

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Programa de Doctorado en Medicina

Departamento de Medicina

Facultad de Medicina

**Vías patogénicas de las enfermedades pulmonares intersticiales
relacionadas con el tabaco.**

TESIS DOCTORAL presentada por **SÍLVIA BARRIL FARRÉ**

para optar al grado de Doctor.

Director: **Dr. Diego Castillo Villegas**

Tutor: **Dr. Vicente Plaza Moral**

Barcelona, 2023

La amistad te impide resbalar al abismo.

Bruce Springsteen

Agradecimientos

Al Dr. Castillo, mi mentor y amigo. Por todos los años que he aprendido de ti y todo el trabajo compartido que culmina con esta tesis. Gracias por haber creído y confiado en mí.

Al Dr. Plaza, profesor durante mi época universitaria y jefe de servicio, por haberme permitido llevar a cabo esta tesis en Sant Pau.

Al Dr. Sibila, por sus sabios consejos durante mi época de residente y por su mano tendida desde que acabé mi formación.

A la Dra. Hortelano y al Dr. Alonso, por enseñarme la magia de la ciencia básica. Gracias por vuestro brillante trabajo.

A Ana M, Guille y Ana R. A ellos les dedico esta tesis. Por estar siempre presentes, a pesar de la distancia, y empujarme hacia las decisiones acertadas. Orgullosa de nuestra amistad.

A Laura López, “les lleidatanes” de Sant Pau, por su siempre amable disponibilidad.

A Anna Feliu y Paloma, por ser mi mano en Sant Pau cuando yo ya no estaba presente.

A Ferran, por las facilidades permitidas para que esta tesis llegase a su fin. Ahora sí: “la millor tesis, la tesis acabada”.

A mis compañeros de los hospitales Sant Pau y Arnau de Vilanova. Me siento afortunada por haber trabajado y seguir compartiendo profesión con vostras.

A Montse y Sisco, por el enorme esfuerzo que han hecho por mi en la recta final de esta tesis.

A mis padres, por estar siempre a mi lado, y por haberme inculcado la cultura del esfuerzo y del trabajo desde su ejemplo.

A Xavi, mi compañero de vida. El pilar que, aunque esté torcido, todo lo sustenta. Y a nuestros hijos, Anna y Pau, por darle un nuevo sentido al vivir. Siento el tiempo robado durante esta última etapa.

A todos ellos, gracias.

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
BR	Bronquiolitis respiratoria
CFPE	Combinación fibrosis pulmonar enfisema
CL	Célula de Langerhans
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
CPT	Capacidad pulmonar total
DLCO	Capacidad de difusión del monóxido de carbono
DMP	Densidad media de píxeles
EPID	Enfermedades pulmonares intersticiales difusas
FBP	Factor de crecimiento de fibroblastos
FC	Número de veces de cambio
FEV ₁	Volumen espiratorio forzado en el primer segundo
FFIP	Fijadas en formalina e incluidas en parafina
FFPE	Formalin-fixed paraffin-embedded
FPI	Fibrosis pulmonar idiopática
FVC	Capacidad vital forzada
GCS	Glucocorticoides sistémicos
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GRO	Oncogén regulado por crecimiento

HCL	Histiocitosis de células de Langerhans
HPCL	Histiocitosis pulmonar de células de Langerhans
IHQ	Inmunohistoquímica
IIB	Instituto de Investigación Biomédica
IFN	Interferón
IL	Interleuquina
IP	Proteína inducida por interferón
IPP	Interacción proteína – proteína
ISC III	Instituto de Salud Carlos III
LBA	Lavado broncoalveolar
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MCP	Proteína quimioatrayente de monocitos
MIG	Monocina inducida por interferón
MMP	Metaloproteinasa de la matriz
MS	Multi system
NID	Neumonía intersticial descamativa
OSM	Oncostatina
PCA	Análisis de componentes principales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMN	Neutrófilos polimorfonucleados

RF	Random Forest
SS	Single system
TARC	Quimioquina regulada por activación y timo
TCAR	Tomografía computarizada de alta resolución
TGF	Transforming growth factor
TIMP	Inhibidor tisular de metaloproteinasas
TNF	Tumor necrosis factor
VR	Volumen residual
XG	Xantogranuloma

Índice de Tablas y Figuras

Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación de las histiocitosis adaptado de la *Histiocyte Society*.

Tabla 2. Panel comercial (Qiagen) que incluye 160 genes mutados en cáncer.

Tabla 3. Panel comercial que incluye las 80 citoquinas estudiadas.

Tabla 4. Características demográficas y clínicas de los pacientes incluidos en el estudio.

Tabla 5. Características demográficas, clínicas y radiológicas de los 19 pacientes incluidos con HPCL.

Tabla 6. Clasificación de las muestras pulmonares en función de sus hallazgos histológicos.

Tabla 7. Análisis de mutaciones de los casos individualizados de la Tabla 5.

Tabla 8. Relación entre las características clínicas según alteraciones de la vía MAPK.

Tabla 9. Relación en la evolución según las alteraciones de la vía MAPK.

Tabla 10. Características clínicas y demográficas de los pacientes con EPID incluidos.

Tabla 11. Expresión de citoquinas y quimioquinas en el LBA de los pacientes con EPID.

Tabla 12. Listado de las proteínas con diferencias significativas en patologías de EPID.

Índice de Figuras

Figura 1. Número de publicaciones referentes a la histiocitosis de células de Langerhans.

Figura 2. Identificación de células de Langerhans mediante estudio inmunohistoquímico.

Figura 3. Ejemplo de los tres estadios histológicos descritos en la HPCL.

Figura 4. Ejemplo de patrón típico de HPCL en la TCAR torácica.

Figura 5. Imagen de adaptación simplificada del linaje de la familia de células dendríticas.

Figura 6. Imagen de adaptación simplificada del mecanismo de acción de las células dendríticas.

Figura 7. Esquema simplificado de la vía ERK/RAS/MAPK.

Figura 8. Selección de variables para el modelo de clasificación RF.

Figura 9. Niveles diferenciales de citoquinas/quimioquinas en LBA de pacientes con EPID.

Figura 10. Perfil inflamatorio de las proteínas seleccionadas en LBA de pacientes con EPID.

Figura 11. Abundancia relativa de proteínas seleccionadas para los grupos establecidos en EPID.

Figura 12. Análisis de componentes principales de la expresión de citoquinas en las EPID.

Figura 13. Análisis de componentes principales de la expresión de citoquinas en las EPID.

Figura 14. Interacción proteína-proteína. Red de interacción proteína-proteína visualizada por STRING.

Figura 15. Análisis de correlación de las proteínas seleccionadas.

Figura 16. Análisis de correlación de las proteínas seleccionadas con parámetros de función pulmonar FEV₁/FVC.

Figura 17. Análisis de correlación de las proteínas seleccionadas con parámetros de función pulmonar FVC.

Figura 18. Modelo de clasificación construido utilizando citoquinas candidatas.

Tabla de contenido

RESUMEN	21
SUMMARY	23
1. INTRODUCCIÓN	27
1.1. Enfermedades pulmonares intersticiales difusas	28
1.2. Histiocitosis pulmonar de células de Langerhans	29
1.2.1. Epidemiología.....	32
1.2.2. Histopatología	32
1.2.3. Aspectos clínicos.....	35
1.2.4. Diagnóstico.....	38
1.2.5. Patogenia: problemas no resueltos	39
1.2.6. Tratamiento y pronóstico.....	46
2. JUSTIFICACIÓN.....	53
3. HIPÓTESIS	57
4. OBJETIVOS.....	61
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	65
5.1. Estudio 1: Caracterización genética de la HPCL	65
5.1.1. Diseño del estudio y aspectos éticos.....	65
5.1.2. Población del estudio.....	65
5.1.3. Variables	66
5.1.4. Análisis de mutaciones	68
5.1.5. Análisis estadístico	71
5.2. Estudio 2: Perfil inflamatorio de la HPCL	72
5.2.1. Diseño del estudio y aspectos éticos.....	72
5.2.2. Población del estudio.....	72

5.2.3. Variables	73
5.2.4. Perfil inflamatorio de los pacientes con EPID	75
5.2.5. Análisis estadístico	78
6. RESULTADOS.....	81
6.1. Estudio 1: Caracterización genética de la HPCL	81
6.1.1. Características demográficas y clínicas.....	81
6.1.2. Análisis de mutaciones	85
6.2. Estudio 2: Perfil inflamatorio de la HPCL	89
6.2.1. Características demográficas y clínicas.....	89
6.2.2. Perfil inflamatorio de los pacientes con EPID	91
7. DISCUSIÓN	109
8. CONCLUSIONES	121
9. LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN FUTURA	125
10. BIBLIOGRAFÍA	129

Resumen

La histiocitosis pulmonar de células de Langerhans (HPCL) es una enfermedad minoritaria que afecta de forma predominante a pacientes jóvenes y fumadores. Esta enfermedad se caracteriza por el acúmulo, alrededor de los bronquiolos terminales, de unas células parecidas a las células de Langerhans (CL) epiteliales junto con otras células inflamatorias, principalmente linfocitos, eosinófilos y macrófagos. Su diagnóstico definitivo precisa de la obtención de una muestra de tejido pulmonar. El lavado broncoalveolar (LBA) puede contribuir en el diagnóstico, en un contexto clínico y radiológico adecuado, aunque su rentabilidad es muy baja.

Referente a la patogenia de la enfermedad hasta ahora desconocida, el reciente descubrimiento de mutaciones somáticas recurrentes en oncogenes de la vía MAPK (del inglés *Mitogen-Activated Protein Kinases*) en los pacientes con HPCL, la convierte en una verdadera enfermedad neoplásica no maligna. Sin embargo, existen muchas incógnitas sobre las implicaciones clínicas de estas mutaciones en la práctica habitual, así como sobre el papel que ejerce toda la cascada inflamatoria evidenciada en la enfermedad.

Las hipótesis que nos planteamos son: 1) Las mutaciones de la vía MAPK están presentes en pacientes con HPCL de nuestro entorno independientemente del estadio histológico. 2) Los pacientes con HPCL presentan un perfil inflamatorio característico en el LBA que permite diferenciarlos de otras enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID) relacionadas con el tabaco.

Es por ello que el objetivo de la tesis es determinar el impacto diagnóstico y clínico de las mutaciones en la vía MAPK y el perfil de citoquinas del LBA en los pacientes con HPCL de nuestro entorno.

Con esta premisa se diseñaron dos estudios exploratorios en los que se incluyeron pacientes con diagnóstico de HPCL y otras EPID conocidas por su relación con el tabaco.

En el primer estudio se incluyeron todos los pacientes con diagnóstico histológico de HPCL y se evaluó la presencia de mutaciones en la vía MAPK. Posteriormente, se relacionó la identificación de mutaciones con variables clínicas y de evolución.

En el segundo estudio, se reclutaron pacientes con diagnóstico de HPCL, EPID relacionadas con el tabaco (EPID – tabaco) y fibrosis pulmonar idiopática (FPI) a quienes se les había practicado un LBA como parte del proceso diagnóstico. Se evaluó el perfil de citoquinas de cada grupo para establecer si la HPCL presentaba un perfil diferenciado que permitía identificarla del resto, y si este se relacionaba con variables clínicas.

Este estudio concluye que la detección de mutaciones en la vía MAPK en pacientes con HPCL, independientemente del estadio histológico, es menor que la descrita en casos seleccionados en estadios celulares. Asimismo, no se evidenció ninguna diferencia entre las características clínicas ni de evolución en los pacientes que presentaban mutaciones. En cuanto al perfil inflamatorio del LBA en los pacientes con HPCL, se identificó un perfil inflamatorio característico que permitió diferenciar la HPCL del resto de las entidades clásicamente relacionadas con el tabaco.

La conclusión global del trabajo es que la detección de mutaciones en la vía MAPK en los pacientes de nuestra práctica habitual es menos frecuente que en los estudios científicos publicados. Sin embargo, la determinación del perfil inflamatorio del LBA puede ser un prometedor método, y menos invasivo, para el diagnóstico de la HPCL, particularmente en aquellos pacientes no candidatos a biopsia pulmonar.

Summary

Pulmonary Langerhans cell histiocytosis (PLCH) is a rare disease that predominantly affects young smokers patients. This disease is characterized by the accumulation, around the terminal bronchioles, of cells similar to epithelial Langerhans cells, together with other inflammatory cells, mainly lymphocytes, eosinophils and macrophages. Its definitive diagnosis requires obtaining a sample of lung tissue. Bronchoalveolar lavage (BAL) can contribute to the diagnosis, in an adequate clinical and radiological context, although its profitability is very low.

Regarding the pathogenesis of the disease, it was unknown until now, the recent discovery of recurrent somatic mutations in oncogenes of the MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) pathway in patients with PLCH makes it a true non-malignant neoplastic disease. However, there are many concerns about the clinical implications of these mutations in routine practice, as well as about the role played by the entire inflammatory cascade evidenced in the disease.

The hypotheses that we propose are: 1) MAPK pathway mutations are present in patients with PLCH in our environment regardless of histological stage. 2) Patients with PLCH present a characteristic inflammatory profile in BAL that makes it possible to differentiate them from other tobacco-related diffuse interstitial lung diseases (ILDs).

For this reason, the objective of this doctoral thesis is to determine the diagnostic and clinical impact of mutations in the MAPK pathway and the BAL cytokine profile in patients with PLCH in our setting.

Two exploratory studies were designed with this premise in which patients diagnosed with PLCH and other ILD related to tobacco were included.

In the first study, all patients with a histological diagnosis of PLCH were included, and the presence of mutations in the MAPK pathway was evaluated. Subsequently, the identification of mutations was related to clinical variables and evolution.

In the second study, patients diagnosed with PLCH, ILD related to tobacco (ILD-tobacco), and idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) who had undergone BAL as part of the diagnostic process, were recruited. The cytokine profile of each group was evaluated to establish if the PLCH had a differentiated profile that allowed it to be identified from the rest, and if this was related to clinical variables.

This study concludes that the detection of mutations in the MAPK pathway in patients with PLCH, regardless of histological stage, is lower than that described in selected cases in cellular stages. Likewise, no difference was found between the clinical characteristics or evolution in the patients who presented mutations. Regarding the inflammatory profile of BAL in patients with PLCH, a characteristic inflammatory profile was identified that allowed differentiating PLCH from the rest of the entities classically related to tobacco.

The overall conclusion of the work is that the detection of mutations in the MAPK pathway in patients in our usual practice is less frequent than in published scientific studies. However, the determination of the inflammatory profile of the BAL may be a promising less invasive method for the diagnosis of PLCH, particularly in those patients who are not candidates for lung biopsy.

1. INTRODUCCIÓN

1. Introducción

Las enfermedades minoritarias son patologías que afectan a un pequeño número de personas en comparación con la población general y que, por su rareza, plantean cuestiones específicas. En Europa, una enfermedad se considera minoritaria cuando su prevalencia se encuentra por debajo de 5 casos por cada 10.000 personas (1).

En la actualidad existen miles de enfermedades minoritarias registradas. Estas patologías son generalmente enfermedades graves y habitualmente crónicas y progresivas. En la mayoría de ellas, los signos pueden observarse desde el nacimiento o edad pediátrica, como consecuencia directa de la alta frecuencia de enfermedades de origen genético y la presencia de anomalías congénitas. Sin embargo, más del 50% de las enfermedades raras aparecen en la edad adulta (1).

El ámbito de las enfermedades minoritarias sufre un déficit de conocimientos médicos y científicos importantes. Éstos son debidos principalmente a las grandes dificultades que supone la investigación de enfermedades cuyas prevalencias son tan bajas en la población. Además, a esto se le añade que a menudo la investigación está muy dispersa en equipos de investigación no siempre bien coordinados. Con este propósito, en el año 2003 se creó la Red Epidemiológica de Investigación de Enfermedades Raras (1), bajo el programa del Instituto de Salud Carlos III (ISC III).

1.1. Enfermedades pulmonares intersticiales difusas

Las **enfermedades pulmonares intersticiales difusas** (EPID) son un grupo heterogéneo de más de 200 enfermedades pulmonares, la mayoría de ellas clasificadas como enfermedades minoritarias debido a su baja prevalencia (2).

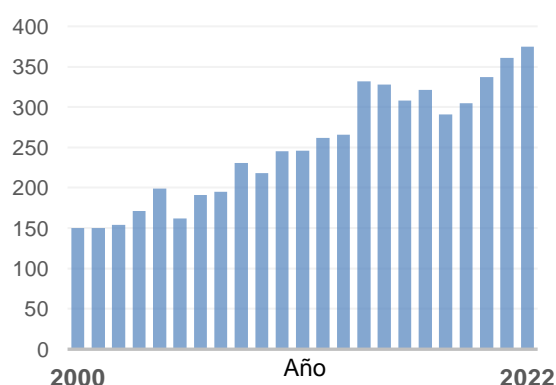
Las EPID se caracterizan por la afectación difusa del espacio alvéolo – intersticial, pudiendo estar también comprometida la vasculatura y pequeña vía aérea (2,3). Estas entidades a menudo comparten características clínicas y radiológicas por lo que su diagnóstico puede ser un auténtico reto. Se conocen más de 150 causas de EPID, aunque su etiología finalmente sólo es conocida en el 30% de los casos (2), el resto se consideran entidades idiopáticas (3).

Dentro de los factores de riesgo descritos, la inhalación del humo del tabaco desempeña un papel central en el desarrollo de múltiples enfermedades respiratorias. Además de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, el enfisema pulmonar, y el cáncer de pulmón, se incluye un grupo distinto pero heterogéneo de enfermedades del parénquima pulmonar, en las que también el humo del tabaco juega un papel principal como factor de riesgos, las denominadas **EPID relacionadas con el tabaco** (4). Convencionalmente, éstas engloban las entidades conocidas por tener un fuerte impacto epidemiológico con el humo del tabaco, dentro de las que se incluyen: la bronquiolitis respiratoria asociada con EPID (BR – EPID), la neumonía intersticial descamativa (NID), la histiocitosis pulmonar de células de Langerhans (HPCL), y la neumonía eosinofílica aguda (4). Sin embargo, el tabaco también puede ser un factor de riesgo para el desarrollo de otras EPID: fibrosis pulmonar idiopática (FPI), combinación fibrosis pulmonar enfisema (CFPE), y las conectivopatías relacionadas con EPID, especialmente la artritis reumatoide (4,5).

Entre las mencionadas EPID asociadas al tabaco, en los últimos años la HPCL ha despertado un especial interés por los avances reportados sobre su patogenia, como se puede observar en la **figura 1**, por el incremento de publicaciones indexadas.

Aun así, quedan muchas cuestiones sobre su patogenia y comportamiento clínico por resolver, preguntas que han motivado la presente tesis doctoral.

Figura 1: Número de publicaciones referentes a la histiocitosis de células de Langerhans. (Fuente: Pubmed).



