

# GRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

## TRABAJO FIN DE GRADO

**Búsqueda de biomarcadores génicos de la enfermedad pulmonar intersticial asociada a las enfermedades del tejido conectivo: ¿*PDGF* y *TGFB* como factores de riesgo y pronóstico prometedores?**

**Search for genetic biomarkers of interstitial lung disease associated with connective tissue diseases: are *PDGF* and *TGFB* promising risk and prognostic factors?**

**Autor/a:** Rebeca Nieto Nieto

**Director/a:** Verónica Pulito Cueto

**Co-director/a:** Raquel López Mejías

**Co-director/a:** Víctor Manuel Martínez Taboada

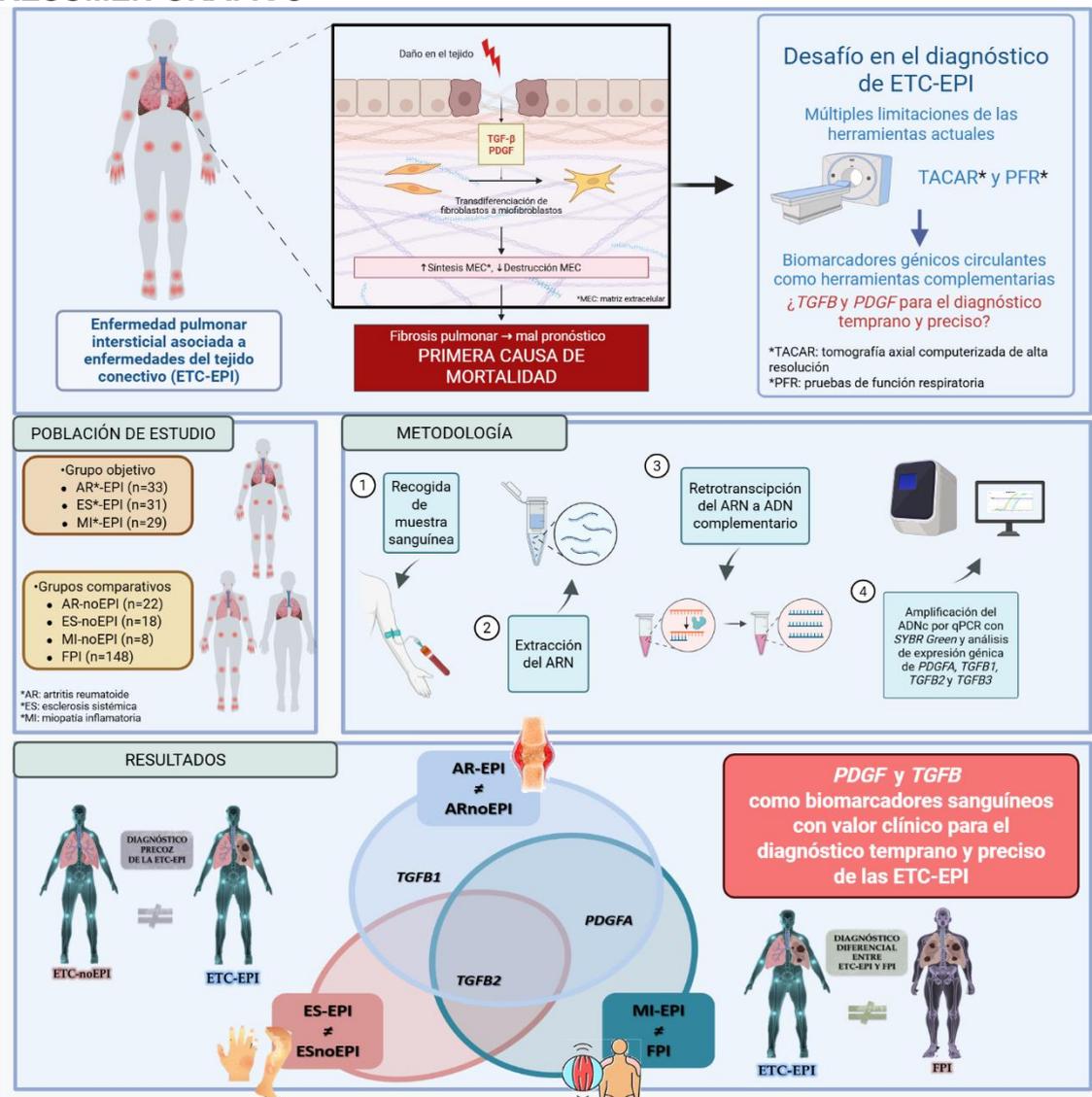
**Santander, 8 de junio de 2025**

## Índice

Título .....	1
Resumen Gráfico .....	1
Autores .....	1
Resumen .....	2
Abstract .....	3
Palabras clave .....	3
Introducción .....	4
Resultados .....	6
Alteraciones en la expresión génica en sangre de <i>PDGFA</i> , <i>TGFB1</i> y <i>TGFB2</i> se asocian a la presencia de una EPI en pacientes con AR y ES .....	6
Alteraciones en la expresión génica en sangre de <i>PDGFA</i> y <i>TGFB2</i> caracterizan a los pacientes con MI-EPI en relación con aquellos con FPI ....	7
<i>PDGFA</i> , <i>TGFB1</i> y <i>TGFB2</i> como biomarcadores de diagnóstico precoz de la EPI en pacientes con AR y ES.....	8
<i>PDGFA</i> y <i>TGFB2</i> como biomarcadores de diagnóstico diferencial entre pacientes con MI-EPI y FPI.....	9
Los niveles de expresión génica en sangre de <i>PDGFA</i> , <i>TGFB2</i> y <i>TGFB3</i> se asocian al pronóstico de los pacientes con AR-EPI y ES-EPI .....	10
Discusión.....	16
Metodología.....	19
Población de estudio.....	19
Extracción del ARN .....	20
Concentración del ARN.....	21
Retrotranscripción del ARN.....	21
Reacción de PCR a tiempo real (qPCR).....	22
Análisis de calidad de los datos de expresión génica .....	22
Procesamiento de los datos de expresión génica .....	23
Análisis estadístico.....	23
Agradecimientos.....	24
Bibliografía .....	24
Información Suplementaria .....	30

# Búsqueda de biomarcadores génicos de la enfermedad pulmonar intersticial asociada a las enfermedades del tejido conectivo: ¿*PDGF* y *TGF $\beta$* como factores de riesgo y pronóstico prometedores?

## RESUMEN GRÁFICO



Creado con Biorender.com

## AUTORES

Rebeca Nieto Nieto, Verónica Pulito Cueto (director/a), Raquel López Mejías (codirector/a), Víctor Manuel Martínez Taboada (codirector/a)

Correspondencia: [veronica.pulito@idival.org](mailto:veronica.pulito@idival.org), [rlopezmejias78@gmail.com](mailto:rlopezmejias78@gmail.com)

# **Búsqueda de biomarcadores génicos de la enfermedad pulmonar intersticial asociada a las enfermedades del tejido conectivo: ¿*PDGF* y *TGFB* como factores de riesgo y pronóstico prometedores?**

Rebeca Nieto Nieto<sup>1</sup>, Verónica Pulito Cueto (director/a)<sup>2\*</sup>, Raquel López Mejías (codirector/a)<sup>2\*</sup>, Víctor Manuel Martínez Taboada (codirector/a)<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Cantabria, Santander, Cantabria

<sup>2</sup>Grupo Inmunopatología, IDIVAL, Santander, Cantabria

\* Correspondencia: [veronica.pulito@idival.org](mailto:veronica.pulito@idival.org), [rlopezmejias78@gmail.com](mailto:rlopezmejias78@gmail.com)

## **RESUMEN**

La enfermedad pulmonar intersticial (EPI) es una de las principales causas de mortalidad de las enfermedades del tejido conectivo (ETC). Su diagnóstico resulta un desafío, en parte, debido a las limitaciones de las herramientas disponibles. El factor de crecimiento transformante beta y el de plaquetas A son factores profibróticos claves. Por lo tanto, se evaluará el papel de *PDGFA*, *TGFB1*, *TGFB2* y *TGFB3* como biomarcadores de diagnóstico en sangre de la EPI en las ETC más frecuentes (esclerosis sistémica (ES), artritis reumatoide (AR) y miopatía inflamatoria (MI)).

Para ello, se reclutaron pacientes con ETC-EPI: AR-EPI(n=33),ES-EPI(n=31),MI-EPI(n=29); ETC-noEPI: AR-noEPI(n=22),ES-noEPI(n=18),MI-noEPI(n=8); y con fibrosis pulmonar idiopática (FPI; n=148). La expresión génica se evaluó por qPCR.

La expresión de *PDGFA*, *TGFB1* y *TGFB2* fue capaz de identificar la EPI en pacientes con AR, así como de *TGFB2* en ES. A su vez, *PDGFA* y *TGFB2* discriminaron a los pacientes con MI-EPI frente a FPI. Se correlacionó en AR-EPI: *PDGFA*-patrón radiológico y *TGFB2*-anti-péptidos cíclicos citrulinados; y en ES-EPI: *TGFB2*-volumen espiratorio forzado en el primer segundo, y *TGFB3*-patrón radiológico y presencia de patología fibrosante progresiva.

En conclusión, *PDGFA* y *TGFB* constituyen biomarcadores sanguíneos con valor clínico para el diagnóstico temprano y preciso de las ETC-EPI.

## ABSTRACT

Interstitial lung disease (ILD) is one of the leading causes of mortality in connective tissue diseases (CTD). Its diagnosis remains challenging, in part due to the limitations of currently available tools. Transforming growth factor- $\beta$  and platelet-derived growth factor subunit A are key profibrotic factors. Therefore, the role of *PDGFA*, *TGFB1*, *TGFB2* and *TGFB3* will be evaluated as potential blood-based diagnostic biomarkers for ILD in the most common CTD (systemic sclerosis (SSc), rheumatoid arthritis (RA) and inflammatory myopathy (IM)).

To this end, the study included CTD-ILD patients: 33 RA-ILD, 31 SSc-ILD, 29 IM-ILD; CTD-nonILD: 22 RA-nonILD, 18 SSc-nonILD, 8 IM-nonILD; and 148 with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). Gene expression was assessed by qPCR.

Expression of *PDGFA*, *TGFB1*, and *TGFB2* identified ILD in RA patients, while *TGFB2* was effective in SSc. Additionally, *PDGFA* and *TGFB2* distinguished IM-ILD patients from those with IPF. In RA-ILD, correlations were observed between *PDGFA* and radiologic pattern, and *TGFB2* and anti-cyclic citrullinated peptide antibodies. In SSc-ILD, *TGFB2* correlated with forced expiratory volume in one second, and *TGFB3* with radiologic pattern and with the presence of progressive fibrosing pathology.

In conclusion, *PDGFA* and *TGFB* represent blood-based biomarkers with clinical value for the early and accurate diagnosis of CTD-ILD.

## PALABRAS CLAVE

Enfermedad del tejido conectivo, enfermedad pulmonar intersticial, biomarcadores de diagnóstico, expresión génica, factor de crecimiento transformante beta, factor de crecimiento derivado de plaquetas, artritis reumatoide, esclerosis sistémica, miopatía inflamatoria, fibrosis pulmonar idiopática

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad pulmonar intersticial (EPI) constituye una de las complicaciones más graves en los pacientes con enfermedad del tejido conectivo (ETC), siendo una de las primeras causas de mortalidad y morbilidad en los mismos<sup>1-4</sup>. Las ETC son un grupo de enfermedades inmunológicas heterogéneas mediadas por factores inflamatorios que pueden afectar a diversos órganos, siendo el pulmón uno de los órganos más susceptibles<sup>1</sup>. En este contexto, una de las manifestaciones más graves es la EPI, un trastorno que afecta de forma difusa al parénquima del pulmón<sup>5</sup>, principalmente al intersticio, vías respiratorias y vasculatura pulmonar<sup>6</sup>, y cuyo desarrollo es más frecuente en la esclerosis sistémica (ES), la artritis reumatoide (AR) y la miopatía inflamatoria (MI)<sup>4,7-9</sup>. Además, dicha comorbilidad puede evolucionar a estadios muy graves en las ETC desarrollando un fenotipo fibrosante progresivo que provoca un deterioro progresivo del pulmón y empeora los síntomas respiratorios conduciendo a un pronóstico desfavorable y riesgo de muerte temprana<sup>10</sup>.

Dada la severidad de la ETC-EPI, su diagnóstico precoz es fundamental. Sin embargo, dicha detección temprana presenta múltiples dificultades. Por un lado, los pacientes pueden ser asintomáticos hasta etapas tardías o presentar síntomas inespecíficos<sup>4,11</sup>. Además, la EPI puede ser la primera manifestación de la ETC (con mayor frecuencia en MI y ES) o bien ser diagnosticada después de la ETC (más frecuente en AR)<sup>2,3</sup>. Por otro lado, las herramientas disponibles hoy en día para su detección conllevan importantes limitaciones. Las pruebas de función respiratoria (PFR), tales como la evaluación de la capacidad vital forzada (CVF), el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV1) y la capacidad de difusión del monóxido de carbono (DLCO), constituyen la herramienta básica para la monitorización de la progresión de la EPI<sup>6</sup>, pero no son útiles para el diagnóstico temprano de la enfermedad<sup>11</sup>. De hecho, los pacientes en fases iniciales de EPI pueden presentar una función pulmonar normal<sup>11</sup>. Actualmente, la tomografía axial computarizada de alta resolución (TACAR) es el *gold estándar* para el diagnóstico de la EPI<sup>11</sup>. Sin embargo, a pesar de su alta sensibilidad y especificidad, se ha visto que tiene cierto retraso en el diagnóstico, existe desacuerdo entre radiólogos a la hora de interpretarlo, y además, emite radiación, por lo que su indicación debe ser justificada<sup>11</sup>. Todo ello convierte al diagnóstico de ETC-EPI en etapas tempranas en un verdadero desafío para los clínicos.

Asimismo, el diagnóstico preciso de las ETC-EPI se complica por su similitud con la fibrosis pulmonar idiopática (FPI), la forma más común y con peor pronóstico de las EPI<sup>12,13</sup>. Diferenciarlas adecuadamente es crucial, dado que las ETC-EPI cursan, por lo general, con un mejor pronóstico que la FPI<sup>3,13</sup>, y requieren un abordaje terapéutico distinto<sup>13</sup>. Sin embargo, la FPI comparte características clínicas, radiológicas, patológicas y epidemiológicas con la ETC-EPI<sup>13</sup> lo que conduce a que el diagnóstico preciso de las EPI-ETC represente en ocasiones un importante reto en la práctica clínica diaria.

