PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOMEDICINA

TESIS DOCTORAL

DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN LA ENFERMEDAD PULMONAR INTERSTICIAL ASOCIADA A ENFERMEDADES AUTOINMUNES

PhD THESIS

ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN INTERSTITIAL LUNG DISEASE ASSOCIATED WITH AUTOIMMUNE DISEASES

AUTORA VERÓNICA PULITO CUETO DIRECTORES MIGUEL ÁNGEL GONZÁLEZ-GAY MANTECÓN RAQUEL LÓPEZ MEJÍAS

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

Escuela de Doctorado de la Universidad de Cantabria

Santander 2022



Departamento de Medicina y Psiquiatría

MIGUEL ANGÉL GONZÁLEZ-GAY MANTECÓN, Profesor Titular de Medicina de la Universidad de Cantabria y Jefe de Servicio de Reumatología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla

CERTIFICA

Que el trabajo titulado:

"DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN LA ENFERMEDAD PULMONAR INTERSTICIAL ASOCIADA A ENFERMEDADES AUTOINMUNES"

Que presenta Verónica Pulito Cueto, graduada en Bioquímica y Biología Molecular, para optar al grado de Doctor por la Universidad de Cantabria, en el programa de doctorado en Biología Molecular y Biomedicina, ha sido realizado bajo mi dirección y reúne las condiciones de rigor y originalidad para una Tesis Doctoral.

Santander, 25 de abril de 2022

Fdo. Miguel Ángel González-Gay Mantecón



RAQUEL LÓPEZ MEJÍAS, Investigadora Corresponsable del Grupo de Investigación en Epidemiología Genética y Arterioesclerosis de las Enfermedades Sistémicas y en Enfermedades Metabólicas Óseas del Aparato Locomotor del Instituto de Investigación Sanitaria (IDIVAL)

CERTIFICA

Que el trabajo titulado:

"DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN LA ENFERMEDAD PULMONAR INTERSTICIAL ASOCIADA A ENFERMEDADES AUTOINMUNES"

Que presenta Verónica Pulito Cueto, graduada en Bioquímica y Biología Molecular, para optar al grado de Doctor por la Universidad de Cantabria, en el programa de doctorado en Biología Molecular y Biomedicina, ha sido realizado bajo mi dirección y reúne las condiciones de rigor y originalidad para una Tesis Doctoral.

Santander, 25 de abril de 2022

Fdo. Raquel López Mejías

"Vive como si fueras a morir mañana. Aprende como si fueras a vivir para siempre".

Mahatma Gandhi

Esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo gracias a una ayuda para un contrato predoctoral del Programa de Personal Investigador en formación Predoctoral en el área de la biomedicina, biotecnología y ciencias de la salud financiado por la Universidad de Cantabria, el Instituto de Investigación Sanitaria IDIVAL, la Consejería de Universidades e Investigación, Medio Ambiente y Política Social y la Consejería de Sanidad del Gobierno de Cantabria (PREVAL 18/01)

ÍNDICE

Abreviaturas

	I. INTRODUCCIÓN					
2	1.	LA ENFERMEDAD PULMONAR INTERSTICIAL ASOCIADA A				
		ENFERMEDADES AUTOINMUNES (EA-EPI+)				
2	1.1. Patogénesis de la EA-EPI+					
4		1.2. Diagnóstico y pronóstico de la EA-EPI+				
5		1.3. La enfermedad pulmonar intersticial asociada a la artritis reumatoide				
		(AR-EPI⁺)				
7		1.4. La enfermedad pulmonar intersticial asociada a la esclerosis				
		sistémica (ES-EPI+)				
8		1.5. La enfermedad pulmonar intersticial asociada a otras enfermedades				
		autoinmunes (otras EA-EPI+)				
9	2.	EL ENDOTELIO EN LA PATOGÉNESIS DE LA EA-EPI+				
11	3.	CÉLULAS Y MOLÉCULAS IMPLICADAS EN LA DISFUNCIÓN				
		ENDOTELIAL				
12		3.1. Células y moléculas encargadas de la formación, reparación y				
		remodelación del endotelio				
12		3.1.1.Células progenitoras endoteliales (EPC)				
14		3.1.2.Células T angiogénicas (TAng)				
15		3.1.3.Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)				
16		3.2. Moléculas de adhesión celular y quimiocinas implicadas en las				
		propiedades de barrera y adhesión del endotelio				
18		3.2.1.Moléculas de adhesión celular (CAMs)				
21		3.2.2.Proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1)				
21		3.3. Moléculas involucradas en la regulación del tono vascular				
22		3.3.1.Dimetilarginina asimétrica (ADMA)				
23		3.3.2. Endotelina -1 (ET-1)				

II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2

ÍNDICE

III. MATERIAL Y MÉTODOS 1. POBLACIÓN DE ESTUDIO 29 29 1.1. Grupo objeto de estudio: pacientes con EA-EPI+ 30 1.2. Grupos control de individuos 2. MÉTODOS 36 36 2.1. Aislamiento y expansión de EPC mediante cultivos celulares 36 2.1.1. Puesta a punto de la técnica de cultivo celular 37 2.1.2. Técnica de aislamiento, diferenciación y expansión de ECFC 39 2.2. Evaluación del efecto de la concentración de O2 sobre las capacidades funcionales de las EPC aisladas a partir de sangre periférica 40 2.3. Cuantificación celular en sangre periférica por citometría de flujo 40 2.3.1. Puesta a punto de la técnica de citometría de flujo 41 2.3.2. Diseño del panel multicolor para evaluar las moléculas de superficie de las células 43 2.3.3. Técnica de citometría de flujo 2.3.4. Estrategia de gateo 44 45 2.4. Genotipado de SNPs del gen VEGF 46 2.4.1. Selección de SNPs 48 2.4.2. Aislamiento del ADN 48 2.4.3. Amplificación del ADN por qPCR 51 2.4.4. Análisis de calidad del genotipado 52 2.4.5. Determinación de las frecuencias genotípicas, alélicas, de portadores y haplotípicas 52 2.5. Estudios de expresión génica 52 2.5.1. Aislamiento del ARN 53 2.5.2. Concentración del ARN 54 2.5.3. Retrotranscripción del ARN 54 2.5.4. Adquisición y diseño de cebadores 56 2.5.5. Realización de la qPCR

2.5.6. Análisis de calidad de los resultados de expresión génica
2.5.7. Procesamiento de los datos de expresión génica
2.6. Estudio de los niveles proteicos
2.6.1. Cuantificación de proteínas por ELISA
2.6.2. Procesamiento de los datos derivados del ELISA
2.7. Análisis estadístico

IV. RESULTADOS

66 1. RESULTADOS DERIVADOS DEL OBJETIVO 1 66 1.1. Capacidades funcionales de las EPC en cultivo condicionadas por la disponibilidad de O2 68 1.2. Papel de las EPC y las TAng en los procesos patológicos de la vasculopatía y la fibrosis pulmonar en la EA-EPI+ 68 1.2.1. EPC relevantes en el daño endotelial vascular y la fibrosis pulmonar en la EA-EPI+ 69 1.2.2. Disminución de TAng en los procesos fibróticos asociados con la EA-EPI+ 71 1.2.3. Frecuencias celulares asociadas características con demográficas y clínicas de los pacientes con EA-EPI+ 1.3. Relevancia de VEGF en la fisiopatología de la EA-EPI+ 77 77 1.3.1. El gen VEGF involucrado en la EA-EPI+ 1.3.2. VEGF implicado a nivel funcional en el desarrollo de EPI en las EA 91 1.4. Ausencia de correlación entre los biomarcadores implicados en la formación, reparación y remodelación vascular en la EA-EPI+ 2. RESULTADOS DERIVADOS DEL OBJETIVO 2 93 93 2.1. MCP-1 como factor importante en la vasculopatía sistémica subyacente y en el proceso de fibrosis pulmonar en la AR-EPI+ 96 2.2. ICAM-1 como marcador de la vasculopatía a nivel pulmonar y de la fibrosis pulmonar en la EA-EPI+

99	2.3	. VCAM-1	involucrado	en	los	mecanismos	patológicos	de	la
		vasculopa	atía sistémica	suby	acen	ite y de la fibr	osis pulmona	ır de	e la
		AR-EPI+							

- 102 2.4. Selectina-E como marcador de la vasculopatía subyacente y del desarrollo de fibrosis pulmonar en la EA-EPI⁺
- 2.5. Correlación entre los biomarcadores moleculares implicados en las propiedades de barrera y adhesión del endotelio en la EA-EPI⁺

109 3. RESULTADOS DERIVADOS DEL OBJETIVO 3

- 109 3.1. Relevancia de ET-1 en el daño vascular de la EA-EPI⁺ y en la presencia de fibrosis pulmonar en la AR-EPI⁺
- 3.2. ADMA relevante en el daño vascular y en la fibrosis pulmonar en la AR-EPI⁺
- 115 3.3. Ausencia de correlación entre los biomarcadores moleculares involucrados en la regulación del tono vascular en la EA-EPI⁺

117 V. DISCUSIÓN

- Alteración de MCP-1, VCAM-1 y ADMA en presencia de daño vascular a nivel sistémico y pulmonar en la AR-EPI⁺
- 121
 2. Relevancia de EPC, Selectina-E y ET-1 en la vasculopatía a nivel sistémico y pulmonar con un papel crucial en los procesos fibróticos de la EA-EPI⁺.
- **125** 3. TAng, VEGF e ICAM-1 claves en los procesos fibróticos de la EA-EPI⁺
- 128 4. Utilidad de las células y moléculas estudiadas como biomarcadores de la EA-EPI⁺ en la práctica clínica
- **130** 5. Perspectivas del estudio

132 VI. CONCLUSIONES

134 VII. BIBLIOGRAFIA

157 VIII. ANEXOS 157 1. ANEXO I: TABLAS SUPLEMENTARIAS

- 160 2. ANEXO II: PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL
- **195** 3. ANEXO III: OTROS TRABAJOS RELACIONADOS CON LA TESIS DOCTORAL
- 1984. ANEXOIV:OTRASPUBLICACIONESENLASQUEHAPARTICIPADO LA DOCTORANDA

ABREVIATURAS

AAC	Anticuerpos anticentrómero
ACPA	Anticuerpos antipéptidos cíclicos citrulinados
ACR	Colegio Americano de Reumatología
ADMA	Dimetilarginina asimétrica
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ANA	Anticuerpos antinucleares
Anti-SSA/Ro	Anticuerpos anti-antígeno A relacionado con el síndrome de
	Sjögren
Anti-SSB/La	Anticuerpos anti-antígeno B relacionado con el síndrome de
	Sjögren
APC	Aloficocianina
AR	Artritis reumatoide
AR-EPI-	Artritis reumatoide sin enfermedad pulmonar intersticial
AR-EPI+	Enfermedad pulmonar intersticial asociada a artritis
	reumatoide
ARN	Ácido ribonucleico
ATA	Anticuerpos anti-topoisomerasa
ATS	Sociedad Torácica Americana
CAMs	Moléculas de adhesión celular
CCL2	Gen que codifica la proteína quimioatrayente de monocitos-1
CE	Células endoteliales
CMN	Células mononucleares
Ct	Ciclo umbral
CVF	Capacidad vital forzada
DE	Desviación estándar
DLCO	Capacidad de difusión pulmonar del monóxido de carbono
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Deoxinucleósidos trifosfato
EA	Enfermedad autoinmune
EA-EPI-	Enfermedad autoinmune sin enfermedad pulmonar
	intersticial
EA-EPI+	Enfermedad pulmonar intersticial asociada a enfermedad
	autoinmune
EBM	Medio basal endotelial
ECFC	Células endoteliales formadoras de colonias
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGM-2 MV	Medio de crecimiento celular endotelial microvascular 2

EHW	Equilibrio de Hardy-Weinberg
ELISA	Inmunoensayo de unión a enzima
END1	Gen que codifica la endotelina-1
EPC	Células progenitoras endoteliales
EPI	Enfermedad pulmonar intersticial
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ERS	Sociedad Respiratoria Europea
ES	Esclerosis sistémica
ES-EPI-	Esclerosis sistémica sin enfermedad pulmonar intersticial
ES-EPI⁺	Enfermedad pulmonar intersticial asociada a esclerosis
	sistémica
ET	Endotelina
EULAR	Liga Europea contra el Reumatismo
FAMEb	Fármacos antireumáticos modificadores de la enfermedad
	biológicos
FAMEcs	Fármacos antireumáticos modificadores de la enfermedad
	convencionales sintéticos
Fc	Fracción constante de los anticuerpos
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FPI	Fibrosis pulmonar idiopática
FR	Factor reumatoide
GAPDH	Gen que codifica la gliceraldehído -3 fosfato deshidrogenasa
HAP	Hipertensión arterial pulmonar
IC	Intervalo de confianza
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulinas
IL	Interleuquina
IPAF	Neumonía intersticial con rasgos autoinmunes
LD	Desequilibrio de ligamiento
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LES	Lupus eritematoso sistémico
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos-1
NINE	Neumonía intersticial no específica
NIU	Neumonía intersticial usual
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetasa
O ₂	Oxígeno
OR	Razón de ventajas
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino

ABREVIATURAS

PCR	Proteína C reactiva
PE	Ficoeritrina
PFR	Pruebas funcionales respiratorias
PRMT	Proteína-arginina metil transferasa
PS	Personas sanas
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real
rcf	Fuerza centrífuga relativa
R.m	Ratio entre las medias
rpm	Revoluciones por minuto
SAS	Síndrome antisintetasa
SBF	Suero bovino fetal
SELE	Gen que codifica la Selectina-E
SNP	Polimorfismo de un único nucleótido
TAng	Células T angiogénicas
TBE	Tris, borato, EDTA
TCAR	Tomografía computarizada de alta resolución
Tm	Temperatura de fusión
TNF	Factor de necrosis tumoral
UTR	Región no traducida del gen
VCAM-1	Molécula de adhesión celular vascular-1
VEF1	Volumen espiratorio forzado en el primer segundo
VEGF/VEGF-A	Factor de crecimiento endotelial vascular
VEGFR	Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular
VSG	Velocidad de sedimentación globular

I. INTRODUCCIÓN

1. LA ENFERMEDAD PULMONAR INTERSTICIAL ASOCIADA A ENFERMEDADES AUTOINMUNES (EA-EPI+)

Las enfermedades autoinmunes (EA) comprenden un conjunto de condiciones patológicas que afectan al 3-5% de la población. Se caracterizan por un desequilibrio del sistema inmunitario que conlleva a una pérdida de la tolerancia, reconociendo lo propio como ajeno y conduciendo, en última instancia, a la destrucción de los tejidos ¹. Todo ello provoca una serie de trastornos inflamatorios inmunomediados que afectan a distintos órganos, desarrollando enfermedades sistémicas tales como la artritis reumatoide (AR), la esclerosis sistémica (ES) y el síndrome antisintetasa (SAS).

Estos trastornos se manifiestan con un daño estructural y funcional de los órganos afectados, disminuyendo la expectativa y calidad de vida de los pacientes que los padecen ¹. Además, una de las complicaciones más severas a las que se enfrentan estos pacientes es su susceptibilidad a una afectación respiratoria ². En este sentido, la enfermedad pulmonar intersticial (EPI) es la patología pulmonar más común en las EA, constituyendo una de las principales causas de muerte en estos pacientes ^{3–7}.

La EPI engloba a un grupo variado de trastornos del parénquima pulmonar que comparten características funcionales, clínicas, radiológicas y anatomopatológicas y son causados por la fibrosis e inflamación de las paredes de los alvéolos y el engrosamiento del intersticio que los rodea. Dicha patología suele evolucionar hacia la pérdida progresiva de las unidades funcionales alvéolo-capilares que da lugar a la insuficiencia respiratoria ^{8,9}. Así, la EPI se puede clasificar en idiopática, siendo la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) la más frecuente y severa, o de causa conocida, como la asociada a una EA subyacente (EA-EPI⁺) ^{2,7–9}.

1.1. Patogénesis de la EA-EPI+

La etiología de la EA-EPI⁺ permanece aún desconocida ^{7,10-14}. Las teorías actuales sugieren que el desarrollo de una EA requiere una predisposición genética y la exposición a factores ambientales que activan las vías inmunes que conducen a la inflamación ^{1,12,15,16}. Dicho proceso inflamatorio sistémico podría estar provocando la entrada de células inflamatorias en el espacio intersticial y alveolar generando un daño endotelial y epitelial. Todo ello promueve el reclutamiento, la activación y la proliferación de fibroblastos y miofibroblastos pulmonares. Además, los fibroblastos residentes en los tejidos, las células epiteliales y las células endoteliales (CE) adquieren un fenotipo de miofibroblastos. Dichos miofibroblastos activados constituyen un impulsor de la fibrosis ya que sintetizan una gran cantidad de colágeno fibrilar y proteínas no estructurales en la matriz extracelular dando lugar a una remodelación descontrolada de la matriz e invadiendo el pulmón con células que promueven la fibrosis. Consecuentemente, se desarrolla la fibrosis pulmonar caracterizada por cicatrización del tejido pulmonar e insuficiencia orgánica (**Figura 1**) ^{10,11,13–17}.



Figura 1. Representación esquemática del proceso de fibrosis pulmonar. (a) Tejido pulmonar sano con una arquitectura pulmonar normal que permite el intercambio gaseoso a través de la barrera alveolo-capilar; (b) Tejido pulmonar fibrótico originado por el daño endotelial y epitelial. Se representan regiones fibróticas y focos fibroblásticos formados por fibroblastos y miofibroblastos que impiden el intercambio gaseoso alveolo-capilar (Adaptada de Trends Mol Med. 2016 Apr;22(4):303-316).

Generalmente la EPI se manifiesta con posterioridad al diagnóstico de las EA. Sin embargo, en ocasiones la EPI constituye la presentación inicial de las mismas ^{3–6,10,12,13,15,16}. En este sentido, se ha propuesto que el daño pulmonar puede llegar a desencadenar una inflamación local induciendo la expresión de autoantígenos que conduce a la generación de autoanticuerpos en el pulmón y, en último lugar, al desarrollo de una EA subyacente ^{10,11,13–17}.

1.2. Diagnóstico y pronóstico de la EA-EPI+

A pesar de los avances en el conocimiento de la EA-EPI⁺ en los últimos años, su diagnóstico continúa constituyendo un desafío en la práctica clínica ^{2–7,10,18,19}.

Por un lado, la detección precoz de la afectación pulmonar en las EA es fundamental para el inicio de una terapia adecuada, dado que el daño pulmonar puede llegar a ser irreversible en el momento de la aparición de los síntomas respiratorios ³⁷. Entre las herramientas clínicas claves para su diagnóstico, destacan las pruebas funcionales respiratorias (PFR) y la tomografía computarizada de alta resolución (TCAR) de tórax ^{3,6,10}. En cuanto a las PFR, los parámetros más utilizados son la capacidad vital forzada (CVF), el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (VEF1) y la capacidad de difusión pulmonar del monóxido de carbono (DLCO). En relación con las imágenes obtenidas por TCAR, los pacientes con EA-EPI⁺ presentan predominantemente un patrón radiológico de neumonía intersticial no específica (NINE), aunque el patrón de neumonía intersticial usual (NIU) también es frecuente ^{3,6,10}.

Por otro lado, el diagnóstico de un trastorno autoinmune en el contexto de una EPI es igualmente importante, ya que afecta al manejo, tratamiento y pronóstico de la enfermedad. Para ello, es fundamental identificar los autoanticuerpos específicos de cada EA, entre los que se incluyen el factor reumatoide (FR), los anticuerpos antipéptidos cíclicos citrulinados (ACPA) y los anticuerpos antinucleares (ANA) ^{2,4,8}.

Actualmente, el diagnóstico de una EA-EPI⁺ precisa de un abordaje multidisciplinar en el que participan neumólogos, reumatólogos, radiólogos, patólogos

e inmunólogos, dada la dificultad de diferenciar la EA-EPI⁺ de la FPI, principalmente ^{2–} 7,10,18,19

El pronóstico de los pacientes con EA-EPI⁺ está generalmente asociado con el patrón radiológico que presentan, siendo el patrón NIU el de peor pronóstico ^{4,6,7}. Este patrón es el más frecuente en los pacientes con FPI ^{4-6,20}. Sin embargo, se ha descrito que el patrón NIU asociado a una EA tiene un mejor pronóstico que en el contexto de una FPI ⁶.

En base a lo anteriormente mencionado, resulta fundamental indagar en los mecanismos fisiopatológicos de la EA-EPI⁺.

1.3. La enfermedad pulmonar intersticial asociada a la artritis reumatoide (AR-EPI+)

La AR es una EA de causa desconocida y de evolución crónica con una prevalencia de entre el 0,5-1% ^{5,11,21,22}. Esta patología afecta fundamentalmente a las articulaciones provocando una sinovitis persistente, una inflamación sistémica y la generación de autoanticuerpos como el FR y ACPA que conducen finalmente a la destrucción progresiva del cartílago y el hueso ^{15,17,21,23}. Esta enfermedad se ha asociado con aterosclerosis acelerada generalizada precedida por disfunción endotelial y rigidez arterial. Una de las mayores complicaciones de la AR son las manifestaciones extraarticulares que están presentes en casi el 50% de los pacientes ^{3,10,17,22}.

Las complicaciones pulmonares constituyen una de las manifestaciones más frecuentes desarrollándose en el 10-20% de los pacientes ^{3,5,6,10,11,15,21,24,25}. Es tal la importancia de las mismas, que hay una clara evidencia de un impacto devastador de las complicaciones pulmonares en la supervivencia de los pacientes con AR siendo responsables del 18% de la mortalidad en estos pacientes y constituyendo, por lo tanto, una de las principales causas de muerte ^{5,15,21,24}. La mayoría de las enfermedades pulmonares asociadas a la AR ocurren en los 5 primeros años desde el comienzo de la enfermedad, apareciendo en el 10-20% de los casos al inicio de la AR y en el 14% en menos de 2 años de evolución de la enfermedad ^{17,21}. De hecho, en algunos casos se ha

visto que la enfermedad pulmonar puede preceder al desarrollo de la AR ^{3,6,11,15,20,22}. Los síntomas respiratorios en la AR pueden deberse a una variedad de condiciones que afectan al parénquima, la pleura, las vías respiratorias o la vasculatura. No obstante, la EPI es la manifestación pulmonar predominante en estos pacientes impactando significativamente tanto en su calidad de vida como en su pronóstico general ^{5,10,11,15,17,21,22,25–27}. Su desarrollo provoca que la supervivencia media de los pacientes con AR-EPI⁺ sea inferior al 40% a los 5 años, estando significativamente reducida en relación con aquellos pacientes con AR sin afectación pulmonar ^{5,11,15,17,19,21,22,25,27,28}.

Ciertos factores pueden contribuir al riesgo a desarrollar AR-EPI⁺, destacando la edad avanzada, el sexo masculino, el hábito tabáquico, la enfermedad articular grave y erosiva, títulos altos de FR y ACPA, disminución de DLCO y presencia de otras manifestaciones clínicas ^{10,11,15,17,19,21,22,24–27}.

En relación a los patrones radiológicos, el 40-62% de los pacientes con AR-EPI⁺ presentan un patrón NIU, mientras que el patrón NINE se observa en el 11-32% de los casos ^{3,6,10,15,17,19-22,26-29}.

El tratamiento de los pacientes con AR-EPI⁺ con agentes antiinflamatorios y/o inmunosupresores, independientemente del patrón de fibrosis que presenten, continúa siendo la terapia de primera línea ^{3,11,15,17,21,30-32}. Los corticoides, los inmunosupresores convencionales (azatioprina y el micofenolato de mofetilo), así como terapias biológicas como rituximab o abatacept son las opciones terapéuticas más frecuentemente utilizadas en estos pacientes ^{3,11,15,30,33}.

En general, la AR-EPI⁺ continua siendo un reto para los clínicos debido a su heterogeneidad y el curso variable de la enfermedad ¹⁵. Esto hace evidente la importancia de tener herramientas adicionales para poder identificar a estos pacientes con mayor precisión.

1.4. La enfermedad pulmonar intersticial asociada a la esclerosis sistémica (ES-EPI+)

La ES es una enfermedad del tejido conectivo, crónica y progresiva, definida clínicamente por una afectación de la piel. Se caracteriza por un desequilibrio inmunológico, la aparición de fibrosis y el desarrollo de alteraciones vasculares ^{10,12–14,16,21,34–39}. Se puede clasificar según el grado de afectación de la piel en ES cutánea limitada y ES cutánea difusa. Esta última se caracteriza por una fibrosis rápida de la piel y otros órganos internos ^{3,5,12,13,37,38}. En este sentido, el pulmón constituye el órgano más comúnmente afectado en la ES, especialmente en la forma difusa, pudiendo estar comprometidas todas las partes del tracto respiratorio, incluyendo el parénquima, la vasculatura y la musculatura. Así, la EPI aparece en el 85% de los casos de ES y constituye la principal causa de mortalidad en estos pacientes ^{5,6,12–14,16,19,21,34,35,37–39}.

El riesgo de desarrollar EPI en los pacientes con ES se ha asociado a una serie de factores entre los que se incluyen el sexo masculino, la edad avanzada, la etnia afroamericana, la menor duración de la enfermedad, la presencia de anticuerpos antitopoisomerasa I (ATA) (anti-Scl-70) y/o ausencia de anticuerpos anticentrómero (AAC) y una reducción significativa de la CVF y DLCO ^{12,13,16,19,38,39}.

El desarrollo o la progresión de la EPI puede ocurrir en cualquier momento del curso de la ES, aunque se ha visto que el riesgo de desarrollar EPI es mayor en los estadios tempranos, durante los 3-4 primeros años, pudiendo llegar a ser la primera manifestación clínica de la enfermedad ^{12,13,38,39}. Además, los pacientes pueden llegar a ser asintomáticos. Sin embargo, el pronóstico de los pacientes con ES-EPI⁺ puede ser grave y se estima que aproximadamente el 15% de ellos experimentarán una EPI rápidamente progresiva ³⁷. Por ello, los pacientes con ES deben recibir una evaluación clínica completa con el fin de garantizar la identificación temprana de una EPI ³⁸.

En cuanto a los patrones radiológicos, NINE es el más común en la ES-EPI⁺ apareciendo en el 76% de los pacientes, mientras que el patrón NIU se encuentra en el 11% de los casos ^{3,6,12,13,16,19-21,35,38,39}. Actualmente, el tratamiento de la ES-EPI⁺ se centra en terapias inmunosupresoras ^{12,14,31,35,38,39}. Asimismo, los corticoides representan uno de los fármacos de primera línea utilizados en la terapia de la ES-EPI⁺ ^{3,12,31}. Además, recientemente, se ha aprobado la utilización del antifibrótico Nintedanib ^{14,34,39,40}. En último término, los pacientes con ES-EPI⁺ que no han respondido al tratamiento deben ser considerados como candidatos para un trasplante de pulmón ^{12,34,35,38,39}.

En resumen, existe la necesidad de una detección temprana y sistemática de los pacientes con ES-EPI⁺ para identificar a aquéllos con alto riesgo de progresión de la enfermedad.

1.5. La enfermedad pulmonar intersticial asociada a otras enfermedades autoinmunes (otras EA-EPI⁺)

Además de la AR y la ES, la EPI se puede presentar en pacientes con otras EA, como el SAS y la neumonía intersticial con rasgos autoinmunes (IPAF), entre otras ^{2–5,10}. En particular, la EPI se presenta hasta en el 90% de los pacientes con SAS ^{7,41}. Los pacientes con IPAF presentan características clínicas, serológicas y/o radiológicas sugestivas de EA, pero éstas no cumplen los criterios de diagnóstico establecidos para cada EA ^{2–6,8,10}.

2. EL ENDOTELIO EN LA PATOGÉNESIS DE LA EA-EPI+

El endotelio, principal encargado de la homeostasis vascular, es un órgano dinámico, heterogéneo y diseminado, que tiene funciones secretoras, sintéticas, metabólicas e inmunológicas, y cuya alteración es determinante en el curso de algunas enfermedades. Se trata de un órgano altamente adaptativo en respuesta a las distintas alteraciones que puedan ocurrir a nivel extracelular ^{42–45}. La disfunción o activación endotelial normalmente comienza como la respuesta fisiológica a un estímulo que finalmente se vuelve excesiva o descontrolada por un defecto en la regulación. Así, el endotelio es incapaz de realizar sus funciones fisiológicas, y da lugar a un daño endotelial vascular. Este estado se caracteriza por el desequilibrio en la biodisponibilidad de sustancias activas de origen endotelial, lo cual predispone a la inflamación, la vasoconstricción y al incremento de la permeabilidad vascular y promueve el desarrollo de aterosclerosis, agregación plaquetaria y trombosis ^{42–45}.

Las enfermedades inflamatorias autoinmunes, tales como la AR y la ES, se han asociado con un daño endotelial vascular subyacente, a menudo en etapas tempranas del curso de la enfermedad ^{46–57}. Los factores de riesgo cardiovascular tradicionales, así como la inflamación sistémica, a través de la acción de quimioquinas y moléculas de adhesión celular (CAMs), entre otros, activan directa e indirectamente las CE, contribuyendo a una disfunción endotelial acelerada ^{54,55}.

Además, el endotelio juega un papel central en la regulación vascular pulmonar por lo que los procesos de reparación vascular contribuyen al desarrollo de la disfunción endotelial y al subsecuente inicio y progresión de la EPI ⁵⁸. De hecho, la activación del endotelio pulmonar se ha descrito como uno de los requisitos para la generación de lesiones pulmonares ⁵⁹. En este sentido, se debe tener en cuenta que, a diferencia de otros órganos en los que el endotelio representa la principal barrera, el pulmón tiene una doble barrera epitelial-endotelial. Bajo condiciones patológicas, la pérdida de la integridad en la barrera endotelial es un requisito previo para el desarrollo del edema intersticial, y éste es una consecuencia de la pérdida de la integridad del epitelio ⁶⁰. Por lo tanto, el mayor conocimiento de los mecanismos implicados en la disfunción endotelial en los pacientes con EA-EPI⁺ puede ayudar a dilucidar la fisiopatología de la enfermedad.

3. CÉLULAS Y MOLÉCULAS IMPLICADAS EN LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

El endotelio vascular es un órgano que juega un papel activo y crítico en una multitud de procesos fisiológicos debido a su capacidad para detectar y responder a estímulos mecánicos y bioquímicos. Dichos procesos incluyen formación, reparación y remodelación de los vasos sanguíneos (angiogénesis y vasculogénesis), control del tráfico celular mediante sus propiedades de barrera y adhesión, y regulación del tono vascular (**Figura 2**) ^{42–45,55,61}. La alteración de estos procesos conduce a la disfunción endotelial y representa un paso clave en el inicio de las enfermedades inflamatorias sistémicas. Sin embargo, aunque existe un gran interés en la identificación de ellos sigue sin estar clara ^{50,51,55–57,62–66}. Además, no existe un único marcador de activación endotelial, por lo que resulta interesante evaluar el endotelio en todas sus facetas para identificar marcadores celulares y moleculares que aporten un mayor conocimiento de la patogénesis de la EA-EPI⁺.



Figura 2. Procesos fisiológicos en los que el endotelio juega un papel crítico en los que se detallan las células y moléculas estudiadas.

3.1. Células y moléculas encargadas de la formación, reparación y remodelación del endotelio

La formación, reparación y remodelación endotelial son fenómenos biológicos de suma importancia en el control de la salud y las enfermedades. Un desequilibrio entre la expresión de las CE circulantes y los mecanismos encargados de la reparación endotelial contribuye a la etiología de la disfunción endotelial y a la patogénesis y progresión de varias patologías ^{42,45,67}.

3.1.1.Células progenitoras endoteliales (EPC)

Existe una población de CE descritas por Asahara y cols. denominadas células progenitoras endoteliales (EPC) que se encargan del mantenimiento vascular 68. Estas células poseen un gran potencial de crecimiento y son capaces de formar colonias 68. Las EPC proceden principalmente de la médula ósea. Se han señalado diferentes precursores de las EPC entre los que se incluyen los hemangioblastos, los precursores no hematopoyéticos, las células monocíticas o las células tronco-residentes de los tejidos 69-⁷¹. Estas células participan en la vasculogénesis durante el desarrollo embrionario y son requeridas en la angiogénesis después del nacimiento, estando presentes también en la vida adulta. Residen en el endotelio vascular y pueden aparecer, de forma esporádica, en la circulación sanguínea representando cerca del 0,01%-0,0001% de la fracción mononuclear en la sangre periférica 72-74. En condiciones fisiológicas, las EPC se encuentran en el microambiente de la médula ósea. En cambio, en condiciones patológicas, una fuente quimiotáctica de factores proangiogénicos procedente de focos de daño endotelial atrae a las EPC, las cuales se reclutan de la médula ósea y circulan por el flujo sanguíneo para migrar a través del endotelio hacia las zonas dañadas. Una vez allí, proliferan y se diferencian en CE maduras con el fin de reparar el daño vascular ^{69,73,75,76}. No obstante, las EPC pueden desempeñar su papel de forma directa, mediante su integración en la pared en crecimiento de los vasos sanguíneos preexistentes o de forma paracrina, a través de la liberación de factores angiogénicos. Por ello, las EPC se caracterizan por desempeñar una importante función en la reparación vascular y en la formación de nuevos vasos 73,76,77.

Las EPC son un grupo heterogéneo de células que se diferencian entre ellas según el momento en el que aparecen en cultivo encontrándose dos tipos: las EPC tempranas y las EPC tardías. Todos los tipos de EPC contribuyen a la promoción y regulación de la angiogénesis pero las EPC tardías, llamadas células endoteliales formadoras de colonias (ECFC), muestran todas las características de un progenitor endotelial, reflejando una morfología endotelial y expresando marcadores endoteliales, además de ser altamente proliferativas y manifestar capacidad de autogeneración y formación de vasos ^{70,72–75,77–86}.

La mayor parte de los estudios identifican las EPC mediante la técnica de citometría de flujo debido a que se caracterizan por coexpresar en su superficie marcadores que reflejan características de células madre (CD34), inmadurez (CD133) y compromiso endotelial (CD309 o receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR)-2). En este sentido, se ha sugerido que la expresión de algunas de estas moléculas puede ser compartida con otras células como las hematopoyéticas. Para una mejor caracterización de las EPC, algunos autores han descrito que muestran una expresión muy baja del marcador panleucocitario CD45 característico de las células hematopoyéticas, debiendo incluirse entre los antígenos de superficie que identifican a las EPC ^{68,87-94}. No obstante, los marcadores empleados para caracterizar estas células constituyen un tema de controversia y probablemente son la principal causa de las discrepancias existentes entre los diferentes estudios ya que existe una falta de una definición clara y de protocolos comunes para su identificación.

Así, las EPC han sido de gran interés durante las últimas décadas dada su relevante aplicación clínica, diagnóstica y terapéutica. Las variaciones en su número y función se han asociado con diferentes condiciones patológicas tales como enfermedades cardiovasculares, respiratorias, inflamatorias y autoinmunes, entre otras ^{46,71,75,85,95-115}. Todo ello ha llevado a que las EPC sean consideradas como marcadores de daño vascular. En particular, las EPC se han visto implicadas en numerosas EA tales como la AR y la ES, así como en diversas complicaciones pulmonares ^{96,107,110,115-134}. Sin embargo, existe una gran controversia sobre el comportamiento de estas células ya que el incremento de las EPC se ha asociado con el desarrollo de AR, ES o FPI mientras que otros autores han encontrado una disminución o ninguna alteración de las EPC en estas

patologías ^{96,107,116-127,129-134}. Además, se desconoce el papel que juegan las EPC en la patogénesis de la EA-EPI⁺.

3.1.2. Células T angiogénicas (TAng)

En 2007, Hur y cols. describieron una nueva subpoblación de linfocitos T, denominadas células T angiogénicas (TAng), con capacidad de promover la proliferación y reparación endotelial ¹³⁵. Estas células se han encontrado en el centro de las colonias de las EPC, por lo que parecen colaborar con ellas en sus funciones de reparación vascular (**Figura 3**) ^{135,136}. Las TAng exhiben una gran cantidad de propiedades angiogénicas y tienen la capacidad de promover la formación de nuevos vasos mediante una acción paracrina indirecta^{67,135,137,138}. Se ha descrito que las TAng se caracterizan por presentar en su membrana principalmente los marcadores CD3 (un componente asociado al receptor de las células T) y CD31 (un marcador del linaje endotelial ¹³⁸), así como el marcador CD184 (receptor para el factor derivado de células estromales), pudiéndolas identificar mediante citometría de flujo ^{136,137,139,140}.

Las TAng se han relacionado con el daño endotelial característico de diferentes condiciones patológicas, encontrándose alteradas en enfermedades cardiovasculares, EA tales como el lupus eritematoso sistémico (LES) y el síndrome de Sjögren, así como la diabetes mellitus tipo II ^{67,118,136,140-146}. Sin embargo, a pesar de que las TAng se han estudiado en la AR y la ES ^{36,143,147-149}, hasta el momento no hay constancia de que se haya evaluado su papel en el desarrollo de EPI en las EA.

I. INTRODUCCIÓN



Figura 3. Cooperación entre las EPC y las TAng en los procesos de reparación endotelial en respuesta al daño endotelial vascular. Las EPC son reclutadas de la médula ósea y migran a los focos de daño donde se diferencian en CE participando en la angiogénesis y vasculogénesis. Las TAng promueven la formación de vasos mediante la liberación de factores proangiogénicos.

3.1.3. Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF o VEGF-A) es el estimulador más importante y potente de la angiogénesis ^{60,150,151}. Está codificado por el gen *VEGFA* localizado en el cromosoma 6p21.3, altamente polimórfico y en el cual se han descrito hasta más de 30 polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) que explican la variabilidad de dicho gen ^{60,150,151}.

VEGF se expresa principalmente en los pulmones, los riñones y el bazo ⁶⁰. En concreto, se ha visto que el epitelio alveolar es la fuente principal de VEGF, aunque las CE, las células del músculo liso, los macrófagos y los fibroblastos también producen VEGF ^{96,151}.

Si bien el principal desencadenante de la inducción de VEGF es la hipoxia, se conocen otros estímulos que los inducen como son las especies reactivas de oxígeno (O₂),

la inhibición del óxido nítrico (NO), los factores de crecimiento y varias citoquinas inflamatorias ^{60,96,150,152,153}.

VEGF ejerce un papel crucial sobre las CE, ya que desempeña numerosas funciones, entre ellas destacan: promover la proliferación y migración de las CE; inducir la tubulogénesis; aumentar la permeabilidad vascular y promover la supervivencia de las CE mediante la inhibición de la apoptosis. En la angiogénesis patológica, VEGF promueve la movilización de células inflamatorias (macrófagos y granulocitos, entre otros) al sitio de la lesión, manteniendo el proceso inflamatorio local e induciendo la síntesis de factores proangiogénicos ^{60,150}.

El impacto de VEGF en diversas patologías se ha evaluado a distintos niveles moleculares. En este sentido, numerosos estudios avalan que determinados SNPs influyen en la susceptibilidad a distintas EA, tales como la AR, y a enfermedades pulmonares, principalmente la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y la hipertensión arterial pulmonar (HAP) ^{154–161}. A nivel proteico, VEGF contribuye a la fibrogénesis, y se ha propuesto como un posible marcador pronóstico en los pacientes con neumonías intersticiales idiopáticas ^{96,151,162–165}. Por otro lado, se ha evidenciado una relación entre VEGF y múltiples EA tales como la ES y la AR ^{57,62,64,66,96,155,166–175}. Los hallazgos de VEGF en el desarrollo de EPI en las EA son escasos ya que, en su mayoría, se centran en el estudio de la HAP en la ES, el LES, la enfermedad mixta del tejido conjuntivo o la poliangeítis microscópica ^{176–179}.

Por ello, dado que la información que disponemos hoy en día de VEGF en la EA-EPI⁺ es limitada, y teniendo en cuenta su importante implicación en los procesos típicos de la patogénesis de la EA-EPI⁺, es crucial una mayor investigación en este campo.

3.2. Moléculas de adhesión celular y quimioquinas implicadas en las propiedades de barrera y adhesión del endotelio

En una situación inflamatoria el endotelio responde reclutando leucocitos a los sitios inflamados a través de la secreción de citoquinas proinflamatorias. El tráfico de los leucocitos hacia los tejidos está regulado por la combinación de las CAMs en el endotelio
y las quimioquinas en el microambiente. Los estímulos del microambiente regulan la exposición de dichas moléculas mediando las interacciones CE-CE, CE-matriz, monocitos-CE, plaquetas-CE y leucocitos-CE ^{44,45,180–182}.

Las etapas de la migración de los leucocitos en respuesta a citoquinas proinflamatorias implican (**Figura 4**):

1) Contacto y rodamiento: se inicia por una interacción débil intermitente de los leucocitos con el endotelio mediada por las selectinas, entre ellas la Selectina-E ^{44,55,182–185}.

2) Adhesión: se produce un rápido aumento de la afinidad de las integrinas de los leucocitos por las CAMs de las CE que incluyen la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) y la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1), desencadenando una adhesión firme leucocito-endotelio. Además, las CAMs se desprenden del endotelio vascular y llevan a cabo sus funciones en forma soluble en la circulación ^{44,55,182-185}.

3) Transmigración endotelial: la unión de las integrinas de alta afinidad por los leucocitos activa señales dentro de las CE que permiten el paso de los mismos a través del endotelio. La extravasación de los leucocitos a través del endotelio está estimulada por un gradiente quimiotáctico de citoquinas destacando la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1) ^{44,55,182-185}.



Figura 4. Representación de las etapas que implican la migración de los leucocitos a los tejidos dañados en respuesta a citoquinas proinflamatorias.

3.2.1. Moléculas de adhesión celular (CAMs)

Las CAMs juegan un papel importante en los procesos de embriogénesis, crecimiento y diferenciación celular, e inflamación, siendo reguladoras principales de la función celular, la integridad tisular y la homeostasis. Estas moléculas han sido clasificadas, basándose en su estructura, en tres grupos principales: la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig), las selectinas y las integrinas ^{180,186–188}.

• Selectina-E

La Selectina-E, también denominada molécula de adhesión de leucocitos endoteliales, está codificada por el gen *SELE* localizado en el cromosoma 1q22q25 ¹⁸⁹. Esta proteína se ha descrito como la selectina más específica para la activación endotelial y se expresa en las CE. Sin embargo, dicha expresión no es constitutiva, sino que está estimulada por moléculas proinflamatorias tales como el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , interleuquina (IL)-1 y el lipopolisacárido bacteriano. Una vez estimulada, la Selectina-E reconoce motivos específicos de carbohidratos encontrados en las estructuras de las glicoproteínas y glicolípidos de la superficie de las CE y células tumorales. La interacción de esta molécula con sus ligandos media la unión inicial de los leucocitos en circulación a la pared del vaso a través de una adhesión reversible que permite que las células se desplacen en la dirección del flujo sanguíneo ^{44,180,184–186,190–193}.

La Selectina-E no solo se encuentra unida a la membrana, sino que debido a una escisión enzimática, puede presentarse soluble en circulación, siendo proporcional la concentración de ambas formas. La liberación a la circulación de la Selectina-E soluble es exclusiva del endotelio ya activado ^{190,192}.

Todo ello nos indica que la Selectina-E está estrechamente asociada con la inflamación, de manera que se han encontrado niveles elevados de esta molécula en pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas tales como la AR y la ES ^{53,54,190,194–206}. Asimismo, se ha reportado que la Selectina-E se asocia con la aparición de complicaciones pulmonares en la ES y en enfermedades respiratorias tales como la EPI, focalizándose los estudios principalmente en la FPI ^{183,184,200,207–212}.

No obstante, aún queda mucho por investigar sobre el papel de la Selectina-E en la EA-EPI⁺.

• Molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1)

ICAM-1 es una glicoproteína que pertenece a la superfamilia de las Ig y está codificada por el gen *ICAM1* localizado en el cromosoma 19p13.2p13.3¹⁸⁸. ICAM-1 unida a la membrana se puede liberar a través de su escisión proteolítica por las metaloproteinasas de la matriz dando lugar a su forma soluble ^{187,188,195,213}.

Esta molécula se expresa a un nivel basal bajo en las CE, las células inmunitarias y las células epiteliales. Sin embargo, dicha expresión aumenta en respuesta a la estimulación inflamatoria. Una vez estimulada, ICAM-1 regula el tráfico de leucocitos mediando la adhesión firme de estas células a las CE de la pared del vaso, guiando su trasvase a través de la capa endotelial ¹⁸⁷.

Por lo tanto, ICAM-1 se ha convertido en un regulador principal de muchas funciones tisulares esenciales en condiciones patológicas, siendo de interés clínico y terapéutico. Los estudios previos indican que los niveles de ICAM-1 aumentan con la inflamación en una variedad de mecanismos inflamatorios e inmunomediados demostrando que promueve respuestas tanto proinflamatorias como antiinflamatorias ^{53-55,187,188}. Esto apoya su implicación en las EA como la AR o la ES ^{53-55,180,186,195,198,214-217}. Además, se ha descrito que ICAM-1 juega un papel importante en otras complicaciones, encontrando altos niveles de ICAM-1 en el suero de pacientes con patologías respiratorias como la EPOC y el asma ^{218,219}. Aunque algunos trabajos se han centrado en el estudio de ICAM-1 en la EPI o en el desarrollo de complicaciones pulmonares en la ES ^{195,207,209,211,216,217,220-224}, aún no se ha establecido un papel claro de esta molécula en la EA-EPI⁺.

• Molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1)

VCAM-1 es otra glicoproteína de la superfamilia de las Ig, codificada por el gen *VCAM1* que está localizado en el cromosoma 1p21.2. Esta proteína se puede encontrar en forma unida a la membrana o soluble en circulación ²²⁵.

VCAM-1 fue inicialmente identificada como una glicoproteína de la superficie de las CE. Sin embargo, la exposición a altos niveles de inflamación conduce a una expresión de VCAM-1 en la superficie de otras células, incluidos los macrófagos tisulares y las células dendríticas. La expresión de VCAM-1 está inducida por citoquinas proinflamatorias, altos niveles de especies reactivas de O₂, la lipoproteína de baja densidad (LDL) oxidada, el 25-hidroxicolesterol, los altos niveles de glucosa o los agonistas del receptor tipo Toll, entre otros. Tras su estimulación, la función principal de VCAM-1 consiste en regular la adhesión de los leucocitos al endotelio y su migración transendotelial ^{181,182,209}.

Por lo tanto, VCAM-1 es un receptor clave en muchos procesos inflamatorios ^{53–55,181,182,198,218,225}. En este contexto, esta molécula se ha asociado estrechamente con la patogénesis de la AR, observándose en la mayoría de los casos niveles más altos en estos pacientes que en los individuos sanos ^{53–55,181,201,202,226–229}. De igual manera, los pacientes con ES presentan niveles más altos de VCAM-1, así como los pacientes con LES u otras enfermedades inflamatorias inmunomediadas ^{53,181,182,196,204,217,228}. Es tal la importancia de esta glicoproteína, que estudios *in vivo* han demostrado que el bloqueo de VCAM-1 posee un efecto beneficioso al inhibir el reclutamiento de células inmunitarias en patologías tales como la AR, el asma, la dermatitis atópica, la enfermedad inflamatoria intestinal o la esclerosis múltiple ¹⁸². A su vez, esta proteína se ha considerado importante en la patofisiología de ciertas enfermedades respiratorias como la EPI ^{209,230,231}.

Los estudios sobre VCAM-1 se han dirigido principalmente a elucidar su implicación en complicaciones pulmonares, fundamentalmente en el desarrollo de HAP en pacientes con ES ^{196,211,217,222}. Sin embargo, pocos trabajos se han centrado en la EA-EPI⁺, por lo que es de especial relevancia indagar el papel de VCAM-1 en su fisiopatología.

20

3.2.2. Proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1)

MCP-1 es una quimioquina clave en la regulación de la migración y la infiltración de los monocitos y está codificada por el gen *CCL2* localizado en el cromosoma 17q11.2q21.1 ^{214,232-235}.

MCP-1 está producida por muchos tipos de células incluyendo las CE, los monocitos, los fibroblastos y los linfocitos B y T, siendo los monocitos y macrófagos su principal fuente. Esta proteína se expresa como resultado de la exposición de las células a citoquinas proinflamatorias tales como IL-1, IL-4, TNF- α o interferón (IFN)- γ , factores de crecimiento como VEGF, especies reactivas de O₂, LDL oxidada y complejos inmunes. En cambio, otros factores como el factor de crecimiento transformante β y el ácido retinoico reprimen su expresión ^{214,232-235}.

La activación específica de MCP-1 por la unión a su receptor en los leucocitos da como resultado un aumento de la afinidad de la integrina regulando la migración e infiltración de estas células hacia focos de inflamación, participando así en la inmunidad innata. Las evidencias actuales demuestran que también participa en la inmunidad adaptativa controlando la diferenciación de los linfocitos T^{214,232-235}.

Dado su papel en la inflamación y la inmunidad, MCP-1 está involucrado en la patología de numerosas EA, entre las que se incluyen la AR y la ES o enfermedades respiratorias como el asma ^{57,62–64,198,199,232,234–245}. Por otra parte, se ha sugerido que MCP-1 regula las propiedades profibróticas en los pacientes con ES, induciendo la fibrosis mediante una acción directa en los fibroblastos o indirecta, estimulando la liberación de citoquinas en los leucocitos reclutados en los tejidos dañados ^{63,64,242,243}. Estas características profibróticas de MCP-1 se han observado también en otros estudios centrados en la FPI ^{246,247}. Aunque ya se han realizado algunos trabajos en la EA-EPI⁺

3.3. Moléculas involucradas en la regulación del tono vascular

El endotelio vascular desempeña un papel central en el mantenimiento del tono vascular fisiológico colaborando en el equilibrio del suministro de O₂ tisular y la demanda metabólica. Esta función implica la liberación por parte de las CE de sustancias vasodilatadoras como el NO y vasoconstrictoras como las endotelinas (ET) ^{44,251}.

El NO se forma por acción de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS) a partir del aminoácido precursor L-arginina. Una vez sintetizado difunde hacia las células musculares lisas y produce la relajación del músculo liso. Además de sus potentes efectos vasodilatadores, el NO actúa como un inhibidor endógeno de la agregación plaquetaria, inhibe la adhesión de monocitos y leucocitos al endotelio vascular sano, y la formación de placas. Además, el NO reduce la liberación vascular de radicales superóxido e inhibe la oxidación de la LDL, todo lo cual está relacionado con procesos inflamatorios y citotóxicos ^{44,45,55,251,252}. Los niveles circulantes de nitritos y proteínas nitrosiladas reflejan, en parte, la generación endotelial de NO, pero son difíciles de medir y es posible que no siempre representen la producción endotelial de NO. En este sentido, la dimetilarginina asimétrica (ADMA) es un antagonista competitivo de NOS que se encuentra en circulación y se ha considerado como un buen marcador del tono vascular ⁴⁴.

3.3.1.Dimetilarginina asimétrica (ADMA)

ADMA es un componente natural de la sangre que se produce por la proteólisis de proteínas con residuos de L-arginina metilados. La metilación se lleva a cabo por la transferencia de uno o más grupos metilo de la S-adenosilmetionina a residuos de L-arginina de las proteínas a través de la enzima proteína-arginina metil transferasa (PRMT) tipo I (**Figura 5**). Esta enzima está codificada por el gen *PRMT1* localizado en el cromosoma 19q13.33^{251,253–255}.

ADMA es una molécula endógena que exhibe homología estructural con el aminoácido L-arginina compitiendo con éste por la unión al sitio activo de NOS e inhibiendo la reacción de formación de NO. Además, ADMA puede desacoplar NOS cambiando el equilibrio de la generación de NO hacia el lado de la producción de superóxido ^{251,252,254-256}.

22



Figura 5. Esquema de la síntesis de ADMA.

En el campo de la reumatología, se ha demostrado una asociación de ADMA con diferentes EA ^{53–55,255,257}. En este sentido, ADMA ha mostrado una especial contribución en el desarrollo de la AR al encontrarse aumentada en los pacientes con esta patología ^{53–55,254,255,258–263}. Igualmente, se ha reportado una asociación de ADMA con la ES ^{254,255,264–} ²⁶⁶. En este caso, los niveles de ADMA se han encontrado notablemente elevados en pacientes con ES que presentaban complicaciones pulmonares, principalmente la HAP ^{264,266–269}. De hecho, se considera que ADMA contribuye a la fibrosis del pulmón estando asociada con enfermedades pulmonares como la HAP o la FPI ^{252,253,270–272}. A pesar de ello, no está clara la contribución de ADMA en la EA-EPI⁺.

3.3.2. Endotelina -1 (ET-1)

ET-1 es el vasoconstrictor endógeno más potente, siendo su fuente principal de producción el endotelio vascular ^{45,273–278}. El gen *END1*, localizado en el cromosoma 6p24.1, codifica para un precursor de ET-1 que tras una doble escisión proteolítica da lugar a su forma madura (**Figura 6**) ^{45,273–278}. El incremento en el flujo sanguíneo disminuye la síntesis y liberación de ET-1 por parte de las CE desencadenando la vasodilatación. Asimismo, la hipoxia y la isquemia son los principales estimuladores de ET-1 ^{45,273,275}.



Figura 6. Esquema de la formación de ET-1.

Aunque ET-1 se secreta fundamentalmente a partir de las CE, también está producida por múltiples células, incluidos los macrófagos y los fibroblastos. Sus acciones paracrinas estimulan la migración de los fibroblastos y su diferenciación a miofibroblastos, así como la proliferación de las células del músculo liso ^{64,275-278}. Así, se ha atribuido a ET-1 un papel profibrótico. En concreto, se ha detectado un aumento de los niveles de ET-1 en las áreas fibróticas de los pulmones y en el suero de los pacientes con FPI ^{96,276,279,280}. Además, se ha descrito una estrecha relación con otras enfermedades pulmonares principalmente con la HAP en la cual el tratamiento con Bosentan, un potente antagonista dual de los receptores de ET-1, ha demostrado que aumenta la supervivencia de estos pacientes ^{273,275,276}. Varios estudios han reportado un aumento de ET-1 en los pacientes con ES que han desarrollado HAP o EPI ^{56,62,64,277,278,281-286}. No obstante, no solo participa en la fibrogénesis sino que también contribuye en la inflamación y el desarrollo de enfermedades reumáticas tales como la ES o la AR ^{62,64,277,278,281,283,287-289}.

Como consecuencia de su papel en la fibrosis pulmonar y en la inflamación, es interesante indagar más sobre su participación en el desarrollo de la EA-EPI⁺.

II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN

La EPI constituye una de las complicaciones más graves en los pacientes con EA, siendo una de las principales causas de muerte. Aunque la EPI se desarrolla con frecuencia en los pacientes con una EA establecida, también puede presentarse como la manifestación inicial o única de una EA no identificada. El diagnóstico temprano de la EA-EPI⁺ en ocasiones resulta un desafío. Esto se debe a la posible ausencia de síntomas o síntomas leves en los pacientes en fases tempranas de la enfermedad pulmonar y a la similitud de la EA-EPI⁺ con otras entidades que involucran al pulmón. Actualmente, no existe un protocolo claro y establecido para identificar a los pacientes con EA-EPI⁺. Por ello, un objetivo fundamental a conseguir en los pacientes afectados por esta patología es el diagnóstico precoz y certero de los mismos, a ser posible en las fases iniciales del proceso pulmonar y antes de que el cuadro sea irreversible, lo que posibilita aplicar las medidas terapéuticas necesarias que mejoren la supervivencia de dichos pacientes. En este contexto, numerosos estudios han demostrado que los marcadores biológicos o biomarcadores, son herramientas adicionales de gran utilidad en el diagnóstico precoz de distintas enfermedades de carácter inflamatorio y/o fibrótico. El deterioro del endotelio vascular es característico de la fase inicial de las enfermedades inflamatorias que, en último término, genera como resultado una activación constitutiva de los fibroblastos en varios órganos, predominantemente el pulmón, desencadenando la fibrosis pulmonar. De hecho, el daño del endotelio pulmonar se ha descrito como uno de los primeros estadios claves para el desarrollo de lesiones pulmonares y la posterior aparición y progresión de la EPI en la EA. Sin embargo, los mecanismos subvacentes al daño de las CE y a la reparación defectuosa siguen sin entenderse por completo en la EA-EPI+.

Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, es crucial una mejor comprensión de la fisiopatología de la EA-EPI⁺. En este sentido, los marcadores de la disfunción endotelial podrían jugar un papel clave en los procesos patológicos del daño vascular subyacente y la fibrosis pulmonar en la EA-EPI⁺. La variación de estos marcadores a nivel sanguíneo podría estar reflejando el estado del endotelio vascular, en particular, la alteración de las propiedades básicas del endotelio en la EA-EPI⁺ permitiendo una exploración no invasiva de la disfunción endotelial. La identificación de nuevos biomarcadores de la EA-EPI⁺ es posible que contribuya al diagnóstico precoz y diferencial de la enfermedad, permitiendo a los profesionales sanitarios utilizarlos como una herramienta complementaria en la práctica clínica diaria.