1.2. Histiocitosis pulmonar de células de Langerhans

La **histiocitosis de células de Langerhans** (HCL) es una enfermedad minoritaria, con una prevalencia de 1 – 2 casos por 100.000 habitantes (6), cuya etiología es desconocida, y que se caracteriza por la infiltración de varios órganos por células mieloides especializadas que comparten morfología y receptores de superficie con las células de Langerhans epiteliales (7). La HCL pertenece al amplio grupo de enfermedades histiocitarias. Dentro de este grupo se incluyen diversos trastornos que se caracterizan por el acúmulo de células del sistema retículo – endotelial en los tejidos y órganos afectados (clasificación de la *Histiocyte Society*) (8) (**Tabla 1**):

Tabla 1. Clasificación de las histiocitosis adaptado de la *Histiocyte Society*.

<p>Grupo L (relacionadas con células de Langerhans)</p> <ul style="list-style-type: none">• Histiocitosis de células de Langerhans• Histiocitosis de células indeterminadas• Enfermedad de Erdheim-Chester• Enfermedad mixta histiocitosis de células de Langerhans / Erdheim - Chester
<p>Grupo C (cutáneas y mucocutáneas)</p> <ul style="list-style-type: none">• Cutáneas no – HCL<ul style="list-style-type: none">• <u>Familia xantogranuloma (XG)</u>: XG juvenil, XG adulto, Reticulohistiocitoma solitario, Histiocitosis cefálica benigna, Histiocitosis generalizada eruptiva, Histiocitosis nodular progresiva.• <u>Familia no – xantogranuloma (XG)</u>: Rosai Dorfman cutáneo, XG necrobiótico, otras.• Cutáneas no – HCL con componente mayoritariamente sistémico
<p>Grupo M (histiocitosis malignas)</p> <ul style="list-style-type: none">• Histiocitosis malignas primarias• Histiocitosis malignas secundarias
<p>Grupo R (enfermedad de Rosai Dorfman)</p> <ul style="list-style-type: none">• Enfermedad de Rosai Dorfman familiar• Enfermedad de Rosai Dorfman esporádica<ul style="list-style-type: none">• Enfermedad de Rosai Dorfman clásica• Enfermedad de Rosai Dorfman extra – nodal• Enfermedad de Rosai Dorfman con neoplasia o enfermedad inmunológica• Inclasificable
<p>Grupo H (Linfocitosis hemofagocítica y síndrome de activación de macrófagos)</p> <ul style="list-style-type: none">• Linfocitosis hemofagocítica primaria• Linfocitosis hemofagocítica secundaria• Linfocitosis hemofagocítica origen desconocido / incierto

La HCL afecta a pacientes de todas las edades, siendo mucho más frecuente en las edades pediátricas. Se trata de una enfermedad con un amplio espectro de manifestaciones clínicas tanto en niños como en adultos, que van desde formas que resuelven de forma espontánea hasta formas diseminadas potencialmente mortales. Por este motivo, la *Histiocyte Society* en su última revisión propuso categorizar la HCL según el número y tipo de órganos involucrados (8):

- HCL sistémica (MS del inglés *multi – system*): cuando en un mismo paciente se combinan diversos grados de afectación en diferentes órganos. Por orden de frecuencia, los órganos más afectados son: hueso, piel, hipotálamo – hipófisis, ganglios linfáticos, lesiones pulmonares y más raramente neurológicas centrales. Se consideran órganos de riesgo cuando existe afectación en hígado, bazo o sistema hematológico. Las HCL MS son formas, por lo general, con un comportamiento clínico agresivo, especialmente cuando se afectan los órganos de riesgo.
- HCL localizadas (SS del inglés *single – system*): cuando existe afectación de un solo órgano, principalmente huesos, piel o pulmones. La gran mayoría de estas formas presentan un curso indolente pudiendo llegar a remitir de forma espontánea en algunos casos. Aunque algunos casos con formas inicialmente localizadas pueden terminar desarrollando una HCL MS.

Dentro de los órganos que se pueden comprometer en la HCL, cabe resaltar la afectación pulmonar en la edad adulta. Dadas sus características epidemiológicas y clínicas específicas se justifica considerarla como una entidad diferenciada del resto, la **histiocitosis pulmonar de células de Langerhans**.

1.2.1. Epidemiología

La HPCL es una enfermedad respiratoria minoritaria que afecta de forma prácticamente exclusiva a pacientes jóvenes fumadores (9), por eso se incluye clásicamente dentro de las EPID relacionadas con el tabaco (4).

Aunque su incidencia y prevalencia exactas no son conocidas, el diagnóstico de HPCL representa menos del 5% de todas las EPID, con un pico de incidencia entre los 20 y 40 años (10). La asociación entre la HPCL y el tabaco es la característica epidemiológica más relevante hasta ahora reportada, dado que más del 90% de los pacientes afectados presenta historia de tabaquismo. Habitualmente con dosis acumuladas de más de 20 cigarrillos / día (11). Aunque también se ha descrito una mayor incidencia en pacientes sometidos a tratamientos con radio y quimioterapia, especialmente para enfermedades hematológicas siendo la más descrita el linfoma de Hodgkin (12).

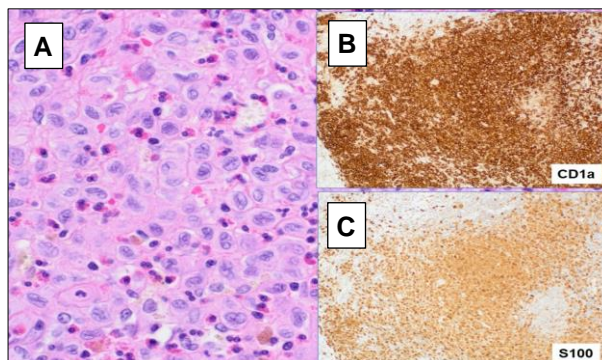
A pesar de la intensa asociación entre el tabaco y la HPCL, la poca incidencia de la enfermedad ha dificultado llegar a resultados concluyentes sobre su relación patogénica.

1.2.2. Histopatología

La HPCL se caracteriza por el acúmulo peri – bronquiolar de unas células que son parecidas a las células de Langerhans (CL) epiteliales. Estas células acumuladas en la HPCL, que a partir de ahora definiremos como células HCL, para diferenciarlas de las CL normales, se organizan junto con otras células inflamatorias, alrededor de la pequeña vía aérea.

Las **células de Langerhans** son un tipo específico de células dendríticas que se encuentran presentes de forma natural en la piel y otros epitelios del organismo, donde actúan como células presentadoras de antígenos (13). Morfológicamente, son células de 15 μm , que presentan de forma característica un núcleo irregular y un citoplasma ligeramente pálido con escasas vacuolas fagocíticas. Estas células se pueden identificar fácilmente por la presencia citoplasmática de los gránulos de Birbeck que son orgánulos de estructura pentalaminar que pueden presentar dilataciones en su porción más distal mostrando una estructura característica en forma de “raquetas de tenis”. Los gránulos de Birbeck son identificables a través de microscopía electrónica o bien por tinción inmunohistoquímica (IHQ) de CD207 (Langerina) (14). Otro factor característico de las CL es la expresión en su superficie de moléculas CD1, proteínas transmembrana polimórficas estructuralmente relacionadas con el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase I (15-17). Aunque las CL epiteliales son CD1a+/CD1c-, las que se encuentran presentes en los granulomas de las HCL (células HCL) expresan de forma más intensa ambos marcadores CD1a+/CD1c+ (16) (**Figura 2**). La tinción positiva para la proteína intracelular S-100, aunque fue ampliamente utilizada en el pasado para identificar las CL, no es específica de estas células y se puede observar en otros tipos celulares, como en las neuroendocrinas y algunos macrófagos (18).

Figura 2. Identificación de células de Langerhans mediante estudio inmunohistoquímico.



Láminas de biopsia pulmonar fotografiada donde se identifican células de Langerhans. A) Tinción hematoxilina eosina (200x). B) Tinción inmunohistoquímica positiva para CD1a (100x). C) Tinción inmunohistoquímica positiva para S100 (100x).

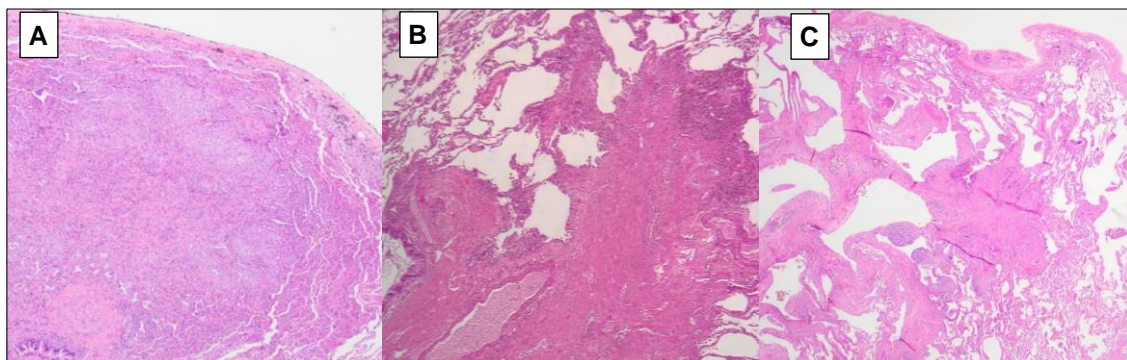
En la HPCL, las células HCL junto con cantidades variables de linfocitos, eosinófilos, macrófagos y, más raramente, células gigantes, se organizan formando granulomas localizados alrededor de los bronquiólos terminales y respiratorios, y separados entre sí por parénquima pulmonar sano (18).

El aspecto histológico de estas lesiones dependerá del estadio de la enfermedad, y aunque es posible identificar lesiones de diferentes fases en una misma muestra pulmonar, principalmente se diferencian tres estadios (19)

(Figura 3):

- Estadios iniciales: la lesión característica es el granuloma central peribronquiolar constituido principalmente por células HCL. En esta fase, también participan grandes cantidades de linfocitos, principalmente linfocitos T CD4+, que se localizan entre las células HCL y la periferia, donde también se encuentran presentes en número variable eosinófilos y macrófagos. Los granulomas HCL característicamente invaden y destruyen la pared bronquiolar adyacente, dando lugar a unas lesiones cavitadas que corresponden a la luz residual del bronquiólo y que pueden observarse desde el inicio de la enfermedad.
- Estadios intermedios: menor representación de células HCL, que se presentan como grupos celulares alrededor de grandes cantidades de linfocitos, macrófagos y eosinófilos, y en menor medida neutrófilos.
- Estadios avanzados: las lesiones granulomatosas iniciales se sustituyen por cicatrices fibróticas de aspecto estrellado y cavidades quísticas confluentes rodeadas por un anillo fibroso que puede dar el aspecto de panal de abeja. En esta etapa las células HCL están prácticamente ausentes. El enfisema de tracción puede contribuir al aspecto quístico de las lesiones avanzadas.

Figura 3. Ejemplo de los tres estadios histológicos descritos en la HPCL.



Tinción hematoxilina eosina, 40x. A) HPCL estadio inicial: lesión nodular, densamente celular, de localización bronquiocéntrica que se extiende en los intersticios del parénquima pulmonar adyacente, constituida principalmente por célula de Langerhans y eosinófilos. B) HPCL estadio intermedio: lesión de histiocitosis en fase mixta con marcada fibrosis hialina, de aspecto estrellado en “cabeza de medusa” de distribución bronquiocéntrica, con agregados de células de Langerhans en cantidad moderada y eosinófilos C) HPCL estadio fibrótico: marcada fibrosis hialina de aspecto estrellado en “cabeza de medusa” de distribución bronquiocéntrica, constituido por abundante colágenos de aspecto cicatricial que se extiende en los intersticios y se acompaña por escasos agregados de células de Langerhans y eosinófilos.

1.2.3. Aspectos clínicos

Manifestaciones clínicas

La HPCL del adulto habitualmente se comporta como una enfermedad localizada, con una presentación clínica muy variada (20-22). En el momento del diagnóstico dos terceras partes de los pacientes presentan síntomas respiratorios, principalmente tos seca, disnea de esfuerzo y dolor torácico, que se pueden acompañar de síntomas constitucionales como fiebre, pérdida de peso, astenia o sudoración nocturna (11,20). Un 20% de los pacientes se muestran asintomáticos, siendo la afectación pulmonar un hallazgo casual en la radiografía de tórax (6). Finalmente, otro 20% de los pacientes presentan un neumotórax como manifestación inicial de HPCL, principalmente en aquellos casos con lesiones quísticas pulmonares (6).

En los casos en que se desarrolla enfermedad MS, las manifestaciones extra-pulmonares más frecuentes son: lesiones óseas (más del 20%), seguidas por la diabetes insípida secundaria a la afectación de la hipófisis (5%) y las lesiones cutáneas (18).

Radiología

La **radiología simple** de tórax a menudo muestra un patrón retículo – nodular bilateral y simétrico, de predominio en lóbulos superiores y medios, y que de forma típica respeta los ángulos costo-frénicos (18,20). En etapas avanzadas de la enfermedad, se pueden visualizar las lesiones quísticas dentro de los infiltrados pulmonares. En menos de un 10% de los casos la radiografía simple de tórax es normal (18).

La **tomografía computarizada de alta resolución (TCAR)** torácica proporciona mayor información para el diagnóstico de la HPCL (19,21,23) (**Figura 4**). Los hallazgos histológicos de la HPCL se representan en la TCAR torácica dando un patrón típico donde se combina la presencia de pequeños nódulos pulmonares mal delimitados, algunos de ellos cavitados, y lesiones quísticas de pared tanto gruesa como fina. Estas lesiones son focales, separadas entre sí por parénquima pulmonar aparentemente normal, y de predominio en lóbulos superiores y medios, con tendencia a respetar las zonas basales. Su distribución centrolobulillar refleja la afectación de la HPCL centrada en el bronquiolo. En las fases evolucionadas, los hallazgos predominantes en la TCAR son las lesiones quísticas. Estas lesiones son de tamaño variable, aunque la mayoría de ellas suelen ser inferiores a 1 cm de diámetro, y pueden distribuirse de forma aislada o confluir dando lugar a imágenes de bullas pulmonares. Estudios longitudinales que incluyeron series de TCAR de pacientes con HPCL evidenciaron que las lesiones cavitadas podían resolver, mientras que los quistes persistían en el tiempo (24). A parte de las lesiones típicas de HPCL, éstas pueden confluir con otros hallazgos radiológicos resultado de la exposición del tabaco, como el enfisema o el vidrio deslustrado.

Figura 4. Ejemplo de patrón típico de HPCL en la TCAR torácica.

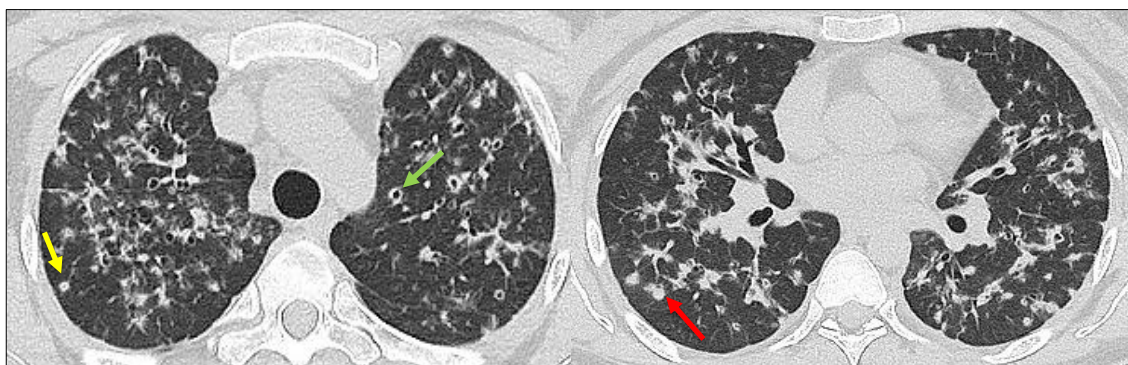


Imagen TCAR torácica en corte sagital. Flecha roja: lesión nodular. Flecha amarilla: lesión nodular con cavitación en su interior. Flecha verde: quiste pulmonar de paredes gruesas.

Función pulmonar

Los resultados de las pruebas de función pulmonar variarán en el curso de la enfermedad y según las lesiones anatómicas predominantes (11,25). En el momento del diagnóstico hasta el 20% de los pacientes presentan pruebas de función pulmonar dentro de los márgenes de referencia (6). La alteración ventilatoria obstructiva, representada por la relación entre del volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV_1) y la capacidad vital forzada (FVC) (FEV_1/FVC) menor de 0,7, con signos de hiperinsuflación pulmonar, es la alteración respiratoria más característica de los pacientes con HPCL. Ésta se debe a la afectación bronquiolar típica de la enfermedad. Los trastornos restrictivos son menos frecuentes y principalmente afectan a pacientes con neumotórax recurrente y pleurodesis. Aproximadamente el 70% de los pacientes tienen una disminución de la capacidad de difusión del monóxido de carbono (DLCO), que es la alteración más común observada en las pruebas de funcionalismo pulmonar (25). En más de la mitad de los pacientes se observa una disminución progresiva de la DLCO y del FEV_1 en el transcurso de los primeros años posteriores al diagnóstico (26).

1.2.4. Diagnóstico

El diagnóstico definitivo de HPCL precisa de la revisión histopatológica de una muestra de tejido pulmonar afecto, que puede ser obtenida mediante biopsia pulmonar transbronquial o quirúrgica. Sin embargo, en los pacientes fumadores que presentan un patrón radiológico típico en la TCAR torácica y en que no se planteen tratamientos sistémicos o el riesgo de realizar un procedimiento invasivo sea alto, se permite asumir un diagnóstico de probabilidad de HPCL (27).

Dentro de los métodos diagnóstico de la HPCL se incluyen:

Broncoscopia

Aunque la **biopsia pulmonar transbronquial** puede mostrar los hallazgos patológicos característicos de la HPCL, su rentabilidad diagnóstica es limitada (15-40%) dada la distribución focal de las lesiones (28). Este hecho, junto al riesgo de neumotórax asociado a la presencia de quistes, limitan su uso como opción diagnóstica a un grupo de pacientes muy seleccionado.

El **lavado broncoalveolar (LBA)** es una prueba menos invasiva, que consiste en la instilación de una cantidad variable de suero salino isotónico y estéril a temperatura ambiente, con volúmenes que oscilan entre los 100 y 400 ml, en alícuotas de 20 a 60 ml, dejando el broncoscopio encajado en un segmento pulmonar, y aspirando con la misma jeringa el volumen instilado para su posterior análisis. El LBA permite determinar el recuento celular que puede revelar un incremento de eosinófilos y neutrófilos comparado con los pacientes jóvenes fumadores, con un recuento linfocitario normal (29). La detección superior al 5% de células positivas para CD1a, en un contexto clínico apropiado y respaldado por hallazgos consistentes en la TCAR de tórax, es específico de la HPCL, aunque solo se detecta en el 0-25% de los pacientes afectados (30-33).