Considerando todas estas limitaciones diagnósticas, el mal pronóstico asociado a las ETC-EPI, y las diferencias en el enfoque terapéutico entre las diferentes entidades, es necesario abordar la problemática y buscar nuevas herramientas que complementen las técnicas actuales y mejoren la detección precoz y la precisión en el diagnóstico de la enfermedad.

En este escenario, numerosos estudios han demostrado la utilidad de los marcadores biológicos o biomarcadores como una herramienta en el diagnóstico de distintas

enfermedades de carácter inflamatorio y/o fibrótico<sup>14–16</sup>. Por lo tanto, la evaluación de los niveles de biomarcadores circulantes en la ETC-EPI podría constituir una herramienta diagnóstica más accesible y menos invasiva, que complementaría las técnicas actualmente empleadas. Pese a los avances en la identificación de biomarcadores potenciales en la ETC-EPI<sup>7,17–26</sup>, todavía no se ha encontrado ninguno lo suficientemente preciso para su aplicación en el ámbito hospitalario<sup>9</sup>.

Para identificar posibles biomarcadores, es fundamental comprender los mecanismos fisiopatológicos subyacentes a las ETC-EPI. Sin embargo, la etiología de las enfermedades pulmonares fibrosantes continúa siendo un enigma<sup>2</sup>. En las ETC-EPI se sugiere que hay algún desencadenante que induce una respuesta inmunitaria en el pulmón, reclutando células inflamatorias al intersticio pulmonar y espacios alveolares, lo que ocasiona daño epitelial y altera los mecanismos normales de reparación celular<sup>2</sup>. Como resultado, se inicia un remodelado defectuoso, que conduce al desarrollo de fibrosis y a la patología intersticial<sup>2</sup>. En algunas ETC, la afectación pulmonar podría ser el evento inicial. Algún factor en el pulmón desencadena la inflamación, lo que hace que se expresen autoantígenos y se produzcan autoanticuerpos<sup>2</sup>. La respuesta inflamatoria se perpetua con la unión antígeno-anticuerpo, lo que conduce a una mayor inflamación y fibrosis<sup>2</sup>.

En los últimos años se ha descrito una red compleja de vías de señalización profibróticas en la que los miofibroblastos desempeñan un papel crucial en la enfermedad fibrótica<sup>9,27–31</sup>. Los miofibroblastos son células determinantes en el proceso de cicatrización fisiológico ya que generan una fuerza contráctil que contribuye a la contracción de heridas y remodelación de la matriz extracelular, ayudando a cerrar lesiones y estabilizar tejidos<sup>29</sup>. En condiciones normales, los miofibroblastos desaparecen por apoptosis una vez completada la reparación<sup>29</sup>. Sin embargo, en procesos patológicos los miofibroblastos persisten, lo que favorece el desarrollo y progresión de la fibrosis<sup>29</sup>. En todas las formas de fibrosis estudiadas, los miofibroblastos son el denominador celular común, por lo que se ha postulado como célula determinante en el desarrollo de la fibrosis activa e irreversible<sup>31</sup>. Se han propuesto diversas hipótesis acerca del origen de los miofibroblastos, aunque el proceso más ampliamente estudiado es su transdiferenciación a partir de fibroblastos<sup>32</sup>. En este sentido, el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) se considera el principal agente profibrogénico<sup>29,30,32</sup>. TGF- $\beta$  regula de forma central la activación y la transdiferenciación de fibroblastos en miofibroblastos<sup>30</sup>. Además, estimula la síntesis y acumulación de matriz extracelular, al tiempo que inhibe su degradación mediante la inhibición de metaloproteasas, favoreciendo así la progresión del proceso fibrótico<sup>32</sup>. Existen tres isoformas del TGF- $\beta$ , conocidas como TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3<sup>30</sup>, de las cuales TGF- $\beta$ 1 es la más ampliamente expresada y asociada al desarrollo de fibrosis<sup>32</sup>. Es tan importante su papel que ya se ha visto aumentada la expresión proteica y activación de TGF- $\beta$ 1 en tejidos afectados por fibrosis, y en particular, en pacientes con EPI o con complicaciones pulmonares<sup>32–36</sup>.

Además del TGF- $\beta$ , se ha descrito otra molécula crucial en la fenotipo conversión a miofibroblastos, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)<sup>30</sup>. Los PDGF son potentes estimuladores de la división celular, necesarios para el crecimiento y proliferación celular<sup>30</sup>. Contribuyen a la formación de fibrosis pulmonar mediante la activación de fibroblastos<sup>30</sup>, y promueve la expresión de genes relacionados con la matriz extracelular<sup>9,30</sup>. En particular, los fibroblastos expresan 4 isoformas de PDGF (PDGF-A, -B, -C y -D), destacando PDGF-A, que forma un homodímero, PDGF-AA, y ejerce su acción a través del receptor PDGFR- $\alpha$ <sup>37</sup> controlando el desarrollo del tejido

pulmonar. De hecho, se ha observado que sus niveles proteicos están incrementados o hay una sobreexpresión proteica en casos de fibrosis<sup>30,38–41</sup>.

El avance en el conocimiento de PDGF y TGF- $\beta$  a nivel proteico en la patogénesis de las ETC-EPI indica el papel prometedor de estas moléculas en la fibrosis. Sin embargo, a pesar de la gran implicación que presenta la expresión génica en el desarrollo de las patologías fibrosantes, ningún estudio se ha centrado en determinar la influencia de la fibrosis pulmonar en sus formas génicas en las ETC-EPI. Consecuentemente, se plantea en el presente trabajo la hipótesis de que existe una alteración en la expresión génica en sangre de las isoformas de *PDGFA* y *TGFB* en los pacientes con ETC-EPI, lo cual reflejaría de forma precisa y precoz su afectación pulmonar, permitiendo diferenciarla de otras patologías como la ETC-noEPI y la FPI, cuyo diagnóstico representa hoy en día un reto en la práctica clínica.

Por ello, el objetivo de este estudio consistió en evaluar el papel de *PDGFA*, *TGFB1*, *TGFB2* y *TGFB3* como biomarcadores circulantes en sangre con valor clínico en el diagnóstico temprano y preciso de las ETC-EPI.

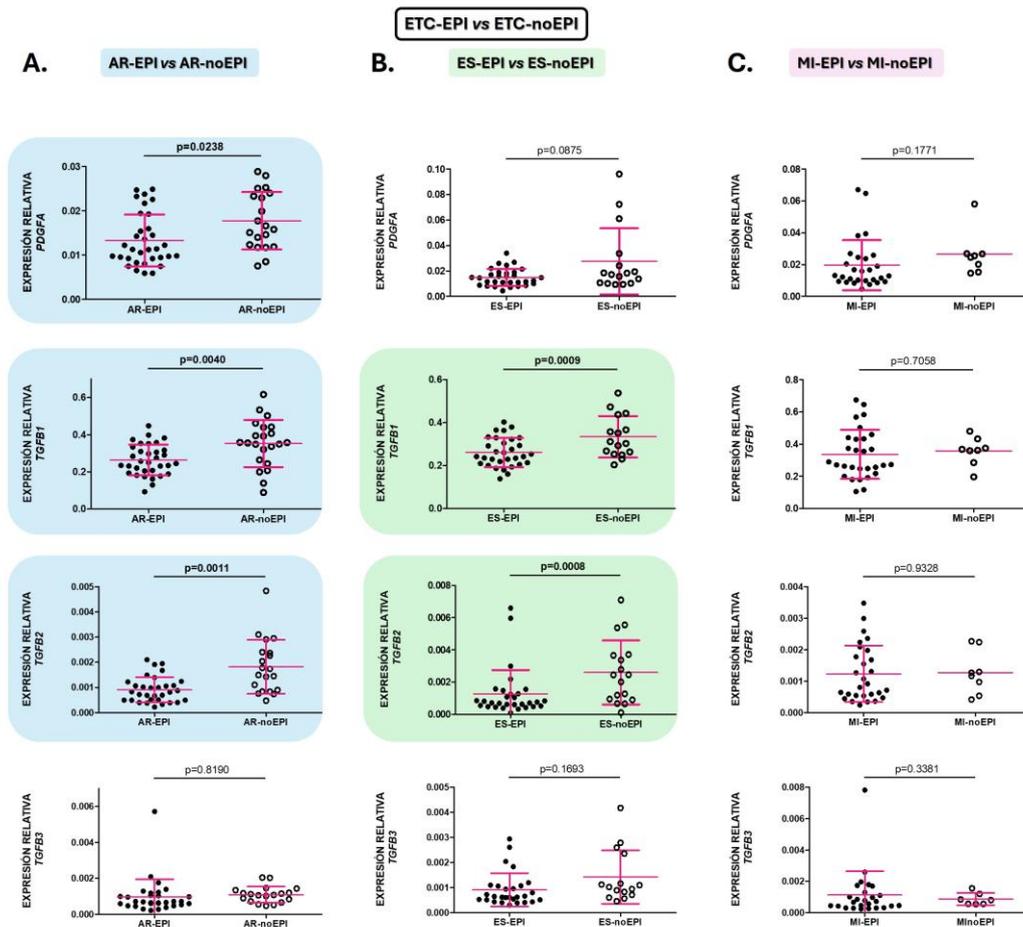
## RESULTADOS

### **Alteraciones en la expresión génica en sangre de *PDGFA*, *TGFB1* y *TGFB2* se asocian a la presencia de una EPI en pacientes con AR y ES**

Se observó una disminución estadísticamente significativa en la expresión génica de *TGFB1* y *TGFB2* en los pacientes con AR-EPI y ES-EPI en comparación con aquellos con AR sin una EPI asociada (AR-noEPI) y ES sin una EPI asociada (ES-noEPI) (*TGFB1*:  $p=0.0040$ , **Figura 1A** y  $p=0.0009$ , **Figura 1B**, respectivamente; y *TGFB2*:  $p=0.0011$ , **Figura 1A** y  $p=0.0008$ , **Figura 1B**, respectivamente).

Además, los pacientes con AR-EPI mostraron niveles de expresión de *PDGFA* significativamente más bajos que aquellos con AR-noEPI ( $p=0.0238$ , **Figura 1A**).

Por su parte, los pacientes con MI-EPI y con MI sin EPI asociada (MI-noEPI) mostraron una expresión de *PDGFA*, *TGFB1* y *TGFB2* similar (**Figura 1C**). Asimismo, la expresión génica de *TGFB3* no presentó diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos de los pacientes con ETC-EPI y aquellos con ETC sin una EPI asociada (ETC-noEPI) (**Figura 1**).



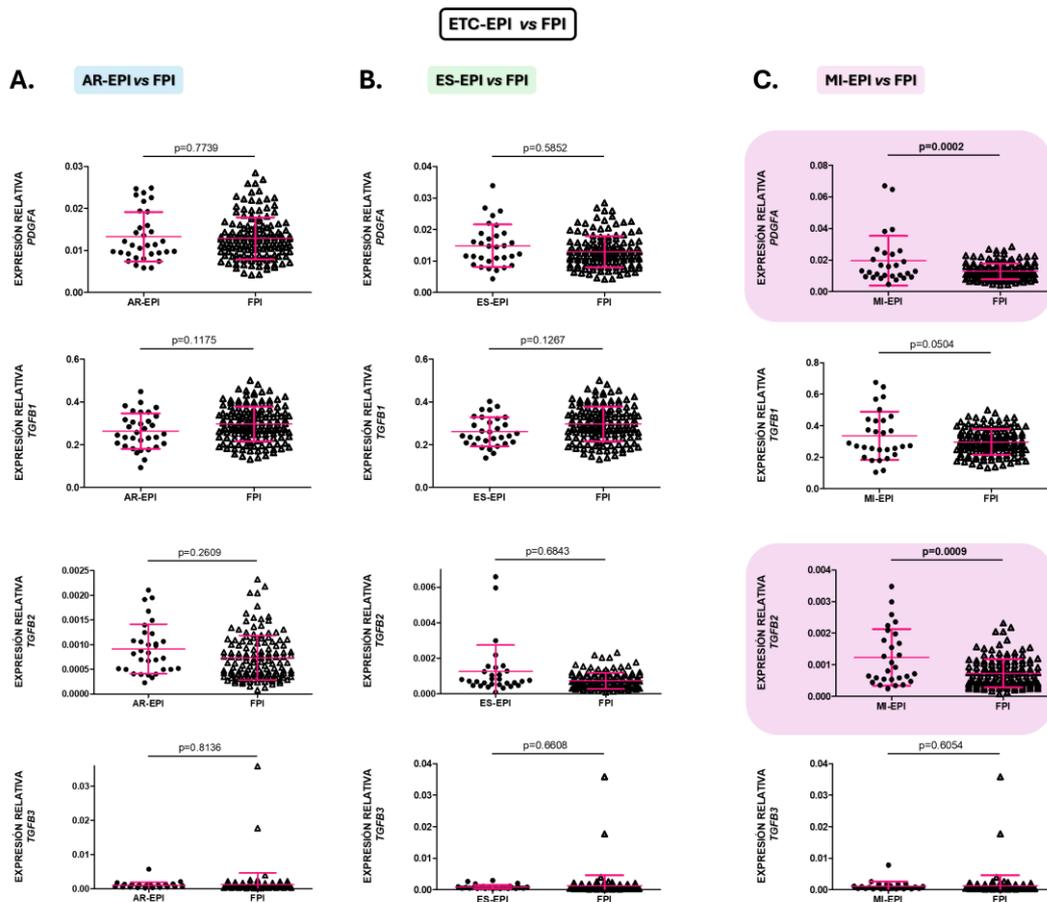
**Figura 1. Papel de *PDGFA*, *TGFBI*, *TGFBI2* y *TGFBI3* en la identificación de la EPI en los pacientes con ETC.**

Diferencias en los niveles de expresión en sangre de *PDGFA*, *TGFBI*, *TGFBI2* y *TGFBI3* de los pacientes con (A) AR-EPI frente a aquellos con AR-noEPI, (B) ES-EPI frente a aquellos con ES-noEPI, y (C) MI-EPI frente a aquellos con MI-noEPI. ETC: enfermedad del tejido conectivo; EPI: enfermedad pulmonar intersticial; ETC-noEPI: ETC sin una EPI asociada; AR: artritis reumatoide; AR-noEPI: AR sin EPI asociada; *PDGFA*: factor de crecimiento derivado de plaquetas subunidad A; *TGFBI*: factor de crecimiento transformante beta; ES: esclerosis sistémica; ES-noEPI: ES sin EPI asociada; MI: miopatía inflamatoria; MI-noEPI: MI sin EPI asociada. Los resultados significativos se resaltan con negrita y sombreado.

