerpos anti-Ro52 y su vinculación a múltiples enfermedades, sugiere que pueden estar relacionados con el mecanismo etiológico de la autoinmunidad. En la discusión, se plantea un posible mecanismo desencadenado por la regulación de la proteína Ro52 mediante su unión a autoanticuerpos intracelulares. Verificar esta hipótesis, requiere de experimentos *in-vitro* que evalúen el efecto de la adición de sueros de pacientes a cultivos celulares en condiciones de estrés como la infección viral, la adición de citoquinas proinflamatorias o la exposición a luz ultravioleta.

“Because it's there.”

George Mallory

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Gould SJ, Isaacson PG. *Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) in human fetal and infant lung.* **J Pathol.** 1993;169(2):229–34.
2. Emery JL, Dinsdale F. *The postnatal development of lymphoreticular aggregates and lymph nodes in infants' lungs.* **J Clin Pathol.** 1973;26(7):539–45.
3. Pabst R, Gehrke I. *Is the bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) an integral structure of the lung in normal mammals, including humans?* **Am J Respir Cell Mol Biol.** 1990;3(2):131–5.
4. Hiller AS, Tschernig T, Kleemann WJ, Pabst R. *Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) and larynx-associated lymphoid tissue (LALT) are found at different frequencies in children, adolescents and adults.* **Scand J Immunol.** 1998;47(2):159–62.
5. Richmond I, Pritchard GE, Ashcroft T, Avery A, Corris PA, Walters EH. *Bronchus associated lymphoid tissue (BALT) in human lung: its distribution in smokers and non-smokers.* **Thorax.** 1993;48(11):1130–4.
6. Sue-Chu M, Karjalainen EM, Altraja A, Laitinen A, Laitinen LA, Naess AB, et al. *Lymphoid aggregates in endobronchial biopsies from young elite cross-country skiers.* **Am J Respir Crit Care Med.** 1998;158(2):597–601.
7. Sato A, Hayakawa H, Uchiyama H, Chida K. *Cellular distribution of bronchus-associated lymphoid tissue in rheumatoid arthritis.* **Am J Respir Crit Care Med.** 1996;154(6 Pt 1):1903–7.
8. Wei J, Bhattacharyya S, Tourtellotte WG, Varga J. *Fibrosis in systemic sclerosis: emerging concepts and implications for targeted therapy.* **Autoimmun Rev.** 2011;10(5):267–75.
9. Vijay-Kumar M, Aitken JD, Gewirtz AT. *Toll like receptor-5: Protecting the gut from enteric microbes.* **Semin Immunopathol.** 2008;30(1):11–21.
10. Lusuardi M, Capelli A, Di Stefano A, Donner CF. *Lung mucosal immunity: immunoglobulin-A revisited.* **Eur Respir J.** 2002;19(4):785; author reply 785-6.
11. Salvi S, Holgate ST. *Could the airway epithelium play an important role in mucosal immunoglobulin A production?* **Clin Exp Allergy.** 1999;29(12):1597–605.
12. Hussell T, Bell TJ. *Alveolar macrophages: Plasticity in a tissue-specific context.* **Nat Rev Immunol.** 2014;14(2):81–93.
13. Johansen FE, Pekna M, Norderhaug IN, Haneberg B, Hietala MA, Krajci P, et al. *Absence of epithelial immunoglobulin A transport, with increased mucosal leakiness, in polymeric immunoglobulin*

- receptor/secretory component-deficient mice. J Exp Med. 1999;190(7):915–22.*
14. Stumpo R, Kauer M, Martin S, Kolb H. *Alternative activation of macrophage by IL-10. Pathobiology. 1999;67(5–6):245–8.*
 15. Alber A, Howie SEM, Wallace WAH, Hirani N. *The role of macrophages in healing the wounded lung. Int J Exp Pathol. 2012;93(4):243–51.*
 16. He C, Ryan AJ, Murthy S, Carter AB. *Accelerated development of pulmonary fibrosis via Cu,Zn-superoxide dismutase-induced alternative activation of macrophages. J Biol Chem. 2013;288(28):20745–57.*
 17. Gordon S, Martinez FO. *Alternative activation of macrophages: Mechanism and functions. Immunity. 2010;32(5):593–604.*
 18. Holt PG. *Inhibitory Activity of Unstimulated Alveolar Macrophages on T-Lymphocyte Blastogenic Response 1. Am Rev Respir Dis. 2015;118(4):791–3.*
 19. Hoidal JR, Schmeling D, Peterson PK. *Phagocytosis, bacterial killing, and metabolism by purified human lung phagocytes. J Infect Dis. 1981;144(1):61–71.*
 20. Horowitz JC, Thannickal VJ. *Epithelial-mesenchymal interactions in pulmonary fibrosis. Semin Respir Crit Care Med. 2006;27(6):600–12.*
 21. Blumenthal RL, Campbell DE, Hwang P, DeKruyff RH, Frankel LR, Umetsu DT. *Human alveolar macrophages induce functional inactivation in antigen-specific CD4 T cells. J Allergy Clin Immunol. 2001;107(2):258–64.*
 22. Kirby AC, Coles MC, Kaye PM. *Alveolar Macrophages Transport Pathogens to Lung Draining Lymph Nodes. J Immunol. 2009;183(3):1983–9.*
 23. Toews GB, Vial WC, Dunn MM, Guzzetta P, Nunez G, Stastny P, et al. *The accessory cell function of human alveolar macrophages in specific T cell proliferation. J Immunol. 1984;132(1):181–6.*
 24. Lipscomb MF, Lyons CR, Nunez G, Ball EJ, Stastny P, Vial W, et al. *Human alveolar macrophages: HLA-DR-positive macrophages that are poor stimulators of a primary mixed leukocyte reaction. J Immunol. 1986;136(2):497–504.*
 25. Snelgrove RJ, Goulding J, Didierlaurent AM, Lyonga D, Vekaria S, Edwards L, et al. *A critical function for CD200 in lung immune homeostasis and the severity of influenza infection. Nat Immunol. 2008;9(9):1074–83.*
 26. Cushion M, Koziel H, Tachado SD, Patel N, Zhu J, Kinane TB, et al. *Negative regulatory role of mannose receptors on human*

- alveolar macrophage proinflammatory cytokine release in vitro.* **J Leukoc Biol.** 2005;**78(3):665–74.**
27. Patel VI, Metcalf JP. *Airway Macrophage and Dendritic Cell Subsets in the Resting Human Lung.* **Crit Rev Immunol.** 2018;**38(4):303–31.**
 28. Ruane D, Chorny A, Lee H, Faith J, Pandey G, Shan M, et al. *Microbiota regulate the ability of lung dendritic cells to induce IgA class-switch recombination and generate protective gastrointestinal immune responses.* **J Exp Med.** 2016;**213(1):53–73.**
 29. Rangel-Moreno J, Hartson L, Navarro C, Gaxiola M, Selman M, Randall TD. *Inducible bronchus-associated lymphoid tissue (iBALT) in patients with pulmonary complications of rheumatoid arthritis.* **J Clin Invest.** 2006;**116(12):3183–94.**
 30. Bongartz T, Cantaert T, Atkins SR, Harle P, Myers JL, Turesson C, et al. *Citrullination in extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis.* **Rheumatology.** 2007;**46(1):70–5.**
 31. Jiang J, Fisher EM, Murasko DM. *CD8 T cell responses to influenza virus infection in aged mice.* **Ageing Res Rev.** 2011;**10(4):422–7.**
 32. Woodworth JSM, Behar SM. *Mycobacterium tuberculosis-Specific CD8+ T Cells and Their Role in Immunity.* **Crit Rev Immunol.** 2012;**26(4):317–52.**
 33. Weber SE, Tian H, Pirofski L -a. *CD8+ Cells Enhance Resistance to Pulmonary Serotype 3 Streptococcus pneumoniae Infection in Mice.* **J Immunol.** 2010;**186(1):432–42.**
 34. Egen JG, Rothfuchs AG, Feng CG, Horwitz MA, Sher A, Germain RN. *Intravital imaging reveals limited antigen presentation and T cell effector function in mycobacterial granulomas.* **Immunity.** 2011;**34(5):807–19.**
 35. Gallegos AM, Pamer EG, Glickman MS. *Delayed protection by ESAT-6-specific effector CD4 + T cells after airborne M. tuberculosis infection .* **J Exp Med.** 2008;**205(10):2359–68.**
 36. Metzger DW, Bakshi CS, Kirimanjeswara G. *Mucosal immunopathogenesis of Francisella tularensis.* **Ann N Y Acad Sci.** 2007;**1105:266–83.**
 37. Gonczol E, Geng Y, Berencsi K, Trinchieri G, Valyi-Nagy T, Gyulai Z. *Roles of Interleukin-12 and Gamma Interferon in Murine Chlamydia pneumoniae Infection.* **Infect Immun.** 2002;**68(4):2245–53.**
 38. Deng JC, Newstead MW, Moore TA, Standiford TJ, Krieg AM, Zeng X. *CpG Oligodeoxynucleotides Stimulate Protective Innate*

- Immunity against Pulmonary Klebsiella Infection. J Immunol. 2014;173(8):5148–55.*
39. Hebart H, Bollinger C, Latge JP, Loeffler J, Monod M, Kanz L, et al. *T-cell responses to Aspergillus fumigatus antigens in healthy individuals and patients with hematological malignancies. Blood. 1999;94(10):641A-641A.*
40. Guo H, Takimoto T, Santiago F, Topham DJ, Lambert K. *T Cell-Mediated Protection against Lethal 2009 Pandemic H1N1 Influenza Virus Infection in a Mouse Model. J Virol. 2010;85(1):448–55.*
41. Sun K, Ye J, Perez DR, Metzger DW. *Seasonal FluMist Vaccination Induces Cross-Reactive T Cell Immunity against H1N1 (2009) Influenza and Secondary Bacterial Infections. J Immunol. 2010;186(2):987–93.*
42. Jiang D, Liang J, Hodge J, Lu B, Zhu Z, Yu S, et al. *Regulation of pulmonary fibrosis by chemokine receptor CXCR3. J Clin Invest. 2004;114(2):291–9.*
43. LaVoy J, Mora AL, Brigham KL, Xu J, Rojas M. *Increased bleomycin-induced lung injury in mice deficient in the transcription factor T-bet. Am J Physiol Cell Mol Physiol. 2006;291(4):L658–67.*
44. Chen F, Liu Z, Wu W, Rozo C, Bowdridge S, Millman A, et al. *An essential role for TH2-type responses in limiting acute tissue damage during experimental helminth infection. Nat Med. 2012;18(2):260–6.*
45. Marshall D, Sealy R, Sangster M, Coleclough C. *TH cells primed during influenza virus infection provide help for qualitatively distinct antibody responses to subsequent immunization. J Immunol. 1999;163(9):4673–82.*
46. Renegar KB, Small PA, Boykins LG, Wright PF. *Role of IgA versus IgG in the Control of Influenza Viral Infection in the Murine Respiratory Tract. J Immunol. 2014;173(3):1978–86.*
47. Romani L. *Immunity to fungal infections. Nat Rev Immunol. 2011;11(4):275–88.*
48. McGarry B, Xing Z, Huaux F, Liu T, Ullenbruch M, Phan SH. *Eosinophils and T Lymphocytes Possess Distinct Roles in Bleomycin-Induced Lung Injury and Fibrosis. J Immunol. 2014;171(10):5470–81.*
49. Kiwamoto T, Ishii Y, Morishima Y, Yoh K, Maeda A, Ishizaki K, et al. *Transcription factors T-bet and GATA-3 regulate development of airway remodeling. Am J Respir Crit Care Med. 2006;174(2):142–51.*

50. Belperio JA, Dy M, Burdick MD, Xue YY, Li K, Elias JA, et al. *Interaction of IL-13 and C10 in the pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis.* **Am J Respir Cell Mol Biol.** **2002;27(4):419–27.**
51. Huang F, Thai P, Wachi S, Chen Y, Wu R, Kao C-Y, et al. *IL-17 Markedly Up-Regulates β -Defensin-2 Expression in Human Airway Epithelium via JAK and NF- κ B Signaling Pathways.* **J Immunol.** **2014;173(5):3482–91.**
52. Frizzell RA, Aujla S, Karasic T, Pilewski JM, Lee RJ, Bertrand CA, et al. *Interleukin-17A induces bicarbonate secretion in normal human bronchial epithelial cells.* **Am J Physiol Cell Mol Physiol.** **2008;296(2):L257–66.**
53. Aujla SJ, Chan YR, Zheng M, Fei M, Askew DJ, Pociask DA, et al. *IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia.* **Nat Med.** **2008;14(3):275–81.**
54. Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P, et al. *Requirement of Interleukin 17 Receptor Signaling for Lung Cxc Chemokine and Granulocyte Colony-Stimulating Factor Expression, Neutrophil Recruitment, and Host Defense.* **J Exp Med.** **2001;194(4):519–28.**
55. Kudva A, Scheller E V., Robinson KM, Crowe CR, Choi SM, Slight SR, et al. *Influenza A inhibits Th17-mediated host defense against bacterial pneumonia in mice.* **J Immunol.** **2011;186(3):1666–74.**
56. Wu Q, Martin RJ, Rino JG, Breed R, Torres RM, Chu HW. *IL-23-dependent IL-17 production is essential in neutrophil recruitment and activity in mouse lung defense against respiratory Mycoplasma pneumoniae infection.* **Microbes Infect.** **2007;9(1):78–86.**
57. Lin Y, Ritchea S, Logar A, Slight S, Messmer M, Rangel-Moreno J, et al. *Interleukin-17 is required for T helper 1 cell immunity and host resistance to the intracellular pathogen Francisella tularensis.* **Immunity.** **2009;31(5):799–810.**
58. Gaffen SL, Hernández-Santos N, Peterson AC. *IL-17 signaling in host defense against Candida albicans.* **Immunol Res.** **2011;50(2–3):181–7.**
59. Hardison SE, Wozniak KL, Kolls JK, Wormley FL. *Interleukin-17 is not required for classical macrophage activation in a pulmonary mouse model of Cryptococcus neoformans infection.* **Infect Immun.** **2010;78(12):5341–51.**
60. Chai LYA, Van De Veerdonk F, Marijnissen RJ, Cheng SC, Khoo AL, Hectors M, et al. *Anti-Aspergillus human host defence relies*