Biopsia pulmonar quirúrgica

La prueba “gold estándar” para el diagnóstico definitivo de HPCL es la **biopsia pulmonar quirúrgica** mediante vídeo – toracoscopia o toracotomía. Cuando se decida someter al paciente a cirugía diagnóstica, se priorizará realizar la biopsia en la zona del pulmón donde en la TCAR torácica predominen las imágenes nodulares. Dado el riesgo inherente de una exploración quirúrgica, la indicación de una biopsia pulmonar quirúrgica quedará relegada a los casos en que se plantee un diagnóstico diferencial y aquellos candidatos a tratamiento sistémico.

Escasos estudios han explorado el potencial del LBA con método diagnóstico poco invasivo en esta enfermedad. Sería de gran utilidad la determinación de nuevos biomarcadores diagnósticos en muestras de LBA que mejoren la rentabilidad diagnóstica de esta enfermedad.

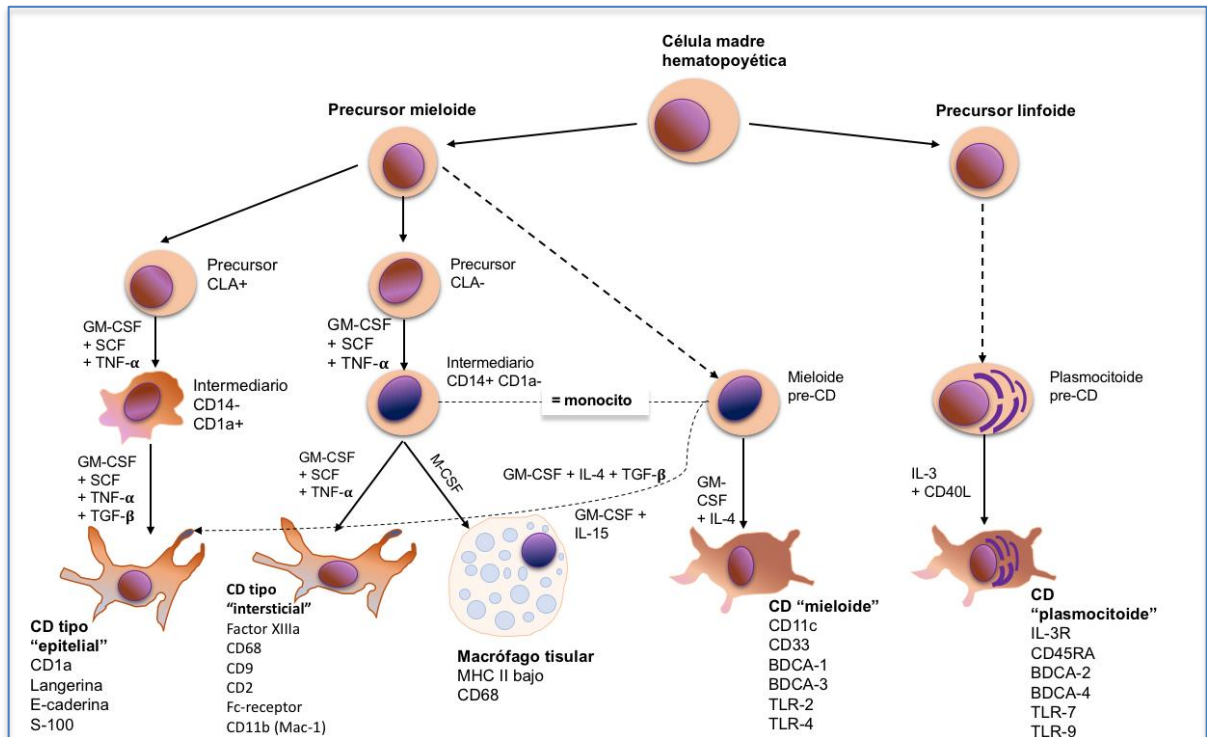
1.2.5. Patogenia: problemas no resueltos

Aunque se ha descrito que el acúmulo de células HCL es el elemento central de la HPCL, los mecanismos patogénicos de la enfermedad no son del todo claros. Como tampoco lo son, las causas que justifican la amplia variabilidad en el pronóstico de la enfermedad y su relación con el tabaco.

¿Es la HPCL una reacción inflamatoria?

Las CL epiteliales pertenecen a un linaje de células dendríticas que proviene de la médula ósea, y cuya función principal es la de actuar como células presentadoras de antígenos para los linfocitos T (34) (**Figura 5**).

Figura 5. Imagen de adaptación simplificada del linaje de la familia de células dendríticas.

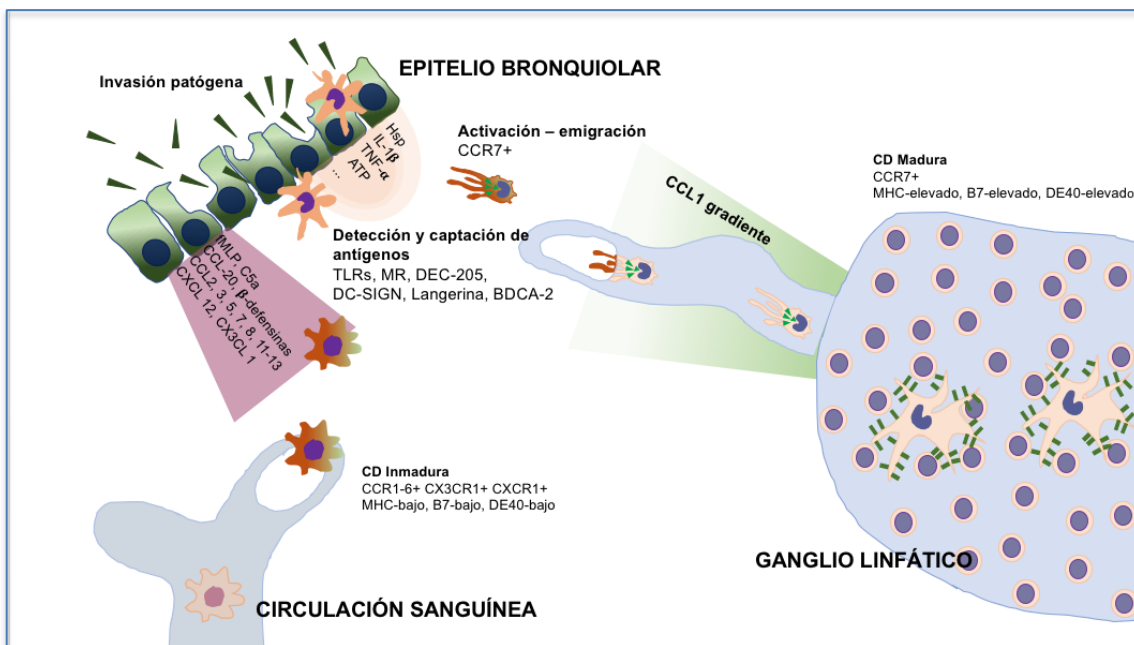


En el sistema respiratorio, las CL se encuentran principalmente en el epitelio traqueo-bronquial de la vía aérea principal, y en menor medida en el epitelio de la pequeña vía aérea. Su presencia en el epitelio alveolar es extremadamente escasa, aunque se ha demostrado la presencia de CL en los alveolos de pacientes fumadores sanos (18). Las CL están idealmente posicionadas para interceptar cualquier potencial antígeno del aire inhalado, participando de esta manera en la respuesta inmune innata y adaptativa.

En el **pulmón sano**, las CL igual que otras células dendríticas de tejidos periféricos, son células inmaduras que expresan de forma característica el receptor de quimioquinas CCR6 (35). Las CL se reclutan desde la circulación sanguínea periférica, a partir de sus formas precursoras, hacia las zonas de exposición antigénica. En el epitelio bronquial se diferencian a CL en respuesta de múltiples señales quimio y citotáxicas, entre ellas *Granulocyte-macrophage*

colony-stimulating factor (GM-CSF), *tumor necrosis factor- α* (TNF- α), *transforming growth factor- β* (TGF- β) y CCL20 (17,36-40). Una vez en el epitelio bronquial, las CL actúan como células centinela. Éstas, son capaces de atrapar a los antígenos, interiorizarlos y fragmentarlos, para expresarlos nuevamente en su membrana a través del CMH. Sin embargo, dado que son células inmaduras, no tienen capacidad para inducir una respuesta inmunológica *in situ*. Primero, deberán migrar vía aferente por los canales linfáticos hasta los órganos linfáticos regionales, donde estimularán a las células T antígeno – específicas. Esta migración por la vía linfática es crucial para la inducción de una respuesta inmune específica y está altamente influenciada por el gradiente de quimioquinas [principalmente TNF- α , e interleuquina (IL)1 β], entre los canales aferentes linfáticos y la zona de exposición antigénica (35). Durante esta migración, las CL maduran y cambian su expresión de membrana CCR6 por CCR7, para poder unirse al ligando CCR19 (CCR19L) que se encuentra en los tejidos linfáticos secundarios (35). En este punto, las CL pierden su capacidad de capturar antígenos y en respuesta a señales adicionales, particularmente a la interacción CD40 – CD40L, pasan a ser células capaces de secretar elevadas cantidades de IL-12 que induce la proliferación de los linfocitos T antígenos específicos y que posteriormente se diferenciarán a células T efectoras capaces de producir citoquinas que recircularán a los tejidos agredidos (35-36). Por consiguiente, el microambiente de quimioquinas y citoquinas es un elemento cardinal en la función de las CL.

Figura 6. Imagen de adaptación simplificada del mecanismo de acción de las células dendríticas.



Dibujo que representa el reclutamiento de las células dendríticas inmaduras de la circulación sanguínea, ante el estímulo de una invasión patógena. En la zona reclutada actúan como células centinela, detectan y captan el antígeno, para posteriormente activar la respuesta inmune en el ganglio linfático local. CD: célula dendrítica.

Concretamente en la **HPCL**, las células de Langerhans-*like* (células HCL) se acumulan en grandes cantidades alrededor del bronquiolo y, a diferencia del pulmón sano, éstas tienen capacidad para invadir y destruir la pared bronquiolar y el parénquima pulmonar adyacente (7). Ambos puntos se hipotetizan como elementos clave de la enfermedad.

- **Acúmulo de células HCL:** Se han descrito varios mecanismos que podrían justificar el acúmulo de las células HCL en la HPCL. Sin embargo, la expresión de grandes cantidades de GM-CSF, TNF- α e IL-1 β en las lesiones de HPCL (41-43), sugiere que el reclutamiento celular desde sus formas precursoras es el mecanismo más implicado (44). Por el contrario, la proliferación de las células HCL tiene un papel muy limitado, dado que se ha demostrado que su tasa de proliferación es similar al de las células epiteliales bronquiales y lejos de las células neoplásicas (45). Finalmente, varios estudios apuntan que las células LCH, a diferencia de las CL, son menos sensibles a la

apoptosis dado que expresan en su membrana moléculas anti-apoptóticas (Bcl-2) (46), sin embargo, no se ha podido demostrar si estas células HCL son realmente resistentes a la muerte celular programada.

- **Capacidad de destrucción:** Las células de HCL expresan de forma coincidente receptores de quimioquinas CCR6 y CCR7 (47,48). Este hecho sugiere que las células HCL tienen un estado funcional diferente a las CL epiteliales, que les permitiría inducir una respuesta local de las células T con efecto citotóxico en las paredes del epitelio bronquiolar y en el tejido pulmonar adyacente (47). El micro – ambiente descrito en las lesiones de la HPCL (GM-CSF, TNF- α , IL-1 β) podría contribuir a la diferenciación y activación local de las células HCL (18). Además de la respuesta citotóxica producida por las células T, se han descrito sobre-expresados otros mediadores como TGF- β y algunos tipos de metaloproteinasas de la matriz (MMP) extracelular, que podrían estar relacionados con la remodelación tisular, incluyendo la formación de quistes y fibrosis posterior (7).

El **humo del tabaco** induce la acumulación de CL en los alvéolos de fumadores sanos, en diversas enfermedades respiratorias y también se ha demostrado en modelos murinos (49). Además, se ha descrito que estimula la producción local de TNF- α , GM-CSF, TGF- β y CCL20, y promueve la supervivencia de las células dendríticas a través de mecanismos anti-apoptóticos (46,50). Sin embargo, dada la elevada prevalencia del tabaco y la poca incidencia de la HPCL sugiere que otros mecanismos tienen que estar involucrados.

En resumen, la HPCL es un proceso dinámico en el que intervienen numerosas citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento y MMP que coordinan todo el proceso reactivo. No obstante, a pesar del papel del microambiente, escasos

estudios han explorado su utilidad como potencial biomarcador diagnóstico o pronóstico en la HPCL.

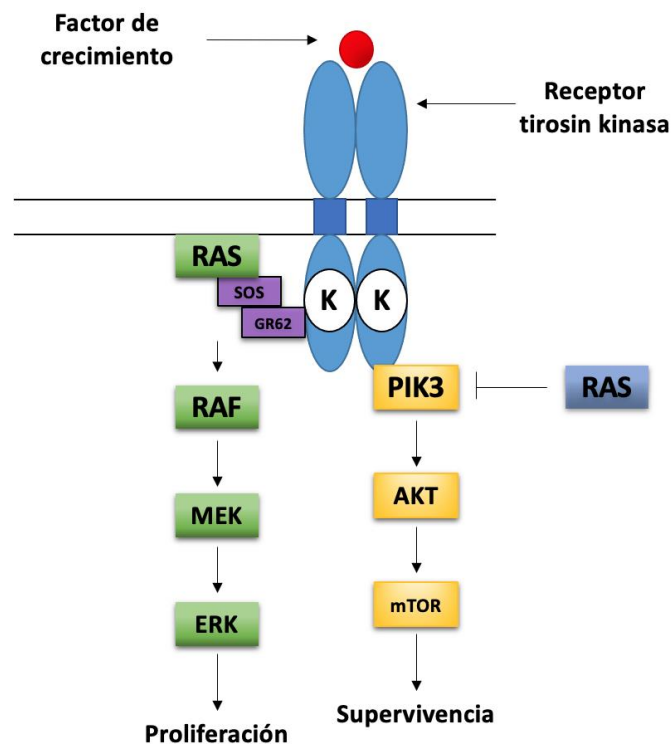
¿Es la HPCL una enfermedad neoplásica?

Si la HPCL es una enfermedad reactiva o clonal ha sido una incógnita desde que la enfermedad fue identificada. Inicialmente la HPCL había sido considerada como un trastorno reactivo dada su asociación casi universal con el humo del tabaco y los casos de remisión espontánea al retirar la exposición (51,52). Además, los estudios sobre la clonalidad de las células HCL han mostrado resultados discordantes. Mientras que se ha demostrado que la HCL MS en población pediátrica es una enfermedad monoclonal (53), ésta no se ha podido demostrar en la HPCL del adulto (54).

Sin embargo, los avances genómicos de los últimos años que permitieron estudiar mutaciones y anomalías genéticas en tejidos incluidos en parafina cambiaron el paradigma de la enfermedad. En el año 2010 se realizó el primer estudio genómico en pacientes con HCL, la mayoría de ellos en edades pediátricas, donde se testaron múltiples oncogenes relacionados con el cáncer (55). Sus resultados fueron reveladores, dado que en el 57% de los pacientes con HCL se detectaron variaciones recurrentes en un nucleótido que codificaba para el gen BRAF^{V600E} (55).

BRAF es una quinasa de la **vía MAPK** (*Mitogen activated protein kinases*) (**Figura 7**). Esta vía es ampliamente utilizada por las células como respuesta a diversos estímulos extracelulares, principalmente ligados con agentes microbianos y su función principal es la regulación de la proliferación, diferenciación y supervivencia celular (56). Anteriormente, mutaciones en este oncogén ya se habían descrito en varios tumores malignos como el melanoma, la leucemia de células peludas y nevus benignos (57).

Figura 7. Esquema simplificado de la vía ERK/RAS/MAPK.



En los pacientes con HPCL también se detectaron mutaciones en BRAF^{V600E}, aunque su frecuencia fue menor (42% casos) (47). Estudios posteriores, confirmaron estos primeros resultados publicados, identificando mutaciones en BRAF^{V600E} en el 50-60% de los casos de HCL (47,58-60) y en el 28-68% de los pacientes con HPCL (61,62). Curiosamente, en el primer estudio en todos los pacientes se demostró la activación de la vía MAPK a pesar del estado mutacional de BRAF^{V600E} (55). Posteriormente, estudios que permitieron analizar toda la secuencia exómica pusieron de manifiesto que los pacientes con HCL presentaban otras mutaciones diferentes de BRAF^{V600E} que activaban de la misma forma la vía MAPK (59). Entre las más destacadas, se demostró la presencia de mutaciones en MAP2K1 en un 25% de los pacientes con HCL sin mutaciones en BRAF^{V600E} (59) y en NRAS en el 40% de las HPCL. De forma interesante, esta última mutación no se encontró en las HCL no pulmonares (52).

A pesar de estos importantes hallazgos sobre la patogenia de la HCL prácticamente todos los estudios están realizados con una muestra muy

seleccionada de pacientes con HCL, y más concretamente en los pacientes con HPCL únicamente se han incluido pacientes en estadios iniciales o intermedios, además existen pocos datos sobre su repercusión clínica en la práctica habitual. Estudios realizados en niños han detectado que las mutaciones en la vía RAS/MAPK aumentan el riesgo de recurrencia de la enfermedad e incrementan la resistencia a la primera línea de tratamiento, sin modificar la supervivencia (63,64). Sin embargo, no existen datos clínicos ni de pronóstico en el adulto, ni concretamente en la HPCL.

En resumen, actualmente la HPCL se considera como un desorden neoplásico no maligno asociado a alteraciones moleculares en la vía RAS/MAPK. Sin embargo, no se conocen con exactitud los mecanismos que justifican la amplia variabilidad clínica y pronóstica de la enfermedad y si ésta puede estar condicionada por factores inflamatorios o por la identificación de mutaciones en la vía RAS/MAPK.

1.2.6. Tratamiento y pronóstico

El tratamiento de la HCL dependerá de la actividad de la enfermedad y de los órganos afectados (SS o MS). Concretamente en la HPCL, el manejo terapéutico deberá individualizarse en función de los síntomas respiratorios, el grado de afectación de la función pulmonar, así como de la extensión radiológica de la enfermedad.

Abstinencia tabáquica

Retirar la exposición al tabaco en todas sus formas, incluyendo la marihuana y los cigarrillos electrónicos, es la recomendación más importante en el manejo de HPCL. En aproximadamente el 50% de los pacientes con enfermedad focalizada en pulmón, esta medida conduce a una regresión parcial y posterior

estabilización de la enfermedad sin necesidad de tratamientos sistémicos (65). Hasta la fecha, no se han descrito marcadores biológicos ni clínicos que permitan diferenciar a los pacientes que presentarán un curso benigno con mejoría de la enfermedad al retirar la exposición del tabaco de aquellos en que la enfermedad progresará a pesar de dejar de fumar.