### Alteraciones en la expresión génica en sangre de *PDGFA* y *TGFBI2* caracterizan a los pacientes con MI-EPI en relación con aquellos con FPI

Los pacientes con MI-EPI presentaron un aumento estadísticamente significativo en la expresión génica de *PDGFA* y *TGFBI2* en comparación con los pacientes con FPI ( $p=0.0002$  y  $p=0.0009$ , respectivamente, **Figura 2C**). En cuanto a la expresión de los genes *TGFBI* y *TGFBI3*, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (**Figura 2C**).

Los pacientes con AR-EPI y ES-EPI revelaron una expresión de los genes analizados (*PDGFA*, *TGFBI*, *TGFBI2* y *TGFBI3*) similar a los pacientes con FPI (**Figura 2A y 2B**).



**Figura 2. Papel de *PDGFA*, *TGFB1*, *TGFB2* y *TGFB3* en la discriminación entre los pacientes con ETC-EPI y FPI.**

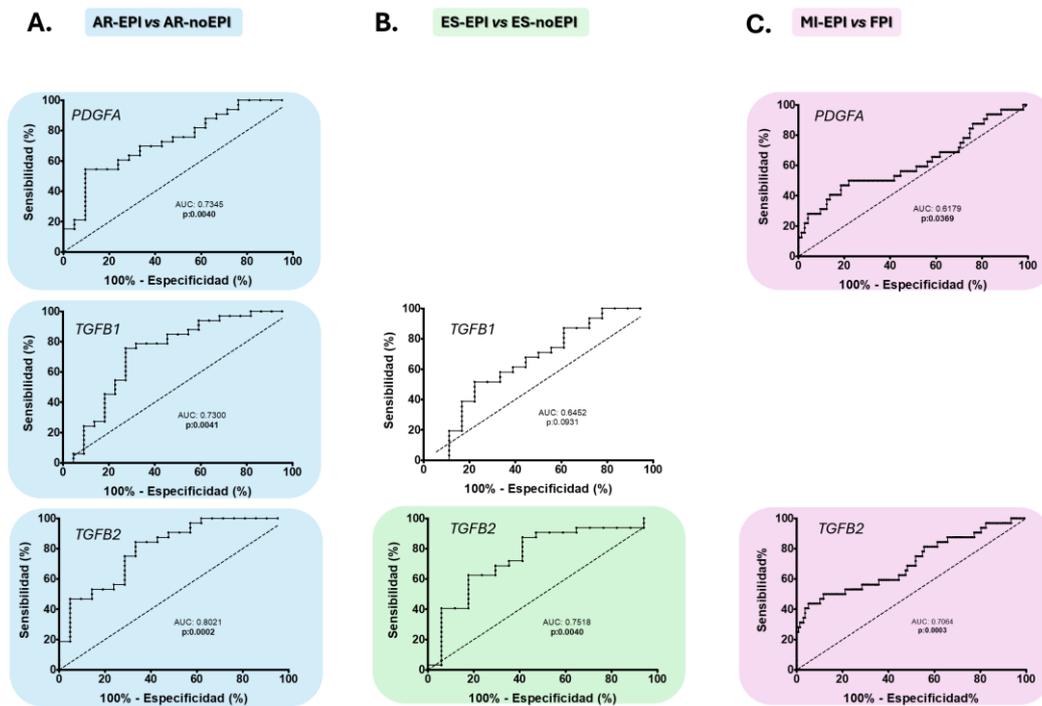
Diferencias en los niveles de expresión en sangre de *PDGFA*, *TGFB1*, *TGFB2* y *TGFB3* de los pacientes con (A) AR-EPI frente a FPI, (B) ES-EPI frente a FPI, y (C) MI-EPI frente a FPI. ETC: enfermedad del tejido conectivo; EPI: enfermedad pulmonar intersticial; FPI: fibrosis pulmonar idiopática; AR: artritis reumatoide; *PDGFA*: factor de crecimiento derivado de plaquetas subunidad A; *TGFB*: factor de crecimiento transformante beta; ES: esclerosis sistémica; MI: miopatía inflamatoria. Los resultados significativos se resaltan con negrita y sombreado.

### ***PDGFA*, *TGFB1* y *TGFB2* como biomarcadores de diagnóstico precoz de la EPI en pacientes con AR y ES**

El análisis de curvas de características operativas del receptor (ROC) confirmó que la evaluación de la expresión de *PDGFA*, *TGFB1* y *TGFB2* permitió diferenciar de forma efectiva a los pacientes con AR que presentaron una EPI de aquellos que no la desarrollaron, actuando como biomarcadores de detección precoz de la AR-EPI (área bajo la curva (AUC): 0.7345,  $p=0.0040$ , AUC:0.7300,  $p=0.0041$ , AUC=0.8021,  $p=0.0002$ , respectivamente, **Figura 3A**). Los valores del punto de corte óptimos que alcanzaron la mejor sensibilidad y especificidad para *PDGFA*, *TGFB1* y *TGFB2* para la identificación de la EPI en la AR fueron  $<0.01153$ ,  $<0.3185$  y  $<0.001410$ , respectivamente.

Asimismo, los niveles de expresión de *TGFB2* también demostraron una capacidad de discriminación entre los pacientes con ES-EPI y aquellos con una ES sin una EPI asociada, actuando como un biomarcador de diagnóstico temprano de la ES-EPI

(AUC:0.7518,  $p=0.0040$ , **Figura 3B**). El valor óptimo del punto de corte para la mayor sensibilidad y especificidad fue  $<0.0018$ . A pesar de que se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión génica de *TGFB1* en pacientes con ES-EPI en comparación con aquellos con ES-noEPI, el análisis de ROC no confirmó que *TGFB1* presentara la capacidad suficiente para diferenciar estos dos grupos de pacientes (**Figura 3B**).



**Figura 3. Papel de *PDGFA*, *TGFB1* y *TGFB2* como biomarcadores de diagnóstico precoz de la EPI en las ETC, y de diagnóstico diferencial entre las ETC-EPI y la FPI.**

Análisis de curvas ROC de *PDGFA*, *TGFB1* y *TGFB2* para discriminar pacientes con (A) AR-EPI y AR-noEPI, (B) ES-EPI y ES-noEPI, y (C) MI-EPI y FPI. AR: artritis reumatoide; EPI: enfermedad pulmonar intersticial; AR-noEPI: AR sin EPI asociada; *PDGFA*: factor de crecimiento derivado de plaquetas subunidad A; AUC: área bajo la curva; *TGFB*: factor de crecimiento transformante beta; ES: esclerosis sistémica; ES-noEPI: ES sin EPI asociada; MI: miopatía inflamatoria; FPI: fibrosis pulmonar idiopática. Los resultados significativos se resaltan con negrita y sombreado.

### ***PDGFA* y *TGFB2* como biomarcadores de diagnóstico diferencial entre pacientes con MI-EPI y FPI**

Las diferencias en la expresión génica de *PDGFA* y *TGFB2* demostraron ser suficientes para diferenciar a los pacientes con MI-EPI de aquellos con FPI mediante el análisis ROC, actuando como biomarcadores de diagnóstico preciso de la MI-EPI (AUC:0.6179,  $p=0.0369$  y AUC:0.7064,  $p=0.0003$ , respectivamente, **Figura 3C**). El valor del punto de corte óptimo para el diagnóstico de MI-EPI vs FPI con la mejor sensibilidad y especificidad fue  $>0.0166$  para *PDGFA* y  $>0.001547$  para *TGFB2*.

**Los niveles de expresión génica en sangre de *PDGFA*, *TGFB2* y *TGFB3* se asocian al pronóstico de los pacientes con AR-EPI y ES-EPI**

En pacientes con AR-EPI se observó una correlación entre *PDGFA* y el patrón radiológico en el TACAR evidenciada por niveles de expresión génica significativamente más bajos en pacientes con un patrón neumonía intersticial usual (NIU), probablemente NIU o indeterminado para NIU que en aquellos con un patrón radiológico de neumonía intersticial no específica (NINE) o no NINE ( $0.0120 \pm 0.0058$  vs  $0.0161 \pm 0.0053$ , respectivamente,  $p=0.044$ , **Tabla 1**). En estos mismos pacientes, también se encontró una disminución significativa de los niveles de *TGFB2* en los pacientes positivos para los anticuerpos anti-péptido cíclico citrulinado (anti-CCP) en relación con aquellos que no los presentaban ( $0.0009 \pm 0.0005$  vs  $0.0032 \pm 0.0048$ ,  $p=0.010$ , **Tabla 1**). En cuanto a otras características clínicas, como la presencia de patología fibrosante progresiva, el uso de distintos tratamientos, duración de la AR y la EPI y PFR, no se observaron diferencias significativas en la expresión de los genes analizados (**Tabla 1**).

Variable	PDGFA		TGFB1		TGFB2		TGFB3	
	r	p	r	p	r	p	r	p
Duración de la AR	0.23	0.24	0.37	0.05	-0.07	0.74	0.06	0.78
Duración de la EPI	-0.06	0.77	0.17	0.38	-0.15	0.42	-0.09	0.63
CVF (% predicho)	-0.21	0.28	-0.22	0.26	-0.16	0.40	0.22	0.25
FEV1 (% predicho)	-0.19	0.31	-0.27	0.16	-0.21	0.29	0.35	0.07
DLCO (% predicho)	0.04	0.88	-0.36	0.13	0.17	0.48	-0.06	0.82
Categorías	MEDIA ± DE	p	MEDIA ± DE	p	MEDIA ± DE	p	MEDIA ± DE	p
Anti-CCP <sup>-</sup>	0.0131±0.0073	0.89	0.2560±0.0772	0.95	0.0032±0.0048	<b>0.01</b>	0.0018±0.0026	0.97
Anti-CCP <sup>+</sup>	0.0134±0.0060		0.2611±0.0847		0.0009±0.0005		0.0078±0.0360	
FR <sup>-</sup>	0.0162±0.0067	0.43	0.3314±0.0213	0.16	0.0011±0.0006	0.97	0.0008±0.0002	0.65
FR <sup>+</sup>	0.0130±0.0060		0.2531±0.0833		0.0012±0.0018		0.0077±0.0353	
NIU, probablemente NIU o indeterminado para NIU	0.0120±0.0058	<b>0.04</b>	0.2499±0.0794	0.17	0.0013±0.0020	0.72	0.0010±0.0011	0.52
NINE o no-NINE	0.0161±0.0053		0.2939±0.0867		0.0010±0.0052		0.0196±0.0592	
Patología fibrosante progresiva <sup>-</sup>	0.0137±0.0057	0.33	0.2739±0.0778	0.09	0.0012±0.0018	0.80	0.0077±0.0353	0.92
Patología fibrosante progresiva <sup>+</sup>	0.0109±0.0073		0.2032±0.0938		0.0010±0.0007		0.0008±0.0004	
Fármacos antifibróticos <sup>-</sup>	0.0134±0.0059	0.37	0.2650±0.0836	0.48	0.0012±0.0017	0.57	0.0070±0.0359	0.95
Fármacos antifibróticos <sup>+</sup>	0.0080±0.0000		0.2052±0.0000		0.0019±0.0000		0.0014±0.0000	
DMARDs sintéticos <sup>-</sup>	0.0118±0.0040	0.31	0.2595±0.0830	0.90	0.0009±0.0005	0.29	0.0008±0.0004	0.40
DMARDs sintéticos <sup>+</sup>	0.0140±0.0068		0.2649±0.0876		0.0015±0.0023		0.0121±0.0453	
DMARDs biológicos <sup>-</sup>	0.0125±0.0048	0.58	0.2425±0.0730	0.08	0.0009±0.0005	0.28	0.0106±0.0429	0.52
DMARDs biológicos <sup>+</sup>	0.0136±0.0071		0.2954±0.0938		0.0017±0.0028		0.0012±0.0015	

**Tabla 1. Relación de la expresión génica de PDGFA, TGFB1, TGFB2 y TGFB3 con las características clínicas de los pacientes AR-EPI.**

PDGFA: factor de crecimiento derivado de plaquetas subunidad A; AR: artritis reumatoide; EPI: enfermedad pulmonar intersticial; CVF: capacidad vital forzada; FEV1: volumen espiratorio forzado 1; DLCO: capacidad de difusión del monóxido de carbono; Anti-CCP: anticuerpos anti-péptidos cítricos citrulinados; FR: factor reumatoide; NIU: neumonía intersticial usual; NINE: neumonía intersticial no específica; DMARDs: fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad; DE: desviación estándar; TGFB: factor de crecimiento transformante beta. Los resultados significativos se resaltan en negrita.

En relación a los pacientes con ES-EPI, se observó una correlación positiva entre los niveles de expresión génica de *TGFB2* y el FEV1 (% predicho), de modo que los niveles de expresión del gen eran más bajos cuanto menor era el FEV1 ( $r=0.40$ ,  $p=0.04$ , **Tabla 2**). Asimismo, encontramos una correlación entre los niveles génicos de *TGFB3* y el patrón radiológico en TACAR, mostrando niveles de *TGFB3* elevados con la presencia de un patrón NIU, probablemente NIU o indeterminado para NIU en relación al patrón NINE o no-NINE ( $0.0069 \pm 0.0177$  vs  $0.0010 \pm 0.0007$ ,  $p=0.021$ , **Tabla 2**). Adicionalmente, el desarrollo de una patología fibrosante progresiva también influyó en los niveles de *TGFB3*, siendo su expresión más alta en los pacientes que la presentaron ( $0.0073 \pm 0.0176$  vs  $0.0073 \pm 0.0176$ ,  $p=0.024$ , **Tabla 2**). En relación a las características clínicas de presencia de anticuerpos específicos para la ES, uso de tratamientos, duración de la AR y la EPI y PFR, los niveles de expresión de los genes estudiados fueron similares en todos los pacientes (**Tabla 2**).