- on type 1 T helper (Th1), rather than type 17 T helper (Th17), cellular immunity. Immunology. 2010;130(1):46–54.*
61. Crowe CR, Chen K, Pociask DA, Alcorn JF, Krivich C, Enelow RI, et al. *Critical role of IL-17RA in immunopathology of influenza infection. J Immunol. 2009;183(8):5301–10.*
 62. Wilson MS, Madala SK, Ramalingam TR, Gochuico BR, Rosas IO, Cheever AW, et al. *Bleomycin and IL-1beta-mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent. J Exp Med. 2010;207(3):535–52.*
 63. François A, Gombault A, Villeret B, Alsaleh G, Fanny M, Gasse P, et al. *B cell activating factor is central to bleomycin- and IL-17-mediated experimental pulmonary fibrosis. J Autoimmun. 2015;56:1–11.*
 64. Simonian PL, Roark CL, Wehrmann F, Lanham AK, Diaz del Valle F, Born WK, et al. *Th17-polarized immune response in a murine model of hypersensitivity pneumonitis and lung fibrosis. J Immunol. 2009;182(1):657–65.*
 65. Facco M, Cabrelle A, Teramo A, Olivieri V, Gnoato M, Teolato S, et al. *Sarcoidosis is a Th1/Th17 multisystem disorder. Thorax. 2011;66(2):144–50.*
 66. Nistala K, Adams S, Cambrook H, Ursu S, Olivito B, de Jager W, et al. *Th17 plasticity in human autoimmune arthritis is driven by the inflammatory environment. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(33):14751–6.*
 67. Ramstein J, Broos CE, Simpson LJ, Ansel KM, Sun SA, Ho ME, et al. *IFN-γ-Producing T-Helper 17.1 Cells Are Increased in Sarcoidosis and Are More Prevalent than T-Helper Type 1 Cells. Am J Respir Crit Care Med. 2016;193(11):1281–91.*
 68. Chen ES. *Reassessing Th1 versus Th17.1 in sarcoidosis: new tricks for old dogma. Eur Respir J. 2018;51(3):1800010.*
 69. Ying X, Su Z, Bie Q, Zhang P, Yang H, Wu Y, et al. *Synergistically increased ILC2 and Th9 cells in lung tissue jointly promote the pathological process of asthma in mice. Mol Med Rep. 2016;13(6):5230–40.*
 70. Moretti S, Renga G, Oikonomou V, Galosi C, Pariano M, Iannitti RG, et al. *A mast cell-ILC2-Th9 pathway promotes lung inflammation in cystic fibrosis. Nat Commun. 2017;8:14017.*
 71. Arras M, Louahed J, Heilier JF, Delos M, Brombacher F, Renaud JC, et al. *IL-9 protects against bleomycin-induced lung injury: Involvement of prostaglandins. Am J Pathol. 2005;166(1):107–15.*
 72. Simonian PL, Wehrmann F, Roark CL, Born WK, O'Brien RL,

- Fontenot AP. $\gamma\delta$ T cells protect against lung fibrosis via IL-22. **J Exp Med.** 2010;207(10):2239–53.
73. Guo H, Topham DJ. Interleukin-22 (IL-22) Production by Pulmonary Natural Killer Cells and the Potential Role of IL-22 during Primary Influenza Virus Infection. **J Virol.** 2010;84(15):7750–9.
74. Moldaver DM, Larché M, Rudulier CD. An Update on Lymphocyte Subtypes in Asthma and Airway Disease. **Chest.** 2017;151(5):1122–30.
75. Eyerich K, Dimartino V, Cavani A. IL-17 and IL-22 in immunity: Driving protection and pathology. **Eur J Immunol.** 2017;47(4):607–14.
76. Chen K, Kolls JK. T Cell–Mediated Host Immune Defenses in the Lung. **Annu Rev Immunol.** 2013;31(1):605–33.
77. Jaffar Z, Ferrini ME, Girtsman TA, Roberts K. Antigen-specific Treg regulate Th17-mediated lung neutrophilic inflammation, B-cell recruitment and polymeric IgA and IgM levels in the airways. **Eur J Immunol.** 2009;39(12):3307–14.
78. Guyot-Revol V, Innes JA, Hackforth S, Hinks T, Lalvani A. Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis. **Am J Respir Crit Care Med.** 2006;173(7):803–10.
79. Re S Lo, Lecocq M, Uwambayinema F, Yakoub Y, Delos M, Demoulin JB, et al. Platelet-derived growth factor-producing CD4+foxp3+regulatory T lymphocytes promote lung fibrosis. **Am J Respir Crit Care Med.** 2011;184(11):1270–81.
80. Boveda-Ruiz D, Gil-Bernabe P, Miyake Y, Morser J, Taguchi O, Matsumoto T, et al. Differential role of regulatory T cells in early and late stages of pulmonary fibrosis. **Immunobiology.** 2012;218(2):245–54.
81. Varricchi G, Harker J, Borriello F, Marone G, Durham SR, Shamji MH. T follicular helper (T_{fh}) cells in normal immune responses and in allergic disorders. **Allergy.** 2016;71(8):1086–94.
82. Rangel-Moreno J, Carragher DM, de la Luz Garcia-Hernandez M, Hwang JY, Kusser K, Hartson L, et al. The development of inducible bronchus-associated lymphoid tissue depends on IL-17. **Nat Immunol.** 2011;12(7):639–46.
83. Jaffar Z, Ferrini ME, Herritt LA, Roberts K. Cutting Edge: Lung Mucosal Th17-Mediated Responses Induce Polymeric Ig Receptor Expression by the Airway Epithelium and Elevate Secretory IgA Levels. **J Immunol.** 2009;182(8):4507–11.
84. Chang Y, Kim HY, Albacker L a, Baumgarth N, McKenzie ANJ,

- Smith DE, et al. *Innate lymphoid cells mediate influenza-induced airway hyper-reactivity independently of adaptive immunity*. **Nat Immunol.** 2011;12(7):631–8.
85. DeKruyff RH, Yu S, Kim HY, Umetsu DT. *Innate immunity in the lung regulates the development of asthma*. **Immunol Rev.** 2014;260(1):235–48.
86. Simonian PL, Roark CL, Born WK, O'Brien RL, Fontenot AP. *$\gamma\delta$ T cells and Th17 cytokines in hypersensitivity pneumonitis and lung fibrosis*. **Transl Res.** 2009;154(5):222–7.
87. Vorkas CK, Wiperman MF, Li K, Bean J, Bhattarai SK, Adamow M, et al. *Mucosal-associated invariant and $\gamma\delta$ T cell subsets respond to initial Mycobacterium tuberculosis infection*. **JCI insight.** 2018;3(19):1–18.
88. Paget C, Ivanov S, Fontaine J, Renneson J, Blanc F, Pichavant M, et al. *Interleukin-22 is produced by invariant natural killer T lymphocytes during influenza A virus infection: potential role in protection against lung epithelial damages*. **J Biol Chem.** 2012;287(12):8816–29.
89. Kim JH, Kim HY, Kim S, Chung J-H, Park WS, Chung DH. *Natural killer T (NKT) cells attenuate bleomycin-induced pulmonary fibrosis by producing interferón-gamma*. **Am J Pathol.** 2005;167(5):1231–41.
90. Domínguez O, Giner MT, Martín MA, Alsina L, Lozano J, Plaza AM. *Fenotipos clínicos asociados a la deficiencia selectiva de IgA: revisión de 330 casos y propuesta de un protocolo de seguimiento*. **An Pediatría.** 2012;76(5):261–7.
91. Mazanec MB, Nedrud JG, Kaetzel CS, Lamm ME. *A three-tiered view of the role of IgA in mucosal defense*. **Immunol Today.** 1993;14(9):430–5.
92. Williams RC, Gibbons RJ. *Inhibition of bacterial adherence by secretory immunoglobulin A: a mechanism of antigen disposal*. **Science.** 1972;177(4050):697–9.
93. Fanger MW, Goldstine SN, Shen L. *Cytofluorographic analysis of receptors for IgA on human polymorphonuclear cells and monocytes and the correlation of receptor expression with phagocytosis*. **Mol Immunol.** 1983;20(9):1019–27.
94. Lowell GH, Smith LF, Artenstein MS, Nash GS, MacDermott RP. *Antibody-dependent cell-mediated antibacterial activity of human mononuclear cells. I. K lymphocytes and monocytes are effective against meningococi in cooperation with human immune sera*. **J Exp Med.** 1979;150(1):127–37.
95. Abu-Ghazaleh RI, Fujisawa T, Mestecky J, Kyle RA, Gleich GJ.

- IgA-induced eosinophil degranulation.* **J Immunol.** **1989;142(7):2393–400.**
96. Wolf HM, Fischer MB, Pühringer H, Samstag A, Vogel E, Eibl MM. *Human serum IgA downregulates the release of inflammatory cytokines (tumor necrosis factor- α , interleukin-6) in human monocytes.* **Blood.** **1994;83(5):1278–88.**
97. Griffiss JM, Goroff DK. *IgA blocks IgM and IgG-initiated immune lysis by separate molecular mechanisms.* **J Immunol.** **1983;130(6):2882–5.**
98. Bouvet JP, Dighiero G. *From natural polyreactive autoantibodies to a la carte monoreactive antibodies to infectious agents: Is it a small world after all?* **Infect Immun.** **1998;66(1):1–4.**
99. Fischer M, Küppers R. *Human IgA- and IgM-secreting intestinal plasma cells carry heavily mutated V(H) region genes.* **Eur J Immunol.** **1998;28(9):2971–7.**
100. Ladjemi MZ, Martin C, Lecocq M, Detry B, Nana FA, Moulin C, et al. *Increased IgA Expression in Lung Lymphoid Follicles in Severe Chronic Obstructive Pulmonary Disease.* **Am J Respir Crit Care Med.** **2019;199(5):592–602.**
101. Pilette C, Godding V, Kiss R, Delos M, Verbeken E, Decaestecker C, et al. *Reduced epithelial expression of secretory component in small airways correlates with airflow obstruction in chronic obstructive pulmonary disease.* **Am J Respir Crit Care Med.** **2001;163(1):185–94.**
102. Gohy ST, Detry BR, Lecocq M, Bouzin C, Weynand BA, Amatngalim GD, et al. *Polymeric immunoglobulin receptor down-regulation in chronic obstructive pulmonary disease: Persistence in the cultured epithelium and role of transforming growth factor- β .* **Am J Respir Crit Care Med.** **2014;190(5):509–21.**
103. Ellson CD, Dunmore R, Hogaboam CM, Sleeman MA, Murray LA. *Danger-associated molecular patterns and danger signals in idiopathic pulmonary fibrosis.* **Am J Respir Cell Mol Biol.** **2014;51(2):163–8.**
104. Bassis CM, Erb-Downward JR, Dickson RP, Freeman CM, Schmidt TM, Young VB, et al. *Analysis of the upper respiratory tract microbiotas as the source of the lung and gastric microbiotas in healthy individuals.* **MBio.** **2015;6(2):1–10.**
105. Dickson RP, Erb-Downward JR, Freeman CM, McCloskey L, Beck JM, Huffnagle GB, et al. *Spatial variation in the healthy human lung microbiome and the adapted island model of lung biogeography.* **Ann Am Thorac Soc.** **2015;12(6):821–30.**
106. Hilty M, Burke C, Pedro H, Cardenas P, Bush A, Bossley C, et al.