HIPÓTESIS

La alteración de marcadores celulares y moleculares de disfunción endotelial reflejan los procesos patológicos del daño vascular subyacente y la fibrosis pulmonar en la EA-EPI⁺, constituyendo biomarcadores específicos de la enfermedad.

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es dilucidar el papel de las células y moléculas claves de disfunción endotelial en los procesos patológicos de daño vascular subyacente y fibrosis pulmonar característicos de la EA-EPI⁺.

Para ello, se han establecido los siguientes objetivos específicos:

1- Evaluar el papel de las células y moléculas implicadas en la formación, reparación y remodelación de los vasos sanguíneos en la fisiopatología de la EA-EPI⁺.

Estudio de las EPC a nivel cualitativo y cuantitativo, cuantificación de las TAng, y evaluación a nivel genético y funcional (expresión génica y niveles proteicos) de VEGF.

2- Determinar la función que desempeñan las moléculas de adhesión celular y quimiocinas implicadas en las propiedades de barrera y adhesión del endotelio en la fisiopatología de la EA-EPI⁺.

Análisis funcional (expresión génica y niveles proteicos) de: MCP-1, ICAM-1, VCAM-1 y Selectina-E.

3- Esclarecer el papel de las moléculas que regulan el tono vascular en la fisiopatología de la EA-EPI⁺.

Evaluación funcional (expresión génica y niveles proteicos) de ET-1 y ADMA.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Para la realización de esta tesis doctoral se incluyeron un total de 144 individuos a los que se les realizó una extracción de sangre periférica. Todos ellos se reclutaron en los Servicios de Reumatología y Neumología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander, España).

El grupo objeto de estudio comprendió pacientes con EA-EPI⁺. Por un lado, con el fin de evaluar el proceso patológico de la vasculopatía subyacente de la EA-EPI⁺, se reclutaron personas sanas (PS) como grupo control que carecían de historia personal y familiar de EA y complicaciones pulmonares. Por otro lado, para estudiar el desarrollo de la fibrosis pulmonar en la EA-EPI⁺, también se reclutaron como grupos control pacientes con una EA que no presentaban ninguna EPI (EA-EPI⁻), así como pacientes con FPI, los cuales representaban la EPI más severa.

Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices y regulaciones aprobadas en la Declaración de Helsinki. Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética de Investigación Clínica de Cantabria, España (2016.092). Todas las personas dieron su consentimiento informado por escrito para participar en este estudio antes de su inclusión.

1.1. Grupo objeto de estudio: pacientes con EA-EPI+

El grupo objeto de estudio lo conformaron 57 pacientes con EA-EPI⁺. Dicho grupo estuvo constituido por 21 pacientes con AR-EPI⁺, 21 pacientes con ES-EPI⁺ y 15 pacientes con otras EA-EPI⁺ (6 con SAS y 9 con IPAF).

Todos ellos cumplían los criterios propios establecidos para el diagnóstico de cada EA. Este fue el caso de los criterios del Colegio Americano de Reumatología (ACR) y la Liga Europea contra el Reumatismo (EULAR) para la clasificación y el diagnóstico de la AR ²⁹⁰ y de la ES ²⁹¹.

Se recogió información sobre los niveles de proteína C reactiva (PCR) y velocidad de sedimentación globular (VSG), así como de la presencia de los anticuerpos específicos para el diagnóstico de cada EA: FR y ACPA para la AR; ANA, AAC y ATA (anti-Scl70) para la ES; FR, ANA, anticuerpos relacionados con miopatías inflamatorias, anticuerpos anti-antígeno A relacionado con el síndrome de Sjögren (anti-SSA/Ro) y anticuerpos anti-antígeno B relacionado con el síndrome de Sjögren (anti-SSB/La) para cada una de las otras EA.

Además, todos los pacientes con EA-EPI⁺ cumplían los criterios para la clasificación y el diagnóstico de EPI establecidos por la Sociedad Torácica Americana (ATS) y la Sociedad Respiratoria Europea (ERS)⁸. La presencia de fibrosis pulmonar fue confirmada en todos los pacientes con la realización de un TCAR torácico, evaluándose asimismo el grado de afectación funcional pulmonar mediante PFR. Los patrones de TCAR de los pacientes con EPI se estratificaron según los criterios de la Sociedad Fleischner en: NIU, probable NIU, NINE y no-NINE ²⁹². Por otro lado, la HAP se diagnosticó en los pacientes con ES-EPI⁺ mediante ecocardiograma transtorácico, confirmándose con cateterismo cardíaco derecho. Asimismo, en dichos pacientes se recogió información relacionada con otras manifestaciones clínicas frecuentes en la ES.

Las características demográficas y clínicas de los pacientes con AR-EPI⁺, ES-EPI⁺ y otras EA-EPI⁺ se detallan en las **Tablas 1, 2 y 3**, respectivamente.

1.2. Grupos control de individuos

Los grupos control del estudio estaban constituidos por 45 pacientes con EA-EPI⁻, 21 pacientes con FPI y 21 PS.

• Pacientes con EA-EPI-

El grupo control de pacientes con EA-EPI⁻ comprendió 25 pacientes con AR-EPI⁻ y 20 pacientes con ES-EPI⁻.

Todos ellos cumplían los criterios propios establecidos por la ACR/EULAR para la clasificación y el diagnóstico de AR ²⁹⁰ y ES ²⁹¹. Se recogió información sobre los niveles de PCR y VSG, así como la presencia de los anticuerpos específicos para el diagnóstico de cada EA: FR y ACPA para los pacientes con AR; ANA, AAC y ATA (anti-Scl70) para los pacientes con ES.

Se excluyó la presencia de EPI en todos los pacientes con EA-EPI⁻ mediante la evaluación de TCAR de tórax y las PFR. Adicionalmente, en los pacientes con ES-EPI⁻ se evaluó la HAP mediante ecocardiograma transtorácico y cateterismo cardíaco derecho. También, se recogió información relacionada con otras manifestaciones clínicas frecuentes en la ES.

Toda la información que describe a los pacientes con AR-EPI⁻ y ES-EPI⁻ se detalla en las **Tablas 1 y 2**, respectivamente.

• Pacientes con FPI

Los 21 pacientes con FPI cumplían los criterios propuestos por la ATS/ERS 8.

La presencia de fibrosis pulmonar fue confirmada en todos los pacientes con la realización de un TCAR torácico, evaluándose asimismo el grado de afectación funcional pulmonar mediante PFR. Los patrones de TCAR se identificaron según los criterios de la Sociedad Fleischner para el patrón NIU ²⁹². De forma adicional, se identificaron aquellos pacientes con HAP mediante ecocardiograma transtorácico y cateterismo cardíaco derecho.

Las características demográficas y clínicas de los pacientes con FPI se definen en la **Tabla 4**.

• *PS*

Las 21 PS incluidas en el estudio no presentaron historia personal ni familiar de EA ni patologías pulmonares. En particular, las PS tenían una edad media \pm desviación estándar (DE) de 41,2 \pm 12,5 años y el 23,8% (5/21) habían fumado alguna vez. Además, el 33,3% (7/21) fueron mujeres.

31

	AR-EPI+	AR-EPI-
	<i>n</i> = 21	<i>n</i> = 25
Sexo (mujer), n (%)	9 (45,9)	15 (60,0)
Edad al estudio, media ± DE, años	$66,5 \pm 10,1$	$60,1 \pm 11,8$
Historia de fumador, n (%)	13 (65,0)	13 (52,0)
Duración AR, media ± DE, años	9,2 ± 10,2	$4,1 \pm 7,4$
PCR (mg/dL), media ± DE	$1,1 \pm 1,1$	$0,5 \pm 0,5$
VSG (mm/hora), media ± DE	$22,8 \pm 27,2$	$14,4 \pm 12,4$
Presencia de autoanticuerpos		
FR positivo, <i>n</i> (%)	17 (81,0)	11 (44,0)
ACPA positivo, <i>n</i> (%)	19 (90,4)	15 (60,0)
Pruebas funcionales respiratorias		
CVF (% predicho), media ± DE	$95,2 \pm 24,1$	99,2 ± 16,0
VEF1 (% predicho), media ± DE	$92,2 \pm 21,0$	94,9 ± 22,0
VEF1/CVF (% predicho), media ± DE	$77,8 \pm 9,1$	93,6 ± 12,3
DLCO (% predicho), media ± DE	$43,3 \pm 15,9$	$79,9 \pm 20,0$
TCAR		
Afectación pulmonar en TCAR, n (%)	21 (100,0)	0 (0,0)
Patrón NIU, <i>n</i> (%)	11 (52,4)	-
Patrón probable NIU, n (%)	2 (9,5)	-
Patrón NINE, n (%)	7 (33,3)	-
Patrón no-NINE, n (%)	1 (4,8)	-
Terapias recibidas		
FAMEcs, <i>n</i> (%)	17 (81,0)	13 (52,0)
FAMEb, <i>n</i> (%)	15 (71,4)	2 (8,0)

Tabla 1. Características demográficas y clínicas de los pacientes con AR-EPI+ y AR-EPI-.

	ES-EPI+	ES-EPI⁻
	<i>n</i> = 21	<i>n</i> = 20
Sexo (mujer), n (%)	13 (61,9)	18 (90,0)
Edad al estudio, media ± DE, años	$60,3 \pm 7,0$	$56,6 \pm 15,4$
Historia de fumador, n (%)	11 (52,4)	11 (55,0)
Duración ES, media ± DE, años	$10,8 \pm 8,3$	$9,6 \pm 8,1$
PCR (mg/dL), media ± DE	$0,7 \pm 1,4$	0.5 ± 0.5
VSG (mm/hora), media ± DE	20,1 ± 15,9	$17,2 \pm 13,4$
Presencia de autoanticuerpos		
ANA positivo, <i>n</i> (%)	19 (95,0)	18 (90,0)
AAC positivo, <i>n</i> (%)	1 (5,0)	9 (45,0)
ATA (anti-Scl70) positivo (%)	10 (50,0)	4 (20,0)
Pruebas funcionales respiratorias		
CVF (% predicho), media ± DE	$88,4 \pm 27,1$	106,6 ± 15,9
VEF1 (% predicho), media ± DE	87,3 ± 25,6	$101,9 \pm 17,8$
VEF1/CVF (% predicho), media ± DE	79,7 ± 5,5	$79,2 \pm 9,9$
DLCO (% predicho), media ± DE	$47,5 \pm 19,5$	71,5 ± 15,3
HAP, <i>n</i> (%)	3 (15,8)	0 (0,0)
TCAR		
Afectación pulmonar en TCAR, n (%)	21 (100,0)	0 (0,0)
Patrón NIU, n (%)	3 (14,3)	-
Patrón probable NIU, n (%)	3 (14,3)	-
Patrón NINE, n (%)	14 (66,7)	-
Patrón no-NINE, n (%)	1 (4,7)	-
Otras manifestaciones clínicas en ES		
Insuficiencia renal, n (%)	1 (4,8)	1 (5,0)
Afectación cardiaca, n (%)	6 (28,6)	1 (5,0)
Fenómeno de Raynaud, n (%)	21 (100,0)	20 (100,0)
Disfunción esofágica, n (%)	12 (57,1)	5 (25,0)
Calcinosis, n (%)	0 (0,0)	6 (30,0)
Sinovitis, n (%)	6 (28,6)	6 (30,0)
Terapias recibidas		
FAMEcs, <i>n</i> (%)	16 (76,2)	12 (60,0)
Rituximab, <i>n</i> (%)	7 (33,3)	2 (10,0)
Vasodilatadores, <i>n</i> (%)	13 (61,9)	14 (70,0)

Tabla 2. Características demográficas y clínicas de los pacientes con ES-EPI+ y ES-EPI-.

	Otras EA-EPI+
	<i>n</i> = 15
Sexo (mujer), n (%)	5 (33,3)
Edad al estudio, media ± DE, años	$62,0 \pm 10,1$
Historia de fumador, n (%)	11 (73,3)
Presencia de autoanticuerpos	
FR positivo, <i>n</i> (%)	1 (6,7)
ANA positivo, <i>n</i> (%)	10 (66,7)
Anticuerpos relacionados con miopatías inflamatorias positivos, n (%)	6 (40,0)
Anti-SSA/Ro positivo, n (%)	3 (20,0)
Anti-SSB/La positivo, n (%)	2 (13,3)
Pruebas funcionales respiratorias	
CVF (% predicho), media ± DE	$88,3 \pm 28,8$
VEF1 (% predicho), media ± DE	$88,7 \pm 27,6$
VEF1/CVF (% predicho), media ± DE	$79,7 \pm 4,6$
DLCO (% predicho), media ± DE	$44,6 \pm 14,6$
TCAR	
Afectación pulmonar en TCAR, n (%)	15 (100,0)
Patrón NIU, n (%)	4 (26,7)
Patrón probable NIU, n (%)	5 (33,3)
Patrón NINE, n (%)	6 (40,0)
Terapias recibidas	
FAMEcs <i>n</i> (%)	2 (13,3)
FAMEb, <i>n</i> (%)	3 (20,0)
Antifibróticos, n (%)	3 (20,0)

Tabla 3. Características demográficas y clínicas de los pacientes con otras EA-EPI+.

	FPI
	<i>n</i> = 21
Sexo (mujer), n (%)	7 (33,3)
Edad al estudio, media ± DE, años	$69,2 \pm 10,0$
Historia de fumador, n (%) 16 (70	
Pruebas funcionales respiratorias	
CVF (% predicho), media ± DE	$84,9 \pm 14,7$
VEF1 (% predicho), media ± DE	87,3 ± 19,6
VEF1/CVF (% predicho), media ± DE	$79,7 \pm 7,8$
DLCO (% predicho), media ± DE	$43,6 \pm 18,4$
HAP, <i>n</i> (%)	4 (26,7)
TCAR	
Afectación pulmonar en TCAR, n (%)	21 (100,0)
Patrón NIU, n (%)	21 (100,0)
Terapias recibidas	
Antifibróticos, n (%)	9 (42,9)

Tabla 4. Características demográficas y clínicas de los pacientes con FPI.

2. MÉTODOS

2.1. Aislamiento y expansión de EPC mediante cultivos celulares

El aislamiento y la expansión de EPC *in vitro* permite la caracterización de las células pudiendo distinguir las ECFC, un subtipo de EPC asociadas con el linaje endotelial.

2.1.1. Puesta a punto de la técnica de cultivo celular

La puesta a punto de la técnica de cultivo celular se llevó a cabo en la *Queen's University Belfast* (Belfast, Irlanda del Norte) siguiendo las recomendaciones del Grupo de investigación *Diabetes and Vascular Stem Cell Research*²⁹³, durante una estancia de 3 meses realizada por la doctoranda en dicho grupo. Dado que la baja frecuencia de las ECFC en sangre constituye un factor limitante, se requieren unas condiciones muy específicas para su aislamiento. Por ello, se testaron diferentes condiciones en puntos críticos del método de aislamiento de las ECFC:

- Volumen sanguíneo de partida: se aumentó de forma progresiva desde 25 mL hasta 100 mL y finalmente se partió de al menos 100 mL.
- 2- Anticoagulante empleado para la recogida de muestras sanguíneas: se estudiaron la heparina (BD Vacutainer) y el anticoagulante ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (BD Vacutainer) y se seleccionó el EDTA.
- 3- Matriz extracelular que recubre las placas de cultivo: se testaron la fibronectina (Sigma Aldrich) y el colágeno tipo I (Corning) y finalmente se empleó el colágeno de tipo I.
- 4- Medio de cultivo: se evaluó el medio libre de xenón para el cultivo de ECFC (EC-Cult[™]-XF ECFC, Stem Cell) y el medio de crecimiento celular endotelial microvascular 2 (EGM-2 MV, Lonza). El EGM-2MV constituyó el medio más eficaz para la obtención de ECFC.
- 5- Enriquecimiento del medio de cultivo con 20% de suero bovino fetal (SBF): se probaron SBF de Sigma-Aldrich y SBF de Hyclone. Finalmente, se llevó a cabo el enriquecimiento del medio de cultivo EGM-2 MV con un 20% de SBF de Hyclone

en las primeras etapas de diferenciación de las ECFC y un 20% de SBF de Sigma-

Aldrich en las etapas posteriores de expansión.

Con el cumplimiento de estas condiciones, a partir de células mononucleares (CMN) aisladas de sangre periférica, se obtuvieron entre 0-3 colonias en los días 20-25 del cultivo (**Figura 7a-b**). Posteriormente, se logró la confluencia celular necesaria para llevar a cabo la expansión de las ECFC (**Figura 7c**).



Figura 7. Microfotografías representativas del progreso del cultivo celular para el aislamiento, diferenciación y expansión de las ECFC a partir de sangre periférica tomadas al microscopio invertido. (a) CMN aisladas de sangre periférica en el día 1 del cultivo (x40). (b) Colonia de ECFC con típica apariencia de cobblestone diferenciada en el día 22 del cultivo (x100). (c) Monocapa de ECFC en la etapa de expansión del cultivo celular (x100).

2.1.2. Técnica de aislamiento, diferenciación y expansión de las ECFC

Se partió de 100 mL de sangre periférica en tubos con EDTA. Las muestras fueron procesadas dentro de las 2 horas siguientes a la extracción.

La fracción de CMN se aisló mediante un gradiente de densidad con ficollhistopaque de 1077 g/mL (Sigma-Aldrich). Para ello, las muestras de sangre se centrifugaron en el gradiente de densidad a razón de volúmenes 1:1 a 400 rcf durante 30 minutos. Tras la recuperación de la capa de CMN, éstas se lavaron una vez con tampón fosfato salino (PBS) y se centrifugaron a 300 rcf durante 10 minutos.

La diferenciación de las ECFC supuso la preparación del medio de cultivo, así como el recubrimiento de las placas de cultivo con colágeno de tipo I. Por un lado, el medio EGM-2 MV estuvo constituido por el medio basal endotelial (EBM) 2 (Lonza) suplementado con alícuotas que contenían factor de crecimiento epidérmico humano, VEGF, factor-1 de crecimiento insulínico R3, ácido ascórbico, hidrocortisona, factor beta de crecimiento de fibroblastos humano, heparina y gentamicina/anfotericina-B (EGM-2 SingleQuots, Lonza). Además, dicho medio se enriqueció con un 20% de SBF (Hyclone). Por otro lado, para el recubrimiento de las placas se añadió a cada pocillo una solución de agua destilada estéril, acetato sódico (Fisher Chemical) y colágeno tipo I (Corning) y se dejó durante 30 minutos en campana. Posteriormente, se retiró la solución y las placas se expusieron a la radiación ultravioleta en campana durante 30 minutos. Tras ello, las placas se almacenaron a 4ºC hasta su utilización. Las CMN se resuspendieron en el medio de cultivo previamente preparado y se llevó a cabo el recuento celular en una cámara de Neubauer (Brand) al microscopio óptico. Se añadieron alrededor de 1x107 CMN/pocillo en las placas de 24 pocillos (Corning) previamente recubiertas con colágeno tipo I. Después de 24 horas, las CMN se lavaron con medio EGM-2 MV para eliminar las células no adherentes. Las CMN se cultivaron un máximo de 5 semanas, cambiándolas el medio de cultivo cada 48 horas hasta la aparición de las células con apariencia de *cobblestone*, estructura característica de las ECFC.

Una vez que las células alcanzaron al menos una confluencia del 80%, se llevó a cabo el pase de éstas a placas de 6 pocillos, frascos de 25 cm² o 75 cm² dependiendo de lo que la situación requería. Para ello, se realizó un tratamiento con tripsina (Lonza) a 37°C durante un máximo de 5 minutos y posteriormente se lavó con medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con gentamicina y 10% de SBF centrifugándolo a 1200 rpm durante 8 minutos. Finalmente, las ECFC se resuspendieron en el medio EGM-2 MV suplementado con 20% SBF en el primer pase y con un 10% de SBF en los sucesivos.

La identidad de las ECFC se confirmó por inmunofenotipificación por citometría de flujo considerándolas como CD34⁺, CD45^{low}, CD133⁺ y CD309⁺. Para ello, al tercer pase de los cultivos, las células se sometieron al tratamiento con tripsina y tras centrifugar a 1200 rpm 8 minutos, las células se marcaron con los anticuerpos CD34, CD45, CD133 y CD309 y se analizaron en el citómetro de flujo (BD Technologies).

2.2. Evaluación del efecto de la concentración de O₂ sobre las capacidades funcionales de las EPC aisladas a partir de sangre periférica

La evaluación del efecto de la concentración de O₂ sobre las capacidades funcionales de las EPC se llevó a cabo en el *Centre for Experimental Medicine* en la *Queen's University Belfast* (Belfast, Irlanda del Norte) durante la estancia previamente mencionada.

Se despegaron las ECFC en el tercer pase del cultivo bajo el tratamiento con tripsina y se realizó el recuento celular al microscopio óptico mediante la cámara de Neubauer. Posteriormente, se resuspendieron 1x10⁵ células en el medio EGM-2 MV suplementado con un 10% de SBF y se plaquearon en un frasco de 25 cm². Se incubaron a 37°C durante 3 días en condiciones de normoxia (21% O₂) cambiando el medio de cultivo el segundo día.

Paralelamente, se repitió el mismo proceso con la diferencia de que se incubó a 37° C durante 3 días en condiciones de hipoxia (5% O₂). En este caso, todo el proceso se realizó en el interior de una cabina especial con el controlador del grado de O₂ *Oxycycler C*42 (Bio-Spherix), que permitió mantener constantes las condiciones de hipoxia.

Finalmente, se estudió la capacidad proliferativa y angiogénica de las ECFC en ambas condiciones.

• Evaluación del efecto de la concentración de O₂ en la capacidad proliferativa de las ECFC

La capacidad de proliferación celular en cada condición se evaluó mediante la comparación del número de células/mL alcanzado tras los 3 días de incubación en el cultivo en condiciones de normoxia en relación con las células en cultivo en hipoxia.

• Evaluación del efecto de la concentración de O₂ en la capacidad vasculogénica de las ECFC

La capacidad vasculogénica celular se determinó mediante el ensayo *in vitro* de Matrigel (BD Biosciences).

Se resuspendieron 7,5x10⁴ células en medio EGM-2 MV y Matrigel a razón de 1:1. Se añadieron alícuotas por triplicado en una placa de 24 pocillos y se incubaron 30 minutos a 37°C para su solidificación. Tras la polimerización de la matriz, se cubrieron las gotas solidificadas con medio EGM-2 MV y se dejó incubar a 37°C un máximo de 3 días. Una vez visualizada la formación de los tubos en los cultivos, se procedió a su tinción. Para ello, se preparó la solución de tinción con calceína AM (Life Technologies) y dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck) y se diluyó a razón de 1:1000 con medio basal EBM-2. Se añadieron 700 µl de dicha solución a cada pocillo y se incubó 1 hora a 37°C. Finalmente, se retiró la solución de tinción y se añadió medio basal EBM-2 a los pocillos para observarlo al microscopio confocal (Nikon). Se adquirieron imágenes con un aumento 100x de un total de 3 campos aleatorios/pocillo mediante el programa EZ-C1. El área de las estructuras tubulares formadas se analizó mediante el programa NIS Elements BR 3.0.

2.3. Cuantificación celular en sangre periférica por citometría de flujo

Se evaluó la variación en la frecuencia celular de las EPC y las TAng mediante la técnica de citometría de flujo. Las EPC se caracterizaron por la expresión simultánea de marcadores de superficie celular que reflejan su carácter de célula madre (CD34⁺), inmadurez (CD133⁺), compromiso endotelial (CD309⁺ o VEGFR-2) y ausencia de carácter hematopoyético (CD45^{low}). Las TAng se caracterizaron por ser células linfocitarias de tipo T (CD3⁺), con receptores específicos del sistema inmunitario (CD184⁺) y con la molécula de adhesión a CE (CD31⁺).

2.3.1. Puesta a punto de la técnica de citometría de flujo

La puesta a punto de la técnica de citometría de flujo se llevó a cabo en la Universidad de Oviedo (Asturias, España), en la *Queen's University Belfast* (Belfast, Irlanda del Norte) y en el IDIVAL (Santander, España) siguiendo las recomendaciones sobre la cuantificación de las EPC del grupo *EULAR Scleroderma Trials and Research* y las de otros métodos descritos anteriormente ^{90,91,93,132,294}. Se testaron diferentes condiciones en puntos críticos de la técnica de citometría de flujo, especialmente en el caso del análisis de las EPC dada su baja frecuencia en sangre periférica:

- 1- Anticoagulante empleado para la recogida de muestras sanguíneas: se estudiaron la heparina (BD Vacutainer) y el EDTA (BD Vacutainer) y finalmente se utilizó el EDTA.
- 2- Material utilizado de partida: se testó a partir de CMN aisladas por gradiente de ficoll y sangre entera y se obtuvieron los mejores resultados empleando sangre entera.
- 3- Volumen sanguíneo de partida: se probó a disminuir progresivamente de 2
 mL a 200 μl y finalmente se partió de 200 μl.
- 4- Uniones inespecíficas: se testaron los anticuerpos bloqueadores del receptor Fc y el uso de controles de isotipo. Finalmente, se emplearon ambos en la cuantificación de las EPC.
- 5- Parámetros de adquisición de la muestra en el citómetro de flujo: se estudiaron la velocidad y el tiempo máximo de adquisición, así como los eventos mínimos necesarios para la obtención de resultados representativos. La adquisición de la muestra a baja velocidad con un máximo de 10 minutos fue requerida para la cuantificación de las EPC, mientras que la velocidad fue estándar en el caso de la cuantificación de las TAng.

2.3.2. Diseño del panel multicolor para evaluar las moléculas de superficie de las células

La selección de los fluorocromos para los anticuerpos conjugados se basó en el estudio de la expresión del antígeno sobre las células y el índice de coloración del fluorocromo. Así, se siguieron los siguientes criterios para la selección de los fluorocromos:

1- Se adecuó el brillo de los fluorocromos al nivel de expresión de los antígenos de modo que los fluorocromos más brillantes se emplearon para los antígenos poco expresados y los más débiles para los antígenos muy expresados. 2- Se minimizó el solapamiento de los espectros de emisión de los diferentes marcadores con el fin de evitar posibles interferencias entre los fluorocromos usados basándonos en el espectro de fluorescencia (Figura 8).

En particular, en el caso del análisis de las EPC se seleccionaron la aloficocianina (APC) (Miltenyi Biotech) para conjugarla con el anticuerpo anti-CD34, el isotiocianato de fluoresceína (FITC) VioBright (Miltenyi Biotech) para conjugarla con el anticuerpo anti-CD309, la ficoeritrina (PE) (Miltenyi Biotech) para conjugarla con el anticuerpo anti-CD133/2 y el VioBlue (Miltenyi Biotech) que se conjugó con el anticuerpo anti-CD45. En relación con la evaluación de las TAng, se escogió el VioBlue (Miltenyi Biotech) para conjugarlo con el anticuerpo anti-CD3, la APC (Miltenyi Biotech) para conjugarla con el anticuerpo anti-CD184 y la PE (Miltenyi Biotech) para conjugarla con el anticuerpo anti-CD31.

El espectro de fluorescencia y la información detallada de los diferentes fluorocromos empleados se muestra en la **Figura 8** y la **Tabla 5**:



Figura 8. Espectro de fluorescencia de los fluorocromos utilizados para la identificación de los marcadores de superficie celular.

Tabla 5. Información detallada de los fluorocromos empleados para la detecciónde los marcadores de superficie celular.

Fluorocromo	Excitación laser (nm)	Excitación máxima (nm)	Emisión máxima (nm)	Canal	Filtro (nm)
APC	561 /635	652	660	R1	655-730
VioBright FITC	488	494	522	B1	525/50
PE	488/561	565	575	B2	585/40
VioBlue	405	400	452	V1	450/50

2.3.3. Técnica de citometría de flujo

La frecuencia de EPC y TAng se analizó mediante la técnica de citometría de flujo dentro de la primera hora tras la extracción sanguínea en tubos con anticoagulante EDTA.

Para el marcaje de las EPC, se preincubaron 200 µL de sangre periférica con 10 µL de anticuerpos que bloquean los receptores Fc (Miltenyi Biotech) durante 20 minutos a 4ºC con el fin de evitar las uniones inespecíficas. Seguidamente, las células se marcaron con 5 µl de anticuerpos monoclonales anti-CD34 conjugados con APC, 5 µl de anti CD309 (VEGFR-2) conjugados con VioBright FITC, 5 µl de anti CD133/2 conjugados con PE (293C3) y 5 µl de anti-CD45 conjugados con VioBlue. Además, la especificidad del marcaje se controló mediante la incubación de la muestra con 2 µl de los anticuerpos de isotipo: REA Control (S)-APC (Clon REA293); Mouse IgG1-VioBright FITC (Clon IS5-21F5); REA control (S)-PE (Clon REA293) y REA control (S)-VioBlue (Clon REA293). Después de 30 minutos a 4ºC en oscuridad, los glóbulos rojos se lisaron tras incubar durante 5 minutos a 4ºC en oscuridad con 2 mL de solución de lisis FACS (BD Bioscience) y centrifugar a 1600 rpm durante 5 minutos. Posteriormente, los sedimentos de glóbulos blancos se lavaron una vez con 2 mL de PBS y se centrifugaron a 1600 rpm durante 5 minutos. Tras retirar el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en 400 µl de PBS y las células marcadas se procesaron en el citómetro de flujo CytoFLEX (Beckman Coulter) utilizando el programa Cytexpert 2.3 (Beckman Coulter). Se adquirieron aproximadamente 1x10⁵ eventos por muestra a una velocidad aproximada de 1000 eventos/segundo con un tiempo máximo de adquisición de 10 minutos.

En cuanto a la evaluación de la frecuencia de las TAng, el protocolo llevado a cabo fue el mismo que el descrito para la cuantificación de las EPC con las siguientes modificaciones: no se realizó el bloqueo de los receptores Fc; las células se marcaron con 2 µl de anticuerpos monoclonales anti-CD3 conjugados con VioBlue, 2 µl de anti-CD184 conjugados con APC y 2 ul de anti-CD31 conjugados con PE; la especificidad del marcaje se controló mediante la incubación de la muestra con 2 µl del anticuerpo CD3; los sedimentos de glóbulos blancos obtenidos tras la incubación con los anticuerpos se lavaron 2 veces con PBS; y finalmente, en el citómetro de flujo se adquirieron unos $3x10^4$ eventos por muestra en la región de las células CD3⁺.

2.3.4. Estrategia de gateo

Una vez que la muestra se introdujo en el citómetro de flujo, las mediciones se basaron según la respuesta de las células teñidas a la luz láser en función de su tamaño, morfología, complejidad y marcadores presentes en su superficie. La determinación de la expresión de los marcadores se llevó a cabo mediante el estudio de la intensidad de la fluorescencia de los fluorocromos unidos a los anticuerpos en gráficos de puntos biparamétricos (dot-blot).

La estrategia de gateo comenzó con una primera selección de las células que se enmarcaban en la región de tamaño y complejidad de los linfocitos.

Posteriormente, en el análisis de las EPC se evaluaron los marcadores CD34 y CD45 y en aquellas CD34⁺ CD45^{low} se determinó la expresión de CD133 y CD309, seleccionando aquéllas que eran positivas para estos marcadores (**Figura 9a**).

En cuanto a las TAng se evaluó la expresión del marcador CD3 y en aquellas células con una alta expresión de CD3 se determinó la expresión de CD184 y CD31, seleccionando aquéllas positivas para estos marcadores (**Figura 9b**).

La frecuencia celular se expresó como porcentaje de células en la región linfoide.



Figura 9. Dot-blots representativos de la estrategia de gateo empleada para la evaluación de la frecuencia de EPC (a) y TAng (b) por citometría de flujo.

2.4. Genotipado de SNPs del gen VEGF

Para el genotipado de SNPs del gen *VEGF*, se seleccionaron los SNPs a tipar, se aisló el ácido desoxirribonucleico (ADN) y se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (qPCR). Posteriormente, se llevó a cabo el procesamiento de los datos obtenidos.

2.4.1. Selección de SNPs

Los polimorfismos de VEGF se seleccionaron según los siguientes criterios:

- Polimorfismos con una frecuencia> 5% en caucásicos y que previamente estuvieran implicados en la susceptibilidad a diversas patologías inflamatorias y pulmonares.
- 2- Polimorfismos asociados con la producción de la proteína VEGF.
- 3- Polimorfismos distribuidos a lo largo del gen.

En consecuencia, se seleccionaron *VEGF* rs833061 y rs1570360 ubicados en la región promotora del gen, rs2010963 ubicado en la región 5′ no traducida (UTR), rs3025020 ubicado en el intrón 6, y rs3025039 ubicado en la región 3′ UTR del gen *VEGF*.

Además, se comprobó que no se encontraran en desequilibrio de ligamiento (LD) mediante el programa Haploview.

Toda la información relevante de los SNPs seleccionados se detalla en la **Figura** 10.



Figura 10. Información de los SNPs seleccionados de VEGF. En la parte superior se indica la región y posición que ocupa cada SNP en el gen, así como el cambio del nucleótido que se produce en esa posición y la frecuencia de cada nucleótido descrita para la población de origen ibérico en el Proyecto 1000 genomas (https://www.internationalgenome.org). En la parte inferior se muestra el LD entre los 5 SNPs en donde el LD está sombreado de gris claro a gris oscuro en función del valor r². r²: coeficiente de correlación entre 2 SNPs. *Frecuencia en la población ibérica del alelo mayoritario/frecuencia del alelo minoritario.

2.4.2. Aislamiento del ADN

La extracción de ADN a partir de sangre periférica en tubos con el anticoagulante EDTA de los individuos reclutados se realizó utilizando el kit comercial de extracción de ADN *RealPure SSS* (REAL) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Específicamente, se lisaron 300 µl de sangre periférica con 900 µl de solución de lisis de eritrocitos durante 15 minutos de incubación en agitación. Tras centrifugar 2 minutos a 13000 rpm y retirar el sobrenadante, se añadieron 300 µl de solución de lisis y se incubó a 37°C durante 10 minutos. A continuación de la lisis celular y la inactivación de las nucleasas, los extractos celulares se eliminaron mediante la adición de 180 µl de una solución de precipitación proteica y su centrifugación a 13000 rpm durante 4 minutos. Con el fin de concentrar el ADN, se realizó una precipitación consecutiva con isopropanol y etanol. Así, el sobrenadante se mezcló por inversión con 300 µl de isopropanol hasta la visualización de la hebra de ADN para posteriormente centrifugarlo a 13000 rpm durante 2 minutos y resuspenderlo en 300 µl de etanol. Tras una centrifugación a 13000 rpm durante 2 minutos, se retiró el sobrenadante y se dejó secar el sedimento para, finalmente, eluir el ADN en 100 µl de agua ultrapura milliQ. El ADN aislado se congeló a -20°C hasta su posterior uso.

La concentración de todas las muestras de ADN se cuantificó en un espectrofotómetro (*NanoDrop One,* Thermo Scientific), realizando mediciones por duplicado. La calidad del ADN se evaluó empleando los cocientes A260/A280 y A260/A230.

2.4.3. Amplificación del ADN por qPCR

El tipaje de los 5 SNPs de *VEGF* se realizó mediante la técnica de qPCR y el uso de sondas TaqMan. Para ello, se añadieron 1,2 µl de cada muestra a una concentración de 15 ng/µl en una placa de 384 pocillos. Además, se incluyeron controles negativos. Posteriormente, se agregaron a cada muestra 3,8 µl de un mix que contenía 49,4% de agua ultrapura milliQ, 49,4% de una solución (compuesta por deoxinucleósidos trifosfato (dNTPs), el colorante de referencia pasivo ROX, una solución amortiguadora, un co-factor de la polimerasa (MgCl₂) y la ADN polimerasa termoestable, Applied

Biosystems) y un 1,2% de la sonda TaqMan que identifica el SNP a estudiar (Applied Biosystems).

La reacción de qPCR se llevó a cabo empleando el equipo *real-time QuantStudio*[™] *7 Flex* (Applied Biosystems) programado previamente con unas condiciones específicas de amplificación (**Figura 11**). En particular, se comenzó con una etapa de pre-lectura a 50°C durante 2 minutos, continuando con un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos. Después, se realizaron 45 ciclos sucesivos de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos y de unión de los cebadores al ADN molde en las zonas 3′ complementarias (alineamiento) y síntesis de la nueva cadena sintetizada por la actividad Taq polimerasa (extensión) a 60°C durante 1 minuto. Para terminar, se realizó una extensión final de 30 segundos a 60°C con el fin de permitir que la Taq polimerasa termine de sintetizar todos los fragmentos que pudieran haber quedado incompletos (**Figura 11**).



Figura 11. Condiciones de la qPCR para la amplificación del ADN con el fin de genotipar los SNPs de VEGF.

Al iniciar la qPCR, la sonda de oligonucleótidos TaqMan se encuentra unida a un marcador fluorescente en un extremo (FAM o VIC en función del alelo) y un *quencher* en el opuesto que reduce la señal del fluoróforo. En las etapas de alineamiento y extensión, cuando esta sonda hibrida específicamente con la secuencia diana, la actividad 5'nucleasa de la Taq polimerasa va liberando la sonda que previamente se había unido

al ADN y aumenta la separación entre el *quencher* y el fluoróforo produciendo un aumento de la fluorescencia de forma que la señal aumenta proporcionalmente a medida que lo hace la cantidad de producto de la reacción de amplificación.

Tras la reacción de qPCR, el programa *QuantStudio*[™] (Applied Biosystems), específico del equipo anteriormente mencionado, genera un gráfico de discriminación alélica con el que se obtiene la distribución de los genotipos para cada SNP (**Figura 12**).



Figura 12. Gráficos de discriminación alélica de los 5 SNPs de VEGF. Imágenes obtenidas del programa QuantStudio™ 7 Flex System.
2.4.4. Análisis de calidad del genotipado

Todos los datos obtenidos del genotipado de *VEGF* rs833061 T/C, rs1570360 G/A, rs2010963 G/C, rs3025020 C/T y rs3025039 C/T se sometieron a un estricto control de calidad que garantizó su fiabilidad ²⁹⁵.

En primer lugar, se calculó la tasa de éxito del genotipado para cada SNP teniendo en cuenta los individuos que habían proporcionado un resultado en la técnica con relación al total de individuos analizados, debiendo obtener al menos entre un 93-97% de éxito. En este sentido, se alcanzó un 100% de éxito para todos los polimorfismos analizados, por lo que se consideró que las muestras fueron de buena calidad.

En segundo lugar, para cada uno de los marcadores estudiados se ha analizado si los datos genotípicos obtenidos se ajustaban a las proporciones esperadas según el equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) (p^2 , 2pq, q^2 , siendo p la frecuencia de un alelo y q=1-p la frecuencia del otro alelo) ^{295,296}. En este sentido, la distribución genotípica de los polimorfismos rs833061, rs2010963, rs3025020 y rs3025039 estaba en EHW (**Tabla 6**). Cabe mencionar que en el caso del polimorfismo rs1570360 se encontró una desviación del EHW (**Tabla 6**). Sin embargo, tras revisar manualmente el genotipado de cada una de las muestras y comprobar que era correcto, se consideró que este resultado era consecuencia del tamaño muestral y este polimorfismo se mantuvo en el estudio genético.

En tercer lugar, se comprobó que las frecuencias de los genotipos y los alelos de los polimorfismos de *VEGF* estudiados se distribuyeron acorde a los datos descritos en el Proyecto 1000 Genomas para población de origen ibérico (**Figura 10**).

		0 1								
	rs833	061	rs1570	360	rs2010	963	rs3025	020	rs3025039	
Frecuencias genotípicas	TT (%)	35,5	GG (%)	54,3	GG (%)	41,8	CC (%)	50,3	CC (%)	70,9
	TC (%)	41,8	GA (%)	32,9	GC (%)	44,0	CT (%)	41,2	CT (%)	27,0
	CC (%)	22,7	AA (%)	12,8	CC (%)	14,2	TT (%)	8,5	TT (%)	2,1
	T (%)	56,4	G (%)	70,7	G (%)	63,8	C (%)	70,9	C (%)	84,4
Frecuencias alélicas	C (%)	43,6	A (%)	29,3	C (%)	36,2	T (%)	29,1	T (%)	15,6
EHW	р	0,08	р	0,01	р	0,57	р	0,97	р	0,78

Tabla 6. Análisis de calidad del genotipado.

2.4.5. Determinación de las frecuencias genotípicas, alélicas, de portadores y haplotípicas

Se calculó la frecuencia en la población de cada genotipo y alelo de cada polimorfismo analizado. Las frecuencias genotípicas se calcularon determinando la proporción de individuos con cada genotipo dentro del total de individuos genotipados. Para calcular las frecuencias alélicas se tomó como unidad de observación el cromosoma (cada individuo contribuye con 2 cromosomas) y se calculó la proporción de cada alelo.

Las frecuencias de los portadores del alelo minoritario se calcularon sumando la proporción de individuos heterocigotos y aquéllos que eran homocigotos para dicho alelo respecto del total de individuos genotipados. Las frecuencias de los no portadores del alelo minoritario fueron aquellos individuos homocigotos para el alelo mayoritario respecto del total de individuos genotipados.

Las frecuencias haplotípicas del gen se calcularon determinando el % de cada haplotipo (combinaciones alélicas de los diferentes SNPs de *VEGF*) respecto del total de haplotipos.

2.5. Estudios de expresión génica

Se cuantificó la expresión de los genes *VEGF*, *CCL2*, *ICAM1*, *VCAM1*, *SELE*, *PRMT1*, *END1* y gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) en todos los individuos incluidos en el estudio. En este sentido, los estudios de expresión génica implicaron la realización de varias técnicas y el procesamiento de datos que se describen a continuación.

2.5.1. Aislamiento del ARN

El ácido ribonucleico (ARN) se obtuvo a partir de las muestras de sangre periférica recogida en tubos con anticoagulante EDTA. Para ello, se utilizó el kit comercial *NucleoSpin®RNA Blood* (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante.

52

En primer lugar, se mezclaron 400 µl de sangre y 400 µl de tampón de lisis por el cual se rompe la membrana celular y nuclear. Con el fin de degradar las proteínas y eliminar la contaminación, se añadieron 10 µl de proteinasa k y esta mezcla se incubó durante 10 minutos en agitación. Posteriormente, se realizó una precipitación del ARN con 400 µl de etanol al 70% y se depositó la mezcla en una columna con una membrana en la que, tras una centrifugación a 11000 rpm durante 30 segundos, el ARN queda unido dada su afinidad por ella. A continuación, se añadieron 350 µl de un tampón de desalación de membrana a la columna con el fin de conseguir las condiciones óptimas de la membrana para la acción posterior de la ADNasa y se centrifugó a 11000 rpm durante 30 segundos. Para eliminar el posible ADN contaminante, se agregaron a la columna 95 µl de ADNasa y se dejó actuar durante 15 minutos. Transcurrido dicho tiempo, se llevaron a cabo 3 lavados sucesivos con 200, 600 y 350 µl de dos soluciones que contienen etanol con el fin de eliminar los contaminantes. Tras la última centrifugación a 11000 rpm durante 1 minuto, se agregaron 72 µl de agua libre de ARNasas a la columna y se centrifugó durante 30 segundos a 11000 rpm para eluir el ARN unido a la membrana. El ARN eluído se conservó a -80ºC hasta el momento de su utilización.

La concentración de todas las muestras de ARN se cuantificó en un espectrofotómetro (*NanoDrop One,* Thermo Scientific), realizando mediciones por duplicado. La pureza del ARN se evaluó empleando los cocientes A260/A280 y A260/A230.

2.5.2. Concentración del ARN

Para concentrar el ARN se empleó el kit de concentración de ARN comercial *GeneJET RNA Cleanup and Concentration Micro* (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. En particular, se preparó una mezcla que contiene 70 μ l de ARN, 70 μ l de agua libre de ARNasas, 70 μ l de un tampón de unión y 210 μ l de etanol al 100% creando las condiciones de unión apropiadas para favorecer la adsorción del ARN a la membrana de sílice. Posteriormente, la solución se transfirió a una columna con una membrana en la cual, tras una centrifugación de 1 minuto a 14000 rpm, se queda

unida el ARN. Con el fin de eliminar todos los contaminantes, se realizaron 3 lavados de 500 µl con 3 tampones diferentes que contenían etanol. Tras la última centrifugación a 14000 rpm durante 1 minuto, se eluyó el ARN añadiendo 12,5 µl de agua libre de ARNasas y centrifugando a 14000 rpm durante 1 minuto. El ARN eluído se conservó a -80°C hasta su posterior utilización. La concentración de las muestras de ARN se cuantificó de nuevo en el espectrofotómetro.

2.5.3. Retrotranscripción del ARN

Se procedió a la retrotranscripción del ARN purificado para obtener ADN complementario (ADNc) utilizando el *iScript Advanced cDNA Synthesis kit for RT-qPCR* (Bio-Rad).

En primer lugar, el ARN se diluyó con agua libre de ARNasas en un tubo de PCR estéril con el fin de obtener una solución de 1000 ng en un volumen total de 15 µl. A dicha mezcla se le añadió el mix de la transcripción inversa que contiene 4 µl de la mezcla de oligos (dT) junto con los dNTPs y 1 µl de la enzima retrotranscriptasa reversa. Tras la homogeneización de la mezcla, se llevó a cabo la retrotranscripción en el equipo *Mastercycler*® *PCR Thermal Cycler* (Eppendorf AG) en donde se realizó la síntesis del ADNc mediante una incubación a 42°C durante 30 minutos, y un posterior calentamiento a 95°C durante 5 minutos.

El ADNc generado se almacenó a -20ºC hasta la realización de la qPCR.

2.5.4. Adquisición y diseño de cebadores

Se adquirieron y diseñaron cebadores específicos para los genes de estudio con el fin de cuantificar su expresión.

La cuantificación de la expresión de los genes *GAPDH*, *VEGF*, *CCL2*, *ICAM1*, *VCAM1*, *PRMT1* y *END1* se analizó mediante la adquisición de oligonucleótidos específicos comerciales (Bio-Rad) (**Tabla 7**).

Gen	Secuencia amplicón	Tamaño amplicón (pb)	Tm (ºC)
GAPDH	5'GTATGACAACGAATTTGGCTACAGCAACAGGGTGGTGGACCTCATG GCCCACATGGCCTCCAAGGAGTAAGACCCCTGGACCACCAGCCCCAG CAAGAGCACAAGAGGAAGAGAGAG	117	86
VEGF	5'TGGTGAAGTTCATGGATGTCTATCAGCGCAGCTACTGCCATCCAATC GAGACCCTGGTGGACATCTTCCAGGAGTACCCTGATGAGATCGAGTA CATCTTCAAGCCATCCTGTGTGCCCCTGATGCGATGC	114	83
CCL2	5'ACTGAAGCTCGCACTCTCGCCTCCAGCATGAAAGTCTCTGCCGCCCT TCTGTGCCTGCTGCTCATAGCAGCCACCTTCATTCCCCAAGGGCTCGCT CAGCCAGATGCAATCAATGCCCCAGTCACCTGCTGTTATAACTTCACC AATAGGAAGATCTCAGTGCAGAGGCTCGCGAGCTAT3'	150	86,5
ICAM1	5'GCATTGTCCTCAGTCAGATACAACAGCATTTGGGGGCCATGGTACCTG CACACCTAAAACACTAGGCCACGCATCTGATCTG	98	82,5
VCAM1	5'GGAATTAACCAGGCTGGAAGAAGCAGAAAGGAAGTGGAATTAATT	137	79,5
PRMT1	5'CAGTATCTCTGATTATGCGGTGAAGATCGTCAAAGCCAACAAGTTA GACCACGTGGTGACCATCATCAAGGGGAAGGTGGAGGAGGTGGAGC TCCCAGTGGAGAAGGTGGACATCATCATCAGCGAGTGGATGGGCTAC TGCCTCTTCTACGAGTC3'	126	84
END1	5'GAAGAAGTTCAGAGGAACACCTAAGACAAACCAGGTCGGAGACCA TGAGAAACAGCGTCAAATCATCTTTTCATGATCCCAAGCTGAAAGGC AAGCCCTCCAGAGAGCGTTATGTGACCCACAACCGAGCACATTGGTG ACAGACCTTCGGGGGCCTGTCTGAAGCC3'	136	84

Tabla 7. Información de los cebadores comerciales adquiridos para los estudios de expresión génica.

Dado que la cuantificación de la expresión del gen *SELE* no pudo ser detectada con los cebadores comerciales, ésta fue analizada mediante el diseño de oligonucleótidos utilizando el programa PrimerBank (<u>https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/</u>). Se consideraron adecuadas las parejas de cebadores con las siguientes propiedades:

- una longitud de alrededor de 20 pares de bases (pb).
- una temperatura de fusión o *melting* (Tm) en torno a 60ºC con una diferencia máxima de 2ºC entre la pareja de cebadores.
- una composición que no favoreciera la aparición de estructuras secundarias:
 contenido de GC en torno al 50%, máximo de 2 bases G o C en los 5 últimos
 núcleotidos del extremo 3' y ausencia de 4 nucléotidos idénticos seguidos.
- un producto de amplificación de un tamaño entre 80-160 pb.

Se comprobó el cumplimiento de estos criterios mediante la herramienta *OligoAnalyzer* (<u>https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer</u>). Teniendo en cuenta estos parámetros, los cebadores empleados para el gen *SELE* (Biolegio) se muestran en la **Tabla 8**.

	Secuencia cebadores	Tm (ºC)	Tamaño amplicón (pb)
SELE	5' CAGCAAAGGTACACACACCTG 3'	61.1	
Forward		01,1	128
SELE		60.7	120
Reverse		00,7	

Tabla 8. Información de los cebadores diseñados para la identificación del gen SELE.

2.5.5. Realización de la qPCR

Esta técnica permite, a partir del ADNc, cuantificar los niveles relativos de los genes de estudio. Debido a que la cantidad de ADNc es proporcional al número de moléculas de ARN presente en una muestra, el ADNc es el material de partida necesario para determinar los cambios en la expresión de los genes. Para la realización de esta técnica se empleó el fluoróforo SYBR Green (Bio-Rad) que se une al ADNc, de manera que la señal fluorescente que emite aumenta proporcionalmente a medida que aumenta la cantidad de producto de PCR.

Para ello, se mezcló 1 µl de ADNc diluido 1/5 con 19 µl del mix de amplificación que contenía: 10 µl de SYBR green Supermix (compuesto por el fluoróforo SYBR green, los dNTPs y la ADN polimerasa termoestable) (Bio-Rad), 8 µl de agua libre de ARNasas y 1 µl de los cebadores específicos de cada gen. Se incluyeron también controles negativos añadiendo agua destilada en lugar de ADNc para poder detectar cualquier contaminación.

Posteriormente, la amplificación del ADNc por qPCR se realizó utilizando el equipo real-time QuantStudio[™] 7 Flex (Applied Biosystems) programado previamente con unas condiciones específicas de amplificación (Figura 13). En particular, se comenzó con un ciclo de desnaturalización inicial a 95ºC durante 2 minutos. A continuación, se realizaron 45 ciclos sucesivos de desnaturalización a 95ºC durante 5 segundos y unión de los cebadores al ADNc molde en las zonas 3'complementarias (alineamiento) y síntesis de la nueva cadena sintetizada por la actividad Taq polimerasa (extensión) a 60ºC durante 30 segundos. Después de cada ciclo, los niveles de fluorescencia se midieron automáticamente mediante un detector que sólo recoge fluorescencia cuando el fluorescente SYBR Green se une al ADN de cadena doble. Para terminar, se realizó una curva de melting. Para ello, se elevó la temperatura a 95ºC durante 15 segundos para disociar la doble cadena de ADN y posteriormente se alcanzó una temperatura de 65°C durante 5 segundos. Finalmente, se llevó a cabo un incremento de la temperatura en etapas de 0,05ºC desde 65ºC a 95ºC durante el cual se registra la fluorescencia para detectar la Tm. Así, la Tm representa aquella temperatura en la que el 50% del ADN está desnaturalizado (Figura 13). Todas las muestras se analizaron por duplicado.



Figura 13. Condiciones de la qPCR para la amplificación del ADNc de los genes GAPDH, VEGF, CCL2, ICAM1, VCAM1, SELE, PRMT1 y END1 con el fin de cuantificar su expresión.

2.5.6. Análisis de calidad de los resultados de expresión génica

Tras la finalización de la reacción de qPCR, se analizaron las curvas de *melting* mediante el programa *QuantStudio™ 7 Flex System* con el objetivo de comprobar la fiabilidad de las reacciones individuales de la qPCR. Estas curvas representan la derivada de la fluorescencia frente a la temperatura, lo que da lugar a un pico que corresponde a la Tm, siendo el área del pico proporcional a la cantidad de producto de amplificación obtenido. Se verificó que la curva presentaba un único pico con la Tm específica del cebador utilizado en cada pocillo, lo que implica que la realización de la técnica ha sido correcta y genera un único producto de amplificación (**Figura 14**).

III. MATERIAL Y MÉTODOS



Figura 14. Curvas de melting específicas de cada gen estudiado. Imágenes obtenidas del programa QuantStudioTM 7 Flex System. Rn: fluorescencia del fluoróforo normalizada.

Además, para confirmar que sólo se amplificó un producto de qPCR en cada pocillo, se realizaron electroforesis en geles de agarosa (Sigma) al 2% a partir del material presente en los distintos pocillos (**Figura 15**). Para ello, los geles se prepararon en una solución de 50 mL de tampón de tris, borato, EDTA (TBE) 0,5X y 1 g de agarosa. Para la tinción de ADN se añadieron 2,5 µl de *Green Acid Stain* (Biotium). A continuación, se añadieron 5 µl de cada muestra diluidos con 2,5 µl de tampón de carga en el gel dispuesto en la cubeta de electroforesis cubierta con tampón TBE 0,5X. Además, se agregaron 1,5 µl del marcador molecular de 50 pb (Thermo Fisher), mezclado con 1 µl de tampón de carga y 4 µl de agua destilada. Finalmente, se puso en marcha la electroforesis a un voltaje de 80V. Las bandas de amplificación se visualizaron y fotografiaron en el lector de geles *Molecular Imager Gel Doc*TM XR+ (Bio-Rad) a través del programa de análisis de imágenes *Image Lab* (Bio-Rad).



Figura 15. Comprobación de los productos de qPCR generados.

2.5.7. Procesamiento de los datos de expresión génica

El procesamiento de los datos de expresión génica se llevó a cabo mediante el programa *QuantStudio™ Real-Time PCR* (Applied Biosystems).

Así, se marcó el umbral de fluorescencia en el punto en que la reacción de amplificación se encontraba en fase exponencial, de manera que el ciclo en el cual la señal fluorescente cruza dicho umbral se denomina ciclo umbral o *threshold* (Ct) y depende de la cantidad de ADNc presente en la muestra. Para cada gen de estudio, la expresión relativa se calculó por el método comparativo de Ct, o también llamado método 2 deltadelta Ct ($\Delta\Delta$ Ct), basado en la comparación de la expresión génica de los genes de estudio con respecto al gen *GAPDH*, utilizado como *housekeeping*²⁹⁷. En particular, el Δ Ct de cada muestra se calculó restando el Ct de cada gen de estudio del Ct de *GAPDH*. A continuación, se calculó el $\Delta\Delta$ Ct como 2- Δ Ct.

2.6. Estudio de los niveles proteicos

Se midió la concentración de las proteínas en el suero de todos los individuos mediante la técnica de inmunoensayo de unión a enzima (ELISA). Para ello, se emplearon kits comerciales de ELISA analizando los siguientes biomarcadores séricos: VEGF (Reddot Biotech Inc, RDVEGFAHu-96T), MCP-1 (Invitrogen, BMS281), VCAM-1 (Invitrogen, BMS232), ICAM-1 (Invitrogen, BMS201), Selectina-E (Invitrogen, BMS205), ET-1 (R&D Systems, DET100) y ADMA (Immundiagnostik AG, K7860).

2.6.1. Cuantificación de proteínas por ELISA

Las muestras obtenidas tras la extracción sanguínea se centrifugaron a 4500 rpm durante 10 minutos para la separación del suero y se conservaron a -80°C hasta su posterior utilización para la realización de los ELISAs.

La técnica de ELISA se llevó a cabo siguiendo las instrucciones de cada fabricante. Para la evaluación del compuesto ADMA se llevó a cabo un ELISA de tipo competitivo, mientras que para el análisis del resto de proteínas se empleó la técnica de ELISA tipo sándwich.

Se prepararon los estándares para obtener una curva de calibración con un rango conocido de concentraciones. Así, se añadieron los estándares, controles y muestras (por duplicado) y se procedió a la primera incubación en la que la molécula diana quedaba inmovilizada por unión a los anticuerpos que recubrían la placa. A continuación, se añadió el anticuerpo conjugado con la enzima peroxidasa de rábano y se incubó de nuevo con el fin de que éste se una específicamente a la molécula diana. Finalmente, se agregó el sustrato tetrametilbenzidina, que reaccionaba con el conjugado unido al anticuerpo durante una incubación en oscuridad, paralizándose finalmente la reacción con un reactivo específico de cada kit comercial.

Por último, se cuantificó la densidad óptica de cada pocillo en un lector de microplacas o espectrofotómetro (Multiskan FC, Thermo Scientific) a una longitud de onda de 450 nm y 620 nm como referencia.