Variable	PDGFA		TGFB1		TGFB2		TGFB3	
	r	p	r	p	r	p	r	p
Duración de la ES	0.04	0.84	-0.15	0.45	-0.13	0.53	-0.02	0.91
Duración de la EPI	-0.12	0.54	-0.15	0.46	-0.22	0.27	-0.06	0.78
CVF (% predicho)	0.24	0.22	0.07	0.74	0.35	0.08	-0.21	0.33
FEV1 (% predicho)	0.30	0.13	0.16	0.42	<b>0.40</b>	<b>0.04</b>	-0.18	0.39
DLCO (% predicho)	0.09	0.70	-0.18	0.44	0.22	0.38	-0.21	0.40
Categorías	MEDIA ± DE	p	MEDIA ± DE	p	MEDIA ± DE	p	MEDIA ± DE	p
ANAs <sup>-</sup>	0.0044±0.0000	0.10	0.3220±0.0000	0.71	0.0001±0.0000	0.30	0.0004±0.0000	0.63
ANAs <sup>+</sup>	0.0155±0.0652		0.2604±0.6789		0.0013±0.0015		0.0028±0.0096	
Anticentrómero <sup>-</sup>	0.0154±0.0067	0.46	0.2624±0.0688	0.94	0.0013±0.0015	0.66	0.0028±0.0096	0.97
Anticentrómero <sup>+</sup>	0.0070±0.0000		0.2639±0.0000		0.0007±0.0000		0.0007±0.0000	
Anti-Scl-70 <sup>-</sup>	0.0126±0.0036	0.13	0.2609±0.0335	0.72	0.0012±0.0018	0.92	0.0011 ±0.0005	0.29
Anti-Scl-70 <sup>+</sup>	0.0172±0.0076		0.2673±0.0839		0.0013±0.0015		0.0040±0.0125	
NIU, probablemente NIU o indeterminado para NIU	0.0137±0.0077	0.88	0.2580±0.0859	0.70	0.0005±0.0002	0.08	0.0069±0.0177	<b>0.02</b>
NINE o no-NINE	0.0153±0.0067		0.2618±0.0638		0.0016±0.0017		0.0010±0.0007	
Patología fibrosante progresiva <sup>-</sup>	0.0153±0.0646	0.76	0.2613±0.0607	0.48	0.0013±0.0014	0.86	0.0009±0.0006	<b>0.02</b>
Patología fibrosante progresiva <sup>+</sup>	0.0135±0.0078		0.2569±0.0896		0.0013±0.0019		0.0073±0.0176	
Fármacos antifibróticos <sup>-</sup>	0.0149±0.0067	0.60	0.2587±0.0687	0.86	0.0013±0.0015	0.46	0.0028±0.0096	0.89
Fármacos antifibróticos <sup>+</sup>	0.0146±0.0095		0.2813±0.0670		0.0006±0.0002		0.0007±0.0005	
DMARDs sintéticos <sup>-</sup>	0.0152±0.0040	0.95	0.2505±0.0676	0.30	0.0018±0.0021	0.56	0.0011±0.0005	0.77
DMARDs sintéticos <sup>+</sup>	0.0151±0.0076		0.2663±0.0738		0.0012±0.0014		0.0033±0.0112	
DMARDs biológicos <sup>-</sup>	0.0159±0.0069	0.88	0.2459±0.0619	0.14	0.0017±0.0020	0.40	0.0047±0.0138	0.65
DMARDs biológicos <sup>+</sup>	0.0156±0.0076		0.2971±0.0801		0.0011±0.0009		0.0010±0.0009	
Fármacos vasodilatadores <sup>-</sup>	0.0156±0.0678	0.78	0.2956±0.0670	0.46	0.0012±0.0009	0.42	0.0010±0.0008	0.91
Fármacos vasodilatadores <sup>+</sup>	0.0159±0.0074		0.2527±0.0732		0.0016±0.0019		0.0042±0.1288	

**Tabla 2. Relación de la expresión génica de PDGFA, TGFB1, TGFB2 y TGFB3 con las características clínicas de los pacientes ES-EPI.**

PDGFA: factor de crecimiento derivado de plaquetas subunidad A; ES: esclerosis sistémica; EPI: enfermedad pulmonar intersticial; CVF: capacidad vital forzada; FEV1: volumen espiratorio forzado 1; DLCO: capacidad de difusión del monóxido de carbono; ANAs: anticuerpos antinucleares; Anti-Scl-70: anticuerpos anti-topoisomerasa I; NIU: neumonía intersticial usual; NINE: neumonía intersticial no específica; DMARDs: fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad; DE: desviación estándar; TGFB: factor de crecimiento transformante beta. Los resultados significativos están indicados en negrita.

Respecto a los pacientes con MI-EPI, no se encontraron diferencias significativas en la expresión de *PDGFA*, *TGFB1*, *TGFB2* y *TGFB3* para ninguna de las características clínicas evaluadas (**Tabla 3**).

Variable	PDGFA		TGFB1		TGFB2		TGFB3	
	r	p	r	p	r	p	r	p
Duración de la MI	-0.20	0.32	0.02	0.93	0.01	0.96	0.17	0.43
Duración de la EPI	0.14	0.53	0.02	0.92	-0.16	0.48	0.14	0.53
CVF (% predicho)	0.05	0.80	-0.03	0.88	-0.16	0.48	0.01	0.96
FEV1 (% predicho)	0.08	0.73	0.01	0.97	-0.07	0.74	-0.04	0.85
DLCO (% predicho)	-0.09	0.75	-0.11	0.70	-0.08	0.80	0.43	0.14
Categorías	MEDIA ± DE	p						
Anti-Jo1 <sup>-</sup>	0.0216±0.0201	0.90	0.3334±0.1490	0.81	0.0013±0.0009	0.38	0.0073±0.0284	0.59
Anti-Jo1 <sup>+</sup>	0.0236±0.0234		0.3513±0.1891		0.0009±0.0007		0.0006±0.0006	
Anti-PL7 <sup>-</sup>	0.0226±0.0198	0.79	0.3507±0.1601	0.40	0.0012±0.0008	0.50	0.0072±0.0284	0.61
Anti-PL7 <sup>+</sup>	0.0195±0.0236		0.2822±0.1169		0.0016±0.0011		0.0010±0.0005	
Anti-PL12 <sup>-</sup>	0.0222±0.0212	0.82	0.3329±0.1467	0.72	0.0012±0.0009	0.83	0.0067±0.0272	0.72
Anti-PL12 <sup>+</sup>	0.0193±0.0094		0.3679±0.2380		0.0011±0.0006		0.0010±0.0007	
NIU, probablemente NIU o indeterminado para NIU	0.0251±0.0199	0.73	0.3454±0.1684	0.89	0.0013±0.0009	0.60	0.0011±0.0007	0.11
NINE o no-NINE	0.0201±0.0249		0.3279±0.1572		0.0011±0.0010		0.0007±0.0005	
Patología fibrosante progresiva <sup>-</sup>	0.0213±0.0204	0.62	0.3346±0.1444	0.81	0.0012±0.0010	0.68	0.0070±0.0285	0.57
Patología fibrosante progresiva <sup>+</sup>	0.0287±0.0312		0.3197±0.3097		0.0014±0.0008		0.0008±0.0008	
Fármacos antifibróticos <sup>-</sup>	0.0225±0.0216	0.71	0.3498±0.1542	0.11	0.0012±0.0009	0.96	0.0067±0.0278	0.99
Fármacos antifibróticos <sup>+</sup>	0.0107±0.0030		0.1421±0.0526		0.0011±0.0009		0.0004±0.0001	
DMARDs sintéticos <sup>-</sup>	0.0282±0.0272	0.60	0.3761±0.1588	0.29	0.0016±0.0011	0.11	0.0010±0.0006	0.09
DMARDs sintéticos <sup>+</sup>	0.0173±0.0107		0.2997±0.1489		0.0009±0.0007		0.0101±0.0344	
DMARDs biológicos <sup>-</sup>	0.0261±0.0223	0.21	0.3537±0.1721	0.42	0.0012±0.0009	0.98	0.0075±0.0291	0.84
DMARDs biológicos <sup>+</sup>	0.0111±0.0060		0.2796±0.0732		0.0012±0.0010		0.0009±0.0006	

**Tabla 3. Relación de la expresión génica de PDGFA, TGFB1, TGFB2 y TGFB3 con las características clínicas de los pacientes MI-EPI.**

PDGFA: factor de crecimiento derivado de plaquetas subunidad A; MI: miopatía inflamatoria; EPI: enfermedad pulmonar intersticial; CVF: capacidad vital forzada; FEV1: volumen espiratorio forzado 1; DLCO: capacidad de difusión del monóxido de carbono; Anti-Jo1: anticuerpos anti-histidil tRNA sintetasa; Anti-PL7: anticuerpos anti-treonil tRNA sintetasa; Anti-PL12: anticuerpos anti-alanil tRNA sintetasa; NIU: neumonía intersticial usual; NINE: neumonía intersticial no específica; DMARDs: fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad; DE: desviación estándar; TGFB: factor de crecimiento transformante beta.

## DISCUSIÓN

Dentro del contexto de las ETC, la EPI representa una importante causa de morbilidad y mortalidad<sup>1,3</sup>. Sin embargo, su diagnóstico temprano y preciso constituye un verdadero reto en la práctica clínica, dado que la etiopatogenia no se conoce completamente<sup>2</sup>, y en ocasiones, los pacientes manifiestan síntomas inespecíficos o son asintomáticos<sup>4,11</sup>. Además, las herramientas de las que disponemos hoy en día para su diagnóstico presentan importantes limitaciones<sup>11</sup>. Por ello, surge la necesidad de encontrar métodos complementarios más accesibles y poco invasivos, como los biomarcadores sanguíneos, que ayuden al diagnóstico de la enfermedad y mejore el pronóstico y la calidad de vida de estos pacientes. En este contexto, PDGF y TGF- $\beta$  se han descrito como moléculas clave en la fenoc conversión de fibroblastos en miofibroblastos<sup>30</sup>, célula esencial en el desarrollo de la fibrosis<sup>31</sup>, considerándose como los principales factores profibrogénicos<sup>30</sup>. De este modo, este trabajo se enfoca en evaluar el papel de *PDGFA*, *TGFB1*, *TGFB2* y *TGFB3* como posibles biomarcadores circulantes en sangre para el diagnóstico precoz y preciso de las ETC-EPI.

Nuestros resultados demuestran, por primera vez, que los factores profibróticos *PDGFA* y *TGFB* son candidatos prometedores para el diagnóstico temprano y preciso de las ETC-EPI, pudiendo ser el análisis de su expresión génica la clave para desarrollar herramientas complementarias que resuelvan esta problemática.

Por un lado, la identificación temprana de una EPI en la AR, la ES y la MI es crucial debido a la alta morbilidad y mortalidad asociada al desarrollo de la enfermedad pulmonar<sup>1-4</sup>. Con el fin de abordar el problema, nuestro estudio reveló que la expresión génica en sangre de *PDGFA*, *TGFB1* y *TGFB2* es capaz de distinguir entre pacientes con AR-EPI y aquellos que tenían una AR sin una complicación pulmonar asociada, siendo más baja la expresión génica en aquellos pacientes que presentaban la EPI. El rol de TGF- $\beta$  en la fibrosis ha sido ampliamente demostrado<sup>29,30,32</sup>, sin embargo no existe ningún estudio centrado en elucidar el papel de las isoformas de *TGFB* ni de *PDGFA* específicamente en la fibrosis pulmonar desarrollada en la AR. Hasta el momento, todos los trabajos realizados en la AR-EPI se han focalizado en la forma proteica. En este contexto, una revisión sistemática ya había identificado a TGF- $\beta$ 1 como potencial biomarcador periférico para caracterizar la enfermedad<sup>42</sup>. En línea con ello, otras investigaciones demostraron que la molécula TGF- $\beta$ 1 estaba aumentada en el suero de los pacientes con una AR-EPI frente a aquellos sin EPI, proponiéndola como un marcador biológico para identificar a estos pacientes<sup>33,36</sup>. De forma similar, una isoforma de PDGF, particularmente PDGF-AB, se ha visto incrementada en el suero de pacientes con AR-EPI frente a aquellos sin la patología pulmonar<sup>36</sup>. Es importante mencionar que todos estos trabajos evaluaron los niveles de proteínas en suero y no la expresión génica en sangre, por lo que los resultados no son estrictamente comparables, pero sí pueden ser complementarios. En este sentido, se sabe que los procesos biológicos de transcripción y traducción son susceptibles de numerosos mecanismos de regulación que adaptan la actividad génica a las necesidades del organismo. Por lo tanto, estos estudios son consistentes con nuestros hallazgos, ya que, es lógico pensar que el incremento de los niveles de la forma proteica de las moléculas activa un proceso de retroalimentación negativa que reprime la expresión de los genes que las codifican en sangre, denotando un mecanismo de compensación que se ve representado en los resultados observados en nuestros pacientes con AR-EPI. En línea con nuestra hipótesis, otros autores han encontrado niveles proteicos de PDGF-AB más altos en el

lavado broncoalveolar de pacientes con una AR-EPI en relación con aquellos con AR-noEPI<sup>34</sup>, apoyando de nuevo el mecanismo compensatorio propuesto, dado que el mayor nivel de la proteína en tejido pulmonar podría ser la razón de encontrar una menor expresión del gen en sangre periférica.

Por lo tanto, nuestro trabajo es el primero en revelar la importancia de la evaluación de la expresión génica de *PDGFA*, *TGFB1* y *TGFB2* como una herramienta adicional para mejorar la identificación precoz de la EPI en los pacientes con AR, reforzando la relevancia del estudio génico para el diagnóstico temprano de la AR-EPI que ya remarcaban otros autores<sup>43</sup>.

Es de resaltar que *TGFB2* evidenció un comportamiento similar en los pacientes con ES-EPI ya que su evaluación génica en sangre fue capaz de diferenciar a los pacientes con ES-EPI frente a aquellos con ES-noEPI, siendo de nuevo su expresión más baja en los pacientes con EPI. La implicación de TGF- $\beta$  en la fisiopatología de la ES y sus manifestaciones clínicas, como la afectación pulmonar, ya había sido previamente demostrada<sup>44-46</sup>. Además, varios estudios mencionaban que la molécula TGF- $\beta$  es un potencial biomarcador en ES-EPI, viéndose aumentada en tejidos fibróticos<sup>47</sup>. Sin embargo, no se ha realizado ningún esfuerzo por indagar sobre el papel de esta molécula ni sus isoformas a nivel génico. Los trabajos a nivel génico se han llevado a cabo para estudiar su vía de señalización, en donde se ha demostrado que la expresión de los genes regulados por TGF- $\beta$  está aumentada en el tejido pulmonar fibrótico de los pacientes con esta enfermedad<sup>35</sup>. En conjunto, estos trabajos y nuestros resultados refuerzan la idea previamente planteada que postula que la menor expresión del gen *TGFB2* en la sangre de los pacientes con ES-EPI es la consecuencia de un mecanismo regulador compensatorio que reprime la expresión del gen por su sobreexpresión a nivel sérico y tisular. Por lo tanto, nuestros hallazgos apuntan, por primera vez, a *TGFB2* como un nuevo biomarcador prometedor para identificar la EPI en los pacientes con ES.