- Disordered microbial communities in asthmatic airways.* **PLoS One.** **2010**;**5**(1).
107. Faner R, Sibila O, Agustí A, Bernasconi E, Chalmers JD, Huffnagle GB, et al. *The microbiome in respiratory medicine: Current challenges and future perspectives.* **Eur Respir J.** **2017**;**49**(4):1–12.
108. Ege MJ, Mayer M, Normand A-C, Genuneit J, Cookson WOCM, Braun-Fahrlander C, et al. *Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma.* **N Engl J Med.** **2011**;**364**(8):701–9.
109. Teo SM, Mok D, Pham K, Kusel M, Serralha M, Troy N, et al. *The infant nasopharyngeal microbiome impacts severity of lower respiratory infection and risk of asthma development.* **Cell Host Microbe.** **2015**;**17**(5):704–15.
110. Dickson RP, Erb-Downward JR, Martinez FJ, Huffnagle GB. *The Microbiome and the Respiratory Tract.* **Annu Rev Physiol.** **2016**;**78**(1):481–504.
111. Garcia-Núñez M, Millares L, Pomares X, Ferrari R, Pérez-Brocal V, Gallego M, et al. *Severity-related changes of bronchial microbiome in chronic obstructive pulmonary disease.* **J Clin Microbiol.** **2014**;**52**(12):4217–23.
112. Sethi S, Murphy TF. *Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease.* **N Engl J Med.** **2008**;**359**(22):2355.
113. Sethi S, Maloney J, Grove L, Wrona C, Berenson CS. *Airway inflammation and bronchial bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease.* **Am J Respir Crit Care Med.** **2006**;**173**(9):991–8.
114. Meneghin A, Hogaboam CM. *Infectious disease, the innate immune response, and fibrosis.* **J Clin Invest.** **2007**;**117**(3):530–8.
115. Raghu G, Anstrom KJ, King TE, Lasky JA, Martinez FJ. *Prednisone, azathioprine, and N-acetylcysteine for pulmonary fibrosis.* **N Engl J Med.** **2012**;**366**(21):1968–77.
116. Varney VA, Parnell HM, Salisbury DT, Ratnathepan S, Tayar RB. *A double blind randomised placebo controlled pilot study of oral co-trimoxazole in advanced fibrotic lung disease.* **Pulm Pharmacol Ther.** **2008**;**21**(1):178–87.
117. Han MK, Zhou Y, Murray S, Tayob N, Noth I, Lama VN, et al. *Lung microbiome and disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis: an analysis of the COMET study.* **Lancet Respir Med.** **2014**;**2**(7):548–56.
118. Takahashi Y, Saito A, Chiba H, Kuronuma K, Ikeda K, Kobayashi

- T, et al. *Impaired diversity of the lung microbiome predicts progression of idiopathic pulmonary fibrosis*. **Respir Res.** **2018;19(1):34**.
119. Molyneaux PL, Cox MJ, Willis-Owen SAG, Mallia P, Russell KE, Russell AM, et al. *The role of bacteria in the pathogenesis and progression of idiopathic pulmonary fibrosis*. **Am J Respir Crit Care Med.** **2014;190(8):906–13**.
120. Xaubet A, Ancochea J, Morell F, Rodriguez-Arias JM, Villena V, Blanquer R, et al. *Report on the incidence of interstitial lung diseases in Spain*. **Sarcoidosis, Vasc Diffus lung Dis Off J WASOG.** **2004;21(1):64–70**.
121. Travis WD, Costabel U, Hansell DM, King TE, Lynch DA, Nicholson AG, et al. *An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias*. **Am J Respir Crit Care Med.** **2013;188(6):733–48**.
122. Loddenkemper R, Gibson GJ, Sibille Y, Lundbäck B. *European Lung White Book*. **Chronic obstructive Pulm Dis.** **2013;148–59**.
123. Franquet T. *Procedimientos diagnósticos en la fibrosis pulmonar idiopática. Relevancia de la TCAR*. **Monogr Arch Bronconeumol.** **2015;2(1):7–16**.
124. Best AC, Meng J, Lynch AM, Bozic CM, Miller D, Grunwald GK, et al. *Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Physiologic Tests, Quantitative CT Indexes, and CT Visual Scores as Predictors of Mortality*. **Radiology.** **2008;246(3):935–40**.
125. Rivera-Ortega P, Hayton C, Blaikley J, Leonard C, Chaudhuri N. *Nintedanib in the management of idiopathic pulmonary fibrosis: clinical trial evidence and real-world experience*. **Ther Adv Respir Dis.** **2018;12(13):1753466618800618**.
126. Bargagli E, Piccioli C, Rosi E, Torricelli E, Turi L, Piccioli E, et al. *Pirfenidone and Nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis: Real-life experience in an Italian referral centre*. **Pulmonology.** **2019;25(3):149–53**.
127. Yoon H-Y, Kim DS, Song JW. *Efficacy and Safety of Pirfenidone in Advanced Idiopathic Pulmonary Fibrosis*. **Respiration.** **2018;(Oct 17:1-10):1–10**.
128. Wu X, Kaner RJ, Martínez FJ. *Idiopathic Pulmonary Fibrosis : What Is The Best Treatment? N-acetylcysteine*. **BRN Rev.** **2017;(3):86–101**.
129. Kondoh Y, Taniguchi H, Yokoi T, Nishiyama O, Ohishi T, Kato T, et al. *Cyclophosphamide and low-dose prednisolone in*

- idiopathic pulmonary fibrosis and fibrosing nonspecific interstitial pneumonia. Eur Respir J. 2005;25(3):528–33.*
130. Akira M, Inoue Y, Arai T, Okuma T, Kawata Y. *Long-term follow-up high-resolution CT findings in non-specific interstitial pneumonia. Thorax. 2011;66(1):61–5.*
131. Park IN, Jegal Y, Kim DS, Do KH, Yoo B, Shim TS, et al. *Clinical course and lung function change of idiopathic nonspecific interstitial pneumonia. Eur Respir J. 2009;33(1):68–76.*
132. Suda T, Kaida Y, Nakamura Y, Enomoto N, Fujisawa T, Imokawa S, et al. *Acute exacerbation of interstitial pneumonia associated with collagen vascular diseases. Respir Med. 2009;103(6):846–53.*
133. Strange C, Highland KB. *Interstitial lung disease in the patient who has connective tissue disease. Clin Chest Med. 2004;25(3):549–59.*
134. Fischer A, Antoniou KM, Brown KK, Cadranel J, Corte TJ, du Bois RM, et al. *An official European Respiratory Society/American Thoracic Society research statement: interstitial pneumonia with autoimmune features. Eur Respir J. 2015;46(4):976–87.*
135. Romagnoli M, Nannini C, Piciocchi S, Girelli F, Gurioli C, Casoni G, et al. *Idiopathic nonspecific interstitial pneumonia: An interstitial lung disease associated with autoimmune disorders? Eur Respir J. 2011;38(2):384–91.*
136. Gutsche M, Rosen GD, Swigris JJ. *Connective Tissue Disease-associated Interstitial Lung Disease: A review. Curr Respir Care Rep. 2012;1(12):224–32.*
137. Bargagli E, Piccioli C, Rosi E, Torricelli E, Turi L, Piccioli E, et al. *Pirfenidone and Nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis: Real-life experience in an Italian referral centre. Pulmonology. 2018;(xx).*
138. Kelly CA, Saravanan V, Nisar M, Arthanari S, Woodhead FA, Price-Forbes AN, et al. *Rheumatoid arthritis-related interstitial lung disease: Associations, prognostic factors and physiological and radiological characteristics-a large multicentre UK study. Rheumatol (United Kingdom). 2014;53(9):1676–82.*
139. Olson AL, Swigris JJ, Sprunger DB, Fischer A, Fernandez-Perez ER, Solomon J, et al. *Rheumatoid arthritis-interstitial lung disease-associated mortality. Am J Respir Crit Care Med. 2011;183(3):372–8.*
140. Tyndall AJ, Bannert B, Vonk M, Airò P, Cozzi F, Carreira PE, et al. *Causes and risk factors for death in systemic sclerosis: a study*

- from the EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) database. **Ann Rheum Dis.** 2010;69(10):1809–15.
141. Wells AU, Margaritopoulos GA, Antoniou KM, Denton C. *Interstitial lung disease in systemic sclerosis.* **Semin Respir Crit Care Med.** 2014;35(2):213–21.
 142. Goh NSL, Desai SR, Veeraraghavan S, Hansell DM, Copley SJ, Maher TM, et al. *Interstitial lung disease in systemic sclerosis: A simple staging system.* **Am J Respir Crit Care Med.** 2008;177(11):1248–54.
 143. Giacomelli R, Liakouli V, Berardicurti O, Ruscitti P, Di Benedetto P, Carubbi F, et al. *Interstitial lung disease in systemic sclerosis: current and future treatment.* **Rheumatol Int.** 2017;37(6):853–63.
 144. Toya SP, Tzelepis GE. *The many faces of scleroderma sine scleroderma: a literature review focusing on cardiopulmonary complications.* **Rheumatol Int.** 2009;29(8):861–8.
 145. Walker UA, Tyndall A, Czirják L, Denton C, Farge-Bancel D, Kowal-Bielecka O, et al. *Clinical risk assessment of organ manifestations in systemic sclerosis: A report from the EULAR Scleroderma Trials and Research group database.* **Ann Rheum Dis.** 2007;66(6):754–63.
 146. Chowaniec M, Skoczyńska M, Sokolik R, Wiland P. *Interstitial lung disease in systemic sclerosis: challenges in early diagnosis and management.* **Reumatologia.** 2018;56(4):249–54.
 147. Reveille JD, Solomon DH. *Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: Anticentromere, Scl-70, and nucleolar antibodies.* **Arthritis Rheum.** 2003;49(3):399–412.
 148. Koenig M, Dieudé M, Senécal J-L. *Predictive value of antinuclear autoantibodies: The lessons of the systemic sclerosis autoantibodies.* **Autoimmun Rev.** 2008;7(8):588–93.
 149. Kuwana M. *Circulating Anti-Nuclear Antibodies in Systemic Sclerosis: Utility in Diagnosis and Disease Subsetting.* **J Nippon Med Sch.** 2017;84(2):56–63.
 150. Chow LN, Schreiner P, Ng BYY, Lo B, Hughes MR, Scott RW, et al. *Impact of a CXCL12/CXCR4 Antagonist in Bleomycin (BLM) Induced Pulmonary Fibrosis and Carbon Tetrachloride (CCl4) Induced Hepatic Fibrosis in Mice.* **PLoS One.** 2016;11(3):e0151765.
 151. Zhang H-Y, Phan SH. *Inhibition of myofibroblast apoptosis by TGFbeta1.* **Am J Respir Cell Mol Biol.** 1999;21:658–65.
 152. Robertson IB, Horiguchi M, Zilberberg L, Dabovic B, Hadjiolova K, Rifkin DB. *Latent TGF-β-binding proteins.* **Matrix Biol.** 2015;47:44–53.

153. Li M, Krishnaveni MS, Li C, Zhou B, Xing Y, Banfalvi A, et al. *Epithelium-specific deletion of TGF- β receptor type II protects mice from bleomycin-induced pulmonary fibrosis.* **J Clin Invest.** **2011;121(1):277–87.**
154. Grainger S, Willert K. *Mechanisms of Wnt signaling and control.* **Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.** **2018;10(5):1–22.**
155. Königshoff M, Eickelberg O. *WNT signaling in lung disease: A failure or a regeneration signal?* **Am J Respir Cell Mol Biol.** **2010;42(1):21–31.**
156. Bayle J, Fitch J, Jacobsen K, Kumar R, Lafyatis R, Lemaire R. *Increased expression of Wnt2 and SFRP4 in Tsk mouse skin: Role of Wnt signaling in altered dermal fibrillin deposition and systemic sclerosis.* **J Invest Dermatol.** **2008;128(4):871–81.**
157. Ghosh AK, Bhattacharyya S, Lakos G, Chen SJ, Mori Y, Varga J. *Disruption of Transforming Growth Factor β Signaling and Profibrotic Responses in Normal Skin Fibroblasts by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ .* **Arthritis Rheum.** **2004;50(4):1305–18.**
158. Howell DCJ, Johns RH, Lasky JA, Shan B, Scotton CJ, Laurent GJ, et al. *Absence of proteinase-activated receptor-1 signaling affords protection from bleomycin-induced lung inflammation and fibrosis.* **Am J Pathol.** **2005;166(5):1353–65.**
159. Bachhuber BG, Sarembock IJ, Gimple LW, Owens GK. *α -Thrombin Induces Transforming Growth Factor- β_1 mRNA and Protein in Cultured Vascular Smooth Muscle Cells via a Proteolytically Activated Receptor.* **J Vasc Res.** **1997;34(1):41–8.**
160. Bogatkevich GS, Tourkina E, Silver RM, Ludwicka-Bradley A. *Thrombin Differentiates Normal Lung Fibroblasts to a Myofibroblast Phenotype via the Proteolytically Activated Receptor-1 and a Protein Kinase C-dependent Pathway.* **J Biol Chem.** **2001;276(48):45184–92.**
161. Abraham DJ, Vancheeswaran R, Dashwood MR, Rajkumar VS, Pantelides P, Shi-wen X, et al. *Increased levels of endothelin-1 and differential endothelin type A and B receptor expression in scleroderma-associated fibrotic lung disease.* **Am J Pathol.** **1997;151(3):831–41.**
162. Mutsaers SE, Foster ML, Chambers RC, Laurent GJ, McAnulty RJ. *Increased endothelin-1 and its localization during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats.* **Am J Respir Cell Mol Biol.** **1998;18(5):611–9.**
163. Jain R, Shaul PW, Borok Z, Willis BC. *Endothelin-1 induces alveolar epithelial-mesenchymal transition through endothelin*