2.6.2. Procesamiento de los datos derivados del ELISA

Los valores de concentración de cada una de las moléculas se calcularon interpolando los valores de absorbancia de cada muestra en una curva patrón creada con una regresión logística de 4 ó 5 parámetros, en función de las recomendaciones del kit, a partir de muestras de concentración conocida utilizando el programa *MyAssays* (<u>www.myassays.com</u>).

2.7. Análisis estadístico

Los resultados de los estudios celulares funcionales *in vitro* se muestran como el área total (μ m²) de las estructuras tubulares por imagen, mientras que los resultados de la frecuencia celular de EPC y TAng, la expresión génica y los niveles proteicos de cada molécula estudiada se expresan como la media ± DE para cada grupo de estudio.

La comparación entre dos grupos de estudio se llevó a cabo mediante el test t de Student.

La asociación entre la frecuencia de cada tipo celular y las variables continuas y categóricas de las características demográficas y clínicas de los pacientes se analizó mediante el análisis de correlación de Pearson y el análisis de varianza unifactorial, respectivamente.

La diferencia de expresión de cada gen estudiado se calculó como el ratio entre las medias (R.m) de cada grupo. En este sentido, un valor de R.m mayor de 1 indica que la expresión del gen está aumentada. Por el contrario, un valor de R.m menor de 1 indica que la expresión del gen está disminuida y en estos casos, para presentar los resultados de una manera biológicamente significativa, la diferencia de expresión se definió como la inversa negativa de R.m (-1/R.m).

En cuanto a los estudios de genotipado, las frecuencias genéticas se expresaron como % (n). Se compararon las frecuencias genotípicas, alélicas, de portadores del alelo minoritario de cada uno de los polimorfismos evaluados y haplotípicas entre los distintos grupos de estudio mediante la prueba chi-cuadrado (χ^2) o el test exacto de Fisher cuando las frecuencias esperadas fueron inferiores a 5. Así mismo, se calculó la razón de ventajas "*odds ratios*" (OR) de cada genotipo/alelo/portador del alelo minoritario/haplotipo respecto del grupo de referencia para cuantificar la magnitud de la asociación, con un intervalo de confianza (IC) del 95%. En todos los casos, se consideró como grupo de referencia al grupo de individuos con el genotipo/alelo mayoritario, así como con los portadores del alelo mayoritario y el haplotipo mayoritario en PS, según corresponda. Teniendo en cuenta que se analizaron 5 SNPs de *VEGF*, los resultados se ajustaron por el test de Bonferroni.

Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando la p fue igual o inferior a 0,05, con la excepción de los estudios genéticos en los que se estableció una p igual o inferior a 0,01.

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa estadístico STATA 12/SE (Stata Corp., College Station, TX, USA).

63

1. Resultados derivados del Objetivo 1

Alteración de los marcadores celulares (EPC y TAng) y moleculares (VEGF) implicados en la formación, reparación y remodelación de los vasos sanguíneos en la EA-EPI⁺

1.1 CAPACIDADES FUNCIONALES DE LAS EPC EN CULTIVO CONDICIONADAS POR LA DISPONIBILIDAD DE O2

El estudio de las capacidades funcionales de las EPC requirió una primera etapa de diferenciación en cultivo a partir de sangre periférica de las ECFC para posteriormente exponerlas a condiciones de hipoxia y normoxia.

Por un lado, las ECFC fueron capaces de proliferar en cultivo tras 3 días de incubación. La proliferación celular fue similar entre los cultivos incubados en normoxia y aquéllos expuestos a condiciones de hipoxia, sin afectar, por lo tanto, la concentración de O₂ a la capacidad de proliferación de las ECFC (**Figura 16**).



Figura 16. Capacidad de proliferación celular de las ECFC en cultivo en condiciones de normoxia e hipoxia. Se representa el nº de ECFC/mL tras 3 días de incubación en normoxia e hipoxia, partiendo en ambos casos de un total de 1x10⁵ células/mL.

Por otro lado, las ECFC fueron capaces por sí mismas de organizarse en estructuras tubulares sobre una matriz de Matrigel. Sin embargo, cuando los cultivos se expusieron a diferentes concentraciones de O₂, la capacidad tubulogénica de las ECFC variaba significativamente. En particular, tras 3 días de incubación se observó que los cultivos de ECFC expuestos a un 5% de O₂ (hipoxia) formaron estructuras tubulares de menor área que aquellos cultivos de ECFC en condiciones de normoxia (**Figuras 17 y 18**).



Figura 17. Microfotografías representativas del ensayo in vitro 3D de tubulogénesis en Matrigel de las ECFC al microscopio confocal (x100). Estructuras tubulares teñidas en verde con calceína AM en condiciones de normoxia (a) e hipoxia (b).



Figura 18. Diferencias en el área de las estructuras tubulares formadas por las ECFC en cultivo en condiciones de normoxia e hipoxia. Las barras horizontales indican el valor medio de cada condición.

1.2 PAPEL DE LAS EPC Y LAS TAng EN LOS PROCESOS PATOLÓGICOS DE LA VASCULOPATÍA Y LA FIBROSIS PULMONAR EN LA EA-EPI⁺

1.2.1 EPC relevantes en el daño endotelial vascular y la fibrosis pulmonar en la EA-EPI+

El estudio de las EPC en la patología vascular de la EA-EPI⁺ reveló una frecuencia mayor de estas células en los pacientes con EA-EPI⁺ en comparación con las PS (p<0,001, **Figura 19a, Tabla S1**). De la misma manera, la estratificación en función de la EA subyacente mostró que las frecuencias de las EPC estaban aumentadas en los pacientes con AR-EPI⁺, ES-EPI⁺ y otras EA-EPI⁺ en relación con la de las PS (p<0,001 en los tres casos, **Figura 19b-d, Tabla S1**).

Además, se analizó el papel de las EPC en el proceso patológico de la fibrosis. En este sentido, se encontró que la frecuencia de estas células en los pacientes con EA-EPI⁺ fue significativamente diferente a la de los grupos control de pacientes. Así, los pacientes con EA-EPI⁺ mostraron frecuencias de EPC más altas que aquéllos con EA-EPI⁻, mientras que éstas eran más bajas que en los pacientes con FPI (p=0,002 y p<0,001, respectivamente, **Figura 19a, Tabla S1**).

Teniendo en cuenta la EA subyacente, los pacientes con AR-EPI⁺ exhibieron una frecuencia de EPC mayor que aquéllos con AR-EPI⁻, aunque menor que los pacientes con FPI (p=0,003 y p<0,001, respectivamente, **Figura 19b, Tabla S1**). Los resultados fueron similares en los pacientes con ES, ya que la frecuencia de las EPC estaba aumentada en los pacientes con ES-EPI⁺ en relación con aquéllos con ES-EPI⁻, mientras que fue notablemente menor que en los pacientes con FPI (p=0,012 y p<0,001, respectivamente, **Figura 19c, Tabla S1**). Asimismo, se observó que aquéllos con otras EA-EPI⁺ también presentaban frecuencias más bajas que las de los pacientes con FPI (p<0,001, **Figura 19d, Tabla S1**).



Figura 19. Diferencias en la frecuencia de las EPC entre todos los grupos de estudio. (*a*) Pacientes con EA-EPI⁺, EA-EPI⁻, FPI y PS; (*b*) Pacientes con AR-EPI⁺, AR-EPI⁻, FPI y PS; (*c*) Pacientes con ES-EPI⁺, ES-EPI⁻, FPI y PS; (*d*) Pacientes con otras EA-EPI⁺, FPI y PS. Las barras horizontales indican el valor medio de cada grupo de estudio. Los resultados significativos se destacan en **negrita**.

1.2.2 Disminución de TAng en los procesos fibróticos asociados con la EA-EPI+

En el marco de la vasculopatía, los pacientes con EA-EPI⁺ mostraron una frecuencia de TAng significativamente menor que las PS (p<0,001, **Figura 20a, Tabla S1**). El análisis de la frecuencia de TAng en función de la EA demostró que los resultados eran similares a los descritos en todo el grupo de EA-EPI⁺ ya que las frecuencias de TAng estaban significativamente disminuidas en los pacientes con AR-EPI⁺, ES-EPI⁺ y otras EA-EPI⁺ en relación con las PS (p=0,007, p=0,016 y p=0,005, respectivamente, **Figura 20b-d**, **Tabla S1**).

Por otro lado, se estudió la función de las TAng en la patología de la fibrosis. En este sentido, las frecuencias de TAng fueron similares en los pacientes con EA-EPI⁺ y aquéllos con FPI, mientras que las frecuencias de aquéllos con EA-EPI⁺ fueron significativamente menores en relación con aquéllos con EA-EPI⁻ (p<0,001, **Figura 20a**, **Tabla S1**).

Tras estratificar según la EA presente, los pacientes con AR-EPI⁺ presentaron frecuencias de TAng significativamente menores en relación con aquellos pacientes con AR-EPI⁻ (p=0,006), mientras que éstas eran semejantes a las de los pacientes con FPI (**Figura 20b**, **Tabla S1**). En línea con estos resultados, no se encontraron diferencias en la frecuencia de TAng entre los pacientes con ES-EPI⁺ y con FPI, aunque las frecuencias de aquéllos con ES-EPI⁺ fueron significativamente menores que las de los pacientes con ES-EPI⁻ (p=0,044, **Figura 20c, Tabla S1**). Así mismo, las frecuencias de TAng de los pacientes con otras EA-EPI⁺ fueron similares a las de aquéllos con FPI (**Figura 20d, Tabla S1**).



Figura 20. Diferencias en la frecuencia de TAng entre todos los grupos de estudio. (a) Pacientes con EA-EPI⁺, EA-EPI⁻, FPI y PS; (b) Pacientes con AR-EPI⁺, AR-EPI⁻, FPI y PS; (c) Pacientes con ES-EPI⁺, ES-EPI⁻, FPI y PS; (d) Pacientes con otras EA-EPI⁺, FPI y PS. Las barras horizontales indican el valor medio de cada grupo de estudio. Los resultados significativos se destacan en **negrita**.

1.2.3 Frecuencias celulares asociadas con características demográficas y clínicas de los pacientes con EA-EPI⁺

• Correlación de EPC y TAng con las características de los pacientes con AR-EPI+

En los pacientes con AR-EPI⁺ se observó una asociación de la frecuencia de TAng con el sexo (**Tabla 9**). En particular, los hombres con AR-EPI⁺ mostraron frecuencias de TAng más bajas que las mujeres (p<0,01, **Tabla 9**). En cambio, no se observó una asociación de las EPC con el sexo. De igual manera, no se observó una asociación de la frecuencia de EPC y TAng con la duración de la AR, PCR, VSG, así como las PFR en estos pacientes (**Tabla 9**). Por otro lado, tampoco se encontraron diferencias en la frecuencia de EPC y TAng cuando los pacientes con AR-EPI⁺ se estratificaron según el historial de tabaquismo, la presencia de FR/ACPA, el patrón radiológico o las terapias recibidas (**Tabla 9**).

	EPC		TAng								
Variable	r	р	r	р							
Duración AR (años)	-0,19	0,42	-0,16	0,50							
PCR (mg/dl)	-0,06	0,79	0,02	0,94							
VSG (mm/ hora)	-0,34	0,10	-0,18	0,44							
CVF (% predicho)	0,07	0,76	0,13	0,58							
FEV1 (% predicho)	-0,07	0,77	0,18	0,43							
FEV1/CVF (% predicho)	-0,03	0,89	0,18	0,44							
DLCO (% predicho)	0,38	0,22	0,15	0,62							
Categoría	Media ± DE	р	Media ± DE	р							
Hombre	$0,041 \pm 0,022$		9,745 ± 4,117	∠ 0.01							
Mujer	$0,055 \pm 0,024$	0,17	16,436 ± 5,974	<0,01							
No Fumador	$0,059 \pm 0,020$	0.20	15,498 ± 5,634	0.24							
Fumador	$0,043 \pm 0,024$	0,20	12,018 ± 5,857	0,24							
FR-	$0,061 \pm 0,034$	0.31	13,589 ± 3,292	0 79							
FR⁺	$0,047 \pm 0,020$	0,51	12,521 ± 6,498	0,79							
Patrón TCAR NIU	$0,043 \pm 0,020$	0.15	12,400 ± 6,338	0.76							
Patrón TCAR NINE	$0,059 \pm 0,025$	0,15	13,363 ± 6,551	0,70							
No FAMEcs	$0,036 \pm 0,099$	0.20	9,887 ± 4,324	0.21							
FAMEcs	$0,049 \pm 0,025$	0,39	13,609 ± 5,857	0,31							
No FAMEb	$0,047 \pm 0,034$	0.00	16,253 ± 8,282	0.15							
FAMEb	$0,047 \pm 0,020$	0,99	11,983 ± 4,464	0,15							
Los resultados significativos	se destacan en n	egrita.									

Tabla 9. Correlación de la frecuencia de EPC y TAng con las características demográficas y clínicas de los pacientes con AR-EPI⁺.

• Correlación de EPC y TAng con las características de los pacientes con ES-EPI+

En los pacientes con ES-EPI⁺ se encontró una correlación negativa entre la frecuencia de EPC y la duración de la ES (r=-0,45, p=0,04, **Tabla 10**). Dada esta asociación con las EPC, los pacientes con ES-EPI⁺ y ES-EPI⁻ se estratificaron por la duración de la ES. En este sentido, la frecuencia de EPC fue mayor en los pacientes con ES-EPI⁺, tanto precoz como tardía, en comparación con las PS (p<0,001 en ambos casos, **Figura 21a**). No se observaron diferencias significativas entre los pacientes con ES-EPI⁺ precoz y tardía (**Figura 21a**). En cuanto a la ES-EPI⁻, los pacientes con ES-EPI⁻ precoz mostraron frecuencias de EPC significativamente más altas que las PS (p=0,030, **Figura 21b**), mientras que aquéllos con ES-EPI⁻ tardía y las PS presentaron frecuencias semejantes (**Figura 21b**). Igualmente, no se observaron diferencias significativas entre los pacientes con ES-EPI⁻ precoz y tardía (**Figura 21b**). Asimismo, en los pacientes con ES-EPI⁺ la frecuencia de EPC se asoció con el sexo, siendo ésta más alta en los hombres en comparación con las mujeres (p=0,04, **Tabla 10**).

Por otro lado, se encontró una correlación positiva entre la frecuencia de las TAng y el ratio FEV1/CVF en los pacientes con ES-EPI⁺ (r=0,48; p=0,03, **Tabla 10**). Asimismo, cuando se analizaron los pacientes en función de la presencia o ausencia de anti-Scl70, aquéllos positivos para anti-Scl70 presentaron frecuencias de TAng significativamente más altas que aquéllos que eran negativos para este anticuerpo (p=0,03, **Tabla 10**). Sin embargo, estas asociaciones no se encontraron con las EPC (**Tabla 10**).

Del mismo modo, no se halló una relación significativa de la frecuencia de EPC y TAng con la PCR, y la VSG. Se observaron los mismos resultados cuando los pacientes con ES-EPI⁺ se estratificaron según el historial de tabaquismo, la presencia de ANA/AAC, la presencia de HAP, el patrón radiológico o las diferentes terapias recibidas (**Tabla 10**).

	EPC					
Variable	r	р	r	р		
Duración de ES (años)	-0,45	0,04	0,04	0,86		
PCR (mg/dl)	-0,08	0,76	0,31	0,22		
VSG (mm/hora)	-0,25	0,33	-0,17	0,51		
CVF (% predicho)	-0,24	0,30	-0,06	0,79		
FEV1 (% predicho)	-0,19	0,40	-0,02	0,94		
FEV1/CVF (% predicho)	0,07	0,74	0,48	0,03		
DLCO (% predicho)	-0,00	0,10	-0,06	0,77		
Categoría	Media ± DE	р	Media ± DE	р		
Hombre	$0,045 \pm 0,021$	0.04	10,304 ± 5,669	0.07		
Mujer	$0,030 \pm 0,007$	0,04	15,022 ± 5,250	0,07		
No Fumador	$0,022 \pm 0,018$	0.50	14,969 ± 5,198	0 19		
Fumador	$0,040 \pm 0,014$	0,00	11,640 ± 6,039	-,		
Scl70-	$0,033 \pm 0,011$	0 35	10,301 ± 5,093	0.03		
Scl70⁺	$0,040 \pm 0,193$	0,33	15,725 ± 5,441	0,03		
No HAP	$0,033 \pm 0,013$	0.07	12,375 ± 6,077	0.27		
HAP	$0,052 \pm 0,028$	0,07	15,864 ± 5,152	0,37		
Patrón TCAR NINE	$0,032 \pm 0,010$	0.26	13,523 ± 6,609	0.70		
Patrón TCAR NIU	$0,039 \pm 0,023$	0,36	12,376 ± 4,282	0,70		
No FAMEcs	$0,034 \pm 0,014$	0.78	10,523 ± 4,968	0.24		
FAMEcs	$0,036 \pm 0,017$	0,78	14,069 ± 5,884	0,24		
No Rituximab	0,039 ± 0,018	0.12	13,049 ± 5,808	0.85		
Rituximab	$0,029 \pm 0,005$	0,13	13,577 ± 6,138	0,65		
No Vasodilatadores	$0,027 \pm 0,006$	0.05	15,065 ± 3,893	0.26		
Vasodilatadores	$0,041 \pm 0,018$	0,03	12,093 ± 6,558	0,20		
Los resultados significativos se de	estacan en negrit e	<i>a</i> .				

Tabla 10. Correlación de la frecuencia de EPC y TAng con las características demográficas y clínicas de la ES-EPI⁺.



Figura 21. Frecuencia de EPC en los pacientes con ES-EPI⁺ y ES-EPI⁻ estratificados según la duración de la ES y en las PS. (a) Frecuencia de las EPC en los pacientes con ES-EPI⁺ precoz y tardía y las PS. (b) Frecuencia de las EPC en los pacientes con ES-EPI⁻ precoz y tardía y las PS. Las barras horizontales indican el valor medio de cada grupo de estudio. Los resultados significativos se destacan en negrita.

• Correlación de EPC y TAng con las características de los pacientes con otras EA-EPI+

Se encontraron diferencias en la frecuencia de TAng cuando los pacientes con otras EA-EPI⁺ se estratificaron según el patrón radiológico (**Tabla 11**). Concretamente, los pacientes que presentaron un patrón NIU tenían frecuencias de TAng más altas que aquéllos con un patrón NINE (p=0,03, **Tabla 11**). Dicha asociación no se encontró en el caso de las EPC (**Tabla 11**).

Tampoco se observó una asociación de EPC y TAng con las PFR, el sexo, el historial de tabaquismo, la presencia de los diferentes autoanticuerpos o el tratamiento de los pacientes con otras EA-EPI⁺ (**Tabla 11**).

	EPC		TAng			
Variable	r	р	r	р		
CVF (% predicho)	-0,48	0,07	-0,27	0,32		
FEV1 (% predicho)	-0,50	0,05	-0,27	0,32		
FEV1/CVF (% predicho)	-0,02	0,95	0,15	0,59		
DLCO (% predicho)	-0,28	0,41	-0,36	0,27		
Categoría	$Media \pm DE$	р	Media ± DE	р		
Hombre	$0,034 \pm 0,018$	0.25	11,924 ± 8,968	0.84		
Mujer	$0,025 \pm 0,010$	0,33	11,052 ± 4,923	0,04		
No Fumador	$0,025 \pm 0,191$	0.20	17,833 ± 7,299	0.06		
Fumador	$0,033 \pm 0,015$	0,39	9,378 ± 6,736	0,00		
ANA ⁻	$0,018 \pm 0,006$	0.10	9,486 ± 1,466	0.49		
ANA ⁺	$0,032 \pm 0,017$	0,10	13,293 ± 8,981	0,49		
Ac Miopatías Inflamatorias-	$0,034 \pm 0,021$	0.42	13,845 ± 11,355	0.59		
Ac Miopatías Inflamatorias ⁺	$0,026 \pm 0,010$	0,42	11,097 ± 4,379	0,59		
Anti-SSA (Ro) ⁻	$0,028 \pm 0,015$	0.72	14,999 ± 10,352	0.65		
Anti-SSA (Ro)+	$0,025 \pm 0,010$	0,72	11,0833 ± 6,790	0,05		
Anti-SSB (La) ⁻	$0,028 \pm 0,014$	0.79	13,995 ± 9,816	0.08		
Anti-SSB (La)+	$0,025 \pm 0,015$	0,79	13,765 ± 8,356	0,90		
Patrón TCAR NINE	$0,033 \pm 0,017$	0.68	6,425 ± 3,991	0.02		
Patrón TCAR NIU	$0,030 \pm 0,017$	0,00	15,105 ± 7,685	0,03		
No Antifibróticos	$0,029 \pm 0,015$	0.20	11,082 ± 6,879	0.60		
Antifibróticos	$0,040 \pm 0,023$	0,30	13,838 ± 11,930	0,00		
No FAMEcs	$0,030 \pm 0,016$	0.53	10,847 ± 7,124	0.34		
FAMEcs	$0,038 \pm 0,019$	0,00	16,743 ± 12,408	0,04		
No FAMEb	$0,032 \pm 0,018$	0.72	11,653 ± 6,385	0.98		
FAMEb	$0,028 \pm 0,005$	0,72	11,552 ± 13,691	0,90		
Los resultados significativos se de	stacan en negrit i	a				

Tabla 11. Correlación de la frecuencia de EPC y TAng con las características demográficas y clínicas de los pacientes con otras EA-EPI⁺.

1.3 RELEVANCIA DE VEGF EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA EA-EPI+

1.3.1 El gen VEGF involucrado en la EA-EPI+

Se estudió en primer lugar la implicación de los polimorfismos rs833061, rs1570360, rs2010963, rs3025020 y rs3025039 en la vasculopatía de la EA-EPI⁺. En este sentido, se encontró que la frecuencia tanto de los genotipos GA y AA, como del alelo A y el portador del alelo A del polimorfismo rs1570360 fue más baja en los pacientes con EA-EPI⁺ en comparación con las PS (GA: OR=0,30 [0,10-0,94], p=0,04; AA: OR=0,15 [0,03-0,82], p=0,03; alelo A: OR=0,33 [0,15-0,72], p=0,005; portador alelo A: OR=0,26 [0,01-0,75], p=0,01) (**Tabla 12**), siendo estadísticamente significativo para el alelo A y los portadores del alelo A (**Figura 22a**).

Asimismo, se observó que la frecuencia del alelo C del polimorfismo rs2010963 fue significativamente mayor en los pacientes con EA-EPI⁺ que en las PS (OR= 3,04 [1,28-7,17], p=0,01, **Tabla 12, Figura 22b**). En línea con estos resultados, cabe mencionar que los pacientes con EA-EPI⁺ portaban el alelo C con una frecuencia más alta que las PS (OR= 3,25 [1,14-9,26], p=0,03, **Tabla 12**), aunque este resultado no se consideró estadísticamente significativo.

No obstante, cuando se analizaron los pacientes con EA-EPI⁺ en comparación con las PS no se obtuvieron diferencias significativas en las frecuencias genotípicas, alélicas y de portadores del resto de los polimorfismos, así como en las frecuencias haplotípicas (**Tablas 12 y 13**).

En segundo lugar, se observó que las frecuencias genotípicas, alélicas y de portadores de los polimorfismos estudiados fueron similares en los pacientes con EA-EPI⁺, EA-EPI⁻ y FPI (**Tabla 14**). A nivel haplotípico se obtuvieron los mismos resultados (**Tabla 15**). Adicionalmente, no se observaron diferencias genéticas al comparar los pacientes con AR-EPI⁺ y AR-EPI⁻ ni entre los pacientes con ES-EPI⁺ y ES-EPI⁻ (**Tablas 16** y **17**).



Figura 22. Diferencias en la frecuencia del alelo A y portadores del alelo A del polimorfismo rs1570360 (a) y del alelo C del polimorfismo rs2010963 (b) de VEGF entre los pacientes con EA-EPI⁺ y las PS.

		Pa	cientes EA	-EPI ⁺ versus PS	Pac	ientes EA-	EPI- <i>versus</i> PS		Pacientes FPI versus PS				
Polimorfismo	Genotipo/	EA-EPI+	PS			EA-EPI-	PS			FPI	PS		
VEGF	Alelo/ Portador	% (n)	% (n)	OK [95% IC]	р	% (n)	% (n)	OK [95% IC]	р	% (n)	% (n)	OK [95% IC]	р
rs833061	TT	44,4 (24)	23,8 (5)	Referencia	-	33,3 (15)	23,8 (5)	Referencia	-	28,6 (6)	23,8 (5)	Referencia	-
	TC	35,2 (19)	42,9 (9)	0,44 [0,13-1,53]	0,20	44,4 (20)	42,9 (9)	0,74 [0,21-2,67]	0,65	52,4 (11)	42,9 (9)	1,02 [0,23-4,47]	0,98
	CC	20,4 (11)	33,3 (7)	0,33 [0,08-1,26]	0,11	22,3 (10)	33,3 (7)	0,48 [0,12-1,93]	0,30	19,0 (4)	33,3 (7)	0,48 [0,09-2,63]	0,40
	Т	62,0 (67)	45,2 (19)	Referencia	-	55 <i>,</i> 6 (50)	45,2 (19)	Referencia	-	54,8 (23)	45,2 (19)	Referencia	-
	С	38,0 (41)	54,8 (23)	0,51 [0,25-1,04]	0,06	44,4 (40)	54,8 (23)	0,66 [0,32-1,38]	0,27	45,2 (19)	54,8 (23)	0,68 [0,29-1,61]	0,38
	No portador de C	44,4 (24)	23,8 (5)	Referencia		33,3 (15)	23,8 (5)	Referencia	-	28,6 (6)	23,8 (5)	Referencia	-
	Portador de C	55,6 (30)	76,2 (16)	0,39 [0,13-1,22]	0,11	66,7 (30)	76,2 (16)	0,63 [0,19-2,03]	0,44	71,4 (15)	76,2 (16)	0,78 [0,20-3,11]	0,73
rs1570360	GG	66,0 (35)	33,3 (7)	Referencia	-	48,9 (22)	33,3 (7)	Referencia	-	57,1 (12)	33,3 (7)	Referencia	
	GA	28,3 (15)	47,6 (10)	0,30 [0,10-0,94]	0,04	33,3 (15)	47,6 (10)	0,48 [0,15-1,53]	0,21	28,6 (6)	47,6 (10)	0,35 [0,09-1,39]	0,14
	AA	5,7 (3)	19,1 (4)	0,15 [0,03-0,82]	0,03	17,8 (8)	19,1 (4)	0,64 [0,15-2,77]	0,55	14,3 (3)	19,1 (4)	0,44 [0,08-2,55]	0,36
	G	80,2 (85)	57,1 (24)	Referencia	-	65,6 (59)	57,1 (24)	Referencia	-	71,4 (30)	57,1 (24)	Referencia	-
	А	19,8 (21)	42,9 (18)	0,33 [0,15-0,72]	0,005	34,4 (31)	42,9 (18)	0,70 [0,33-1,48]	0,35	28,6 (12)	42,9 (18)	0,53 [0,22-1,32]	0,17
	No portador de A	66,0 (35)	33,3 (7)	Referencia	-	48,9 (22)	33,3 (7)	Referencia	-	57,1 (12)	33,3 (7)	Referencia	-
	Portador de A	34,0 (18)	66,7 (14)	0,26 [0,01-0,75]	0,01	51,1 (23)	66,7 (14)	0,52 [0,18-1,54]	0,24	42,9 (9)	66,7 (14)	0,38 [0,11-1,31]	0,13
rs2010963	GG	33,3 (18)	61,9 (13)	Referencia	-	46,6 (21)	61,9 (13)	Referencia	-	33,3 (7)	61,9 (13)	Referencia	-
	GC	50,0 (27)	38,1 (8)	2,44 [0,84-7,06]	0,10	37,8 (17)	38,1 (8)	1,32 [0,44-3,91]	0,62	47,6 (10)	38,1 (8)	2,32 [0,63-8,58]	0,21
	CC	16,7 (9)	0,0 (0)	-	-	15,6 (7)	0,0 (0)	-	-	19,1 (4)	0,0 (0)	-	-
	G	58,3 (63)	81,0 (34)	Referencia	-	65,6 (59)	81,0 (34)	Referencia	-	57,1 (24)	81,0 (34)	Referencia	-
	С	41,7 (45)	19,0 (8)	3,04 [1,28-7,17]	0,01	34,4 (31)	19,0 (8)	2,23 [0,92-5,41]	0,08	42,9 (18)	19,0 (8)	3,19 [1,19-8,52]	0,02
	No portador de C	33,3 (18)	61,9 (13)	Referencia	-	46,7 (21)	61,9 (13)	Referencia	-	33,3 (7)	61,9 (13)	Referencia	-
Portador de C 66,7 (36) 38,1 (8) 3,25 [1,14-9,26] 0,03 53,3 (24) 38,1 (8) 1,86 [0,64-5,35] 0,25 66,7 (14) 38,1 (8) 3,25 [0,92-11,51] (9,14) (9													0,07
Los resultados signif	icativos se destacan en n	iegrita.											

Tabla 12. Comparación de las frecuencias genotípicas, alélicas y de portadores de los polimorfismos de VEGF en los pacientes con EA-EPI⁺, EA-EPI⁻ y FPI en relación con las PS.

		Pa	cientes EA	-EPI+ versus PS		Pac	ientes EA-l	EPI [.] versus PS		Pacientes FPI versus PS			
Polimorfismo VEGF	Genotipo/ Alelo/ Portador	EA-EPI+ % (n)	PS % (n)	OR [95% IC]	p	EA-EPI ⁻ % (n)	PS % (n)	OR [95% IC]	р	FPI % (n)	PS % (n)	OR [95% IC]	р
rs3025020	CC	53,7 (29)	52,4 (11)	Referencia	-	51,1 (23)	52,4 (11)	Referencia	-	38,1 (8)	52,4 (11)	Referencia	
	СТ	37,0 (20)	38,1 (8)	0,95 [0,32-2,78]	0,92	42,2 (19)	38,1 (8)	1,14 [0,38-3,40]	0,82	52,4 (11)	38,1 (8)	1,89 [0,52-6,85]	0,33
	TT	9,3 (5)	9,5 (2)	0,95 [0,16-5,63]	0,95	6,7 (3)	9,5 (2)	0,72 [0,10-4,93]	0,74	9,5 (2)	9,5 (2)	1,38 [0,16-11,94]	0,77
	С	72,2 (78)	71,4 (30)	Referencia	-	72,2 (65)	71,4 (30)	Referencia	-	64,3 (27)	71,4 (30)	Referencia	-
	Т	27,8 (30)	28,6 (12)	0,96 [0,44-2,12]	0,92	27,8 (25)	28,6 (12)	0,96 [0,43-2,17]	0,93	35,7 (15)	28,6 (12)	1,39 [0,55-3,49]	0,48
	No portador de T	53,7 (29)	52,4 (11)	Referencia	-	51,1 (23)	52,4 (11)	Referencia	-	38,1 (8)	52,4 (11)	Referencia	-
	Portador de T	46,3 (25)	47,6 (10)	0,95 [0,35-2,60]	0,92	48,9 (22)	47,6 (10)	1,05 [0,37-2,97]	0,92	61,9 (13)	47,6 (10)	1,79 [0,52-6,11]	0,35
rs3025039	CC	70,4 (38)	71,4 (15)	Referencia	-	73,3 (33)	71,4 (15)	Referencia	-	66,7 (14)	71,4 (15)	Referencia	-
	СТ	25,9 (14)	28,6 (6)	0,92 [0,30-2,84]	0,89	24,4 (11)	28,6 (6)	0,83 [0,26-2,68]	0,76	33,3 (7)	28,6 (6)	1,25 [0,34-4,64]	0,74
	TT	3,7 (2)	0,0 (0)	-	-	2,3 (1)	0,0 (0)	-	-	0,0 (0)	0,0 (0)	-	-
	С	83,3 (90)	85,7 (36)	Referencia	-	85,6 (77)	85,7 (36)	Referencia	-	83,3 (35)	85,7 (36)	Referencia	-
	Т	16,7 (18)	14,3 (6)	1,20 [0,44-3,27]	0,72	14,4 (13)	14,3 (6)	1,01 [0,36-2,88]	0,98	16,7 (7)	14,3 (6)	1,20 [0,37-3,93]	0,76
	No portador de T	70,4 (38)	71,4 (15)	Referencia	-	73,3 (33)	71,4 (15)	Referencia	-	66,7 (14)	71,4 (15)	Referencia	-
	Portador de T	29,6 (16)	28,6 (6)	1,05 [0,35-3,20]	0,93	26,7 (12)	28,6 (6)	0,91 [0,29-2,88]	0,87	33,3 (7)	28,6 (6)	1,25 [0,34-4,64]	0,74

Continuación Tabla 12. Comparación de las frecuencias genotípicas, alélicas y de portadores de los polimorfismos de VEGF en los pacientes con EA-EPI⁺, EA-EPI⁻ y FPI en relación con las PS.

	I	Pacientes EA	-EPI ⁺ versus PS		Р	EPI-versus PS	Pacientes FPI versus PS					
*Haplotipos VEGF	EA-EPI+ % (n)	PS % (n)	OR [95% IC]	р	EA-EPI ⁻ % (n)	PS % (n)	OR [95% IC]	р	FPI % (n)	PS % (n)	OR [95% IC]	р
TGGCC	29,3 (31)	35,7 (15)	Referencia	-	32,2 (29)	35,7 (15)	Referencia	-	28,6 (12)	35,7 (15)	Referencia	-
CAGCC	5,7 (6)	14,3 (6)	0,48 [0,13-1,76]	0,27	10,0 (9)	14,3 (6)	0,78 [0,23-2,59]	0,68	7,1 (3)	14,3 (6)	0,63 [0,13-3,03]	0,56
CAGTC	6,6 (7)	9,5 (4)	0,85 [0,21-3,35]	0,81	8,9 (8)	9,5 (4)	1,03 [0,27-4,00]	0,96	9,5 (4)	9,5 (4)	1,25 [0,26-6,07]	0,78
CAGTT	0,0 (0)	7,1 (3)	-	-	2,2 (2)	7,1 (3)	0,34 [0,05-2,29]	0,27	2,4 (1)	7,1 (3)	0,42 [0,04-4,53]	0,47
CGGCC	6,6 (7)	7,1 (3)	1,13 [0,26-4,99]	0,87	5,6 (5)	7,1 (3)	0,86 [0,18-4,11]	0,85	2,4 (1)	7,1 (3)	0,42 [0,04-4,53]	0,47
TGCCC	14,2 (15)	7,1 (3)	2,42 [0,61-9,66]	0,21	10,0 (9)	7,1 (3)	1,55 [0,36-6,60]	0,55	14,3 (6)	7,1 (3)	2,50 [0,51-12,14]	0,26
CGGTC	3,8 (4)	4,8 (2)	0,97 [0,16-5,89]	0,97	1,1 (1)	4,8 (2)	0,26 [0,02-3,09]	0,29	2,4 (1)	4,8 (2)	0,63 [0,05-7,75]	0,71
CACCC	1,9 (2)	2,4 (1)	0,97 [0,08-11,54]	0,98	0,0 (0)	2,4 (1)	-	-	0,0 (0)	2,4 (1)	-	-
CACCT	0,0 (0)	2,4 (1)	-	-	1,1 (1)	2,4 (1)	0,52 [0,03-8,86]	0,65	2,4 (1)	2,4 (1)	1,25 [0,07-22,13]	0,88
CACTC	4,7 (5)	2,4 (1)	2,42 [0,26-22,58]	0,44	8,9 (8)	2,4 (1)	4,14 [0,47-36,25]	0,20	4,8 (2)	2,4 (1)	2,50 [0,20-31,00]	0,48
CACTT	0,0 (0)	2,4 (1)	-	-	0,0 (0)	2,4 (1)	-	-	0,0 (0)	2,4 (1)	-	-
CAGCT	0,9 (1)	2,4 (1)	0,48 [0,03-8,28]	0,62	2,2 (2)	2,4 (1)	1,03 [0,09-12,35]	0,98	2,4 (1)	2,4 (1)	1,25 [0,07-22,13]	0,88
TGCTC	6,6 (7)	2,4 (1)	3,39 [0,38-30,09]	0,27	3,3 (3)	2,4 (1)	1,55 [0,15-16,23]	0,71	2,4 (1)	2,4 (1)	1,25 [0,07-22,13]	0,88

Tabla 13. Comparación de las frecuencias haplotípicas de VEGF en los pacientes con EA-EPI⁺, EA-EPI⁻ y FPI en relación con las PS.

*El orden de los polimorfismos fue rs833061, rs1570360, rs2010963, rs3025020 y rs3025039.

		Pacientes EA-EPI ⁺ versus EA-EPI ⁻				Pa	cientes EA-I	EPI+ <i>versus</i> FPI		Pacientes EA-EPI versus FPI				
Polimorfismo VEGF	Genotipo /Alelo/ Portador	EA-EPI⁺ % (n)	EA-EPI ⁻ % (n)	OR [95% IC]	р	EA-EPI+ % (n)	FPI % (n)	OR [95% IC]	p	EA-EPI ⁻ % (n)	FPI % (n)	OR [95% IC]	р	
rs833061	TT	44,4 (24)	33,3 (15)	Referencia	-	44,4 (24)	28,6 (6)	Referencia	-	33,3 (15)	28,6 (6)	Referencia	-	
	TC	35,2 (19)	44,4 (20)	0,59 [0,24-1,46]	0,26	35,2 (19)	52,4 (11)	0,43 [0,14-1,38]	0,16	44,4 (20)	52,4 (11)	0,73 [0,22-2,41]	0,60	
	CC	20,4 (11)	22,3 (10)	0,69 [0,24-2,00]	0,49	20,4 (11)	19,0 (4)	0,69 [0,16-2,94]	0,61	22,3 (10)	19,0 (4)	1,00 [0,22-4,47]	1,00	
	Т	62,0 (67)	55,6 (50)	Referencia	-	62,0 (67)	54,8 (23)	Referencia	-	55,6 (50)	54,8 (23)	Referencia	-	
	С	38,0 (41)	44,4 (40)	0,76 [0,43-1,35]	0,36	38,0 (41)	45,2 (19)	0,74 [0,36-1,52]	0,42	44,4 (40)	45,2 (19)	0,97 [0,46-2,02]	0,93	
	No portador de C	44,4 (24)	33,3 (15)	Referencia	-	44,4 (24)	28,6 (6)	Referencia	-	33,3 (15)	28,6 (6)	Referencia	-	
	Portador de C	55,6 (30)	66,7 (30)	0,63 [0,28-1,42]	0,26	55,6 (30)	71,4 (15)	0,50 [0,17-1,48]	0,21	66,7 (30)	71,4 (15)	0,80 [0,26-2,48]	0,70	
rs1570360	GG	66,0 (35)	48,9 (22)	Referencia	-	66,0 (35)	57,1 (12)	Referencia	-	48,9 (22)	57,1 (12)	Referencia	-	
	GA	28,3 (15)	33,3 (15)	0,63 [0,26-1,53]	0,31	28,3 (15)	28,6 (6)	0,86 [0,27-2,71]	0,79	33,3 (15)	28,6 (6)	1,36 [0,42-4,44]	0,61	
	AA	5,7 (3)	17,8 (8)	0,24 [0,06-0,99]	0,05	5,7 (3)	14,3 (3)	0,34 [0,06-1,93]	0,23	17,8 (8)	14,3 (3)	1,45 [0,32-4,53]	0,63	
	G	80,2 (85)	65,6 (59)	Referencia	-	80,2 (85)	71,4 (30)	Referencia	-	65,6 (59)	71,4 (30)	Referencia	-	
	А	19,8 (21)	34,4 (31)	0,47 [0,25-0,90]	0,02	19,8 (21)	28,6 (12)	0,62 [0,27-1,41]	0,25	34,4 (31)	28,6 (12)	1,31 [0,59-2,92]	0,50	
	No portador de A	66,0 (35)	48,9 (22)	Referencia	-	66,0 (35)	57,1 (12)	Referencia	-	48,9 (22)	57,1 (12)	Referencia	-	
	Portador de A	34,0 (18)	51,1 (23)	0,49 [0,22-1,11]	0,09	34,0 (18)	42,9 (9)	0,69 [0,24-1,93]	0,48	51,1 (23)	42,9 (9)	1,40 [049-3,96]	0,53	
rs2010963	GG	33,3 (18)	46,6 (21)	Referencia	-	33,3 (18)	33,3 (7)	Referencia	-	46,6 (21)	33,3 (7)	Referencia	-	
	GC	50,0 (27)	37,8 (17)	1,85 [0,77-4,44]	0,17	50,0 (27)	47,6 (10)	1,05 [0,34-3,27]	0,93	37,8 (17)	47,6 (10)	0,57 [0,18-1,80]	0,34	
	CC	16,7 (9)	15,6 (7)	1,50 [0,46-4,84]	0,50	16,7 (9)	19,1 (4)	0,88 [0,20-3,79]	0,86	15,6 (7)	19,1 (4)	0,58 [0,13-2,61]	0,48	
	G	58,3 (63)	65,6 (59)	Referencia	-	58,3 (63)	57,1 (24)	Referencia	-	65,6 (59)	57,1 (24)	Referencia	-	
	С	41,7 (45)	34,4 (31)	1,36 [0,76-2,43]	0,30	41,7 (45)	42,9 (18)	0,95 [0,46-1,96]	0,89	34,4 (31)	42,9 (18)	0,70 [0,33-1,48]	0,35	
	No portador de C	33,3 (18)	46,7 (21)	Referencia	-	33,3 (18)	33,3 (7)	Referencia	-	46,7 (21)	33,3 (7)	Referencia	-	
	Portador de C	66,7 (36)	53,3 (24)	1,75 [0,78-3,95]	0,18	66,7 (36)	66,7 (14)	1,00 [0,34-2,91]	1,00	53,3 (24)	66,7 (14)	0,57 [0,19-1,68]	0,31	

Tabla 14. Comparación de las frecuencias genotípicas, alélicas y de portadores de los polimorfismos de VEGF en los pacientes con EA-EPI⁺ en relación con aquéllos con EA-EPI⁻ y FPI, así como en pacientes con EA-EPI⁻ en comparación con pacientes con los pacientes con FPI.

		Pacientes EA-EPI⁺ <i>versus</i> EA-EPI⁻				Pa	cientes EA-	EPI+ <i>versus</i> FPI		Pacientes EA-EPI versus FPI			
Polimorfismo VEGF	Genotipo /Alelo/ Portador	EA-EPI+ % (n)	EA-EPI ⁻ % (n)	OR [95% IC]	р	EA-EPI+ % (n)	FPI % (n)	OR [95% IC]	р	EA-EPI- % (n)	FPI % (n)	OR [95% IC]	p
rs3025020	CC	53,7 (29)	51,1 (23)	Referencia	-	53,7 (29)	38,1 (8)	Referencia	-	51,1 (23)	38,1 (8)	Referencia	-
	СТ	37,0 (20)	42,2 (19)	0,83 [0,36-1,92]	0,67	37,0 (20)	52,4 (11)	0,50 [0,17-1,47]	0,21	42,2 (19)	52,4 (11)	0,60 [0,20-1,80]	0,36
	TT	9,3 (5)	6,7 (3)	1,32 [0,29-6,12]	0,72	9,3 (5)	9,5 (2)	0,69 [0,11-4,24]	0,69	6,7 (3)	9,5 (2)	0,52 [0,07-3,71]	0,52
	С	72,2 (78)	72,2 (65)	Referencia	-	72,2 (78)	64,3 (27)	Referencia	-	72,2 (65)	64,3 (27)	Referencia	-
	Т	27,8 (30)	27,8 (25)	1,00 [0,54-1,87]	1,00	27,8 (30)	35,7 (15)	0,69 [0,32-1,48]	0,34	27,8 (25)	35,7 (15)	0,69 [0,32-1,51]	0,36
	No portador de T	53,7 (29)	51,1 (23)	Referencia	-	53,7 (29)	38,1 (8)	Referencia	-	51,1 (23)	38,1 (8)	Referencia	-
	Portador de T	46,3 (25)	48,9 (22)	0,90 [0,41-1,99]	0,80	46,3 (25)	61,9 (13)	0,53 [0,19-1,49]	0,23	48,9 (22)	61,9 (13)	0,59 [0,20-1,69]	0,33
rs3025039	CC	70,4 (38)	73,3 (33)	Referencia	-	70,4 (38)	66,7 (14)	Referencia	-	73,3 (33)	66,7 (14)	Referencia	-
	СТ	25,9 (14)	24,4 (11)	1,11 [0,44-2,77]	0,83	25,9 (14)	33,3 (7)	0,74 [0,25-2,20]	0,59	24,4 (11)	33,3 (7)	0,67 [0,21-2,07]	0,48
	TT	3,7 (2)	2,3 (1)	1,74 [0,15-20,03]	0,66	3,7 (2)	0,0 (0)	-	-	2,3 (1)	0,0 (0)	-	-
	С	83,3 (90)	85,6 (77)	Referencia	-	83,3 (90)	83,3 (35)	Referencia	-	85,6 (77)	83,3 (35)	Referencia	-
	Т	16,7 (18)	14,4 (13)	1,18 [0,54-2,57]	0,67	16,7 (18)	16,7 (7)	1,00 [0,38-2,60]	1,00	14,4 (13)	16,7 (7)	0,84 [0,31-2,30]	0,74
	No portador de T	70,4 (38)	73,3 (33)	Referencia	-	70,4 (38)	66,7 (14)	Referencia	-	73,3 (33)	66,7 (14)	Referencia	-
	Portador de T	29,6 (16)	26,7 (12)	1,16 [0,48-2,80]	0,75	29,6 (16)	33,3 (7)	0,84 [0,29-2,48]	0,76	26,7 (12)	33,3 (7)	0,73 [0,24-2,23]	0,58

Continuación Tabla 14. Comparación de las frecuencias genotípicas, alélicas y de portadores de los polimorfismos de VEGF en los pacientes con EA-EPI⁺ en relación con aquéllos con EA-EPI⁻ y FPI, así como en pacientes con EA-EPI⁻ en comparación con pacientes con los pacientes con FPI.

	Pac	ientes EA-E	PI ⁺ versus EA-EPI ⁻		Pa	cientes EA-	EPI⁺ <i>versus</i> FPI		Pa	cientes EA-	EPI- <i>versus</i> FPI	
*Haplotipos VEGF	EA-EPI+ % (n)	EA-EPI ⁻ % (n)	OR [95% IC]	p	EA-EPI+ % (n)	FPI % (n)	OR [95% IC]	p	EA-EPI ⁻ % (n)	FPI % (n)	OR [95% IC]	p
TGGCC	29,3 (31)	32,2 (29)	Referencia	-	29,3 (31)	28,6 (12)	Referencia	-	32,2 (29)	28,6 (12)	Referencia	-
CAGCC	5,7 (6)	10,0 (9)	0,62 [0,20-1,97]	0,42	5,7 (6)	7,1 (3)	0,77 [0,17-3,60]	0,74	10,0 (9)	7,1 (3)	1,24 [0,29-5,40]	0,77
CAGTC	6,6 (7)	8,9 (8)	0,82 [0,26-2,54]	0,73	6,6 (7)	9,5 (4)	0,68 [0,17-2,74]	0,59	8,9 (8)	9,5 (4)	0,83 [0,21-3,28]	0,79
CAGTT	0,0 (0)	2,2 (2)	-	-	0,0 (0)	2,4 (1)	-	-	2,2 (2)	2,4 (1)	0,83 [0,68-10,01]	0,88
CGGCC	6,6 (7)	5,6 (5)	1,31 [0,37-4,59]	0,67	6,6 (7)	2,4 (1)	2,71 [0,30-24,42]	0,37	5,6 (5)	2,4 (1)	2,07 [0,22-19,63]	0,53
TGCCC	14,2 (15)	10,0 (9)	1,56 [0,59-4,11]	0,37	14,2 (15)	14,3 (6)	0,97 [0,30-3,08]	0,96	10,0 (9)	14,3 (6)	0,62 [0,18-2,13]	0,45
CGGTC	3,8 (4)	1,1 (1)	3,74 [0,39-35,47]	0,25	3,8 (4)	2,4 (1)	1,55 [0,16-15,30]	0,71	1,1 (1)	2,4 (1)	0,41 [0,02-7,17]	0,54
CACCC	1,9 (2)	0,0 (0)	-	-	1,9 (2)	0,0 (0)	-	-	0,0 (0)	0,0 (0)	-	-
CACCT	0,0 (0)	1,1 (1)	-	-	0,0 (0)	2,4 (1)	-	-	1,1 (1)	2,4 (1)	0,41 [0,02-7,17]	0,54
CACTC	4,7 (5)	8,9 (8)	0,58 [0,17-1,99]	0,39	4,7 (5)	4,8 (2)	0,97 [0,16-5,68]	0,97	8,9 (8)	4,8 (2)	1,66 [0,31-8,96]	0,56
CAGCT	0,9 (1)	2,2 (2)	0,47 [0,04-5,44]	0,54	0,9 (1)	2,4 (1)	0,39 [0,02-6,70]	0,51	2,2 (2)	2,4 (1)	0,83 [0,07-10,01]	0,88
TGCTC	6,6 (7)	3,3 (3)	2,18 [0,52-9,25]	0,29	6,6 (7)	2,4 (1)	2,71 [0,30-24,42]	0,37	3,3 (3)	2,4 (1)	1,24 [0,12-13,16]	0,86
TGGTC	0,9 (1)	1,1 (1)	0,94 [0,06-15,66]	0,96	0,9 (1)	2,4 (1)	0,39 [0,02-6,70]	0,51	1,1 (1)	2,4 (1)	0,41 [0,02-7,17]	0,54
TGCCT	6,6 (7)	6,7 (6)	1,09 [0,33-3,63]	0,89	6,6 (7)	0,0 (0)	-	-	6,7 (6)	0,0 (0)	-	-
CGCCC	1,9 (2)	1,1 (1)	1,87 [0,16-21,75]	0,62	1,9 (2)	4,8 (2)	0,39 [0,05-3,07]	0,37	1,1 (1)	4,8 (2)	0,21 [0,02-2,50]	0,22
CGCTC	0,9 (1)	2,2 (2)	0,47 [0,04-5,44]	0,54	0,9 (1)	4,8 (2)	0,19 [0,02-2,34]	0,20	2,2 (2)	4,8 (2)	0,41 [0,05-3,29]	0,40
TGGCT	2,8 (3)	1,1 (1)	2,81 [0,28-28,53]	0,38	2,8 (3)	0,0 (0)	-	-	1,1 (1)	0,0 (0)	-	-
CGCCT	1,9 (2)	1,1 (1)	1,87 [0,16-21,75]	0,62	1,9 (2)	2,4 (1)	0,77 [0,06-9,35]	0,84	1,1 (1)	2,4 (1)	0,41 [0,02-7,17]	0,54
CGGTT	1,9 (2)	0,0 (0)	-	-	1,9 (2)	0,0 (0)	-	-	0,0 (0)	0,0 (0)	-	-
TGCTT	0,9 (1)	0,0 (0)	-	-	0,9 (1)	7,1 (20)	0,13 [0,01-1,37]	0,09	0,0 (0)	7,1 (20)	-	-

Tabla 15. Comparación de las frecuencias haplotípicas de VEGF en los pacientes con EA-EPI⁺ en relación con aquéllos con EA-EPI⁻ y FPI, así como en pacientes con EA-EPI⁻ en comparación con pacientes con los pacientes con FPI.

*El orden de los polimorfismos fue rs833061, rs1570360, rs2010963, rs3025020 y rs3025039.

		Pacientes AR-EPI ⁺ versus AR-EPI ⁻				Pacientes ES-EPI ⁺ versus ES-EPI ⁻			
Polimorfismo VEGF	Genotipo /Alelo/ Portador	AR-EPI+ % (n)	AR-EPI ⁻ % (n)	OR [95% IC]	p	ES-EPI⁺ % (n)	ES-EPI ⁻ % (n)	OR [95% IC]	p
rs833061	TT	52,4 (11)	36,0 (9)	Referencia	-	44,4 (8)	30,0 (6)	Referencia	-
	TC	28,6 (6)	44,0 (11)	0,45 [0,12-1,69]	0,23	38,9 (7)	45,0 (9)	0,58 [0,14-2,48]	0,47
	CC	19,0 (4)	20,0 (5)	0,65 [0,13-3,19]	0,60	16,7 (3)	25,0 (5)	0,45 [0,08-2,67]	0,38
	Т	66,7 (28)	58,0 (29)	Referencia	-	63,9 (23)	52,5 (21)	Referencia	-
	С	33,3 (14)	42,0 (21)	0,69 [0,29-1,62]	0,40	36,1 (13)	47,5 (19)	0,62 [0,25-1,57]	0,32
	Portador de C	52,3 (11)	36,0 (9)	Referencia	-	44,4 (8)	30,0 (6)	Referencia	-
	No portador de C	47,6 (10)	64,0 (16)	0,51 [0,16-1,67]	0,27	55,6 (10)	70,0 (14)	0,54 [0,14-2,03]	0,36
rs1570360	GG	66,7 (14)	56,0 (14)	Referencia	-	58,8 (10)	40,0 (8)	Referencia	-
	GA	28,6 (6)	32,0 (8)	0,75 [0,21-2,73]	0,66	29,4 (5)	35,0 (7)	0,57 [0,13-2,50]	0,46
	AA	4,7 (1)	12,0 (3)	0,33 [0,03-3,61]	0,37	11,8 (2)	25,0 (5)	0,32 [0,05-2,11]	0,24
	G	80,9 (34)	72,0 (36)	Referencia	-	73,5 (25)	57,5 (23)	Referencia	-
	А	19,1 (8)	28,0 (14)	0,61 [0,23-1,62]	0,32	26,5 (9)	42,5 (17)	0,49 [0,18-1,31]	0,15
	Portador de A	66,7 (14)	56,0 (14)	Referencia	-	58,8 (10)	40,0 (8)	Referencia	-
	No portador de A	33,3 (7)	44,0 (11)	0,64 [0,19-2,12]	0,46	41,2 (7)	60,0 (12)	0,47 [0,13-1,74]	0,26
rs2010963	GG	28,6 (6)	48,0 (12)	Referencia	-	22,2 (4)	45,0 (9)	Referencia	-
	GC	52,4 (11)	36,0 (9)	2,44 [0,65-9,13]	0,18	61,1 (11)	40,0 (8)	3,09 [0,70-13,71]	0,14
	CC	19,0 (4)	16,0 (4)	2,00 [0,37-10,92]	0,42	16,7 (3)	15,0 (3)	2,25 [0,31-16,41]	0,42
	G	54,8 (23)	66,0 (33)	Referencia	-	52,8 (19)	65,0 (26)	Referencia	-
	С	45,2 (19)	34,0 (17)	1,60 [0,69-3,73]	0,27	47,2 (17)	35,0 (14)	1,66 [0,66-4,18]	0,28
	Portador de C	28,6 (6)	48,0 (12)	Referencia	-	22,2 (4)	45,0 (9)	Referencia	-
	No portador de C	71,4 (15)	52,0 (13)	2,30 [0,67-7,89]	0,18	77,8 (14)	55,0 (11)	2,86 [0,69-11,82]	0,15

Tabla 16. Comparación de las frecuencias genotípicas, alélicas y portadores de los polimorfismos de VEGF entre los pacientes con AR-EPI⁺ y AR-EPI-, así como entre los pacientes con ES-EPI⁺ y ES-EPI⁻.
		Paci	ientes AR-E	PI⁺ <i>versus</i> AR-EPI	Pacientes ES-EPI+ <i>versus</i> ES-EPI-					
Polimorfismo VEGF	Genotipo /Alelo/ Portador	AR-EPI+ % (n)	AR-EPI [.] % (n)	OR [95% IC]	р	ES-EPI⁺ % (n)	ES-EPI ⁻ % (n)	OR [95% IC]	p	
rs3025020	CC	66,7 (14)	64,0 (16)	Referencia	-	44,4 (8)	35,0 (7)	Referencia	-	
	СТ	19,0 (4)	24,0 (6)	0,76 [0,18-3,26]	0,76 [0,18-3,26] 0,71		65,0 (13)	0,61 [0,16-2,28]	0,46	
	TT	14,3 (3)	12,0 (3)	1,14 [0,20-6,60]	0,88	5,6 (1)	0,0 (0)	-	-	
	С	76,2 (32)	2) 76,0 (38) Referencia -		69,4 (25)	67,5 (27)	Referencia	-		
	Т	23,8 (10)	24,0 (12)	0,99 [0,38-2,59]	0,98	30,6 (11)	32,5 (13)	0,91 [0,35-2,41]	0,86	
	Portador de T	66,7 (14)	64,0 (16)	Referencia	-	44,4 (8)	35,0 (7)	Referencia	-	
	No portador de T	33,3 (7)	36,0 (9)	0,89 [0,26-3,01]	0,85	55,6 (10)	65,0 (13)	0,67 [0,18-2,49]	0,55	
rs3025039	CC	61,9 (13)	68,0 (17)	Referencia	-	72,2 (13)	80,0 (16)	Referencia	-	
	СТ	28,6 (6)	32,0 (8)	0,98 [0,27-3,53]	0,98	27,8 (5)	15,0 (3)	2,05 [0,41-10,24]	0,38	
	TT	9,5 (2)	0,0 (0)	-	-	0,0 (0)	5,0 (1)	-	-	
	С	76,2 (32)	84,0 (42)	Referencia	-	86,1 (31)	87,5 (35)	Referencia	-	
	Т	23,8 (10)	16,0 (8)	1,64 [0,58-4,63]	0,35	13,9 (5)	12,5 (5)	1,13 [0,30-4,27]	0,86	
	Portador de T	61,9 (13)	68,0 (17)	Referencia	-	72,2 (13)	80,0 (16)	Referencia	-	
	No portador de T	37,1 (8)	32,0 (8)	1,31 [0,39-4,42]	0,67	27,8 (5)	20,0 (4)	1,54 [0,34-6,93]	0,58	

Continuación Tabla 16. Comparación de las frecuencias genotípicas, alélicas y portadores de los polimorfismos de VEGF entre los pacientes con AR-EPI⁺ y AR-EPI-, así como entre los pacientes con ES-EPI⁺ y ES-EPI⁻.