Por otro lado, debido a la similitud clínica, radiológica y patológica entre las ETC-EPI y la FPI, y su distinto pronóstico y abordaje terapéutico<sup>13</sup>, es esencial distinguirlos correctamente. Nuestro estudio reveló que *PDGFA* y *TGFB2* discriminan la MI-EPI de la FPI, siendo su expresión génica más elevada en los pacientes con la conectivopatía subyacente. Coincidente con nuestros resultados, una investigación observó también un nivel de expresión más bajo del gen *PDGFA* en pacientes con FPI en comparación con pacientes sanos<sup>48</sup>. Otro estudio encontró en pacientes con MI niveles más bajos de la molécula PDGF-AA en suero en comparación con sujetos sanos<sup>49</sup>, demostrando un papel relevante de esta vía en la enfermedad. No obstante, ninguno de los estudios incluyó comparaciones con pacientes con MI que manifestaran una EPI asociada, y en el segundo, además, se estudió la molécula a nivel sérico. Por su parte, numerosos artículos explican el importante rol de TGF- $\beta$  tanto en la FPI<sup>28,50,51</sup>, como en la MI<sup>52,53</sup>. Sin embargo, no hay ningún estudio sobre la expresión génica en sangre de *TGFB2* en las MI-EPI y FPI. Por tanto, nuestra investigación es la primera en demostrar que tanto *PDGFA* como *TGFB2* podrían actuar como biomarcadores para distinguir entre ambas enfermedades.

Poniendo en común todos los resultados expuestos anteriormente, se observa que los pacientes que presentan una fibrosis pulmonar, tanto en ETC-EPI como en FPI, se caracterizan por tener niveles de expresión de los factores profibróticos estudiados más bajos en sangre periférica que aquellos que carecen de dicha fibrosis, como en las ETC-noEPI, ya que proponemos que al haber una sobreexpresión de la proteína que codifica a nivel tisular y sérico, se podría estar poniendo en marcha un mecanismo

compensatorio que regula los niveles génicos en sangre. Además, en los casos de fibrosis pulmonar más grave, como la FPI, la disminución de dicha expresión es aún más marcada, posiblemente en respuesta a una mayor producción de dichas proteínas a nivel tisular y sérico que la que ocurre en los pacientes con una fibrosis pulmonar con mejor pronóstico, como la ETC-EPI.

Por último, es importante distinguir la severidad de cada ETC-EPI con el objetivo de detener la progresión de la fibrosis antes de que se produzca un daño irreversible. De forma notable, nuestros resultados proponen a *PDGFA* como un indicador pronóstico de la AR-EPI ya que observamos que los niveles de expresión génica de *PDGFA* en sangre periférica eran significativamente más bajos en aquellos con patrones radiológicos considerados más graves y de peor pronóstico (patrón radiológico NIU, probablemente NIU o indeterminado)<sup>2</sup> que en los que presentaban un patrón con mejor pronóstico (NINE o no-NINE)<sup>2</sup>. Además, en estos mismos pacientes, también encontramos niveles más bajos de *TGFB2* en aquellos que tenían anticuerpos anti-CCP circulantes, los cuales se asocian a una mayor incidencia de EPI en la AR y a su evolución a formas más graves<sup>54</sup>. Ninguna investigación previa ha estudiado estas correlaciones con los genes *PDGFA* y *TGFB2*, siendo la nuestra la primera en descubrir su importante papel en el pronóstico de la AR-EPI. Estos hallazgos concuerdan con los resultados previos, ya que, nuevamente, los niveles bajos de expresión génica se asocian a la presencia de características clínicas propias del desarrollo de fibrosis pulmonar y, además, a que esta sea más grave o de peor pronóstico.

Adicionalmente, en los pacientes con ES-EPI encontramos una correlación positiva entre los niveles de expresión génica en sangre de *TGFB2* y el FEV1(% predicho), lo que indica que una menor expresión de *TGFB2* se asocia con menor capacidad funcional pulmonar, y, por tanto, con un peor pronóstico. Una investigación previa también encontró una correlación significativa, en este caso negativa, entre los niveles de molécula TGF- $\beta$  en esputo, y el FEV1 anual, concluyendo que mayores concentraciones de esta proteína se asocian con un mayor deterioro de la función pulmonar a lo largo del tiempo<sup>55</sup>. Aunque en dicho estudio se agruparon pacientes con ES y ES-EPI y se evaluó la proteína en esputo, nuestros hallazgos e hipótesis mencionados anteriormente se ven reforzados, ya que niveles elevados de TGF- $\beta$ , junto con una menor expresión génica de *TGFB2*, como mecanismo compensatorio, se relacionan con una peor función pulmonar.

Además, en estos pacientes observamos de nuevo una correlación con un peor pronóstico, en este caso con la expresión génica de *TGFB3*, ya que dicha expresión es más alta en aquellos pacientes con el patrón radiológico más grave (patrón NIU) y con la patología progresiva. Estos hallazgos nos indican que *TGFB3* parece alterarse de otra forma a los otros genes estudiados, hecho que está de acuerdo con que, aunque también participa en procesos fibróticos y se ha visto aumentado en tejido fibrótico pulmonar, su activación y señalización difieren de otras citoquinas profibróticas como *TGFB1*<sup>56</sup>. Además, *TGFB3* podría ejercer un papel menos potente y más regulado, con funciones posiblemente moduladoras en el entorno fibrótico. Nuestra investigación es la primera en exponer la importante correlación de la expresión de *TGFB2* y *TGFB3* con el pronóstico en la ES-EPI.

En resumen, nuestros hallazgos evidencian el gran potencial como biomarcadores sanguíneos de *TGFB2* para identificar precozmente la EPI en la AR y la ES; *PDGFA* y *TGFB1*, para diagnosticar la EPI específicamente en la AR; *PDGFA*, y *TGFB2* para

discriminar MI-EPI de FPI; así como *PDGFA*, *TGFB2* y *TGFB3* para determinar el pronóstico de la AR-EPI y la ES-EPI. Estos resultados son la base que apunta a dichas moléculas como candidatas idóneas para investigaciones posteriores que confirmen su papel y permitan finalmente el desarrollo de una futura herramienta complementaria adicional, no invasiva y fácil de implementar en la práctica clínica, que podría mejorar el diagnóstico precoz y preciso de las ETC-EPI, reduciendo así la progresión de la EPI a estadios de fibrosis irreversible y, en consecuencia, la mortalidad asociada a esta enfermedad.

En conclusión, *PDGFA* y *TGFB* constituyen biomarcadores en sangre con valor clínico para el diagnóstico temprano y preciso de la ETC-EPI, contribuyendo al abordaje del desafío que supone esta enfermedad en la práctica clínica.

## METODOLOGÍA

### Población de estudio

En el presente estudio se reclutaron un total de 289 pacientes procedentes de los servicios de Neumología y Reumatología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander, Cantabria). Por un lado, se reclutó un grupo objetivo de estudio de un total de 93 pacientes con EPI asociada a ETC constituido por 33 pacientes con AR-EPI, 31 pacientes con ES-EPI y 29 pacientes con MI-EPI. Por otro lado, se incluyeron grupos comparativos: un grupo de 48 pacientes con ETC-noEPI conformado por 22 pacientes con AR-noEPI, 18 pacientes con ES-noEPI y 8 pacientes con MI-noEPI; así como otro grupo de 148 pacientes con FPI, una EPI que carece de una enfermedad autoinmune subyacente.

Todos los pacientes con una ETC cumplieron con los criterios propios establecidos por la *American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism* (ACR/EULAR) para la clasificación y diagnóstico de la AR<sup>57</sup>, la ES<sup>58</sup> y la MI<sup>59</sup>. En el caso de los pacientes clasificados con una EPI, tanto con ETC-EPI como con FPI, cumplieron con los criterios de *American Thoracic Society/European Respiratory Society* (ATS/ERS)<sup>60</sup>.

A todos los pacientes incluidos en el estudio, siguiendo las guías clínicas del diagnóstico de EPI<sup>60</sup>, se les evaluó la presencia de una fibrosis pulmonar mediante la realización de un TACAR de tórax y del grado de afectación funcional pulmonar por PFR: CVF, FEV1 y DLCO. Estas pruebas clínicas permitieron clasificar a los pacientes en pacientes con ETC con EPI (ETC-EPI), ETC sin EPI (ETC-noEPI), y pacientes con FPI. Asimismo, los pacientes con fibrosis pulmonar se clasificaron acorde los criterios de la Sociedad Fleischner y la Sociedad Americana<sup>61,62</sup> según su patrón radiológico en neumonía NIU, probable NIU, indeterminado para NIU, NINE y no-NINE; y se estratificaron en función de la presencia de una patología fibrosante progresiva<sup>63</sup>.

Adicionalmente, se recogieron otras características clínicas relacionadas con la EPI (duración de la EPI y tratamientos antifibróticos), y con la ETC (duración de la ETC; anticuerpos específicos: factor reumatoide (FR) y anti-CCP) para la AR; anticuerpos antinucleares (ANAs), anticuerpos anti-topoisomerasa I (ATA o Anti-Scl-70) y anticuerpos Anti-centrómero (ACA) para la ES; anticuerpos anti-histidil tRNA sintetasa (Anti-Jo-1), anticuerpos anti-treonil tRNA sintetasa (Anti-PL-7) y anticuerpos anti-alanil tRNA sintetasa (Anti-PL-12) para la MI; y tratamientos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARDs) para todas las ETC, además de vasodilatadores para la ES, así como información demográfica (edad, sexo e historial de tabaquismo).

Las características demográficas y clínicas de todos los pacientes incluidos en el estudio se detallan en la **Tabla S1**.

Todos los individuos firmaron un consentimiento informado para ser incluidos en el estudio. Los experimentos cumplían con la Declaración de Helsinki, y el protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos de Cantabria (2024.453).

## Extracción del ARN

El ARN total de cada paciente fue extraído a partir de sangre periférica recogida en tubos con anticoagulante EDTA. Para su extracción, se utilizó un kit comercial de extracción de ARN que emplea un método de purificación de ARN basado en columnas con membrana de sílice (*NucleoSpin ARN Blood Kit, Macherey-Nagel, Alemania*).

Dado que el ARN es una molécula altamente lábil y las RNasas son contaminantes habituales, la extracción del ARN se llevó a cabo en una zona de trabajo libre de RNasas. Para ello, se utilizó un descontaminante superficial (*Molecular BioProducts™ RNase AWAY™*).

En primer lugar, para la rotura de la membrana celular y nuclear de las células sanguíneas, se mezclaron 400 µl de sangre periférica con 400 µl de tampón de lisis. Este tampón contiene sales caotrópicas que desnaturalizan proteínas y alteran las interacciones secundarias del ARN, facilitando su unión a la membrana de sílice. Además, estas sales crean un ambiente de alta salinidad, lo que reduce la solubilidad del ARN en agua. Posteriormente, se agregaron 10 µl de proteinasa K para eliminar las proteínas, y la mezcla se incubó 10 minutos a temperatura ambiente, en agitación. Para precipitar los ácidos nucleicos y purificar, se añadió etanol al 70%.

Con el fin de aislar el ARN, la mezcla se transfirió a una columna con membrana de sílice donde, tras una centrifugación, el ARN quedó adsorbido.

Posteriormente, para eliminar sales, contaminantes y mejorar la afinidad del ARN por la columna, se añadieron 350 µl de tampón de desalinización de membrana. Tras una centrifugación, se añadieron 95 µl de rDNasa con el fin de eliminar el ADN genómico. Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, se aplicaron tampones de lavado y centrifugaciones consecutivas para eliminar el resto de sales, metabolitos y componentes celulares, seguido de una etapa de secado para la evaporación del etanol residual por centrifugación. Finalmente, el ARN se eluyó mediante centrifugación con 72 µl de agua libre de RNasas.

La cuantificación del ARN se realizó mediante espectrofotometría basada en la absorción de luz UV por las bases nitrogenadas a 260nm en el equipo *Nanodrop One* (Thermo Scientific). Además de la concentración de ARN en ng/µl, se midió la pureza de las muestras mediante la valoración de los cocientes de absorción A260/280 y A260/230. La absorbancia de los ácidos nucleicos tiene un máximo a 260 nm, mientras que la de proteínas es a 280 nm, por lo que el ARN se considera de buena calidad cuando la relación A260/280 es aproximadamente 2,0. Adicionalmente, para detectar otros posibles contaminantes que absorben a 230 nm, se evalúa el cociente A260/230, cuyo rango óptimo es entre 2,0-2,2.

Tras la cuantificación, el ARN se almacenó a -80°C para su correcta conservación.

### **Concentración del ARN**

Se concentró el ARN de aquellas muestras que no alcanzaron la concentración y/o pureza óptima para los ensayos de expresión génica (concentraciones de ARN  $\leq 70$  ng/ $\mu$ l).

Se utilizó un kit comercial de concentración de ARN basado en columnas con membrana de sílice (Microkit de concentración y limpieza de ARN *GeneJET*, Thermo scientific). Siguiendo el protocolo, se añadió agua libre de nucleasas hasta alcanzar un volumen de 140  $\mu$ l, junto con 70  $\mu$ l de tampón de unión que contiene sales caotrópicas para facilitar la unión del ARN a la columna, y etanol al 100% para su precipitación y purificación. La mezcla se traspasó a una columna con membrana de sílice, en donde tras una centrifugación, se unió el ARN. Se utilizaron tampones de lavado junto con centrifugaciones consecutivas para eliminar las sales, metabolitos y macromoléculas contaminantes. Posteriormente, se llevó a cabo una etapa de secado final mediante centrifugación para la evaporación del etanol residual y el ARN se eluyó por centrifugación con 14,3  $\mu$ l de agua libre de nucleasas.

Finalmente, se cuantificó el ARN concentrado mediante espectrofotometría basada en la absorción de luz UV por las bases nitrogenadas a 260nm (*Nanodrop One*, Thermo Scientific). Para medir la pureza de las muestras se valoraron los cocientes de absorción A260/280 y A260/230, cuyo rango óptimo se consideró 2,0 y 2,0-2,2, respectivamente.

Por último, se almacenó el ARN a -80 °C para su correcta conservación.

### **Retrotranscripción del ARN**

Se llevó a cabo la retrotranscripción del ARN a ADN complementario (ADNc), molécula más estable y necesaria para la realización de la reacción de PCR, utilizando el kit comercial *iScript™ Reverse Transcription Supermix* de Bio-Rad mediante la técnica de transcripción inversa.

En primer lugar, en una campana de flujo laminar que garantiza condiciones de esterilidad, la concentración de 1000 ng de ARN se diluyó hasta conseguir un volumen total de 15  $\mu$ l. Posteriormente, se añadió 4  $\mu$ l de una mezcla que contiene los desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs), el oligo (dT), random primers y cofactores esenciales como iones de magnesio y 1  $\mu$ l de la enzima retrotranscriptasa, necesarios para llevar a cabo la reacción, obteniendo un volumen de reacción total de 20  $\mu$ l.