- type A receptor-mediated production of TGF- β 1*. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 2007;37(1):38–47.
164. Shi-wen X, Kennedy L, Renzoni EA, Bou-Gharios G, Du Bois RM, Black CM, et al. *Endothelin is a downstream mediator of profibrotic responses to transforming growth factor β in human lung fibroblasts*. **Arthritis Rheum.** 2007;56(12):4189–94.
165. Wei J, Ghosh AK, Sargent JL, Komura K, Wu M, Huang Q-Q, et al. *PPAR γ downregulation by TGF β in fibroblast and impaired expression and function in systemic sclerosis: a novel mechanism for progressive fibrogenesis*. **PLoS One.** 2010;5(11):e13778.
166. Culver DA, Barna BP, Raychaudhuri B, Bonfield TL, Abraham S, Malur A, et al. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Activity Is Deficient in Alveolar Macrophages in Pulmonary Sarcoidosis*. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 2004;30(1):1–5.
167. Sakkas LI, Platsoucas CD. *Is systemic sclerosis an antigen-driven T cell disease?* **Arthritis Rheum.** 2004;50(6):1721–33.
168. Liu T, Jin H, Ullenbruch M, Hu B, Hashimoto N, Moore B, et al. *Regulation of Found in Inflammatory Zone 1 Expression in Bleomycin-Induced Lung Fibrosis: Role of IL-4/IL-13 and Mediation via STAT-6*. **J Immunol.** 2004;173(5):3425–31.
169. Jakubzick C, Choi ES, Joshi BH, Keane MP, Kunkel SL, Puri RK, et al. *Therapeutic Attenuation of Pulmonary Fibrosis Via Targeting of IL-4- and IL-13-Responsive Cells*. **J Immunol.** 2003;171(5):2684–93.
170. Luzina IG, Atamas SP, Wise R, Wigley FM, Choi J, Xiao HQ, et al. *Occurrence of an activated, profibrotic pattern of gene expression in lung CD8+ T cells from scleroderma patients*. **Arthritis Rheum.** 2003;48(8):2262–74.
171. Radstake TRDJ, van Bon L, Broen J, Wenink M, Santegoets K, Deng Y, et al. *Increased frequency and compromised function of T regulatory cells in systemic sclerosis (SSc) is related to a diminished CD69 and TGF β expression*. **PLoS One.** 2009;4(6).
172. Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, Takehara K. *Altered blood B lymphocyte homeostasis in systemic sclerosis: Expanded naive B cells and diminished but activated memory B cells*. **Arthritis Rheum.** 2004;50(6):1918–27.
173. Gabrielli A. *New Insights into the Role of Oxidative Stress in Scleroderma Fibrosis*. **Open Rheumatol J.** 2012;6(1):87–95.
174. Pereira DAS, Dias OM, Almeida GE De, Araujo MS, Kawano-Dourado LB, Baldi BG, et al. *Lung-dominant connective tissue disease among patients with interstitial lung disease: prevalence, functional stability, and common extrathoracic features*. **J Bras**

- Pneumol. 2015;41(2):151–60.**
175. Johannson KA, Strâmbu I, Ravaglia C, Grutters JC, Valenzuela C, Mogulkoc N, et al. *Antacid therapy in idiopathic pulmonary fibrosis: more questions than answers?* **Lancet Respir Med. 2017;5(7):591–8.**
 176. Christmann RB, Wells AU, Capellozzi VL, Silver RM. *Gastroesophageal Reflux Incites Interstitial Lung Disease in Systemic Sclerosis: Clinical, Radiologic, Histopathologic, and Treatment Evidence.* **Semin Arthritis Rheum. 2010;40(3):241–9.**
 177. Fagundes MN, Caleiro MTC, Navarro-Rodriguez T, Baldi BG, Kavakama J, Salge JM, et al. *Esophageal involvement and interstitial lung disease in mixed connective tissue disease.* **Respir Med. 2009;103(6):854–60.**
 178. de Carvalho M-EP, Kairalla RA, Capellozzi VL, Deheinzelin D, do Nascimento Saldiva PH, de Carvalho CRR. *Centrilobular fibrosis: a novel histological pattern of idiopathic interstitial pneumonia.* **Pathol Res Pract. 2002;198(9):577–83.**
 179. Farrell S, McMaster C, Gibson D, Shields MD, McCallion WA. *Pepsin in bronchoalveolar lavage fluid: A specific and sensitive method of diagnosing gastro-oesophageal reflux-related pulmonary aspiration.* **J Pediatr Surg. 2006;41(2):289–93.**
 180. Satoh H, Kurishima K, Ishikawa H, Ohtsuka M. *Increased levels of KL-6 and subsequent mortality in patients with interstitial lung diseases.* **J Intern Med. 2006;260(5):429–34.**
 181. Fidler L, Sitzer N, Shapera S, Shah PS. *Treatment of Gastroesophageal Reflux in Patients With Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Systematic Review and Meta-Analysis.* **Chest. 2018;153(6):1405–15.**
 182. Furnari M, Savarino V, de Bortoli N, Savarino E. *Interstitial lung disease in systemic sclerosis patients may benefit more from anti-reflux therapies than from immunosuppressants.* **Autoimmun Rev. 2016;15(12):1208–9.**
 183. Dawson JK, Fewins HE, Desmond J, Lynch MP, Graham DR. *Fibrosing alveolitis in patients with rheumatoid arthritis as assessed by high resolution computed tomography, chest radiography, and pulmonary function tests.* **Thorax. 2001;56(8):622–7.**
 184. Sihvonen S, Korpela M, Laippala P, Mustonen J, Pasternack A. *Death rates and causes of death in patients with rheumatoid arthritis: A population-based study.* **Scand J Rheumatol. 2004;33(4):221–7.**
 185. Carmona L, González-Alvaro I, Balsa A, Angel Belmonte M,

- Tena X, Sanmartí R. *Rheumatoid arthritis in Spain: occurrence of extra-articular manifestations and estimates of disease severity*. **Ann Rheum Dis**. 2003;62(9):897–900.
186. Albano SA, Santana-Sahagun E, Weisman MH. *Cigarette smoking and rheumatoid arthritis*. **Semin Arthritis Rheum**. 2001;31(3):146–59.
187. Saag KG, Cerhan JR, Kolluri S, Ohashi K, Hunninghake GW, Schwartz DA. *Cigarette smoking and rheumatoid arthritis severity*. **Ann Rheum Dis**. 1997;56(8):463–9.
188. Mahdi H, Fisher BA, Källberg H, Plant D, Malmström V, Rönnelid J, et al. *Specific interaction between genotype, smoking and autoimmunity to citrullinated α -enolase in the etiology of rheumatoid arthritis*. **Nat Genet**. 2009;41(12):1319–24.
189. Fischer A, Solomon JJ, du Bois RM, Deane KD, Olson AL, Fernandez-Perez ER, et al. *Lung disease with anti-CCP antibodies but not rheumatoid arthritis or connective tissue disease*. **Respir Med**. 2012;106(7):1040–7.
190. Deane KD, Norris JM, Holers VM. *Preclinical rheumatoid arthritis: identification, evaluation, and future directions for investigation*. **Rheum Dis Clin North Am**. 2010;36(2):213–41.
191. Barrera P, Laan RFJM, Van Riel PLCM, Dekhuijzen PNR, Boerbooms AMT, Van De Putte LBA. *Methotrexate-related pulmonary complications in rheumatoid arthritis*. **Ann Rheum Dis**. 1994;53(7):434–9.
192. Thavarajah K, Wu P, Rhew EJ, Yeldandi AK, Kamp DW. *Pulmonary complications of tumor necrosis factor-targeted therapy*. **Respir Med**. 2009;103(5):661–9.
193. Lilleker JB, Vencovsky J, Wang G, Wedderburn LR, Diederichsen LP, Schmidt J, et al. *The EuroMyositis registry: an international collaborative tool to facilitate myositis research*. **Ann Rheum Dis**. 2018;77(1):30–9.
194. Jan K, Sriranganathan MK. *Acute interstitial pneumonia as first presentation of anti-synthetase syndrome: An atypical case*. **Oxford Med Case Reports**. 2018;2018(4):121–3.
195. Ghirardello A, Borella E, Beggio M, Franceschini F, Fredi M, Doria A. *Myositis autoantibodies and clinical phenotypes*. **Auto-Immun highlights**. 2014;5(3):69–75.
196. Matsushita M, Tamura N, Ogasawara M, Tada K, Yamaji K, Takasaki Y. *The Association of Anti-Aminoacyl-Transfer Ribonucleic Acid Synthetase Antibodies in Patients With Rheumatoid Arthritis and Interstitial Lung Disease*. **Arch Rheumatol**. 2018;33(1):26–32.

197. Bernstein RM, Morgan SH, Chapman J, Bunn CC, Mathews MB, Turner-Warwick M, et al. *Anti-Jo-1 antibody: a marker for myositis with interstitial lung disease.* **Br Med J (Clin Res Ed).** **1984;289(6438):151–2.**
198. Fischer A, Swigris JJ, Bois R, Lynch D, Downey GP, Cosgrove GP, et al. *Anti-synthetase syndrome in ANA and anti-Jo-1 negative patients presenting with idiopathic interstitial pneumonia.* **Respir Med.** **2009;103(11):1719–24.**
199. Mecoli CA, Christopher-Stine L. *Management of Interstitial Lung Disease in Patients With Myositis Specific Autoantibodies.* **Curr Rheumatol Rep.** **2018;20(5).**
200. Koenig M, Fritzler MJ, Targoff IN, Troyanov Y, Sénécal J. *Research article Heterogeneity of autoantibodies in 100 patients with autoimmune myositis: insights into clinical features and outcomes.* **2007;9(4):1–13.**
201. Chen F, Li S, Wang T, Shi J, Wang G. *Clinical Heterogeneity of Interstitial Lung Disease in Polymyositis and Dermatomyositis Patients With or Without Specific Autoantibodies.* **Am J Med Sci.** **2018;355(1):48–53.**
202. Alqatari S, Riddell P, Harney S, Henry M, Murphy G. *MDA-5 associated rapidly progressive interstitial lung disease with recurrent Pneumothoraces: A case report.* **BMC Pulm Med.** **2018;18(1):1–5.**
203. Endo Y, Koga T, Suzuki T, Hara K, Ishida M, Fujita Y, et al. *Successful treatment of plasma exchange for rapidly progressive interstitial lung disease with anti-MDA5 antibody-positive dermatomyositis: A case report.* **Medicine (Baltimore).** **2018;97(15):e0436.**
204. Schiffenbauer A, Faghihi-Kashani S, O’Hanlon TP, Flegel WA, Adams SD, Targoff IN, et al. *The effect of cigarette smoking on the clinical and serological phenotypes of polymyositis and dermatomyositis.* **Semin Arthritis Rheum.** **2018;48(3):504–12.**
205. Palm Ø, Garen T, Enger TB, Jensen JL, Lund MB, AalØkken TM, et al. *Clinical pulmonary involvement in primary Sjögren’s syndrome: Prevalence, quality of life and mortality - A retrospective study based on registry data.* **Rheumatol (United Kingdom).** **2013;52(1):173–9.**
206. Roca F, Dominique S, Schmidt J, Smail A, Duhaut P, Lévesque H, et al. *Interstitial lung disease in primary Sjögren’s syndrome.* **Autoimmun Rev.** **2017;16(1):48–54.**
207. Manfredi A, Sebastiani M, Cerri S, Cassone G, Bellini P, Casa G Della, et al. *Prevalence and characterization of non-sicca onset*

- primary Sjögren syndrome with interstitial lung involvement. Clin Rheumatol. 2017;36(6):1261–8.*
208. Brito-Zerón P, Theander E, Baldini C, Seror R, Retamozo S, Quartuccio L, et al. *Early diagnosis of primary Sjögrens syndrome: EULAR-SS task force clinical recommendations. Expert Rev Clin Immunol. 2016;12(2):137–56.*
209. Gao H, Zhang XW, He J, Zhang J, An Y, Sun Y, et al. *Prevalence, risk factors, and prognosis of interstitial lung disease in a large cohort of Chinese primary Sjögren syndrome patients: A case-control study. Medicine (Baltimore). 2018;97(24):e11003.*
210. Gao H, Zou Y dan, Zhang X wu, He J, Zhang J, Sun Y, et al. *Interstitial lung disease in non-sicca onset primary Sjögren's syndrome: a large-scale case-control study. Int J Rheum Dis. 2018;21(7):1423–9.*
211. Stojan G, Baer AN, Danoff SK. *Pulmonary manifestations of Sjögren's syndrome. Curr Allergy Asthma Rep. 2013;13(4):354–60.*
212. Reina D, Roig Vilaseca D, Torrente-Segarra V, Cerdà D, Castellví I, Díaz Torné C, et al. *Sjögren's syndrome-associated interstitial lung disease: A multicenter study. Reumatol Clin. 2016;12(4):201–5.*
213. Wang Y, Hou Z, Qiu M, Ye Q. *Risk factors for primary Sjögren syndrome-associated interstitial lung disease. J Thorac Dis. 2018;10(4):2108–17.*
214. Lopez Velazquez M, Highland KB. *Pulmonary manifestations of systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. Curr Opin Rheumatol. 2018;30(5):449–64.*
215. Reiseter S, Gunnarsson R, Aaløkken TM, Lund MB, Mynarek G, Corander J, et al. *Progression and mortality of interstitial lung disease in mixed connective tissue disease: A long-term observational nationwide cohort study. Rheumatol (United Kingdom). 2018;57(2):255–62.*
216. Narula N, Narula T, Mira-Avendano I, Wang B, Abril A. *Interstitial lung disease in patients with mixed connective tissue disease: pilot study on predictors of lung involvement. Clin Exp Rheumatol. 2018;36(4):648–51.*
217. Bodolay E, Szekanecz Z, Dévényi K, Galuska L, Csípo I, Vègh J, et al. *Evaluation of interstitial lung disease in mixed connective tissue disease (MCTD). Rheumatology. 2005;44(5):656–61.*
218. Szodoray P, Hajas A, Kardos L, Dezsó B, Soos G, Zold E, et al. *Distinct phenotypes in mixed connective tissue disease: Subgroups and survival. Lupus. 2012;21(13):1412–22.*