	F	Pacientes AR-E	PI ⁺ versus AR-EPI ⁻	Pa	cientes ES-E	PI ⁺ versus ES-EPI ⁻						
*Haplotipos VEGF	AR-EPI⁺ % (n)	AR-EPI ⁻ % (n)	OR [95%IC]	р	ES-EPI+ % (n)	ES-EPI ⁻ % (n)	OR [95%IC]	p				
TGGCC	26.2 (11)	34.0 (17)	Reference	Reference -		30.0 (12)	Reference	-				
CAGCC	2.4 (1)	8.0 (4)	0.39 [0.04-3.93]	0.39 [0.04-3.93] 0.42 11.8 (4) 12.5 (5) 0.80 [0.1		0.80 [0.17-3.73]	0.78					
CAGTC	9.5 (4)	8.0 (4)	1.55 [0.32-7.50]	0.59	0.0 (0)	10.0 (4)	-	-				
CAGTT	0.0 (0)	2.0 (1)	-	-	0.0 (0)	2.5 (1)	-	-				
CGGCC	2.4 (1)	6.0 (3)	0.52 [0.05-5.60]	0.59	2.9 (1)	5.0 (2)	0.50 [0.04-6.28]	0.60				
TGCCC	19 .1 (8)	12.0 (6)	2.06 [0.56-7.58]	0.28	8.8 (3)	7.5 (3)	1.00 [0.17-5.98]	1.00				
CGGTC	4.8 (2)	2.0 (1)	3.09 [0.25-38.32]	0.38	0.0 (0)	0.0 (0)	-	-				
CACCC	2.4 (1)	0.0 (0)	-	-	2.9 (1)	0.0 (0)	-	-				
CACCT	0.0 (0)	2.0 (1)	-	-	0.0 (0)	0.0 (0)	-	-				
CACTC	4.8 (2)	6.0 (3)	1.03 [0.14-7.19]	0.98	8.8 (3)	12.5 (5)	0.60 [0.12-3.09]	0.54				
CAGCT	0.0 (0)	2.0 (1)	-	-	2.9 (1)	2.5 (1)	1.00 [0.06-17.90]	1.00				
TGCTC	2.4 (1)	2.0 (1)	1.55 [0.09-27.36]	0.77	11.8 (4)	5.0 (2)	2.00 [0.31-13.06]	0.47				
TGGTC	0.0 (0)	2.0 (1)	-	-	0.0 (0)	0.0 (0)	-	-				
TGCCT	11.9 (5)	6.0 (3)	2.58 [0.51-13.01]	0.25	2.9 (1)	7.5 (3)	0.33 [0.03-3.68]	0.37				
CGCCC	2.4 (1)	2.0 (1)	1.55 [0.09-27.36]	0.77	0.0 (0)	0.0 (0)	-	-				
CGCTC	0.0 (0)	2.0 (1)	-	-	2.9 (1)	2.5 (1)	1.00 [0.06-17.90]	1.00				
TGGCT	7.1 (3)	2.0 (1)	4.64 [0.43-50.44]	0.21	0.0 (0)	0.0 (0)	-	-				
CGCCT	2.4 (1)	2.0 (1)	1.55 [0.09-27.36]	0.77	2.9 (1)	0.0 (0)	-	-				
*El orden de los	*El orden de los polimorfismos fue rs833061, rs1570360, rs2010963, rs3025020 y rs3025039.											

Tabla 17. Comparación de las frecuencias haplotípicas de VEGF en los pacientes con AR-EPI⁺ con relación a aquéllos con AR-EPI⁻, así como en los pacientes con ES-EPI⁺ en comparación con pacientes con ES-EPI⁻.

1.3.2 VEGF implicado a nivel funcional en el desarrollo de EPI en las EA

La evaluación de la asociación de la expresión del gen *VEGF* con el proceso patológico vascular presente en la EA-EPI⁺ reveló que los pacientes con EA-EPI⁺ mostraron una expresión menor de *VEGF* que las PS (R.m=-3,57, p<0,001, **Figura 23a**, **Tabla S1**). Al estratificar a los pacientes según la EA se obtuvieron los mismos resultados, ya que tanto aquéllos con AR-EPI⁺ como con ES-EPI⁺ u otras EA-EPI⁺ presentaron una expresión de *VEGF* significativamente más baja que las PS (R.m=-2,78, p=0,015; R.m=-2,50, p=0,024; R.m=-7,69, p=0,002, respectivamente, **Figura 23b-d, Tabla S1**).

En cuanto al papel del gen *VEGF* en la fibrosis, se observó que los pacientes con EA-EPI⁺ mostraron una expresión significativamente más baja de *VEGF* que los grupos control de pacientes, siendo estadísticamente significativa al compararlos con aquéllos con FPI (R.m=-3,70, p<0,001, **Figura 23a, Tabla S1**). En concreto, estos resultados fueron similares en los pacientes con AR-EPI⁺, ES-EPI⁺ y otras EA-EPI⁺, los cuales exhibieron una menor expresión de *VEGF* en relación con aquéllos con FPI (R.m=-2,86, p=0,025, R.m=-2,63, p=0,037, R.m=-3,70, p=0,008, respectivamente, **Figura 23b-d, Tabla S1**). También, se observó que la expresión de *VEGF* estaba aumentada en los pacientes con ES-EPI⁺ en relación con los pacientes con ES-EPI⁻ (R.m=5,70, p=0,030, **Figura 23c, Tabla S1**).



Figura 23. Diferencias en la expresión de VEGF entre todos los grupos de estudio. (a) Pacientes con EA-EPI⁺, EA-EPI⁻, FPI y PS; (b) Pacientes con AR-EPI⁺, AR-EPI⁻, FPI y PS; (c) Pacientes con ES-EPI⁺, ES-EPI⁻, FPI y PS; (d) Pacientes con otras EA-EPI⁺, FPI y PS. Las barras horizontales indican el valor medio de cada grupo de estudio y el borde inferior y superior de las cajas indican el valor mínimo y máximo, respectivamente. Los resultados significativos se destacan en **negrita**.

Por otro lado, se evaluó la implicación de los niveles séricos de VEGF en la enfermedad vascular de la EA-EPI⁺. En este sentido, los pacientes con EA-EPI⁺ no mostraron diferencias significativas con las PS (**Figura 24a, Tabla S1**). Al estratificar a los pacientes según la EA subyacente, tampoco se encontraron diferencias significativas en los niveles séricos de VEGF entre los pacientes con AR-EPI⁺, ES-EPI⁺ y otras EA-EPI⁺ en relación con las PS (**Figura 24b-d, Tabla S1**).

Asimismo, se estudió el papel de VEGF en el desarrollo de la fibrosis, de manera que los pacientes con EA-EPI⁺ mostraron mayores niveles de VEGF en suero que aquéllos con EA-EPI⁻ y FPI, siendo significativo con aquéllos con EA-EPI⁻ (p<0,001, **Figura 24a, Tabla S1**). En particular, los pacientes con AR-EPI⁺ y ES-EPI⁺ exhibieron concentraciones de VEGF más altas que aquéllos con AR-EPI⁻ y ES-EPI⁻, respectivamente (p=0,002 y p=0,001, respectivamente, **Figura 24b-c, Tabla S1**). Los pacientes con AR-EPI⁺ presentaron concentraciones de VEGF significativamente más altas que aquéllos con FPI (p=0,021, **Figura 24b, Tabla S1**). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los pacientes con ES-EPI⁺, otras EA-EPI⁺ y FPI (**Figura 24c-d, Tabla S1**).



Figura 24. Diferencias en los niveles séricos de VEGF entre todos los grupos de estudio. (a) Pacientes con EA-EPI⁺, EA-EPI⁻, FPI y PS; (b) Pacientes con AR-EPI⁺, AR-EPI⁻, FPI y PS; (c) Pacientes con ES-EPI⁺, ES-EPI⁻, FPI y PS; (d) Pacientes con otras EA-EPI⁺, FPI y PS. Las barras horizontales indican el valor medio de cada grupo de estudio y el borde inferior y superior de las cajas indican el valor mínimo y máximo, respectivamente. Los resultados significativos se destacan en **negrita**.

1.4 AUSENCIA DE CORRELACIÓN ENTRE LOS BIOMARCADORES IMPLICADOS EN LA FORMACIÓN, REPARACIÓN Y REMODELACIÓN VASCULAR EN LA EA-EPI⁺

No se observó ninguna asociación entre EPC y TAng, la expresión del gen *VEGF*, así como los niveles proteicos de VEGF en toda la cohorte de pacientes con EA-EPI⁺ (**Tabla 18**).

Tabla 18. Correlación entre los biomarcadores implicados en la formación, reparación y remodelación vascular en la EA-EPI⁺.

			VEGF						
	IAng		Expresión A	RNm VEGF	Niveles séricos VEGF				
	r	р	r	р	r	р			
EPC	-0,04	0,76	0,01	0,92	0,26	0,06			
TAng	-	-	0,15	0,25	0,06	0,65			
Expresión ARNm VEGF	-	-	-	-	0,10	0,45			

2. Resultados derivados del Objetivo 2

Alteración de las propiedades de barrera y adhesión del endotelio mediadas por MCP-1, ICAM-1, VCAM-1 y Selectina-E en la EA-EPI⁺

2.1 MCP-1 COMO FACTOR IMPORTANTE EN LA VASCULOPATÍA SISTÉMICA SUBYACENTE Y EN EL PROCESO DE FIBROSIS PULMONAR EN LA AR-EPI⁺

En primer lugar, se evaluó la contribución de la expresión del gen *CCL2* en la patología vascular subyacente a la EA-EPI⁺. Así, no se encontraron diferencias significativas entre los pacientes con EA-EPI⁺ y las PS (**Figura 25a, Tabla S2**). Cuando los pacientes fueron estratificados en función de su EA, se obtuvieron los mismos resultados (**Figura 25b-d, Tabla S2**).

Además, se valoró si el desarrollo de la fibrosis en la EA-EPI⁺ se relacionaba con la expresión del gen *CCL2*. En este sentido, los pacientes con EA-EPI⁺ mostraron una expresión de *CCL2* más alta que la de aquéllos con EA-EPI⁻ (R.m=2,00, p=0,001), mientras que ésta fue similar a la de los pacientes con FPI (**Figura 25a, Tabla S2**). Al estratificar en función de la EA, se obtuvieron los mismos resultados en los pacientes con AR. La expresión de *CCL2* fue significativamente mayor en los pacientes con AR-EPI⁺ en comparación con aquéllos con AR-EPI⁻ (R.m=2,29, p=0,012, **Figura 25b, Tabla S2**). Así, se encontró una expresión de *CCL2* menor en los pacientes con AR-EPI⁺ que aquéllos con FPI (R.m=-1,61, p=0,052, **Figura 25b, Tabla S2**). Los pacientes con ES-EPI⁺ presentaron una expresión similar a los pacientes con ES-EPI⁻ y FPI (**Figuras 25c, Tabla S2**). Igualmente, los pacientes con otras EA-EPI⁺ mostraron una expresión de *CCL2* similar a aquéllos con FPI (**Figuras 25d, Tabla S2**).



Figura 25. Diferencias en la expresión de CCL2 entre todos los grupos de estudio. (a) Pacientes con EA-EPI⁺, EA-EPI⁻, FPI y PS; (b) Pacientes con AR-EPI⁺, AR-EPI⁻, FPI y PS; (c) Pacientes con ES-EPI⁺, ES-EPI⁻, FPI y PS; (d) Pacientes con otras EA-EPI⁺, FPI y PS. Las barras horizontales indican el valor medio de cada grupo de estudio y el borde inferior y superior de las cajas indican el valor mínimo y máximo, respectivamente. Los resultados significativos se destacan en **negrita**.

En segundo lugar, se estudió la proteína MCP-1 en la patogénesis de la EA-EPI⁺. En el marco de la vasculopatía, se hallaron niveles séricos de MCP-1 significativamente mayores en los pacientes con EA-EPI⁺ que en las PS (p<0,001, **Figura 26a, Tabla S2**). Específicamente, las concentraciones de MCP-1 fueron más altas en los pacientes con AR-EPI⁺, ES-EPI⁺ u otras EA-EPI⁺ cuando se compararon con las PS (p<0,001, p=0,007 y p=0,008, respectivamente, **Figura 26b-d**, **Tabla S2**). En relación con la implicación de MCP-1 en el proceso de fibrosis, se observaron niveles séricos de MCP-1 superiores en los pacientes con EA-EPI⁺ en comparación con aquéllos con EA-EPI⁻ y FPI (p=0,027 y p=0,004, respectivamente, **Figura 26a, Tabla S2**). Al estratificar según la EA subyacente, los pacientes con AR-EPI⁺ presentaron niveles de MCP-1 más altos que aquéllos con AR-EPI⁻ y FPI (p<0,001 y p<0,001, respectivamente, **Figura 26b, Tabla S2**). La concentración de MCP-1 fue similar en los pacientes con ES-EPI⁺ u otras EA-EPI⁺ en relación con aquéllos con FPI (**Figura 26c-d, Tabla S2**). Los mismos resultados se obtuvieron al comparar los pacientes con ES-EPI⁺ y ES-EPI⁻ (**Figura 26c, Tabla S2**).



Figura 26. Diferencias en los niveles séricos de MCP-1 entre todos los grupos de estudio. (*a*) *Pacientes con EA-EPI⁺, EA-EPI⁻, FPI y PS;* (*b*) *Pacientes con AR-EPI⁺, AR-EPI⁻, FPI y PS;* (*c*) *Pacientes con ES-EPI⁺, ES-EPI⁻, FPI y PS;* (*d*) *Pacientes con otras EA-EPI⁺, FPI y PS. Las barras horizontales indican el valor medio de cada grupo de estudio y el borde inferior y superior de las cajas indican el valor mínimo y máximo, respectivamente. Los resultados significativos se destacan en negrita.*

2.2 ICAM-1 COMO MARCADOR DE LA VASCULOPATÍA A NIVEL PULMONAR Y DE LA FIBROSIS PULMONAR EN LA EA-EPI⁺

Por un lado, se valoró si la presencia de una vasculopatía subyacente se vinculaba con la expresión del gen *ICAM1* en los pacientes con EA-EPI⁺. Los pacientes con EA-EPI⁺ mostraron una expresión de *ICAM1* más baja que las PS (R.m=-1,92, p<0,001, **Figura 27a**, **Tabla S2**). Igualmente, la expresión de *ICAM1* se encontró reducida en los pacientes con AR-EPI⁺, ES-EPI⁺ y otras EA-EPI⁺ en relación con las PS (**Figura 27b-d, Tabla S2**). Concretamente, esta diferencia fue significativa en los pacientes con otras EA-EPI⁺ (R.m=-2,27, p=0,005, **Figura 27d, Tabla S2**).

En cuanto al papel de la expresión del gen *ICAM1* en el desarrollo de la fibrosis, los pacientes con EA-EPI⁺ y EA-EPI⁻ presentaron una expresión de *ICAM1* similar, mientras que fue significativamente menor que la de aquéllos con FPI (R.m=-2,17, p<0,001, **Figura 27a, Tabla S2**). Cuando se estratificaron los pacientes según la EA, la expresión de *ICAM1* fue más baja en los pacientes con AR-EPI⁺, ES-EPI⁺, y otras EA-EPI⁺ en relación con aquéllos con FPI, siendo esta diferencia significativa en los pacientes con AR-EPI⁺ y otras EA-EPI⁺ (R.m=-1,82, p=0,048 y R.m=-2,56, p=0,011, respectivamente, **Figura 27b y d, Tabla S2**). No obstante, no hubo diferencias significativas en la expresión de *ICAM1* entre los pacientes con AR-EPI⁺ y AR-EPI⁻, así como entre aquéllos con ES-EPI⁺ y ES-EPI⁻ (**Figura 27b-c, Tabla S2**).



Figura 27. Diferencias en la expresión de ICAM1 entre todos los grupos de estudio. (a) Pacientes con EA-EPI⁺, EA-EPI⁻, FPI y PS; (b) Pacientes con AR-EPI⁺, AR-EPI⁻, FPI y PS; (c) Pacientes con ES-EPI⁺, ES-EPI⁻, FPI y PS; (d) Pacientes con otras EA-EPI⁺, FPI y PS. Las barras horizontales indican el valor medio de cada grupo de estudio y el borde inferior y superior de las cajas indican el valor mínimo y máximo, respectivamente. Los resultados significativos se destacan en **negrita**.

El estudio del vínculo de ICAM-1 con el daño vascular reveló que los pacientes con EA-EPI⁺ presentaron niveles elevados de esta proteína en comparación con las PS (p<0,001, **Figura 28a, Tabla S2**). Se observaron los mismos resultados cuando los pacientes se estratificaron en función de la EA ya que aquéllos con AR-EPI⁺, ES-EPI⁺ u otras EA-EPI⁺ mostraron niveles de ICAM-1 significativamente mayores que las PS (p<0,001, p=0,011 y p=0,002, respectivamente, **Figura 28b-d, Tabla S2**). En el marco de la fibrosis pulmonar, los pacientes con EA-EPI⁺ presentaron concentraciones de ICAM-1 similares a aquéllos con FPI, mientras que éstas eran significativamente mayores que las de los pacientes con EA-EPI⁻ (p<0,001, **Figura 28a**, **Tabla S2**). Igualmente, al estratificar por la EA, los pacientes con AR-EPI⁺, ES-EPI⁺ u otras EA-EPI⁺ también mostraron niveles de ICAM-1 semejantes a los pacientes con FPI (**Figura 28b-d, Tabla S2**). Asimismo, las concentraciones de la proteína fueron más altas en los pacientes con AR-EPI⁺ y ES-EPI⁺ que en aquéllos con AR-EPI⁻ y ES-EPI⁻, respectivamente (p=0,005 y p=0,001, respectivamente, **Figura 28b-c, Tabla S2**).



Figura 28. Diferencias en los niveles séricos de ICAM-1 entre todos los grupos de estudio. (a) Pacientes con EA-EPI⁺, EA-EPI⁻, FPI y PS; (b) Pacientes con AR-EPI⁺, AR-EPI⁻, FPI y PS; (c) Pacientes con ES-EPI⁺, ES-EPI⁻, FPI y PS; (d) Pacientes con otras EA-EPI⁺, FPI y PS. Las barras horizontales indican el valor medio de cada grupo de estudio y el borde inferior y superior de las cajas indican el valor mínimo y máximo, respectivamente. Los resultados significativos se destacan en **negrita**.

2.3 VCAM-1 INVOLUCRADO EN LOS MECANISMOS PATOLÓGICOS DE LA VASCULOPATÍA SISTÉMICA SUBYACENTE Y DE LA FIBROSIS PULMONAR DE LA AR-EPI⁺

El estudio del papel del gen *VCAM1* en la vasculopatía subyacente mostró que los pacientes con EA-EPI⁺ presentaron una expresión de *VCAM1* más baja que las PS (R.m=-4,00, p=0,001, **Figura 29a, Tabla S2**). En particular, se observó que estos resultados fueron los mismos en los pacientes con AR-EPI⁺ y otras EA-EPI⁺, los cuales presentaron una expresión significativamente inferior a las PS (R.m=-4,00, p=0,018 y R.m=-4,00, p=0,040, respectivamente, **Figura 29b y d, Tabla S2**). Aunque la expresión de *VCAM1* también resultó ser más baja en los pacientes con ES-EPI⁺ que en las PS, esta diferencia no alcanzó la significación estadística (**Figura 29c, Tabla S2**).

Con relación a la fibrosis pulmonar, toda la cohorte de pacientes con EA-EPI⁺ mostró una expresión del gen *VCAM1* menor que aquéllos con EA-EPI⁻ y FPI (R.m=-2,00, p=0,031 y R.m=-2,00, p=0,052, respectivamente, **Figura 29a, Tabla S2**). En concreto, tanto los pacientes con AR-EPI⁺ como aquéllos con otras EA-EPI⁺ mostraron una expresión de *VCAM1* significativamente inferior a aquéllos con FPI (R.m=-2,00, p=0,018 y R.m=-2,00, p=0,021, respectivamente, **Figura 29b y d**, **Tabla S2**). Sin embargo, la expresión de *VCAM1* fue similar entre los pacientes con ES-EPI⁺ y FPI (**Figura 29c, Tabla S2**). Asimismo, no hubo diferencias significativas entre los pacientes con AR-EPI⁺ y ES-EPI⁺ y aquéllos con AR-EPI⁻ y ES-EPI⁻, respectivamente (**Figura 29b-c, Tabla S2**).



Figura 29. Diferencias en la expresión de VCAM1 entre todos los grupos de estudio. (a) Pacientes con EA-EPI⁺, EA-EPI⁻, FPI y PS; (b) Pacientes con AR-EPI⁺, AR-EPI⁻, FPI y PS; (c) Pacientes con ES-EPI⁺, ES-EPI⁻, FPI y PS; (d) Pacientes con otras EA-EPI⁺, FPI y PS. Las barras horizontales indican el valor medio de cada grupo de estudio y el borde inferior y superior de las cajas indican el valor mínimo y máximo, respectivamente. Los resultados significativos se destacan en **negrita**.

A nivel proteico y en el marco de la vasculopatía, los niveles de VCAM-1 se encontraron elevados en los pacientes con EA-EPI⁺ en relación con las PS (p=0,049, **Figura 30a, Tabla S2**). Igualmente, los pacientes con AR-EPI⁺ también presentaron niveles de VCAM-1 superiores a las PS (p<0,001, **Figura 30c-d, Tabla S2**). Sin embargo, no hubo diferencias entre los pacientes con ES-EPI⁺, otras EA-EPI⁺ y las PS (**Figura 30b, Tabla S2**).

Además, se evaluó el papel de VCAM-1 en el proceso de fibrosis pulmonar en los pacientes con EA-EPI⁺. En este sentido, los niveles de esta proteína fueron más altos en toda la cohorte de pacientes con EA-EPI⁺ en comparación con aquéllos con EA-EPI⁻ y FPI (p=0,047 y p=0,018, respectivamente, **Figura 30a, Tabla S2**). Específicamente, los pacientes con AR-EPI⁺ también mostraron niveles de la proteína mayores que aquéllos con AR-EPI⁻ y FPI (p<0,001 en ambos casos, **Figura 30b, Tabla S2**). No obstante, los niveles de VCAM-1 fueron similares en los pacientes con ES-EPI⁺, ES-EPI⁻ y otras EA-EPI⁺ (**Figura 30c-d, Tabla S2**).



Figura 30. Diferencias en los niveles séricos de VCAM-1 entre todos los grupos de estudio. (*a*) *Pacientes con EA-EPI⁺, EA-EPI⁻, FPI y PS;* (*b*) *Pacientes con AR-EPI⁺, AR-EPI⁻, FPI y PS;* (*c*) *Pacientes con ES-EPI⁺, ES-EPI⁻, FPI y PS;* (*d*) *Pacientes con otras EA-EPI⁺, FPI y PS. Las barras horizontales indican el valor medio de cada grupo de estudio y el borde inferior y superior de las cajas indican el valor mínimo y máximo, respectivamente. Los resultados significativos se destacan en negrita.*

2.4 SELECTINA-E COMO MARCADOR DE LA VASCULOPATÍA SUBYACENTE Y DEL DESARROLLO DE FIBROSIS PULMONAR EN LA EA-EPI⁺

En primer lugar, se valoró si la expresión del gen *SELE* estaba vinculada con la vasculopatía subyacente. Así, los pacientes con EA-EPI⁺ mostraron una expresión de *SELE* más baja que las PS (R.m=-4,55, p=0,002, **Figura 31a, Tabla S2**). Cuando se tuvo en cuenta la EA subyacente, se observó que los pacientes con AR-EPI⁺, ES-EPI⁺ y otras EA-EPI⁺ presentaron una expresión de *SELE* menor que las PS, siendo estadísticamente significativa en los pacientes con AR-EPI⁺ (R.m=-4,55, p=0,048, **Figura 31b, Tabla S2**).

En segundo lugar, se estudió el papel de *SELE* en la fibrosis pulmonar. En este sentido, la expresión de *SELE* fue significativamente menor en los pacientes con EA-EPI⁺ que en aquéllos con EA-EPI⁻ (R.m=-2,00, p=0,017, **Figura 31a, Tabla S2**). No obstante, no se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los pacientes con EA-EPI⁺ y aquéllos con FPI (**Figura 31a, Tabla S2**).

Los resultados fueron similares cuando se estratificaron los pacientes por la EA subyacente ya que los pacientes con AR-EPI⁺, ES-EPI⁺, otras EA-EPI⁺ y FPI mostraron una expresión de *SELE* similar (**Figura 31b-d, Tabla S2**). Adicionalmente, la expresión de *SELE* fue más baja en los pacientes con ES-EPI⁺ en relación con aquéllos con ES-EPI⁻, aunque esta diferencia no fue significativa (**Figura 31c, Tabla S2**). En cambio, no se encontraron diferencias entre los pacientes con AR-EPI⁺ y AR-EPI⁻ (**Figura 31b, Tabla S2**).



Figura 31. Diferencias en la expresión de SELE entre todos los grupos de estudio. (a) Pacientes con EA-EPI⁺, EA-EPI⁻, FPI y PS; (b) Pacientes con AR-EPI⁺, AR-EPI⁻, FPI y PS; (c) Pacientes con ES-EPI⁺, ES-EPI⁻, FPI y PS; (d) Pacientes con otras EA-EPI⁺, FPI y PS. Las barras horizontales indican el valor medio de cada grupo de estudio y el borde inferior y superior de las cajas indican el valor mínimo y máximo, respectivamente. Los resultados significativos se destacan en **negrita**.

Respecto a la asociación de los niveles de Selectina-E y el daño vascular, se observó que los pacientes con EA-EPI⁺ presentaron concentraciones mayores de la proteína que las PS (p<0,001, **Figura 32a, Tabla S2**). Estos mismos resultados se encontraron cuando los pacientes fueron estratificados por la EA puesto que aquéllos con AR-EPI⁺, ES-EPI⁺ y otras EA-EPI⁺ mostraron niveles de Selectina-E superiores a los de las PS (p<0,001, p=0,001, p=0,022, respectivamente, **Figura 32b-d, Tabla S2**).

En relación con el papel de la Selectina-E en el proceso patológico de la fibrosis pulmonar, se observó que toda la cohorte de pacientes con EA-EPI⁺ mostró una concentración proteica mayor que los pacientes con EA-EPI⁻ (p=0,001), aunque similar a los pacientes con FPI (**Figura 32a, Tabla S2**). En concreto, aquéllos con AR-EPI⁺ y ES-EPI⁺ también mostraron niveles de Selectina-E más altos que los pacientes con AR-EPI⁻ y ES-EPI⁻, respectivamente (p<0,001 y p=0,042, respectivamente, **Figura 32b-c, Tabla S2**). Al mismo tiempo, las concentraciones de la Selectina-E fueron similares entre los pacientes con AR-EPI⁺, ES-EPI⁺, otras EA-EPI⁺ y aquéllos con FPI (**Figura 32b-d, Tabla S2**).



Figura 32. Diferencias en los niveles séricos de Selectina-E entre todos los grupos de estudio. (a) Pacientes con EA-EPI⁺, EA-EPI⁻, FPI y PS; (b) Pacientes con AR-EPI⁺, AR-EPI⁻, FPI y PS; (c) Pacientes con ES-EPI⁺, ES-EPI⁻, FPI y PS; (d) Pacientes con otras EA-EPI⁺, FPI y PS. Las barras horizontales indican el valor medio de cada grupo de estudio y el borde inferior y superior de las cajas indican el valor mínimo y máximo, respectivamente. Los resultados significativos se destacan en **negrita**.

2.5 CORRELACIÓN ENTRE LOS BIOMARCADORES MOLECULARES IMPLICADOS EN LAS PROPIEDADES DE BARRERA Y ADHESIÓN DEL ENDOTELIO EN LA EA-EPI⁺

Por un lado, al evaluar la relación entre la expresión de los genes *CCL2*, *ICAM1*, *VCAM1* y *SELE* en toda la cohorte de EA-EPI⁺, se halló una correlación positiva entre *ICAM1* y *SELE* (r=0,43, p<0,01, **Tabla 19, Figura 33a**).

Asimismo, se analizó la asociación entre los niveles séricos de MCP-1, ICAM-1, VCAM-1 y Selectina-E. En este sentido, se observó una correlación positiva entre los niveles séricos tanto de MCP-1 y VCAM-1 (r=0,80, p<0,01, **Tabla 11, Figura 33b**), así como entre ICAM-1 y Selectina-E (r=0,46, p<0,01, **Tabla 11, Figura 33c**).

Por otro lado, se estudió si la expresión de los genes y los niveles séricos de las diferentes moléculas podrían estar asociados. Se encontró una correlación positiva entre la expresión de *SELE* y los niveles séricos de la Selectina-E (r=0,38, p=0,02, **Tabla 11, Figura 33d**).

		MCP-1 Niveles séricos MCP-1			ICA	M-1			VCA	M-1		Selectina-E			
				Expresión ARNm ICAM1		Niveles séricos ICAM-1		Expresión ARNm VCAM1		Niveles séricos VCAM-1		Expresión ARNm SELE		Niveles séricos Selectina-E	
		r	р	r	р	r	р	r	р	r	р	r	р	r	р
MCP-1	Expresión ARNm CCL2	0,10 0,47		0,18 0,21		-		-0,12	0,40	-		0,10	0,58	-	
	Niveles séricos MCP-1	-		-		0,24	0,08	-		0,80	<0,01	-	-	0,17	0,21
ICAM-1	Expresión ARNm ICAM1	-		-		-0,03	0,82	0,01	0,94	-		0,43	<0,01		
	Niveles séricos ICAM-1	-		-		-			-	0,19	0,17	-	-	0,46	<0,01
VCAM 1	Expresión ARNm VCAM1	-		-		-			-	-0,04	0,79	0,07	0,68	-	
V CAIVI-I	Niveles séricos VCAM-1	-		-		-			-	-		-	-	0,03	0,82
Selectina-E	Expresión ARNm SELE	-	-	-		-			-	-			-	0,38	0,02
Los resultados s	ignificativos se destacan en negrita .			•											

Tabla 19. Correlación entre los biomarcadores implicados en las propiedades de barrera y adhesión del endotelio en la EA-EPI ⁺ .

signijic egr



Figura 33. Representación de la correlación de los biomarcadores moleculares implicados en las propiedades de barrera y adhesión del endotelio en EA-EPI⁺. (a) Correlación entre la expresión de los genes ICAM1 y SELE; (b) Correlación entre los niveles séricos de MCP-1 y VCAM-1; (c) Correlación entre los niveles séricos de ICAM-1 y Selectina-E; (d) Correlación entre la expresión del gen SELE y los niveles séricos de la Selectina-E.

3. Resultados derivados del Objetivo 3

Alteración de moléculas implicadas en la regulación del tono vascular (ET-1 y ADMA) en la EA-EPI⁺

3.1. RELEVANCIA DE ET-1 EN EL DAÑO VASCULAR DE LA EA-EPI⁺ Y EN LA PRESENCIA DE FIBROSIS PULMONAR EN LA AR-EPI⁺

Por un lado, se estudió el papel del gen *END1* en la vasculopatía subyacente de la EA-EPI⁺. Los pacientes con EA-EPI⁺ mostraron una expresión de *END1* más alta que la de las PS (R.m=2,00, p=0,031, **Figura 34a, Tabla S3**). Estos resultados fueron similares cuando los pacientes se estratificaron según la EA puesto que la expresión de *END1* fue superior en los pacientes con AR-EPI⁺, ES-EPI⁺ y otras EA-EPI⁺ en comparación con la de las PS (R.m=2,00, p=0,045, R.m=2,00, p=0,045 y R.m=2,50, p=0,036, respectivamente, **Figura 34b-d; Tabla S3**).

Cuando se valoró la relación del gen *END1* con la presencia de fibrosis pulmonar, no se observaron diferencias significativas en la expresión de *END1* en los pacientes con EA-EPI⁺, EA-EPI⁻ y FPI (**Figura 34a, Tabla S3**). Al estratificar según la EA subyacente, tampoco hubo diferencias significativas en los pacientes con AR-EPI⁺, ES-EPI⁺, ES-EPI⁺ otras EA-EPI⁺ y FPI (**Figura 34c-d, Tabla S3**). No obstante, los pacientes con AR-EPI⁺ presentaron una expresión de *END1* significativamente menor que aquéllos con AR-EPI⁻ (R.m=-1,75, p=0,027, **Figura 34b, Tabla S3**).



Figura 34. Diferencias en la expresión de END1 entre todos los grupos de estudio. (*a*) Pacientes con *EA-EPI*⁺, *EA-EPI*⁻, *FPI y PS*; (*b*) Pacientes con *AR-EPI*⁺, *AR-EPI*⁻, *FPI y PS*; (*c*) Pacientes con *ES-EPI*⁺, *ES-EPI*⁻, *FPI y PS*; (*d*) Pacientes con otras *EA-EPI*⁺, *FPI y PS*. Las barras horizontales indican el valor medio de cada grupo de estudio y el borde inferior y superior de las cajas indican el valor mínimo y máximo, respectivamente. Los resultados significativos se destacan en **negrita**.

Por otro lado, respecto al papel de ET-1 en el daño vascular, todos los pacientes con EA-EPI⁺ presentaron niveles proteicos significativamente más altos que las PS (p=0,001, **Figura 35a, Tabla S3**). Los mismos resultados se hallaron al estratificar a los pacientes en AR-EPI⁺, ES-EPI⁺ y otras EA-EPI⁺ y compararlos con las PS (p<0,001, p=0,004 y p=0,007, respectivamente, **Figura 35b-d, Tabla S3**).

En cuanto a la posible asociación de los niveles de ET-1 con el desarrollo de la fibrosis pulmonar, se observó que los pacientes con EA-EPI⁺ presentaron

concentraciones de ET-1 significativamente más altas que aquéllos con EA-EPI⁻ (p=0,006), aunque similares a los pacientes con FPI (**Figura 35a, Tabla S3**). Igualmente, al estratificar a los pacientes en función de la EA, no se encontraron diferencias en los niveles séricos de ET-1 en los pacientes con AR-EPI⁺, ES-EPI⁺, otras EA-EPI⁺ y FPI (**Figura 35c-d, Tabla S3**). Además, los pacientes con ES-EPI⁺ y ES-EPI⁻ también presentaron niveles similares. Sin embargo, los pacientes con AR-EPI⁺ mostraron concentraciones superiores a aquéllos con AR-EPI⁻ (p<0,001, **Figura 35b, Tabla S3**).



Figura 35. Diferencias en los niveles séricos de ET-1 entre todos los grupos de estudio. (a) Pacientes con EA-EPI⁺, EA-EPI⁻, FPI y PS; (b) Pacientes con AR-EPI⁺, AR-EPI⁻, FPI y PS; (c) Pacientes con ES-EPI⁺, ES-EPI⁻, FPI y PS; (d) Pacientes con otras EA-EPI⁺, FPI y PS. Las barras horizontales indican el valor medio de cada grupo de estudio y el borde inferior y superior de las cajas indican el valor mínimo y máximo, respectivamente. Los resultados significativos se destacan en **negrita**.

3.2. ADMA RELEVANTE EN EL DAÑO VASCULAR Y EN LA FIBROSIS PULMONAR EN LA AR-EPI⁺

Por un lado, en el marco de la vasculopatía se encontró que la expresión del gen *PRMT1* fue menor en los pacientes con EA-EPI⁺ en comparación con las PS (R.m=-2,50, p<0,001, **Figura 36a, Tabla S3**). De forma similar, al estratificar en función de la EA, los pacientes con AR-EPI⁺, ES-EPI⁺ y otras EA-EPI⁺ también mostraron una expresión de *PRMT1* inferior a las PS. En particular, esta diferencia con las PS fue estadísticamente significativa en la AR-EPI⁺ y otras EA-EPI⁺ (R.m=-2,56, p=0,004 y R.m=-5,26, p<0,001, respectivamente, **Figura 36b y d**, **Tabla S3**).

Asimismo, se analizó la relación de la presencia de fibrosis pulmonar y el gen *PRMT1*. Así, los pacientes con EA-EPI⁺ mostraron una expresión más baja que aquéllos con EA-EPI⁻ y FPI (R.m=-1,56, p=0,025 y R.m=-2,78, p<0,001, respectivamente, **Figura 36a**, **Tabla S3**). En concreto, se observó que la expresión de *PRMT1* fue inferior en los pacientes con AR-EPI⁺ en comparación con aquéllos con AR-EPI⁻ y FPI (R.m=-2,08, p=0,017 y R.m=-2,78, p=0,007, respectivamente, **Figura 36b**, **Tabla S3**). Esto occurrió de igual forma cuando se compararon los pacientes con ES-EPI⁺ y otras EA-EPI⁺ con aquéllos con FPI, siendo esta diferencia significativa en el caso de los pacientes con otras EA-EPI⁺ (R.m=-5,88, p=0,002, **Figura 36c-d**, **Tabla S3**). No obstante, los pacientes con ES-EPI⁺ no mostraron diferencias significativas con respecto a aquéllos con ES-EPI⁻ (**Figura 36c, Tabla S3**).



Figura 36. Diferencias en la expresión de PRMT1 entre todos los grupos de estudio. (a) Pacientes con EA-EPI⁺, EA-EPI⁻, FPI y PS; (b) Pacientes con AR-EPI⁺, AR-EPI⁻, FPI y PS; (c) Pacientes con ES-EPI⁺, ES-EPI⁻, FPI y PS; (d) Pacientes con otras EA-EPI⁺, FPI y PS. Las barras horizontales indican el valor medio de cada grupo de estudio y el borde inferior y superior de las cajas indican el valor mínimo y máximo, respectivamente. Los resultados significativos se destacan en **negrita**.

Por otro lado, se analizó el papel de ADMA en el daño vascular de la EA-EPI⁺, de manera que los pacientes con EA-EPI⁺ mostraron niveles séricos de ADMA más altos que las PS (p=0,003, **Figura 37a, Tabla S3**). Los mismos resultados se hallaron en los pacientes con AR-EPI⁺ y otras EA-EPI⁺, los cuales mostraron concentraciones de ADMA mayores que las PS (p<0,001 y p=0,053, respectivamente, **Figura 37b y d, Tabla S3**). Esta diferencia no fue estadísticamente significativa en el caso de los pacientes con ES-EPI⁺ (**Figura 37c, Tabla S3**).

Adicionalmente, se estudió la implicación de ADMA en el desarrollo de la fibrosis. En este sentido, los niveles séricos de ADMA fueron similares en los pacientes con EA-EPI⁺, EA-EPI⁻ y FPI (**Figura 37a, Tabla S3**). Asimismo, al estratificar según la EA subyacente, no se observaron diferencias significativas en los pacientes con ES-EPI⁺, otras EA-EPI⁺ y FPI (**Figura 37c-d, Tabla S3**). Tampoco se encontraron diferencias entre la ES-EPI⁺ y la ES-EPI⁻ (**Figura 37c, Tabla S3**). Además, los pacientes con AR-EPI⁺ presentaron niveles de ADMA significativamente superiores que aquéllos con AR-EPI⁻ y FPI (p=0,023 y p=0,001, respectivamente, **Figura 37b, Tabla S3**).



Figura 37. Diferencias en los niveles séricos de ADMA entre todos los grupos de estudio. (a) Pacientes con EA-EPI⁺, EA-EPI⁻, FPI y PS; (b) Pacientes con AR-EPI⁺, AR-EPI⁻, FPI y PS; (c) Pacientes con ES-EPI⁺, ES-EPI⁻, FPI y PS; (d) Pacientes con otras EA-EPI⁺, FPI y PS. Las barras horizontales indican el valor medio de cada grupo de estudio y el borde inferior y superior de las cajas indican el valor mínimo y máximo, respectivamente. Los resultados significativos se destacan en negrita.

3.3. AUSENCIA DE CORRELACIÓN ENTRE LOS BIOMARCADORES MOLECULARES INVOLUCRADOS EN LA REGULACIÓN DEL TONO VASCULAR EN LA EA-EPI⁺

Cuando se analizó la correlación entre la expresión de los genes *END1* y *PRMT1* en toda la cohorte de EA-EPI⁺, así como entre los niveles séricos de ET-1 y ADMA, no se encontró ninguna asociación estadísticamente significativa (**Tabla 20**).

Igualmente, no se encontró ninguna asociación entre la expresión del gen *END1* y los niveles séricos de ET-1, así como entre la expresión del gen *PRMT1* y las concentraciones de ADMA (**Tabla 20**).

Tabla 20. Correlación entre los biomarcadores moleculares involucrados en la regulación del tono vascular en la EA-EPI⁺.

		ET	-1		AD	MA		
	-	Niveles	séricos	Expre	sión	Niveles	séricos	
		ET	-1	ARNm I	PRMT1	ADMA		
	-	r	р	r	р	r	р	
ET-1	Expresión ARNm END1	0,10	0,47	-0,21	0,14	-		
	Niveles séricos ET-1	-		-		0,19	0,17	
ADMA	Expresión ARNm PRMT1	-		-		-0,04	0,75	

V. DISCUSIÓN

Las EA engloban distintas patologías en las que se produce un desequilibrio del sistema inmunitario, afectando a una gran variedad de órganos y disminuyendo la expectativa y calidad de vida de los pacientes. Una de las complicaciones más severas a las que se enfrentan estos pacientes es la EPI, que constituye una de sus principales causas de muerte ^{3–7}.

Frecuentemente, la fase inicial de estas enfermedades inflamatorias se caracteriza por un daño del endotelio vascular. A nivel pulmonar esto da lugar a una activación constitutiva de los fibroblastos, siendo clave para el desarrollo de lesiones pulmonares y la posterior aparición y progresión de EPI en las EA ^{58,59}. Sin embargo, los mecanismos subyacentes al daño vascular en la EA-EPI⁺ aún no han sido completamente establecidos.

Dado que existe una escasez de marcadores útiles para el diagnóstico precoz de la EA-EPI⁺ y que el daño vascular juega un papel clave en el inicio de la enfermedad, un mayor conocimiento de los mecanismos implicados en la disfunción endotelial podría contribuir a la identificación de la EA-EPI⁺.

Por todo ello, el objetivo de este trabajo de Tesis es dilucidar el papel de las células y moléculas claves de disfunción endotelial en los procesos patológicos de daño vascular y fibrosis pulmonar característicos de la EA-EPI⁺. Los resultados del presente trabajo reflejan diferentes comportamientos de estos marcadores biológicos en la EA-EPI⁺, por lo que se han agrupado en función de su asociación con los procesos fisiopatológicos en esta enfermedad.

1. Alteración de MCP-1, VCAM-1 y ADMA en presencia de daño vascular a nivel sistémico y pulmonar en la AR-EPI⁺

Nuestro trabajo mostró un incremento de los niveles de MCP-1, VCAM-1 y ADMA en los pacientes con AR-EPI⁺ en relación con las PS. Asimismo, los pacientes con AR-EPI⁺ presentaron, a su vez, niveles más elevados de MCP-1, VCAM-1 y ADMA que aquéllos con AR-EPI⁻ y FPI. Todos estos resultados indican que un efecto aditivo que combina el daño vascular causado por la inflamación y otras características inherentes de la AR, así como el asociado a los procesos fibróticos propios de la EPI se relaciona con mayores concentraciones de MCP-1, VCAM-1 y ADMA en la AR-EPI⁺ (**Figura 38**).



Figura 38. Participación de MCP-1, VCAM-1 y ADMA en la fisiopatología de la AR-EPI+.

En primer lugar, las altas concentraciones de **MCP-1** encontradas en nuestros pacientes con AR-EPI⁺ pueden ser consecuencia de la exposición sistémica crónica a citoquinas inflamatorias, descritas previamente como responsables de la sobreexpresión de la proteína ^{232,239,245,298}. En línea con nuestros resultados se han reportado concentraciones séricas de MCP-1 altas en AR y ES ^{57,62–64,234,235,238–243}. Cabe mencionar que nuestros pacientes con ES-EPI⁺ y otras EA-EPI⁺ también mostraron niveles altos de MCP-1 en relación con las PS, sugiriendo un papel de esta molécula en la vasculopatía subyacente de dichas patologías.

Asimismo, el aumento de los niveles de MCP-1 en circulación podría ser debido a una mayor permeabilidad o destrucción de la barrera alveolo-capilar en los pulmones de los pacientes con AR-EPI⁺. Por otra parte, la transformación de los macrófagos a un subtipo fibrótico en respuesta a MCP-1 explicaría su relación con la afectación pulmonar en nuestros pacientes con AR ^{247,299}. De acuerdo con estos resultados, previamente se ha descrito un papel profibrótico de MCP-1, asociándose con la presencia de EPI en varias EA y con una función pulmonar deteriorada ^{233,238,243,247-250}. Además, los pacientes con EPI, tanto AR-EPI⁺ como FPI, presentaron una expresión de *CCL2* más alta que aquéllos con AR-EPI⁻, lo que indica que podría intervenir en las vías de señalización fibróticas, tal y como se describe por otros autores ^{243,249,250}.

En segundo lugar, el incremento de **VCAM-1** en la AR-EPI⁺ posiblemente también sea el resultado de la presencia de inflamación sistémica, especies reactivas de O₂ y LDL oxidadas, entre otras, tal y como se ha reportado previamente en pacientes con AR ^{53,181,182,202,209,226,227,300}. En línea con nuestros resultados, se ha descrito previamente un aumento de los niveles de VCAM-1 en AR y otras EA ^{53–55,181,182,196,201,202,204,217,226–229}.

Además, a pesar de que los pacientes con EA-EPI⁺ mostraron los niveles más altos de VCAM-1, la expresión del gen *VCAM1* fue la más baja. A su vez, las PS que presentaron las concentraciones más bajas de VCAM-1, mostraron la expresión génica de *VCAM1* más alta. Por lo tanto, se podría plantear que los niveles elevados de VCAM-1 en sangre ejerzan un efecto negativo represor sobre la expresión del gen que lo codifica. No obstante, hay otros factores que pueden influir en los procesos que intervienen desde que *VCAM1* se transcribe hasta que la proteína queda libre en circulación: la existencia

de dos isoformas, las modificaciones postraduccionales y la escisión proteolítica necesaria para la liberación de VCAM-1 soluble ^{181,182,209,225}.

Adicionalmente, tanto la hipoxia que induce la producción de la proteína VCAM-1 como la estimulación de la proliferación de los fibroblastos por parte de esta molécula podrían explicar su papel profibrótico en la AR-EPI^{+ 209,230}. De hecho, mayores concentraciones de VCAM-1 se han asociado con un deterioro de la función pulmonar, así como con una mayor tasa de hospitalizaciones y muerte por EPI ^{196,209,222,230,231}.

Asimismo, cabe destacar que nuestros resultados mostraron una fuerte correlación positiva entre los niveles séricos de MCP-1 y VCAM-1, por lo que es lógico pensar que podrían compartir vías de señalización en respuesta al daño vascular.

En tercer lugar, el incremento sérico de **ADMA** en los pacientes con AR-EPI⁺ puede ser el resultado de la inhibición, por parte de citoquinas inflamatorias y el estrés oxidativo, de la enzima que degrada ADMA ^{48,301,302}. De acuerdo con nuestros datos, valores altos de ADMA han sido encontrados en otras cohortes de pacientes con AR ^{53–} ^{55,254,255,258–263}.

Por otro lado, tal y como se comentó en relación con VCAM-1, la hipoxia podría ser uno de los factores responsables del incremento de ADMA en nuestros pacientes con AR-EPI⁺. De hecho, la enzima que la degrada está inhibida por fenómenos de hipoxia, por lo que ADMA tiene un papel crucial en las enfermedades respiratorias y se correlaciona inversamente con la capacidad funcional pulmonar ^{252,253,255,268,301,303}. En línea con nuestros resultados, otros trabajos han propuesto que ADMA contribuye a la fibrosis pulmonar, describiendo una asociación de esta molécula con enfermedades pulmonares tales como la FPI o la HAP en ES ^{252,253,264,266,267,270–272}. Nuestro estudio de la expresión del gen *PRMT1*, al igual que se ha comentado anteriormente para el gen *VCAM1*, mostró que la expresión de *PRMT1* en los pacientes con AR-EPI⁺ fue la más baja, al contrario que lo ocurrido a nivel proteico. Por lo tanto, este hallazgo esto podría indicar la existencia de un mecanismo regulador de retroalimentación negativa en estos pacientes. No obstante, la formación de ADMA es el resultado de un balance de varios factores que incluyen el grado de metilación de la arginina y la degradación de la proteína ^{44,254,255}.
2. Relevancia de EPC, Selectina-E y ET-1 en la vasculopatía a nivel sistémico y pulmonar con un papel crucial en los procesos fibróticos de la EA-EPI⁺

El presente estudio mostró que los pacientes con EA-EPI⁺, independientemente de la EA subyacente, presentaron mayores frecuencias de EPC así como niveles de Selectina-E y ET-1 más altos en relación con las PS. Cabe resaltar que los pacientes con EA-EPI⁺ también exhibieron dicho incremento en relación con las PS, mientras que mostraron una disminución de estos biomarcadores en relación con aquéllos con EA-EPI⁺. Además, los niveles de Selectina-E y ET-1 fueron similares entre los pacientes con EA-EPI⁺ y FPI. En el caso de las EPC, los pacientes con FPI presentaron las frecuencias más altas. Estos resultados plantean la posibilidad de que el incremento en la frecuencia de las EPC y los niveles de Selectina-E y ET-1 se relacione con el daño vascular derivado tanto de las características propias de la EA como de la fibrosis pulmonar causada por la EPI. En este sentido, la afectación pulmonar intersticial mostró un papel predominante en la producción de estos biomarcadores, observándose un incremento aún mayor asociado a los procesos fibróticos (**Figura 39**). Este papel profibrótico, en el caso de ET-1, se observó específicamente en los pacientes con AR-EPI⁺ y otras EA-EPI⁺.



Figura 39. Participación de EPC, Selectina-E y ET-1 en la fisiopatología de la EA-EPI+.

En primer lugar, se puede plantear que un aumento de la producción de **EPC** y de su movilización a la circulación en la EA-EPI⁺ se produce como un mecanismo compensatorio en respuesta al daño endotelial vascular subyacente. En línea con esta hipótesis, otros trabajos han mostrado un aumento de EPC en la AR, la ES y otras EA ^{107,119–126,129,132}.

Por otra parte, nuestros datos parecen indicar que los procesos fibróticos del pulmón estimulan la producción de EPC de forma proporcional a la gravedad de la fibrosis pulmonar. La hipoxia podría explicar estos resultados ya que induce el reclutamiento de EPC ^{304,305}. En consonancia con nuestros resultados, otros trabajos han demostrado una asociación de las EPC tanto con complicaciones pulmonares en la ES como con la FPI ^{121,127,133,306}. No obstante, el aumento de las EPC en sangre no necesariamente indica que estas células sean funcionales. De hecho, nuestros estudios *in vitro* demostraron que la hipoxia afecta al desarrollo de sus funciones, disminuyendo su capacidad tubulogénica. Así, se puede especular que una vez que las EPC llegan a los sitios de daño vascular en ambientes hipóxicos, dichas células pueden proliferar, pero podrían no ser tan efectivas en cuanto a su capacidad angiogénica, pudiendo no llegar a conseguir reparar el daño vascular.

Adicionalmente, nuestros resultados revelaron una correlación inversa de la frecuencia de EPC con la duración de la ES en los pacientes con ES-EPI⁺ y, a su vez, una elevación de las EPC más notable en los pacientes con ES en fases tempranas de la enfermedad, tal y como han publicado previamente otros autores ^{90,116,119,123-125,306,307}. Por lo tanto, es concebible pensar que la disminución de las EPC en los pacientes con una enfermedad más avanzada esté relacionada con el reclutamiento de dichas células en los tejidos dañados, lo que conduce a una disminución de las EPC en los hombres, hecho que cabría esperar teniendo en cuenta que el sexo masculino es un factor de riesgo para la ES-EPI⁺ ^{16,38}.

En segundo lugar, los niveles incrementados de **Selectina-E** en la EA-EPI⁺ podrían relacionarse con la exposición a citoquinas inflamatorias, ya que se ha descrito que su inducción se desencadena principalmente en respuesta a un estímulo

122

inflamatorio ^{180,190–193}. De acuerdo con nuestros datos, se han observado concentraciones elevadas de Selectina-E en la AR, la ES y otras EA ^{53,54,190,194–206}.

Asimismo, los niveles de Selectina-E más altos en los pacientes con EA-EPI⁺ y FPI podrían sugerir que la lesión pulmonar mediada por leucocitos es necesaria para el inicio y/o la propagación del proceso fibrogénico. Así, se la ha considerado previamente como una proteína relevante en la progresión de la fibrosis pulmonar ^{183,184,207-209}. De forma adicional, los pacientes con EA-EPI⁺ y FPI, que presentaban las concentraciones más altas de la proteína, mostraron una expresión del gen *SELE* más baja, mientras que aquéllos con EA-EPI⁻ y las PS, que tenían los niveles más bajos de Selectina-E, presentaron la expresión del gen *SELE* más alta. Por lo tanto, es concebible pensar que su producción está regulada por un mecanismo de retroalimentación negativa. No obstante, es de destacar que intervienen muchos factores en los procesos que tienen lugar desde que el gen *SELE* codifica la proteína hasta que la proteína Selectina-E queda soluble en suero, tales como inhibidores de la transcripción o de la traducción, una vida corta del ARN mensajero y la rápida eliminación de la proteína por lisosomas, entre otros ¹⁹¹.

En tercer lugar, al igual que Selectina-E, **ET-1** es posible que aumente en suero debido a la influencia de citoquinas inflamatorias, tal y como se ha demostrado en múltiples enfermedades asociadas con inflamación ^{275,282,308}.

Además, la hipoxia podría estar estimulando la producción de ET-1 en nuestros pacientes con AR-EPI⁺, puesto que es uno de sus inductores más importantes ^{45,273,275}. Por otra parte, su papel profibrótico en estos pacientes también podría ser consecuencia de su capacidad para estimular la proliferación y activación de los fibroblastos así como de sus efectos en la apoptosis de las células epiteliales alveolares ^{273,275,276,282,284}. En línea con esta idea, estudios previos han descrito un papel de ET-1 en el desarrollo de fibrosis pulmonar ^{96,275,276,279-284}.

Es importante mencionar que nuestro trabajo mostró una sobreexpresión del gen *END1* en los pacientes con EA-EPI⁺, así como en el resto de los pacientes (a excepción de aquéllos con ES-EPI⁻), en relación con las PS, lo que apoya el papel de ET-1 en el daño vascular subyacente. A favor de nuestros resultados, otros autores han revelado una mayor expresión del gen *END1* y concentraciones más altas de ET-1 tanto en sangre

V. DISCUSIÓN

como en otras muestras biológicas de pacientes con EA-EPI⁺, EA-EPI⁻ y FPI en relación con las PS ^{275,276,279-284}. Por lo tanto, una mayor expresión del gen *END1* podría producir mayores concentraciones de ET-1 en nuestros pacientes con EA-EPI⁺.

3. TAng, VEGF e ICAM-1 claves en los procesos fibróticos de la EA-EPI+

Nuestro estudio mostró una disminución de TAng y un incremento de los niveles de ICAM-1 en los pacientes con EA-EPI⁺, independientemente de la EA, en relación con las PS y los pacientes con EA-EPI⁻. Cabe resaltar que las concentraciones de ICAM-1 y las frecuencias de TAng fueron similares entre los pacientes con EA-EPI⁺ y FPI y también a su vez entre aquéllos con EA-EPI⁻ y las PS, indicando que estos biomarcadores podrían estar asociadas al desarrollo de la vasculopatía a nivel pulmonar. Además, los pacientes con EA-EPI⁺ también presentaron niveles de VEGF más altos que aquéllos con EA-EPI⁻ y similares a los de los pacientes con FPI (a excepción de la AR-EPI⁺). Así, se propone que la alteración de TAng, VEGF e ICAM-1 podría estar vinculada con el daño pulmonar asociado a la fibrosis en los pacientes con EA-EPI⁺ (**Figura 40**).



Figura 40. Participación de TAng, VEGF e ICAM-1 en la fisiopatología de la EA-EPI+.