Finalmente, se llevó a cabo la reacción de retrotranscripción en un termociclador (*Mastercycler PCR Thermal Cycler*, Eppendorf AG). En una primera etapa, la muestra se incubó a 42°C durante 30 minutos, permitiendo que los oligos dT se unieran a la cola poli-A del ARN mensajero y que los *random primers* se fijaran a zonas al azar. Posteriormente, la enzima retrotranscriptasa se unió a la cadena de ARN e inició la síntesis del ADNc con los dNTPs incluidos en la reacción. A continuación, para inactivar la retrotranscriptasa y detener la reacción, la temperatura se elevó a 85° durante 5 minutos. Por último, la mezcla se mantuvo a 4° para conservar el ADNc obtenido.

Finalmente, el ADNc se diluyó con agua libre de nucleasas para alcanzar una concentración de 10 ng/ $\mu$ l y se conservó a -20° hasta su posterior uso.

## Reacción de PCR a tiempo real (qPCR)

Por último, se realizó una qPCR para cuantificar la expresión génica en tiempo real. Esta técnica permite medir la cantidad de ADN en una muestra mediante el uso de fluoróforos (SYBR Green). Dado que la cantidad de ADNc es directamente proporcional al número de copias de ARN mensajero, su cuantificación permite estimar la expresión génica.

Para realizar la qPCR, en una campana de flujo laminar que garantiza condiciones de esterilidad, se preparó la mezcla de la reacción para cada gen con un volumen total de 20  $\mu$ l. La mezcla incluyó 1  $\mu$ l del ADNc a 10 ng/ $\mu$ l junto con 19  $\mu$ l de la mezcla de amplificación que contenía a su vez: 8  $\mu$ l de agua libre de nucleasas, 1  $\mu$ l de *primers* específicos y 10  $\mu$ l del SYBR Green *Supermix* (compuesto por los dNTPs, la enzima ADN polimerasa, cloruro de magnesio como cofactor, la curva Rox como referencia pasiva y el SYBR Green). Los *primers* específicos fueron adquiridos comercialmente (Bio-Rad).

Los genes analizados fueron *GAPDH* (como referencia activa), *PDGFA*, *TGFB1*, *TGFB2* y *TGFB3* (como genes diana). En la **Tabla S2** se indica cada gen, la secuencia del amplicón (en pares de base (pb)) y la temperatura de *melting* ( $T_m$ ) de los *primers* específicos adquiridos comercialmente.

Posteriormente, la amplificación del ADNc por qPCR se realizó en un termociclador utilizando el equipo real-time QuantStudio™ 7 Flex (Applied Biosystems). El programa específico para la reacción de amplificación incluyó varias fases (**Figura S1**). En la primera etapa, se llevó a cabo la fase de activación (*Hold Stage*), en la que la mezcla se incubó a 95° durante 2 min para activar a la ADN polimerasa. En la segunda fase se realizó una etapa de amplificación con 45 ciclos sucesivos. En primer lugar, se produjo la etapa de desnaturalización del ADN a 95° durante 5 segundos, permitiendo la separación de las hebras del ADN. A continuación, a 60° durante 30 segundos, tuvo lugar una fase de alineamiento, en la cual los *primers* específicos (*GAPDH*, *PDGFA*, *TGFB1*, *TGFB2* o *TGFB3*) se unieron al ADNc molde en las secuencias 3' complementarias y la posterior fase de extensión en la que la ADN polimerasa sintetizó la nueva hebra de ADN de doble hebra a partir de los *primers* unidos a la secuencia molde. En este paso, el fluoróforo SYBR Green se intercaló en la doble hebra del ADN recién sintetizado, permitiendo su detección por fluorescencia. La fluorescencia emitida por el SYBR Green, al unirse al ADN y ser excitado por la luz, se correlaciona directamente con la cantidad de ADN amplificado, lo que nos permite estimar la cantidad de ARNm correspondiente al gen en estudio. Finalmente, en un último ciclo, se realizó una curva de *melting* en un rango de temperatura de 65 a 95° para determinar la  $T_m$  de cada muestra amplificada, es decir, la temperatura a la cual el 50% del ADN se ha desnaturalizado, y es específica de cada primer utilizado.

Todas las muestras se analizaron por duplicado y se incluyeron controles negativos.

## Análisis de calidad de los datos de expresión génica

Tras la finalización de la qPCR, se analizaron las curvas de *melting* en el programa QuantStudio™ 7 Flex (Applied Biosystems), con el objetivo de verificar la especificidad de los productos amplificados en cada reacción individual de la qPCR.

En estas curvas, el eje X representa la temperatura a la que se produce la desnaturalización del ADN amplificado, mientras que el eje Y muestra la derivada negativa de la señal de fluorescencia (-Rn). Esta señal refleja el cambio de fluorescencia a medida que la doble hebra del ADN se separa, siendo negativa porque la fluorescencia

disminuye durante la desnaturalización. El pico de la curva indica el punto donde ocurre el mayor cambio de fluorescencia, es decir, la  $T_m$  del fragmento amplificado. Un único pico en la curva sugiere una amplificación específica del producto de interés. En cambio, la presencia de múltiples picos indicaría inespecificidad pudiendo deberse a diferentes causas como la amplificación de diferentes productos o la formación de dímeros entre los *primers* empleados. Se verificó que cada curva específica de gen presentara un único pico correspondiente a la  $T_m$  específica de cada primer utilizado, lo que implicó que la técnica se había desarrollado correctamente generando un único producto de amplificación (**Figura S2**).

## Procesamiento de los datos de expresión génica

El procesamiento de los datos de expresión génica se llevó a cabo mediante el programa QuantStudio™ 7 Flex (Applied Biosystems).

Se ajustó el umbral de cada gen en la fase exponencial de la amplificación, en la que la cantidad de ADN se duplica en cada ciclo de PCR, y, por tanto, la señal de fluorescencia crece de manera exponencial. El ciclo en el que la señal fluorescente cruza el umbral se denomina ciclo umbral (Ct) y depende de la cantidad de ADNc en la muestra. La concentración de ADNc es inversamente proporcional al valor del Ct, es decir, a mayor concentración de ADNc, menor es el valor de Ct.

Con el fin de minimizar los errores experimentales y asegurar la fiabilidad de los resultados, se utilizaron una referencia pasiva (ROX), colorante que se utiliza para normalizar las variaciones entre pocillos y corregir las diferencias ópticas entre ellos proporcionando una medición estable de la fluorescencia para compensar variaciones en la sensibilidad del sistema de detección, y una referencia activa (gen *GAPDH*), que se expresa de forma constante e independiente del estado fisiológico de la célula.

Para cada gen de estudio, la expresión relativa se calculó por el método comparativo de Ct, o también llamado método 2 delta-delta Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ), basado en la comparación de la expresión génica de los genes de estudio con respecto al gen *GAPDH*, utilizado como gen de referencia activa.

## Análisis estadístico

La expresión de cada gen estudiado se expresa como la media  $\pm$  desviación estándar (DE) para cada grupo de estudio.

La comparación entre los valores de la expresión génica entre dos grupos de estudio se realizó mediante el análisis de varianza (ANOVA), ajustando por potenciales factores de confusión: edad, sexo y hábito tabáquico. La asociación de dichos valores con variables continuas y categóricas se analizó mediante la estimación del coeficiente de correlación parcial de Pearson ( $r$ ) y la regresión lineal, respectivamente, ajustando por los potenciales factores de confusión mencionados anteriormente. La utilidad de los genes como potenciales biomarcadores se comprobó realizando un análisis ROC. Se calculó el AUC con un intervalo de confianza (IC) del 95%.

En todos los casos, se consideraron estadísticamente significativos los valores de  $p < 0.05$ .

Tras la confirmación de la capacidad de los genes revelados para identificar específicamente la ETC-EPI mediante el análisis de curvas ROC, se determinaron los valores de corte óptimos para discriminar dos grupos de estudio mediante el índice de Youden (el valor más alto obtenido de la fórmula % de sensibilidad + % de especificidad - 100). Así, se obtendrán los valores de expresión génica de las moléculas diana a partir de los cuales se considerará la presencia de una ETC-EPI.

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa estadístico STATA 12/SE (Stata Corp., CollegeStation, TX, EEUU) y el GraphPad Prism 5.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Verónica y Raquel, profesionales del grupo de Inmunopatología del IDIVAL, por su apoyo y orientación durante la realización de este trabajo. He aprendido mucho de ellas y han sabido transmitir sus conocimientos de forma amena. Además, me hicieron sentir muy cómoda, por lo que valoro su amabilidad y cercanía.

También me gustaría dar las gracias a mis compañeros de laboratorio Clara, Dani y Diego, por su compañerismo y hacer la estancia más agradable.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Antoniou, K.M., Margaritopoulos, G., Economidou, F., and Siafakas, N.M. (2009). Pivotal clinical dilemmas in collagen vascular diseases associated with interstitial lung involvement: Table 1—. *Eur. Respir. J.* 33, 882–896. <https://doi.org/10.1183/09031936.00152607>.
2. Atzeni, F., Gerardi, M.C., Barilaro, G., Masala, I.F., Benucci, M., and Sarzi-Puttini, P. (2018). Interstitial lung disease in systemic autoimmune rheumatic diseases: a comprehensive review. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 14, 69–82. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2018.1411190>.
3. Ysamat Marfá, R., Benito Ysamat, A., Espejo Pérez, S., Blanco Negro, M., and Roldán Molina, R. (2013). La patología pulmonar asociada a las enfermedades del tejido conectivo. *Radiología* 55, 107–117. <https://doi.org/10.1016/j.rx.2012.03.004>.
4. Matson, S.M., and Demoruelle, M.K. (2024). Connective Tissue Disease Associated Interstitial Lung Disease. *Rheum. Dis. Clin. N. Am.* 50, 423–438. <https://doi.org/10.1016/j.rdc.2024.03.001>.
5. Antoniou, K.M., Margaritopoulos, G.A., Tomassetti, S., Bonella, F., Costabel, U., and Poletti, V. (2014). Interstitial lung disease. *Eur. Respir. Rev. Off. J. Eur. Respir. Soc.* 23, 40–54. <https://doi.org/10.1183/09059180.00009113>.
6. Ancochea Bermúdez, J., and Miguel Díez, J. de (2008). Enfermedades pulmonares intersticiales difusas (Ergon).
7. Cerro Chiang, G., and Parimon, T. (2023). Understanding Interstitial Lung Diseases Associated with Connective Tissue Disease (CTD-ILD): Genetics, Cellular Pathophysiology, and Biologic Drivers. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 2405. <https://doi.org/10.3390/ijms24032405>.
8. Cottin, V. (2016). Idiopathic interstitial pneumonias with connective tissue diseases features: A review. *Respirology* 21, 245–258. <https://doi.org/10.1111/resp.12588>.

9. Spagnolo, P., Distler, O., Ryerson, C.J., Tzouveleakis, A., Lee, J.S., Bonella, F., Bouros, D., Hoffmann-Vold, A.-M., Crestani, B., and Matteson, E.L. (2021). Mechanisms of progressive fibrosis in connective tissue disease (CTD)-associated interstitial lung diseases (ILDs). *Ann. Rheum. Dis.* *80*, 143–150. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2020-217230>.
10. Cottin, V., Hirani, N.A., Hotchkin, D.L., Nambiar, A.M., Ogura, T., Otaola, M., Skowasch, D., Park, J.S., Poonyagariyagorn, H.K., Wuyts, W., et al. (2018). Presentation, diagnosis and clinical course of the spectrum of progressive-fibrosing interstitial lung diseases. *Eur. Respir. Rev.* *27*. <https://doi.org/10.1183/16000617.0076-2018>.
11. Guiot, J., Miedema, J., Cordeiro, A., De Vries-Bouwstra, J.K., Dimitroulas, T., Søndergaard, K., Tzouveleakis, A., and Smith, V. (2024). Practical guidance for the early recognition and follow-up of patients with connective tissue disease-related interstitial lung disease. *Autoimmun. Rev.* *23*, 103582. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2024.103582>.
12. Benegas Urteaga, M., Ramírez Ruz, J., and Sánchez González, M. (2022). Idiopathic pulmonary fibrosis. *Radiologia* *64 Suppl* *3*, 227–239. <https://doi.org/10.1016/j.rxeng.2022.10.009>.
13. Enomoto, N. (2024). Relationship between idiopathic interstitial pneumonias (IIPs) and connective tissue disease-related interstitial lung disease (CTD-ILD): A narrative review. *Respir. Investig.* *62*, 465–480. <https://doi.org/10.1016/j.resinv.2024.03.006>.
14. Zhu, W., Liu, C., Tan, C., and Zhang, J. (2024). Predictive biomarkers of disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis. *Heliyon* *10*, e23543. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e23543>.
15. Wang, Q., Xie, Z., Wan, N., Yang, L., Jin, Z., Jin, F., Huang, Z., Chen, M., Wang, H., and Feng, J. (2023). Potential biomarkers for diagnosis and disease evaluation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Chin. Med. J. (Engl.)* *136*, 1278–1290. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000002171>.
16. Jog, N.R., and James, J.A. (2017). Biomarkers in connective tissue diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* *140*, 1473–1483. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.10.003>.
17. Pulito-Cueto, V., Remuzgo-Martínez, S., Genre, F., Atienza-Mateo, B., Mora-Cuesta, V.M., Iturbe-Fernández, D., Lera-Gómez, L., Rodríguez-Carrio, J., Prieto-Peña, D., Portilla, V., et al. (2022). Angiogenic T Cells: Potential Biomarkers for the Early Diagnosis of Interstitial Lung Disease in Autoimmune Diseases? *Biomedicines* *10*, 851. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10040851>.
18. Pulito-Cueto, V., Remuzgo-Martínez, S., Genre, F., Atienza-Mateo, B., Mora-Cuesta, V.M., Iturbe-Fernández, D., Lera-Gómez, L., Mora-Gil, M.S., Portilla, V., Corrales, A., et al. (2023). E-Selectin, ICAM-1, and ET-1 Biomarkers Address the Concern of the Challenging Diagnosis of Interstitial Lung Disease in Patients with Autoimmune Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* *24*, 12518. <https://doi.org/10.3390/ijms241512518>.
19. Pulito-Cueto, V., Remuzgo-Martínez, S., Genre, F., Atienza-Mateo, B., Mora-Cuesta, V.M., Iturbe-Fernández, D., Lera-Gómez, L., Sebastián Mora-Gil, M., Prieto-Peña, D., Portilla, V., et al. (2022). Elevated VCAM-1, MCP-1 and ADMA serum levels related to pulmonary fibrosis of interstitial lung disease associated with rheumatoid arthritis. *Front. Mol. Biosci.* *9*, 1056121. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.1056121>.
20. 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. (2020). Endothelial Progenitor Cells as a Potential Biomarker in Interstitial