219. Medlin JL, Hansen KE, McCoy SS, Bartels CM. *Pulmonary manifestations in late versus early systemic lupus erythematosus: A systematic review and meta-analysis*. **Semin Arthritis Rheum**. 2018;48(2):198–204.
220. Weinrib L, Sharma OP, Quismorio FP. *A long-term study of interstitial lung disease in systemic lupus erythematosus*. **Semin Arthritis Rheum**. 1990;20(1):48–56.
221. Groen H, ter Borg EJ, Postma DS, Wouda AA, van der Mark TW, Kallenberg CG. *Pulmonary function in systemic lupus erythematosus is related to distinct clinical, serologic, and nailfold capillary patterns*. **Am J Med**. 1992;93(6):619–27.
222. Hedgpeth MT, Boulware DW. *Interstitial pneumonitis in antinuclear antibody-negative systemic lupus erythematosus: a new clinical manifestation and possible association with anti-Ro (SS-A) antibodies*. **Arthritis Rheum**. 1988;31(4):545–8.
223. Kamen DL, Strange C. *Pulmonary manifestations of systemic lupus erythematosus*. **Clin Chest Med**. 2010;31(3):479–88.
224. Matthay RA, Schwarz MI, Petty TL, Stanford RE, Gupta RC, Sahn SA, et al. *Pulmonary manifestations of systemic lupus erythematosus: review of twelve cases of acute lupus pneumonitis*. **Medicine (Baltimore)**. 1975;54(5):397–409.
225. Atzeni F, Gerardi MC, Barilaro G, Masala IF, Benucci M, Sarzi-Puttini P. *Interstitial lung disease in systemic autoimmune rheumatic diseases: a comprehensive review*. **Expert Rev Clin Immunol**. 2018;14(1):69–82.
226. Corte TJ, Copley SJ, Desai SR, Zappala CJ, Hansell DM, Nicholson AG, et al. *Significance of connective tissue disease features in idiopathic interstitial pneumonia*. **Eur Respir J**. 2012;39(3):661–8.
227. Suda T, Kono M, Nakamura Y, Enomoto N, Kaida Y, Fujisawa T, et al. *Distinct prognosis of idiopathic nonspecific interstitial pneumonia (NSIP) fulfilling criteria for undifferentiated connective tissue disease (UCTD)*. **Respir Med**. 2010;104(10):1527–34.
228. Kinder BW, Collard HR, Koth L, Daikh DI, Wolters PJ, Elicker B, et al. *Idiopathic nonspecific interstitial pneumonia: Lung manifestation of undifferentiated connective tissue disease?* **Am J Respir Crit Care Med**. 2007;176(7):691–7.
229. Vij R, Noth I, Strek ME. *Autoimmune-featured interstitial lung disease: A distinct entity*. **Chest**. 2011;140(5):1292–9.
230. Fischer A, West SG, Swigris JJ, Brown KK, Du Bois RM. *Connective tissue disease-associated interstitial lung disease: A*

- call for clarification. Chest. 2010;138(2):251–6.*
231. Ito Y, Arita M, Kumagai S, Takei R, Noyama M, Tokioka F, et al. *Serological and morphological prognostic factors in patients with interstitial pneumonia with autoimmune features. BMC Pulm Med. 2017;17(1):111.*
 232. Oldham JM, Adegunsoye A, Valenzi E, Lee C, Witt L, Chen L, et al. *Characterisation of patients with interstitial pneumonia with autoimmune features. Eur Respir J. 2016;47(6):1767–75.*
 233. Chartrand S, Swigris JJ, Stanchev L, Lee JS, Brown KK, Fischer A. *Clinical features and natural history of interstitial pneumonia with autoimmune features: A single center experience. Respir Med. 2016;119:150–4.*
 234. Raj R, Raparia K, Lynch DA, Brown KK. *Surgical Lung Biopsy for Interstitial Lung Diseases. Chest. 2017;151(5):1131–40.*
 235. Hernández-González F, Lucena CM, Ramírez J, Sánchez M, Jimenez MJ, Xaubet A, et al. *Utilidad de la criobiopsia en el diagnóstico de la enfermedad pulmonar intersticial difusa: análisis de rentabilidad y coste. Arch Bronconeumol. 2015;51(6):261–7.*
 236. Padley SP, Hansell DM, Flower CD, Jennings P. *Comparative accuracy of high resolution computed tomography and chest radiography in the diagnosis of chronic diffuse infiltrative lung disease. Clin Radiol. 1991;44(4):222–6.*
 237. Chung JH, Landeras L. *Probable UIP: What is the Evidence that Compels this Classification and How is it Different from the Indeterminate Category? Semin Roentgenol. 2019;54(1):15–20.*
 238. Raghu G, Remy-Jardin M, Myers JL, Richeldi L, Ryerson CJ, Lederer DJ, et al. *Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. Am J Respir Crit Care Med. 2018;198(5):e44–68.*
 239. Raghu G, Mageto YN, Lockhart D, Schmidt RA, Wood DE, Godwin JD. *The accuracy of the clinical diagnosis of new-onset idiopathic pulmonary fibrosis and other interstitial lung disease: A prospective study. Chest. 1999;116(5):1168–74.*
 240. Katzenstein A-LA, Zisman DA, Litzky LA, Nguyen BT, Kotloff RM. *Usual interstitial pneumonia: histologic study of biopsy and explant specimens. Am J Surg Pathol. 2002;26(12):1567–77.*
 241. Troy LK, Grainge C, Corte T, Williamson JP, Vallely MP, Cooper W, et al. *Cryobiopsy versus open lung biopsy in the diagnosis of interstitial lung disease (COLDICE): Protocol of a multicentre study. BMJ Open Respir Res. 2019;6(1):1–8.*
 242. Buendía-Roldán I, Ruiz V, Sierra P, Montes E, Ramírez R, Vega

- A, et al. *Increased expression of CC16 in patients with idiopathic pulmonary fibrosis*. **PLoS One**. 2016;11(12):1–11.
243. Hasegawa M, Fujimoto M, Hamaguchi 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(5):877–84.
244. 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**. 2016;56(4):309–13.
245. Ishii H, Mukae H, Kadota J, Kaida H, Nagata T, Abe K, et al. *High serum concentrations of surfactant protein A in usual interstitial pneumonia compared with non-specific interstitial pneumonia*. **Thorax**. 2003;58(1):52–7.
246. Sakamoto K, Taniguchi H, Kondoh Y, Johkoh T, Sumikawa H, Kimura T, et al. *Serum KL-6 in fibrotic NSIP: Correlations with physiologic and radiologic parameters*. **Respir Med**. 2010;104(1):127–33.
247. Okada F, Ando Y, Honda K, Tanoue S, Matsumoto S, Mori H. *Comparison of pulmonary CT findings and serum KL-6 levels in patients with cryptogenic organizing pneumonia*. **Br J Radiol**. 2009;82(975):212–8.
248. Ohnishi T, Yamada G, Tanaka H, Nakajima K, Tanaka S, Morita-Ichimura S, et al. *[A case of chronic hypersensitivity pneumonia with elevation of serum SP-D and KL-6]*. **Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi**. 2002;40(1):66–70.
249. Iwata H, Shibamoto Y, Baba F, Sugie C, Ogino H, Murata R, et al. *Correlation between the serum KL-6 level and the grade of radiation pneumonitis after stereotactic body radiotherapy for stage I lung cancer or small lung metastasis*. **Radiother Oncol**. 2011;101(2):267–70.
250. Yamakawa H, Hagiwara E, Kitamura H, Yamanaka Y, Ikeda S, Sekine A, et al. *Serum KL-6 and surfactant protein-D as monitoring and predictive markers of interstitial lung disease in patients with systemic sclerosis and mixed connective tissue disease*. **J Thorac Dis**. 2017;9(2):362–71.
251. Ishikawa N, Hattori N, Yokoyama A, Kohno N. *Utility of KL-6/MUC1 in the clinical management of interstitial lung diseases*. **Respir Investig**. 2012;50(1):3–13.
252. Wang K, Ju Q, Cao J, Tang W, Zhang J. *Impact of serum SP-A and SP-D levels on comparison and prognosis of idiopathic pulmonary fibrosis*. **Med (United States)**. 2017;96(23).

253. Bauer Y, White ES, de Bernard S, Cornelisse P, Leconte I, Morganti A, et al. *MMP-7 is a predictive biomarker of disease progression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis*. **ERJ Open Res.** 2017;**3(1):00074–2016**.
254. 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(10):1242–51**.
255. Tzouveleakis A, Herazo-Maya JD, Slade M, Chu J-H, Deiuliis G, Ryu C, et al. *Validation of the prognostic value of MMP-7 in idiopathic pulmonary fibrosis*. **Respirology.** 2017;**22(3):486–93**.
256. Guiot J, Bondue B, Henket M, Corhay JL, Louis R. *Raised serum levels of IGFBP-1 and IGFBP-2 in idiopathic pulmonary fibrosis*. **BMC Pulm Med.** 2016;**16(1):86**.
257. Wollin L, Wex E, Pautsch A, Schnapp G, Hostettler KE, Stowasser S, et al. *Mode of action of nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis*. **Eur Respir J.** 2015;**45(5):1434–45**.
258. Ando M, Miyazaki E, Ito T, Hiroshige S, Nureki SI, Ueno T, et al. *Significance of serum vascular endothelial growth factor level in patients with idiopathic pulmonary fibrosis*. **Lung.** 2010;**188(3):247–52**.
259. Yamashita M, Mouri T, Niisato M, Nitana H, Kobayashi H, Ogasawara M, et al. *Lymphangiogenic factors are associated with the severity of hypersensitivity pneumonitis*. **BMJ open Respir Res.** 2015;**2(1):e000085**.
260. Korthagen NM, van Moorsel CHM, Zanen P, Ruven HJ, Grutters JC. *Evaluation of Circulating YKL-40 Levels in Idiopathic Interstitial Pneumonias*. **Lung.** 2014;**192(6):975–80**.
261. Guzman J, Costabel U, Bonella F, Long X, Sarria R, Griese M, et al. *Serum YKL-40 as predictor of outcome in hypersensitivity pneumonitis*. **Eur Respir J.** 2016;**49(2):1501924**.
262. Jiang L, Wang Y, Peng Q, Shu X, Wang G, Wu X. *Serum YKL-40 level is associated with severity of interstitial lung disease and poor prognosis in dermatomyositis with anti-MDA5 antibody*. **Clin Rheumatol.** 2019;**38(6):1655–63**.
263. Yogo Y, Fujishima S, Inoue T, Saito F, Shiomi T, Yamaguchi K, et al. *Macrophage derived chemokine (CCL22), thymus and activation-regulated chemokine (CCL17), and CCR4 in idiopathic pulmonary fibrosis*. **Respir Res.** 2009;**10:1–11**.
264. Manabe K, Nishioka Y, Kishi J, Inayama M, Aono Y, Nakamura

- Y, et al. *Elevation of macrophage-derived chemokine in eosinophilic pneumonia: a role of alveolar macrophages*. **J Med Invest**. 2005;52(1–2):85–92.
265. Shinoda H, Tasaka S, Fujishima S, Yamasawa W, Miyamoto K, Nakano Y, et al. *Elevated CC chemokine level in bronchoalveolar lavage fluid is predictive of a poor outcome of idiopathic pulmonary fibrosis*. **Respiration**. 2009;78(3):285–92.
266. Miyazaki Y, Unoura K, Tateishi T, Akashi T, Takemura T, Tomita M, et al. *Higher serum CCL17 may be a promising predictor of acute exacerbations in chronic hypersensitivity pneumonitis*. **Respir Res**. 2013;14(1):1.
267. Pierce EM, Carpenter K, Jakubzick C, Kunkel SL, Evanoff H, Flaherty KR, et al. *Idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts migrate and proliferate to CC chemokine ligand 21*. **Eur Respir J**. 2007;29(6):1082–93.
268. Chen S, Wang Q, Wu CY, Wu QJ, Li Y, Wu ZY, et al. *A single-nucleotide polymorphism of CCL21 rs951005 T>C is associated with susceptibility of polymyositis and such patients with interstitial lung disease in a Chinese Han population*. **Clin Exp Rheumatol**. 33(5):639–46.
269. Inoue Y, Ishizuka M, Furusawa H, Honda T, Kawahara T, Tateishi T, et al. *Acute inflammatory and immunologic responses against antigen in chronic bird-related hypersensitivity pneumonitis*. **Allergol Int**. 2019;68(3):321–8.
270. Schmidt K, Martinez-Gamboa L, Meier S, Witt C, Meisel C, Hanitsch LG, et al. *Bronchoalveolar lavage fluid cytokines and chemokines as markers and predictors for the outcome of interstitial lung disease in systemic sclerosis patients*. **Arthritis Res Ther**. 2009;11(4):R111.
271. Mota PC, Morais A, Palmares C, Beltrão M, Melo N, Santos AC, et al. *Diagnostic value of CD103 expression in bronchoalveolar lymphocytes in sarcoidosis*. **Respir Med**. 2012;106(7):1014–20.
272. Couto M, Palmares C, Beltrão M, Neves S, Mota P, Morais A, et al. *Integrin $\alpha E \beta 7$ (CD103) expression in bronchoalveolar lymphocytes of patients with hypersensitivity pneumonitis*. **Int Arch Occup Environ Health**. 2015;88(2):167–73.
273. Englert JM, Hanford LE, Kaminski N, Tobolewski JM, Tan RJ, Fattman CL, et al. *A role for the receptor for advanced glycation end products in idiopathic pulmonary fibrosis*. **Am J Pathol**. 2008;172(3):583–91.
274. Xu Y, Toure F, Qu W, Lin L, Song F, Shen X, et al. *Advanced glycation end product (AGE)-receptor for age (RAGE) signaling*