Glucocorticoides

La terapia con glucocorticoides sistémicos (GCS) ha sido la principal recomendación durante muchos años. Su uso en los pacientes con HPCL se ha asociado con mejoras sintomáticas, radiológicas y funcionales (6). Sin embargo, no existen ensayos clínicos que demuestren su efectividad, dosis adecuada ni duración del tratamiento, así como tampoco se han realizado estudios comparativos con el abandono del hábito tabáquico. Además, se deben tener en cuenta los efectos secundarios asociados a la terapia con GCS a largo plazo. En los pacientes que presentan una obstrucción reversible en la espirometría, se ha demostrado el beneficio del tratamiento combinado con un broncodilatador de acción larga colinérgico y glucocorticoides inhalados (6).

Citotóxicos

En los casos de HPCL graves con afectación MS que progresan a pesar de la retirada de la exposición al tabaco y el tratamiento con GCS, se han propuesto varios regímenes de tratamiento quimioterápico (66-68). Aunque estos tratamientos se han mostrado eficaces para la HCL en edad pediátrica, los resultados en adultos son menos satisfactorios. Vinblastina se ha demostrado eficaz en el 70% de las HCL, sin embargo, no ha resultado útil en pacientes con HPCL y deterioro de la función pulmonar (69). Mejores resultados se han obtenido con cladribina en múltiples estudios que han asociado su uso con una mejora de la función pulmonar, por lo que actualmente es el tratamiento citotóxico de elección (70-73). Aunque sus efectos a largo plazo y su seguridad se están evaluando en pacientes adultos con HPCL (NCT01473797).

Terapias Dirigidas

En los últimos años, la identificación de mutaciones genéticas en la vía MAPK en los pacientes con HPCL ha permitido valorar el uso de fármacos que inhiben de forma específica esta vía. Aunque se ha demostrado la eficacia de algunos tratamientos dirigidos en casos de MS en edad pediátrica (74,75), no existen datos sobre el papel de la inhibición de la vía MAPK en el adulto con HPCL.

Trasplante de pulmón

El trasplante de pulmón deberá considerarse en pacientes con HPCL en fases avanzadas. El pronóstico de los pacientes con trasplante de pulmón por HPCL es similar al de los pacientes con otras EPID. Su tasa de supervivencia a un año es del 75% y a cinco años del 50% (76). Los pacientes que presentan afectación pulmonar como parte de una HCL MS presentan peor pronóstico después del trasplante de pulmón. Además, se ha demostrado recurrencia de la HPCL en los pulmonares trasplantados (77).

Pronóstico

De forma característica, el curso natural y el pronóstico de la HPCL son variables e impredecibles. La regresión espontánea y/o la estabilización de la enfermedad tras el cese del hábito tabáquico, provoca la pérdida de seguimiento de muchos pacientes, hecho que puede influir en la evaluación de su supervivencia. No obstante, se ha descrito que los pacientes con HPCL tienen una menor supervivencia media en comparación con la población general de la misma edad y sexo (6). Concretamente, en el grupo de Vasallo et. al se observó una supervivencia media de 12,5 años en pacientes adultos con diagnóstico definitivo de HPCL (11). La obstrucción de la vía aérea, la disminución de la DLCO, así como la presencia de lesiones quísticas graves en la TCAR torácica, la edad avanzada y la HCL MS se han descrito como factores pronósticos negativos (78). Sin embargo, pocos estudios han evaluado si la detección de mutaciones en la

vía MAPK o el perfil inflamatorio de estos pacientes se relacionan con la amplia variabilidad clínica y en el pronóstico de la enfermedad.

En conclusión, la HPCL es una patología minoritaria y enigmática dada su amplia variabilidad clínica y curso impredecible. En los últimos años se ha descrito la patogenia de la HPCL como una enfermedad neoplásica no maligna con una fuerte asociación con el humo del tabaco. No obstante, la detección de mutaciones en la vía MAPK se ha restringido a grupos muy concretos de pacientes con HPCL y aún existen muchas dudas referentes a la versatilidad clínica que persisten sin resolver. Además, la necesidad de métodos invasivos para el diagnóstico de la enfermedad con sus riesgos inherentes promueve que en ocasiones no se consiga un diagnóstico definitivo. Métodos menos invasivos como el LBA han demostrado su utilidad diagnóstica en pacientes con patrones radiológicos típicos en la TCAR torácica. Sin embargo, su rentabilidad diagnóstica para la detección de células CD1a o Langerina positivas, es muy baja y existen muy pocos datos sobre el estudio de otros biomarcadores en LBA de pacientes con HPCL. Con el objetivo de resolver todas estas dudas, se planteó la realización de esta tesis doctoral

2. JUSTIFICACIÓN

2. Justificación

La HPCL es una enfermedad respiratoria minoritaria relacionada con el tabaco, cuyo diagnóstico definitivo precisa de procedimientos agresivos como la biopsia pulmonar quirúrgica. Recientes estudios, han demostrado que se trata de una enfermedad neoplásica, no maligna, asociada a alteraciones moleculares en la vía MAPK.

No obstante, existe poca evidencia sobre otros métodos diagnósticos menos invasivos que puedan ayudar a establecer su diagnóstico. Así como, sobre las implicaciones clínicas y pronósticas de la detección de mutaciones en la vía MAPK en la práctica clínica habitual.

La investigación de enfermedades minoritarias supone un verdadero reto científico dada su baja prevalencia. En este sentido, se creó la Red Epidemiológica de Investigación de Enfermedades Raras del ISC III. El Hospital de la Santa Creu i Sant Pau se incluyó como uno de los centros de referencia nacionales para la HPCL del adulto.

Por estos motivos se planteó realizar un estudio liderado por nuestro centro y con la colaboración del Instituto de Investigación de Enfermedades raras del ISC III, para evaluar si las mutaciones en MAPK y el perfil inflamatorio en el LBA de los pacientes con HPCL pueden ser útiles para establecer el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad.

3. HIPÓTESIS

3. Hipótesis

- Las mutaciones de la vía MAPK están presentes en pacientes con HPCL de nuestro entorno independientemente del estadio histológico.
- Los pacientes con HPCL presentan un perfil inflamatorio característico en el LBA que permite diferenciarlos de otras EPID relacionadas con el tabaco.

4. OBJETIVOS

4. Objetivos

Objetivo principal:

- Determinar el impacto diagnóstico y clínico del perfil de citoquinas del LBA y de las mutaciones en la vía MAPK en los pacientes con HPCL dentro de la práctica clínica habitual.

Objetivos específicos:

- Caracterizar las mutaciones genéticas en la vía MAPK en muestras pulmonares de pacientes con HPCL de nuestra práctica clínica habitual, independientemente del estadio histológico.
- Relacionar la presencia de mutaciones en la vía MAPK con variables clínicas y de seguimiento.
- Determinar si el perfil de citoquinas del LBA de los pacientes con HPCL es diferente a otras EPID que se asocian con el tabaco.
- Relacionar el perfil de citoquinas del LBA de los pacientes con HPCL con variables clínicas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5. Materiales y métodos

Esta tesis doctoral engloba dos estudios que incluyeron a pacientes con HPCL. El primero, se centra en la identificación de mutaciones genéticas en las biopsias pulmonares fijadas en formalina e incluidas en parafina (FFIP). El segundo, se basa en la evaluación del sobrenadante del LBA y si éste presenta un perfil inflamatorio característico en los pacientes con HPCL. A continuación, se desarrolla la metodología de ambos estudios.

5.1. Estudio 1: Caracterización genética de la HPCL

5.1.1. Diseño del estudio y aspectos éticos

Se trata de un estudio multicéntrico, retrospectivo y observacional, para determinar la presencia de mutaciones en la vía MAPK de pacientes con diagnóstico de HPCL de una cohorte española. En el estudio participaron cuatro centros hospitalarios de tercer nivel del área de Barcelona: Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Hospital Universitari Vall de Hebron, Hospital Clínic de Barcelona y Hospital Universitari de Bellvitge. El protocolo del estudio fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética (IIBSP-LAN-2013-39) del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona, siguiendo las recomendaciones recogidas en la Declaración de Helsinki, así como en cada uno de los centros participantes. Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado. El estudio se registró en ClinicalTrials.gov (NCT03093727).

5.1.2. Población del estudio

En este estudio se incluyeron a pacientes mayores de 18 años con diagnóstico definitivo de HPCL, establecido por la presencia de células CD1a+ en muestras de biopsia pulmonar, de acuerdo con los criterios de manejo de la HCL adulta (27). Las biopsias pulmonares debían estar FFIP y archivadas en el servicio de

anatomía patológica de cada centro. El único criterio de exclusión fue la falta de consentimiento informado por parte del paciente.

Los pacientes fueron reclutados de la consulta monográfica de patología intersticial de los Servicios de Neumología de los cuatro centros participantes, mediante revisión de sus bases de datos.

5.1.3. Variables

Clínicas

Cada uno de los centros participantes, recogió los datos clínicos de los pacientes incluidos mediante revisión de su historia clínica. Estos datos se recopilaban de la primera visita del paciente y de la última.

Se obtuvieron los principales datos demográficos de los pacientes que incluyeron la fecha de diagnóstico, edad, sexo, hábito tabáquico, exposiciones ambientales, exposiciones farmacológicas y antecedentes neoplásicos. Los síntomas y signos clínicos de la enfermedad (disnea, tos y/o neumotórax). Así como los tratamientos sistémicos recibidos para la HPCL en algún momento de la enfermedad. Los pacientes fueron clasificados como enfermedad MS o MM según los criterios de la *Histiocyte Society* (8).

Radiológicas

De cada paciente se revisó la TCAR torácica previa a la realización de la biopsia pulmonar. Se anotó la descripción de los principales hallazgos radiológicos (nódulos, quistes, combinación nódulos / quistes u otros).

Función respiratoria

Los datos de función pulmonar se registraron de la primera visita del paciente y de la última. De todos los parámetros funcionales disponibles se recopiló: FVC, FEV₁, FEV₁/FVC, capacidad pulmonar total (CPT), volumen residual (VR) y la DLCO. Se utilizaron los valores de referencia establecidos para la población mediterránea (79).

Evolución

Durante el seguimiento, según la evolución de su enfermedad, los pacientes con HPCL se clasificaron como mejoría, estabilidad o progresión. De esta forma, los pacientes fueron clasificados como mejoría o progresión cuando entre las pruebas de función pulmonar de la primera y última visita, existió un cambio mayor o igual al 10% en los valores de FVC o FEV₁, o mayor o igual al 15% en la DLCO (78). Cuando no se cumplieron estos criterios el paciente fue clasificado como estabilidad. Además, todos los pacientes que recibieron tratamiento sistémico para su HPCL durante el seguimiento también se clasificaron como progresión.

Finalmente, de la última visita registrada se obtuvieron datos de derivación a trasplante pulmonar y del estado del paciente (vivo o fallecido).

Histológicas

Todas las láminas teñidas en hematoxilina y eosina, así como las tinciones IHC para CD1a y Langerina, de los pacientes incluidos, fueron revisadas por cuatro patólogos expertos. Los objetivos de la revisión de las muestras fueron confirmar el diagnóstico, seleccionar las áreas más representativas de HPCL de los bloques de tejido FFPI y establecer el estadio histológico de las muestras, según los siguientes criterios patológicos (80):

1. Estadio celular: cuando se determinaron grupos de células LCH fácilmente identificables y con escasa evidencia de fibrosis.
2. Estadio fibrótico: cuando se determinaron lesiones fibróticas estrelladas y presencia menor a un 5% de células de HCL.
3. Estadio mixto: cuando se demostraron características celulares y de fibrosis sugestivas de HPCL pero que no cumplían los criterios del estadio celular ni fibrótico.

5.1.4. Análisis de mutaciones

Selección de las muestras

De los bloques de parafina de cada paciente se seleccionaron las áreas más representativas de HPCL (mínimo 1 área, máximo 3 áreas), bajo criterio de consenso entre los patólogos expertos participantes.

Cada centro participante realizó un punch de 2-3 mm de las áreas previamente seleccionadas, que se enviaron, a temperatura ambiente, al Instituto de Investigación de Enfermedades Raras del ISC III de Madrid, el mismo día de su obtención.

Aislamiento del ácido desoxirribonucleico (ADN)

La purificación del ADN genómico de las muestras pulmonares FFIP se realizó mediante el kit *GeneRead DNA FFPE* (del inglés *formalin-fixed paraffin-embedded*), Qiagen, Germantown, United States, siguiendo la metodología recomendada por el fabricante (81).

Identificación de mutaciones

La identificación de mutaciones se realizó a partir de secuenciación masiva, utilizando un panel comercial que incluía 160 genes mutados frecuentemente en el cáncer (*Human Comprehensive Cancer GeneRead v2*, Qiagen) y que incorporaba la mayoría de los genes descritos en HCL, como BRAF, KRAS; NRAS y varios miembros de la familia MAPK (82). En la **tabla 2** se enumeran todos los genes estudiados.

Brevemente se describe el proceso de secuenciación masiva del ADN utilizado:

1. Amplificación de ADN: mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se amplificaron los fragmentos de ADN correspondientes a los 160 genes incluidos en el panel. Una vez obtenidos estos amplicones, se purificaron y se añadieron a ambos extremos de cada amplicón unos adaptadores para realizar una segunda ronda de amplificación generando las llamadas librerías de amplicones (para obtener una cantidad de material genético suficiente para su posterior secuenciación).
2. Secuenciación: se determinaron las secuencias de nucleótidos de cada uno de los fragmentos de ADN amplificados, mediante el secuenciador NextSeq500 (Illumina, San Diego, United States), en un formato de ejecución de 2x150 bp.
3. Lectura de la secuenciación: se realizó una lectura con una profundidad media de 10.000x lecturas de cada fragmento de ADN secuenciado, permitiendo comparar las secuencias obtenidas con otras secuencias previamente conocidas e identificando de esta manera las mutaciones en el ADN.
4. Análisis de datos automático: los datos obtenidos se analizaron para la identificación de mutaciones mediante el software de *GeneRead Panel Variant Calling* (Qiagen). Además del análisis automático, los datos obtenidos fueron revisados visualmente por dos expertos en

secuenciación masiva (CRM y CR) utilizando un *Integrative Genomics Viewer* (Broad Institute, University of California, San Diego).

Cuando las mutaciones se detectaron en más del 15% de las lecturas, éstas se confirmaron mediante secuenciación Sanger.

Tabla 2. Panel comercial (Qiagen) que incluye 160 genes mutados en cáncer.

ABL1	BUB1B	DDR2	FGFR2	IDH2	MEN1	PDGFRA	SMARCA4
AKT1	CARD11	DICER1	FGFR3	IKZF1	MET	PHF6	SMARCB1
AKT2	CBL	DNMT3A	FH	IL6ST	MLH1	PIK3CA	SMO
ALK	CBLB	ECT2L	FLCN	IL7R	MSH2	PIK3R1	SPOP
AMER1	CD79A	EGFR	FLT3	JAK1	MSH6	PMS2	SRC
APC	CD79B	EP300	FUBP1	JAK2	MTOR	PPP2R1A	STK11
AR	CDC73	EPCAM	GATA1	JAK3	MUTYH	PRDM1	SUFU
ARID1A	CDH1	ERBB2	GATA2	KDM6A	MYC	PRKAR1A	TERT
ARID2	CDK12	ERBB3	GATA3	KDR	MYD88	PTCH1	TNFAIP3
ASXL1	CDK4	ERBB4	GNA11	KIT	NF1	PTEN	TNFRSF14
ATM	CDKN2A	ERCC5	GNAQ	KLF6	NF2	PTPN11	TP53
ATRX	CHEK2	ESR1	GNAS	KMT2D	NFE2L2	RAC1	TSC1
BAP1	CIC	EZH2	GPC3	KRAS	NFKBIA	RB1	TSC2
BCL6	CREBBP	FAM46C	GRIN2A	MAP2K1	NOTCH1	RET	TSHR
BCOR	CRLF2	FANCA	H3F3A	MAP2K2	NOTCH2	ROS1	U2AF1
BRAF	CSF1R	FANCD2	HIST1H3B	MAP2K4	NPM1	SDHB	VHL
BRCA1	CTNNB1	FANCE	HNF1A	MAP3K1	NRAS	SETD2	WT1
BRCA2	CYLD	FAS	HRAS	MAP4K3	PALB2	SF3B1	XPC
BRIP1	DAXX	FBXO11	HSPH1	MDM2	PAX5	SLC7A8	ZNF2
BTK	DDB2	FBXW7	IDH1	MED12	PBRM1	SMAD4	ZRSR2

En rojo se especifican los genes mutados en HCL previamente descritos. El panel no incluye los siguientes genes mutados para HCL: ARAF, CRAF, MAPK3, MAPK1, GFR, KMTD2, SMAD6, TET2, SRSF.

5.1.5. Análisis estadístico

Los resultados se presentan como mediana y rango intercuartílico para las variables continuas no paramétricas, y media y desviación estándar para las variables continuas

que seguían una distribución normal. Las variables categóricas se presentan como frecuencia y porcentajes. La prueba exacta de Fisher y el test de Wilcoxon, se utilizaron para comparar las variables clínicas y de evolución en función de la presencia de mutaciones o no, según si las variables eran categóricas o continuas, respectivamente.

La significancia estadística se definió con un p-valor inferior a 0,05. Para el análisis estadístico se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 21 (IBM® SPSS® Statistics 21, Armonk, New York, EUA).

5.2. Estudio 2: Perfil inflamatorio de la HPCL

5.2.1. Diseño del estudio y aspectos éticos

Se trata de un estudio prospectivo y exploratorio para determinar el perfil de citoquinas presente en el LBA de pacientes con diagnóstico de HPCL. El protocolo del estudio fue evaluado y aceptado por el Comité de Ética (IIBSP-LAN-2013-39) del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona, siguiendo las recomendaciones recogidas en la Declaración de Helsinki, y todos los pacientes firmaron el consentimiento informado. El estudio fue registrado en ClinicalTrials.gov (NCT03093727).

5.2.2. Población del estudio

En este estudio se invitó a participar a los pacientes mayores de 18 años con hallazgos radiológicos compatibles con EPID en la TCAR torácica y que se sometían a una broncoscopia para realizar un LBA dentro del algoritmo diagnóstico de práctica clínica habitual. El diagnóstico de la EPID se realizó de acuerdo con las guías nacionales e internacionales (27,83-85). Los pacientes se manejaron independientemente al propósito de este estudio siguiendo los protocolos institucionales basados en las guías nacionales e internacionales. Finalmente, se incluyeron los pacientes con diagnóstico establecido de HPCL; FPI y EPID relacionadas con el tabaco (EPID – tabaco): NID, BR – EPID y CFPE (4). Los criterios de exclusión fueron tener una infección pulmonar activa en el momento de realizar el LBA; haber recibido tratamiento previo por su enfermedad pulmonar con GCS, inmunosupresores o antifibróticos y no haber firmado el consentimiento informado.