- Lung Disease Associated with Rheumatoid Arthritis. *J. Clin. Med.* 9, 4098. <https://doi.org/10.3390/jcm9124098>.
21. Pulito-Cueto, V., Atienza-Mateo, B., Batista-Liz, J.C., Sebastián Mora-Gil, M., Mora-Cuesta, V.M., Iturbe-Fernández, D., Izquierdo Cuervo, S., Aguirre Portilla, C., Blanco, R., and López-Mejías, R. (2025). Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors as upcoming biomarker signatures of connective tissue diseases-related interstitial lung disease: towards an earlier and accurate diagnosis. *Mol. Med.* 31, 70. <https://doi.org/10.1186/s10020-025-01128-2>.
  22. Zhong, D., Wu, C., Bai, J., Hu, C., Xu, D., Wang, Q., and Zeng, X. (2020). Comparative diagnostic efficacy of serum Krebs von den Lungen-6 and surfactant D for connective tissue disease-associated interstitial lung diseases: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 99, e19695. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000019695>.
  23. Miądlkowska, E., Miłkowska-Dymanowska, J., Białas, A.J., Makowska, J.S., Lewandowska-Polak, A., Puła, A., Kumor-Kisiełowska, A., and Piotrowski, W.J. (2025). Serum KL-6 and SP-D: Markers of Lung Function in Autoimmune-Related Interstitial Lung Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 26, 1091. <https://doi.org/10.3390/ijms26031091>.
  24. Ahmed, S., and Handa, R. (2022). Management of Connective Tissue Disease–related Interstitial Lung Disease. *Curr. Pulmonol. Rep.* 11, 86–98. <https://doi.org/10.1007/s13665-022-00290-w>.
  25. Hoffmann-Vold, A.-M., Maher, T.M., Philpot, E.E., Ashrafzadeh, A., Barake, R., Barsotti, S., Bruni, C., Carducci, P., Carreira, P.E., Castellví, I., et al. (2020). The identification and management of interstitial lung disease in systemic sclerosis: evidence-based European consensus statements. *Lancet Rheumatol.* 2, e71–e83. [https://doi.org/10.1016/S2665-9913\(19\)30144-4](https://doi.org/10.1016/S2665-9913(19)30144-4).
  26. Pugashetti, J.V., Khanna, D., Kazerooni, E.A., and Oldham, J. (2023). Clinically Relevant Biomarkers in Connective Tissue Disease-Associated Interstitial Lung Disease. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 43, 411–433. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2023.01.012>.
  27. Hoyles, R.K., Derrett-Smith, E.C., Khan, K., Shiwen, X., Howat, S.L., Wells, A.U., Abraham, D.J., and Denton, C.P. (2011). An essential role for resident fibroblasts in experimental lung fibrosis is defined by lineage-specific deletion of high-affinity type II transforming growth factor  $\beta$  receptor. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 183, 249–261. <https://doi.org/10.1164/rccm.201002-0279OC>.
  28. Chanda, D., Otoupalova, E., Smith, S.R., Volckaert, T., De Langhe, S.P., and Thannickal, V.J. (2019). Developmental pathways in the pathogenesis of lung fibrosis. *Mol. Aspects Med.* 65, 56–69. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2018.08.004>.
  29. Tomasek, J.J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., and Brown, R.A. (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 349–363. <https://doi.org/10.1038/nrm809>.
  30. Zhao, M., Wang, L., Wang, M., Zhou, S., Lu, Y., Cui, H., Racanelli, A.C., Zhang, L., Ye, T., Ding, B., et al. (2022). Targeting fibrosis: mechanisms and clinical trials. *Signal Transduct. Target. Ther.* 7, 206. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01070-3>.
  31. Hinz, B., and Gabbiani, G. (2010). Fibrosis: recent advances in myofibroblast biology and new therapeutic perspectives. *F1000 Biol. Rep.* 2, 78. <https://doi.org/10.3410/B2-78>.

32. Biernacka, A., Dobaczewski, Marcin, and Frangogiannis, N.G. (2011). TGF- $\beta$  signaling in fibrosis. *Growth Factors* 29, 196–202. <https://doi.org/10.3109/08977194.2011.595714>.
33. Ji, Y., Huang, J., Zong, J., Lü, D., Xin, X., He, J., Chen, Y., Chen, X., Yu, S., and Li, J. (2008). [The serum levels of cytokines in patients with rheumatoid arthritis associated interstitial lung disease and their clinical significance]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi Zhonghua Jiehe He Huxi Zazhi Chin. J. Tuberc. Respir. Dis.* 31, 264–267.
34. Gochuico, B.R., Avila, N.A., Chow, C.K., Novero, L.J., Wu, H.-P., Ren, P., MacDonald, S.D., Travis, W.D., Stylianou, M.P., and Rosas, I.O. (2008). Progressive Preclinical Interstitial Lung Disease in Rheumatoid Arthritis. *Arch. Intern. Med.* 168, 159–166. <https://doi.org/10.1001/archinternmed.2007.59>.
35. Christmann, R.B., Sampaio-Barros, P., Stifano, G., Borges, C.L., de Carvalho, C.R., Kairalla, R., Parra, E.R., Spira, A., Simms, R., Capellozzi, V.L., et al. (2014). Association of Interferon- and Transforming Growth Factor  $\beta$ -Regulated Genes and Macrophage Activation With Systemic Sclerosis-Related Progressive Lung Fibrosis. *Arthritis Rheumatol.* 66, 714–725. <https://doi.org/10.1002/art.38288>.
36. Jian, X., Guo, G., Ruan, Y., Zhao, B., Wang, Y., Ning, Q., and Zhang, Y. (2008). [Clinical observation of rheumatoid arthritis associated interstitial lung disease patients and changes of serum cytokines thereof]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 88, 1884–1887. <https://doi.org/10.3321/j.issn:0376-2491.2008.27.005>.
37. Andrae, J., Gallini, R., and Betsholtz, C. (2008). Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.* 22, 1276–1312. <https://doi.org/10.1101/gad.1653708>.
38. Ying, H.-Z., Chen, Q., Zhang, W.-Y., Zhang, H.-H., Ma, Y., Zhang, S.-Z., Fang, J., and Yu, C.-H. (2017). PDGF signaling pathway in hepatic fibrosis pathogenesis and therapeutics. *Mol. Med. Rep.* 16, 7879–7889. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7641>.
39. Ostendorf, T., Eitner, F., and Floege, J. (2012). The PDGF family in renal fibrosis. *Pediatr. Nephrol.* 27, 1041–1050. <https://doi.org/10.1007/s00467-011-1892-z>.
40. Wynn, T. (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J. Pathol.* 214, 199–210. <https://doi.org/10.1002/path.2277>.
41. Saha, P., and Talwar, P. (2024). Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF): disease pathophysiology, targets, and potential therapeutic interventions. *Mol. Cell. Biochem.* 479, 2181–2194. <https://doi.org/10.1007/s11010-023-04845-6>.
42. Van Kalsbeek, D., Brooks, R., Shaver, D., Ebel, A., Hershberger, D., Schmidt, C., Poole, J.A., Ascherman, D.P., Thiele, G.M., Mikuls, T.R., et al. (2023). Peripheral Blood Biomarkers for Rheumatoid Arthritis-Associated Interstitial Lung Disease: A Systematic Review. *ACR Open Rheumatol.* 5, 201–226. <https://doi.org/10.1002/acr2.11535>.
43. Vermant, M., Goos, T., Gogaert, S., De Cock, D., Verschueren, P., and Wuyts, W.A. (2023). Are genes the missing link to detect and prognosticate RA-ILD? *Rheumatol. Adv. Pract.* 7, rkad023. <https://doi.org/10.1093/rap/rkad023>.
44. Bonella, F., Patuzzo, Giuseppe, and Lunardi, C. (2015). Biomarker discovery in systemic sclerosis: state of the art. *Curr. Biomark. Find.* 5, 47–68. <https://doi.org/10.2147/CBF.S60446>.
45. Sargent, J.L., Milano, A., Bhattacharyya, S., Varga, J., Connolly, M.K., Chang, H.Y., and Whitfield, M.L. (2010). A TGF $\beta$ -Responsive Gene Signature Is Associated with a Subset of

- Diffuse Scleroderma with Increased Disease Severity. *J. Invest. Dermatol.* *130*, 10.1038/jid.2009.318. <https://doi.org/10.1038/jid.2009.318>.
46. Silver, R.M., and Wells, A.U. (2008). Histopathology and bronchoalveolar lavage. *Rheumatol. Oxf. Engl.* *47*, v62–v64. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ken272>.
  47. Muruganandam, M., Ariza-Hutchinson ,Angie, Patel ,Rosemina A, and and Sibbitt Jr, W.L. (2023). Biomarkers in the Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment of Systemic Sclerosis. *J. Inflamm. Res.* *16*, 4633–4660. <https://doi.org/10.2147/JIR.S379815>.
  48. Desai, B., Mattson ,Jeanine, Paintal ,Harman, Nathan ,Manjari, Shen ,Fran, Beaumont ,Maribel, Malinao ,Maria-Christina, Li ,Ying, Canfield ,James, Basham ,Beth, et al. (2011). Differential expression of monocyte/macrophage- selective markers in human idiopathic pulmonary fibrosis. *Exp. Lung Res.* *37*, 227–238. <https://doi.org/10.3109/01902148.2010.538132>.
  49. da Silva, T.C.P., Silva, M.G., and Shinjo, S.K. (2018). Relevance of serum angiogenic cytokines in adult patients with dermatomyositis. *Adv. Rheumatol.* *58*, 17. <https://doi.org/10.1186/s42358-018-0018-8>.
  50. Inui, N., Sakai, S., and Kitagawa, M. (2021). Molecular Pathogenesis of Pulmonary Fibrosis, with Focus on Pathways Related to TGF- $\beta$  and the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* *22*, 6107. <https://doi.org/10.3390/ijms22116107>.
  51. Ye, Z., and Hu, Y. (2021). TGF- $\beta$ 1: Gentlemanly orchestrator in idiopathic pulmonary fibrosis (Review). *Int. J. Mol. Med.* *48*, 132. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.4965>.
  52. Burks, T.N., and Cohn, R.D. (2011). Role of TGF- $\beta$  signaling in inherited and acquired myopathies. *Skelet. Muscle* *1*, 19. <https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-19>.
  53. Shimojima, Y., Ishii, W., Matsuda, M., and Ikeda, S.-I. (2012). Phenotypes of Peripheral Blood Lymphocytes and Cytokine Expression in Polymyositis and Dermatomyositis before Treatment and after Clinical Remission. *Clin. Med. Insights Arthritis Musculoskelet. Disord.* *5*, 77–87. <https://doi.org/10.4137/CMAMD.S10272>.
  54. Akiyama, M., and Kaneko, Y. (2022). Pathogenesis, clinical features, and treatment strategy for rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease. *Autoimmun. Rev.* *21*, 103056. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2022.103056>.
  55. Jacquerie, P., Henket, M., André, B., Moermans, C., de Seny, D., Gester, F., Louis, R., Malaise, M., and Guiot, J. (2021). Inflammatory profile of induced sputum composition in systemic sclerosis and comparison with healthy volunteers. *Sci. Rep.* *11*, 10679. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87701-1>.
  56. Sun, T., Huang, Z., Liang, W.-C., Yin, J., Lin, W.Y., Wu, J., Vernes, J.-M., Lutman, J., Caplazi, P., Jeet, S., et al. (2021). TGF $\beta$ 2 and TGF $\beta$ 3 isoforms drive fibrotic disease pathogenesis. *Sci. Transl. Med.* *13*, eabe0407. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abe0407>.
  57. Aletaha, D., Neogi, T., Silman, A.J., Funovits, J., Felson, D.T., Bingham, C.O., Birnbaum, N.S., Burmester, G.R., Bykerk, V.P., Cohen, M.D., et al. (2010). 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* *62*, 2569–2581. <https://doi.org/10.1002/art.27584>.
  58. van den Hoogen, F., Khanna, D., Fransen, J., Johnson, S.R., Baron, M., Tyndall, A., Matucci-Cerinic, M., Naden, R.P., Medsger, T.A., Carreira, P.E., et al. (2013). 2013 classification

- criteria for systemic sclerosis: an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Ann. Rheum. Dis.* 72, 1747–1755. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204424>.
59. Lundberg, I.E., Tjärnlund, A., Bottai, M., Werth, V.P., Pilkington, C., de Visser, M., Alfredsson, L., Amato, A.A., Barohn, R.J., Liang, M.H., et al. (2017). EULAR/ACR Classification Criteria for Adult and Juvenile Idiopathic Inflammatory Myopathies and their Major Subgroups. *Ann. Rheum. Dis.* 76, 1955–1964. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2017-211468>.
  60. Raghu, G., Collard, H.R., Egan, J.J., Martinez, F.J., Behr, J., Brown, K.K., Colby, T.V., Cordier, J.-F., Flaherty, K.R., Lasky, J.A., et al. (2011). An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Statement: Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Evidence-based Guidelines for Diagnosis and Management. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 183, 788–824. <https://doi.org/10.1164/rccm.2009-040GL>.
  61. 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. (2018). Diagnostic criteria for idiopathic pulmonary fibrosis: a Fleischner Society White Paper. *Lancet Respir. Med.* 6, 138–153. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(17\)30433-2](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(17)30433-2).
  62. Raghu, G., Remy-Jardin, M., Richeldi, L., Thomson, C.C., Inoue, Y., Johkoh, T., Kreuter, M., Lynch, D.A., Maher, T.M., Martinez, F.J., et al. (2022). Idiopathic Pulmonary Fibrosis (an Update) and Progressive Pulmonary Fibrosis in Adults: An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 205, e18–e47. <https://doi.org/10.1164/rccm.202202-0399ST>.
  63. Cottin, V. (2019). Treatment of progressive fibrosing interstitial lung diseases: a milestone in the management of interstitial lung diseases. *Eur. Respir. Rev. Off. J. Eur. Respir. Soc.* 28, 190109. <https://doi.org/10.1183/16000617.0109-2019>.