- and up-regulation of Egr-1 in hypoxic macrophages. J Biol Chem.* **2010;285(30):23233–40.**
275. Machahua C, Montes-Worboys A, Planas-Cerezales L, Buendia-Flores R, Molina-Molina M, Vicens-Zygmunt V. *Serum AGE/RAGEs as potential biomarker in idiopathic pulmonary fibrosis. Respir Res.* **2018;19(1):1–9.**
276. Seibold MA, Wise AL, Speer MC, Steele MP, Brown KK, Loyd JE, et al. *A common MUC5B promoter polymorphism and pulmonary fibrosis. N Engl J Med.* **2011;364(16):1503–12.**
277. Stock CJ, Sato H, Fonseca C, Banya WAS, Molyneaux PL, Adamali H, et al. *Mucin 5B promoter polymorphism is associated with idiopathic pulmonary fibrosis but not with development of lung fibrosis in systemic sclerosis or sarcoidosis. Thorax.* **2013;68(5):436–41.**
278. Vittinghoff E, Golden JA, Wolters PJ. *The MUC5B promoter polymorphism and telomere length in patients with chronic hypersensitivity pneumonitis. Lancet Respir Med.* **2018;5(8):639–47.**
279. Newton CA, Oldham JM, Ley B, Anand V, Adegunsoye A, Liu G, et al. *Telomere length and genetic variant associations with interstitial lung disease progression and survival. Eur Respir J.* **2019;53(4):1–18.**
280. Peljto AL, Zhang Y, Fingerlin TE, Ma S, Garcia JGN, Richards TJ, et al. *Association between the MUC5B promoter polymorphism and survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. JAMA.* **2013;309(21):2232–9.**
281. Noth I, Zhang Y, Ma S, Flores C, Barber M, Huang Y, et al. *Genetic variants associated with idiopathic pulmonary fibrosis susceptibility and mortality: a genome-wide association study. Lancet Respir Med.* **2013;1(4):309–17.**
282. Oldham JM, Ma SF, Martinez FJ, Anstrom KJ, Raghu G, Schwartz DA, et al. *TOLLIP, MUC5B, and the response to N-acetylcysteine among individuals with idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Respir Crit Care Med.* **2015;192(12):1475–82.**
283. Stuart BD, Choi J, Zaidi S, Xing C, Holohan B, Chen R, et al. *Exome sequencing links mutations in PARN and RTEL1 with familial pulmonary fibrosis and telomere shortening. Nat Genet.* **2015;47(5):512–7.**
284. Courtwright AM, El-Chemaly S. *Telomeres in interstitial lung disease: The short and the long of it. Ann Am Thorac Soc.* **2019;16(2):175–81.**
285. Newton CA, Batra K, Torrealba J, Kozlitina J, Glazer CS,

- Aravena C, et al. *Telomere-related lung fibrosis is diagnostically heterogeneous but uniformly progressive*. **Eur Respir J**. 2016;48(6):1710–20.
286. Juge P-AA, Borie R, Kannengiesser C, Gazal S, Revy P, Wemeau-Stervinou L, et al. *Shared genetic predisposition in rheumatoid arthritis-interstitial lung disease and familial pulmonary fibrosis*. **Eur Respir J**. 2017;49(5).
287. Rouzet A, Reboux G, Dalphin JC, Gondouin A, De Vuyst P, Balliau T, et al. *An immunoproteomic approach revealed antigenic proteins enhancing serodiagnosis performance of bird fancier's lung*. **J Immunol Methods**. 2017;450:58–65.
288. Hamada T, Samukawa T, Kumamoto T, Hatanaka K, Tsukuya G, Yamamoto M, et al. *Serum B cell-activating factor (BAFF) level in connective tissue disease associated interstitial lung disease*. **BMC Pulm Med**. 2015;15(1):4–11.
289. Sellares J, Veraldi KL, Thiel KJ, Cárdenes N, Alvarez D, Schneider F, et al. *Intracellular Heat Shock Protein 70 Deficiency in Pulmonary Fibrosis*. **Am J Respir Cell Mol Biol**. 2018;1–36.
290. Harlow L, Gochuico BR, Rosas IO, Doyle TJ, Osorio JC, Travers TS, et al. *Anti-citrullinated heat shock protein 90 antibodies identified in bronchoalveolar lavage fluid are a marker of lung-specific immune responses*. **Clin Immunol**. 2014;155(1):60–70.
291. Defendenti C, Atzeni F, Spina MF, Grosso S, Cereda A, Guercilena G, et al. *Clinical and laboratory aspects of Ro/SSA-52 autoantibodies*. **Autoimmun Rev**. 2011;10(3):150–4.
292. Burbelo PD, Ching KH, Han BL, Bush ER, Reeves WH, Iadarola MJ. *Extraordinary antigenicity of the human Ro52 autoantigen*. **Am J Transl Res**. 2010;2(2):145–55.
293. Vallerskog T, Gunnarsson I, Widhe M, Risselada A, Klareskog L, van Vollenhoven R, et al. *Treatment with rituximab affects both the cellular and the humoral arm of the immune system in patients with SLE*. **Clin Immunol**. 2007;122(1):62–74.
294. Heinlen LD, McClain MT, Ritterhouse LL, Bruner BF, Edgerton CC, Keith MP, et al. *60 kD Ro and nRNP A frequently initiate human lupus autoimmunity*. **PLoS One**. 2010;5(3):e9599.
295. Eriksson C, Kokkonen H, Johansson M, Hallmans G, Wadell G, Rantapää-Dahlqvist S. *Autoantibodies predate the onset of systemic lupus erythematosus in northern Sweden*. **Arthritis Res Ther**. 2011;13(1):R30.
296. Clark G, Reichlin M, Tomasi TB. *Characterization of a soluble cytoplasmic antigen reactive with sera from patients with systemic lupus erythematosus*. **J Immunol**. 1969;102(1):117–22.

297. Alsbaugh MA, Tan EM. *Antibodies to cellular antigens in Sjögren's syndrome*. **J Clin Invest**. 1975;55(5):1067–73.
298. Granito A, Muratori P, Muratori L, Pappas G, Cassani F, Worthington J, et al. *Antibodies to SS-A/Ro-52kD and centromere in autoimmune liver disease: a clue to diagnosis and prognosis of primary biliary cirrhosis*. **Aliment Pharmacol Ther**. 2007;26(6):831–8.
299. Montano-Loza AJ, Shums Z, Norman GL, Czaja AJ. *Prognostic implications of antibodies to Ro/SSA and soluble liver antigen in type 1 autoimmune hepatitis*. **Liver Int**. 2012;32(1):85–92.
300. Ramos-Casals M, García-Carrasco M, Cervera R, Rosas J, Trejo O, de la Red G, et al. *Hepatitis C virus infection mimicking primary Sjögren syndrome. A clinical and immunologic description of 35 cases*. **Medicine (Baltimore)**. 2001;80(1):1–8.
301. Wu Y-Y, Hsu T-C, Chen T-Y, Liu T-C, Liu G-Y, Lee Y-J, et al. *Proteinase 3 and dihydrolipoamide dehydrogenase (E3) are major autoantigens in hepatitis C virus (HCV) infection*. **Clin Exp Immunol**. 2002;128(2):347–52.
302. Fritzler MJ, Pauls JD, Kinsella TD, Bowen TJ. *Antinuclear, anticytoplasmic, and anti-Sjogren's syndrome antigen A (SS-A/Ro) antibodies in female blood donors*. **Clin Immunol Immunopathol**. 1985;36(1):120–8.
303. Bonifacino JS, Weissman AM. *Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways*. **Annu Rev Cell Dev Biol**. 1998;14:19–57.
304. Tanaka M, Kamitani T. *Cytoplasmic relocation of Daxx induced by Ro52 and FLASH*. **Histochem Cell Biol**. 2010;134(3):297–306.
305. Tanaka M, Tanji K, Niida M, Kamitani T. *Dynamic movements of Ro52 cytoplasmic bodies along microtubules*. **Histochem Cell Biol**. 2010;133(3):273–84.
306. Rajsbaum R, García-Sastre A, Versteeg GA. *TRIMunity: the roles of the TRIM E3-ubiquitin ligase family in innate antiviral immunity*. **J Mol Biol**. 2014;426(6):1265–84.
307. Rhodes DA, Trowsdale J. *TRIM21 is a trimeric protein that binds IgG Fc via the B30.2 domain*. **Mol Immunol**. 2007;44(9):2406–14.
308. Rhodes DA, Ihrke G, Reinicke AT, Malcherek G, Towey M, Isenberg DA, et al. *The 52 000 MW Ro/SS-A autoantigen in Sjögren's syndrome/systemic lupus erythematosus (Ro52) is an interferón-gamma inducible tripartite motif protein associated with membrane proximal structures*. **Immunology**.

- 2002;106(2):246–56.
309. Bolland S, Garcia-Sastre A. *Vicious circle: systemic autoreactivity in Ro52/TRIM21-deficient mice.* **J Exp Med.** 2009;206(8):1647–51.
310. Kong HJ, Anderson DE, Lee CH, Jang MK, Tamura T, Tailor P, et al. *Cutting edge: autoantigen Ro52 is an interferón inducible E3 ligase that ubiquitinates IRF-8 and enhances cytokine expression in macrophages.* **J Immunol.** 2007;179(1):26–30.
311. Oke V, Vassilaki I, Espinosa A, Strandberg L, Kuchroo VK, Nyberg F, et al. *High Ro52 expression in spontaneous and UV-induced cutaneous inflammation.* **J Invest Dermatol.** 2009;129(8):2000–10.
312. Nobuhara Y, Kawano S, Kageyama G, Sugiyama D, Saegusa J, Kumagai S. *Is SS-A/Ro52 a hydrogen peroxide-sensitive signaling molecule?* **Antioxid Redox Signal.** 2007;9(3):385–91.
313. Jauharoh SNA, Saegusa J, Sugimoto T, Ardianto B, Kasagi S, Sugiyama D, et al. *SS-A/Ro52 promotes apoptosis by regulating Bcl-2 production.* **Biochem Biophys Res Commun.** 2012;417(1):582–7.
314. Eloranta M-L, Barbasso Helmers S, Ulfgren A-K, Rönnblom L, Alm G V, Lundberg IE. *A possible mechanism for endogenous activation of the type I interferón system in myositis patients with anti-Jo-1 or anti-Ro 52/anti-Ro 60 autoantibodies.* **Arthritis Rheum.** 2007;56(9):3112–24.
315. McArthur C, Wang Y, Veno P, Zhang J, Fiorella R. *Intracellular trafficking and surface expression of SS-A (Ro), SS-B (La), poly(ADP-ribose) polymerase and alpha-fodrin autoantigens during apoptosis in human salivary gland cells induced by tumour necrosis factor-alpha.* **Arch Oral Biol.** 2002;47(6):443–8.
316. Ohlsson M, Jonsson R, Brokstad KA. *Subcellular redistribution and surface exposure of the Ro52, Ro60 and La48 autoantigens during apoptosis in human ductal epithelial cells: a possible mechanism in the pathogenesis of Sjögren's syndrome.* **Scand J Immunol.** 2002;56(5):456–69.
317. Higgs R, Ní Gabhann J, Ben Larbi N, Breen EP, Fitzgerald KA, Jefferies CA. *The E3 ubiquitin ligase Ro52 negatively regulates IFN-beta production post-pathogen recognition by polyubiquitin-mediated degradation of IRF3.* **J Immunol.** 2008;181(3):1780–6.
318. Niida M, Tanaka M, Kamitani T. *Downregulation of active IKK beta by Ro52-mediated autophagy.* **Mol Immunol.** 2010;47(14):2378–87.
319. Higgs R, Lazzari E, Wynne C, Ní Gabhann J, Espinosa A,