Los pacientes fueron reclutados de forma prospectiva de la consulta monográfica de patología intersticial del Servicio de Neumología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona). La inclusión de los pacientes fue correlativa entre los años 2013 y 2019.

5.2.3. Variables

Clínicas

Se recogieron datos demográficos a partir de revisión de la historia clínica. Los datos que se recopilaron fueron: edad del paciente, género, hábito tabáquico y diagnóstico de EPID.

Radiológicas

Se revisaron todas las TCAR torácicas previas a la realización del LBA, de donde se recogieron los principales hallazgos radiológicos. Los patrones radiológicos fueron descritos según las recomendaciones Fleischner (86).

Función pulmonar

Se recogieron los datos de función pulmonar disponibles próximos a la realización del LBA. De todos los parámetros funcionales disponibles se recopiló: FVC, FEV₁, FEV₁/FVC, CPT, VR y DLCO. Se utilizaron los valores de referencia establecidos para la población mediterránea (79).

Evaluación del LBA

Procesamiento del LBA

El procesamiento de la muestra se realizó en el biobanco del Instituto de Investigación Biomédica de Sant Pau (IIB Sant Pau). Brevemente, la muestra se trasladó en una nevera a 4° C desde la unidad de broncoscopias del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau hasta el laboratorio del biobanco. Para su procesamiento, la muestra fue homogenizada, mediante “*up and down*” y posteriormente se centrifugó a 800 g, durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante generado se decantó en un tubo cónico limpio y se obtuvieron 5 alícuotas de 1 mL que se recopilaron en criotubos para su posterior congelación a -80°C.

Recuento celular

A partir del material celular en suspensión, obtenido del LBA, se realiza primero una estimación de la cantidad celular mediante la cámara de Neubauer con tinción de Toluidina. Asimismo, en paralelo, se obtienen tres extensiones celulares mediante Cytospin (Thermo) sobre laminillas de carga electromagnética negativa (Dako) y se fijan dichos extendidos celulares en alcohol absoluto. Tras 12 horas de fijación, se realiza de forma rutinaria tinción de Papanicolau, para valoración citológica, tinción de Perls, para hierro, y tinción de eosinófilos.

El recuento celular corresponde a una estimación de porcentajes relativos de macrófagos alveolares, hemosiderófagos, neutrófilos polimorfonucleados, eosinófilos y linfocitos. Se establece por conteo de un mínimo de 10 campos de gran aumento (400x) en el microscopio óptico tras una valoración global de la homogeneidad del extendido celular.

5.2.4. Perfil inflamatorio de los pacientes con EPID

Las muestras de sobrenadante congeladas y almacenadas en el biobanco IIB Sant Pau, se enviaron a la Unidad de Terapias Farmacológicas del Instituto de Investigación de Enfermedades Raras del ISCIII de Madrid. Donde se realizaron los estudios del perfil inflamatorio.

Análisis de los perfiles inflamatorios

Los perfiles inflamatorios se analizaron en las muestras de LBA utilizando un panel/una matriz (*Human Cytokine Membrane Antibody Array* ab133998; Abcam, Cambridge, UK), que permite la detección simultánea de 80 proteínas relevantes en los procesos inflamatorios (nombradas a partir de ahora citoquinas para simplificar), incluyendo citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento y MMP (**Tabla 3**). En esta técnica, se utilizan anticuerpos específicos unidos a una membrana para capturar y detectar las citoquinas presentes en una muestra. El análisis de las muestras se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, el LBA obtenido de los pacientes se incubó con las membranas. Posteriormente, se lavaron las membranas y se incubaron con una solución de HRP-estreptavidina para detectar la presencia de citoquinas unidas a los anticuerpos mediante quimioluminiscencia. Las imágenes de los paneles/matrices se procesaron en un sistema de imagen Chemi Doc XRS (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Las mediciones de densitometría se realizaron con el software Quantity One (Bio-Rad Laboratories). Para cada punto, se determinó la intensidad neta restando el nivel medio de dos controles negativos. Tras la sustracción del fondo, se asignó un valor 0 a las intensidades de las señales negativas. Para las comparaciones múltiples, se utilizó la intensidad media de la señal de los seis puntos de control positivo para normalizar los resultados de las distintas membranas. Los datos se expresan como densidad media de píxeles (DMP), o como número de veces de cambio (FC) de cada condición en comparación con las muestras HPCL. Para identificar las proteínas diana que mostraban cambios significativos en la expresión, se utilizaron valores de corte de FC de $\geq 1,5$ o $\leq 0,50$.

Tabla 3. Panel comercial que incluye las 80 citoquinas estudiadas.

ENA-78	GCSF	GM-CSF	GRO	GRO- α	I-309	IL-1 α	IL- β
IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10
IL-12	IL-13	IL-15	IFN- γ	MCP-1	MCP-2	MCP-3	MCSF
MDC	MIG	MIP-1b	MIP-1 δ	RANTES	SCF	SDF-1	TARC
TGF- β 1	TNF- α	TNF- β	EGF	IGF-1	ANG	OSM	TPO
VEGF	PDGF-BB	Leptina	BDNF	BLC	Ck β 8-1	Eotaxin	Eotaxin-2
Eotaxin-3	FGF-4	FGD-6	FGF-7	FGF-9	Flt-3 L	CX3CL1	GCP-2
GDNF	HGF	IGFBP-1	IGFBP-2	IGFBP-3	IGFBP-4	IL-6	IP-10
LIF	LIGHT	MCP-4	MIF	MIP-3 α	NAP-2	NT-3	NT-4
OPN	OPG	PARC	PIGF	TGF- β 2	TGF- β 3	TIMP-1	TIMP-2

Red de interacción proteína-proteína (IPP)

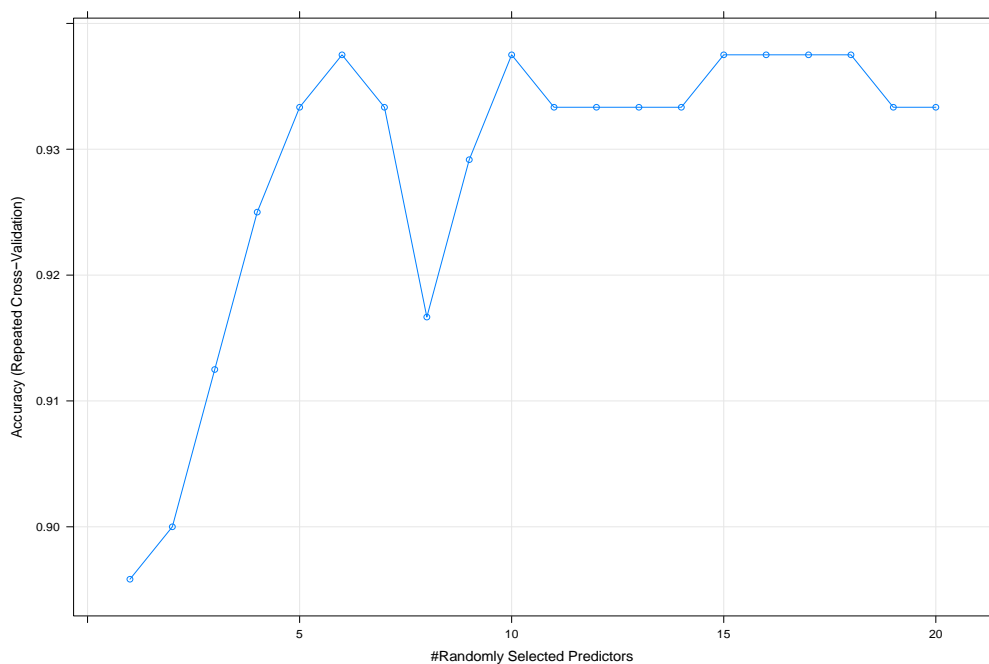
Las interacciones entre las citoquinas se analizaron utilizando la herramienta de búsqueda para la recuperación de genes/proteínas que interactúan (STRING) versión 11.5 del software (<http://string-db.org>) (87). La base de datos STRING proporciona IPP de interacciones experimentales de diferentes fuentes que combinan enfoques de minería de texto y datos.

Clasificador RF (del inglés *Random Forest*)

Se utilizó un clasificador de RF para evaluar la fuerza de la asociación entre el perfil de citoquinas y el grupo EPID. Los datos de citoquinas (80) se filtraron a aquellas variables que se expresaron significativamente en uno de los tres grupos (32). Todos los datos se procesaron con R studio (R 1.3.1075) y los paquetes caret, mlbench, randomForest y purrr. Para el algoritmo RF, la normalización del conjunto de datos no fue necesaria. No hubo variables con varianza cero. Dado que la redundancia de la información disminuye el rendimiento de predicción de los modelos, se tuvieron en cuenta las fuertes correlaciones entre las variables ($r > 0,9$ y $p < 0,05$) y se eliminaron 10 variables redundantes. Debido al desequilibrio de los grupos (HPCL $n = 7$, EPID - tabaco = 16 y FPI = 13), realizamos un muestreo superior de los pacientes para perder

registros ya que el conjunto de datos es demasiado valioso. Además, para evitar un sesgo debido al sobre-muestreo, realizamos un sobre-muestreo de 10 veces para evaluar el clasificador por completo. Los datos se dividieron en un conjunto de entrenamiento con el 75 % de los pacientes, y el 25 % restante se utilizó para el grupo de prueba con el fin de validar el predictor. Primero, comparamos el algoritmo de RF con el método de vecinos más cercanos (k-Nearest Neighbors, o KNN). El modelo de RF arrojó la mejor precisión y decidimos seleccionarlo para un análisis más detallado. Finalmente, ajustamos el número de predictores mediante una cuadrícula de búsqueda, obteniendo la mejor precisión con la combinación de seis características (**Figura 8**). Se utilizó validación cruzada con un k-fold = 50 para evitar sesgos durante el entrenamiento del algoritmo.

Figura 8. Selección de variables para el modelo de clasificación RF.



La cuadrícula de búsqueda muestra que la selección óptima con la precisión más alta correspondiente (0,9905) de un resultado predictivo después de una validación cruzada de 10 veces se obtuvo con seis variables.

5.2.5. Análisis estadístico

Los resultados se presentan como mediana y rango intercuartílico para las variables continuas no paramétricas, y media y desviación estándar para las variables continuas que seguían una distribución normal. Para las variables categóricas, se presentan como porcentajes.

Cuando fue apropiado, las variables se transformaron logarítmicamente antes del análisis estadístico para normalizar la distribución y reducir el sesgo asociado con quimioquinas y citoquinas de expresión extremadamente alta y baja. La prueba de Kruskal-Wallis con las pruebas posteriores indicadas o la prueba de análisis de varianza de dos vías con la prueba posterior de Tukey se utilizaron para comparar tres grupos. Se utilizó la prueba de Chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher para las variables categóricas, según correspondiera. Se utilizaron análisis de regresión lineal simple para determinar las correlaciones entre variables y calcular los coeficientes de correlación de Spearman (r). Se consideró estadísticamente significativo un valor de p inferior a 0,05. Se utilizó el análisis de componentes principales (PCA) para reducir la dimensionalidad e identificar tendencias en la expresión de proteínas en pacientes con EPID.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad prism (versión 9: GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.) y el software R (R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria).

6. RESULTADOS

6. Resultados

6.1. Estudio 1: Caracterización genética de la HPCL

Se evaluaron diecinueve pacientes con diagnóstico definitivo de HPCL en las muestras de biopsia pulmonar embebidas en parafina. De ellos, siete pacientes eran del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, cinco del Hospital Universitari Vall d'Hebron, cuatro del Hospital Clínic de Barcelona y tres del Hospital Universitari de Bellvitge. Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado.

6.1.1. Características demográficas y clínicas

Todos los pacientes incluidos tenían diagnóstico de HPCL según los criterios de manejo de la HCL adulta (27). En todos los pacientes se confirmó el diagnóstico después de revisión por parte de cuatro patólogos expertos de las tinciones IHQ para CD1a y Langerina. En la **tabla 4** se resumen los datos demográficos, clínicos y funcionales de los pacientes incluidos en el estudio.

Tabla 4. Características demográficas y clínicas de los pacientes incluidos en el estudio.

Características demográficas	
Edad (años)	37 (24 - 53)
Hombres, n (%)	14 (73,68)
Ambiente urbano, n (%)	17 (89,47)
Antecedentes de neoplasia, n (%)	4 (21,05)
Antecedentes quimioterapia, n (%)	3 (15,79)
Tabaco	
Fumadores activos, n (%)	15 (78,94)
Ex – fumadores, n (%)	3 (15,79)
Nunca fumadores, n (%)	1 (5,26)
Paquetes – año	25 (7 - 40)
Manifestaciones clínicas	
Disnea, n (%)	11 (58)
Tos, n (%)	8 (42)
Neumotórax, n (%)	2 (10)
Formas HPCL	
SS, n (%)	16 (84,21)
MS, n (%)	3 (15,79)
Hueso	1
Hígado	1
Hipotálamo	1
Función pulmonar	
FVC % predicho	88 (77,5 – 104)
FEV ₁ % predicho	77 (59,5 – 94,5)
FEV ₁ / FVC % predicho	75 (61,5 – 83,5)
CPT % predicho	102 (89 – 117)
VR % predicho	112 (90,5 – 126)
DLCO % predicho	61,9 (46,7 – 67)

Valores expresados como mediana (rango intercuartílico), si no se especifica lo contrario. HPCL: histiocitosis pulmonar de células de Langerhans. SS: del inglés *single – system*. MS: del inglés *multi – system*. FVC: capacidad vital forzada. FEV₁: flujo espiratorio forzado en el primer segundo. CPT: capacidad pulmonar total. VR: volumen residual. DLCO: capacidad de difusión del monóxido de carbono.

Radiológicas

El hallazgo más habitual de la TCAR torácica fue la combinación de lesiones nodulares con quísticas en siete pacientes (36,89%), seguida por la presencia de quistes pulmonares en seis pacientes (31,58%) y de lesiones nodulares en tres pacientes (15,79%). Los tres pacientes restantes presentaron otras manifestaciones radiológicas: un paciente (5,26%) presentó vidrio esmerilado difuso; un paciente (5,26%) presentó un nódulo pulmonar solitario y finalmente en un paciente (5,26%) no se demostraron alteraciones en la TCAR de tórax.

Evolución

De los diecinueve pacientes incluidos se obtuvieron datos de seguimiento de diecisiete. Dos pacientes perdieron el seguimiento en consulta externa sin causa especificada. La mediana de seguimiento fue de veinticuatro meses (12– 36).

Durante el seguimiento diez pacientes (58,82%) abandonaron el hábito tabáquico. Seis pacientes (35,29%) precisaron tratamiento sistémico en algún momento de su enfermedad. De ellos, tres (50%) recibieron tratamiento con glucocorticoides y un paciente (16,67%) se trató con inmunosupresores. En dos casos (33,3%) se instauró tratamiento con quimioterapia (*cladribina*) por enfermedad MS.

De todos los pacientes revisados, tres pacientes (17,65%) fueron derivados a la unidad de trasplante pulmonar. No constaba ningún fallecido en el momento de la revisión de los datos.

En la **tabla 5** se detalla de forma individualizada las principales características clínicas de los diecinueve pacientes incluidos.

Tabla 5. Características demográficas, clínicas y radiológicas de los 19 pacientes incluidos con HPCL.

Caso	Edad (años)	Sexo	Tabaco	HPCL- MS	Hallazgos TCAR	Estadio	Antecedentes oncológicos	Tratamiento
1	36	Hombre	Activo	No	Vídrío deslustrado	Mixto	No	No
2	44	Mujer	Ex - fumador	No	Quistes	Fibrótico	No	GCS
3	62	Hombre	Ex - fumador	No	Quistes	Mixto	No	GCS
4	66	Hombre	Ex - fumador	No	NPS	Fibrótico	Carcinoma escamoso pulmón	No
5	18	Mujer	Activo	No	Quistes	Mixto	No	No
6	49	Hombre	Activo	Hueso	Quistes y nódulos	Celular	Adenocarcinoma colon	No
7	37	Hombre	Activo	No	Nódulos	Celular	Linfoma de Hodgkin	No
8	32	Mujer	Activo	No	Quistes y nódulos	Mixto	No	NA
9	53	Hombre	Activo	No	Quistes	Mixto	No	NA
10	66	Hombre	Activo	No	Nódulos	Mixto	No	No
11	31	Hombre	Activo	Hígado	Quistes y nódulos	Celular	No	Cladribina
12	32	Hombre	Nunca	No	Normal	Celular	No	No
13	35	Hombre	Activo	No	Quistes y Nódulos	Mixto	No	AZA
14	42	Hombre	Activo	No	Vídrío deslustrado	Celular	No	GCS
15	68	Hombre	Activo	No	Quistes y nódulos	Mixto	Adenocarcinoma colon	No
16	18	Hombre	Activo	Hipófisis	Quistes	Celular	No	Cladribina
17	24	Mujer	Activo	No	Quistes y nódulos	Celular	No	Cladribina
18	39	Hombre	Activo	No	Quistes y nódulos	Mixto	No	No
19	22	Mujer	Activo	No	Quistes	Fibrótico	No	No

HPCL – MS: histiocitosis pulmonar de células de Langerhans multi sistémica, TCAR: tomografía computarizada de alta resolución, NPS: nódulo pulmonar solitario, NA: no analizado, AZA: azatioprina

Histológicas

Las muestras histológicas fueron obtenidas por biopsia pulmonar quirúrgica en catorce pacientes (73,68%) y mediante biopsia pulmonar transbronquial en cinco pacientes (26,32%). En la **tabla 6** se resumen los estadios histológicos de las muestras incluidas.

Tabla 6. Clasificación de las muestras pulmonares en función de sus hallazgos histológicos.

	n = 19
Estadio celular, n (%)	7 (36,84)
Estadio fibrótico, n (%)	3 (15,79)
Estadio mixto, n (%)	9 (47,37)

6.1.2. Análisis de mutaciones

Aislamiento de ADN

De todas las muestras analizadas, se obtuvo al menos diez nanogramos de ADN. Por lo que hubo material suficiente para realizar la secuenciación del ADN a través de métodos de alto rendimiento.