Información suplementaria

## **Búsqueda de biomarcadores génicos de la enfermedad pulmonar intersticial asociada a las enfermedades del tejido conectivo: ¿*PDGF* y *TGFB* como factores de riesgo y pronóstico prometedores?**

Rebeca Nieto Nieto (alumno/a)<sup>1</sup>, Verónica Pulito Cueto (director/a)<sup>2</sup>, Raquel López Mejías (codirector/a)<sup>2</sup>, Víctor Manuel Martínez Taboada (codirector/a)<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Cantabria, Santander, Cantabria

<sup>2</sup>Grupo Inmunopatología, IDIVAL, Santander, Cantabria

	Grupos objetivos de estudio			Grupos comparativos			
	AR-EPI n=33	ES-EPI n=31	MI-EPI n=29	ARnoEPI n=22	ESnoEPI n=18	MInoEPI n=8	FPI n=148
Sexo (mujeres), n (%)	13 (39.39)	19 (61.29)	18 (62.07)	14 (63.64)	16 (88.89)	6 (75.00)	123 (83.11)
Edad al momento de estudio (años), media ± DE	70.73 ± 7.1	63.06 ± 10.2	62.45 ± 19.0	64.68 ± 11.29	57.94 ± 13.76	63.86 ± 19.17	70.60 ± 7.12
Fumador, n (%)	26 (78.79)	16 (51.61)	21 (72.41)	13 (59.09)	10 (55.56)	3 (37.5)	130 (87.84)
<b>Estado de anticuerpos</b>							
FR <sup>+</sup> , n (%)	29 (87.87)	-	-	12 (54.55)	-	-	-
Anti-CCP <sup>+</sup> , n (%)	28 (84.84)	-	-	14 (63.64)	-	-	-
ANA <sup>+</sup> , n (%)	-	29 (93.55)	-	-	16 (88.89)	-	-
ACA <sup>+</sup> , n (%)	-	1 (3.23)	-	-	8 (44.44)	-	-
ATA (anti-Sci70) <sup>+</sup> , n (%)	-	17 (54.84)	-	-	3 (16.67)	-	-
Anti-Jo1 <sup>+</sup> , n (%)	-	-	5 (17.24)	-	-	0 (0.0)	-
Anti-PL7 <sup>+</sup> , n (%)	-	-	6 (20.69)	-	-	1 (12.5)	-
Anti-PL12 <sup>+</sup> , n (%)	-	-	3 (10.34)	-	-	0 (0.0)	-
Duración de la ETC (años), media ± DE	6.72 ± 7.13	7.01 ± 7.06	7.96 ± 21.29	9.70 ± 9.65	9.94 ± 7.92	5.27 ± 1.58	-
Duración de la EPI (años), media ± DE	3.88 ± 4.28	5.64 ± 6.95	3.88 ± 4.28	-	-	-	3.43 ± 3.49
<b>Pruebas de función pulmonar</b>							
CVF (% predicho), media ± DE	85.46 ± 26.60	78.75 ± 24.16	79.58 ± 24.77	103.90 ± 17.51	107.20 ± 16.12	113.00 ± 0.00	75.73 ± 18.94
FEV1 (% predicho), media ± DE	83.82 ± 24.52	77.11 ± 22.99	81.21 ± 25.57	101.10 ± 22.72	102.50 ± 18.14	119.00 ± 0.00	77.57 ± 19.39
DLCO (% predicho), media ± DE	44.34 ± 19.50	39.60 ± 17.71	52.18 ± 16.21	77.49 ± 17.85	70.68 ± 15.46	101.0 ± 0.00	36.47 ± 16.11
<b>TACAR</b>							
Afectación pulmonar en TACAR, n (%)	33 (100.0)	31 (100.0)	29 (100.0)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	148 (100.00)
Patrón NIU, n (%)	17 (51.52)	8 (25.80)	7 (24.14)	-	-	-	148 (100.00)
Patrón probablemente NIU, n (%)	5 (15.15)	1 (3.23)	6 (20.69)	-	-	-	0 (0.0)
Patrón indeterminado para NIU, n (%)	1 (3.03)	0 (0.00)	0 (0.00)	-	-	-	0 (0.0)
Patrón NINE, n (%)	9 (27.27)	20 (64.52)	9 (31.03)	-	-	-	0 (0.0)
Patrón no NINE, n (%)	1 (3.03)	2 (6.45)	2 (6.90)	-	-	-	0 (0.0)
Fibrosis pulmonar progresiva, n (%)	5 (15.15)	8 (25.81)	3 (10.34)	-	-	-	148 (100.00)
Fármacos antifibróticos, n (%)	1 (3.03)	2 (6.45)	2 (6.90)	-	-	-	98 (66.21)
DMARDs sintéticos, n (%)	17 (52.52)	22 (70.97)	15 (51.72)	19 (86.36)	11 (61.11)	6 (75.00)	-
DMARDs biológicos, n (%)	12 (36.36)	10 (32.26)	7 (24.14)	4 (18.18)	2 (36.00)	3 (37.50)	-
Fármacos vasodilatadores, n (%)	-	17 (54.84)	-	-	13 (72.22)	-	-

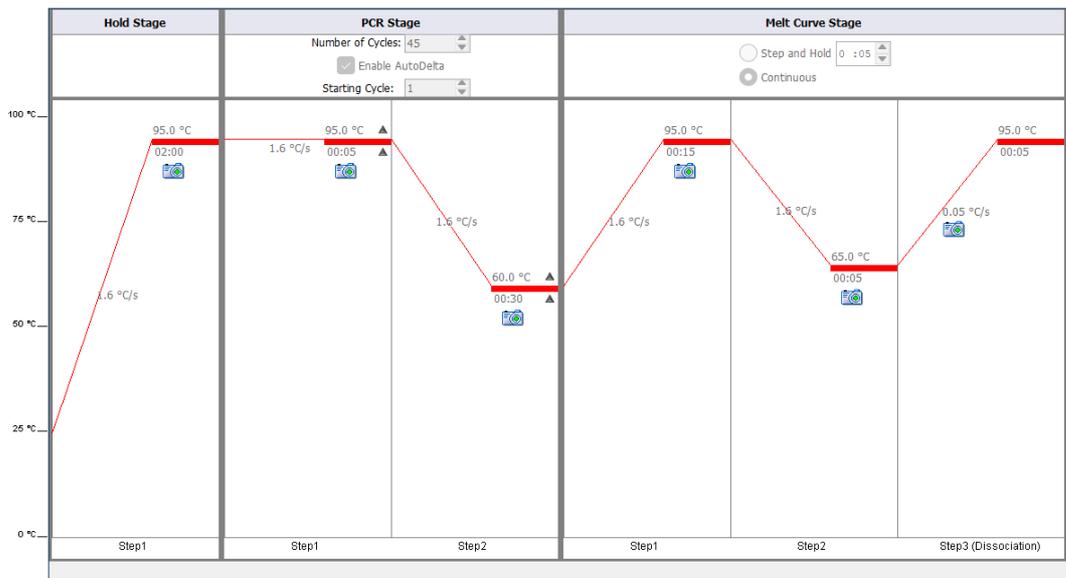
## **Tabla S1. Características demográficas y clínicas de todos los pacientes del estudio.**

AR: artritis reumatoide; EPI: enfermedad intersticial pulmonar; ES: esclerosis sistémica; MI: miopatía inflamatoria; AR-noEPI: AR sin EPI asociada; ES-noEPI: ES sin EPI asociada; MI-noEPI: MI sin EPI asociada; FPI: fibrosis pulmonar idiopática; DE: desviación estándar; FR: factor reumatoide; Anti-CCP: anti-péptidos cíclicos citrulinados; ANA: anticuerpos antinucleares; ACA: anticuerpos anti-centrómero; ATA (anti-scl-70) : anticuerpos anti-topoisomerasa I ; Anti-Jo-1: anticuerpos anti-histidil tRNA sintetasa; Anti-PL-7: anticuerpos anti-treonil tRNA sintetasa; Anti-PL-12: anticuerpos anti-alanil tRNA sintetasa; ETC: enfermedad del tejido conectivo; CVF: capacidad vital forzada; FEV1: volumen espiratorio forzado en el primer segundo; DLCO: capacidad de difusión del monóxido de carbono; TACAR: tomografía axial computarizada de alta resolución; NIU: neumonía intersticial usual; NINE: neumonía intersticial no específica; DMARDs: fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad.

Genes	Secuencia del amplicón (pb)	T <sub>m</sub> (°C)
<i>GAPDH</i>	GTATGACAACGAATTTGGCTACAGCAACAGGGTGGTGGACCTCA TGGCCACATGGCCTCCAAGGAGTAAGACCCCTGGACCACCAG CCCCAGCAAGAGCACAAGAGGAAGAGAGAGACCCTCACTGCTG GGGAGTCCCTGCCACAC	86
<i>PDGFA</i>	GGCTTCTTCCTGACGTATTCCACCTTGGCCACCTTGACGCTGCG GTGGTGGACGCGGGAGGGCTGGCACTTGACACTGCTCGTGTTG CAGCAGCCGGTGCAGCGTTTCACCTCCACGCACGGGGGCCAG ATCAGGAAGTTGGCGGACGTGGGGTGCACCTGACTCCGAGG	89.5
<i>TGFB1</i>	AACCACTGCCGCACAACCTCCGGTGACATCAAAGATAACCACTC TGGCGAGTCGCTGGGTGCCAGCAGCCGTTGCTGAGGTATCGC CAGGAATTGTTGCTGTATTTCTGGTACAGCTCCACGTGCTGCTCC ACTTTTAACTTGAGCCTCAGCAGACGCAGCTCTGCCCGGGA	86
<i>TGFB2</i>	TACAATGCCAACTTCTGTGCTGGAGCATGCCCGTATTTATGGAGT TCAGACACTCAGCACAGCAGGGTCCCTGAGCTTATATAATACCATA AATCCAGAAGCATCTGCTTCTCCTTGCTGCGTGTCCCAAGATTTA GAACCTCTAACCATTTCTCTACTACATTGGCAAAA	82
<i>TGFB3</i>	CCTAAGTTGGACTCTCTTCTCAACAGCCACTCACGCACAGTGTC AGTGACATCAAAGGACAGCCACTCGGCAGTGCCCCGTGTGGGC AGATTCTTGCCACCGATATAGCGCTGTTTGGCAATGTGC	85.5

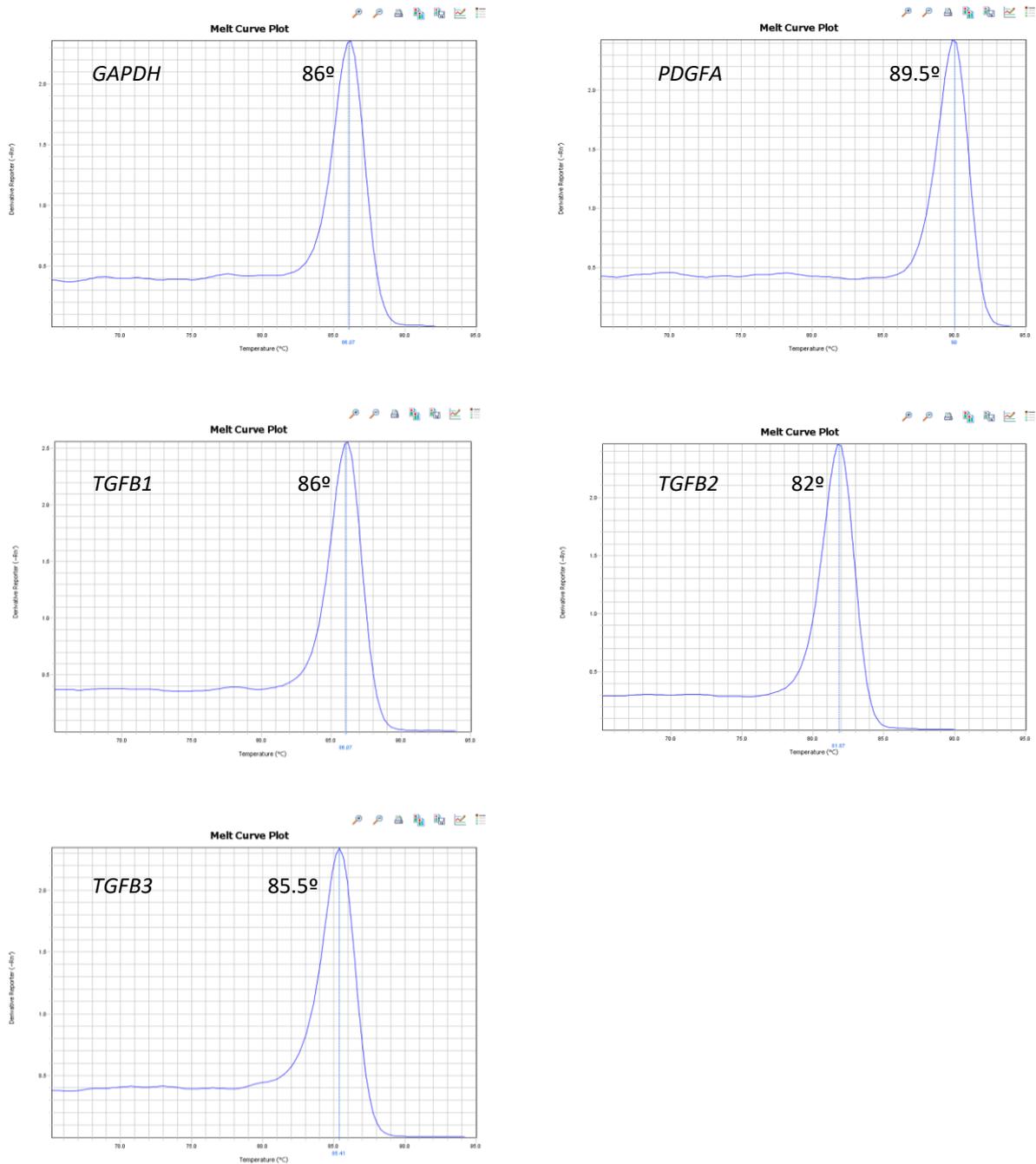
**Tabla S2. Información de los cebadores comerciales adquiridos para los estudios de expresión génica.**

Se indican la secuencia del amplicón, así como la temperatura de *melting* de los genes *GAPDH*, *PDGFA*, *TGFB1*, *TGFB2* y *TGFB3*.



**Figura S1. Condiciones de la qPCR para la amplificación del ADNc de los genes *GADPH*, *PDGFA*, *TGFB1*, *TGFB2*, *TGFB3*.**

La gráfica muestra las temperaturas y tiempos de cada fase del proceso: *Hold Stage* (fase de activación), *PCR Stage* (fase de amplificación) y *Melt Curve Stage* (fase de curva de *melting*). Se indican la temperatura máxima alcanzada en cada etapa, la velocidad de cambio de temperatura y los tiempos de retención en cada paso, así como el número de ciclos en cada etapa. Imagen obtenida del programa informático del QuantStudio™ 7 Flex (Applied Biosystems).



**Figura S2. Curvas de melting específicas de cada gen estudiado (GAPDH, PDGFA, TGFB1, TGFB2 y TGFB3).**

Se representa el cambio de fluorescencia a medida que el ADN se desnaturaliza como la derivada negativa de la señal del reportero (-Rn, en el eje Y) en función de la temperatura (eje X), lo que permite determinar la Tm de los productos amplificados. Imágenes obtenidas del programa QuantStudioTM 7 Flex (Applied Biosystems).