- Wahren-Herlenius M, et al. *Self protection from anti-viral responses--Ro52 promotes degradation of the transcription factor IRF7 downstream of the viral Toll-Like receptors.* **PLoS One.** **2010;5(7):e11776.**
320. Tanaka N, Muro Y, Sugiura K, Tomita Y. *Anti-SS-A/Ro antibody determination by indirect immunofluorescence and comparison of different methods of anti-nuclear antibody screening: evaluation of the utility of HEp-2 cells transfected with the 60 kDa SS-A/Ro as a substrate.* **Mod Rheumatol.** **2008;18(6):585–92.**
321. Peene I, Meheus L, De Keyser S, Humbel R, Veys EM, De Keyser F. *Anti-Ro52 reactivity is an independent and additional serum marker in connective tissue disease.* **Ann Rheum Dis.** **2002;61(10):929–33.**
322. Franceschini F, Cretti L, Quinzanini M, Rizzini FL, Cattaneo R. *Deforming arthropathy of the hands in systemic lupus erythematosus is associated with antibodies to SSA/Ro and to SSB/La.* **Lupus.** **1994;3(5):419–22.**
323. Marie I, Hatron PY, Dominique S, Cherin P, Mouthon L, Menard J-FF, et al. *Short-term and long-term outcome of anti-Jol1-positive patients with anti-Ro52 antibody.* **Semin Arthritis Rheum.** **2012;41(6):890–9.**
324. Mierau R, Moinzadeh P, Riemekasten G, Melchers I, Meurer M, Reichenberger F, et al. *Frequency of disease-associated and other nuclear autoantibodies in patients of the German Network for Systemic Scleroderma: correlation with characteristic clinical features.* **Arthritis Res Ther.** **2011;13(5):R172.**
325. Hervier B, Rimbert M, Colonna F, Hamidou MA, Audrain M. *Clinical significance of anti-Ro/SSA-52 kDa antibodies: a retrospective monocentric study.* **Rheumatology (Oxford).** **2009;48(8):964–7.**
326. Petri M, Orbai A-M, Alarcón GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, et al. *Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus.* **Arthritis Rheum.** **2012;64(8):2677–86.**
327. Shiboski SC, Shiboski CH, Criswell LA, Baer AN, Challacombe S, Lanfranchi H, et al. *American College of rheumatology classification criteria for Sjögren's syndrome: A data-driven, expert consensus approach in the Sjögren's International Collaborative Clinical Alliance cohort.* **Arthritis Care Res.** **2012;64(4):475–87.**
328. Bohan A, Peter JB. *Polymyositis and dermatomyositis (first of two*

- parts). **N Engl J Med.** 1975;292(7):344–7.
329. van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. **Ann Rheum Dis.** 2013;72(11):1747–55.
330. Limaye VS, Cassidy J, Scott G, Roberts-Thomson PJ, Gillis D. Anti-Ro52 antibodies, antisynthetase antibodies, and antisynthetase syndrome. **Clin Rheumatol.** 2008;27(4):521–3.
331. Walsh SLF. *Multidisciplinary evaluation of interstitial lung diseases: current insights: Number 1 in the Series “Radiology” Edited by Nicola Sverzellati and Sujal Desai.* **Eur Respir Rev.** 2017;26(144).
332. American Thoracic Society, European Respiratory Society. *American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (E.* **Am J Respir Crit Care Med.** 2002;165(2):277–304.
333. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, et al. *Standardisation of spirometry.* **Eur Respir J.** 2005;26(2):319–38.
334. ATS Committee on Proficiency Standards for Clinical Pulmonary Function Laboratories. *ATS statement: guidelines for the six-minute walk test.* **Am J Respir Crit Care Med.** 2002;166(1):111–7.
335. Roca J, Burgos F, Sunyer J, Saez M, Chinn S, Antó JM, et al. *Reference values for forced spirometry. Group of the European Community Respiratory Health Survey.* **Eur Respir J.** 1998;11(6):1354–62.
336. Wells AU, Desai SR, Rubens MB, Goh NSL, Cramer D, Nicholson AG, et al. *Idiopathic pulmonary fibrosis: a composite physiologic index derived from disease extent observed by computed tomography.* **Am J Respir Crit Care Med.** 2003;167(7):962–9.
337. Meyer KC, Raghu G, Baughman RP, Brown KK, Costabel U, du Bois RM, et al. *An official American Thoracic Society clinical practice guideline: the clinical utility of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease.* **Am J Respir Crit Care Med.** 2012;185(9):1004–14.
338. Lee S, Hayashi H, Mastuzaki H, Kumagai-Takei N, Otsuki T. *Silicosis and autoimmunity.* **Curr Opin Allergy Clin Immunol.**

- 2017;17(2):78–84.
339. Chan EKL, Damoiseaux J, Carballo OG, Conrad K, de Melo Cruvinel W, Francescantonio PLC, et al. *Report of the First International Consensus on Standardized Nomenclature of Antinuclear Antibody HEp-2 Cell Patterns 2014-2015*. **Front Immunol.** 2015;6:412.
340. Peene I, Meheus L, Veys EM, De Keyser F. *Diagnostic associations in a large and consecutively identified population positive for anti-SSA and/or anti-SSB: the range of associated diseases differs according to the detailed serotype*. **Ann Rheum Dis.** 2002;61(12):1090–4.
341. Murng SHK, Thomas M. *Clinical associations of the positive anti Ro52 without Ro60 autoantibodies: undifferentiated connective tissue diseases*. **J Clin Pathol.** 2018;71(1):12–9.
342. Ghillani P, André C, Toly C, Rouquette AM, Bengoufa D, Nicaise P, et al. *Clinical significance of anti-Ro52 (TRIM21) antibodies non-associated with anti-SSA 60kDa antibodies: results of a multicentric study*. **Autoimmun Rev.** 2011;10(9):509–13.
343. Simmons-O'Brien E, Chen S, Watson R, Antoni C, Petri M, Hochberg M, et al. *One hundred anti-Ro (SS-A) antibody positive patients: a 10-year follow-up*. **Medicine (Baltimore).** 1995;74(3):109–30.
344. Alniemi DT, Gutierrez A, Drage LA, Wetter DA. *Subacute Cutaneous Lupus Erythematosus: Clinical Characteristics, Disease Associations, Treatments, and Outcomes in a Series of 90 Patients at Mayo Clinic, 1996-2011*. **Mayo Clin Proc.** 2017;92(3):406–14.
345. Popovic K, Brauner S, Ek M, Wahren-Herlenius M, Nyberg F. *Fine specificity of the Ro/SSA autoantibody response in relation to serological and clinical findings in 96 patients with self-reported cutaneous symptoms induced by the sun*. **Lupus.** 2007;16(1):10–7.
346. Popovic K, Wahren-Herlenius M, Nyberg F. *Clinical follow-up of 102 anti-Ro/SSA-positive patients with dermatological manifestations*. **Acta Derm Venereol.** 2008;88(4):370–5.
347. Cruellas MGP, Viana V dos ST, Levy-Neto M, Souza FHC de, Shinjo SK. *Myositis-specific and myositis-associated autoantibody profiles and their clinical associations in a large series of patients with polymyositis and dermatomyositis*. **Clinics (Sao Paulo).** 2013;68(7):909–14.
348. Liu Y, Xu M, Min X, Wu K, Zhang T, Li K, et al. *TWEAK/Fn14 Activation Participates in Ro52-Mediated Photosensitization in Cutaneous Lupus Erythematosus*. **Front Immunol.** 2017;8:651.

349. Achtman JC, Werth VP. *Pathophysiology of cutaneous lupus erythematosus*. **Arthritis Res Ther**. 2015;17:182.
350. Espinosa A, Dardalhon V, Brauner S, Ambrosi A, Higgs R, Quintana FJ, et al. *Loss of the lupus autoantigen Ro52/Trim21 induces tissue inflammation and systemic autoimmunity by dysregulating the IL-23-Th17 pathway*. **J Exp Med**. 2009;206(8):1661–71.
351. Xue D, Shi H, Smith JD, Chen X, Noe DA, Cedervall T, et al. *A lupus-like syndrome develops in mice lacking the Ro 60-kDa protein, a major lupus autoantigen*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2003;100(13):7503–8.
352. Srivastava P, Dwivedi S, Misra R. *Myositis-specific and myositis-associated autoantibodies in Indian patients with inflammatory myositis*. **Rheumatol Int**. 2016;36(7):935–43.
353. Hudson M, Pope J, Mahler M, Tatibouet S, Steele R, Baron M, et al. *Clinical significance of antibodies to Ro52/TRIM21 in systemic sclerosis*. **Arthritis Res Ther**. 2012;14(2):R50.
354. Wodkowski M, Hudson M, Proudman S, Walker J, Stevens W, Nikpour M, et al. *Monospecific anti-Ro52/TRIM21 antibodies in a tri-nation cohort of 1574 systemic sclerosis subjects: evidence of an association with interstitial lung disease and worse survival*. **Clin Exp Rheumatol**. 2015;33(4 Suppl 91):S131-5.
355. Vánca A, Csípo I, Németh J, Dévényi K, Gergely L, Dankó K. *Characteristics of interstitial lung disease in SS-A positive/Jo-1 positive inflammatory myopathy patients*. **Rheumatol Int**. 2009;29(9):989–94.
356. La Corte R, Lo Mo Naco A, Locaputo A, Dolzani F, Trotta F. *In patients with antisynthetase syndrome the occurrence of anti-Ro/SSA antibodies causes a more severe interstitial lung disease*. **Autoimmunity**. 2006;39(3):249–53.
357. Bahmer T, Romagnoli M, Girelli F, Claussen M, Rabe KF. *The use of auto-antibody testing in the evaluation of interstitial lung disease (ILD)--A practical approach for the pulmonologist*. **Respir Med**. 2016;113:80–92.
358. Menéndez A, Gómez J, Caminal-Montero L, Díaz-López JB, Cabezas-Rodríguez I, Mozo L. *Common and specific associations of anti-SSA/Ro60 and anti-Ro52/TRIM21 antibodies in systemic lupus erythematosus*. **ScientificWorldJournal**. 2013;2013:832789.
359. Aqrabi LA, Kvarnström M, Brokstad KA, Jonsson R, Skarstein K, Wahren-Herlenius M. *Ductal epithelial expression of Ro52 correlates with inflammation in salivary glands of patients with*

- primary Sjögren's syndrome. Clin Exp Immunol. 2014;177(1):244–52.*
360. Szczerba BM, Kaplonek P, Wolska N, Podsiadlowska A, Rybakowska PD, Dey P, et al. *Interaction between innate immunity and Ro52-induced antibody causes Sjögren's syndrome-like disorder in mice. Ann Rheum Dis. 2016;75(3):617–22.*
361. Sroka M, Bagavant H, Biswas I, Ballard A, Deshmukh US. *Immune response against the coiled coil domain of Sjögren's syndrome associated autoantigen Ro52 induces salivary gland dysfunction. Clin Exp Rheumatol. 36 Suppl 1(3):41–6.*
362. Aqrawi LA, Skarstein K, Bredholt G, Brun JG, Brokstad KA. *Autoantigen-specific memory B cells in primary Sjögren's syndrome. Scand J Immunol. 2012;75(1):61–8.*
363. Fujimoto M, Shimozuma M, Yazawa N, Kubo M, Ihn H, Sato S, et al. *Prevalence and clinical relevance of 52-kDa and 60-kDa Ro/SS-A autoantibodies in Japanese patients with systemic sclerosis. Ann Rheum Dis. 1997;56(11):667–70.*
364. Ahlin E, Mathsson L, Eloranta M-L, Jonsdottir T, Gunnarsson I, Rönnblom L, et al. *Autoantibodies associated with RNA are more enriched than anti-dsDNA antibodies in circulating immune complexes in SLE. Lupus. 2012;21(6):586–95.*
365. Ferro R, Medina F, Serracín D. *Factores de Riesgo y Pronósticos de Nefritis Lúpica. Cimel. 2006;11(2):67–71.*
366. Salomonsson S, Sonesson S-E, Ottosson L, Muhallab S, Olsson T, Sunnerhagen M, et al. *Ro/SSA autoantibodies directly bind cardiomyocytes, disturb calcium homeostasis, and mediate congenital heart block. J Exp Med. 2005;201(1):11–7.*
367. Bergman G, Eliasson H, Mohlkert L-A, Wahren-Herlenius M, Sonesson S-E. *Progression to first-degree heart block in preschool children exposed in utero to maternal anti-SSA/Ro52 autoantibodies. Acta Paediatr. 2012;101(5):488–93.*
368. Costedoat-Chalumeau N, Amoura Z, Villain E, Cohen L, Piette J-C. *Anti-SSA/Ro antibodies and the heart: more than complete congenital heart block? A review of electrocardiographic and myocardial abnormalities and of treatment options. Arthritis Res Ther. 2005;7(2):69–73.*
369. Frank MB, Itoh K, Fujisaku A, Pontarotti P, Mattei MG, Neas BR. *The mapping of the human 52-kD Ro/SSA autoantigen gene to human chromosome 11, and its polymorphisms. Am J Hum Genet. 1993;52(1):183–91.*
370. Ito J, Li W, Ito S, Tanaka S, Matsumoto Y, Sato F, et al. *Sal-like 4 protein levels in breast cancer cells are post-translationally*

- down-regulated by tripartite motif-containing 21. J Biol Chem.* **2018;293(17):6556–64.**
371. Brauner S, Zhou W, Backlin C, Green TM, Folkersen L, Ivanchenko M, et al. *Reduced expression of TRIM21/Ro52 predicts poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients with and without rheumatic disease. J Intern Med.* **2015;278(3):323–32.**
372. Chatterjee M, Hurley LC, Levin NK, Stack M, Tainsky MA. *Utility of paraneoplastic antigens as biomarkers for surveillance and prediction of recurrence in ovarian cancer. Cancer Biomark.* **2017;20(4):369–87.**
373. Infantino M, Meacci F, Grossi V, Benucci M, Morozzi G, Tonutti E, et al. *Serological epitope profile of anti-Ro52-positive patients with systemic autoimmune rheumatic diseases. Arthritis Res Ther.* **2015;17:365.**
374. Malmström V, Catrina AI, Klareskog L. *The immunopathogenesis of seropositive rheumatoid arthritis: from triggering to targeting. Nat Rev Immunol.* **2017;17(1):60–75.**
375. *Tissue expression of TRIM21 - Summary - The Human Protein Atlas [Internet].*
376. Yoshimi R, Ishigatsubo Y, Ozato K. *Autoantigen TRIM21/Ro52 as a Possible Target for Treatment of Systemic Lupus Erythematosus. Int J Rheumatol.* **2012;2012:718237.**
377. Espinosa A, Hennig J, Ambrosi A, Anandapadmanaban M, Abenius MS, Sheng Y, et al. *Anti-Ro52 autoantibodies from patients with Sjögren's syndrome inhibit the Ro52 E3 ligase activity by blocking the E3/E2 interface. J Biol Chem.* **2011;286(42):36478–91.**
378. McEwan WA. *Surveillance for Intracellular Antibody by Cytosolic Fc Receptor TRIM21. Antibodies (Basel, Switzerland).* **2016;5(4).**
379. Ajeganova S, Humphreys JH, Verheul MK, van Steenberg HW, van Nies JAB, Hafström I, et al. *Anticitrullinated protein antibodies and rheumatoid factor are associated with increased mortality but with different causes of death in patients with rheumatoid arthritis: a longitudinal study in three European cohorts. Ann Rheum Dis.* **2016;75(11):1924–32.**

ANEXOS

11.1. ANEXO 1. Descripción de los autoanticuerpos estudiados

Anti-centrómero (CENP-A, CENP-B, CENP-C): Anticuerpos dirigidos contra proteínas del centrómero principalmente CENP-B, pero también CENP-A y CENP-C. Son altamente específicos del síndrome de CREST una forma clínica de ISSc. Su detección se asocia con la aparición de úlceras digitales e HAP.