En primer lugar, es razonable pensar que la disminución de **TAng** circulantes en los pacientes con EA-EPI⁺ está causada por una migración de estas células al sitio de la lesión pulmonar con el fin de reparar el endotelio. En concordancia con nuestros resultados en los que observamos una variación de TAng con el desarrollo de EPI en las EA, un estudio previo en LES mostró una alteración de dichas células en presencia de afectación renal, una de las comorbilidades más graves de esta enfermedad ¹¹⁸.

Asimismo, encontramos una frecuencia más baja de TAng en los hombres con AR-EPI⁺, lo que cabría esperar ya que el sexo masculino es un factor de riesgo para esta patología ^{10,11,15,17,19,21,22,24–27}. Paradójicamente, se observó una mayor frecuencia de TAng en los pacientes con ES positivos para Scl-70 en comparación con aquéllos negativos para este anticuerpo. Además, en estos pacientes una mayor frecuencia de TAng se asoció con ratios más altos de VEF1/CVF. Dado que el anticuerpo Scl-70 es un factor de riesgo para el desarrollo de EPI en los pacientes con ES y una disminución en la CVF se emplea como medida rutinaria para evaluar la progresión de la enfermedad en una EPI fibrótica ^{12,13,21,35,37–39}, es posible que el incremento relativo de TAng en los pacientes con ES-EPI⁺ en estas dos situaciones se deba a un mecanismo compensatorio en respuesta al daño vascular. Cabe mencionar que los pacientes con otras EA-EPI⁺ que presentaban un patrón NINE mostraron las frecuencias de TAng más bajas, lo que está de acuerdo con el hecho de que NINE es el patrón predominante en las EA-EPI⁺ ^{4–6,20}.

En segundo lugar, la mayor producción de **VEGF** en los pacientes con EA-EPI⁺ en relación con aquéllos con EA-EPI⁻ podría estar promovida por los fenómenos de hipoxia, los cuales constituyen uno de principales inductores de la proteína ^{96,152,153}. Además, el aumento sérico de VEGF podría constituir una respuesta compensatoria a la lesión en el pulmón dado que el daño de las células epiteliales alveolares y la liberación de proteasas por neutrófilos infiltrados en el tejido pulmonar producen una disminución de VEGF en el compartimento alveolar ^{60,171}. En línea con estas ideas, se ha propuesto que VEGF contribuye a la fibrogénesis ^{64,96,151,162–166,168,171,175}. Es importante destacar que la expresión del gen *VEGF* fue más alta en los pacientes con ES-EPI⁺ respecto a aquéllos con una ES-EPI⁻, por lo que es posible pensar que la presencia de hipoxia en este contexto también favorece la sobreexpresión del gen *VEGF* produciendo mayores niveles de la proteína. Por otra parte, nuestro trabajo mostró que los pacientes con EA-EPI⁺ presentaron una menor frecuencia del alelo A de *VEGF* rs1570360 en relación con las PS, indicando que el alelo A de dicho polimorfismo podría ejercer un papel protector en la EA-EPI⁺. Además, nuestros datos revelaron una frecuencia más alta del alelo C de *VEGF* rs2010963 en los pacientes con EA-EPI⁺ en relación con las PS, por lo que la presencia del alelo C podría considerarse como un factor de riesgo de la enfermedad. En particular, estudios previos han reportado la asociación de *VEGF* rs2010963 con diversas EA ^{154,309}.

En tercer lugar, es comprensible plantear que los niveles altos de **ICAM-1** en los pacientes con EA-EPI⁺ podrían deberse a la pérdida de las unidades alveolo-capilares ya que al ser éstas una fuente importante de producción de ICAM-1^{208,209}, otros órganos liberan la proteína a la circulación como una respuesta compensatoria al daño pulmonar. Además, su papel en la afectación pulmonar podría estar vinculado con su capacidad de regular la acumulación de células profibróticas en los pulmones ³¹⁰. De acuerdo con nuestros resultados, ICAM-1 se ha considerado un indicador de la disfunción respiratoria, encontrándose mayores concentraciones en los pacientes con ES con una afectación pulmonar ^{195,211,216,217,221,222}. Asimismo, nuestros resultados revelaron una asociación positiva entre ICAM-1 y Selectina-E (otra proteína que también encontramos relacionada con la fibrosis pulmonar) tanto a nivel sérico como de expresión génica en la EA-EPI⁺. En consecuencia, ambas moléculas podrían compartir vías de señalización implicadas en la fibrosis pulmonar.

Adicionalmente, los pacientes con EA-EPI⁺ presentaron una menor expresión de *ICAM1* en sangre en relación con las PS. Estudios previos han revelado que ICAM-1 soluble funciona como un inhibidor competitivo de ICAM-1 unido a la membrana reprimiendo la expresión de *ICAM1*²¹⁶, pudiendo ser un reflejo de lo que ocurre en nuestros individuos. No obstante, resulta complicado encontrar una relación directa entre ICAM-1 circulante y la expresión del gen *ICAM1* que codifica para ICAM-1 de membrana puesto que muchos factores están implicados en este contexto, destacando las enzimas encargadas de la escisión proteolítica de ICAM-1 de membrana y los inhibidores que bloquean la liberación de ICAM-1 soluble ^{187,195,213}.

V. DISCUSIÓN

Utilidad de las células y moléculas estudiadas como biomarcadores de la EA-EPI⁺ en la práctica clínica

Los biomarcadores están adquiriendo una importancia potencial en una gran variedad de patologías, pudiendo ser especialmente relevantes en la EA-EPI⁺ debido a la severidad de la enfermedad y la dificultad de su diagnóstico precoz. En este sentido, nuestros datos sugieren que los biomarcadores de disfunción endotelial vascular estudiados podrían tener una mayor relevancia para su uso en la práctica clínica dada su facilidad de adquisición mediante técnicas poco invasivas y su papel en la identificación de la EPI en los pacientes con una EA, así como en la diferenciación de la EA-EPI⁺ y la FPI. Así, dichos biomarcadores podrían constituir herramientas adicionales que podrían ser integradas en un algoritmo de diagnóstico de EA-EPI⁺. Por consiguiente, favorecerían el manejo de los pacientes de manera más personalizada, pudiendo ayudar a evitar la progresión del daño pulmonar hasta una situación irreversible y de esta manera, pudiendo tener un papel en el pronóstico de los pacientes. Asimismo, estos biomarcadores podrían ser relevantes en la identificación de dianas terapéuticas sobre las que se sustentaría el desarrollo de futuros tratamientos.

Nuestro estudio ha mostrado resultados prometedores a nivel celular y proteico haciendo posible que las células y moléculas estudiadas puedan ser consideradas como biomarcadores que pudieran caracterizar mejor la enfermedad. Por consiguiente, se propone que estos biomarcadores podrían tener las siguientes aplicaciones en la práctica clínica en el contexto de la EA-EPI⁺ (**Figura 41**):

- <u>Diagnóstico precoz de EPI en los pacientes con EA</u>: las frecuencias de EPC y TAng, así como los niveles de VEGF, Selectina-E e ICAM-1 podrían resultar útiles para la identificación de la presencia de EPI en los pacientes con EA, independientemente de que ésta sea una AR o una ES. Además, el estudio de las EPC permitiría identificar a aquellos pacientes con EA-EPI⁺ con peor pronóstico.
- <u>Diagnóstico precoz de EPI en los pacientes con AR</u>: los niveles de MCP-1,
 VCAM-1, ADMA y ET-1 podrían identificar la presencia de EPI específicamente en los pacientes con AR.

- <u>Diagnóstico diferencial entre EA-EPI+ y FPI</u>: la evaluación de la frecuencia de EPC podría ayudar al diagnóstico diferencial entre la EA-EPI+ y la FPI.
- <u>Diagnóstico diferencial entre AR-EPI+ y FPI</u>: los niveles de MCP-1, VCAM-1 y ADMA permitirían diferenciar a los pacientes con AR-EPI+ de aquéllos con FPI.



Figura 41. Biomarcadores celulares y moleculares propuestos en este trabajo para el diagnóstico precoz de la EA-EPI⁺ así como el diagnóstico diferencial entre EA-EPI⁺ y FPI. *Biomarcadores específicos de AR-EPI⁺.

5. Perspectivas del estudio

Tras la realización del presente trabajo de tesis, se plantea continuar investigando en los mecanismos fisiopatológicos de la EA-EPI⁺.

Por un lado, dada la complejidad de la fisiopatología de la EA-EPI⁺ y la importancia del pulmón en esta enfermedad, el próximo objetivo estaría enfocado en el estudio de la expresión en tejido pulmonar de los genes analizados en esta tesis. De esta manera, se podría ver la implicación de estos genes en el pulmón, así como estudiar si su expresión en dicho tejido se relacionaría con la observada en sangre periférica. En este sentido, nuestro grupo de investigación cuenta ya con 16 secciones de tejido pulmonar de pacientes con EPI recogidas tras el trasplante. Estos estudios podrían aportar resultados muy relevantes y novedosos en este campo.

Por otro lado, sería interesante evaluar el papel de otros biomarcadores en la EA-EPI⁺ tanto a nivel pulmonar como sanguíneo.

Finalmente, la presente tesis abre las puertas a establecer colaboraciones con otros hospitales incrementando el tamaño muestral de nuestros grupos de estudio.

VI. CONCLUSIONES

- MCP-1, VCAM-1 y ADMA son moléculas relevantes en el daño vascular sistémico subyacente y los procesos fibróticos del pulmón característicos de la AR-EPI⁺, constituyendo biomarcadores de diagnóstico precoz de EPI en la AR y de diagnóstico diferencial entre AR-EPI⁺ y FPI.
- 2. Las EPC actúan como un mecanismo compensatorio en respuesta al daño endotelial en la EA-EPI⁺, incrementando progresivamente según la gravedad de la afectación pulmonar. El grado de la frecuencia de EPC facilitaría la identificación precoz de pacientes con EA-EPI⁺ y de éstos con peor pronóstico, así como permitiría el diagnóstico diferencial entre EA-EPI⁺ y FPI.
- **3.** La capacidad tubulogénica de las EPC *in vitro* se encuentra disminuida en ambientes de hipoxia.
- **4.** Selectina-E y ET-1 se asocian con el daño vascular a nivel sistémico y pulmonar, siendo fundamentales en los procesos fibróticos que favorecen el desarrollo de EPI en las EA, particularmente en la AR en el caso de ET-1.
- **5.** La alteración de TAng e ICAM-1 se vincula con el daño pulmonar propio de la EPI, constituyendo biomarcadores de diagnóstico precoz de EPI en las EA.
- **6.** VEGF, a nivel genético y sérico, contribuye a la fisiopatología de la EA-EPI⁺, destacando que la proteína desempeña un papel profibrótico que permite establecer un diagnóstico precoz de EPI en los pacientes con EA.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- 1. Wang, L., Wang, F. & Gershwin, M. E. Human autoimmune diseases : a comprehensive update. *J. Intern. Med.* **278**, 369–395 (2015).
- Fischer, A. & du Bois, R. Interstitial lung disease in connective tissue disorders. *Lancet* 380, 689–698 (2012).
- Antoniou, K. M., Margaritopoulos, G., Economidou, F. & Siafakas, N. M. Pivotal clinical dilemmas in collagen vascular diseases associated with interstitial lung involvement. *Eur. Respir. J.* 33, 882–896 (2009).
- Cottin, V. I. Idiopathic interstitial pneumonias with connective tissue diseases features : A review. *Respirology* 21, 245–258 (2016).
- 5. Mathai, S. C. & Danoff, S. K. Management of interstitial lung disease associated with connective tissue disease. *Bmj* **352**, h6819 (2016).
- Ysamat Marfá, R., Benito Ysamat, A., Espejo Pérez, S., Blanco Negredo, M. & Roldán Molina, R. Lung disease associated with connective tissue disease. *Radiologia* 55, 107–117 (2013).
- Atienza-Mateo, B. *et al.* The Spectrum of Interstitial Lung Disease Associated with Autoimmune Diseases : Data of a 3.6-Year Prospective Study from a Referral Center of Interstitial Lung Disease and Lung Transplantation. *J. Clin. Med.* 9, 1606 (2020).
- Travis, W. D. *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.* 188, 733–748 (2013).
- 9. Behr, J. Approach to the Diagnosis of Interstitial Lung Disease. *Clin. Chest Med.* **33**, 1–10 (2012).
- 10. Atzeni, F. *et al.* Interstitial lung disease in systemic autoimmune rheumatic diseases : a comprehensive review. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **14**, 69–82 (2018).
- Manfredi, A. *et al.* Rheumatoid arthritis related interstitial lung disease. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 17, 485–497 (2021).
- Distler, O., Volkmann, E. R., Hoffmann-vold, A. M. & Maher, T. M. Current and future perspectives on management of systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 15, 1009–1017 (2019).
- 13. Distler, O. *et al.* Predictors of progression in systemic sclerosis patients with interstitial lung disease. *Eur. Respir. J.* **55**, 1902026 (2020).
- Khedoe, P., Marges, E., Hiemstra, P., Ninaber, M. & Geelhoed, M. Interstitial Lung Disease in Patients With Systemic Sclerosis: Toward Prediction and Drug Screening Models of Systemic Sclerosis-Related Interstitial Lung Disease (SSc-ILD). *Front. Inmunol.* **11**, 1990 (2020).
- Bendstrup, E., Møller, J., Kronborg-white, S., Prior, T. S. & Hyldgaard, C. Interstitial Lung Disease in Rheumatoid Arthritis Remains a Challenge for Clinicians. *J. Clin. Med.* 8, 2038 (2019).

- 16. Khanna, D. *et al.* Etiology, Risk Factors, and Biomarkers in Systemic Sclerosis with Interstitial Lung Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **201**, 650–660 (2020).
- 17. Shaw, M., Collins, B. F., Ho, L. A. & Raghu, G. Rheumatoid arthritis-associated lung disease. *Eur. Respir. Rev.* 24, 1–16 (2015).
- Castelino, F. V, Goldberg, H. & Dellaripa, P. F. The impact of rheumatological evaluation in the management of patients with interstitial lung disease. *Rheumatol.* 50, 489–493 (2011).
- Lauretis, A. De, Veeraraghavan, S. & Renzoni, E. Connective tissue disease-associated interstitial lung disease : How does it differ from IPF ? How should the clinical approach differ ? *Chron. Respir. Dis.* 8, 53–82 (2011).
- 20. Lee, H. *et al.* Histopathologic Pattern and Clinical Features of Rheumatoid Arthritis-Associated Interstitial Lung Disease. *Chest* **127**, 2019–2027 (2005).
- 21. Gómez-Carrera, L. & Bonilla-Hernan, G. Pulmonary Manifestations of Collagen Diseases. *Arch. Bronconeumol.* **49**, 249–260 (2013).
- Suda, T. Up-to-Date Information on Rheumatoid Arthritis-Associated Interstitial Lung Disease. *Clin. Med. Insights Circ. Respir. Pulm. Med.* 9, 155–162 (2015).
- 23. Gonzalez-Gay, M. A., Gonzalez-Juanatey, C. & Martin, J. Rheumatoid Arthritis : A Disease Associated with Accelerated Atherogenesis. *Semin. Arthritis Rheum.* **35**, 8–17 (2005).
- 24. Bongartz, T. *et al.* Incidence and Mortality of Interstitial Lung Disease in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum.* **62**, 1583–1591 (2010).
- 25. Hyldgaard, C. *et al.* A population-based cohort study of rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease : comorbidity and mortality. *Ann. Rheum. Dis.* **76**, 1700–1706 (2017).
- 26. Solomon, J. J. *et al.* Predictors of mortality in rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease. *Eur. Respir. J.* **47**, 588–596 (2016).
- Zamora-legoff, J. A., Krause, M. L., Crowson, C. S., Ryu, J. H. & Matteson, E. L. Patterns of interstitial lung disease and mortality in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 56, 344–350 (2017).
- 28. Kakutani, T. *et al.* Related factors, increased mortality and causes of death in patients with rheumatoid arthritis- associated interstitial lung disease. *Mod. Rheumatol.* **30**, 458–464 (2020).
- Paulin, F., Doyle, T. J., Fletcher, E. A., Ascherman, D. P. & Rosas, I. O. Rheumatoid Arthritis-Associated Interstitial Lung Disease and Idiopathic Pulmonary Fibrosis : Shared Mechanistic and Phenotypic Traits Suggest Overlapping Disease Mechanisms. *Rev. Investig. Clínica* 67, 280–286 (2015).
- Atienza-Mateo, B. *et al.* Rituximab in the Treatment of Interstitial Lung Disease Associated with Autoimmune Diseases : Experience from a Single Referral Center and Literature Review. J. Clin. Med. 9, 3070 (2020).

- 31. Kobayashi, A. & Okamoto, H. Treatment of interstitial lung diseases associated with connective tissue diseases. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* **5**, 219–227 (2012).
- 32. Vicente-Rabaneda, E. F. *et al.* Efficacy and safety of abatacept in interstitial lung disease of rheumatoid arthritis: A systematic literature review. *Autoimmun. Rev.* **20**, 102830 (2021).
- Vicente-Rabaneda, E. F. *et al.* Efficacy and safety of biological drugs in interstitial lung disease associated with connective tissue diseases. *Expert Opin. Drug Saf.* 21, 311–333 (2022).
- 34. Hoffmann-Vold, A.-M. *et al.* The need for a holistic approach for SSc- ILD achievements and ambiguity in a devastating disease. *Respir. Res.* **21**, 197 (2020).
- Roofeh, D., Jaafar, S., Vummidi, D. & Khanna, D. Management of Systemic Sclerosis-Associated Interstitial Lung Disease. *Curr. Opin. Rheumatol.* 31, 241–249 (2019).
- 36. Manetti, M. *et al.* Angiogenic T cell expansion correlates with severity of peripheral vascular damage in systemic sclerosis. *PLoS One* **12**, e0183102 (2017).
- Caron, M., Hoa, S., Hudson, M., Schwartzman, K. & Steele, R. Pulmonary function tests as outcomes for systemic sclerosis interstitial lung disease. *Eur. Respir. Rev.* 27, 170102 (2018).
- Cottin, V. & Brown, K. K. Interstitial lung disease associated with systemic sclerosis (SSc-ILD). *Respir. Res.* 20, 13 (2019).
- Fischer, A., Patel, N. M. & Volkmann, E. R. Interstitial Lung Disease in Systemic Sclerosis : Focus on Early Detection and Intervention. *Open Access Rheumatol. Res. Rev.* 11, 283–307 (2019).
- 40. Richeldi, L. *et al.* Efficacy and Safety of Nintedanib in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *N. Engl. J. Med.* **370**, 2071–2082 (2014).
- López-Mejías, R. *et al.* Influence of MUC5B gene on antisynthetase syndrome. *Sci. Rep.* 10, 1415 (2020).
- 42. Godo, S. & Shimokawa, H. Endothelial Functions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **37**, e108–e114 (2017).
- Ambrosino, P., Grassi, G. & Maniscalco, M. Endothelial Dysfunction: From a Pathophysiological Mechanism to a Potential Therapeutic Target. *Biomedicines* 10, 78 (2022).
- Deanfield, J. E., Halcox, J. P. & Rabelink, T. J. Contemporary Reviews in Cardiovascular Medicine Endothelial Function and Dysfunction Testing and Clinical Relevance Endothelium in Normal Vascular Homeostasis. *Contemp. Rev. Cardiovasc. Med.* 115, 1285– 1295 (2007).
- 45. Duboscq, C. Vascular endothelium. *Hematología* **21**, 19–30 (2017).
- Guiducci, S., Distler, O., Distler, J. H. W. & Matucci-Cerinic, M. Mechanisms of vascular damage in SSc – implications for vascular treatment strategies. *Rheumatol.* 47 Suppl 5,

v18-20 (2008).

- 47. Distler, J. H. W., Gay, S. & Distler, O. Angiogenesis and vasculogenesis in systemic sclerosis. *Rheumatol.* **45 Suppl 3**, 26–27 (2006).
- Sattar, N., Mccarey, D. W., Capell, H. & Mcinnes, I. B. Explaining How "High-Grade " Systemic Inflammation Accelerates Vascular Risk in Rheumatoid Arthritis. *Circulation* 108, 2957–2963 (2003).
- González-Gay, M. A., Gonzalez-Juanatey, C., Vazquez-Rodriguez, T. R., Martin, J. & Llorca, J. Endothelial Dysfunction, Carotid Intima-Media Thickness, and Accelerated Atherosclerosis in Rheumatoid Arthritis. *Semin. Arthritis Rheum.* 38, 67–70 (2008).
- 50. Szucs, G. *et al.* Endothelial dysfunction precedes atherosclerosis in systemic sclerosis relevance for prevention of vascular complications. *Rheumatology* **46**, 759–762 (2007).
- 51. Müller-Ladner, U., Distler, O., Ibba-manneschi, L., Neumann, E. & Gay, S. Mechanisms of vascular damage in systemic sclerosis. *Autoinmunity* **42**, 587–595 (2009).
- 52. Fleming, J. N., Nash, R. A., Mahoney Jr, W. M. & Schwartz, S. M. Is Scleroderma a Vasculopathy? *Curr. Rheumatol. Rep.* **11**, 103–110 (2009).
- 53. Murdaca, G. *et al.* Endothelial dysfunction in rheumatic autoimmune diseases. *Atherosclerosis* **224**, 309–317 (2012).
- 54. Soltész, P. *et al.* Autoimmunity Reviews Comparative assessment of vascular function in autoimmune rheumatic diseases: Considerations of prevention and treatment. *Autoimmun. Rev.* **10**, 416–425 (2011).
- 55. Steyers, C. M. & Miller, F. J. Endothelial Dysfunction in Chronic Inflammatory Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 11324–11349 (2014).
- 56. Asano, Y. & Sato, S. Vasculopathy in scleroderma. Semin. Immunopathol. 37, 489–500 (2015).
- 57. Yang, X., Chang, Y. & Wei, W. Endothelial Dysfunction and Inflammation : Immunity in Rheumatoid Arthritis. *Mediators Inflamm.* **2016**, 6813016 (2016).
- 58. Bacha, N. C. *et al.* Endothelial Microparticles are Associated to Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Stem Cell Rev. Reports* **14**, 223–235 (2017).
- Kawano-Dourado, L., Ab'Saber, A. M., Capelozzi, V. L., Valeri, C. & Barbas, C. S. V. In Situ Evidence of Pulmonary Endothelial Activation in Patients with Granulomatosis with Polyangiitis and Systemic Sclerosis. *Lung* **193**, 355–359 (2015).
- 60. Mura, M., Santos, C. C., Stewart, D. & Liu, M. Vascular endothelial growth factor and related molecules in acute lung injury. *J. Appl. Physiol.* **97**, 1605–1617 (2004).
- 61. Krüger-Genge, A., Blocki, A., Franke, R. P. & Jung, F. Vascular endothelial cell biology: An update. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 4411 (2019).
- 62. Chora, I. *et al.* Autoimmunity Reviews Vascular biomarkers and correlation with peripheral vasculopathy in systemic sclerosis. *Autoimmun. Rev.* **14**, 314–322 (2015).

- 63. Randone, S. B. *et al.* Angiostatic and angiogenic chemokines in systemic sclerosis: an overview. *J. Scleroderma Relat. Disord.* **2**, 1–10 (2017).
- 64. Hasegawa, M. Biomarkers in systemic sclerosis : Their potential to predict clinical courses. *J. Dermatol.* **43**, 29–38 (2016).
- 65. Wolk, R. *et al.* Plasma Leptin and Prognosis in Patients With Established Coronary Atherosclerosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* **44**, 1819–1824 (2004).
- Macdonald, I. J. *et al.* Implications of Angiogenesis Involvement in Arthritis. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 2012 (2018).
- 67. Weil, B. R. *et al.* CD31+ T Cells, Endothelial Function and Cardiovascular Risk. *Hear. Lung Circ.* **20**, 659–662 (2011).
- Asahara, T. *et al.* Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis. *Sci. New Ser.* 275, 964–967 (1997).
- 69. Fadini, G. P. *et al.* Technical notes on endothelial progenitor cells : Ways to escape from the knowledge plateau. *Atherosclerosis* **197**, 496–503 (2008).
- 70. Aragona, C. O. *et al.* Endothelial Progenitor Cells for Diagnosis and Prognosis in Cardiovascular Disease. *Stem Cells Int.* **2016**, 8043792 (2016).
- 71. Zhang, H. A. O. *et al.* Isolation and characterization of human umbilical cord derived endothelial colony forming cells. *Exp. Ther. Med.* **14**, 4160–4166 (2017).
- Alphonse, R. S. *et al.* Existence, Functional Impairment, and Lung Repair Potential of Endothelial Colony-Forming Cells in Oxygen-Induced Arrested Alveolar Growth. *Am. Hear. Assoc.* 129, 2144–2157 (2014).
- 73. Yu, S. *et al.* Isolation and characterization of endothelial colony-forming cells from mononuclear cells of rat bone marrow. *Exp. Cell Res.* **370**, 116–126 (2018).
- 74. Duong, H. T. *et al.* Pulmonary artery endothelium resident endothelial colony-forming cells in pulmonary arterial hypertension. *Pulm. Circ.* **1**, 475–486 (2011).
- 75. Colombo, E., Calcaterra, F., Cappelletti, M., Mavilio, D. & Della Bella, S. Comparison of Fibronectin and Collagen in Supporting the Isolation and Expansion of Endothelial Progenitor Cells from Human Adult Peripheral Blood. *PLoS One* 8, e66734 (2013).
- Luttun, A., Carmeliet, G. & Carmeliet, P. Vascular progenitors: From biology to treatment. *Trends Cardiovasc. Med.* 12, 88–96 (2002).
- 77. Khzam, L. B. *et al.* Early outgrowth cells versus endothelial colony forming cells functions in platelet aggregation. *J. Transl. Med.* **13**, 353 (2015).
- 78. Banno, K. & Yoder, M. C. Tissue regeneration using endothelial colony-forming cells: Promising cells for vascular repair. *Pediatr. Res.* **83**, 283–290 (2018).
- 79. Chillà, A. *et al.* Mature and progenitor endothelial cells perform angiogenesis also under protease inhibition : the amoeboid angiogenesis. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **37**, 74 (2018).

- 80. Medina, R. J. *et al.* Endothelial Progenitors: A Consensus Statement on Nomenclature. *Stem Cells Transl. Med.* **6**, 1316–1320 (2017).
- 81. Mena, H. A., Zubiry, P. R., Dizier, B., Schattner, M. & Boisson-vidal, C. Acidic preconditioning of endothelial colony-forming cells (ECFC) promote vasculogenesis under proinflammatory and high glucose conditions in vitro and in vivo. *Stem Cell Res. Ther.* **9**, 120 (2018).
- Siegel, G. *et al.* Manufacture of endothelial colony-forming progenitor cells from steadystate peripheral blood leukapheresis using pooled human platelet lysate. *Transfusion* 58, 1132–1142 (2018).
- D'Audigier, C. *et al.* Egfl7 Represses the Vasculogenic Potential of Human Endothelial Progenitor Cells. *Stem Cell Rev. Reports* 14, 82–91 (2018).
- Critser, P. J. & Yoder, M. C. Endothelial Colony Forming Cell role in neoangiogenesis and tissue repair. *Curr. Opin. Organ Transplant.* 15, 68–72 (2010).
- 85. Alvarez, D. F. *et al.* Lung microvascular endothelium is enriched with progenitor cells that exhibit vasculogenic capacity. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **294**, L419–L430 (2008).
- 86. Baker, C. D. *et al.* Endothelial Colony-forming Cells from Preterm Infants Are Increased and More Susceptible to Hyperoxia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **180**, 454–461 (2009).
- 87. Case, J. *et al.* progenitor cells but distinct , primitive hematopoietic progenitors. *Exp. Hematol.* **35**, 1109–1118 (2007).
- Ingram, D. A. *et al.* Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Hemostasis, Thromb. Vasc. Biol.* 104, 2752–2761 (2004).
- Tasev, D. *et al.* CD34 expression modulates tube-forming capacity and barrier properties of peripheral blood-derived endothelial colony-forming cells (ECFCs). *Angiogenesis* 19, 325–338 (2016).
- 90. Distler, J. H. W. *et al.* EULAR Scleroderma Trials and Research group statement and recommendations on endothelial precursor cells EUSTAR statement and recommendations on endothelial precursor cells. *Ann. Rheum. Dis.* **68**, 163–168 (2009).
- 91. Schmidt-Lucke, C. *et al.* Quantification of Circulating Endothelial Progenitor Cells Using the Modified ISHAGE Protocol. *PLoS One* **5**, e13790 (2010).
- 92. Timmermans, F. *et al.* Endothelial Outgrowth Cells Are Not Derived From CD133+ Cells or CD45+ Hematopoietic Precursors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 1572–1579 (2007).
- Craenenbroeck, E. M. Van *et al.* Quantification of circulating CD34 + / KDR + / CD45 dim endothelial progenitor cells: Analytical considerations. *Int. J. Cardiol.* 167, 1688–1695 (2013).
- 94. Kuwana, M. & Okazaki, Y. Quantification of circulating endothelial progenitor cells in systemic sclerosis : a direct comparison of protocols. *Ann. Rheum. Dis.* **71**, 617–620 (2012).

- Shirai, Y. *et al.* Elevated Levels of Pentraxin 3 in Systemic Sclerosis Associations With Vascular Manifestations and Defective Vasculogenesis. *Arthritis Rheumatol.* **67**, 498–507 (2015).
- 96. Farkas, L., Gauldie, J., Voelkel, N. F. & Kolb, M. Pulmonary hypertension and idiopathic pulmonary fibrosis: a tale of angiogenesis, apoptosis, and growth factors. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 45, 1–15 (2011).
- 97. Asosingh, K. *et al.* Circulating angiogenic precursors in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Pathol.* **172**, 615–627 (2008).
- 98. Hill, J. M. *et al.* Circulating Endothelial Progenitor Cells, Vascular Function, and Cardiovascular Risk. *N. Engl. J. Med.* **348**, 593–600 (2003).
- 99. Khakoo, A. Y. & Finkel, T. Endothelial Progenitor Cells. Annu. Rev. Med. 56, 79–101 (2005).
- 100. Povsic, T. J. & Goldschmidt-clermont, P. J. Endothelial progenitor cells : markers of vascular reparative capacity. *Ther. Adv. Cardiovasc. Dis.* **2**, 199–213 (2008).
- 101. Shintani, S. *et al.* Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* **103**, 2776–2779 (2001).
- 102. Ye, L. & Poh, K.-K. Enhancing endothelial progenitor cell for clinical use. *World J. Stem Cells* 7, 894–898 (2015).
- 103. Distler, H. W. *et al.* Endothelial Progenitor Cells Novel Players in the Pathogenesis of Rheumatic Diseases. *Arthritis Rheum.* **60**, 3168–3179 (2009).
- 104. Furuya, Y. *et al.* Mobilization of endothelial progenitor cells by intravenous cyclophosphamide in patients with systemic sclerosis. *Rheumatology* **49**, 2375–2380 (2010).
- 105. Ghiadoni, L. *et al.* Clinical and methodological aspects of endothelial function in patients with systemic autoimmune diseases. *Clin. Exp. Rheumatol.* **26**, 680 (2008).
- 106. Del Papa, N. *et al.* Antiendothelial Cell Antibodies Induce Apoptosis of Bone Marrow Endothelial Progenitors in Systemic Sclerosis. *J. Rheumatol.* **37**, 2053–2063 (2010).
- 107. Del Papa, N. & Pignataro, F. The Role of endothelial Progenitors in the Repair of vascular Damage in Systemic Sclerosis. *Front. Inmunol.* **9**, 1383 (2018).
- 108. Bueno-betí, C. *et al.* An affordable method to obtain cultured endothelial cells from peripheral blood. *J. Cell. Mol. Med.* **17**, 1475–1483 (2013).
- 109. Medina, R. J., Neill, C. L. O., Doherty, T. M. O., Wilson, S. E. J. & Stitt, A. W. Endothelial Progenitors as Tools to Study Vascular Disease. *Stem Cells Int.* **2012**, 346735 (2012).
- 110. Huertas, A. & Palange, P. Circulating endothelial progenitor cells and chronic pulmonary diseases. *Eur. Respir. J.* **37**, 426–431 (2011).
- 111. Bagnato, G. & Harari, S. Cellular interactions in the pathogenesis of interstitial lung diseases. *Eur. Respir. Rev.* 24, 102–114 (2015).
- 112. Fadini, G. P., Avogaro, A., Ferraccioli, G. & Agostini, C. Endothelial progenitors in

pulmonary hypertension : new pathophysiology and therapeutic implications. *Eur. Respir. J.* **35**, 418–425 (2010).

- Marsboom, G. *et al.* Sustained Endothelial Progenitor Cell Dysfunction After Chronic Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension. *Stem Cells* 26, 1017–1026 (2008).
- 114. Yamada, M. *et al.* Increased circulating endothelial progenitor cells in patients with bacterial pneumonia: evidence that bone marrow derived cells contribute to lung repair. *Thorax* **60**, 410–413 (2005).
- 115. Baker, C. D. *et al.* Endothelial colony-forming cell conditioned media promote angiogenesis in vitro and prevent pulmonary hypertension in experimental bronchopulmonary dysplasia. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **305**, L73-81 (2013).
- 116. Mok, M. Y. *et al.* Low circulating level of CD133 + KDR + cells in patients with systemic sclerosis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **28**, S19-25 (2010).
- 117. Patschan, S. *et al.* Early Endothelial Progenitor Cells (eEPCs) in systemic sclerosis (SSc)
 dynamics of cellular regeneration and mesenchymal transdifferentiation. *BMC Musculoskelet. Disord.* 12, 339 (2016).
- Zhao, P. et al. Circulating Angiogenic T Cells Are Increased in Lupus Nephritis Patients. Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res. 24, 5384–5390 (2018).
- 119. Allanore, Y. *et al.* Levels of circulating endothelial progenitor cells in systemic sclerosis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **25**, 60–66 (2007).
- 120. Jodon de Villeroché, V. *et al.* Enhanced late-outgrowth circulating endothelial progenitor cell levels in rheumatoid arthritis and correlation with disease activity. *Arthritis Res. Ther.* 12, R27 (2010).
- 121. Benyamine, A. *et al.* Increased serum levels of fractalkine and progenitor cells in systemic sclerosis. *Arthritis Res. Ther.* **19**, 60 (2017).
- 122. Cipriani, P., Marrelli, A., Liakouli, V., Benedetto, P. Di & Giacomelli, R. Autoimmunity Reviews Cellular players in angiogenesis during the course of systemic sclerosis. *Autoimmun. Rev.* **10**, 641–646 (2011).
- Nevskaya, T. *et al.* Circulating endothelial progenitor cells in systemic sclerosis : relation to impaired angiogenesis and cardiovascular manifestations. *Clin. Exp. Rheumatol.* 26, 421– 429 (2008).
- 124. Papa, N. Del *et al.* Bone Marrow Endothelial Progenitors Are Defective in Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheum.* **54**, 2605–2615 (2006).
- 125. Del Papa, N. *et al.* Circulating Endothelial Cells as a Marker of Ongoing Vascular Disease in Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheum.* **50**, 1296–1304 (2004).
- Del Papa, N. *et al.* Simvastatin Reduces Endothelial Activation and Damage But Is Partially Ineffective in Inducing Endothelial Repair in Systemic Sclerosis. *J. Rheumatol.* 35, 1323–1328 (2008).

- 127. Smadja, D. M. *et al.* Imbalance of circulating endothelial cells and progenitors in idiopathic pulmonary fibrosis. *Angiogenesis* **16**, 147–157 (2013).
- 128. Schiavon, M. *et al.* Increased tissue endothelial progenitor cells in end-stage lung diseases with pulmonary hypertension. *J. Hear. Lung Transplant.* **31**, 1025–1030 (2012).
- 129. Avouac, J., Uzan, G., Kahan, A., Boileau, C. & Allanore, Y. Endothelial progenitor cells and rheumatic disorders. *Jt. Bone Spine* **75**, 131–137 (2008).
- 130. Egan, C. G., Caporali, F., Garcia-Gonzalez, E., Galeazzi, M. & Sorrentino, V. Endothelial progenitor cells and colony-forming units in rheumatoid arthritis: association with clinical characteristics. *Rheumatology* **47**, 1484–1488 (2008).
- 131. Grisar, J. *et al.* Endothelial progenitor cells in active rheumatoid arthritis: effects of tumour necrosis factor and glucocorticoid therapy. *Ann. Rheum. Dis.* **66**, 1284–1288 (2007).
- Rodríguez-Carrio, J. *et al.* Circulating endothelial cells and their progenitors in systemic lupus erythematosus and early rheumatoid arthritis patients. *Rheumatology* 51, 1775–1784 (2012).
- Fadini, G. P. *et al.* Circulating Progenitor Cells Are Reduced in Patients with Severe Lung Disease. *Stem Cells* 24, 1806–1813 (2006).
- Andrigueti, F. V, Arismendi, M. I., Ebbing, P. C. C. & Kayser, C. Decreased numbers of endothelial progenitor cells in patients in the early stages of systemic sclerosis. *Microvasc. Res.* 98, 82–87 (2015).
- Hur, J. *et al.* Identification of a Novel Role of T Cells in Postnatal Vasculogenesis. Characterization of Endothelial Progenitor Cell Colonies. *Circulation* 116, 1671–1682 (2007).
- 136. Bella, S. Della & Mavilio, D. Editorial: Senescent angiogenic T cells: the use of CD28 makes the difference in endothelial homeostasis. *J. Leukoc. Biol.* **99**, 399–401 (2016).
- 137. Kushner, E. J. *et al.* CD31 + T cells represent a functionally distinct vascular T cell phenotype. *Blood cells Mol. Dis.* **44**, 74–78 (2010).
- 138. Marelli-berg, F. M., Clement, M., Mauro, C. & Caligiuri, G. An immunologist ' s guide to CD31 function in T-cells. *J. Cell Sci.* **126**, 2343–2352 (2013).
- 139. Hoymans, V. Y. *et al.* TransFix [®] for delayed flow cytometry of endothelial progenitor cells and angiogenic T cells. *Microvasc. Res.* **84**, 384–386 (2012).
- 140. Rouhl, R. P. W. *et al.* Angiogenic T-Cells and Putative Endothelial Progenitor Cells in Hypertension-Related Cerebral Small Vessel Disease. *Stroke* **43**, 256–258 (2012).
- 141. Kakizaki, M. *et al.* Increased circulating CD3 + / CD31 + T cells in patients with acute coronary syndrome. *Heart Vessels* **28**, 566–569 (2013).
- 142. Bortoluzzi, A. *et al.* The IMMENSE Study: The Interplay Between iMMune and ENdothelial Cells in Mediating Cardiovascular Risk in Systemic Lupus Erythematosus. *Front. Inmunol.* **11**, 572876 (2020).

- López, P., Rodriguez-Carrio, J., Martínez-Zapico, A., Caminal-Montero, L. & Suarez, A. Senescent profile of angiogenic T cells from systemic lupus erythematosus patients. *J. Leukoc. Biol.* 99, 405–412 (2016).
- 144. Miao, J. *et al.* Circulating Angiogenic T Cells and Their Subpopulations in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Mediators Inflamm.* **2016**, 2842143 (2016).
- 145. Alunno, A. *et al.* Angiogenic T cells in primary Sjögren's syndrome: a double-edged sword ? *Clin. Exp. Rheumatol.* **37 Suppl 1**, 36–41 (2019).
- 146. De Boer, S. A. *et al.* Angiogenic T cells are decreased in people with type 2 diabetes mellitus and recruited by the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor Linagliptin : A subanalysis from a randomized , placebo-controlled trial (RELEASE study). *Diabetes, Obes. Metab.* **22**, 1220–1225 (2020).
- 147. Zhao, P. *et al.* CD147 participates in the activation function of circulating angiogenic T cells in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.* **38**, 2621–2628 (2019).
- 148. Rodríguez-Carrio, J. *et al.* Angiogenic T cells are decreased in rheumatoid arthritis patients. *Ann. Rheum. Dis.* **74**, 921–927 (2015).
- 149. Lv, T. *et al.* International Immunopharmacology The risk of circulating angiogenic T cells and subsets in patients with systemic sclerosis. *Int. Immunopharmacol.* **81**, 106282 (2020).
- 150. Melincovici, C. S. *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom. J. Morphol. Embryol.* **59**, 455–467 (2018).
- 151. Barratt, S. L., Flower, V. A., Pauling, J. D. & Millar, A. B. VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) and Fibrotic Lung Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1269 (2018).
- 152. Berse, B. *et al.* Hypoxia augments cytokine (transforming growth factor-beta (TGF-beta) and IL-1)-induced vascular endothelial growth factor secretion by human synovial fibroblasts. *Clin. Exp. Immunol.* **115**, 176–182 (1999).
- 153. Marti, H. H. & Risau, W. Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 15809–15814 (1998).
- Wei, N., Chen, Z., Xue, Z. & Zhu, Y. Polymorphism of VEGF gene in susceptibility to chronic immune-mediated inflammatory diseases: a meta-analysis. *Rheumatol. Int.* 35, 1351–1360 (2015).
- Paradowska-Gorycka, A. *et al.* Relationship between VEGF Gene Polymorphisms and Serum VEGF Protein Levels in Patients with Rheumatoid Arthritis. *PLoS One* **11**, e0160769 (2016).
- 156. Simpson, A. *et al.* Genetic variation in vascular endothelial growth factor-a and lung function. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **185**, 1197–1204 (2012).
- 157. Zhuo, Y. *et al.* VEGF Promoter Polymorphism Confers an Increased Risk of Pulmonary Arterial Hypertension in a Chinese Population. *Yonsei Med. J.* **58**, 305–311 (2017).

- 158. Baz-Dávila, R. *et al.* Role of HIF1A, VEGFA and VEGFR2 SNPs in the Susceptibility and Progression of COPD in a Spanish Population. *PLoS One* **11**, e0154998 (2016).
- 159. Liu, L. *et al.* [Association of ENA-78, IP-10 and VEGF gene polymorphism with idiopathic pulmonary fibrosis]. *honghua yi xue za zhi* **89**, 2690–2694 (2009).
- 160. Rodríguez-Rodríguez, L. *et al.* Vascular endothelial growth factor A and cardiovascular disease in rheumatoid arthritis patients. *Tissue Antigens* **77**, 291–297 (2011).
- 161. Rueda, B. *et al.* Analysis of vascular endothelial growth factor (VEGF) functional variants in rheumatoid arthritis. *Hum. Immunol.* **66**, 864–868 (2005).
- 162. Hamada, N. *et al.* Anti-vascular endothelial growth factor gene therapy attenuates lung injury and fibrosis in mice. *J. Immunol.* **175**, 1224–1231 (2005).
- 163. Ando, M. *et al.* Significance of serum vascular endothelial growth factor level in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Lung* **188**, 247–252 (2010).
- 164. Simler, N. R. *et al.* Angiogenic cytokines in patients with idiopathic interstitial pneumonia. *Thorax* **59**, 581–585 (2004).
- 165. Vasakova, M. *et al.* Bronchoalveolar lavage fluid cellular characteristics, functional parameters and cytokine and chemokine levels in interstitial lung diseases. *Scand. J. Immunol.* **69**, 268–274 (2009).
- 166. Manetti, M. *et al.* Overexpression of VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, leads to insufficient angiogenesis in patients with systemic sclerosis. *Circ. Res.* **109**, e14–e26 (2011).
- 167. Maurer, B. *et al.* Vascular endothelial growth factor aggravates fibrosis and vasculopathy in experimental models of systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* **73**, 1880–1887 (2014).
- 168. Kuryliszyn-Moskal, A., Klimiuk, P. A., Sierakowski, S. & Ciolkiewicz, M. A study on vascular endothelial growth factor and endothelin-1 in patients with extra-articular involvement of rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.* 25, 314–319 (2006).
- 169. Maruotti, N., Cantatore, F. P., Crivellato, E., Vacca, A. & Ribatti, D. Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Histol. Histopathol.* **21**, 557–566 (2006).
- 170. Taylor, P. C. Serum vascular markers and vascular imaging in assessment of rheumatoid arthritis disease activity and response to therapy. *Rheumatology* **44**, 721–728 (2005).
- 171. De Santis, M. *et al.* Nailfold videocapillaroscopy and serum VEGF levels in scleroderma are associated with internal organ involvement. *Automnunity Highlights* 7, 5 (2016).
- 172. Carvalho, J. F., Blank, M. & Shoenfeld, Y. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in autoimmune diseases. *J. Clin. Immunol.* **27**, 246–256 (2007).
- Huang, J. *et al.* Nintedanib inhibits macrophage activation and ameliorates vascular and fibrotic manifestations in the Fra2 mouse model of systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* 76, 1941–1948 (2017).
- 174. Fleming, J. N., Nash, R. A., Mahoney, W. M. & Schwartz, S. M. Is scleroderma a

vasculopathy? Curr. Rheumatol. Rep. 11, 103-110 (2009).

- 175. Hashimoto, N., Iwasaki, T., Kitano, M., Ogata, A. & Hamano, T. Levels of vascular endothelial growth factor and hepatocyte growth factor in sera of patients with rheumatic diseases. *Mod. Rheumatol.* **13**, 129–134 (2003).
- 176. Iwakawa, J. *et al.* Increased serum vascular endothelial growth factor levels in microscopic poly angiitis with pulmonary involvement. *Respir. Med.* **100**, 1724–1733 (2006).
- 177. Kolstad, K. D. *et al.* Cytokine signatures differentiate systemic sclerosis patients at high versus low risk for pulmonary arterial hypertension. *Arthritis Res. Ther.* **24**, 39 (2022).
- 178. Tanaseanu, C. *et al.* Vascular endothelial growth factor, lipoporotein-associated phospholipase A2, sP-selectin and antiphospholipid antibodies, biological markers with prognostic value in pulmonary hypertension associated with chronic obstructive pulmonary disease and systemi. *Eur. J. Med. Res.* **12**, 145–151 (2007).
- 179. Distler, J. H. W. *et al.* Dysbalance of angiogenic and angiostatic mediators in patients with mixed connective tissue disease. *Ann. Rheum. Dis.* **70**, 1197–1202 (2011).
- Mcmurray, R. W. Adhesion molecules in autoimmune disease. *Semin. Arthritis Rheum.* 25, 215–233 (1996).
- Kong, D. H., Kim, Y. K., Kim, M. R., Jang, J. H. & Lee, S. Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 1057 (2018).
- 182. Cook-Mills, J. M., Marchese, M. E. & Abdala-Valencia, H. Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 1607–1638 (2011).
- 183. Azuma, A. *et al.* Role of E-selectin in bleomycin induced lung fibrosis in mice. *Thorax* **55**, 147–152 (2000).
- 184. Hayashi, S. *et al.* Increased level of soluble E-selectin in the serum from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Inflammation* **28**, 1–5 (2004).
- 185. Preiss, D. J. & Sattar, N. Vascular cell adhesion molecule-1: a viable therapeutic target for atherosclerosis? *Int. J. Clin. Pract.* **61**, 697–701 (2007).
- Veale, D. J. & Maple, C. Cell adhesion molecules in rheumatoid arthritis. *Drugs Aging* 9, 87–92 (1996).
- 187. Bui, T. M., Wiesolek, H. L. & Sumagin, R. ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis. *J. Leukoc. Biol.* **108**, 787–799 (2020).
- Anbarasan, C., Bavanilatha, M., Latchumanadhas, K. & Ajit Mullasari, S. ICAM-1 molecular mechanism and genome wide SNP's association studies. *Indian Heart J.* 67, 282– 287 (2015).
- 189. Wang, X. *et al.* Association of A561C and G98T polymorphisms in E-selectin gene with coronary artery disease: a meta-analysis. *PLoS One* **8**, e79301 (2013).

- 190. Jubeli, E., Moine, L., Vergnaud-Gauduchon, J. & Barratt, G. E-selectin as a target for drug delivery and molecular imaging. *J. Control. release* **158**, 194–206 (2012).
- 191. Kansas, G. S. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 88, 3259–3287 (1996).
- 192. Barthel, S. R., Gavino, J. D., Descheny, L. & Dimitroff, C. J. Targeting selectins and selectin ligands in inflammation and cancer. *Expert Opin. Ther. Targets* **11**, 1473–1491 (2007).
- 193. Kneuer, C., Ehrhardt, C., Radomski, M. W. & Bakowsky, U. Selectins--potential pharmacological targets? *Drug discovery today* **11**, 1034–1040 (2006).
- 194. Chia, M. C. The role of adhesion molecules in atherosclerosis. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **35**, 573–602 (1998).
- 195. Hasegawa, M. *et al.* Serum adhesion molecule levels as prognostic markers in patients with early systemic sclerosis: a multicentre, prospective, observational study. *PLoS One* **9**, e88150 (2014).
- 196. Ihn, H., Sato, S., Fujimoto, M., Takehara, K. & Tamaki, K. Increased serum levels of soluble vascular cell adhesion molecule-1 and E-selectin in patients with systemic sclerosis. *Br. J. Rheumatol.* 37, 1188–1192 (1998).
- 197. Krasowska, D., Pietrzak, A. & Lecewicz-Torun, B. Serum level of sELAM-1 in psoriatic patients correlates with disease activity. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **12**, 140–142 (1999).
- 198. Dessein, P. H. *et al.* Marked independent relationship between circulating interleukin-6 concentrations and endothelial activation in rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm.* **2013**, 510243 (2013).
- Genre, F. *et al.* Significant sE-Selectin levels reduction after 6 months of anti-TNF-α therapy in non-diabetic patients with moderate-to-severe psoriasis. *J. Dermatolog. Treat.* 28, 726–730 (2017).
- 200. Ates, A., Kinikli, A. G., Turgay, M. & Duman, M. Serum-soluble selectin levels in patients with rheumatoid arthritis and systemic sclerosis. *Scand. J. Immunol.* **59**, 315–320 (2004).
- Klimiuk, P. A., Fiedorczyk, M., Sierakowski, S. & Chwiecko, J. Soluble cell adhesion molecules (sICAM-1, sVCAM-1, and sE-selectin) in patients with early rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.* 36, 345–350 (2007).
- Dessein, P. H., Joffe, B. I. & Singh, S. Biomarkers of endothelial dysfunction, cardiovascular risk factors and atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 7, R634–R643 (2005).
- 203. Koch, A. E., Halloran, M. M., Haskell, C. J., Shah, M. R. & Polverini, P. J. Angiogenesis mediated by soluble forms of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1. *Nature* 376, 517–519 (1995).
- 204. Andersen, G. N. *et al.* Correlation between increased nitric oxide production and markers of endothelial activation in systemic sclerosis: findings with the soluble adhesion molecules E-selectin, intercellular adhesion molecule 1, and vascular cell adhesion

molecule 1. Arthritis Rheum. 43, 1085-1093 (2000).

- 205. Bhatti, M., Chapman, P., Peters, M., Haskard, D. & Hodgson, J. F. Visualising E-selectin in the detection and evaluation of inflammatory bowel disease. *Gut* **43**, 40–47 (1998).
- Carson, C. W., Beall, L. D., Hunder, G. G., Johnson, C. M. & Newman, W. Serum ELAM-1 is increased in vasculitis, scleroderma, and systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* 20, 809–814 (1993).
- Nakao, A., Hasegawa, Y., Tsuchiya, Y. & Shimokata, K. Expression of cell adhesion molecules in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 108, 233–239 (1995).
- 208. Southcott, A. M. *et al.* Adhesion molecule expression in the lung: a comparison between normal and diffuse interstitial lung disease. *Eur. Respir. J.* **11**, 91–98 (1998).
- 209. McGroder, C. F. *et al.* Circulating adhesion molecules and subclinical interstitial lung disease: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Eur. Respir. J.* **54**, 1900295 (2019).
- 210. Smith, C. H., Barker, J. N. W. N. & Lee, T. H. Adhesion molecules in allergic inflammation. *Am. Rev. Respir. Dis.* **148**, S75–S78 (1993).
- 211. Kawano-Dourado, L., Ab'Saber, A. M., Capelozzi, V. L., Valeri, C. & Barbas, C. S. V. In situ evidence of pulmonary endothelial activation in patients with granulomatosis with polyangiitis and systemic sclerosis. *Lung* **193**, 355–359 (2015).
- 212. Kumánovics, G. *et al.* Comprehensive investigation of novel serum markers of pulmonary fibrosis associated with systemic sclerosis and dermato/polymyositis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **26**, 414–420 (2008).
- 213. Tsakadze, N. L. *et al.* Signals mediating cleavage of intercellular adhesion molecule-1. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **287**, C55–C63 (2004).
- 214. Oppenheimer-Marks, N. & Lipsky, P. E. Adhesion molecules in rheumatoid arthritis. *Springer Semin. Immunopathol.* **20**, 95–114 (1998).
- 215. Andersen, G. N. *et al.* Correlation between increased nitric oxide production and markers of endothelial activation in systemic sclerosis: findings with the soluble adhesion molecules E-selectin, intercellular adhesion molecule 1, and vascular cell adhesion molecule 1. *Arthritis Rheum.* **43**, 1085–1093 (2000).
- 216. Ihn, H. *et al.* Circulating intercellular adhesion molecule-1 in the sera of patients with systemic sclerosis: enhancement by inflammatory cytokines. *Br. J. Rheumatol.* **36**, 1270–1275 (1997).
- 217. Thakkar, V. *et al.* Increased serum levels of adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 in systemic sclerosis are not specific for pulmonary manifestations. *Clin. Rheumatol.* **37**, 1563–1571 (2018).
- 218. Smith, C. H., Barker, J. N. W. N. & Lee, T. H. Adhesion Molecules in Allergic Inflammation. *Am. Rev. Respir. Dis.* **148**, S75–S78 (1993).

- 219. Lopez-Campos, J. L. *et al.* Increased levels of soluble ICAM-1 in chronic obstructive pulmonary disease and resistant smokers are related to active smoking. *Biomark. Med.* **6**, 805–811 (2012).
- 220. Takehara, H. *et al.* Intercellular adhesion molecule-1 in patients with idiopathic interstitial pneumonia. *Acta Med. Okayama* **55**, 205–211 (2001).
- 221. Kolstad, K. D. *et al.* Cytokine signatures differentiate systemic sclerosis patients at high versus low risk for pulmonary arterial hypertension. *Arthritis Res. Ther.* **24**, 39 (2022).
- 222. Iannone, F. *et al.* Bosentan regulates the expression of adhesion molecules on circulating T cells and serum soluble adhesion molecules in systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension. *Ann. Rheum. Dis.* **67**, 1121–1126 (2008).
- 223. Sapna, S. & Shivakumar, K. Hypoxia and antioxidants enhance soluble ICAM-1 release from cardiac fibroblasts. *Mol. Cell. Biochem.* **303**, 259–262 (2007).
- 224. Shijubo, N. *et al.* Circulating intercellular adhesion molecule-i (ICAM-1) antigen in sera of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Clin. Exp. Immunol.* **89**, 58–62 (1992).
- 225. Troncoso, M. F. *et al.* VCAM-1 as a predictor biomarker in cardiovascular disease. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis Dis.* **1867**, 166170 (2021).
- 226. Wang, L., Ding, Y., Guo, X. & Zhao, Q. Role and mechanism of vascular cell adhesion molecule-1 in the development of rheumatoid arthritis. *Exp. Ther. Med.* **10**, 1229–1233 (2015).
- 227. Navarro-Hernández, R. E. *et al.* Expression of ICAM1 and VCAM1 serum levels in rheumatoid arthritis clinical activity. Association with genetic polymorphisms. *Dis. Markers* **26**, 119–126 (2009).
- Wellicome, S. M. *et al.* Detection of a circulating form of vascular cell adhesion molecule1: raised levels in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Clin. esperimental Immunol.* 92, 412–418 (1993).
- Littler, A. J. *et al.* A distinct profile of six soluble adhesion molecules (ICAM-1, ICAM-3, VCAM-1, E-selectin, L-selectin and P-selectin) in rheumatoid arthritis. *Br. J. Rheumatol.* 36, 164–169 (1997).
- 230. Agassandian, M. *et al.* VCAM-1 is a TGF-β1 inducible gene upregulated in idiopathic pulmonary fibrosis. *Cell. Signal.* **27**, 2467–2473 (2015).
- 231. Franco De Carvalho, E., Parra, E. R., De Souza, R., Muxfeldt A'b Saber, A. & Capelozzi, V. L. Parenchymal and vascular interactions in the pathogenesis of nonspecific interstitial pneumonia in systemic sclerosis and idiopathic interstitial pneumonia. *Respiration* 76, 146–153 (2008).
- 232. Deshmane, S. L., Kremlev, S., Amini, S. & Sawaya, B. E. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J. Interf. Cytokine Res.* **29**, 313–326 (2009).
- 233. Hasegawa, M. & Sato, S. The roles of chemokines in leukocyte recruitment and fibrosis in systemic sclerosis. *Front. Biosci.* **13**, 3637–3647 (2008).