Identificación de mutaciones

La secuenciación de las muestras pulmonares detectó mutaciones en la vía MAPK en seis pacientes (31,58%) de los diecinueve incluidos. Las mutaciones más frecuentes identificadas fueron en los oncogenes de la familia RAS. Concretamente, KRAS^{G12D} en dos casos (10,26%) y NRAS^{Q61L} en también dos casos (10,26%). Se encontraron mutaciones en un único paciente en BRAF^{V600E} (5,26%) y MAP2K1^{Q56P} (5,26%). No se identificó concomitancia de mutaciones en ningún paciente. Las alteraciones moleculares identificadas se detectaron en

muy baja frecuencia. No obstante, los pacientes que presentaron mutaciones y se disponía de más de un área representativa de análisis, ésta se identificó en varias de las áreas analizadas. En este sentido, la mayor consistencia se obtuvo en las mutaciones BRAF^{V600E} y MAP2K1^{Q56P} que se encontraron presentes en todas las áreas analizadas (3/3). Mientras que NRAS^{Q61L} se detectó en dos de las tres áreas analizadas (2/3). El análisis de mutaciones individualizado se describe en la **tabla 7**.

Tabla 7. Análisis de mutaciones de los casos individualizados de la Tabla 5.

Caso	Gen mutado	Cambio AA	Frecuencia de la variante (muestras con mutación)	COSMIC (n)
1	KRAS	p.G12D	7% (1/1)	15.078
2	ND	-	-	-
3	ND	-	-	-
4	ND	-	-	-
5	ND	-	-	-
6	ND	-	-	-
7	MAP2K1	p.Q56P	6%, 15%, 5% (3/3)	27
8	ND	-	-	-
9	KRAS	p.G12D	17% (1/1)	15.078
10	ND	-	-	-
11	ND	-	-	-
12	NRAS	p.Q61L	3%, 6% (2/3)	329
13	NRAS	p.Q61L	3%, 7% (2/3)	329
14	ND	-	-	-
15	ND	-	-	-
16	ND	-	-	-
17	BRAF	p.V600E	6%, 10%, 6% (3/3)	28.255
18	ND	-	-	-
19	ND	-	-	-

ND: no detectado. Número de variantes descritas en la base de datos COSMIC (del inglés *Catalogue of Somatic Mutation in Cancer*), actualizada el 13/01/2020.

Relación entre alteraciones en la vía MAPK y características clínicas

Los resultados clínicos y de seguimiento se analizaron según la presencia o ausencia de mutaciones en la vía MAPK (**Tabla 8**). Las principales diferencias observadas fueron que los pacientes que albergaban una mutación somática MAPK tienden a ser más jóvenes, más sintomáticos y presentan valores de DLCO más bajos que los pacientes sin mutaciones somáticas. Aunque no se pudieron demostrar diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 8. Relación entre las características clínicas según alteraciones de la vía MAPK.

	Presencia de mutación en MAPK (n=6)	Ausencia de mutación en MAPK (n=13)	p-valor
Demográficas			
Edad (años)	35,5 (26,8 – 36,8)	42 (32 – 62)	0,23
Hombres, n (%)	5 (83,3)	9 (69,2)	1,00
Tabaco			
Fumador activo, n (%)	5 (83,3)	10 (76,9)	0,18
Ex – fumador, n (%)	0 (0)	3 (23,1)	
Nunca fumador, n (%)	1 (16,7)	0 (0)	
Paquetes - año	27 (11,2 – 34,5)	25 (15 – 50)	0,54
Clínica			
Disnea, n (%)	5 (83,3)	6 (46,2)	0,18
Tos, n (%)	3 (50)	5 (38,5)	1,00
Neumotórax, n (%)	1 (16,7)	1 (7,69)	1,00
Función pulmonar			
FVC % predicho	96,0 (58,0 – 111)	87,0 (81,0 – 96,2)	0,87
FEV ₁ % predicho	102 (58,0 – 103)	76,5 (70,8 – 78,8)	0,63
FEV ₁ /FVC % predicho	75,0 (71,0 – 84,0)	75,5 (61,8 – 80,8)	0,67
CPT % predicho	102 (89,0 – 114)	102 (95,8 – 121)	0,60
VR % predicho	115 (111 – 122)	106 (90,8 – 117)	0,46
DLCO % predicho	58,0 (35,0 – 61,0)	64,0 (55,2 – 66,8)	0,24

Valores expresados como mediana (rango intercuartílico), si no se especifica lo contrario. FVC: capacidad vital forzada. FEV₁: flujo espiratorio forzado en el primer segundo. CPT: capacidad pulmonar total. VR: volumen residual. DLCO: capacidad de difusión del monóxido de carbono.

Con relación a la evolución de la enfermedad, se obtuvieron datos de seguimiento de diecisiete pacientes de los diecinueve incluidos. No se observaron diferencias en cuanto al comportamiento clínico con respecto a la presencia de mutaciones en la vía MAPK (**Tabla 9**).

Tabla 9. Relación en la evolución según las alteraciones de la vía MAPK.

	n = 17	Presencia de mutación en MAPK (n=5)	Ausencia de mutación en MAPK (n=15)	p-valor
Evolución				0,42
Tiempo seguimiento (meses)	24 (12-36)	18 (12-33)	24 (15-33)	1,00
Mejoría, n (%)	5 (30)	1 (20)	4 (33,3)	
Estabilidad, n (%)	6 (35)	2 (40)	4 (33,3)	
Progresión, n (%)	6 (35)	2 (40)	4 (33,3)	

Valores expresados como mediana (rango intercuartílico), si no se especifica lo contrario.

6.2. Estudio 2: Perfil inflamatorio de la HPCL

Treinta y seis pacientes con EPID fueron evaluados en el estudio, incluidos siete pacientes HPCL, dieciséis con EPID - tabaco y trece con FPI. Ningún paciente presentó infección pulmonar activa en el momento del LBA, ni había recibido tratamiento con GCS, inmunosupresor o antifibrótico previamente. Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado.

6.2.1. Características demográficas y clínicas

En la **tabla 10** se resumen las principales variables demográficas, radiológicas y de función pulmonar de los pacientes incluidos en el estudio.

Tabla 10. Características clínicas y demográficas de los pacientes con EPID incluidos.

	HPCL	EPID tabaco	FPI
Número de pacientes	7	16	13
Patrones predominantes TCAR, n (%)			
Nódulos o micronódulos	3 (42,8%)	3 (18,7%)	0
Nódulos y quistes	2 (28,6%)	0	0
Quistes	2 (28,6%)	2 (12,5%)	5 (38,5%)
Reticulación	0	5 (31,2%)	8 (61,5%)
Vidrio deslustrado	0	6 (37,5%)	0
Sexo			
Hombre, n (%)	2 (29-%)	12 (75%)	12 (92%)^A
Edad (años)	46 (42-48)	66 (52-72)^A	72 (67-77)^A
Hábito tabáquico, n (%)			
No fumadores	0 (0%)	0 (0%)	2 (15%)
Ex – fumadores	1 (14%)	6 (40%)	2 (15%)
Fumadores activos	6 (86%)	10 (60%)	9 (69%)
Pruebas de función pulmonar			
FVC % predicho	89,71 (14,77)	93,81 (15,73)	80,00 (9,6)^B
FEV ₁ % predicho	71,71 (19,11)	82,56 (18,71)	82,85 (11,64)
FEV ₁ /FVC, %	63,14 (12,23)	66,80 (11,28)	75,86 (8,67)^B
DLCO, % predicho	64,14 (15,32)	67,07 (19,21)	51,23 (18,42)^B
Recuento celular en LBA (%)			
Macrófagos	70 (21,6)	71 (17,4)	59,75 (20,66)
Neutrófilos polimorfonucleados	14,5 (12,67)	15,18 (10,09)	10,91 (18,86)
Linfocitos	13 (9,84)	9,56 (7,49)	10,91 (5,4)

Los datos están presentados como %, mediana (rango intercuartílico). **A**, $p < 0,05$ comparado con HPCL; **B**, $p < 0,05$ comparado con EPID relacionadas con el tabaco. TCAR: tomografía computarizada de alta resolución; FVC: capacidad vital forzada; FEV₁: volumen de flujo espiratorio en el primer segundo; DLCO: capacidad de difusión del monóxido de carbono, LBA: lavado broncoalveolar; EPID: enfermedad pulmonar intersticial difusa; HPCL: histiocitosis pulmonar de células de Langerhans; EPID tabaco: enfermedades pulmonares intersticiales difusas relacionadas con el tabaco; FPI: fibrosis pulmonar idiopática.

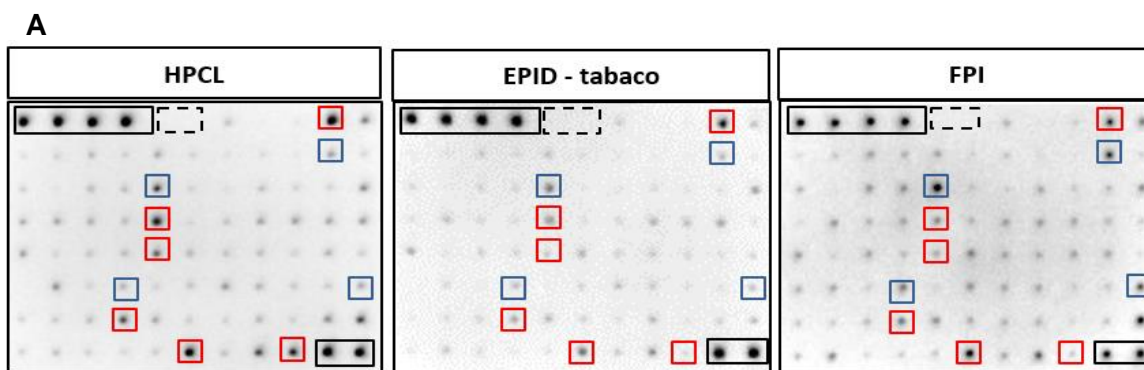
Como era de esperar, los pacientes con HPCL eran más jóvenes que los grupos EPID – tabaco y FPI (mediana de 46 frente a 66 y 72 años, $p = 0,017$ y $p < 0,0001$, respectivamente). También se observaron diferencias de género entre los tres grupos de EPID, con predominio del sexo masculino en los grupos de EPID – tabaco y FPI (75% y 92%, respectivamente). No se encontraron diferencias en la función pulmonar entre los pacientes con HPCL y los grupos EPID – tabaco y FPI, aunque la mayoría de los pacientes con HPCL presentaban

limitación al flujo aéreo y leve disminución de la DLCO, por debajo del 75%. El recuento celular del LBA mostró un aumento de los neutrófilos polimorfonucleados (PMN) (> 5%) en todas las condiciones, aunque no se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de macrófagos, neutrófilos o linfocitos entre los diferentes grupos. Además, no hubo correlación entre el porcentaje de los diferentes tipos celulares y las pruebas de función pulmonar.

6.2.2. Perfil inflamatorio de los pacientes con EPID

El sobrenadante del LBA de los pacientes incluidos (HPCL, EPID – tabaco y FPI) se analizó utilizando la matriz *Human Cytokine Membrane Antibody Array*, con el fin de caracterizar el perfil inflamatorio. En la **figura 9** se muestra las intensidades obtenidas en una membrana representativa de cada uno de los grupos de pacientes (**Figura 9A**), así como la distribución de las diferentes proteínas y los controles en las matrices (**Figura 9B**).

Figura 9. Niveles diferenciales de citoquinas/quimioquinas en LBA de pacientes con EPID.



B

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	Posit	Posit	Posit	Posit	Negat	Negat	ENA-78	GCSF	GM-CSF	GRO	GRO- α
2	I-309	IL-1 α	IL-1 β	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10
3	IL-12	IL-13	IL-15	IFN- γ	MCP-1	MCP-2	MCP-3	MCSF	MDC	MIG	MIP-1b
4	MIP-1 δ	RANTES	SCF	SDF-1	TARC	TGF- β 1	TNF- α	TNF- β	EGF	IGF-I	ANG
5	OSM	TPO	VEGF	PDGF-BB	Leptin	BDNF	BLC	Ck β 8-1	Eotaxin	Eotaxin-2	Eotaxin-3
6	FGF-4	FGF-6	FGF-7	FGF-9	Flt-3 L	CX3CL1	GCP-2	GDNF	HGF	IGFBP-1	IGFBP-2
7	IGFBP-3	IGFBP-4	IL-16	IP-10	LIF	LIGHT	MCP-4	MIF	MIP-3 α	NAP-2	NT-3
8	NT-4	OPN	OPG	PARC	PIGF	TGF- β 2	TGF- β 3	TIMP-1	TIMP-2	Posit	Posit

A) Se expusieron matrices de anticuerpos de membrana de citoquinas humanas (Abcam) al LBA de pacientes con EPID y se procesaron según las instrucciones del fabricante. Las imágenes muestran membranas representativas de cada grupo de pacientes con EPI. Los cuadros negros indican controles internos positivos y los cuadros negros discontinuos indican controles internos negativos. Se muestran citoquinas representativas con niveles aumentados (cuadros rojos) o niveles reducidos (cuadros azules) en HPCL en comparación con EPID – tabaco o FPI. **B)** Representación esquemática de las posiciones de las manchas de citoquinas/quimioquinas en la membrana con los respectivos controles internos. Los rectángulos con fondo rojo representan citoquinas reguladas al alza, y con fondo azul representan citoquinas/quimioquinas reguladas a la baja en HPCL en comparación con EPID – tabaco o FPI.

La **tabla 11** muestra los valores de DMP obtenidos tras la cuantificación de las membranas.

Tabla 11. Expresión de citoquinas y quimioquinas en el LBA de los pacientes con EPID.

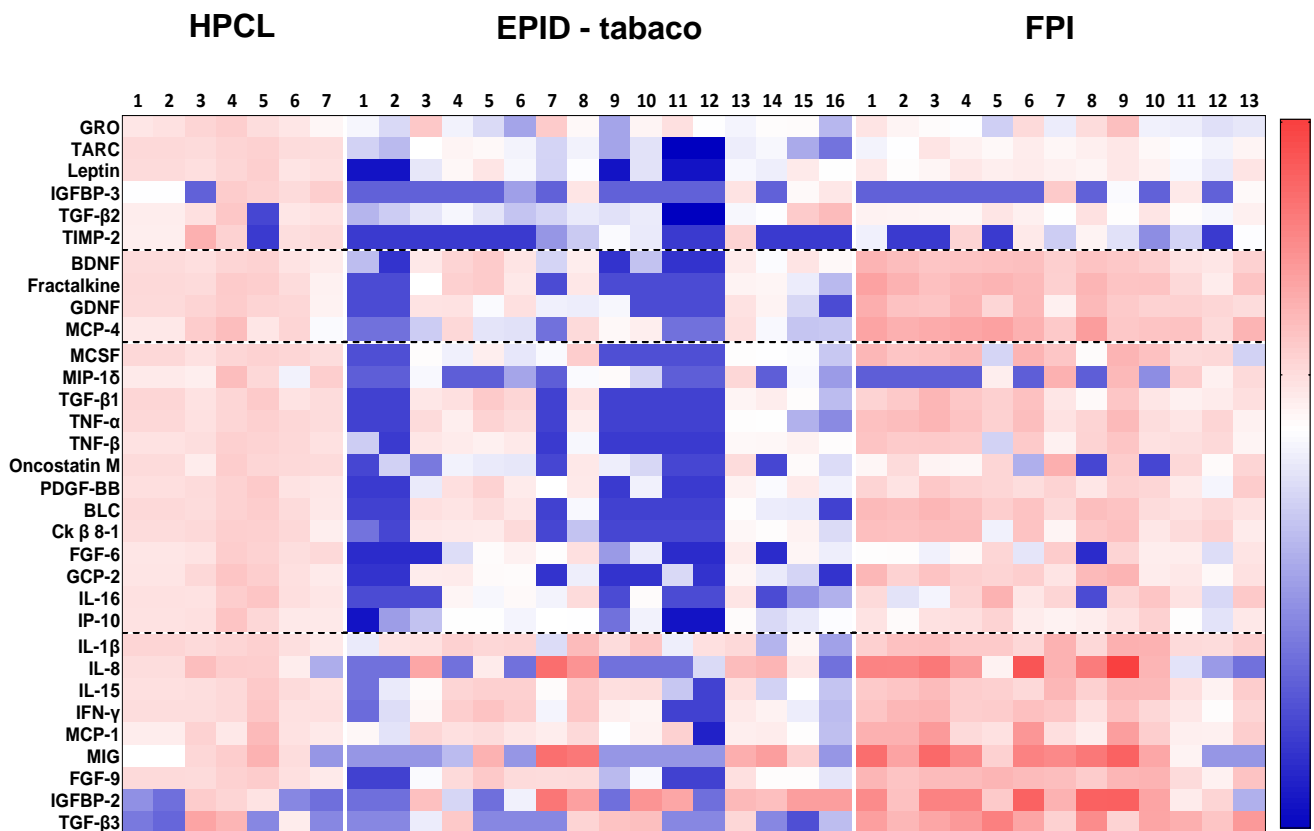
	HPCL (n = 7)	EPID - tabaco (n = 16)	FPI (n = 13)
ENA-78	0,032 ± 0,018	0,016 ± 0,032	0,090 ± 0,058
GCSF	ND	0,009 ± 0,022	0,023 ± 0,028
GM-CSF	ND	0,016 ± 0,029	0,021 ± 0,038
GRO	0,501 ± 0,140	0,275 ± 0,237	0,328 ± 0,259
GRO-α	0,062 ± 0,066	0,085 ± 0,142	0,138 ± 0,182
I-309	0,011 ± 0,012	0,015 ± 0,027	0,031 ± 0,046
IL-1α	0,044 ± 0,020	0,045 ± 0,044	0,102 ± 0,076
IL-1β	0,097 ± 0,039	0,087 ± 0,058	0,169 ± 0,061
IL-2	0,077 ± 0,033	0,072 ± 0,062	0,122 ± 0,041
IL-3	0,119 ± 0,054	0,065 ± 0,059	0,122 ± 0,054
IL-4	0,062 ± 0,022	0,034 ± 0,043	0,062 ± 0,040
IL-5	0,040 ± 0,022	0,019 ± 0,038	0,085 ± 0,059
IL-6	0,020 ± 0,010	0,015 ± 0,031	0,064 ± 0,052
IL-7	0,004 ± 0,004	0,023 ± 0,047	0,041 ± 0,048
IL-8	0,044 ± 0,033	0,075 ± 0,139	0,331 ± 0,423
IL-10	0,001 ± 0,002	0,025 ± 0,054	0,004 ± 0,012
IL-12 p40/p70	0,028 ± 0,022	0,019 ± 0,031	0,062 ± 0,058
IL-13	0,036 ± 0,020	0,041 ± 0,047	0,086 ± 0,069
IL-15	0,120 ± 0,049	0,082 ± 0,065	0,194 ± 0,066
IFN-γ	0,118 ± 0,057	0,081 ± 0,073	0,183 ± 0,071
MCP-1	0,256 ± 0,169	0,184 ± 0,099	0,536 ± 0,400
MCP-2	0,098 ± 0,047	0,040 ± 0,049	0,100 ± 0,059
MCP-3	0,074 ± 0,036	0,028 ± 0,037	0,092 ± 0,044
MCSF	0,088 ± 0,038	0,030 ± 0,034	0,137 ± 0,075
MDC	0,052 ± 0,022	0,027 ± 0,041	0,081 ± 0,057
MIG	0,019 ± 0,018	0,040 ± 0,071	0,121 ± 0,103
MIP-1b	0,063 ± 0,046	0,065 ± 0,097	0,084 ± 0,069
MIP-1δ	0,067 ± 0,042	0,014 ± 0,022	0,047 ± 0,063
RANTES	0,130 ± 0,049	0,076 ± 0,059	0,187 ± 0,075
SCF	0,149 ± 0,065	0,062 ± 0,055	0,157 ± 0,057
SDF-1	0,140 ± 0,070	0,067 ± 0,068	0,186 ± 0,062
TARC	0,487 ± 0,219	0,126 ± 0,101	0,298 ± 0,079
TGF-β1	0,122 ± 0,057	0,057 ± 0,064	0,159 ± 0,069
TNF-α	0,123 ± 0,057	0,047 ± 0,058	0,192 ± 0,074
Angiogenina	0,079 ± 0,053	0,055 ± 0,120	0,047 ± 0,086
Oncostatina M	0,116 ± 0,047	0,032 ± 0,036	0,103 ± 0,090
Leptina	0,291 ± 0,091	0,094 ± 0,083	0,195 ± 0,050
BDNF	0,161 ± 0,041	0,085 ± 0,079	0,269 ± 0,075
BLC	0,120 ± 0,056	0,040 ± 0,049	0,196 ± 0,065