Factor reumatoide (FR): Anticuerpos de clase IgM dirigidos contra la Fc de los anticuerpos IgG. Una definición más laxa podría abarcar cualquier anticuerpo dirigido frente a la Fc de otro anticuerpo de distinta clase. Pese a servir para definir la AR seropositiva y para realizar su seguimiento, este marcador no es específico y puede encontrarse en cualquier condición inflamatoria donde exista una respuesta mediada por células T frente a inmunocomplejos que contengan IgG.

Anti-histonas: Aparece en algunos casos de LES inducido por fármacos.

Anti-Ku: Anticuerpos de la familia de las ARS (ver anticuerpos anti-sintetasas). Aparece en algunos síndromes de solapamiento SSc/DM y se asocia con la aparición de EPID.

Anti-MBG: Anticuerpos frente a la membrana basal glomerular. Específicos del síndrome de Goodpasture.

Anti-MDA5: Se puede detectar en pacientes con DM amiofálica y EPID rápidamente progresiva.

Anti-Mi-2: Altamente específicos de DM. Asociado con afectación cutánea (signo de Gottron, pápulas o eritema en heliotropo), escasa afectación pulmonar, bajo riesgo de neoplasia y buena respuesta a los esteroides.

Anti-DNAse: A títulos altos resultan patognomónicos de LES. Están implicados en el mecanismo etiológico y su variación puede utilizarse para monitorizar la enfermedad.

Anti-MPO: Anticuerpos anti-mieloperoxidasa, aparecen en las vasculitis ANCA positivas. En la zona mediterránea se detecta casi exclusivamente en pacientes de poliarteritis microscópica o síndrome de Churg-strauss.

Anti-NOR-90: Asociado a SSc, pueden aparecer en otras ETCs y en cáncer por lo que es poco específico.

Anti-Nucleosoma: Algunos autores sugieren que se trata de anticuerpos altamente específicos de LES mientras que otros consideran que son inespecíficos. Estos anticuerpos está dirigido frente a un macroestructura, con una estructura cuaternaria lábil y de difícil extracción lo que explica las discrepancias entre distintos autores.

Anti-NXP2: Aparecen principalmente en la DM juvenil o del adulto y solo excepcionalmente en PM. Asociado a lesiones cutáneas severas, incluida calcinosis, y contracturas musculares. En adultos se ha asociado con cáncer.

Anti-PCNA: Anticuerpo altamente específico de LES pero con una prevalencia muy baja.

Anti-péptidos cíclicos citrulinados (CCP): Anticuerpos dirigidos frente a diferentes proteínas generalmente de tipo estructural (queratina, filagrina, fibrinógeno, vimentina, colágeno, histonas...) modificadas mediante citrulinización, un proceso enzimático que produce la modificación de residuos de arginina en citrulina. Los métodos de detección utilizan fragmentos de estas moléculas que varían dependiendo del fabricante. A concentraciones altas son altamente específicos de AR pero a diferencia del FR no son útiles para la monitorización. Su presencia en AR se asocia con un aumento en el riesgo de muerte por enfermedades respiratorias ⁽³⁷⁹⁾.

Anti-PM-Scl: Puede aparecer en pacientes con SSc sin otra clínica asociada, pero generalmente aparecen el síndrome de solapamiento SSc-PM/DM

Anti-PR3: Anticuerpos proteinasa 3, aparecen en las vasculitis ANCA positivas. En la zona mediterránea se detecta casi exclusivamente en pacientes con poliangeitis granulomatosa.

Anti-ribosomal-P: Aparecen en LES generalmente asociados a otros anticuerpos específicos. Se relacionan con la aparición de cuadros psicóticos.

Anti-RNapol-III: Altamente específicos de ISSc, asociados con rápida progresión cutánea y la aparición de hernia de hiato, crisis renal y neoplasias.

Anti-SAE1: Se encuentra en pacientes adultos con DM. Asociado a afectación cutánea grave, disfagia y manifestaciones sistémicas. La mayoría de los pacientes presentan una buena respuesta al tratamiento inmunosupresor y presentan un pronóstico favorable.

Anti-Scl-70: Anticuerpos dirigidos contra la topoisomerasa I. Altamente específicos de dSSc y asociados a la aparición de úlceras digitales y EPID. En ocasiones puede aparecer en síndromes de solapamiento con LES.

Anti-sintetasas: Se trata de un grupo de anticuerpos dirigidos contra las aminoacil-RNA-sintetasas (ARS), el principal miembro es Jo-1 pero también incluye a PL-7, PL-12, OJ, EJ, KS y Ku entre otros. Altamente específicos de síndrome anti-sintetasa (SAS), una forma clínicamente heterogénea de miopatía inflamatoria idiopática caracterizada por miositis, artralgia, fenómeno de Raynaud, "manos de mecánico" y enfermedad pulmonar intersticial. A menudo aparecen acompañados de anti-Ro52.

Anti-Smd: Anticuerpo muy específico de LES. Se asocia a la aparición de nefritis y mal pronóstico.

Anti-SRP: Estrictamente asociado con la miositis necrotizante, una forma grave de PM que se inicia con debilidad muscular rápidamente progresiva y con mala respuesta al tratamiento.

Anti-SS-A/Ro60: Marcador de síndrome de Sjögren, tanto primario como asociado a otras ETCs. Muy común en LES.

Anti-SS-B/La: Aparece siempre acompañando al SS-A/Ro60, tanto en SSp como en otras ETCs.

Anti-Th/T₀: Altamente específicos de ISSc, asociados con EPID y HAP.

Anti-TIF1-γ: Aparece exclusivamente en pacientes con DM juvenil o del adulto. Asociado con lesiones cutáneas severas en jóvenes y adultos y riesgo de cáncer en adultos.

Anti-U1-RNP: Cuando aparece de forma aislada y en títulos altos, este anticuerpo es altamente específico de EMTC. También puede encontrarse en otras ETCs como en el LES, la PM/DM y la SSc, generalmente en forma de síndromes de solapamiento.

Anti-U3-RNP: Anticuerpos dirigidos contra la fibrilarina. Aparece en algunos síndromes de solapamiento SSc/DM

Nota: Para una mayor profundización, recomendamos consultar las siguientes referencias: PM/DM ⁽¹⁹⁵⁾, SSc ⁽¹⁴⁸⁾⁽¹⁴⁹⁾, AR ⁽³⁷⁴⁾.

11.2. ANEXO 2. Relación de tablas

Tabla 1. Subpoblaciones linfocitarias (respuesta adaptativa).....	pag 12
Tabla 2. Subpoblaciones linfocitarias (respuesta innata).....	pag 20
Tabla 3. Clasificación de la EPID de causa conocida	pag 25
Tabla 4. Neumonías intersticiales idiopáticas.....	pag 26
Tabla 5. Hallazgos de TCAR característicos de NII asociada a ETC.....	pag 30
Tabla 6. Características radiológicas de las NII.....	pag 31
Tabla 7. Características histológicas de las NII.....	pag 32
Tabla 8. Criterios de clasificación para la neumonía Intersticial con características autoinmunes (IPAF)	pag 42
Tabla 9.1. Biomarcadores en EPID (moléculas no relacionadas con la respuesta inmunitaria).....	pag 49
Tabla 9.2. Biomarcadores en EPID (moléculas relacionadas con la respuesta inmunitaria).....	pag 50
Tabla 10. Anticuerpos relacionados con autoinmunidad no órgano específica y su asociación con EPID.....	pag 52
Tabla 11. Listado de los centros participantes	pag 70
Tabla 12. Listado de las manifestaciones estudiadas según el órgano diana y la enfermedad.....	pag 71
Tabla 13. Listado de las variables estudiadas estudio suero.....	pag 76
Tabla 14. Relación de sueros seleccionados para realizar el estudio mediante	

IFI.....	pag 85
Tabla 15. Listado de variables y test estadísticos utilizados estudio LBA.	pag 87
Tabla 16. Distribución de los pacientes por diagnóstico y enfermedad estudio suero	pag 94
Tabla 17. Resumen estadístico estudio suero	pag 110
Tabla 18. Resultados del inmunoblot de ENAs en LBA (conjugado IgG e IgA)	pag 112
Tabla 19. Variables clínico-epidemiológicas estudio LBA.....	pag 113
Tabla 20. Poblaciones leucocitarias en LBA.....	pag 114
Tabla 21. Distribución de los diagnósticos en el total de pacientes y el grupo con ENAs positivos.....	pag 115
Tabla 22. Presencia de anticuerpos relacionados con SSc, PM-DM y vasculitis	pag 117
Tabla 23. Presencia de anticuerpos relacionados con AR	pag 118
Tabla 24. Correlación entre los hallazgos del inmunoblot y el patrón ANA o ANCA	pag 119
Tabla 25. Test de normalidad variables cuantitativas.....	pag 134
Tabla 26. Presencia de ENAs en LBA vs variables clínico-epidemiológicas.....	pag 135
Tabla 27. Presencia de ENAs en LBA vs variables funcionales.....	pag 135
Tabla 28. Presencia de ENAs en LBA vs poblaciones leucocitarias en LBA	pag 136

11.3. ANEXO 3. Relación de figuras

Fig 1. Orígenes de los fibroblastos implicados en la fibrosis pulmonar.... pag 35

Fig 2. Estructura de la proteína TRIM21/Ro52..... pag 54

Fig 3. Procedimiento analítico inmunoblots pag 80

Fig 4. Ejemplo de resultados de inmunoblot pag 81

Fig 5. Procedimiento analítico ELISAs..... pag 83

Fig 6. Procedimiento analítico IFI..... pag 84

Fig 7. Descripción pacientes HUGTiP..... pag 92

Fig 8. Pacientes según su especificidad..... pag 93

Fig 9. Pacientes según diagnóstico..... pag 93

Fig 10. Prevalencia de las manifestaciones pulmonares..... pag 96

Fig 11. Prevalencia del fenómeno de Raynaud..... pag 97

Fig 12. Prevalencia de las manifestaciones articulares..... pag 98

Fig 13. Prevalencia de la artritis por enfermedades..... pag 99

Fig 14. Prevalencia de la artropatía de Jaccoud..... pag 100

Fig 15. Porcentaje de pacientes con SSp según especificidades..... pag 101

Fig 16. Prevalencia del síndrome seco secundario en otras ETCs..... Pag 102

Fig 17. Prevalencia de las manifestaciones cutáneas en LES..... pag 103

Fig 18. Prevalencia de la forma difusa Vs limitada en SSc..... pag 104

Fig 19. Prevalencia de la serositis..... pag 105

Fig 20. Prevalencia de las manifestaciones renales..... pag 106

Fig 21. Prevalencia de la aparición de tumores..... pag 107

Fig 22. Prevalencia de las manifestaciones cardiacas..... pag 108

Figs 23-29. Imágenes de IFI en LBA..... pags 120-133

Fig 30. Posible mecanismo de acción de los anticuerpos anti-Ro52 en la
EPID..... pag 153

11.4. ANEXO 4. Ayudas institucionales

Esta tesis doctoral ha sido realizada con las siguientes ayudas institucionales:

- Beca para la investigación de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR): proyecto 020: “Utilidad pronóstica de la determinación de anticuerpos anti-Ro52 en lavado broncoalveolar en pacientes con enfermedad pulmonar intersticial difusa”.
- Ayudas a la Investigación Roche EPID FUTURO 2014 del PII de EPID de SEPAR: “Utilidad de la determinación de anticuerpos anti-Ro52 en lavado broncoalveolar en pacientes con enfermedad pulmonar intersticial difusa”.
- Beca Separ-Boehringer EPID 2018 para jóvenes investigadores: “Detección de anticuerpos en el lavado broncoalveolar de pacientes con enfermedad intersticial difusa asociada a enfermedad autoinmune sistémica. Implicaciones clínicas y pronósticas.”