- 234. Bianconi, V., Sahebkar, A., Atkin, S. L. & Pirro, M. The regulation and importance of monocyte chemoattractant protein-1. *Curr. Opin. Hematol.* **25**, 44–51 (2018).
- 235. Singh, S., Anshita, D. & Ravichandiran, V. MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease. *Int. Immunopharmacol.* **101**, 107598 (2021).
- 236. An, Q., Yan, W., Zhao, Y. & Yu, K. Enhanced neutrophil autophagy and increased concentrations of IL-6, IL-8, IL-10 and MCP-1 in rheumatoid arthritis. *Int. Immunopharmacol.* **65**, 119–128 (2018).
- Giuffrida, M. J. *et al.* Increased cytokine/chemokines in serum from asthmatic and nonasthmatic patients with viral respiratory infection. *Influenza Other Respi. Viruses* 8, 116–122 (2014).
- 238. Ling, T., Lv, H.-Z., Ma, Y.-X., Shang, Q.-H. & Zhang, J.-T. [Relationship between the level of MCP-1 expression in sera of RA patients and ILD]. *Xi bao yu fen zi mian yi xue za zhi* 26, 59–60 (2010).
- 239. Rantapää-Dahlqvist, S., Boman, K., Tarkowski, A. & Hallmans, G. Up regulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression in anti-citrulline antibody and immunoglobulin M rheumatoid factor positive subjects precedes onset of inflammatory response and development of overt rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 66, 121–123 (2007).
- 240. Stankovic, A. *et al.* Serum and synovial fluid concentrations of CCL2(MCP-1) chemokine in patients suffering rheumatoidarthritis and osteoarthritis reflect disease activity. *Bratisl. Lek. List.* **110**, 641–646 (2009).
- 241. Zhou, H. *et al.* Elevated circulating T cell subsets and cytokines expression in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.* **38**, 1831–1839 (2019).
- Hasegawa, M. *et al.* Serum chemokine levels as prognostic markers in patients with early systemic sclerosis: a multicenter, prospective, observational study. *Mod. Rheumatol.* 23, 1076–1084 (2013).
- 243. Wu, M. et al. CCL2 in the Circulation Predicts Long-Term Progression of Interstitial Lung Disease in Patients With Early Systemic Sclerosis: Data From Two Independent Cohorts. Arthritis Rheumatol. 69, 1871–1878 (2017).
- 244. Hrycek, E., Franek, A., Błaszczak, E., Dworak, J. & Hrycek, A. Serum levels of selected chemokines in systemic lupus erythematosus patients. *Rheumatol. Int.* **33**, 2423–2427 (2013).
- 245. Hayashida, K. *et al.* Synovial stromal cells from rheumatoid arthritis patients attract monocytes by producing MCP-1 and IL-8. *Arthritis Res.* **3**, 118–126 (2001).
- 246. Suga, M. *et al.* Clinical significance of MCP-1 levels in BALF and serum in patients with interstitial lung diseases. *Eur. Respir. J.* **14**, 376–382 (1999).
- 247. Ohnishi, H. *et al.* Comparative study of KL-6, surfactant protein-A, surfactant protein-D, and monocyte chemoattractant protein-1 as serum markers for interstitial lung diseases.

Am. J. Respir. Crit. Care Med. 165, 378–381 (2002).

- 248. Hasegawa, M., Sato, S. & Takehara, K. Augmented production of chemokines (monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha) and MIP-1beta) in patients with systemic sclerosis: MCP-1 and MIP-1alpha may be involved in the development of pulmonary fibrosis. *Clin. Exp. Immunol.* **117**, 159–165 (1999).
- 249. Assassi, S. *et al.* Skin gene expression correlates of severity of interstitial lung disease in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* **65**, 2917–2927 (2013).
- 250. Schmidt, K. *et al.* Bronchoalveoloar lavage fluid cytokines and chemokines as markers and predictors for the outcome of interstitial lung disease in systemic sclerosis patients. *Arthritis Res. Ther.* **11**, R111 (2009).
- 251. San Miguel, A., San Miguel, R. & Martín Gil, F. J. Dimetilarginina asimétrica (ADMA) en diferentes enfermedades. *Rev. del Lab. Clin.* 1, 113–121 (2008).
- Lüneburg, N., Harbaum, L. & Hennigs, J. K. The endothelial ADMA/NO pathway in hypoxia-related chronic respiratory diseases. *BioMed research international* 2014, 501612 (2014).
- 253. Janssen, W. *et al.* The role of dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) in pulmonary fibrosis. *J. Pathol.* **229**, 242–249 (2013).
- 254. Dimitroulas, T., Sandoo, A. & Kitas, G. D. Asymmetric dimethylarginine as a surrogate marker of endothelial dysfunction and cardiovascular risk in patients with systemic rheumatic diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 12315–12335 (2012).
- 255. Chen, X. M., Hu, C. P., Li, Y. J. & Jiang, J. L. Cardiovascular risk in autoimmune disorders: role of asymmetric dimethylarginine. *Eur. J. Pharmacol.* **696**, 5–11 (2012).
- 256. Sibal, L., Agarwal, S. C., Home, P. D. & Boger, R. H. The Role of Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Disease. *Curr. Cardiol. Rev.* 6, 82–90 (2010).
- 257. Genre, F. *et al.* Adipokines, biomarkers of endothelial activation, and metabolic syndrome in patients with ankylosing spondylitis. *Biomed Res. Int.* **2014**, 860651 (2014).
- 258. Zhao, C. N. *et al.* Elevated circulating asymmetric dimethylarginine levels in rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Amino Acids* **51**, 773–782 (2019).
- Turiel, M. *et al.* Non-invasive assessment of coronary flow reserve and ADMA levels: a case Control study of early rheumatoid arthritis patients. *Rheumatology* 48, 834–839 (2009).
- 260. Surdacki, A. *et al.* Elevated plasma asymmetric dimethyl-L-arginine levels are linked to endothelial progenitor cell depletion and carotid atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **56**, 809–819 (2007).
- 261. Kwaśny-Krochin, B., Głuszko, P. & Undas, A. Plasma asymmetric dimethylarginine in active rheumatoid arthritis: links with oxidative stress and inflammation. *Pol. Arch. Med.*

Wewn. 122, 270-276 (2012).

- 262. Dimitroulas, T., Hodson, J., Sandoo, A., Smith, J. & Kitas, G. D. Endothelial injury in rheumatoid arthritis: a crosstalk between dimethylarginines and systemic inflammation. *Arthritis Res. Ther.* **19**, 32 (2017).
- 263. Dimitroulas, T. & Kitas, G. D. Genetic regulation of dimethylarginines and endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis. *Amino Acids* **51**, 983–990 (2019).
- 264. Dooley, A. *et al.* Abnormal nitric oxide metabolism in systemic sclerosis: increased levels of nitrated proteins and asymmetric dimethylarginine. *Rheumatology* **45**, 676–684 (2006).
- 265. Blaise, S. *et al.* Correlation of biomarkers of endothelium dysfunction and matrix remodeling in patients with systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* **36**, 984–988 (2009).
- 266. Zhang, L. *et al.* The association between systemic sclerosis, arginine and asymmetric dimethylarginine. *Inflammation* **38**, 218–223 (2015).
- 267. Jud, P. *et al.* Evaluation of endothelial dysfunction and clinical events in patients with early-stage vasculopathy in limited systemic sclerosis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **131**, 57–65 (2021).
- 268. Dimitroulas, T. *et al.* Asymmetrical dimethylarginine in systemic sclerosis-related pulmonary arterial hypertension. *Rheumatology* **47**, 1682–1685 (2008).
- 269. Thakkar, V. *et al.* The role of asymmetric dimethylarginine alone and in combination with N-terminal pro-B-type natriuretic peptide as a screening biomarker for systemic sclerosisrelated pulmonary arterial hypertension: a case control study. *Clin. Exp. Rheumatol.* **100**, 129–136 (2016).
- 270. Wells, S. M., Buford, M. C., Migliaccio, C. T. & Holian, A. Elevated asymmetric dimethylarginine alters lung function and induces collagen deposition in mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **40**, 179–188 (2009).
- 271. Pullamsetti, S. S. *et al.* The Role of Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Sci. Transl. Med.* **3**, 87ra53 (2011).
- 272. Zhao, W. C., Li, G., Huang, C. Y. & Jiang, J. L. Asymmetric dimethylarginine: An crucial regulator in tissue fibrosis. *Eur. J. Pharmacol.* **854**, 54–61 (2019).
- 273. Flores Valdez, N. Endothelin-1: Intrinsic vasoconstrictor vascular endothelial. *Rev. med* **21**, 42–56 (2013).
- 274. D'Orléans-Juste, P., Plante, M., Honoré, J. C., Carrier, E. & Labonté, J. Synthesis and degradation of endothelin-1. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **81**, 503–510 (2003).
- 275. Fonseca, C., Abraham, D. & Renzoni, E. A. Endothelin in pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **44**, 1–10 (2011).
- 276. Ross, B., D'Orléans-Juste, P. & Giaid, A. Potential role of endothelin-1 in pulmonary fibrosis: from the bench to the clinic. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **42**, 16–20 (2010).
- 277. Sticherling, M. The role of endothelin in connective tissue diseases. Rheumatology 45 Suppl

3, iii8-10 (2006).

- 278. Mayes, M. D. Endothelin and endothelin receptor antagonists in systemic rheumatic disease. *Arthritis Rheum.* **48**, 1190–1199 (2003).
- 279. Uguccioni, M. *et al.* Endothelin-1 in idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Clin. Pathol.* **48**, 330–334 (1995).
- 280. Saleh, D. *et al.* Elevated expression of endothelin-1 and endothelin-converting enzyme-1 in idiopathic pulmonary fibrosis: possible involvement of proinflammatory cytokines. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **16**, 187–193 (1997).
- 281. Kuryliszyn-Moskal, A., Klimiuk, P. A. & Sierakowski, S. Soluble adhesion molecules (sVCAM-1, sE-selectin), vascular endothelial growth factor (VEGF) and endothelin-1 in patients with systemic sclerosis: Relationship to organ systemic involvement. *Clin. Rheumatol.* 24, 111–116 (2005).
- Abraham, D. J. *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.* 151, 831–841 (1997).
- 283. Silver, R. M. Endothelin and scleroderma lung disease. Rheumatology 47, v25-v26 (2008).
- 284. Swigris, J. J. & Brown, K. K. The role of endothelin-1 in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *BioDrugs* **24**, 49–54 (2010).
- 285. Vancheeswaran, R. *et al.* Circulating endothelin-1 levels in systemic sclerosis subsets, a marker of fibrosis or vascular dysfunction? *J. Rheumatol.* **21**, 1838–1844 (1994).
- 286. Leask, A. The role of endothelin-1 signaling in the fibrosis observed in systemic sclerosis. *Pharmacol. Res.* **63**, 502–503 (2011).
- 287. Hajialilo, M., Noorabadi, P., Tahsini Tekantapeh, S. & Malek Mahdavi, A. Endothelin-1, α-Klotho, 25(OH) Vit D levels and severity of disease in scleroderma patients. *Rheumatol. Int.* 37, 1651–1657 (2017).
- 288. Alvarez-Cienfuegos, A. *et al.* Endothelin-1 serum levels in women with Rheumatoid Arthritis. *Acta Reumatol. Port.* **44**, 250–257 (2019).
- Haq, A., El-Ramahi, K., Al-Dalaan, A. & Al-Sedairy, S. T. Serum and synovial fluid concentrations of endothelin-1 in patients with rheumatoid arthritis. *J. Med.* 30, 51–60 (1999).
- Aletaha, D. *et al.* 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 62, 2569–2581 (2010).
- 291. Van Den Hoogen, F. *et al.* 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis* 72, 1747–1755 (2013).
- 292. Lynch, D. A. et al. Diagnostic criteria for idiopathic pulmonary fibrosis: a Fleischner

Society White Paper. Lancet Respir. Med. 6, 138–153 (2018).

- 293. Dellett, M. *et al.* MicroRNA-containing extracellular vesicles released from endothelial colony-forming cells modulate angiogenesis during ischaemic retinopathy. *J. Cell. Mol. Med.* **21**, 3405–3419 (2017).
- 294. Rodríguez-carrio, J. *et al.* Angiogenic T cells are decreased in rheumatoid arthritis patients. *Ann. Rheum. Dis.* **74**, 921–927 (2015).
- 295. Anderson, C. A. *et al.* Data quality control in genetic case-control association studies. *Nat. Protoc.* **5**, 1564–1573 (2010).
- 296. Trikalinos, T. A., Salanti, G., Khoury, M. J. & Ioannidis, J. P. A. Impact of violations and deviations in Hardy-Weinberg equilibrium on postulated gene-disease associations. *Am. J. Epidemiol.* **163**, 300–309 (2006).
- 297. Schmittgen, T. D. & Livak, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* **3**, 1101–1108 (2008).
- Lin, J., Kakkar, V. & Lu, X. Impact of MCP -1 in atherosclerosis. *Curr. Pharm. Des.* 20, 4580–4588 (2014).
- 299. Trial, J. A., Cieslik, K. A., Haudek, S. B., Duerrschmid, C. & Entman, M. L. Th1/M1 conversion to Th2/M2 responses in models of inflammation lacking cell death stimulates maturation of monocyte precursors to fibroblasts. *Front. Immunol.* **4**, 287 (2013).
- Peter, K., Weirich, U., Nordt, T. K., Ruef, J. & Bode, C. Soluble vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) as potential marker of atherosclerosis. *Thromb. Haemost.* 82, 38–43 (1999).
- 301. Sandoo, A. *et al.* Lack of association between asymmetric dimethylarginine and in vivo microvascular and macrovascular endothelial function in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **30**, 388–396 (2012).
- 302. Ito, A. *et al.* Novel Mechanism for Endothelial Dysfunction Dysregulation of Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase. *Circulation* **99**, 3092–3095 (1999).
- 303. Millatt, L. J. *et al.* Evidence for dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase I in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 108, 1493–1498 (2003).
- 304. Catrina, S.-B. & Zheng, X. Disturbed hypoxic responses as a pathogenic mechanism of diabetic foot ulcers. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* **32**, 179–185 (2016).
- 305. He, M. *et al.* Hypoxia induces the dysfunction of human endothelial colony-forming cells via HIF-1 *α* signaling. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **247**, 87–95 (2018).
- 306. Brunasso, A. M. G. & Massone, C. Update on the pathogenesis of Scleroderma : focus on circulating progenitor cells. *F1000Research* **5**, F1000 (2016).
- 307. Avouac, J. *et al.* Circulating endothelial progenitor cells in systemic sclerosis: association with disease severity. *Ann. Rheum. Dis.* **67**, 1455–1460 (2008).

- 308. Molet, S., Furukawa, K., Maghazechi, A., Hamid, Q. & Giaid, A. Chemokine- and cytokine-induced expression of endothelin 1 and endothelin-converting enzyme 1 in endothelial cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* **105**, 333–338 (2000).
- 309. Chen, H., Zhang, T., Gong, B. & Cao, X. Association between VEGF -634G/C polymorphism and susceptibility to autoimmune diseases: a meta-analysis. *Gene* **558**, 181–186 (2015).
- 310. Yoshizaki, A. *et al.* Cell adhesion molecules regulate fibrotic process via Th1/Th2/Th17 cell balance in a bleomycin-induced scleroderma model. *J. Immunol.* **185**, 2502–2515 (2010).
VIII. ANEXOS

Anexo I

Tablas Suplementarias

VIII. ANEXOS

					VEGF
		Frecuencia	Frecuencia	Expresión	Niveles séricos
		EPC (%)	TAng (%)	ARNm VEGF	VEGF (pg/mL)
		$(Media \pm DE)$	(Media ± DE)	(Media ± DE)	(Media \pm DE)
Crupos	EA-EPI⁺	$0,037 \pm 0,017$	11,560 ± 5,242	$0,0398 \pm 0,0694$	89,6 ± 63,8
obiete de	AR-EPI⁺	$0,047 \pm 0,023$	11,950 ± 5,234	$0,0517 \pm 0,0870$	$117,1 \pm 94,8$
objeto de	ES-EPI+	$0,033 \pm 0,012$	12,570 ± 5,052	$0,0569 \pm 0,0880$	$74,8 \pm 44,8$
estudio	Otras EA-EPI⁺	$0,031 \pm 0,016$	10,560 ± 6,684	0,0195 ± 0,0439	72,9 ± 52,7
	EA-EPI-	0,026 ± 0,015	15,920 ± 4,612	$0,0528 \pm 0,0760$	32,9 ± 45,8
Crupos	AR-EPI-	$0,030 \pm 0,013$	$16,400 \pm 4,926$	$0,0955 \pm 0,0968$	35,8 ± 56,3
control	ES-EPI-	$0,021 \pm 0,017$	16,070 ± 5,420	$0,098 \pm 0,0032$	$29,0 \pm 26,6$
control	FPI	$0,087 \pm 0,041$	11,340 ± 3,732	$0,1501 \pm 0,1679$	$57,9 \pm 50,0$
	PS	$0,012 \pm 0,010$	$16,500 \pm 4,830$	$0,1425 \pm 0,1336$	$168,0 \pm 320,3$

Tabla S1. Frecuencia de EPC y TAng, así como expresión y niveles séricos de VEGF.

		M	CP-1	IC	ICAM-1		VCAM-1		Selectina-E	
		Expresión	Niveles séricos	Expresión	Niveles séricos	Expresión	Niveles séricos	Expresión	Niveles séricos	
		ARNm CCL2	MCP-1 (pg/mL)	ARNm ICAM1	ICAM-1 (ng/mL)	ARNm VCAM1	VCAM-1 (ng/mL)	ARNm SELE	Selectina-E (ng/mL)	
		(Media ± DE)	$(Media \pm DE)$	(Media ± DE)	$(Media \pm DE)$	(Media ± DE)	(Media ± DE)	(Media ± DE)	(Media ± DE)	
Grupos	EA-EPI+	$0,0032 \pm 0,0029$	455,5±224,9	$0,0930 \pm 0,0784$	524,2 ± 109,2	$0,0002 \pm 0,0003$	$1768,0 \pm 2050,0$	$0,0002 \pm 0,0001$	77,6 ± 29,7	
objeto	AR-EPI ⁺	$0,0016 \pm 0,0010$	$642,8 \pm 268,6$	0,1103 ± 0,1134	556,4 ± 125,4	$0,0002 \pm 0,0002$	$3499,0 \pm 2978,0$	$0,0002 \pm 0,0001$	77,6 ± 22,9	
de	ES-EPI+	$0,0039 \pm 0,0032$	345,6 ± 123,9	0,1280 ± 0,1139	$507,7 \pm 116,2$	$0,0003 \pm 0,0003$	859,7 ± 471,9	$0,0002 \pm 0,0001$	$85,1 \pm 36,8$	
estudio	Otras EA-EPI+	$0,0024 \pm 0,0021$	370,3 ± 156,9	0,0787 ± 0,0393	522,2 ± 100,6	$0,0002 \pm 0,0001$	817,4 ± 479,3	$0,0002 \pm 0,0001$	$71,8 \pm 32,7$	
	EA-EPI-	0,0016 ± 0,0017	367,2 ± 138,5	0,1107 ± 0,0894	433,6 ± 70,2	$0,0004 \pm 0,0003$	1111,0 ± 785,1	0,0004 ± 0,0005	60,5 ± 18,6	
Constants	AR-EPI-	$0,0007 \pm 0,0002$	$406,9 \pm 127,8$	$0,1393 \pm 0,1041$	$465,4 \pm 80,6$	$0,0003 \pm 0,0002$	$1118,0 \pm 787,5$	0,0001 ± 0,0001	$57,3 \pm 14,6$	
Grupos	ES-EPI-	$0,0024 \pm 0,0023$	305,4 ± 122,2	0,0745 ± 0,0483	$404,3 \pm 57,3$	$0,0004 \pm 0,0003$	989,2 ± 639,5	$0,0004 \pm 0,0004$	$64,9 \pm 23,1$	
control	FPI	$0,0026 \pm 0,0018$	$295,0 \pm 130,1$	0,2014 ± 0,1664	527,4 ± 75,5	$0,0004 \pm 0,0003$	646,2 ± 313,3	$0,0002 \pm 0,0001$	$76,8 \pm 20,8$	
	PS	$0,0048 \pm 0,0065$	239,0 ± 81,3	0,1787 ± 0,1181	$421,2 \pm 57,8$	$0,0008 \pm 0,0011$	731,2 ± 284,9	0,0009 ± 0,0012	$47,4 \pm 20,4$	

Tabla S2. Expresión y niveles séricos de MCP-1, ICAM-1, VCAM-1 y Selectina-E.

		ET	-1	AL	DMA
		Expresión	Niveles séricos	Expresión	Niveles séricos
		ARNm END1	ET-1 (pg/mL)	ARNm PRMT1	ADMA (µmol/L)
		(Media ± DE)	$(Media \pm DE)$	(Media ± DE)	$(Media \pm DE)$
Crupos	EA-EPI+	$0,0004 \pm 0,0002$	$1,248 \pm 0,603$	$0,0578 \pm 0,0648$	$0,4736 \pm 0,0701$
obieto de	AR-EPI+	$0,0004 \pm 0,0002$	$1,168 \pm 0,330$	$0,0565 \pm 0,0685$	$0,5307 \pm 0,0694$
ostudio	ES-EPI⁺	$0,0004 \pm 0,0002$	$1,373 \pm 0,798$	$0,0926 \pm 0,0914$	$0,4503 \pm 0,0630$
estudio	Otras EA-EPI⁺	$0,0005 \pm 0,0002$	$1,187 \pm 0,599$	$0,0270 \pm 0,0091$	$0,4661 \pm 0,0734$
	EA-EPI-	$0,0005 \pm 0,0004$	$0,961 \pm 0,331$	0,0909 ± 0,0772	0,4797 ± 0,0719
Crupos	AR-EPI-	$0,0007 \pm 0,0006$	$0,861 \pm 0,206$	$0,1180 \pm 0,0886$	$0,4852 \pm 0,0602$
Grupos	ES-EPI-	$0,0003 \pm 0,0002$	$1,142 \pm 0,390$	$0,0568 \pm 0,0410$	$0,4584 \pm 0,0805$
control	FPI	$0,0005 \pm 0,0002$	$1,091 \pm 0,377$	$0,1591 \pm 0,1435$	$0,4693 \pm 0,0347$
	PS	$0,0002 \pm 0,0001$	$0,672 \pm 0,193$	$0,1444 \pm 0,1021$	$0,4153 \pm 0,0643$

Tabla S3. Expresión y niveles séricos de ET-1 y ADMA.

Anexo II

Publicaciones derivadas de la tesis doctoral

- Endothelial Progenitor Cells as a Potential Biomarker in Interstitial Lung Disease Associated with Rheumatoid Arthritis
- Endothelial Progenitor Cells: Relevant Players in the Vasculopathy and Lung Fibrosis Associated with the Presence of Interstitial Lung Disease in Systemic Sclerosis Patients
- Angiogenic T Cells: Potential Biomarkers for the Early Diagnosis of Interstitial Lung Disease in Autoimmune Diseases?





Endothelial Progenitor Cells as a Potential Biomarker in Interstitial Lung Disease Associated with Rheumatoid Arthritis

Verónica Pulito-Cueto ^{1,†}, Sara Remuzgo-Martínez ^{1,†}, Fernanda Genre ^{1,†}, Víctor M. Mora-Cuesta ^{1,2}, David Iturbe-Fernández ^{1,2}, Sonia Fernández-Rozas ^{1,2}, Belén Atienza-Mateo ^{1,3,4}, Leticia Lera-Gómez ¹, Pilar Alonso-Lecue ^{1,2}, Javier Rodríguez-Carrio ⁵, Diana Prieto-Peña ^{1,4}, Virginia Portilla ^{1,4}, Ricardo Blanco ^{1,4}, Alfonso Corrales ^{1,4}, Oreste Gualillo ⁶, José M. Cifrián ^{1,2,7}, Raquel López-Mejías ^{1,*,‡} and Miguel A. González-Gay ^{1,4,7,8,*,‡}

- ¹ Research Group on Genetic Epidemiology and Atherosclerosis in Systemic Diseases and in Metabolic Bone Diseases of the Musculoskeletal System, IDIVAL, Santander, 39011 Cantabria, Spain; veronica_pulito_cueto@hotmail.com (V.P.-C.); sara.r.mtz@gmail.com (S.R.-M.); fernandagenre@gmail.com (F.G.); victormanuel.mora@scsalud.es (V.M.M.-C.); david.iturbe@scsalud.es (D.I.-F.); soniam.fernandez@scsalud.es (S.F.-R.); mateoatienzabelen@gmail.com (B.A.-M.); letizialera@hotmail.com (L.L.-G.); alonsolecue@hotmail.com (P.A.-L.); diana.prieto.pena@gmail.com (D.P.-P.); virgiportilla@hotmail.com (V.P.); ricardo.blanco@scsalud.es (R.B.); afcorralesm@hotmail.com (A.C.); josecifrian@gmail.com (J.M.C.)
- ² Department of Pneumology, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, 39008 Cantabria, Spain
- ³ López Albo' Post-Residency Programme, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, 39008 Cantabria, Spain
- ⁴ Department of Rheumatology, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, 39008 Cantabria, Spain
- ⁵ Department of Functional Biology, Immunology Area, Faculty of Medicine, Universidad de Oviedo, Oviedo, 33006 Asturias, Spain; javiercarrio@hotmail.com
- ⁶ SERGAS (Servizo Galego de Saude) and IDIS (Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago), NEIRID Lab (Neuroendocrine Interactions in Rheumatology and Inflammatory Diseases), Research Laboratory 9, Santiago University Clinical Hospital, Santiago de Compostela, 15706 A Coruña, Spain; oreste.gualillo@sergas.es
- ⁷ School of Medicine, Universidad de Cantabria, Santander, 39005 Cantabria, Spain
- ⁸ Cardiovascular Pathophysiology and Genomics Research Unit, School of Physiology, Faculty of Health Sciences, University of the Witwatersrand, Johannesburg 2050, South Africa
- * Correspondence: rlopezmejias78@gmail.com (R.L.-M.); miguelaggay@hotmail.com (M.A.G.-G.); Tel.: +34-942-315-515 (R.L.-M. & M.A.G.-G.); Fax: +34-942-31-55-17 (R.L.-M. & M.A.G.-G.)
- + These authors contributed equally.
- ‡ These authors share senior authorship.

Received: 9 November 2020; Accepted: 14 December 2020; Published: 18 December 2020



Abstract: Interstitial lung disease (ILD) increases morbidity and mortality in patients with rheumatoid arthritis (RA). Although the pathogenesis of ILD associated with RA (RA-ILD⁺) remains poorly defined, vascular tissue is crucial in lung physiology. In this context, endothelial progenitor cells (EPC) are involved in endothelial tissue repair. However, little is known about their implication in RA-ILD⁺. Accordingly, we aimed to investigate the potential role of EPC related to endothelial damage in RA-ILD⁺. EPC quantification in peripheral blood from 80 individuals (20 RA-ILD⁺ patients, 25 RA-ILD⁻ patients, 21 idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) patients, and 14 healthy controls) was performed by flow cytometry. EPC were considered as CD34⁺, CD45^{low}, CD309⁺ and CD133⁺. A significant increase in EPC frequency in RA-ILD⁺ patients, as well as in RA-ILD⁻ and IPF patients, was found when compared with controls (p < 0.001, p = 0.02 and p < 0.001, respectively). RA-ILD⁺ patients exhibited a higher EPC frequency than the RA-ILD⁻ ones (p = 0.003), but lower than IPF

patients (p < 0.001). Our results suggest that EPC increase may represent a reparative compensatory mechanism in patients with RA-ILD⁺. The degree of EPC frequency may help to identify the presence of ILD in RA patients and to discriminate RA-ILD⁺ from IPF.

Keywords: endothelial progenitor cells; vascular damage biomarker; interstitial lung disease; rheumatoid arthritis; idiopathic pulmonary fibrosis

1. Introduction

Interstitial lung disease (ILD) is one of the most feared complications in patients with rheumatoid arthritis (RA), increasing their morbidity and mortality [1,2]. Although ILD frequently develops in patients with established RA, it may also be presented as the initial or single manifestation of an unidentified RA [1–3]. In this regard, the identification of an underlying RA in ILD patients remains a challenge, considering that RA-ILD⁺ shares clinical, pathological, and epidemiological similarities with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), the most common and severe ILD [2–4]. Consequently, some patients initially defined as having IPF may be finally diagnosed with RA-ILD⁺ [4]. Based on these data, a better understanding of the pathogenesis of RA-ILD⁺ is crucial.

The pulmonary microvascular endothelium constitutes a large surface area that displays great growth potential [5]. Accordingly, vascular tissue plays a key role in lung homeostasis, contributing both to physiological and pathological processes [5]. In this context, the maintenance of the endothelium through its repair and regeneration is guaranteed by a population of cells described by Asahara et al. and termed as endothelial progenitor cells (EPC) [6]. EPC are mobilized from the bone marrow and possess the capacity to migrate, proliferate, and differentiate into mature endothelial cells stimulating the formation of new blood vessels [6]. Interestingly, accumulating evidence has shown the implication of EPC in several diseases, although controversial results have been reported in RA [7–10] and IPF [11,12]. As far as we know, the specific role of EPC in the pathogenesis of RA-ILD⁺ remains largely unknown. Given that EPC have been suggested as a marker of endothelial damage in several diseases, the understanding of the role of EPC in RA-ILD⁺ may be critical for a better knowledge of the vascular pathophysiology that characterizes this disease.

Taking these considerations into account, the aim of this study was to investigate the potential role of EPC in the pathogenesis related to endothelial damage in RA-ILD⁺. For this purpose, we compared the frequency of EPC in patients with RA-ILD⁺ with that observed in the following three groups: RA-ILD⁻ patients, IPF patients, and healthy controls. In addition, the association of EPC frequency with the demographic and clinical features of these patients was determined.

2. Materials and Methods

2.1. Study Population

A total of 80 individuals, constituted by 20 RA-ILD⁺ patients and three comparative groups (25 RA-ILD⁻ patients, 21 IPF patients, and 14 healthy controls), were recruited from the Pneumology and Rheumatology departments of Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander, Spain). RA-ILD⁻ patients fulfilled the 2010 American College of Rheumatology criteria for RA [13]. ILD was excluded in RA-ILD⁻ patients by the evaluation of high-resolution computed tomography (HRCT) images of the chest by experienced radiologists. Those who fulfilled the American Thoracic and European Respiratory Society's criteria for ILD were classified as RA-ILD⁺ [14]. IPF patients met their own criteria [14]. Healthy controls did not present any history of autoimmune or lung diseases.

Demographic and clinical features of patients comprising sex, age, smoking history, duration of RA disease, rheumatoid factor (RF) and anti-cyclic citrullinated peptide antibodies (ACPA) status, C-reactive protein (CRP), erythrocyte sedimentation rate (ESR), pulmonary function tests (PFTs),

HRCT pattern, and immunosuppressive therapies received by RA patients at the time of the study were collected. HRCT patterns of ILD patients were stratified according to the criteria for the usual interstitial pneumonia (UIP) pattern of the Fleischner Society [15].

All the experiments involving humans and human blood samples were carried out in accordance with the approved guidelines and regulations, according to the Declaration of Helsinki. All experimental protocols were approved by the Ethics Committee of clinical research of Cantabria, Spain (2016.092). All subjects gave written informed consent to participate in this study previous to their inclusion.

2.2. EPC Quantification by Flow Cytometry

EPC from peripheral venous blood were characterized by simultaneous expression of cell surface markers that reflect stemness (CD34), immaturity (CD133), endothelial commitment (CD309 or vascular endothelial growth factor receptor 2), and a low expression of the pan-leukocyte marker (CD45) [16–18].

EPC quantification was analysed by direct flow cytometry, following the recommendations on EPC measurement that were previously described [16–18]. Briefly, 200 µL of peripheral blood was pre-incubated with Fc receptors blocking reagent (Miltenyi Biotech, Madrid, Spain). Then, cells were labelled with APC-conjugated anti-CD34 (Miltenyi Biotech, Madrid, Spain), VioBright FITC-conjugated anti-CD309 (VEGFR-2) (Miltenyi Biotech, Madrid, Spain), PE-conjugated anti-CD133/2(293C3) (Miltenyi Biotech, Madrid, Spain), Vioblue-conjugated anti-CD45 (Miltenyi Biotech, Madrid, Spain) monoclonal antibodies, or with isotype-matched antibodies (Miltenyi Biotech, Madrid, Spain). After conjugation, red blood cells were lysed by incubating in flow cytometry and fluorescence-activated cell sorting (FACS) lysing solution (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) and white blood cell pellets were then washed once with phosphate-buffered saline (PBS). Labelled cells were analysed in a CytoFLEX flow cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) using a Cytexpert 2.3 analyzer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), acquiring approximately 1×10^5 per sample. First, CD34⁺ and CD45^{low} were gated and then assayed for expression of CD133 and CD309⁺ cells. EPC quantification was expressed as the percentage of cells in the lymphocyte gate.

2.3. Statistical Analyses

Data were expressed as mean \pm standard deviation (SD) for continuous variables, and number of individuals (*n*) and percentage (%) for categorical variables. The differences between RA-ILD⁺ and RA-ILD⁻ patients in sex, smoking status, RF and ACPA status, as well as in therapies received were analysed by chi-square test, whereas the differences in age at study, duration of RA disease, CRP and ESR levels and PFTs were determined by Student's t-test. Comparisons of EPC frequency between two study groups were performed by Student's t-test. Relationship of EPC frequency with continuous variables and categorical variables related to disease features was carried out via estimation of the Pearson's correlation coefficient (r) and one-way ANOVA, respectively. *p*-values <0.05 were considered as statistically significant. Statistical analysis was performed using STATA statistical software 12/SE (Stata Corp., College Station, TX, USA).

3. Results

3.1. Demographic and Clinical Features of Patients and Controls

The mean age \pm SD at the time of the study of healthy controls, RA-ILD⁺, RA-ILD^{-,} and IPF patients was 41.8 \pm 13.7, 66.8 \pm 10.2, 60.1 \pm 11.8 and 69.2 \pm 10.0 years, respectively. Additionally, information on sex and smoking status of individuals, as well as clinical features, is displayed in Table 1.

As expected, statistically significant differences were found between patients with RA-ILD⁻ and RA-ILD⁺ regarding the following clinical features: RF and ACPA status, CRP levels, forced expiratory

volume in one second /forced vital capacity (FEV1/FVC) (% predicted), diffusing capacity of the lung for carbon monoxide (DLCO) (% predicted), and therapies received (Table 1).

	Healthy Controls $n = 14$	RA-ILD ⁺ Patients n = 20	RA-ILD [–] Patients n = 25	IPF Patients $n = 21$	* p
Sex (women), n (%)	7 (50)	9 (45.0)	15 (60.0)	7 (33.3)	0.32
Age at study, mean \pm SD, years	41.8 ± 13.7	66.8 ± 10.2	60.1 ± 11.8	69.2 ± 10.0	0.05
Smoking ever, n (%)	3 (27.3)	13 (65.0)	13 (52.0)	16 (76.2)	0.38
Duration of RA disease, mean ± SD, years	-	9.2 ± 10.2	4.1 ± 7.4	-	0.06
RF positive, n (%)	-	16 (80.0)	11 (44.0)	-	0.01
ACPA positive, n (%)	-	18 (90.0)	15 (60.0)	-	0.02
CRP (mg/dL), mean \pm SD	-	1.1 ± 1.1	0.5 ± 0.5	-	0.04
ESR (mm/1st hour), mean \pm SD	-	22.8 ± 27.2	14.4 ± 12.4	-	0.24
Pulmonary function tests					
FVC (% predicted), mean ± SD	-	95.1 ± 24.7	99.2 ± 16.0	84.9 ± 14.7	0.58
FEV1 (% predicted), mean ± SD	-	91.7 ± 21.5	94.9 ± 22.0	87.3 ± 19.6	0.67
FEV1/FVC (% predicted), mean ± SD	-	77.6 ± 9.3	93.6 ± 12.3	79.7 ± 7.8	< 0.001
DLCO (% predicted), mean ± SD	-	40.9 ± 13.9	79.9 ± 20.0	43.6 ± 18.4	< 0.001
HRCT pattern					
UIP pattern, n (%)	-	11 (55.0)	-	21 (100.0)	-
Probable UIP pattern, n (%)	-	1 (5.0)	-	-	-
NSIP pattern, n (%)	-	7 (35.0)	-	-	-
Non-NSIP pattern, n (%)	-	1 (5.0)	-	-	-
Therapies received by RA patients					
csDMARDs, n (%)	-	17 (85)	13 (52)	-	0.02
bDMARDs, <i>n</i> (%)	-	15 (75)	2 (8)	-	<0.001

Table 1. Demographic and clinical features of the individuals included in this study.

RA: rheumatoid arthritis; ILD: interstitial lung disease; IPF: idiopathic pulmonary fibrosis; SD: standard deviation; RF: rheumatoid factor; ACPA: anti-cyclic citrullinated peptide antibodies; CRP: C-reactive protein; ESR: erythrocyte sedimentation rate; FVC: forced vital capacity; FEV1: forced expiratory volume in one second; DLCO: diffusing capacity of the lung for carbon monoxide; HRCT: high resolution computed tomography; UIP: usual interstitial pneumonia; NSIP: non-specific interstitial pneumonia; csDMARDs: conventional synthetic disease-modifying anti-rheumatic drugs; bDMARDs: biologic disease-modifying anti-rheumatic drugs. * *p*: *p*-value obtained after comparison between RA-ILD⁺ and RA-ILD⁻ patients. Statistically significant results are highlighted in bold.

3.2. Differences of EPC Frequency between RA-ILD⁺ Patients and the Comparative Groups

A significant increase in EPC frequency in patients with RA-ILD⁺ was found when compared with healthy controls (p < 0.001) (Figure 1 and Supplementary Table S1).



Figure 1. Quantification of EPC population by flow cytometry in all individuals included in the study. EPC were considered as CD34 ⁺, CD45^{low}, CD309⁺ and CD133⁺ cells in the lymphocyte gate and were expressed as the percentage of cells in this gate. Differences between the study groups were evaluated by Student's t-test. Horizontal bars indicate the mean value of each study group. *p: p*-value; EPC: endothelial progenitor cells; RA: rheumatoid arthritis; ILD: interstitial lung disease; IPF: idiopathic pulmonary fibrosis.

Furthermore, EPC frequency in patients with RA-ILD⁺ was also significantly different from RA-ILD⁻ and IPF patients (Figure 1 and Supplementary Table S1). In particular, patients with RA-ILD⁺ exhibited a higher EPC percentage than the RA-ILD⁻ ones (p = 0.003), but lower than IPF patients (p < 0.001) (Figure 1 and Supplementary Table S1).

In addition, patients with RA-ILD⁻ and IPF showed a higher frequency of EPC than healthy controls (p = 0.02 and p < 0.001, respectively) (Figure 1). Moreover, patients with RA-ILD⁻ revealed a lower frequency of EPC than IPF patients (p < 0.001) (Figure 1).

3.3. Relationship of EPC Frequency with Clinical Features

No correlation of EPC frequency with the duration of RA disease, CRP, and ESR was observed in RA patients, regardless of the presence or absence of underlying ILD (Table 2). This was also the case when the relationship of EPC frequency with PFTs of RA-ILD⁺, RA-ILD⁻, and IPF patients was analyzed (Table 2). Likewise, we could not observe differences in the EPC frequency when RA-ILD⁺ patients were stratified according to smoking history, RF/ACPA status, HRCT pattern, or therapies (Table 3). Additional information on RA-ILD⁻ and IPF patients is shown in Table 3.

	RA-ILD⁺ Patients		RA-ILD ⁻	Patients	IPF Patients	
_	r	р	r	р	r	р
Duration of RA disease (years)	-0.19	0.42	-0.04	0.87	_	_
CRP (mg/dL)	-0.06	0.79	-0.30	0.20	_	_
ESR (mm/1st hour)	-0.34	0.10	-0.06	0.82	_	_
FVC (% predicted)	0.07	0.76	0.26	0.34	-0.21	0.35
FEV1 (% predicted)	-0.07	0.77	0.29	0.29	-0.19	0.40
FEV1/FVC (% predicted)	-0.03	0.89	0.24	0.40	-0.05	0.83
DLCO (% predicted)	0.38	0.22	0.07	0.81	-0.23	0.40

Table 2. Correlation of EPC frequency with continuous variables related to disease features.

EPC: endothelial progenitor cells; RA: rheumatoid; ILD: interstitial lung disease; IPF: idiopathic pulmonary fibrosis; *r*: Pearson's correlation coefficient; *p*: *p*-value; CRP: C-reactive protein; ESR: erythrocyte sedimentation rate; FVC: forced vital capacity; FEV1: forced expiratory volume in one second; DLCO: diffusing capacity of the lung for carbon monoxide.

Table 3.	Differences in	EPC frequency	according to	categorical	variables	related to	o disease features
----------	----------------	---------------	--------------	-------------	-----------	------------	--------------------

Variable Category		RA-ILD+ Pa	atients	RA-ILD– Pa	atients	IPF Patients	
Vullubic		Mean ± SD	р	$Mean \pm SD$	р	$Mean \pm SD$	р
Smoking ever	No Yes	0.059 ± 0.020 0.043 ± 0.024	0.20	0.028 ± 0.010 0.031 ± 0.016	0.53	0.092 ± 0.048 0.091 ± 0.045	0.93
RF	No Yes	0.061 ± 0.034 0.047 ± 0.020	0.31	0.026 ± 0.009 0.034 ± 0.017	0.18		-
ACPA	No Yes	0.046 0.049 ± 0.023	0.88	0.026 ± 0.009 0.031 ± 0.015	0.34		-
HRCT pattern	UIP NSIP	0.043 ± 0.020 0.059 ± 0.025	0.15		-	0.091 ± 0.045 -	_
csDMARDs	No Yes	0.036 ± 0.099 0.049 ± 0.025	0.39	0.033 ± 0.016 0.027 ± 0.011	0.25	_	_
bDMARDs	No Yes	0.047 ± 0.034 0.047 ± 0.020	0.99	0.030 ± 0.014 0.020 ± 0.004	0.31	_	_

EPC: endothelial progenitor cells; RA: rheumatoid arthritis; ILD: interstitial lung disease; IPF: idiopathic pulmonary fibrosis; SD: standard deviation; *p*: *p*-value; RF: rheumatoid factor; ACPA: anti-cyclic citrullinated peptide antibodies; HRCT: high resolution computed tomography; UIP: usual interstitial pneumonia; NSIP: non-specific interstitial pneumonia; csDMARDs: conventional synthetic disease-modifying anti-rheumatic drugs; bDMARDs: biologic disease-modifying anti-rheumatic drugs.

Since IPF and RA-ILD⁺ with UIP share a similar HRCT pattern, we assessed if differences in the frequency of EPC between them might exist. In this regard, we observed that the frequency of EPC was higher in IPF than in RA-ILD⁺ with UIP pattern (p < 0.001).

4. Discussion

EPC are crucial in several inflammatory diseases in which endothelial damage plays a fundamental role [7–12,16,19–21]. In this line, and to the best of our knowledge, no data regarding the role of EPC in RA-ILD⁺, a severe complication in RA patients, were available until the present study. Accordingly, the purpose of this work was to determine the potential role of EPC in the pathogenesis related to endothelial damage in RA-ILD⁺.

Our results show, for the first time, a higher EPC frequency in the peripheral blood of RA-ILD⁺ patients when compared with healthy controls, supporting an increase in EPC production and mobilization into the systemic circulation. In this regard, we hypothesize that EPC are being recruited at the sites of vascular damage to exert their repair capacities as a compensatory mechanism related to endothelial damage in RA-ILD⁺ patients. In addition, and in accordance with previous studies in RA and IPF [7,11], our data also revealed a significant increase in EPC frequency in RA-ILD⁻ and IPF patients in relation to controls, further supporting the compensatory mechanism of these cells.

Interestingly, we also disclosed, for the first time, a significant difference in the EPC frequency of RA-ILD⁺ patients when compared with IPF and RA-ILD⁻ patients. In keeping with that, patients with the most severe ILD, represented by IPF patients, showed the highest frequencies of EPC. Accordingly, patients with RA-ILD⁺ exhibited a higher frequency of EPC than those patients with RA-ILD⁻ who did not present any ILD. This suggests a potential value of the quantification of EPC as a complementary tool for establishing a differential diagnosis between these diseases.

Regarding the association of EPC frequency with disease features, no relationship was observed. In agreement with this, previous reports showed a lack of association of EPC quantification with PFTs and smoking status in IPF patients [12], as well as with the duration of RA disease, CRP and ESR levels, ACPA and RF status, or therapies in RA patients [7,8].

We acknowledge that the present study has some limitations. The difference in the age between patients and controls may constitute a weakness of our study. However, whereas significant differences in the frequency of EPC existed between RA-ILD⁺ and RA-ILD⁻, the age was similar between these two subgroups of RA. It was also applicable when RA patients, regardless of their ILD status, were compared with those with IPF. In addition, previous studies have shown that age does not constitute a relevant influence on the number of EPC in peripheral blood in healthy controls [22]. Furthermore, statistical differences in some clinical characteristics between RA groups, especially DLCO (% predicted), may also constitute a potential limitation of our study.

In conclusion, our results suggest that EPC increase may represent a reparative compensatory mechanism in patients with RA-ILD⁺. Moreover, clinical assessment of EPC frequency as a biomarker of endothelial damage may help to identify the presence of ILD in patients with RA and to discriminate RA-ILD⁺ from IPF.

The results of this work were partially presented at the 2019 American College of Rheumatology Meeting in Atlanta, Georgia, USA (abstract no. 57) (View Abstract and Citation Information Online- https://acrabstracts.org/abstract/endothelial-progenitor-cells-in-the-pathophysiology-of-interstitial-lung-disease-associated-with-rheumatoid-arthritis/) and at the 2020 European E-Congress of Rheumatology (abstract no. SAT0014) (View Abstract and Citation Information Online- https://eular.conference2web.com/#!resources/endothelial-progenitor-cells-role-in-endothelial-damage-of-interstitial-lung-disease-associated-to-rheumatoid-arthritis).

Supplementary Materials: The following are available online at http://www.mdpi.com/2077-0383/9/12/4098/s1, Table S1: Differences of EPC frequency between RA-ILD⁺ patients and the three comparative groups (healthy controls, RA-ILD⁻ and IPF patients).

Author Contributions: Conceptualization, formal analysis, methodology, visualization, writing—original draft and writing—review and editing: V.P.-C., S.R.-M., F.G.; data curation and investigation: V.P.-C., S.R.-M., F.G., V.M.M.-C., D.I.-F., S.F.-R., B.A.-M., L.L.-G., P.A.-L., J.R.-C., D.P.-P., V.P., R.B., A.C., O.G., J.M.C.; project administration, supervision and writing—review and editing: R.L.-M., M.A.G.-G. All authors have contributed significantly to the article. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was partially supported by the European Regional Development Fund (ERDF) and 'Fondo de Investigación Sanitaria' [PI18/00043] from Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Health Ministry, Spain. VP-C is supported by a pre-doctoral grant from IDIVAL [PREVAL 18/01]. SR-M is supported by funds of RETICS Program [RD16/0012/0009, ISCIII, co-funded by ERDF]. BA-M is a recipient of a 'López Albo' Post-Residency Programme funded by Servicio Cántabro de Salud. LL-G is supported by funds of ISCIII, co-funded by ERDF [PI18/00042]. OG is beneficiary of a grant funded by Xunta de Galicia, Consellería de Educación, Universidade Formación Profesional and Consellería de Economía, Emprego e Industria (GAIN), GPC IN607B2019/10. RL-M is a recipient of a Miguel Servet type I fellowship [ISCIII, co-funded by European Social Fund—ESF, CP16/00033].

Acknowledgments: We thank all subjects that participated in this study.

Conflicts of Interest: The authors declare no competing interest related to this study.

References

- 1. Bendstrup, E.; Moller, J.; Kronborg-white, S.; Prior, T.S.; Hyldgaard, C. Interstitial Lung Disease in Rheumatoid Arthritis Remains a Challenge for Clinicians. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 2038. [CrossRef] [PubMed]
- 2. Mathai, S.C.; Danoff, S.K. Management of interstitial lung disease associated with connective tissue disease. *BMJ* **2016**, 352, h6819. [CrossRef] [PubMed]
- 3. Paulin, F.; Doyle, T.J.; Fletcher, E.A.; Ascherman, D.P.; Rosas, I.O. Rheumatoid Arthritis-Associated Interstitial Lung Disease and Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Shared Mechanistic and Phenotypic Traits Suggest Overlapping Disease Mechanisms. *Rev. Investig. Clin.* **2015**, *67*, 280–286.
- Atienza-Mateo, B.; Remuzgo-Martínez, S.; Mora-Cuesta, V.M.; Iturbe-Fernández, D.; Fernández-Rozas, S.; Prieto-Peña, D.; Calderón-Goercke, M.; Corrales, A.; Blanco-Rodriguez, G.; Gómez-Román, J.J.; et al. The Spectrum of Interstitial Lung Disease Associated with Autoimmune Diseases: Data of a 3.6-Year Prospective Study from a Referral Center of Interstitial Lung Disease and Lung Transplantation. *J. Clin. Med.* 2020, 9, 1606. [CrossRef]
- Alvarez, D.F.; Huang, L.; King, J.A.; Elzarrad, M.K.; Yoder, M.C.; Stevens, T. Lung microvascular endothelium is enriched with progenitor cells that exhibit vasculogenic capacity. *Lung. Cell Mol. Physiol.* 2008, 294, 419–430. [CrossRef] [PubMed]
- Asahara, T.; Murohara, T.; Sullivan, A.; Silver, M.; Van der Zee, R.; Li, T.; Witzenbichler, B.; Schatteman, G.; Isner, J.M. Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis. *Sci. New Ser.* 1997, 275, 964–967. [CrossRef] [PubMed]
- 7. Jodon de Villeroché, V.; Avouac, J.; Ponceau, A.; Ruiz, B.; Kahan, A.; Boileau, C.; Uzan, G.; Allanore, Y. Enhanced late-outgrowth circulating endothelial progenitor cell levels in rheumatoid arthritis and correlation with disease activity. *Arthritis Res. Ther.* **2010**, *12*, R27. [CrossRef]
- 8. Rodríguez-Carrio, J.; Prado, C.; De Paz, B.; López, P.; Gómez, J.; Alperi-López, M.; Ballina-García, F.J.; Suárez, A. Circulating endothelial cells and their progenitors in systemic lupus erythematosus and early rheumatoid arthritis patients. *Rheumatology* **2012**, *51*, 1775–1784. [CrossRef]
- 9. Distler, H.W.; Beyer, C.; Schett, G.; Luscher, T.F.; Gay, S.; Distler, O. Endothelial Progenitor Cells Novel Players in the Pathogenesis of Rheumatic Diseases. *Arthritis Rheum.* **2009**, *60*, 3168–3179. [CrossRef]
- 10. Avouac, J.; Uzan, G.; Kahan, A.; Boileau, C.; Allanore, Y. Endothelial progenitor cells and rheumatic disorders. *Jt. Bone Spine* **2008**, *75*, 131–137. [CrossRef]
- 11. De Biasi, S.; Cerri, S.; Bianchini, E.; Gibellini, L.; Persiani, E.; Montanari, G.; Luppi, F.; Carbonelli, C.M.; Zucchi, L.; Bocchino, M.; et al. Levels of circulating endothelial cells are low in idiopathic pulmonary fibrosis and are further reduced by anti-fibrotic treatments. *BMC Med.* **2015**, *13*, 277. [CrossRef] [PubMed]
- Smadja, D.M.; Mauge, L.; Nunes, H.; D'Audigier, C.; Juvin, K.; Borie, R.; Carton, Z.; Bertil, S.; Blanchard, A.; Crestani, B.; et al. Imbalance of circulating endothelial cells and progenitors in idiopathic pulmonary fibrosis. *Angiogenesis* 2013, *16*, 147–157. [CrossRef] [PubMed]

- Aletaha, D.; Neogi, T.; Silman, A.J.; Funovits, J.; Felson, D.T.; Bingham, C.O., 3rd; Birnbaum, N.S.; Burmester, G.R.; Bykerk, V.P.; Cohen, M.D.; et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2010, *62*, 2569–2581. [CrossRef] [PubMed]
- Travis, W.D.; Costabel, U.; Hansell, D.M.; King, T.E.; Lynch, D.A.; Nicholson, A.G.; Ryerson, C.J.; Ryu, J.H.; Selman, M.; Wells, A.U.; 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*, 733–748. [CrossRef] [PubMed]
- Lynch, D.A.; Sverzellati, N.; Travis, W.D.; Brown, K.K.; Colby, T.V.; Galvin, J.R.; Goldin, J.G.; Hansell, D.M.; Inoue, Y.; Johkoh, T.; et al. Diagnostic criteria for idiopathic pulmonary fibrosis: A Fleischner Society White Paper. *Lancet Respir. Med.* 2018, *6*, 138–153. [CrossRef]
- 16. Distler, J.H.W.; Allanore, Y.; Avouac, J.; Giacomelli, R.; Guiducci, S.; Moritz, F.; Akhmetshina, A.; Walker, U.A.; Gabrielli, A.; Müller-Ladner, U.; et al. EULAR Scleroderma Trials and Research group statement and recommendations on endothelial precursor cells EUSTAR statement and recommendations on endothelial precursor cells. *Ann. Rheum. Dis.* 2009, *68*, 163–168. [CrossRef]
- Schmidt-Lucke, C.; Fichtlscherer, S.; Aicher, A.; Tschöpe, C.; Schultheiss, H.-P.; Zeiher, A.M.; Dimmeler, S. Quantification of Circulating Endothelial Progenitor Cells Using the Modified ISHAGE Protocol. *PLoS ONE* 2010, 5, e13790. [CrossRef]
- Van Craenenbroeck, E.M.; Van Craenenbroeck, A.H.; Van Ierssel, S.; Bruyndonckx, L.; Hoymans, V.Y.; Vrints, C.J.; Conraads, V.M. Quantification of circulating CD34 +/KDR +/CD45 dim endothelial progenitor cells: Analytical considerations. *Int. J. Cardiol.* 2013, *167*, 1688–1695. [CrossRef]
- Aragona, C.O.; Imbalzano, E.; Mamone, F.; Cairo, V.; Gullo, A.L.; D'Ascola, A.; Sardo, M.A.; Scuruchi, M.; Basile, G.; Saitta, A.; et al. Endothelial Progenitor Cells for Diagnosis and Prognosis in Cardiovascular Disease. *Stem Cells Int.* 2016, 2016, 8043792. [CrossRef]
- 20. Huertas, A.; Palange, P. Circulating endothelial progenitor cells and chronic pulmonary diseases. *Eur. Respir. J.* **2011**, *37*, 426–431. [CrossRef]
- 21. Ghiadoni, L.; Mosca, M.; Tani, C.; Virdis, A.; Taddei, S.; Bombardieri, S. Clinical and methodological aspects of endothelial function in patients with systemic autoimmune diseases. *Clin. Exp. Rheumatol.* **2008**, *26*, 680. [PubMed]
- 22. Heiss, C.; Keymel, S.; Niesler, U.; Ziemann, J.; Kelm, M.; Kalka, C. Impaired progenitor cell activity in age-related endothelial dysfunction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2005**, *45*, 1441–1448. [CrossRef] [PubMed]

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).





Supplementary Table S1. Differences of EPC frequency between RA-ILD⁺ patients and the three comparative groups (healthy controls, RA-ILD⁻ and IPF patients).

	EPC frequency (Mean \pm SD)	р
RA-ILD ⁺ patients vs healthy controls	0.047 ± 0.023 vs 0.019 ± 0.012	< 0.001
RA-ILD⁺ patients vs RA-ILD⁻ patients	0.047 ± 0.023 vs 0.030 ± 0.013	0.003
RA-ILD ⁺ patients vs IPF patients	0.047 ± 0.023 vs 0.091 ± 0.045	< 0.001
EDC, and a thalial and consistent calles DA, where a stati	d anthritia. II D. interatitial luna diasaas. ID	E. idianathia

EPC: endothelial progenitor cells; RA: rheumatoid arthritis; ILD: interstitial lung disease; IPF: idiopathic pulmonary fibrosis; SD: standard deviation. Significant results are highlighted in **bold**.