	HPCL (n = 7)	EPID - tabaco	FPI (n = 13)
Ck β 8-1	0,108 \pm 0,050	0,039 \pm 0,042	0,155 \pm 0,068
Eoxatin-2	0,068 \pm 0,032	0,034 \pm 0,049	0,102 \pm 0,060
Eoxatin-3	0,005 \pm 0,008	0,021 \pm 0,044	0,008 \pm 0,015
FGF-4	0,019 \pm 0,019	0,012 \pm 0,027	0,051 \pm 0,073
FGF-6	0,184 \pm 0,074	0,058 \pm 0,061	0,126 \pm 0,082
FGF-7	0,080 \pm 0,039	0,036 \pm 0,048	0,103 \pm 0,071
FGF-9	0,128 \pm 0,055	0,075 \pm 0,066	0,251 \pm 0,074
Flt-3 Ligando	0,081 \pm 0,046	0,033 \pm 0,042	0,115 \pm 0,052
Fractalkina	0,096 \pm 0,050	0,041 \pm 0,049	0,199 \pm 0,075
GCP-2	0,154 \pm 0,086	0,041 \pm 0,045	0,220 \pm 0,101
GDNF	0,097 \pm 0,050	0,038 \pm 0,038	0,166 \pm 0,063
HGF	0,053 \pm 0,035	0,022 \pm 0,027	0,093 \pm 0,056
IGFBP-1	0,029 \pm 0,028	0,023 \pm 0,042	0,067 \pm 0,051
IGFBP-2	0,045 \pm 0,053	0,107 \pm 0,125	0,281 \pm 0,272
IGFBP-3	0,064 \pm 0,036	0,013 \pm 0,023	0,017 \pm 0,031
IGFBP-4	0,068 \pm 0,040	0,023 \pm 0,037	0,059 \pm 0,057
IL-16	0,098 \pm 0,053	0,028 \pm 0,035	0,102 \pm 0,072
IP-10	0,289 \pm 0,118	0,081 \pm 0,062	0,240 \pm 0,088
LIF	0,178 \pm 0,087	0,099 \pm 0,131	0,179 \pm 0,055
LIGHT	0,055 \pm 0,040	0,020 \pm 0,028	0,126 \pm 0,053
MCP-4	0,043 \pm 0,030	0,016 \pm 0,018	0,116 \pm 0,043
MIF	0,067 \pm 0,039	0,033 \pm 0,029	0,123 \pm 0,057
MIP-3 α	0,026 \pm 0,035	0,017 \pm 0,026	0,059 \pm 0,051
NAP-2	0,098 \pm 0,061	0,036 \pm 0,044	0,058 \pm 0,052
NT-3	0,191 \pm 0,055	0,117 \pm 0,119	0,268 \pm 0,188
NT-4	0,040 \pm 0,040	0,009 \pm 0,020	0,001 \pm 0,002
Osteopontina	0,047 \pm 0,032	0,041 \pm 0,058	0,289 \pm 0,632
Osteoprotegerina	0,033 \pm 0,030	0,014 \pm 0,030	0,049 \pm 0,067
PARC	0,030 \pm 0,031	0,013 \pm 0,024	0,049 \pm 0,079
PIGF	0,038 \pm 0,036	0,011 \pm 0,023	0,053 \pm 0,069
TGF- β 2	0,602 \pm 0,366	0,266 \pm 0,351	0,398 \pm 0,096
TGF- β 3	0,026 \pm 0,040	0,014 \pm 0,021	0,099 \pm 0,052
TIMP-1	0,174 \pm 0,118	0,093 \pm 0,092	0,241 \pm 0,143
TIMP-2	0,140 \pm 0,134	0,020 \pm 0,047	0,046 \pm 0,055

Los niveles de citoquinas y quimioquinas están expresados en Densidad Media de Píxeles (DMP) \pm SD, normalizado al promedio de los controles positivos. ND: no detectable. EPID: enfermedades pulmonares intersticiales difusas. HPCL: histiocitosis pulmonar de células de Langerhans. EPID – tabaco: enfermedad pulmonar intersticial difusa relacionada con el tabaco. FPI: fibrosis pulmonar idiopática.

Los resultados obtenidos muestran que el LBA de pacientes con HPCL presenta diferencias significativas en treinta y dos citoquinas ($p < 0,05$) en comparación con al menos una de las otras EPID (**Figura 10; Tabla 12**). Además, se observa una regulación similar entre algunas de las citoquinas en las distintas patologías, pudiendo establecer cuatro grupos principales de proteínas (**Figura 10; Tabla 12**).

Figura 10. Perfil inflamatorio de las proteínas seleccionadas en LBA de pacientes con EPID.



Reconstrucción del mapa de calor de las quimioquinas, citoquinas y factores de crecimiento seleccionados expresados diferencialmente ($p < 0,05$) en el LBA de pacientes con EPID. Los datos se presentan como cambios de veces Log_2 (FC) de los niveles de proteína. La expresión más alta y más baja de los mapas de calor se representa en rojo y azul, respectivamente. Cada columna representa datos de muestras independientes. Cada fila representa una sola proteína. Las líneas horizontales discontinuas indican grupos de proteínas reguladas de manera similar en las diferentes patologías de EPID.

Tabla 12. Listado de las proteínas con diferencias significativas en patologías de EPID.

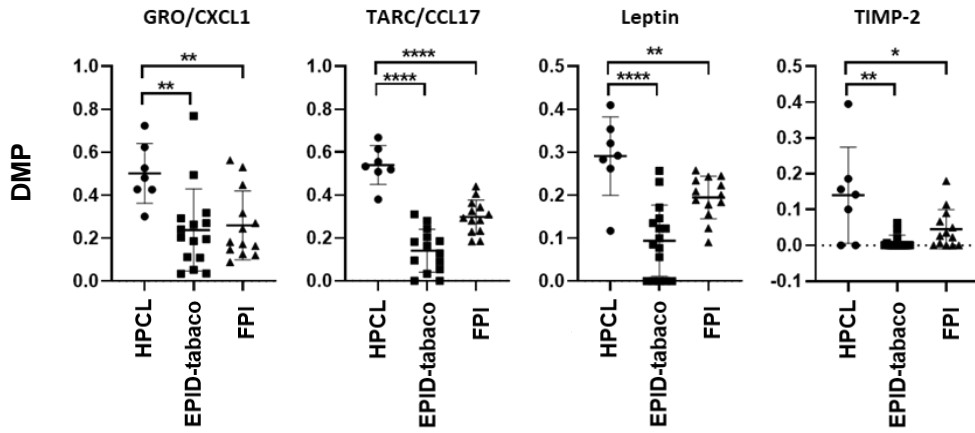
	Proteína	HPCL vs EPID - tabaco			HPCL vs FPI		
		FC	p valor	p resumen	FC	p valor	p resumen
Grupo I	GRO (CXCL1)	1,822	0,010	**	1,934	0,006	**
	TARC (CCL17)	3,861	<0,0001	****	1,633	0,001	****
	Leptina	3,103	<0,0001	****	1,496	0,006	**
	IGFBP-3	4,899	0,001	**	3,799	0,012	*
	TGF-β2	2,266	<0,0001	****	1,511	0,006	**
	TIMP-2	7,029	0,004	**	3,072	0,028	*
Grupo II	BDNF	1,897	0,017	*	0,598	0,002	**
	Fractalkina (CXCL3)	2,367	0,014	*	0,483	0,003	**
	GDNF	2,586	0,007	**	0,586	0,028	*
	MCP-4	2,676	0,033	*	0,373	0,001	**
Grupo III	MCSF	2,955	0,003	**	0,643	ns	ns
	MIP-1δ	4,765	0,020	*	1,431	ns	ns
	TGF-β1	2,131	0,017	*	0,771	ns	ns
	TNF-α	2,633	0,005	**	0,644	ns	ns
	TNF-β	2,628	0,019	*	0,831	ns	ns
	Oncostatina M	3,623	0,009	**	1,120	ns	ns
	PDGF-BB	2,179	0,002	**	0,875	ns	ns
	BLC	2,977	0,044	*	0,611	ns	ns
	Ck β 8-1	2,794	0,023	*	0,696	ns	ns
	FGF-6	3,174	0,004	**	1,463	ns	ns
	GCP-2	3,720	0,016	*	0,701	ns	ns
	IL-16	3,462	0,003	**	0,954	ns	ns
	IP-10	3,561	0,000	***	1,205	ns	ns
Grupo IV	IL-1β	1,110	ns	ns	0,574	0,009	**
	IL-8 (CXCL8)	0,589	ns	ns	0,133	<0,0001	****
	IL-15	1,455	ns	ns	0,617	0,007	**
	IFN-γ	1,466	ns	ns	0,646	0,043	*
	MCP-1 (CCL2)	1,393	ns	ns	0,477	<0,0001	****
	MIG (CXCL9)	0,484	ns	ns	0,158	0,010	**
	FGF-9	1,714	ns	ns	0,508	0,003	**
	IGFBP-2	0,419	ns	ns	0,159	0,009	**
	TGF-β3	1,853	ns	ns	0,265	0,005	**

Se muestra la expresión diferencial de proteínas (cambio de veces) entre grupos (valor de $p < 0,05$). Las líneas horizontales discontinuas indican grupos de proteínas reguladas de manera similar en las diferentes patologías de EPI. Definición de abreviaturas: FC= Fold Change; EPID = enfermedad pulmonar intersticial difusa; HPCL = histiocitosis pulmonar de células de Langerhans; EPID – tabaco = enfermedad pulmonar intersticial difusa relacionada con el tabaco; FPI = fibrosis pulmonar idiopática; ns = sin significado * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

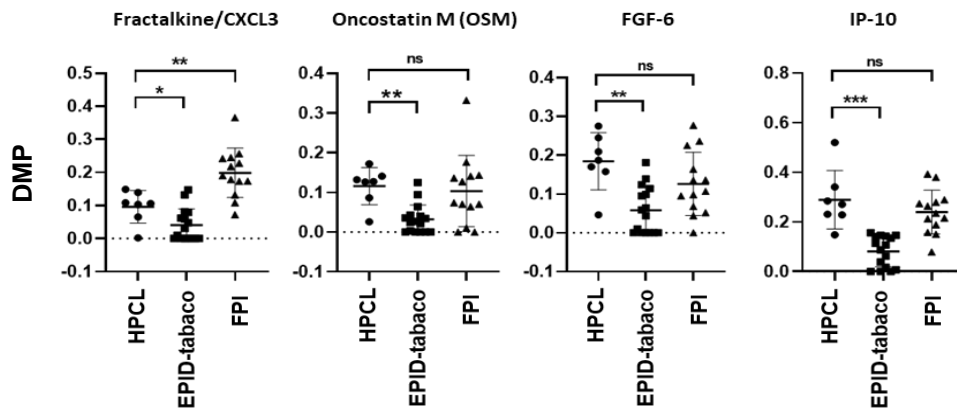
El grupo I consistió en proteínas significativamente aumentadas en HPCL en comparación con EPID – tabaco o FPI, en este grupo se incluían mediadores de quimiotaxis inflamatorios bien descritos como el oncogén regulado por crecimiento (GRO)/CXCL1, la quimioquina regulada por activación y timo (TARC)/CCL17 o la leptina; y reguladores de metaloproteinasas como el inhibidor tisular de metaloproteinasas 2 (TIMP-2) (ver Figura 10). Los grupos II y III incluyeron proteínas con niveles significativamente elevados en la HPCL frente a las EPID relacionadas con el tabaco, pero no frente a la FPI, como las quimioquinas proinflamatorias: fractalquina/CX3CL1, oncostatina M (OSM), factor de crecimiento de fibroblastos-(FBP)-6 e inducida por interferón (IFN)- γ proteína (IP)-10/CXCL10. Finalmente, el grupo IV comprendía varios mediadores de fibrosis pulmonar como IL-8/CXCL8, proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1)/CCL-2, monocina inducida por IFN- γ (MIG)/CXCL9 y FBP-9, altamente expresada en pacientes con FPI pero no en los otros dos grupos (**Figura 11**).

Figura 11. Abundancia relativa de proteínas seleccionadas para los grupos establecidos en EPID.

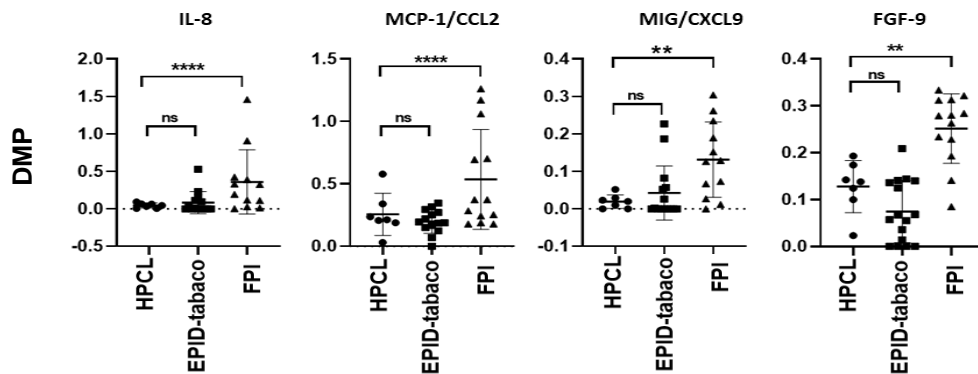
Grupo I:



Grupo II – III:



Grupo IV:

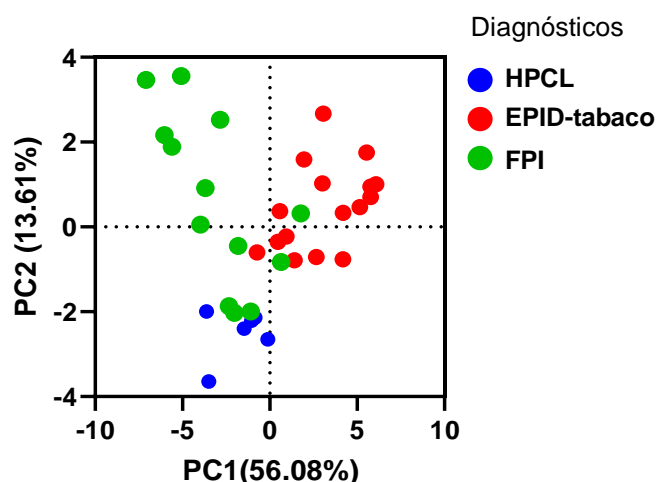


Los diagramas de puntos de dispersión representan los valores de densidad media de píxeles (DMP) para cada paciente individual de proteínas seleccionadas en los diferentes grupos. También se muestran los valores medianos (barras horizontales) y el error estándar de la media. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. HPCL: E-T: FPI:

El análisis de PCA identifica un patrón diferente de proteínas inflamatorias en las EPID

Se realizó un análisis de componentes principales del total de pacientes (n = 36) y de las citoquinas que presentaban la mayor expresión (n = 24) con el fin de identificar patrones de expresión de proteínas similares entre las distintas EPID. El análisis de PCA reveló que los tres grupos se agruparon por separado con una mejor diferencia entre los pacientes HPCL y EPID – tabaco. Los primeros dos componentes principales en el PCA explicaron el 69,69% de la variación, con una varianza total de 56,08% para el primer componente principal y 13,61% para el segundo componente principal (**Figura 12**).

Figura 12. Análisis de componentes principales de la expresión de citoquinas en las EPID.

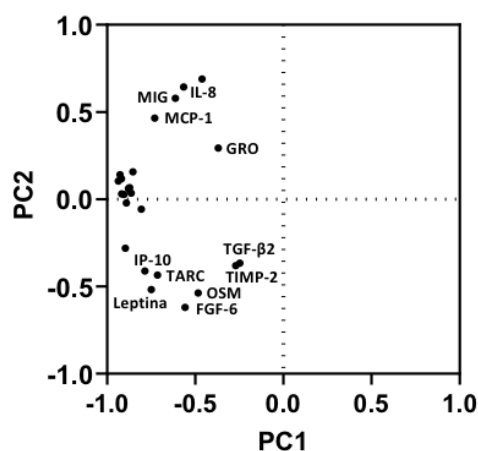


El gráfico de puntuación de PCA muestra la separación de EPID en función de las puntuaciones del primer y segundo componente principal. Cada punto representa una muestra proyectada en los dos principales componentes principales (PC1 y PC2); los puntos se colorean según el grupo al que pertenecen.

Varias citoquinas contribuyeron principalmente a la separación de los grupos, como lo indica su posición en el gráfico de carga de PC1 frente a PC2 (**Figura 13**). Curiosamente, las diferencias en los niveles de once citoquinas, incluidas GRO/CXCL1, TARC/CCL17, leptina, TGF- β 2, TIMP-2, OSM, FGF-6, IP-10/CXCL10, IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2 y MIG/CXCL9 fueron los principales

factores responsables de discriminar los grupos. De estos, IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2 y MIG/CXCL9 se identificaron como significativamente aumentados en FPI versus HPCL y EPID – tabaco, mientras que TARC/CCL17, leptina e IP-10/CXCL10 mostraron aumentos significativos en el grupo HPCL.

Figura 13. Análisis de componentes principales de la expresión de citoquinas en las EPID.