Article Endothelial Progenitor Cells: Relevant Players in the Vasculopathy and Lung Fibrosis Associated with the Presence of Interstitial Lung Disease in Systemic Sclerosis Patients

Verónica Pulito-Cueto ^{1,†}[®], Sara Remuzgo-Martínez ^{1,†}, Fernanda Genre ^{1,†}[®], Belén Atienza-Mateo ^{1,2,3}[®], Víctor M. Mora-Cuesta ^{1,4}[®], David Iturbe-Fernández ^{1,4}, Leticia Lera-Gómez ¹, Raquel Pérez-Fernández ¹, Diana Prieto-Peña ^{1,3}, Virginia Portilla ^{1,3}, Ricardo Blanco ^{1,3}[®], Alfonso Corrales ^{1,3}, Oreste Gualillo ⁵, José M. Cifrián ^{1,4,6}, Raquel López-Mejías ^{1,*,‡}[®] and Miguel A. González-Gay ^{1,3,6,7,*,‡}[®]

- ¹ Research Group on Genetic Epidemiology and Atherosclerosis in Systemic Diseases and in Metabolic Bone Diseases of the Musculoskeletal System, IDIVAL, 39011 Santander, Spain; veronica_pulito_cueto@hotmail.com (V.P-C.); sararmtz@gmail.com (S.R.-M.); fernandagenre@gmail.com (F.G.); mateoatienzabelen@gmail.com (B.A.-M.); victormanuel.mora@scsalud.es (V.M.M.-C.); diturfer@gmail.com (D.I.-F.); letizialera@hotmail.com (L.L.-G.); kelyra95@hotmail.com (R.P.-F.); diana.prieto.pena@gmail.com (D.P.-P.); virgiportilla@hotmail.com (V.P.); ricardo.blanco@scsalud.es (R.B.); afcorralesm@hotmail.com (A.C.); josemanuel.cifrian@scsalud.es (J.M.C.)
 - López Albo' Post-Residency Programme, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, 39008 Santander, Spain
- ³ Department of Rheumatology, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, 39008 Santander, Spain
 ⁴ Department of Pheumology, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, 39008 Santander, Spain
- Department of Pneumology, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, 39008 Santander, Spain
- ⁵ Servizo Galego de Saude and Instituto de Investigación Sanitaria, Hospital Clinico Universitario de Santiago, 15706 Santiago de Compostela, Spain; orestegualillo@gmail.com
- ⁶ School of Medicine, Universidad de Cantabria, 39011 Santander, Spain
 ⁷ Cardiovacular Bathenhysiology and Conomics Passarch Unit School
 - Cardiovascular Pathophysiology and Genomics Research Unit, School of Physiology, Faculty of Health Sciences, University of the Witwatersrand, Johannesburg 2050, South Africa
 - Correspondence: rlopezmejias78@gmail.com (R.L.-M.); miguelaggay@hotmail.com (M.A.G.-G.); Tel.: +34-942-315-515 (R.L.-M. & M.A.G.-G.); Fax: +34-942-31-55-17 (R.L.-M. & M.A.G.-G.)
- + These authors contributed equally to this work.
- ‡ These authors share senior authorship.

Abstract: Endothelial progenitor cells (EPC), which are key effectors in the physiologic vascular network, have been described as relevant players in autoimmune diseases. We previously showed that EPC frequency may help to identify the presence of interstitial lung disease (ILD) in rheumatoid arthritis patients. Given that ILD constitutes the main cause of mortality in systemic sclerosis (SSc) patients, we aimed to determine the EPC contribution to the pathogenic processes of vasculopathy and lung fibrosis in SSc-ILD⁺. EPC quantification was performed by flow cytometry on blood from 83 individuals: 21 SSc-ILD⁺ patients and subjects from comparative groups (20 SSc-ILD⁻ and 21 idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) patients and 21 healthy controls (HC)). EPC were considered as CD34⁺, CD45^{low}, CD309⁺, and CD133⁺. A significant increase in EPC frequency was found in SSc-ILD⁺ patients when compared to HC (p < 0.001). SSc-ILD⁺ patients exhibited a higher EPC frequency than SSc-ILD⁻ patients (p = 0.012), whereas it was markedly reduced compared to IPF patients (p < 0.001). EPC frequency was higher in males (p = 0.04) and negatively correlated to SSc duration (p = 0.04) in SSc-ILD⁺. EPC frequency may be considered as a biomarker of ILD in SSc patients.

Keywords: endothelial progenitor cells; systemic sclerosis; interstitial lung disease; biomarker

1. Introduction

Endothelial progenitor cells (EPC) are known to be key cellular effectors in the homeostasis of the physiologic vascular network, being implicated in vascular regeneration, both



Citation: Pulito-Cueto, V.; Remuzgo-Martínez, S.; Genre, F.; Atienza-Mateo, B.; Mora-Cuesta, V.M.; Iturbe-Fernández, D.; Lera-Gómez, L.; Pérez-Fernández, R.; Prieto-Peña, D.; Portilla, V.; et al. Endothelial Progenitor Cells: Relevant Players in the Vasculopathy and Lung Fibrosis Associated with the Presence of Interstitial Lung Disease in Systemic Sclerosis Patients. *Biomedicines* 2021, 9, 847. https:// doi.org/10.3390/biomedicines9070847

Academic Editor: Pasquale Ambrosino

Received: 25 June 2021 Accepted: 19 July 2021 Published: 20 July 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https:// creativecommons.org/licenses/by/ 4.0/). in new vessel formation and in the repair mechanisms of existing vessels [1–3]. The ability of these cells to differentiate towards mature endothelial cells and to incorporate into the injured vasculature, promoting neovascularization, has raised great interest over the last several decades [2,4]. Accordingly, growing evidence has shown the relevant contribution of EPC to the pathogenesis of different vascular diseases [2,4–6]. In fact, we recently proposed that the degree of EPC frequency may be useful as a biomarker to identify the presence of interstitial lung disease (ILD) in patients with rheumatoid arthritis (RA) [7].

Systemic sclerosis (SSc) is a clinically heterogeneous disease characterized by a complex interplay between autoimmunity, vasculopathy, and fibrosis [8–12]. ILD is one of the most severe and common manifestations of SSc and a leading cause of death in these patients [8–12]. However, the options for treatment are limited, since the underlying mechanisms of defective vasculogenesis and lung fibrosis of SSc-ILD are not clear [12]. Therefore, the investigation of novel, reliable, and non-invasive biomarkers would provide a better understanding of the pathophysiology of SSc-ILD [10,12]. In this context, EPC have been described as important players in the pathogenesis of SSc [13–30]. Nevertheless, to the best of our knowledge, their role in the development of ILD in SSc patients remains unknown.

Taking all this into account and given the essential role of EPC in endothelial repair, the objective of this study was to determine the contribution of EPC to the pathogenic processes of vasculopathy and lung fibrosis in SSc-ILD⁺.

2. Materials and Methods

2.1. Study Population

A total of 83 individuals constituted by 21 SSc-ILD⁺ patients and subjects from three comparative groups (20 SSc-ILD⁻ patients, 21 idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) patients, and 21 healthy controls (HC)) were recruited from the Pneumology and Rheumatology departments of Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander, Spain).

Patients with SSc fulfilled the 2013 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism criteria for the classification of SSc [31]. Pulmonary fibrosis was assessed in all the patients by high-resolution computed tomography (HRCT) images of the chest and pulmonary function tests (PFTs). Additionally, pulmonary hypertension (PH) was diagnosed by transthoracic echocardiogram in all the patients. SSc patients who lacked lung involvement (absence of pulmonary fibrosis and PH) were considered as SSc-ILD⁻ patients, whereas those who fulfilled the American Thoracic Society/European Respiratory Society criteria for ILD were classified as SSc-ILD⁺ [32]. IPF patients met the criteria proposed by the American Thoracic Society/European Respiratory Society [32]. HC did not present any history of autoimmune or lung diseases.

For further clinical characterization, demographic and clinical features of patients including sex, age, smoking history, duration of SSc disease (early: \leq 5 years; late: >5 years), antibodies status, C-reactive protein, erythrocyte sedimentation rate, PFTs, PH, pulmonary fibrosis on HRCT, HRCT patterns, and other SSc clinical manifestations at the time of the study were collected (Table 1). HRCT patterns of ILD patients were stratified according to the Fleischner society's criteria for usual interstitial pneumonia pattern [33].

All the experiments involving humans and human blood samples were carried out in accordance with the approved guidelines and regulations, according to the Declaration of Helsinki. All experimental protocols were approved by the Ethics Committee of Clinical Research of Cantabria, Spain (2016.092). All subjects gave written informed consent to participate in this study prior to their inclusion.

	SSc-ILD ⁺ Patients	SSc-ILD ⁻ Patients	IPF Patients	Healthy Controls
	<i>n</i> = 21	n = 20	n = 21	n = 21
Sex (women), <i>n</i> (%)	13 (61.9)	18 (90.0)	7 (33.3)	7 (33.3)
Age at study, mean \pm SD, years	60.3 ± 7.0	56.6 ± 15.4	69.2 ± 10.0	41.2 ± 12.5
Smoking ever, <i>n</i> (%)	11 (52.4)	11 (55.0)	16 (76.2)	5 (31.3)
SSc duration, mean \pm SD, years	10.8 ± 8.3	9.6 ± 8.1	-	-
Antibodies status				
ANA positive, <i>n</i> (%)	19 (95.0)	18 (90.0)	-	-
ACA positive, <i>n</i> (%)	1 (5.0)	9 (45.0)	-	-
ATA (anti-Scl70) positive (%)	10 (50.0)	4 (20.0)	-	-
CRP (mg/dL), mean \pm SD	0.7 ± 1.4	0.5 ± 0.5	-	-
ESR (mm/ $\overline{1}$ st hour), mean \pm SD	20.1 ± 15.9	17.2 ± 13.4	-	-
Pulmonary function tests				
FVC (% predicted), mean \pm SD	88.4 ± 27.1	106.6 ± 15.9	84.9 ± 14.7	-
FEV1 (% predicted), mean \pm SD	87.3 ± 25.6	101.9 ± 17.8	87.3 ± 19.6	-
FEV1/FVC (% predicted), mean \pm SD	79.7 ± 5.5	79.2 ± 9.9	79.7 ± 7.8	-
DLCO (% predicted), mean \pm SD	47.5 ± 19.5	71.5 ± 15.3	43.6 ± 18.4	-
Pulmonary hypertension, n (%)	3 (15.8)	0 (0.0)	4 (26.7)	-
HRCT				
Pulmonary involvement on HRCT	21 (100.0)	0 (0.0)	21 (100.0)	-
NSIP pattern, <i>n</i> (%)	14 (66.7)	-	0 (0.0)	-
Non-NSIP pattern, <i>n</i> (%)	1 (4.7)	-	0 (0.0)	-
UIP pattern, n (%)	3 (14.3)	-	21 (100.0)	-
Probable UIP pattern, <i>n</i> (%)	3 (14.3)	-	0 (0.0)	-
Other SSc clinical manifestations				
Renal impairment, n (%)	1 (4.8)	1 (5.0)	-	-
Cardiac involvement, n (%)	6 (28.6)	1 (5.0)	-	-
Raynaud's phenomenon, n (%)	21 (100.0)	20 (100.0)	-	-
Esophageal dysfunction, n (%)	12 (57.1)	5 (25.0)	-	-
Calcinosis, <i>n</i> (%)	0 (0.0)	6 (30.0)	-	-
Synovitis, n (%)	6 (28.6)	6 (30.0)	-	-

Table 1. Demographic and clinical features of the individuals included in this study.

SSc: systemic sclerosis; ILD: interstitial lung disease; IPF: idiopathic pulmonary fibrosis; SD: standard deviation; ANA: anti-nuclear antibodies; ACA: anti-centromere antibodies; ATA: anti-topoisomerase I antibodies; CRP: C-reactive protein; ESR: erythrocyte sedimentation rate; FVC: forced vital capacity; FEV1: forced expiratory volume in one second; DLCO: diffusing capacity of the lung for carbon monoxide; HRCT: high resolution computed tomography; UIP: usual interstitial pneumonia; NSIP: non-specific interstitial pneumonia.

2.2. EPC Quantification by Flow Cytometry

EPC from peripheral venous blood were characterized by simultaneous expression of cell surface markers that reflect stemness (CD34), immaturity (CD133), endothelial commitment (CD309 or vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2)), and a low expression of the pan-leukocyte marker (CD45) [34–36].

EPC quantification was analyzed by direct flow cytometry following recommendations on EPC measurement from the EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) group and other methods previously described [34–36]. Briefly, 200 µL of peripheral blood was pre-incubated with FcR blocking reagent (Miltenyi Biotech, Madrid, Spain). Then, cells were labeled with APC-conjugated anti-CD34 (Miltenyi Biotech, Madrid, Spain), VioBright FITC-conjugated anti-CD309 (VEGFR-2) (Miltenyi Biotech, Madrid, Spain), PE-conjugated anti-CD133/2(293C3) (Miltenyi Biotech, Madrid, Spain), and VioBlue-conjugated anti-CD45 (Miltenyi Biotech, Madrid, Spain) monoclonal antibodies. Specificity of staining was controlled by incubation with isotype-matched antibodies (Miltenyi Biotech, Madrid, Spain). After conjugation, red blood cells were lysed by incubating in FACS lysing solution (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) and white blood cell pellets were then washed once with PBS. Labeled cells were analyzed in a CytoFLEX flow cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) using a Cytexpert 2.3 analyzer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), acquiring approximately 1×10^5 eventsper sample. First, CD34⁺ and CD45^{low} were gated and then assayed for expression of CD133 and CD309 in the lymphocyte gate. Thus, EPC were considered as CD34⁺, CD45^{low}, CD133⁺ and CD309⁺ cells. EPC quantification was expressed as the percentage of cells in the lymphocyte gate.

2.3. Statistical Analyses

Data were expressed as mean \pm standard deviation (SD) for continuous variables and as number of individuals (*n*) and percentage (%) for categorical variables. Comparisons of EPC frequency between two study groups were performed by Student's *t*-test. The relationships of EPC frequency with continuous variables and categorical variables related to demographic and disease features were established via estimation of Pearson's correlation coefficient (r) and one-way ANOVA, respectively. *p*-values < 0.05 were considered as statistically significant. Statistical analysis was performed using STATA 12/SE statistical software (Stata Corp., College Station, TX, USA).

3. Results

3.1. Differences in EPC Frequency between SSc-ILD⁺ Patients and the Comparative Groups

Patients with SSc-ILD⁺ showed a significantly higher EPC frequency than HC (p < 0.001) (Figure 1 and Table S1). Likewise, EPC frequencies were increased in IPF and SSc-ILD⁻ patients when compared to HC, but in the latter case it was marginally statistically significant (p < 0.001 and p = 0.057, respectively) (Figure 1).



Figure 1. Quantification of EPC population by flow cytometry in all individuals included in the study. EPC were considered as CD34⁺, CD45^{low}, CD309⁺, and CD133⁺ cells in the lymphocyte gate and are expressed as the percentage of cells in this gate. Differences between the study groups were evaluated by Student's *t*-test. *p*-values <0.05 were considered as statistically significant. Horizontal bars indicate the mean value of each study group. EPC: endothelial progenitor cells; HC: healthy controls; SSc: systemic sclerosis; ILD: interstitial lung disease; IPF: idiopathic pulmonary fibrosis.

Moreover, EPC frequency was increased in SSc-ILD⁺ patients compared to patients with SSc-ILD⁻ (p = 0.012), whereas it was markedly reduced compared to IPF patients (p < 0.001) (Figure 1 and Table S1). Furthermore, patients with SSc-ILD⁻ exhibited a lower frequency of EPC than IPF patients (p < 0.001) (Figure 1).

In a further step, SSc-ILD⁺ and SSc-ILD⁻ patients were stratified by disease duration. In this sense, EPC frequency was greater both in early and late SSc-ILD⁺ patients when compared to HC (p < 0.001 in both cases) (Figure 2a). No significant differences were observed between early and late SSc-ILD⁺ patients (Figure 2a). Regarding SSc-ILD⁻, early SSc-ILD⁻ patients showed EPC frequencies significantly greater than HC (p = 0.030), while no differences were found between late SSc-ILD⁻ patients and HC (p = 0.332) (Figure 2b). No significant differences were observed between early and late SSc-ILD⁻ patients (Figure 2b).



Figure 2. Quantification of EPC population by flow cytometry in HC and patients with SSc-ILD⁺ and SSc-ILD⁻ stratified according to SSc duration. (**a**) EPC frequency in HC and patients with early and late SSc-ILD⁺. (**b**) EPC frequency in HC and patients with early and late SSc-ILD⁺. (**b**) EPC frequency in HC and patients with early and late SSc-ILD⁻. EPC were considered as CD34⁺, CD45^{low}, CD309⁺, and CD133⁺ cells in the lymphocyte gate and are expressed as the percentage of cells in this gate. Differences between the study groups were evaluated by Student's *t*-test. *p*-values < 0.05 were considered as statistically significant. Horizontal bars indicate the mean value of each study group. EPC: endothelial progenitor cells; HC: healthy controls; SSc: systemic sclerosis; ILD: interstitial lung disease.

3.2. Relationship of EPC Frequency with Demographic and Clinical Features

We found a negative correlation between the frequency of EPC and the SSc disease duration in patients with SSc-ILD⁺ (r = -0.45; p = 0.04) (Table 2). Moreover, EPC frequency was higher in male SSc-ILD⁺ patients when compared to female patients (p = 0.04) (Table 3). No significant relationship between EPC frequency and the other demographic and clinical features assessed was found in SSc-ILD⁺ patients (Tables 2 and 3).

Regarding patients with SSc-ILD⁻ and IPF, no significant results were obtained (Tables 2 and 3).

Table 2. Correlation of EPC frequency with continuous variables related to demographic and disease features.

	SSc-ILD ⁺ Patients		SSc-ILD [–] Patients		IPF Patients	
	r	р	r	р	r	р
Age (years)	-0.33	0.14	-0.34	0.14	0.02	0.94
Duration of SSc disease (years)	-0.45	0.04	-0.10	0.69	-	-
CRP (mg/dL)	-0.08	0.76	-0.26	0.26	-	-
ESR (mm/ 1 st hour)	-0.25	0.33	-0.01	0.96	-	-
FVC (% predicted)	-0.24	0.30	0.06	0.82	-0.21	0.35
FEV1 (% predicted)	-0.19	0.40	0.04	0.89	-0.19	0.40
FEV1/FVC (% predicted)	0.07	0.74	0.13	0.61	-0.05	0.83
DLCO (% predicted)	-0.01	0.99	-0.06	0.84	-0.23	0.40

EPC: endothelial progenitor cells; SSc: systemic sclerosis; ILD: interstitial lung disease; IPF: idiopathic pulmonary fibrosis; CRP: C-reactive protein; ESR: erythrocyte sedimentation rate; FVC: forced vital capacity; FEV1: forced expiratory volume in one second; DLCO: diffusing capacity of the lung for carbon monoxide. Significant results are highlighted in **bold**.

Mariahla	Catagory	SSc-ILD ⁺ P	atients	SSc-ILD [–] Patients		IPF Patients	
variable	Category	$\mathbf{Mean} \pm \mathbf{SD}$	р	$\mathbf{Mean} \pm \mathbf{SD}$	р	$\mathbf{Mean} \pm \mathbf{SD}$	р
Sex	Male Female	$\begin{array}{c} 0.045 \pm 0.021 \\ 0.030 \pm 0.007 \end{array}$	0.04	$\begin{array}{c} 0.047 \pm 0.017 \\ 0.024 \pm 0.028 \end{array}$	0.28	$\begin{array}{c} 0.093 \pm 0.047 \\ 0.086 \pm 0.042 \end{array}$	0.70
Smoking ever	No Yes	$\begin{array}{c} 0.022 \pm 0.018 \\ 0.040 \pm 0.014 \end{array}$	0.50	$\begin{array}{c} 0.020 \pm 0.019 \\ 0.031 \pm 0.033 \end{array}$	0.40	$\begin{array}{c} 0.092 \pm 0.048 \\ 0.091 \pm 0.045 \end{array}$	0.93
ANA	No Yes	$\begin{array}{c} 0.025 \\ 0.037 \pm 0.016 \end{array}$	0.46	$\begin{array}{c} 0.022 \pm 0.017 \\ 0.027 \pm 0.029 \end{array}$	0.85	-	
ACA	No Yes	$\begin{array}{c} 0.037 \pm 0.016 \\ 0.021 \end{array}$	0.33	$\begin{array}{c} 0.024 \pm 0.021 \\ 0.028 \pm 0.036 \end{array}$	0.76	-	
ATA (anti-Scl70)	No Yes	$\begin{array}{c} 0.033 \pm 0.011 \\ 0.040 \pm 0.193 \end{array}$	0.35	$\begin{array}{c} 0.026 \pm 0.030 \\ 0.025 \pm 0.023 \end{array}$	0.93	-	
РН	No Yes	$\begin{array}{c} 0.033 \pm 0.013 \\ 0.052 \pm 0.028 \end{array}$	0.07	0.026 ± 0.028 -	-	$\begin{array}{c} 0.088 \pm 0.037 \\ 0.106 \pm 0.066 \end{array}$	0.52
HRCT pattern	NSIP UIP	$\begin{array}{c} 0.032 \pm 0.010 \\ 0.039 \pm 0.023 \end{array}$	0.36	-		0.091 ± 0.045	-

Table 3. Differences in EPC frequency according to categorical variables related to demographic and disease features.

EPC: endothelial progenitor cells; SSc: systemic sclerosis; ILD: interstitial lung disease; IPF: idiopathic pulmonary fibrosis; SD: standard deviation; ANA: anti-nuclear antibodies; ACA: anti-centromere antibodies; ATA: anti topoisomerase I antibodies; PH: pulmonary hypertension; HRCT: high resolution computed tomography; NSIP: non-specific interstitial pneumonia; UIP: usual interstitial pneumonia. Significant results are highlighted in **bold**.

4. Discussion

EPC have been described as important players in the pathogenesis of vascular diseases [2,4–6]. Given that we recently identified EPC as a potential biomarker of endothelial damage in RA-ILD⁺ [7], and based on the relevance of ILD as a main cause of mortality in patients with SSc [8–12], we wondered if EPC may also play a crucial role in SSc-ILD⁺. Accordingly, we assessed the contribution of EPC to the pathogenic processes of vasculopathy and lung fibrosis in SSc-ILD⁺.

Our study found a relevant role of EPC in the vasculopathy process of SSc-ILD⁺. In particular, we found an increase in EPC production and mobilization into the systemic circulation in SSc-ILD⁺ patients, since a higher EPC frequency was found in these patients when compared to HC. This difference remained significant when SSc-ILD⁺ patients were stratified into early and late disease duration. Given that endothelial injury and insufficient endothelial repair are strong contributors to the vasculopathy underlying SSc-ILD⁺, we hypothesize that EPC are increasing in peripheral blood to be recruited at the sites of vascular damage and to exert their reparative function as a compensatory mechanism. This finding is consistent with a previous result of our group from a study performed in RA-ILD⁺ patients [7]. Likewise, other groups demonstrated an increase in circulating EPC in SSc patients in relation to HC [14–16,20,26–28,30], mainly in the early stage of the disease [14,20,26–28]. In keeping with this, our study showed significantly greater EPC frequencies in early SSc-ILD⁻ patients than HC, unlike late SSc-ILD⁻ patients. The latter may explain the lack of statistically significant difference between HC and SSc-ILD⁻ patients, regardless of SSc duration. We also observed an increase in EPC frequency in IPF patients in relation to HC, as described in a previous work [6], further supporting the compensatory mechanism of these cells.

Interestingly, an increase in EPC linked to the presence and severity of ILD was found in our study. According to this, patients with SSc-ILD⁺ exhibited a higher EPC frequency than those patients with SSc-ILD⁻ who did not present lung disease. Notably, the greatest EPC frequencies were found in IPF patients, who experience the most aggressive form of ILD. This behavior of EPC is similar to that observed in our previous work, in which we showed that the degree of EPC frequency may help to identify the presence of ILD in RA patients [7]. Therefore, although the exact mechanism responsible for these findings is not clear, it can be speculated that it may be associated with an enhancement of EPC production in response to the lung fibrotic process and, consequently, to the presence of ILD in patients with autoimmune diseases. In favor of this suggestion, previous reports in SSc indicated an association of EPC with lung involvement [15,16]. Our results further support the idea that EPC frequency may be considered as a useful complementary tool to identify the presence of ILD in SSc patients, mirroring the severity of SSc disease.

It is known that several factors influence the development of SSc-ILD⁺, including shorter disease duration and male sex [9,11]. Notably, our results revealed an inverse correlation of EPC frequency with SSc disease duration in SSc-ILD⁺ patients, as reported in SSc by different authors [16,20,25,34]. It is conceivable that the decrease in EPC in patients with long-standing disease is related to the recruitment of such cells into damaged tissues, leading to a decrease in circulating EPC. Furthermore, we found a higher frequency of EPC in men, which seems to be expected considering that the male sex is a known SSc-ILD⁺ risk factor. Nevertheless, no further association was found between EPC and demographic or disease features in SSc-ILD⁺ patients or in SSc-ILD⁻ and IPF patients. In agreement with this, previous reports showed a lack of association of EPC with PFTs and smoking status in IPF patients [37], as well as with age, inflammation markers, antibodies status, and PH presence in SSc patients [14,19,24,25,27].

In conclusion, our findings provide evidence for a potential role of EPC in the pathogenic processes of vasculopathy and lung fibrosis in SSc-ILD⁺. Interestingly, EPC frequency may be considered a promising marker for vascular damage and disease progression, particularly regarding the presence of ILD in patients with SSc.

Supplementary Materials: The following is available online at https://www.mdpi.com/article/10 .3390/biomedicines9070847/s1, Table S1: Differences in EPC frequency between SSc-ILD⁺ patients and the three comparative groups (healthy controls, SSc-ILD⁻ and IPF patients).

Author Contributions: Conceptualization, formal analysis, methodology, visualization, writing original draft, and writing—review and editing: V.P.-C., S.R.-M., F.G.; data curation and investigation: V.P.-C., S.R.-M., F.G., B.A.-M., V.M.M.-C., D.I.-F., L.L.-G., R.P.-F., D.P.-P., V.P., R.B., A.C., O.G., J.M.C.; project administration, supervision, and writing—review and editing: R.L.-M., M.A.G.-G. All authors have contributed significantly to the article. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: V.P.-C. is supported by a pre-doctoral grant from IDIVAL [PREVAL 18/01]. S.R.-M. is supported by funds from the RETICS Program [RD16/0012/0009, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), co-funded by the European Regional Development Fund (ERDF)]. B.A.-M. is a recipient of a 'López Albo' Post-Residency Programme funded by Servicio Cántabro de Salud. L.L.-G. is supported by funds from INNVAL20/06 (IDIVAL). R.P.-F. is supported by funds from the START project [FOREUM18/34]. O.G. is staff personnel of Xunta de Galicia (Servizo Galego de Saude (SERGAS) through a research-staff stabilization contract (ISCIII/SERGAS), and his work is funded by ISCIII and the ERDF [grants RD16/0012/0014 (RIER) and PI17/00409]. He is a beneficiary of project funds from the Research Executive Agency (REA) of the European Union in the framework of MSCA-RISE Action of the H2020 Programme, project 734899—Olive-Net. R.L.-M. is a recipient of a Miguel Servet type I fellowship [ISCIII, co-funded by the European Social Fund, 'Investing in your future', CP16/00033].

Institutional Review Board Statement: All subjects gave their informed consent to be included in the study. The procedures followed were in accordance with the ethical standards of the approved guidelines and regulations, in accordance with the Declaration of Helsinki. All experimental protocols were approved by the Ethics Committee of Clinical Research of Cantabria, Spain (2016.092).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

Acknowledgments: We thank all subjects that participated in this study.

Conflicts of Interest: The authors declare no competing interest related to this study. The results of this work were partially presented at the EULAR 2021 Virtual Congress (abstract no. AB0094) (View Abstract and Citation Information Online https://ard.bmj.com/content/80/Suppl_1/1076.1.full (accessed on 25 June 2021)).

References

- 1. Asahara, T.; Toyoaki, M.; Sullivan, A.; Silver, M.; Van der Zee, R.; Li, T.; Witzenbichler, B.; Schatteman, G.; Isner, J.M. Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis. *Sci. New Ser.* **1997**, 275, 964–967. [CrossRef] [PubMed]
- 2. Khakoo, A.Y.; Finkel, T. Endothelial Progenitor Cells. Annu. Rev. Med. 2005, 56, 79–101. [CrossRef]
- 3. Fadini, G.P.; Baesso, I.; Albiero, M.; Sartore, S.; Agostini, C.; Avogaro, A. Technical notes on endothelial progenitor cells: Ways to escape from the knowledge plateau. *Atherosclerosis* **2008**, *197*, 496–503. [CrossRef]
- 4. Ferrante, A.; Guggino, G.; Di Liberto, D.; Ciccia, F.; Cipriani, P.; Balistreri, C.R.; Sireci, G.; Giacomelli, R.; Triolo, G. Endothelial progenitor cells: Are they displaying a function in autoimmune disorders? *Mech. Ageing Dev.* **2016**, *159*, 44–48. [CrossRef]
- Distler, H.W.; Beyer, C.; Schett, G.; Luscher, T.F.; Gay, S.; Distler, O. Endothelial Progenitor Cells Novel Players in the Pathogenesis of Rheumatic Diseases. *Arthritis Rheum.* 2009, 60, 3168–3179. [CrossRef]
- De Biasi, S.; Cerri, S.; Bianchini, E.; Gibellini, L.; Persiani, E.; Montanari, G.; Luppi, F.; Carbonelli, C.M.; Zucchi, L.; Bocchino, M.; et al. Levels of circulating endothelial cells are low in idiopathic pulmonary fibrosis and are further reduced by anti-fibrotic treatments. *BMC Med.* 2015, *13*, 277. [CrossRef] [PubMed]
- Pulito-Cueto, V.; Remuzgo-Martínez, S.; Genre, F.; Mora-Cuesta, V.M.; Iturbe-Fernández, D.; Fernández-Rozas, S.; Atienza-Mateo, B.; Lera-Gómez, L.; Alonso-Lecue, P.; Rodríguez-Carrio, J.; et al. Endothelial Progenitor Cells as a Potential Biomarker in Interstitial Lung Disease Associated with Rheumatoid Arthritis. *J. Clin. Med.* 2020, *9*, 4098. [CrossRef]
- Arias-Nuñez, M.C.; Llorca, J.; Vazquez-Rodriguez, T.R.; Gomez-Acebo, I.; Miranda-Filloy, J.A.; Martin, J.; Gonzalez-Juanatey, C.; Gonzalez-Gay, M.A. Systemic sclerosis in northwestern Spain: A 19-year epidemiologic study. *Medicine* 2008, *87*, 272–280. [CrossRef]
- 9. Khanna, D.; Tashkin, D.P.; Denton, C.P.; Renzoni, E.A.; Desai, S.R.; Varga, J. Etiology, Risk Factors, and Biomarkers in Systemic Sclerosis with Interstitial Lung Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2020**, *201*, 650–660. [CrossRef] [PubMed]
- Distler, O.; Assassi, S.; Cottin, V.; Cutolo, M.; Danoff, S.K.; Denton, C.P.; Distler, J.H.W.; Hoffmann-Vold, A.; Johnson, S.R.; Ladner, U.M.; et al. Predictors of progression in systemic sclerosis patients with interstitial lung disease. *Eur. Respir. J.* 2020, 55, 1902026. [CrossRef] [PubMed]
- 11. Cottin, V.; Brown, K.K. Interstitial lung disease associated with systemic sclerosis (SSc-ILD). *Respir. Res.* 2019, 20, 13. [CrossRef] [PubMed]
- 12. Fischer, A.; Patel, N.M.; Volkmann, E.R. Interstitial Lung Disease in Systemic Sclerosis: Focus on Early Detection and Intervention. *Open Access Rheumatol.* **2019**, *11*, 283–307. [CrossRef] [PubMed]
- 13. Kuwana, M.; Okazaki, Y.; Yasuoka, H.; Kawakami, Y.; Ikeda, Y. Defective vasculogenesis in systemic sclerosis. *Lancet* 2004, 364, 603–610. [CrossRef]
- 14. Allanore, Y.; Batteux, F.; Avouac, J.; Assous, N.; Weill, B.; Kahan, A. Levels of circulating endothelial progenitor cells in systemic sclerosis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2007, 25, 60–66. [PubMed]
- 15. Benyamine, A.; Magalon, J.; Cointe, S.; Lacroix, R.; Arnaud, L.; Bardin, N.; Rossi, P.; Francès, Y.; Bernard-Guervilly, F.; Kaplanski, G.; et al. Increased serum levels of fractalkine and progenitor cells in systemic sclerosis. *Arthritis Res. Ther.* **2017**, *19*, 60. [CrossRef] [PubMed]
- Brunasso, A.M.G.; Massone, C. Update on the pathogenesis of Scleroderma: Focus on circulating progenitor cells. *F1000Research* 2016, 5, F1000. [CrossRef]
- Campioni, D.; Lo Monaco, A.; Lanza, F.; Moretti, S.; Ferrari, L.; Fotinidi, M.; La Corte, R.; Cuneo, A.; Trotta, F. CXCR4 pos circulating progenitor cells coexpressing monocytic and endothelial markers correlating with fibrotic clinical features are present in the peripheral blood of patients affected by systemic sclerosis. *Haematologica* 2008, 93, 1233–1237. [CrossRef]
- Yamaguchi, Y.; Kuwana, M. Proangiogenic hematopoietic cells of monocytic origin: Roles in vascular regeneration and pathogenic processes of systemic sclerosis. *Histol. Histopathol.* 2013, 28, 175–183. [CrossRef]
- Zhu, S.; Evans, S.; Yan, B.; Povsic, T.J.; Tapson, V.; Goldschmidt-Clermont, P.J.; Dong, C. Transcriptional Regulation of Bim by FOXO3a and Akt Mediates Scleroderma Serum–Induced Apoptosis in endothelial progenitor cells. *Circulation* 2008, 118, 2156–2165. [CrossRef]
- Nevskaya, T.; Bykovskaia, S.; Lyssuk, E.; Shakhov, I.; Zaprjagaeva, M.; Mach, E.; Ananieva, L.; Guseva, N.; Nassonov, E. Circulating endothelial progenitor cells in systemic sclerosis: Relation to impaired angiogenesis and cardiovascular manifestations. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2008, 26, 421–429.
- Patschan, S.; Tampe, D.; Müller, C.; Seitz, C.; Herink, C.; Müller, G.A.; Zeisberg, E.; Henze, E.; Patschan, D. Early Endothelial Progenitor Cells (eEPCs) in systemic sclerosis (SSc)-dynamics of cellular regeneration and mesenchymal transdifferentiation. BMC Musculoskelet. Disord. 2016, 12, 339. [CrossRef]
- Shirai, Y.; Okazaki, Y.; Inoue, Y.; Tamura, Y.; Yasuoka, H.; Takeuchi, T.; Kuwana, M. Elevated Levels of Pentraxin 3 in Systemic Sclerosis Associations With Vascular Manifestations and Defective Vasculogenesis. *Arthritis Rheumatol.* 2015, 67, 498–507. [CrossRef]

- Kuwana, M.; Okazaki, Y. Quantification of circulating endothelial progenitor cells in systemic sclerosis: A direct comparison of protocols. Ann. Rheum. Dis. 2012, 71, 617–620. [CrossRef]
- 24. Andrigueti, F.V.; Arismendi, M.I.; Ebbing, P.C.C.; Kayser, C. Decreased numbers of endothelial progenitor cells in patients in the early stages of systemic sclerosis. *Microvasc. Res.* 2015, *98*, 82–87. [CrossRef]
- 25. Mok, M.Y.; Yiu, K.H.; Wong, C.Y.; Qiuwaxi, J.; Lai, W.H.; Wong, W.S.; Tse, H.F.; Lau, C.S. Low circulating level of CD133 + KDR + cells in patients with systemic sclerosis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **2010**, *28*, S19–S25.
- 26. Avouac, J.; Juin, F.; Wipff, J.; Couraud, P.O.; Chiocchia, G.; Kahan, A.; Boileau, C.; Uzan, G.; Allanore, Y. Circulating endothelial progenitor cells in systemic sclerosis: Association with disease severity. *Ann. Rheum. Dis.* **2008**, *67*, 1455–1460. [CrossRef]
- 27. Del Papa, N.; Quirici, N.; Soligo, D.; Scavullo, C.; Cortiana, M.; Borsotti, C.; Maglione, W.; Comina, D.P.; Vitali, C.; Fraticelli, P. Bone Marrow Endothelial Progenitors Are Defective in Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheum.* **2006**, *54*, 2605–2615. [CrossRef]
- Del Papa, N.; Colombo, G.; Fracchiolla, N.; Moronetti, L.M.; Ingegnoli, F.; Maglione, W.; Comina, D.P.; Vitali, C.; Fantini, F.; Cortelezzi, A. Circulating Endothelial Cells as a Marker of Ongoing Vascular Disease in Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2004, 50, 1296–1304. [CrossRef] [PubMed]
- 29. Avouac, J.; Meune, C.; Ruiz, B.; Couraud, P.O.; Uzan, G.; Boileau, C.; Kahan, A.; Chiocchia, G.; Allanore, Y. Angiogenic biomarkers predict the occurrence of digital ulcers in systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* **2011**, *71*, 394–399. [CrossRef] [PubMed]
- Avouac, J.; Valluci, M.; Smith, V.; Senet, P.; Ruiz, B.; Sulli, A.; Pizzorni, C.; Frances, C.; Chiocchia, G.; Cutolo, M.; et al. Correlations between angiogenic factors and capillaroscopic patterns in systemic sclerosis. *Arthritis Res. Ther.* 2013, 15, R55. [CrossRef] [PubMed]
- Van Den Hoogen, F.; Khanna, D.; Fransen, J.; Johnson, S.R.; Baron, M.; Tyndall, A.; Matucci-Cerinic, M.; Naden, R.P.; Medsger, T.A., Jr.; Carreira, P.E.; et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: An American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2013, 65, 2737–2747, Also puplished in *Ann. Rheum. Dis.* 2013, 72, 1747–1755. [CrossRef]
- Travis, W.D.; Costabel, U.; Hansell, D.M.; King, T.E., Jr.; Lynch, D.A.; Nicholson, A.G.; Ryerson, C.J.; Ryu, J.H.; Selman, M.; Wells, A.U.; 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, 733–748. [CrossRef] [PubMed]
- Lynch, D.A.; Sverzellati, N.; Travis, W.D.; Brown, K.K.; Colby, T.V.; Galvin, J.R.; Goldin, J.G.; Hansell, D.M.; Inoue, Y.; Johkoh, T.; et al. Diagnostic criteria for idiopathic pulmonary fibrosis: A Fleischner Society White Paper. *Lancet Respir. Med.* 2018, 6, 138–153. [CrossRef]
- Distler, J.H.W.; Allanore, Y.; Avouac, J.; Giacomelli, R.; Guiducci, S.; Moritz, F.; Akhmetshina, A.; Walker, U.A.; Gabrielli, A.; Müller-Ladner, U.; et al. EULAR Scleroderma Trials and Research group statement and recommendations on endothelial precursor cells EUSTAR statement and recommendations on endothelial precursor cells. *Ann. Rheum. Dis.* 2009, *68*, 163–168. [CrossRef] [PubMed]
- 35. Schmidt-Lucke, C.; Fichtlscherer, S.; Aicher, A.; Tschöpe, C.; Schultheiss, H.; Zeiher, A.M.; Dimmeler, S. Quantification of Circulating Endothelial Progenitor Cells Using the Modified ISHAGE Protocol. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e13790. [CrossRef]
- Van Craenenbroeck, E.M.; Van Craenenbroeck, A.H.; Van Ierssel, S.; Bruyndonckx, L.; Hoymans, V.Y.; Vrints, C.J.; Conraads, V.M. Quantification of circulating CD34+/KDR+/CD45 dim endothelial progenitor cells: Analytical considerations. *Int. J. Cardiol.* 2013, 167, 1688–1695. [CrossRef]
- Smajda, D.M.; Mauge, L.; Nunes, H.; D'Audigier, C.; Juvin, K.; Borie, R.; Carton, Z.; Bertil, S.; Blanchard, A.; Crestani, B.; et al. Imbalance of circulating endothelial cells and progenitors in idiopathic pulmonary fibrosis. *Angiogenesis* 2013, 16, 147–157. [CrossRef]



Article

Endothelial progenitor cells: relevant players in the vasculopathy and lung fibrosis associated with the presence of interstitial lung disease in systemic sclerosis patients

Verónica Pulito-Cueto^{1*}, Sara Remuzgo-Martínez^{1*}, Fernanda Genre^{1*}, Belén Atienza-Mateo^{1,2,3}, Víctor M. Mora-Cuesta^{1,4}, David Iturbe-Fernández^{1,4}, Leticia Lera-Gómez¹, Raquel Pérez-Fernández¹, Diana Prieto-Peña^{1,3}, Virginia Portilla^{1,3}, Ricardo Blanco^{1,3}, Alfonso Corrales^{1,3}, Oreste Gualillo⁵, José M. Cifrián^{1,4,6}, Raquel López-Mejías^{1**} and Miguel A. González-Gay^{1,3,6,7**}

Supplementary Table S1. Differences of EPC frequency between SSc-ILD⁺ patients and the three comparative groups (healthy controls, SSc-ILD⁻ and IPF patients).

	EPC frequency (Mean \pm SD)	р
SSc-ILD ⁺ patients vs healthy controls	0.033 ± 0.012 vs 0.013 ± 0.010	< 0.001
SSc-ILD ⁺ patients vs SSc-ILD ⁻ patients	0.033 ± 0.012 vs 0.021 ± 0.017	0.012
SSc-ILD ⁺ patients vs IPF patients	$0.033 \pm 0.012 \text{ vs} \ 0.087 \pm 0.041$	< 0.001

EPC: endothelial progenitor cells; SSc: systemic sclerosis; ILD: interstitial lung disease; IPF: idiopathic pulmonary fibrosis; SD: standard deviation. Significant results are highlighted in **bold**.



Article



Angiogenic T Cells: Potential Biomarkers for the Early Diagnosis of Interstitial Lung Disease in Autoimmune Diseases?

Verónica Pulito-Cueto ^{1,†}, Sara Remuzgo-Martínez ^{1,†}, Fernanda Genre ^{1,†}, Belén Atienza-Mateo ^{1,2}, Víctor M. Mora-Cuesta ^{1,3}, David Iturbe-Fernández ^{1,3}, Leticia Lera-Gómez ¹, Javier Rodriguez-Carrio ⁴, Diana Prieto-Peña ^{1,2}, Virginia Portilla ^{1,2}, Ricardo Blanco ^{1,2}, Alfonso Corrales ^{1,2}, Oreste Gualillo ⁵, José M. Cifrián ^{1,3,6}, Raquel López-Mejías ^{1,*,‡} and Miguel A. González-Gay ^{1,2,7,8,*,‡}

- ¹ Research Group on Genetic Epidemiology and Atherosclerosis in Systemic Diseases and in Metabolic Bone Diseases of the Musculoskeletal System, IDIVAL, 39011 Santander, Spain; veronica_pulito_cueto@hotmail.com (V.P.-C.); sara.r.mtz@gmail.com (S.R.-M.); fernandagenre@gmail.com (F.G.); mateoatienzabelen@gmail.com (B.A.-M.); victormanuel.mora@scsalud.es (V.M.M.-C.); diturfer@gmail.com (D.I.-F.); letizialera@hotmail.com (L.L.-G.); diana.prieto.pena@gmail.com (D.P.-P.); virgiportilla@hotmail.com (V.P.); ricardo.blanco@scsalud.es (R.B.); afcorralesm@hotmail.com (A.C.); josemanuel.cifrian@scsalud.es (J.M.C.)
- ² Department of Rheumatology, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, 39008 Santander, Spain
- ³ Department of Pneumology, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, 39008 Santander, Spain
- Department of Functional Biology, Immunology Area, Faculty of Medicine, Universidad de Oviedo, 33006 Oviedo, Spain; javiercarrio@hotmail.com
- ⁵ SERGAS (Servizo Galego de Saude) and IDIS (Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago), NEIRID Lab. (Neuroendocrine Interactions in Rheumatology and Inflammatory Diseases), Research Laboratory 9, Santiago University Clinical Hospital, 15706 Santiago de Compostela, Spain; orestegualillo@gmail.com
- School of Medicine, Universidad de Cantabria, 39011 Santander, Spain
- ⁷ Department of Medicine and Psychiatry, Universidad de Cantabria, 39011Santander, Spain
- ⁸ Cardiovascular Pathophysiology and Genomics Research Unit, School of Physiology, Faculty of Health Sciences, University of the Witwatersrand, Johannesburg 2050, South Africa
- Correspondence: rlopezmejias78@gmail.com (R.L.-M.); miguelaggay@hotmail.com (M.A.G.-G.); Tel.: +34-942-315-515; Fax: +34-942-31-55-17
- + These authors contributed equally to this work.
- ‡ These authors share senior authorship.

Abstract: (1) Background: We explored, for the first time, the contribution of angiogenic T cells (TAng) in interstitial lung disease associated to autoimmune disease (AD-ILD⁺) as potential biomarkers of the disease, evaluating their role in the underlying vasculopathy and lung fibrosis. Additionally, the relationship of TAng with clinical manifestations and cellular and molecular endothelial dysfunction-related biomarkers was assessed. (2) Methods: We included 57 AD-ILD⁺ patients (21 with rheumatoid arthritis (RA)-ILD⁺, 21 with systemic sclerosis (SSc)-ILD⁺ and 15 with other AD-ILD⁺) and three comparative groups: 45 AD-ILD⁻ patients (25 RA-ILD⁻ and 20 SSc-ILD⁻); 21 idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) patients; 21 healthy controls (HC). TAng were considered as CD3⁺CD184⁺CD31⁺ by flow cytometry. (3) Results: A similar TAng frequency was found between AD-ILD⁺ and IPF, being in both cases lower than that observed in AD-ILD⁻ and HC. A lower TAng frequency was associated with negative Scl-70 status and lower FEV1/FVC ratio in SSc-ILD⁺, as well as with men in RA-ILD⁺ and non-specific interstitial pneumonia radiological pattern in other AD-ILD⁺. No relationship between TAng and endothelial progenitor cells, endothelial cells and vascular endothelial growth factor gene expression and protein levels was disclosed. (4) Conclusions: Our findings suggest TAng as potential biomarkers for the early diagnosis of ILD in AD.

Keywords: angiogenic T cells; autoimmune disease; interstitial lung disease; systemic sclerosis; rheumatoid arthritis; biomarkers

Citation: Pulito-Cueto, V.; Remuzgo-Martínez, S.; Genre, F.; Atienza-Mateo, B.; Mora-Cuesta, V.M.; Iturbe-Fernández, D.; Lera-Gómez, L.; Rodriguez-Carrio, J.; Prieto-Peña, D.; Portilla, V.; et al. Angiogenic T Cells: Potential Biomarkers for the Early Diagnosis of Interstitial Lung Disease in Autoimmune Diseases? *Biomedicines* 2022, 10, 851. https://doi.org/10.3390/ biomedicines10040851

Academic Editor: Shaker A. Mousa

Received: 11 March 2022 Accepted: 4 April 2022 Published: 5 April 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Interstitial lung disease (ILD) is a common and potentially life-threatening complication in patients with autoimmune diseases (AD), mainly in those with systemic sclerosis (SSc) and rheumatoid arthritis (RA) [1–5]. Early diagnosis of AD-ILD⁺ is sometimes challenging due to the potential absence of symptoms in early or mild disease and the similarity of radiological features with other entities involving the lung [1–6]. Currently, there is no established protocol to evaluate these patients, although several studies highlight the need for careful follow-up of these patients with both pulmonary function tests (PFTs) and high-resolution computed tomography (HRCT) [1–7]. In this sense, the early detection of pulmonary involvement is crucial to start an appropriate therapy and to avoid an irreversible damage to the lung in these patients [1–5,7,8]. A large body of evidence suggests that an impairment of vascular endothelium is a characteristic hallmark of the initial phase in these inflammatory diseases, ultimately resulting in a constitutive activation of fibroblasts in various organs, predominantly in the lung, leading to pulmonary fibrosis. In fact, the damage of the pulmonary endothelium has been described as one of the early key stages for the development of pulmonary lesions and the subsequent onset and progression of ILD in AD. However, the mechanisms underlying endothelial cell damage and defective repair remain incompletely understood in AD-ILD⁺ [1,3,9–13]. Endothelial progenitor cells (EPC) and endothelial cells (EC) are key cellular effectors in the homeostasis of the physiologic vascular network, and they have been described as an essential element of the endogenous vascular repair machinery in AD [14-16]. In this regard, we recently proposed EPC as biomarkers to identify the presence of ILD in patients with RA and SSc [14,15]. Moreover, it has been reported that a circulating cell population showing both M1 and M2 monocyte/macrophage surface markers characterizes SSc patients with lung involvement [17].

It has been described that a specific T cell population termed angiogenic T cells (TAng) cooperate with EPC in the endothelial repair function [18]. Since then, several studies have supported the notion that TAng promote the formation of new blood vessels and enhance the repair of damaged endothelium [9,18–27]. Furthermore, TAng exhibit a vasculogenic phenotype characterized by enhanced endothelial proliferation and may function by cell contact-dependent and paracrine mechanisms [9,18,28,29]. Specifically, TAng secrete a wide array of proangiogenic factors that have been implicated in AD-related angiogenic disturbances such as vascular endothelial growth factor (VEGF) [9,18,28,29]. Moreover, it has been demonstrated that TAng have migratory capacity towards the angiogenic chemoattractant VEGF secreted by injured endothelium [28,30]. Interestingly, altered TAng frequencies have been linked to RA [20,23,24], SSc [9,19], or to other AD [22,23,25–27]. Nevertheless, information on their role in the development of ILD in AD patients is scarce.

It has become apparent that the scarcity of useful markers for the early diagnosis of AD-ILD⁺ remains a problem that needs to be solved [1,2,4,8]. With respect to this, TAng may have an important role as biomarkers of endothelial damage in AD-ILD⁺. Accordingly, the main objective of this study was to determine, for the first time, the contribution of TAng in the pathogenesis of AD-ILD⁺ as potential biomarkers of the disease. For this purpose, we evaluated the role of TAng in the underlying vasculopathy of patients with AD-ILD⁺ and in the presence of lung fibrosis in these patients. Additionally, we also aimed to assess the relationship of TAng with AD-ILD⁺ clinical manifestations and endothelial dysfunction-related biomarkers at the cellular (EPC, CE) and molecular (*VEGF* mRNA expression and VEGF protein) level.

2. Materials and Methods

2.1. Study Population

Peripheral venous blood was collected from a total of 144 individuals. Specifically, 57 patients with AD-ILD⁺ were recruited: 21 with RA-ILD⁺, 21 with SSc-ILD⁺ and 15 with other AD-ILD⁺. Moreover, to assess the role of TAng in AD-ILD⁺, we recruited different comparative groups. A group of AD-ILD⁻ patients (n = 45) composed of 25 RA-ILD⁻ and 20 SSc-ILD⁻,

another group of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) patients (n = 21), and 21 healthy controls (HC). Both patients and HC were recruited from the departments of Pneumology and Rheumatology of Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander, Spain).

Patients with AD had an underlying vasculopathy (clinically evident or not) and met the criteria established by the ACR/EULAR for the classification and diagnosis of each AD [31,32]. Pulmonary involvement was assessed in all the patients by HRCT images of the chest and PFTs. AD-ILD⁻ patients lacked lung involvement, whereas those with AD-ILD⁺ fulfilled the ATS/ERS criteria for ILD [33]. IPF patients fulfilled the ATS/ERS criteria [33]. HRCT patterns of ILD patients were stratified according to the criteria for usual interstitial pneumonia (UIP) pattern of the Fleischner Society [34]. Additionally, in SSc and IPF patients, pulmonary hypertension (PH) was diagnosed by transthoracic echocardiogram.

Demographic and clinical features of patients including sex, age, smoking history, duration of disease, PFTs, pulmonary involvement on HRCT and HRCT pattern, among others, were collected. The main characteristics of all the patients of the study group (RA-ILD⁺, SSc-ILD⁺ and other AD-ILD⁺) and the comparative groups (RA-ILD⁻, SSc-ILD⁻, IPF patients) are shown in Table 1. Furthermore, PH and other clinical manifestations of SSc patients were described in Table S1. HC did not present any history of autoimmune or lung diseases. Additionally, their mean age \pm standard deviation (SD) was 41.2 \pm 12.5 years, 33.3% of them were women, and 31.3 % were smokers.

All patients and HC gave their written informed consent to be included in the study. The procedures followed were in accordance with the ethical standards of the approved guidelines and regulations, according to the Declaration of Helsinki. The Ethics Committee of clinical research of Cantabria, Spain (2016.092) approved all experimental protocols.

	Study Objective Groups		Comparative Groups			
_	RA-ILD⁺	SSc-ILD⁺	Other AD-ILD ⁺	RA-ILD-	SSc-ILD⁻	IPF
	<i>n</i> = 21	<i>n</i> = 21	<i>n</i> = 15	<i>n</i> = 25	<i>n</i> = 20	n = 21
Sex (women), <i>n</i> (%)	9 (45.9)	13 (61.9)	5 (33.3)	15 (60.0)	18 (90.0)	7 (33.3)
Age at study, mean ± SD, years	66.5 ± 10.1	60.3 ± 7.0	62.0 ± 10.1	60.1 ± 11.8	56.6 ± 15.4	69.2 ± 10.0
Smoking ever, n (%)	13 (65.0)	11 (52.4)	11 (73.3)	13 (52.0)	11 (55.0)	16 (76.2)
Pulmonary function tests						
FVC (% predicted), mean ± SD	95.2 ± 24.1	88.4 ± 27.1	88.3 ± 28.8	99.2 ± 16.0	106.6 ± 15.9	84.9 ± 14.7
FEV1 (% predicted), mean ± SD	92.2 ± 21.0	87.3 ± 25.6	88.7 ± 27.6	94.9 ± 22.0	101.9 ± 17.8	87.3 ± 19.6
FEV1/FVC (% predicted), mean ± SD	77.8 ± 9.1	79.7 ± 5.5	79.7 ± 4.6	93.6 ± 12.3	79.2 ± 9.9	79.7 ± 7.8
DLCO (% predicted), mean ± SD	43.3 ± 15.9	47.5 ± 19.5	44.6 ± 14.6	79.9 ± 20.0	71.5 ± 15.3	43.6 ± 18.4
HRCT						
Pulmonary involvement on HRCT	21 (100.0)	21 (100.0)	15 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	21 (100.0)
UIP pattern, n (%)	11 (52.4)	3 (14.3)	4 (26.7)	-	-	21 (100.0)
Probable UIP pattern, <i>n</i> (%)	2 (9.5)	3 (14.3)	5 (33.3)	-	-	0 (0.0)
NSIP pattern, n (%)	7 (33.3)	14 (66.7)	6 (40.0)	-	-	0 (0.0)
Non-NSIP pattern, n (%)	1 (4.8)	1 (4.7)	0 (0.0)	-	-	0 (0.0)
Received therapies						
csDMARDs n (%)	17 (81.0)	16 (76.2)	2 (13.3)	13 (52)	12 (60.0)	0 (0.0)
bDMARDs, <i>n</i> (%)	15 (71.4)	7 (33.3)	3 (20.0)	2 (8)	2 (10.0)	0 (0.0)
Antifibrotic drugs, <i>n</i> (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	9 (42.9)

Table 1. Main characteristics of all the patients of the study objective groups and the comparative groups.

RA: rheumatoid arthritis; ILD: interstitial lung disease; SSc: systemic sclerosis; AD: autoimmune disease; IPF: idiopathic pulmonary fibrosis; SD: standard deviation; FVC: forced vital capacity; FEV1: forced expiratory volume in one second; DLCO: diffusing capacity of the lung for carbon monoxide; HRCT: high resolution computed tomography; UIP: usual interstitial pneumonia; NSIP: non-specific interstitial pneumonia; csDMARDs: conventional synthetic disease-modifying anti-rheumatic drugs; bDMARDs: biologic disease-modifying anti-rheumatic drugs.

2.2. Cell Quantification by Flow Cytometry

TAng quantification was analyzed by direct flow cytometry following a method previously described [24]. Briefly, cells obtained from 200 μ L of peripheral blood were labelled with VioBlue-conjugated anti-CD3 (Miltenyi Biotec, Madrid, Spain), APC-conjugated anti-CD184 (Miltenyi Biotec, Madrid, Spain) and PE-conjugated anti-CD31 (Miltenyi Biotec, Madrid, Spain) monoclonal antibodies. In a further step, incubation with FACS lysing solution (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) was performed to lyse red blood cells. After obtaining the white cell pellets, two washes with PBS were carried out. Finally, a CytoFLEX flow cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) and the Cytexpert 2.3 analyzer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) were used to assess the labeled cells, acquiring approximately 3 × 10⁴ events per sample. CD3⁺ cells were gated and then assayed for the expression of CD184 and CD31 in the lymphocyte gate. TAng were considered as triple-positive for CD3, CD184 and CD31 (Figure S1) and expressed as percentage of cells in the lymphocyte gate.

EPC and EC frequencies were measured by flow cytometry following the method previously described [14,15]. EPC were considered as CD34⁺, CD45^{low}, CD133⁺ and CD309⁺ cells and EC were defined as triple-negative for CD34, CD45 and CD133 and positive for CD309, following the nomenclature previously defined [14,15].

2.3. VEGF mRNA Expression

Total RNA was isolated from peripheral blood by a commercial RNA extraction kit (NucleoSpin RNA Blood Kit, Macherey-Nagel, Neumann-Neander-Str., Düren, Germany). The complementary DNA (cDNA) was obtained using iScript[™] Advanced cDNA Synthesis Kit for reverse transcription-quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) (Bio-Rad, Madrid, Spain). qPCR was performed in the thermocycler QuantStudio[™] 7 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using SsoAdvanced[™] Universal SYBR[®] Green Supermix (Bio-Rad, Madrid, Spain). All samples were assayed in duplicate and experimental control assays were included. The relative *VEGF* mRNA expression was analyzed by the comparative Ct method using GAPDH as housekeeping gene.

2.4. VEGF Serum Levels Determination

VEGF levels were measured in serum samples by a commercial quantitative colorimetric sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (Reddot Biotech Inc., Kelowna, BC, Canada) as previously described [35].

2.5. Statistical Analyses

Data were reported as the number of individuals (n) and percentage (%) or mean \pm SD depending on the type of data. Differences in TAng frequencies between two study groups were calculated and compared by Student's *t*-test. To evaluate the implication of TAng in the underlying vasculopathy, we compared all patients with HC, while their role in fibrosis was analyzed by comparing patients with AD-ILD⁺, patients with AD-ILD⁻ and patients with IPF. Estimation of the Pearson's correlation coefficient (r) was used to assess the relationship of TAng frequency with continuous variables. To evaluate the association of TAng frequency with categorical variables, we employed one-way ANOVA. Statistical significance was defined as *p*-values < 0.05. STATA statistical software 12/SE (Stata Corp., College Station, TX, USA) was used to perform all statistical analysis.

3. Results

3.1. TAng Play a Role in the Pathogenesis of AD-ILD+

First, we studied the role of TAng in the vasculopathy in AD-ILD⁺. Patients with AD-ILD⁺ showed a significantly lower frequency of TAng than HC (11.560 ± 5.242 vs. 16.500 ± 4.830, p < 0.001, Figure 1a and Table S2). It was also the case when IPF patients were compared with HC (11.340 ± 3.732 vs. 16.500 ± 4.830, p < 0.001, Figure 1a and Table S2). However, similar frequencies of TAng in patients with AD-ILD⁻ and HC were found (Figure

1a and Table S2). The same findings were seen when patients were stratified according to the underlying AD. In particular, frequencies of TAng were significantly decreased in patients with RA-ILD⁺ and SSc-ILD⁺ in relation to HC (11.950 ± 5.234 vs. 16.500 ± 4.830, p = 0.007 and 12.570 ± 5.052 vs. 16.500 ± 4.830, p = 0.016, respectively), unlike patients with RA-ILD⁻ and SSc-ILD⁻ who showed no differences with HC (Figure 1b,c and Table S2). Furthermore, patients with other AD-ILD⁺ displayed a lower frequency of TAng than HC (10.560 ± 6.684 vs. 16.500 ± 4.830, p = 0.005, Figure 1d and Table S2).

In a second step, we evaluated the implication of TAng in the presence of fibrosis in AD-ILD⁺. TAng frequencies were similar between patients with AD-ILD⁺ and those with IPF, while these frequencies were significantly lower in relation to those with AD-ILD⁻ (11.560 ± 5.242 vs. 15.920 ± 4.612, p < 0.001 and 11.340 ± 3.732 vs. 15.920 ± 4.612, p < 0.001, respectively, Figure 1a and Table S2). Specifically, patients with RA-ILD⁺ exhibited significantly lower TAng frequencies than those with RA-ILD⁻ (11.950 ± 5.234 vs. 16.400 ± 4.926, p = 0.006), but no differences were observed when they were compared to patients with IPF (Figure 1b and Table S2). Moreover, a significant increase in the frequency of TAng was seen in patients with RA-ILD⁻ when compared to those with IPF (16.400 ± 4.926 vs. 11.340 ± 3.732, p < 0.001, Figure 1c and Table S2). Patients with SSc-ILD⁺ and IPF had the same frequencies, which were significantly lower than those observed in patients with SSc-ILD⁻ (12.570 ± 5.052 vs. 16.070 ± 5.420, p = 0.044 and 11.340 ± 3.732 vs. 16.070 ± 5.420, p = 0.003, respectively, Figure 1c and Table S2). Likewise, TAng frequencies of patients with other AD-ILD⁺ were similar to the frequency of those with IPF (Figure 1d and Table S2).



Figure 1. Differences in the frequency of TAng between all the study groups. Differences between patients with AD-ILD⁺, AD-ILD⁻, IPF and HC (**a**); patients with RA-ILD⁺, RA-ILD⁻, IPF y HC (**b**); patients with SSc-ILD⁺, SSc-ILD⁻, IPF and HC (**c**); and patients with other AD-ILD⁺, IPF and HC (**d**). TAng: angiogenic T cells; AD: autoimmune disease; RA: rheumatoid arthritis; ILD: interstitial lung disease; SSc: systemic sclerosis; IPF: idiopathic pulmonary fibrosis; HC: healthy controls. The horizontal bars indicate the mean value of each study group. Significant results are highlighted in bold.

3.2. TAng Are Associated with Demographic and Clinical Features of RA-ILD⁺, SSc-ILD⁺ and Other AD-ILD⁺

Regarding RA-ILD⁺ patients, men had significantly lower TAng frequencies than women (9.75 ± 4.12 vs. 16.44 ± 5.97, p < 0.01, Table 2), though no relationship was disclosed between these cells and the duration of RA, C-reactive protein (CRP), erytrocyte sedimentation rate (ESR) or PFTs. No differences were found in the frequency of TAng when patients with RA-ILD⁺ were stratified according to smoking history, rheumatoid factor/anticyclic citrullinated peptide antibodies status or HRCT pattern (Table 2).

Variable	r	р	
Duration of RA (years)	-0.16	0.50	
CRP (mg/dL)	0.02	0.94	
ESR (mm/1st hour)	-0.18	0.44	
FVC (% predicted)	0.13	0.58	
FEV1 (% predicted)	0.18	0.43	
FEV1/FVC (% predicted)	0.18	0.44	
DLCO (% predicted)	0.15	0.62	
Category	Mean ± SD	р	
Men	9.75 ± 4.12	<0.01	
Women	16.44 ± 5.97		
Non-Smoker	15.50 ± 5.63	0.24	
Smoker	12.02 ± 5.86		
RF-	13.59 ± 3.29	0.79	
RF ⁺	12.52 ± 6.50		
UIP HRCT Pattern	12.40 ± 6.34		
NSIP HRCT Pattern	13.36 ± 6.55	0.76	

Table 2. Relationship of TAng frequency with characteristics of RA-ILD⁺ patients.

TAng: angiogenic T cells; RA: rheumatoid arthritis; ILD: interstitial lung disease; CRP: C-reactive protein; ESR: erythrocyte sedimentation rate; FVC: forced vital capacity; FEV1: forced expiratory volume in one second; DLCO: diffusing capacity of the lung for carbon monoxide; SD: standard deviation; RF: rheumatoid factor; UIP: usual interstitial pneumonia; HRCT: high resolution computed tomography; NSIP: non-specific interstitial pneumonia. Significant results are highlighted in **bold**.

With respect to SSc-ILD⁺ patients, a positive correlation between the frequency of TAng and the forced expiratory volume in one second (FEV1)/forced vital capacity (FVC) ratio was observed in these patients (r = 0.48; p = 0.03, Table 3). Anti-Scl70 negative SSc-ILD⁺ patients presented lower TAng frequencies compared to anti-Scl70 positive patients (10.30 ± 5.09 vs. 15.73, p = 0.03, Table 3). No significant relationship was found between the frequency of TAng and SSc duration, CRP or ESR (Table 3). The same results were obtained when SSc-ILD⁺ patients were stratified according to sex, smoking history, anti-nuclear antibodies/anti-centromere antibodies status, presence of pulmonary hypertension or HRCT pattern (Table 3).

In relation to patients with other AD-ILD⁺, differences in the frequency of TAng were found when these patients were stratified according to the HRCT pattern (Table 4). Specifically, patients who presented a NSIP pattern had lower TAng frequencies than those with an UIP pattern (6.43 ± 3.99 vs. 15.11 ± 7.69 , p = 0.03, Table 4). Nonetheless, no associations of PFTs with TAng were noted in these patients (Table 4). Similarly, we did not disclose an association with TAng frequency when these patients with other AD-ILD⁺ were analyzed according to sex or smoking history (Table 4).

Variable	r	р	
Duration of SSc disease (years)	0.04	0.86	
CRP (mg/dL)	0.31	0.22	
ESR (mm/1st hour)	-0.17	0.51	
FVC (% predicted)	-0.06	0.79	
FEV1 (% predicted)	-0.02	0.94	
FEV1/FVC (% predicted)	0.48	0.03	
DLCO (% predicted)	-0.06	0.77	
Category	Mean ± SD	p	
Men	10.30 ± 5.67	0.07	
Women	15.02 ± 5.25		
Non-Smoker	14.97 ± 5.20	0.19	
Smoker	11.64 ± 6.04		
ATA (Scl70) ⁻	10.30 ± 5.09	0.02	
ATA (Scl70)+	15.73 ± 5.44	0.03	
Non-Pulmonary hypertension	12.38 ± 6.08	0.37	
Pulmonary hypertension	15.86 ± 5.15		
NSIP HRCT Pattern	13.52 ± 6.61	0.70	
UIP HRCT Pattern	12.38 ± 4.28	0.70	

Table 3. Relationship of TAng frequency with characteristics of SSc-ILD⁺ patients.

TAng: angiogenic T cells; SSc: systemic sclerosis; ILD: interstitial lung disease; CRP: C-reactive protein; ESR: erythrocyte sedimentation rate; FVC: forced vital capacity; FEV1: forced expiratory volume in one second; DLCO: diffusing capacity of the lung for carbon monoxide; SD: standard deviation; ATA: anti-topoisomerase I antibodies; NSIP: non-specific interstitial pneumonia; HRCT: high resolution computed tomography; UIP: usual interstitial pneumonia. Significant results are highlighted in **bold**.

Table 4. Relationship of TAng frequency with characteristics of other AD-ILD⁺ patients.

Variable	r	р	
FVC (% predicted)	-0.27	0.32	
FEV1 (% predicted)	-0.27	0.32	
FEV1/FVC (% predicted)	0.15	0.59	
DLCO (% predicted)	-0.36	0.27	
Category	Mean ± SD	р	
Men	11.92 ± 8.97	0.84	
Women	11.05 ± 4.92		
Non-Smoker	17.83 ± 7.30	0.06	
Smoker	9.38 ± 6.74		
NSIP HRCT Pattern	6.43 ± 3.99	0.03	
UIP HRCT Pattern	15.11 ± 7.69		

TAng: angiogenic T cells; AD: autoimmune disease; ILD: interstitial lung disease; FVC: forced vital capacity; FEV1: forced expiratory volume in one second; DLCO: diffusing capacity of the lung for carbon monoxide; SD: standard deviation; NSIP: non-specific interstitial pneumonia; HRCT: high resolution computed tomography; UIP: usual interstitial pneumonia. Significant results are high-lighted in **bold**.

3.3. No Relationship of TAng with Biomarkers of Endothelial Dysfunction in the Whole Cohort of AD-ILD⁺

TAng frequency did not show correlation with EPC or EC frequency in AD-ILD⁺ patients (Table S3). Likewise, no association between TAng frequency and VEGF, either at mRNA expression or at protein level, was observed (Table S3).

4. Discussion

Growing evidence indicates that vascular abnormalities constitute the early phase in the pathogenesis of AD-ILD⁺ [1,3,9–12]. To the best of our knowledge, this is the first study exploring the implication of TAng, a crucial player in endothelial repair [18], in the pathogenic processes of lung fibrosis and vasculopathy in patients with AD-ILD⁺.

The present findings provide the first evidence that TAng may be a relevant factor involved in the processes of lung fibrosis. This idea is supported by the decrease in TAng in patients with AD-ILD⁺ compared to those with AD-ILD⁻. In line with this notion, patients with RA-ILD⁺ and SSc-ILD⁺ showed a decrease in TAng compared to RA-ILD⁻ and SSc-ILD⁻ patients, respectively, demonstrating the same behavior of TAng regardless of the underlying AD. In keeping with our results, a previous study showed different frequencies of TAng in systemic lupus erythematous (SLE) depending on the presence or absence of a renal involvement, one of the most severe comorbidities of SLE [27]. Interestingly, our work disclosed that patients with IPF presented TAng frequencies similar to those with AD-ILD⁺ and lower than AD-ILD⁻ patients. Accordingly, we disclosed that TAng were decreased in all the individuals with a lung involvement, including both AD-ILD⁺ and IPF patients, compared to those unaffected by this condition, highlighting the contribution of TAng in the pulmonary complications. Therefore, a reduction in TAng may indicate the presence of lung fibrosis. Based on our results and given that the development of ILD is one of the main causes of mortality in AD patients [1,2,4], TAng could be used as novel biomarkers for the early diagnosis of AD-ILD⁺.

Following the same line of evidence, both patients with AD-ILD⁺ and IPF showed a remarkable decrease in TAng frequency when compared to HC. In accordance with our results, it has been previously reported that TAng diminish in response to vascular disease in other disorders [23–25,29,30,36,37]. Furthermore, our data showed that TAng frequency in AD-ILD⁻ patients, in particular in RA-ILD⁻ and SSc-ILD⁻ patients, was not different from HC, as disclosed in other rheumatic diseases [9,23,26,27]. Consequently, we could speculate that the decrease in circulating TAng in AD-ILD⁺ and IPF patients occurs because they are migrating to the site of lung injury to repair the endothelium, constituting a marker of lung vasculopathy.

In the present study, we also disclosed a relationship of TAng with some characteristics of our patients with AD-ILD⁺. Notably, we found a lower frequency of TAng in men with RA-ILD⁺, which seems to be expected considering that the male sex is a known RA-ILD⁺ risk factor [1]. Paradoxically, a higher TAng frequency was observed in Scl-70-positive when compared with Scl-70-negative SSc-ILD⁺ patients. Additionally, a higher TAng frequency was associated with a higher FEV1/FVC ratio in SSc-ILD⁺ patients. Since the Scl-70 antibody is a risk factor for the development of ILD in patients with SSc and a decrease in FVC is used as a routine measure to assess disease progression in fibrotic ILD [5], it is possible that the relative TAng increases in these two situations in SSc-ILD⁺ patients may be due to a compensatory mechanism in response to vascular damage. It is worth mentioning that patients with other AD-ILD⁺ who presented NSIP pattern had the lowest TAng frequencies. This is in line with the fact that NSIP is the predominant pattern in AD-ILD⁺ [1,2,8,33,34,38].

Finally, a relationship of TAng with EPC or EC was not found in peripheral blood of our AD-ILD⁺ patients. These results are in keeping with other studies in which a lack of association was described in patients with RA and diabetes mellitus [24,37]. It is possible that the cooperation of TAng and EPC may take place when they are already in the damaged tissues and not at the blood level. Additionally, we did not find an association of TAng with VEGF. This finding may be explained by the fact that VEGF secretion is regulated by many different factors in AD-ILD⁺ or even at different molecular levels.

In conclusion, our findings suggest, for the first time, that TAng play a relevant role in the underlying lung vasculopathy and fibrosis, being potential biomarkers of ILD in patients with AD. Therefore, the assessment of TAng could help to establish an earlier diagnosis of AD-ILD⁺. This may favor the use of appropriate therapy in earlier stages of
the disease, preventing progression to an irreversible pulmonary process and, ultimately, contributing to improving the survival of patients with AD.

The results of this work were partially presented at the American College of Rheumatology (ACR) 2021 Congress (abstract no. 1508) (View Abstract and Citation Information Online https://acrabstracts.org/abstract/decrease-of-angiogenic-t-cells-associatedto-the-presence-of-interstitial-lung-disease-in-patients-with-connective-tissue-diseases/ (accessed on 4 April 2022)), European Alliance of Associations for Rheumatology (EU-LAR) 2021 Congress (abstract no. AB0026) (View Abstract and Citation Information Online https://ard.bmj.com/content/80/Suppl_1/1046.3 (accessed on 4 April 2022)) and European Respiratory Society (ERS) Virtual Congress (abstract no. 27636) (view abstract and citation information online: https://erj.ersjournals.com/content/58/suppl_65/PA3620 (accessed on 4 April 2022)).

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/biomedicines10040851/s1, Figure S1: Representative dotblots of the strategy used to quantify of TAng by flow cytometry; Table S1: Clinical manifestations of patients with SSc-ILD⁺ and SSc-ILD⁻; Table S2: Frequency of TAng (%) in all the individuals included in the study; Table S3: Detailed information of cellular and molecular endothelial dysfunction-related biomarkers in the whole cohort of patients with AD-ILD⁺.

Author Contributions: Conceptualization, formal analysis, methodology, visualization, writing original draft and writing—review and editing: V.P.-C., S.R.-M. and F.G.; data curation and investigation: V.P.-C., S.R.-M., F.G., B.A.-M., V.M.M.-C., D.I.-F., L.L.-G., J.R.-C., D.P.-P., V.P., R.B., A.C., O.G. and J.M.C.; project administration, supervision and writing—review and editing: R.L.-M. and M.A.G.-G. All authors have contributed significantly to the article. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: V.P.-C. and S.R.-M. are supported by funds of RETICS Program [RD16/0012/0009, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), co-funded by European Regional Development Fund (ERDF); FG is supported by funds of the RICORS Program (RD21/0002/0025) from ISCIII, co-funded by the European Union; OG is staff personnel of Xunta de Galicia (Servizo Galego de Saude (SERGAS) through a research-staff stabilization contract (ISCIII/SERGAS) and his work is funded by ISCIII and ERDF [RD16/0012/0014 (RIER) and PI17/00409]. He is the beneficiary of project funds from the Research Executive Agency of the European Union in the framework of MSCA-RISE Action of the H2020 Programme, project 734899—Olive-Net. RL-M is a recipient of a Miguel Servet type II Program fellowship from ISCIII, co-funded by the European Social Fund, 'Investing in your future' (CPII21/00004).

Institutional Review Board Statement: All subjects gave their informed consent to be included in the study. The procedures followed were in accordance with the ethical standards of the approved guidelines and regulations, in accordance with the Declaration of Helsinki. All experimental protocols were approved by the Ethics Committee of clinical research of Cantabria, Spain (2016.092).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

Acknowledgments: We thank all subjects that participated in this study.

Conflicts of Interest: The authors declare no competing interests related to this study.

References

- 1. Atzeni, F.; Gerardi, M.C.; Barilaro, G.; Masala, I.F.; Benucci, M.; Sarzi-puttini, P. Interstitial lung disease in systemic autoimmune rheumatic diseases : A comprehensive review. *Expert. Rev. Clin. Immunol.* **2018**, *14*, 69–82.
- Antoniou, K.M.; Margaritopoulos, G.; Economidou, F.; Siafakas, N.M. Pivotal clinical dilemmas in collagen vascular diseases associated with interstitial lung involvement. *Eur. Respir. J.* 2009, 33, 882–896.
- 3. Fischer, A.; Du Bois, R. Interstitial lung disease in connective tissue disorders. Lancet 2012, 380, 689–698.
- 4. Mathai, S.C.; Danoff, S.K. Management of interstitial lung disease associated with connective tissue disease. *BMJ* **2016**, *352*, h6819.
- 5. Cottin, V.; Brown, K.K. Interstitial lung disease associated with systemic sclerosis (SSc-ILD). Respir. Res. 2019, 20, 13.

- 6. Orlandi, M.; Landini, N.; Sambataro, G.; Nardi, C.; Tofani, L.; Bruni, C.; Bellando-Randone, S.; Blagojevic, J.; Melchiorre, D.; Hughes, M.; et al. The role of chest ct in deciphering interstitial lung involvement: Systemic sclerosis versus covid-19. *Rheumatology* **2021**, *preprints*.
- Ruaro, B.; Baratella, E.; Confalonieri, P.; Wade, B.; Marrocchio, C.; Geri, P.; Busca, A.; Pozzan, R.; Andrisano, A.G.; Cova, M.A.; et al. High-Resolution Computed Tomography: Lights and Shadows in Improving Care for SSc-ILD Patients. *Diagnostics* 2021, 11, 1960.
- 8. Cottin, V. Idiopathic interstitial pneumonias with connective tissue diseases features: A review. Respirology 2016, 21, 245–258.
- 9. Manetti, M.; Pratesi, S.; Romano, E.; Bellando-Randone, S.; Rosa, I.; Guiducci, S.; Fioretto, B.S.; Ibba-Manneschi, L.; Maggi, E.; Matucci-Cerinic, M. Angiogenic T cell expansion correlates with severity of peripheral vascular damage in systemic sclerosis. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0183102.
- 10. Murdaca, G.; Colombo, B.M.; Cagnati, P.; Gulli, R.; Spanò, F; Puppo, F. Endothelial dysfunction in rheumatic autoimmune diseases. *Atherosclerosis* **2020**, 224, 309–317.
- 11. Yang, X.; Chang, Y.; Wei, W. Endothelial Dysfunction and Inflammation : Immunity in Rheumatoid Arthritis. *Mediat. Inflamm.* **2016**, 2016, 6813016.
- 12. Asano, Y.; Sato, S. Vasculopathy in scleroderma. Semin. Inmunopathol. 2015, 37, 489–500.
- 13. Arias-Nuñez, M.C.; Llorca, J.; Vazquez-Rodriguez, T.R.; Gomez-Acebo, I.; Miranda-Filloy, J.A.; Martin, J.; Gonzalez-Juanatey, C.; Gonzalez-Gay, M.A. Systemic sclerosis in northwestern Spain: A 19-year epidemiologic study. *Medicine* **2008**, *87*, 272–280.
- Pulito-Cueto, V.; Remuzgo-Martínez, S.; Genre, F.; Atienza-Mateo, B.; Mora-Cuesta, V.M.; Iturbe-Fernández, D.; Lera-Gómez, L.; Pérez-Fernández, R.; Prieto-Peña, D.; Portilla, V.; et al. Endothelial Progenitor Cells : Relevant Players in the Vasculopathy and Lung Fibrosis Associated with the Presence of Interstitial Lung Disease in Systemic Sclerosis Patients. *Biomedicines* 2021, 9, 847.
- Pulito-Cueto, V.; Remuzgo-Martínez, S.; Genre, F.; Mora-Cuesta, V.M.; Iturbe-Fernández, D.; Fernández-Rozas, S.; Atienza-Mateo, B.; Lera-Gómez, L.; Alonso-Lecue, P.; Rodríguez-Carrio, J.; et al. Endothelial Progenitor Cells as a Potential Biomarker in Interstitial Lung Disease Associated with Rheumatoid Arthritis. J. Clin. Med. 2020, 9, 4098.
- 16. Patschan, S.; Tampe, D.; Müller, C.; Seitz, C.; Herink, C.; Müller, G.A.; Zeisberg, E.; Zeisberg, M.; Henze, E.; Patschan, D. Early Endothelial Progenitor Cells (eEPCs) in systemic sclerosis (SSc)—Dynamics of cellular regeneration and mesenchymal transdifferentiation. *BMC Musculoskelet Disord*. **2016**, *17*, 339.
- 17. Trombetta, A.C.; Soldano, S.; Contini, P.; Tomatis, V.; Ruaro, B.; Paolino, S.; Brizzolara, R.; Montagna, P.; Sulli, A.; Pizzorni, C.; et al. A circulating cell population showing both M1 and M2 monocyte/macrophage surface markers characterizes systemic sclerosis patients with lung involvement. *Respir. Res.* **2018**, *19*, 186.
- Hur, J.; Yang, HM.; Yoon, CH.; Lee, CS.; Park, KW.; Kim, JH.; Kim, TY.; Kim, JY.; Kang, HJ.; Chae, IH.; et al. Identification of a Novel Role of T Cells in Postnatal Vasculogenesis. Characterization of Endothelial Progenitor Cell Colonies. *Circulation* 2007, 116, 1671–1682.
- 19. Lv, T.; Yang, F.; Zhang, K.; Lv, M.; Zhang, Y.; Zhu, P. International Immunopharmacology The risk of circulating angiogenic T cells and subsets in patients with systemic sclerosis. *Int. Immunopharmacol.* **2020**, *81*, 106282.
- Zhao, P.; Miao, J.; Zhang, K.; Yu, Z.; Lv, M.; Xu, Y.; Fu, X.; Han, Q.; Zhu, P. CD147 participates in the activation function of circulating angiogenic T cells in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.* 2019, *38*, 2621–2628.
- 21. Kakizaki, M.; Nobori, K.; Watanabe, H.; Iino, K.; Ishida, M.; Ito, H. Increased circulating CD3+/CD31+ T cells in patients with acute coronary syndrome. *Heart Vessels* **2013**, *28*, 566–569.
- 22. Alunno, A.; Ibba-Manneschi, L.; Bistoni, O.; Cipriani, S.; Topini, F.; Gerli, R.; Manetti, M. Angiogenic T cells in primary Sjögren 's syndrome: A double-edged sword? *Clin. Exp. Rheumatol.* **2019**, *37*, 36–41.
- 23. López, P.; Rodriguez-Carrio, J.; Martínez-Zapico, A.; Caminal-Montero, L.; Suarez, A.; Senescent profile of angiogenic T cells from systemic lupus erythematosus patients. *J. Leukoc. Biol.* **2016**, *99*, 405–412.
- 24. Rodríguez-Carrio, J.; Alperi-lópez, M.; López, P.; Alonso-Castro, S.; Ballina-García, F.J.; Suárez, A. Angiogenic T cells are decreased in rheumatoid arthritis patients. *Ann. Rheum. Dis.* **2015**, *74*, 921–927.
- Bortoluzzi, A.; Chighizola, C.B.; Fredi, M.; Raschi, E.; Bodio, C.; Privitera, D.; Gonelli, A.; Silvagni, E.; Govoni, M.; Cavazzana, I.; et al. The IMMENSE Study: The Interplay Between iMMune and ENdothelial Cells in Mediating Cardiovascular Risk in Systemic Lupus Erythematosus. *Front. Inmunol.* 2020, *11*, 572876.
- Miao, J.; Qiu, F.; Li, T.; Zhao, P.; Zhang, K.; Lv, M.; Wan, J.; Qi, X.; Zhu, P. Circulating Angiogenic T Cells and Their Subpopulations in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Mediat. Inflamm.* 2016, 2016, 2842143.
- Zhao, P.; Miao, J.; Zhang, K.; Lv, M.; Han, Q.; Zhu, P. Circulating Angiogenic T Cells Are Increased in Lupus Nephritis Patients. *Med. Sci. Monit.* 2018, 24, 5384–5390.
- 28. Weil, B.R.; Kushner, E.J.; Diehl, K.J.; Greiner, J.J.; Stauffer, B.L.; Desouza, C.A. CD31+ T Cells, Endothelial Function and Cardiovascular Risk. *Heart Lung Circ.* 2011, 20, 659–662.
- 29. Bella, S.D.; Mavilio, D.; Editorial: Senescent angiogenic T cells: The use of CD28 makes the difference in endothelial homeostasis. *J. Leukoc. Biol.* **2016**, *99*, 399–401.
- 30. Kushner, E.J.; MacEneaney, O.J.; Morgan, R.G.; Van Engelenburg, A.M.; Van Guilder, G.P.; Desouza, C.A. CD31+ T cells represent a functionally distinct vascular T cell phenotype. *Blood Cells Mol. Dis.* **2010**, *44*, 74–78.

- Aletaha, D.; Neogi, T.; Silman, A.J.; Funovits, J.; Felson, D.T.; Bingham, C.O., 3rd; Birnbaum, N.S.; Burmester, G.R.; Bykerk, V.P.; Cohen, M.D.; et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2010, *62*, 2569–2581.
- 32. Van Den Hoogen, F.; Khanna, D.; Fransen, J.; Johnson, S.R.; Baron, M.; Tyndall, A.; Matucci-Cerinic, M.; Naden, R.P.; Medsger, T.A., Jr.; Carreira, P.E.; et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: An American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2013, 65, 2737–2747.
- 33. Travis, W.D.; Costabel, U.; Hansell, D.M.; King, T.E., Jr.; Lynch, D.A.; Nicholson, A.G.; Ryerson, C.J.; Ryu, J.H.; Selman, M.; Wells, A.U.; 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, 733–748.
- Lynch, D.A.; Sverzellati, N.; Travis, W.D.; Brown, K.K.; Colby, T.V.; Galvin, J.R.; Goldin, J.G.; Hansell, D.M.; Inoue, Y.; Johkoh, T.; et al. Diagnostic criteria for idiopathic pulmonary fibrosis: A Fleischner Society White Paper. *Lancet Respir. Med.* 2018, 6, 138– 153.
- Remuzgo-Martínez, S.; Genre, F.; Pulito-Cueto, V.; Atienza-Mateo, B.; Mora-Cuesta, V.M.; Iturbe-Fernández, D.; Fernández-Rozas, S.M.; Lera-Gómez, L.; Alonso-Lecue, P.; Piedad-Ussetti, M.; et al. Role of VEGF Polymorphisms in the Susceptibility and Severity of Interstitial Lung Disease. *Biomedicines* 2021, 9, 458.
- Rouhl, R.P.W.; Mertens, A.E.C.S.; Van Oostenbrugge, R.J.; Damoiseaux, J.G.; Debrus-Palmans, L.L.; Henskens, L.H.; Kroon, A.A.; De Leeuw, P.W.; Lodder, J.: Tervaert, J.W. Angiogenic T-Cells and Putative Endothelial Progenitor Cells in Hypertension-Related Cerebral Small Vessel Disease. *Stroke* 2012, 43, 256–258.
- 37. De Boer, S.A.; Reijrink, M.; Abdulahad, W.H.; Hoekstra, E.S.; Slart, R.H.J.A.; Heerspink, H.J.L.; Westra, J.; Mulder, D.J. Angiogenic T cells are decreased in people with type 2 diabetes mellitus and recruited by the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor Linagliptin : A subanalysis from a randomized , placebo-controlled trial (RELEASE study). *Diabetes Obes. Metab.* 2020, 22, 1220– 1225.
- Atienza-Mateo, B.; Remuzgo-Martínez, S.; Mora-Cuesta, V.M.; Iturbe-Fernández, D.; Fernández-Rozas, S.; Prieto-Peña, D.; Calderón-Goercke, M.; Corrales, A.; Blanco-Rodriguez, G.; Gómez-Román, J.J.; et al. The Spectrum of Interstitial Lung Disease Associated with Autoimmune Diseases: Data of a 3.6-Year Prospective Study from a Referral Center of Interstitial Lung Disease and Lung Transplantation. J. Clin. Med. 2020, 9, 1606.



Article

Angiogenic T cells: potential biomarkers for the early diagnosis of interstitial lung disease in autoimmune diseases?

Verónica Pulito-Cueto^{1*}, Sara Remuzgo-Martínez^{1*}, Fernanda Genre^{1*}, Belén Atienza-Mateo^{1,2}, Víctor M. Mora-Cuesta^{1,3}, David Iturbe-Fernández^{1,3}, Leticia Lera-Gómez¹, Javier Rodriguez-Carrio⁴, Diana Prieto-Peña^{1,2}, Virginia Portilla^{1,2}, Ricardo Blanco^{1,2}, Alfonso Corrales^{1,2}, Oreste Gualillo⁵, José M. Cifrián^{1,3,6}, Raquel López-Mejías^{1**} and Miguel A. González-Gay^{7,8**}



Supplementary Figure S1. Representative dot-blots of the strategy used to quantify of TAng by flow cytometry. CD3⁺ were gated and then assayed for expression of CD184 and CD31 in the lymphocyte gate. TAng were considered as CD3⁺/CD184⁺/CD31⁺ cells in the lymphocyte gate. Images obtained from Cytexpert 2.3 analyzer.



	SSc-ILD⁺ patients n = 21	SSc-ILD- patients n = 20
Pulmonary hypertension, <i>n</i> (%)	3 (15.8)	0 (0.0)
Renal impairment, n (%)	1 (4.8)	1 (5.0)
Cardiac involvement, <i>n</i> (%)	6 (28.6)	1 (5.0)
Raynaud's phenomenon, n (%)	21 (100.0)	20 (100.0)
Esophageal dysfunction, n (%)	12 (57.1)	5 (25.0)
Calcinosis, n (%)	0 (0.0)	6 (30.0)
Synovitis, n (%)	6 (28.6)	6 (30.0)

Supplementary Table S1. Clinical manifestations of patients with SSc-ILD⁺ and SSc-ILD⁻.

SSc: systemic sclerosis; ILD: interstitial lung disease.

		Mean ± SD
Study Objective Groups	AD-ILD+	11.560 ± 5.242
	RA-ILD+	11.950 ± 5.234
	SSc-ILD⁺	12.570 ± 5.052
	Other AD-ILD ⁺	10.560 ± 6.684
Comparative Groups	AD-ILD ⁻	15.920 ± 4.612
	RA-ILD-	16.400 ± 4.926
	SSc-ILD ⁻	16.070 ± 5.420
	IPF	11.340 ± 3.732
	НС	16.500 ± 4.830

Supplementary Table S2. Frequency of TAng (%) in all the individuals included in the study.

TAng: angiogenic T cells; SD: standard deviation; AD: autoimmune disease; ILD: interstitial lung disease; RA: rheumatoid arthritis; SSc: systemic sclerosis; IPF: idiopathic pulmonary fibrosis; HC: healthy controls.



Supplementary Table S3. Detailed information of cellular and molecular endothelial dysfunction-related biomarkers in the whole cohort of patients with AD-ILD⁺.

EPC Frequency (%) (<i>Mean</i> ± <i>SD</i>)	0.037 ± 0.017
EC Frequency (%) (<i>Mean</i> \pm <i>SD</i>)	0.017 ± 0.019
VEGF mRNA expression (Mean ± SD)	0.040 ± 0.069
VEGF serum levels (pg/mL) (Mean $\pm SD$)	89.620 ± 63.840

AD: autoimmune disease; ILD: interstitial lung disease; EPC: endothelial progenitor cells; SD: standard deviation; EC: endothelial cells; VEGF: vascular endothelial growth factor.

Anexo III

Otros trabajos relacionados con la tesis doctoral

- [Artículo científico] Remuzgo-Martínez, Sara; Genre, Fernanda; <u>Pulito-Cueto, Verónica</u>*; Atienza-Mateo, Belén; Mora-Cuesta, Víctor M.; Iturbe-Fernández, David; Fernández-Rozas, Sonia; Lera-Gómez, Leticia; Alonso-Lecue, Pilar; Ussetti, María P.; Laporta, Rosalía; Berastegui, Cristina; Solé, Amparo; Pérez, Virginia; De Pablo Gafas, Alicia; Gualillo, Oreste; Cifrián, José M.; López-Mejías, Raquel; González-Gay, Miguel A. Role of VEGF Polymorphisms in the Susceptibility and Severity of Interstitial Lung Disease. *Biomedicines. 2021 Apr 22;9(5):458. *Compartiendo primera autoría.*
- 2) [Poster científico] <u>Pulito-Cueto, Verónica</u>; Remuzgo-Martínez, Sara; Genre, Fernanda; Atienza-Mateo, Belén; Portilla, Virginia; Mora-Cuesta, Víctor M.; Iturbe-Fernández, David; Lera-Gómez, Leticia; Prieto-Pena, Diana; Blanco, Ricardo; Corrales, Alfonso; Gualillo, Oreste; Cifrian, Jose M.; Lopez-Mejias, Raquel; González-Gay, Miguel A. Increased levels of cellular adhesion molecules are linked to the presence of interstitial lung disease in patients with autoimmune diseases. *European e-Congress of Rheumatology EULAR 2022 (Copenhague, Dinamarca).*
- 3) [Poster científico] Pulito-Cueto, Verónica; Remuzgo-Martínez, Sara; Genre, Fernanda; Atienza-Mateo, Belén; Portilla, Virginia; Mora-Cuesta, Víctor M.; Iturbe-Fernández, David; Lera-Gómez, Leticia; Rodriguez-Carrio, Javier; Prieto-Pena, Diana; Blanco, Ricardo; Corrales, Alfonso; Gualillo, Oreste; Cifrian, José M.; Lopez-Mejias, Raquel; González-Gay, Miguel A. Angiogenic T cells as relevant players in the lung vasculopathy of rheumatoid arthritis, systemic sclerosis and other autoimmune diseases. European e-Congress of Rheumatology EULAR 2022 (Copenhague, Dinamarca).
- 4) [Poster científico] <u>Pulito-Cueto, Verónica</u>; Remuzgo-Martínez, Sara; Genre, Fernanda; Atienza-Mateo, Belén; Mora-Cuesta, Víctor M.; Iturbe-Fernández, David; Lera-Gómez, Leticia; Prieto-Pena, Diana; Portilla, Virginia; Blanco, Ricardo; Corrales, Alfonso; Gualillo, Oreste; Cifrian, José M.; Lopez-Mejias, Raquel; González-Gay, Miguel A. Moléculas de Adhesión Celular asociadas a la presencia de Enfermedad Pulmonar Intersticial en pacientes con Enfermedades Autoinmunes. *XLVIII Congreso de la Sociedad Española de Reumatología (SER) 2021 (Granada, España).*
- 5) [Poster científico] <u>Pulito-Cueto, Verónica</u>; Remuzgo-Martínez, Sara; Genre, Fernanda; Mora-Cuesta, Víctor M.; Iturbe-Fernández, David; Fernández-Rozas, Sonia; Atienza-Mateo, Belén; Lera-Gómez, Leticia; Alonso-Lecue, Pilar; Rodriguez-Carrio, Javier; Prieto-Pena, Diana; Portilla, Virginia; Blanco, Ricardo; Corrales, Alfonso; Gualillo, Oreste; Cifrian, José M.; Lopez-Mejias, Raquel; González-Gay, Miguel A. Decrease of angiogenic T cells associated to the presence of interstitial lung disease in patients with connective tissue diseases. American College of Rheumatology (ACR) Annual Meeting 2021 (Congreso virtual).
- 6) [Comunicación Oral] <u>Pulito-Cueto, Verónica</u>; Remuzgo-Martínez, Sara; Genre, Fernanda; Mora-Cuesta, Víctor M.; Iturbe-Fernández, David; Fernández-Rozas, Sonia; Atienza-Mateo, Belén; Lera-Gómez, Leticia; Alonso-Lecue, Pilar; Rodriguez-Carrio, Javier; Prieto-Pena, Diana; Portilla, Virginia; Blanco, Ricardo; Corrales, Alfonso; Gualillo, Oreste; Cifrian, José M.; Lopez-Mejias, Raquel; González-Gay, Miguel A. Células Progenitoras Endoteliales y Células T Angiogénicas: posibles biomarcadores de la enfermedad pulmonar intersticial en pacientes con conectivopatías. XLVII Congreso de la Sociedad Española de Reumatología (SER) 2021 (Palma de Mallorca, España).
- 7) [Póster Científico] Pulito-Cueto, Verónica; Remuzgo-Martínez, Sara; Genre, Fernanda; Mora-Cuesta, Víctor M.; Iturbe-Fernández, David; Fernández-Rozas, Sonia; Atienza-Mateo, Belén; Lera-Gómez, Leticia; Alonso-Lecue, Pilar; Rodriguez-Carrio, Javier; Prieto-Pena, Diana; Portilla, Virginia; Blanco, Ricardo; Corrales, Alfonso; Gualillo, Oreste; Cifrian, José M.; Lopez-Mejias, Raquel; González-Gay, Miguel. Angiogenic T cells in interstitial lung diseases. European Respiratory Society (ERS) e-Congress 2021 (Congreso virtual).
- 8) [Póster Científico] Pulito-Cueto, Verónica; Remuzgo-Martínez, Sara; Genre, Fernanda; Mora-Cuesta, Víctor M.; Iturbe-Fernández, David; Fernández-Rozas, Sonia; Atienza-Mateo, Belén; Lera-Gómez, Leticia; Alonso-Lecue, Pilar; Rodriguez-Carrio, Javier; Prieto-Pena, Diana; Portilla, Virginia; Blanco, Ricardo; Corrales, Alfonso; Gualillo, Oreste; Cifrian, José M.; Lopez-Mejias, Raquel; González-Gay, Miguel A. Decrease of angiogenic T cells in connective tissue disease-associated interstitial lung disease. European e-Congress of Rheumatology EULAR 2021 (Congreso virtual).

- 9) [Póster Científico] <u>Pulito-Cueto, Verónica</u>; Remuzgo-Martínez, Sara; Genre, Fernanda; Atienza-Mateo, Belén; Mora-Cuesta, Víctor M.; Iturbe-Fernández, David; Lera-Gómez, Leticia; Perez-Fernández, Raquel; Prieto-Pena, Diana; Portilla, Virginia; Blanco, Ricardo; Corrales, Alfonso; Cifrian-Martínez, José M.; Lopez-Mejias, Raquel; González-Gay, Miguel A. Increase of endothelial progenitor cells in systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. European e-Congress of Rheumatology EULAR 2021 (Congreso virtual).
- 10) [Póster Científico] <u>Pulito-Cueto, Verónica</u>; Remuzgo-Martínez, Sara; Genre, Fernanda; Mora-Cuesta, Víctor M.; Iturbe-Fernández, David; Fernández-Rozas, Sonia M.; Lera-Gómez, Leticia; Alonso-Lecue, Pilar; Rodriguez-Carrio, Javier; Atienza-Mateo, Belén; Portilla, Virginia; Merino, David; Blanco, Ricardo; Corrales, Alfonso; Cifrián, José M.; López-Mejías, Raquel; González-Gay, Miguel A. Células progenitoras endoteliales: papel en el daño endotelial de la enfermedad pulmonar intersticial asociada a artritis reumatoide. XLVI Congreso de la Sociedad Española de Reumatología (SER) 2020 (Congreso virtual).
- 11) [Póster Científico] Pulito-Cueto, Verónica; Remuzgo-Martínez, Sara; Genre, Fernanda; Mora-Cuesta, Víctor M.; Iturbe-Fernández, David; Fernández-Rozas, Sonia M.; Lera-Gómez, Leticia; Alonso-Lecue, Pilar; Rodriguez-Carrio, Javier; Atienza-Mateo, Belén; Portilla, Virginia; Blanco, Ricardo; Corrales, Alfonso; López-Mejías, Raquel; Gónzalez-Gay, Miguel A.; Cifrián, José M. ¿Idiopathic pulmonary fibrosis or interstitial lung disease associated to connective tissue diseases? Endothelial progenitor cells as a potential tool for the differential diagnosis. European Respiratory Society (ERS) e-Congress 2020 (Congreso virtual).
- 12) [Póster Científico] Pulito-Cueto, Verónica; Remuzgo-Martínez, Sara; Genre, Fernanda; Mora Cuesta, Víctor M.; Iturbe Fernández, David; Fernández Rozas, Sonia M.; Lera Gómez, Leticia; Alonso Lecue, Pilar; Rodriguez-Carrio, Javier; Atienza-Mateo, Belén; Portilla, Virginia; Merino, David; Blanco, Ricardo; Corrales, Alfonso; Cifrián, José M.; López Mejías, Raquel; González-Gay, Miguel A. Endothelial progenitor cells: role in endothelial damage of interstitial lung disease associated to rheumatoid arthritis. European e-Congress of Rheumatology EULAR 2020 (Congreso virtual).
- 13) [Póster Científico] <u>Pulito-Cueto, Verónica</u>; Remuzgo-Martínez, Sara; Genre, Fernanda; Lera-Gómez, Leticia; Mijares, Verónica; Alonso-Lecue, Pilar; Mora-Cuesta, Víctor; Iturbe-Fernández, David; Fernández-Rozas, Sonia M; Blanco, Ricardo; Corrales, Alfonso; Cifrián, José M; López-Mejías, Raquel; González-Gay, Miguel Ángel. Endothelial Progenitor Cells in the Pathophysiology of Interstitial Lung Disease Associated with Rheumatoid Arthritis. American College of Rheumatology (ACR) Annual Meeting 2019 (Atlanta, Estados Unidos de América).

Anexo IV

Otras publicaciones en las que ha participado la doctoranda

- Pulito-Cueto, Verónica; Remuzgo-Martínez, Sara; Genre, Fernanda; Calvo-Alén, Jaime; Aurrecoechea, Elena; Llorente, Irene; Triguero-Martinez, Ana; Blanco, Ricardo; Llorca, Javier; Ruiz-Lucea, Esther; Rivera-García, Natalia; Gualillo, Oreste; Lopez-Mejias, Raquel; Castañeda, Santos; González-Gay, Miguel A. Role of adiponectin in non-diabetic patients with rheumatoid arthritis undergoing anti-IL-6 therapy. *Clin Exp Rheumatol. 2021 Jul 7. Online ahead of print.*
- 2) <u>Pulito-Cueto, Verónica</u>; Remuzgo-Martínez, Sara; Genre, Fernanda; Calvo-Alén, Jaime; Aurrecoechea, Elena; Llorente, Irene; Triguero-Martinez, Ana; Blanco, Ricardo; Llorca, Javier; Ruiz-Lucea, Esther; Rivera-García, Natalia; Gualillo, Oreste; Lopez-Mejias, Raquel; Castañeda, Santos; González-Gay, Miguel A. Anti-IL-6 therapy reduces leptin serum levels in patients with rheumatoid arthritis. Clin Exp Rheumatol. Nov-Dec 2020;38(6):1201-1205.
- 3) Remuzgo-Martínez, Sara; Rueda-Gotor, Javier; <u>Pulito-Cueto, Verónica</u>*; López-Mejías, Raquel; Corrales, Alfonso; Lera-Gómez, Leticia; Pérez-Fernández, Raquel; Portilla, Virginia; González-Mazón, Íñigo; Blanco, Ricardo; Expósito, Rosa; Mata, Cristina; Llorca, Javier; Hernández-Hernández, Vanesa; Rodríguez-Lozano, Carlos; Barbarroja, Nuria; Ortega Castro, Rafaela; Vicente, Esther; Fernández-Carballido, Cristina; Martínez-Vidal, María P.; Castro-Corredor, David; Anino-Fernández, Joaquín; Peiteado, Diana; Plasencia-Rodriguez, Chamaida; Galíndez-Agirregoikoa, Eva; García Vivar, María L.; Vegas-Revenga, Nuria; Urionaguena, Irati; Gualillo, Oreste; Quevedo-Abeledo, Juan C.; Castañeda, Santos; Ferraz-Amaro, Iván; González-Gay, Miguel A., Genre, Fernanda. Irisin as a novel biomarker of subclinical atherosclerosis, cardiovascular risk and severe disease in axial spondyloarthritis. Frontiers in Inmunology (En revisión). *Compartiendo primera autoría
- 4) Remuzgo-Martínez, Sara; Atienza-Mateo, Belén; Gonzalo Ocejo-Vinyals, J.; Genre, Fernanda; <u>Pulito-Cueto, Verónica</u>; Mora-Cuesta, Víctor M.; Iturbe-Fernández, David; Lera-Gómez, Leticia; Perez-Fernández, Raquel; Prieto-Peña, Diana; Irure, Juan; Romero-Bueno, Fredeswinda; Sánchez-Pernaute, Olga; Alonso-Moralejo, Rodrigo; Nuno, Laura; Bonilla, Gema; Vicente-Rabaneda, Esther F.; Grafía, Ignacio; Prieto-González, Sergio; Narváez, Javier; Trallero-Araguas, Ernesto; Selva-O'Callaghan, Albert; Spanish Biomarkers of Antisynthetase Syndrome Consortium*; Spanish Biomarkers of Interstitial Lung Disease Consortium; Gualillo, Oreste; Cavagna, Lorenzo; Cifrian, José M.; Renzoni, Elisabetta A.; Castañeda, Santos; Lopez-Mejias, Raquel; González-Gay, Miguel A. Role of MUC1 rs4072037 polymorphism and serum KL-6 levels in patients with antisynthetase syndrome. Sci Rep. 2021 Nov 19;11(1):22574.
- 5) Prieto-Peña, Diana; Remuzgo-Martínez, Sara; Genre, Fernanda; <u>Pulito-Cueto, Verónica</u>; Atienza-Mateo, Belén; Llorca, Javier; Sevilla-Perez, Belén; Ortego-Centeno, Norberto; Márquez, Ana; Lera-Gómez, Leticia; Teresa Leonardo, María; Peñalba, Ana; Narváez, Javier; Martin-Penagos, Luis; Rodrigo, Emilio; Miranda-Filloy, José A.; Caminal-Montero, Luis; Collado, Paz; Sánchez Perez, Javier; de Argila, Diego; Rubio, Esteban; León Luque, Manuel; Blanco-Madrigal, Juan M.; Galindez-Agirregoikoa, Eva; Gualillo, Oreste; Martin, Javier; Castañeda, Santos; Blanco, Ricardo; González-Gay, Miguel A.; Lopez-Mejias, Raquel. Role of the IL33 and IL1RL1 pathway in the pathogenesis of Immunoglobulin A vasculitis. *Sci Rep. 2021 Aug 9;11(1):16163.*
- 6) Prieto-Peña, Diana; Genre, Fernanda; Remuzgo-Martínez, Sara; Pulito-Cueto, Verónica; Atienza-Mateo, Belén; Llorca, Javier; Sevilla-Perez, Beier; Ortego-Centeno, Norberto; Lera-Gómez, Leticia; Teresa Leonardo, María; Peñalbe, Ana; Narváez, Javier; Martin-Penagos, Luis; Rodrigo, Emilio; Miranda-Filloy, José A.; Caminal-Montero, Luis; Collado, Paz; Sánchez Perez, Javier; de Argila, Diego; Rubio, Esteban; León Luque, Manuel; Blanco-Madrigal, Juan M.; Galindez-Agirregoikoa, Eva; Gualillo, Oreste; Martin, Javier; Castañeda, Santos; Blanco, Ricardo; González-Gay, Miguel A.; Lopez-Mejias, Raquel. BAFF, APRIL and BAFFR on the pathogenesis of Immunoglobulin-A vasculitis. *Sci Rep.* 2021 Jun 1;11(1):11510.
- 7) Remuzgo-Martínez, Sara; Atienza-Mateo, Belén; Gonzalo Ocejo-Vinyals, J.; <u>Pulito-Cueto, Verónica</u>; Prieto-Pena, Diana; Genre, Fernanda; Márquez, Ana; Llorca, Javier; Mora Cuesta, Víctor M.; Iturbe Fernández, David; Riesco, Laura; Ortego-Centeno, Norberto; Perez Gómez, Nair; Mera, Antonio; Martínez-Barrio, Julia; Lopez-Longo, Francisco J.; Lera-Gómez, Leticia; Moriano, Clara;

Diez, Elvira; Tomero, Eva; Calvo-Alen, Jaime; Romero-Bueno, Fredeswinda; Sánchez-Pernaute, Olga; Nuno, Laura; Bonilla, Gema; Grafía, Ignacio; Prieto-González, Sergio; Narváez, Javier; Trallero-Araguas, Ernesto; Selva-O'Callaghan, Albert; Gualillo, Oreste; Martin, Javier; Cavagna, Lorenzo; Castañeda, Santos; Cifrian, José M.; Renzoni, Elisabetta A.; Lopez-Mejias, Raquel; González-Gay, Miguel A. **HLA association with the susceptibility to anti-synthetase syndrome**. *Joint Bone Spine*. 2021 May;88(3):105115.

- 8) Rueda-Gotor, Javier; López-Mejías, Raquel; Remuzgo-Martínez, Sara; <u>Pulito-Cueto, Verónica</u>; Corrales, Alfonso; Lera-Gómez, Leticia; Portilla, Virginia; González-Mazón, Iñigo; Blanco, Ricardo; Expósito, Rosa; Mata, Cristina; Llorca, Javier; Hernández-Hernández, Vanesa; Rodriguez-Lozano, Carlos; Barbarroja, Nuria; Ortega Castro, Rafaela; Vicente, Esther; Fernández-Carballido, Cristina; Martínez-Vidal, María P.; Castro-Corredor, David; Anino-Fernández, Joaquín; Peiteado, Diana; Plasencia-Rodriguez, Chamaida; Galindez-Agirregoikoa, Eva; García-Vivar, María L.; Gualillo, Oreste; Quevedo-Abeledo, Juan C.; Castañeda, Santos; Ferraz-Amaro, Iván; González-Gay, Miguel A.; Genre, Fernanda. Vaspin in atherosclerotic disease and cardiovascular risk in axial spondyloarthritis: a genetic and serological study. *Arthritis Res Ther.* 2021 Apr 13;23(1):111.
- 9) Genre, Fernanda; Rueda-Gotor, Javier; Remuzgo-Martínez, Sara; Pulito-Cueto, Verónica; Corrales, Alfonso; Mijares, Verónica; Lera-Gómez, Leticia; Portilla, Virginia; Expósito, Rosa; Mata, Cristina; Blanco, Ricardo; Llorca, Javier; Hernández-Hernández, Vanesa; Vicente, Esther; Fernández-Carballido, Cristina; Martínez-Vidal, María P.; Castro-Corredor, David; Anino-Fernández, Joaquín; Rodriguez-Lozano, Carlos; Gualillo, Oreste; Quevedo-Abeledo, Juan C.; Castañeda, Santos; Ferraz-Amaro, Iván; Lopez-Mejias, Raquel; González-Gay, Miguel A. Omentin: a biomarker of cardiovascular risk in individuals with axial spondyloarthritis. *Sci Rep.* 2020 Jun 15;10(1):9636.
- 10) Lopez-Mejias, Raquel; Remuzgo-Martínez, Sara; Genre, Fernanda; <u>Pulito-Cueto, Verónica</u>; Fernández-Rozas, Sonia M.; Llorca, Javier; Iturbe-Fernández, David; Mora-Cuesta, Victor M.; Ortego-Centeno, Norberto; Perez-Gómez, Nair; Mera-Varela, Antonio; Martinez-Barrio, Julia; Lopez-Longo, Francisco J.; Mijares, Veronica; Lera-Gómez, Leticia; Usetti, Maria P.; Laporta, Rosalia; Perez, Virginia; De Pablo Gafas, Alicia; Alfranca González, Maria A.; Calvo-Alen, Jaime; Romero-Bueno, Fredeswinda; Sanchez-Pernaute, Olga; Nuno, Laura; Bonilla, Gema; Balsa, Alejandro; Hernández-González, Fernanda; Grafia, Ignacio; Prieto-Gonzalez, Sergio; Narváez, Javier; Trallero-Araguas, Ernesto; Selva-O'Callaghan, Albert; Gualillo, Oreste; Castañeda, Santos; Cavagna, Lorenzo; Cifrian, José M.; González-Gay, Miguel A. Influence of MUC5B gene on antisynthethase syndrome. *Sci Rep. 2020 Jan 29;10(1):1415.*
- 11) Lopez-Mejias, Raquel; Genre, Fernanda; Remuzgo-Martínez, Sara; <u>Pulito-Cueto, Verónica</u>; Sevilla-Perez, Belén; Llorca, Javier; Ortego-Centeno, Norberto; Mijares, Verónica; Lera-Gómez, Leticia; Leonardo, María T.; Peñalba, Ana; Cabero, María J.; Martin-Penagos, Luis; Miranda-Filloy, José A.; Navas Parejo, Antonio; Sánchez Pérez, Javier; de Argila, Diego; Rubio, Esteban; León Luque, Manuel; Blanco-Madrigal, Juan M.; Galindez-Agirregoikoa, Eva; Martin, Javier; Blanco, Ricardo; Castañeda, Santos; González-Gay, Miguel A. Influence of IL17A gene on the pathogenesis of immunoglobulin-A vasculitis. Clin Exp Rheumatol. Mar-Apr 2020;38 Suppl 124(2):166-170.
- 12) Genre, Fernanda; Remuzgo-Martínez, Sara; Prieto-Pena, Diana; Atienza-Mateo, Belén; <u>Pulito-Cueto, Verónica</u>; Llorca, Javier; Sevilla-Perez, Belén; Ortego-Centeno, Norberto; Lera-Gómez, Leticia; Leonardo, María T.; Peñalba, Ana; Cabero, María J.; Martín-Penagos, Luis; Miranda-Filloy, José A.; Navas Parejo, Antonio; Sánchez Pérez, Javier; de Argila, Diego; Rubio, Esteban; Luque, Manuel L.; Blanco-Madrigal, Juan M.; Galindez-Agirregoikoa, Eva; Blanco, Ricardo; Gualillo, Oreste; Martin, Javier; Castañeda, Santos; González-Gay, Miguel A.; Lopez-Mejias, Raquel. Role of IRF5 in the pathogenesis of immunoglobulin-A vasculitis. *Clin Exp Rheumatol. Mar-Apr* 2020;38 Suppl 124(2):182-187.
- 13) Lopez-Mejias, Raquel; Carmona, F David; Genre, Fernanda; Remuzgo-Martínez, Sara; González-Juanatey, Carlos; Corrales, Alfonso; Vicente, Esther F.; <u>Pulito-Cueto, Verónica</u>; Miranda-Filloy, Jose A.; Ramírez Huaranga, Marco A.; Blanco, Ricardo; Robustillo-Villarino, Montserrat; Rodriguez-Carrio, Javier; Alperi-Lopez, Mercedes; Alegre-Sancho, Juan J.; Mijares, Verónica; Lera-

Gómez, Leticia; Perez-Pampin, Eva; Gonzalez, Antonio; Ortega-Castro, Rafaela; Lopez-Pedrera, Chary; García Vivar, Mari L.; Gómez-Arango, Catalina; Raya, Enrique; Narváez, Javier; Balsa, Alejandro; Lopez-Longo, Francisco J.; Carreira, Patricia; González-Álvaro, Isidoro; Rodriguez-Rodriguez, Luis; Fernández-Gutierrez, Benjamin; Ferraz-Amaro, Iván; Gualillo, Oreste; Castañeeda, Santos; Martin, Javier; Llorca, Javier; González-Gay, Miguel A. **Identification of a 3 '-Untranslated Genetic Variant of RARB Associated With Carotid Intima-Media Thickness in Rheumatoid Arthritis: A Genome-Wide Association Study.** *Arthritis Rheumatol.* 2019 *Mar;71(3):351-360.*