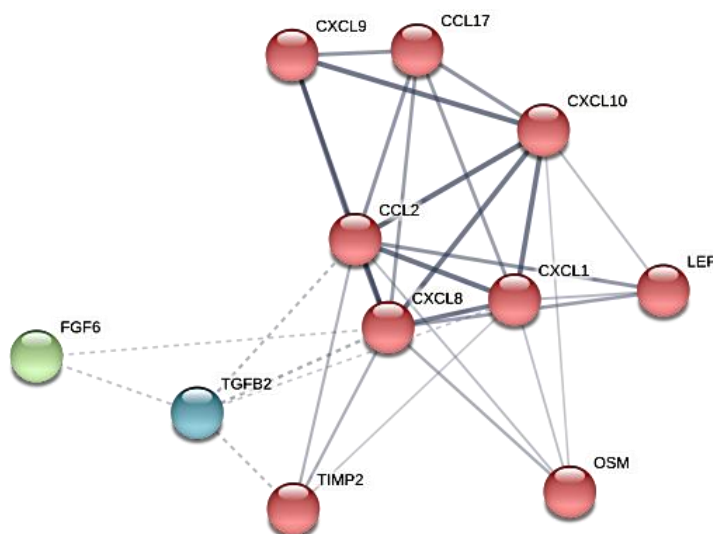


El gráfico de carga de PCA muestra las citoquinas responsables de las diferencias entre los grupos. Las etiquetas solo se muestran para las citoquinas cuyos vectores de carga en PC1 y PC2 superaron una magnitud de 0,3.

Interacción proteína – proteína y correlaciones de citoquinas seleccionadas

Para comprender mejor el papel de las proteínas alteradas significativamente en cada enfermedad, realizamos un análisis de red de IPP utilizando la base de datos STRING 11.5. El análisis de IPP predijo asociaciones funcionales cercanas entre las once proteínas seleccionadas (**Figura 14**), identificándose tres grupos. Uno de ellos (grupo rojo) mostró una fuerte asociación entre 9 de las 11 proteínas, incluyendo GRO/CXCL1, TARC/CCL17, IP-10/CXCL10, IL-8/CXCL8, MCP-1/ CCL2 y MIG/CXCL9.

Figura 14. Interacción proteína-proteína. Red de interacción proteína-proteína visualizada por STRING.

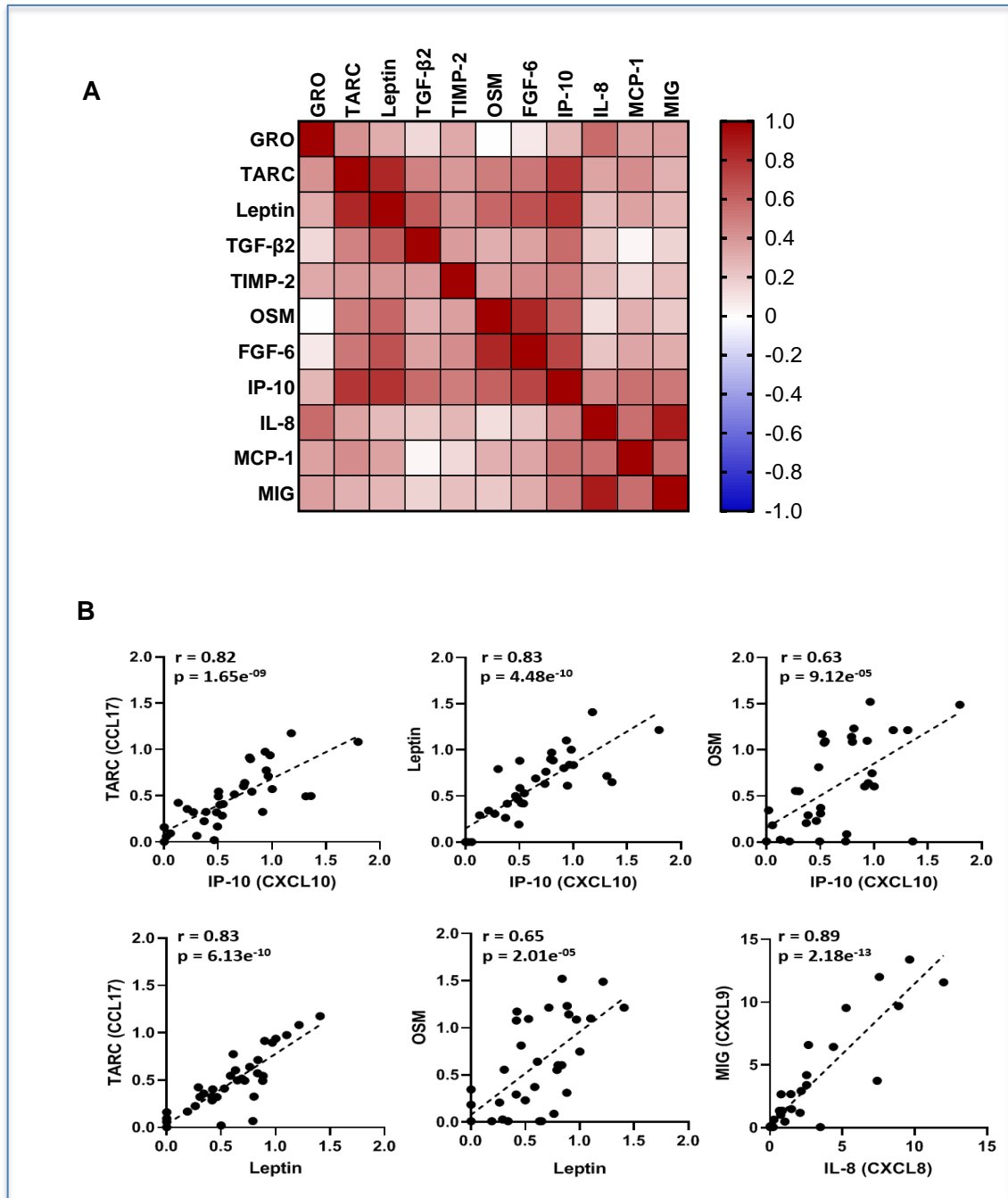


Número de nodos	11
Número de bordes	31
Grado promedio de nodo	5,64
Coefficiente de agrupamiento local promedio	0,813
Número esperado de bordes	3
Enriquecimiento IPP p – valor	< 1.0e-16

En esta red, los nodos son proteínas, los bordes indican el número de interacciones y el grosor de las líneas representa la fuerza de las interacciones funcionales previstas entre proteínas. El número de interacciones promedio por nodo se indica mediante el grado de nodo. El coeficiente de agrupamiento especifica la densidad promedio de nodos del mapa. Parámetro de confianza = 0,4. Se muestran tres grupos (rojo, azul y verde (grupos k-medias 3)).

A continuación, se llevó a cabo un análisis de correlación de Spearman, con el fin de explorar más a fondo las asociaciones entre las citoquinas (**Figura 15A**). Como se observa en la **figura 15A**, la mayoría de las proteínas mostraron correlaciones positivas (Spearman $r > 0.5$, $p = 0.05$). Así, los niveles de IP-10/CXCL10 correlacionaban con los niveles de TARC/CCL17, leptina y OSM; la leptina con TARC/CCL17 y OSM; y IL8/CXCL8 con MIG/CXCL9 (**Figura 15B**).

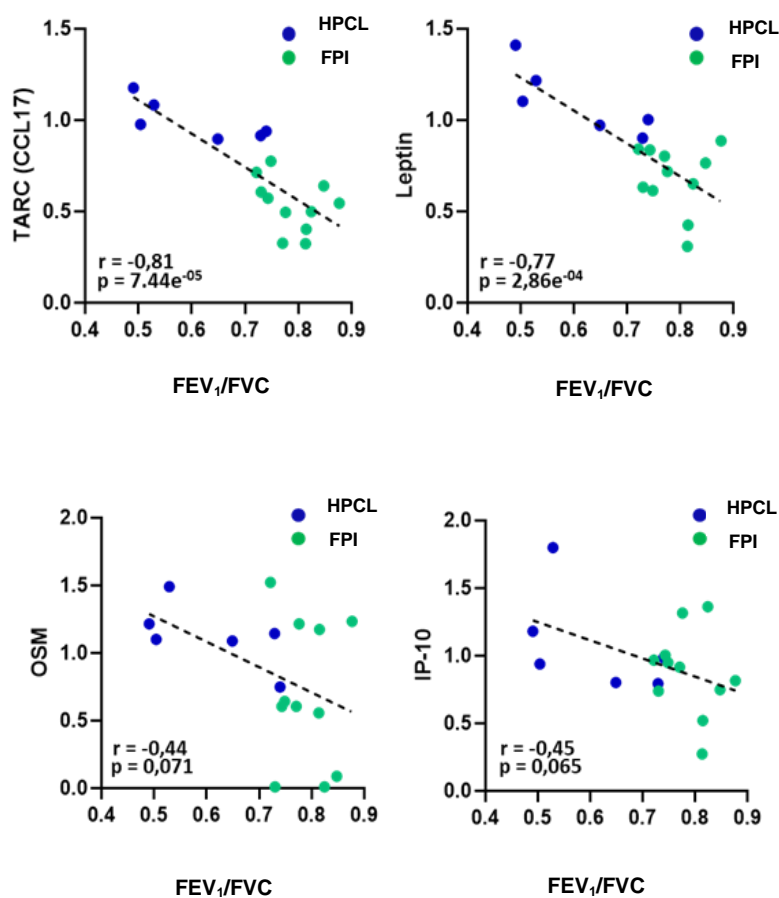
Figura 15. Análisis de correlación de las proteínas seleccionadas.



A) El mapa de calor informa las correlaciones de rango de Spearman observadas entre proteínas expresadas diferencialmente. El valor del color de las celdas es proporcional a la fuerza de las asociaciones, desde el rojo (correlaciones positivas) hasta el azul (correlaciones negativas). **B)** Diagramas de dispersión que representan los valores de los diferentes pares de biomarcadores.

Dado que la disminución de la función pulmonar se ha asociado con la expresión alterada de citoquinas a continuación, se analizó si existía alguna relación entre estos parámetros. En primer lugar, se analizó la relación entre las citoquinas y el cociente FEV₁/FVC, como una variable clínica importante en los pacientes de HPCL, al estar relacionada con un patrón obstructivo. Tal y como se observa en la **Figura 16**, los niveles de TARC/CCL17, leptina, OSM e IP-10/CXCL10 mostraron una correlación inversa con FEV₁/FVC, indicando que en los pacientes con HPCL, los niveles aumentados de estas citoquinas reflejarían una peor función pulmonar.

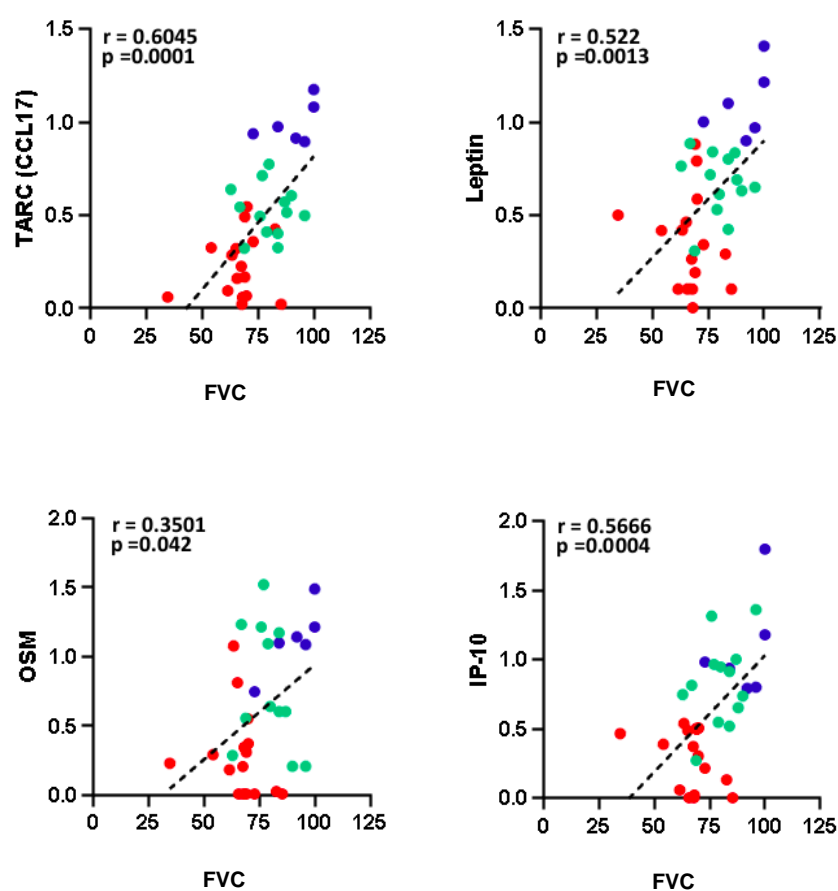
Figura 16. Análisis de correlación de las proteínas seleccionadas con parámetros de función pulmonar FEV₁/FVC.



Los coeficientes de correlación se obtuvieron mediante el método de rangos de Spearman en pacientes con HPCL, EPID - tabaco y FPI. Los valores r y p del coeficiente de correlación de Spearman (prueba de dos colas) se mostraron en gráficos. FEV₁: volumen espiratorio forzado en el primer segundo; FVC: capacidad vital forzada.

Posteriormente, se analizó la relación entre las citoquinas y FVC, como variable que refleja mejor la función pulmonar en los pacientes con FPI. Como se muestra en la figura 9 y en la tabla 4, los niveles de TARC/CCL17, leptina, OSM e IP-10/CXCL10 correlacionaron con la FVC (**Figura 17**).

Figura 17. Análisis de correlación de las proteínas seleccionadas con parámetros de función pulmonar FVC.



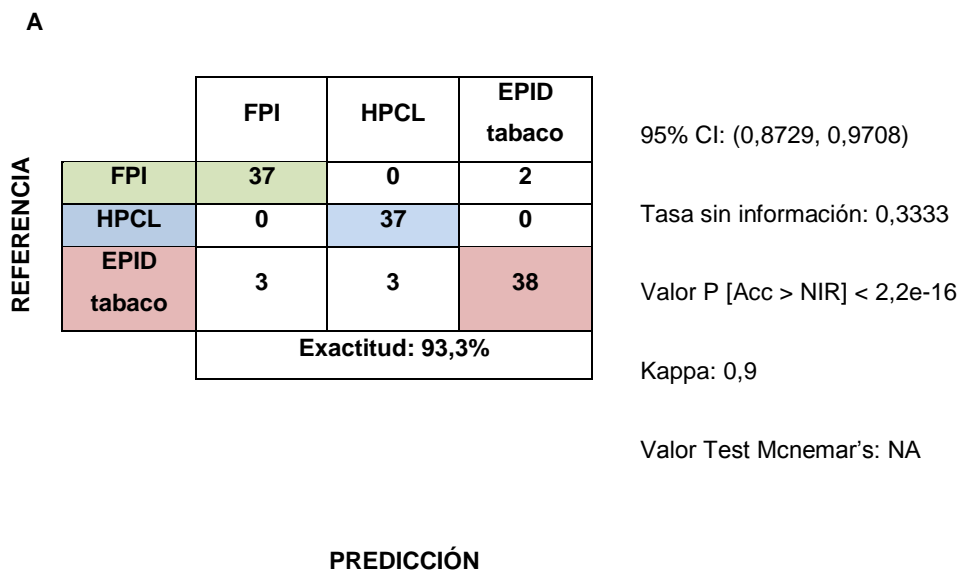
Los coeficientes de correlación se obtuvieron mediante el método de rangos de Spearman en pacientes con HPCL (azul), EPID – tabaco (verde) y FPI (rojo). Los valores r y p del coeficiente de correlación de Spearman (prueba de dos colas) se mostraron en gráficos. CVF: capacidad vital forzada.

Desarrollo de un predictor de *Random Forest* para la discriminación de los grupos

En conjunto, nuestros datos sugieren que el análisis de perfiles de citoquinas específicos en pacientes con EPID puede permitir una clasificación más precisa, así como la diferenciación entre los distintos grupos. Mediante el uso de algoritmos de aprendizaje automático RF, nos propusimos construir un modelo de clasificación que permitiese la identificación de cada uno de los grupos. De las 32 citoquinas expresadas significativamente, se eliminaron 10 variables redundantes, en base a las fuertes correlaciones existentes entre ellas ($r > 0,9$ y $p < 0,05$). Tal y como se ha descrito anteriormente en los materiales y métodos (**Figura 8**), la combinación de seis marcadores fue suficiente para obtener un modelo de precisión.

La matriz de confusión mostró una tasa de discriminación de perfil muy satisfactoria entre los tres grupos, lo que se traduce en una precisión general del 93,3 % (**Figura 18A**), la precisión del balance de las diferentes clases fue de 0,9625, 0,9375 y 0,95 para HPCL, EPID – tabaco y FPI, respectivamente (**Figura 18B**).

Figura 18. Modelo de clasificación construido utilizando citoquinas candidatas.



B

	FPI	HPCL	EPID tabaco
Sensibilidad	0,925	0,925	0,95
Especificidad	0,975	1	0,925
Valor predictivo positivo (VPP)	0,9487	1	0,8636
Valor predictivo negativo (VPN)	0,963	0,9639	0,9737
Prevalencia	0,3333	0,3333	0,3333
Frecuencia de detección	0,3083	0,3083	0,3167
Prevalencia de detección	0,325	0,3083	0,3667
Precisión equilibrada	0,95	0,9625	0,9375

A) Matriz de confusión *Random Forest*. **B)** Análisis *Random Forest* por clases. FPI: fibrosis pulmonar idiopática, HPCL: histiocitosis pulmonar de células de Langerhans, EPID tabaco: enfermedades pulmonares intersticiales difusas relacionadas con el tabac

7. DISCUSIÓN

7. Discusión

Los principales hallazgos de esta tesis son que la identificación de mutaciones en la vía MAPK de los pacientes con HPCL de nuestro entorno, en los que se incluyen estadios celulares y también fibróticos, es menor que la descrita en la literatura, sin evidenciarse diferencias clínicas ni en el pronóstico entre los pacientes con mutaciones detectadas de aquellos negativos. Sin embargo, el LBA de los pacientes con HPCL presenta un perfil inflamatorio característico, que permite diferenciarlos de otras EPID relacionadas con el tabaco.

En el primer estudio, realizamos una caracterización de las mutaciones somáticas en la vía MAPK en muestras pulmonares de pacientes con HPCL de nuestro medio y evaluamos si la presencia de estas mutaciones se relacionaba con un comportamiento más agresivo de la enfermedad. Mediante secuenciación masiva, se analizaron 160 genes frecuentemente mutados en cáncer, entre los que se incluían oncogenes de la vía MAPK. Nuestros datos apoyan la presencia de mutaciones en la vía RAS/MAPK en los pacientes con HPCL, aunque nuestra tasa de identificación está por debajo de la reportada en la bibliografía. Curiosamente, las mutaciones que más encontramos fueron en KRAS/NRAS, mutaciones que han sido descritas de forma exclusiva en las formas pulmonares, pero no predominantes en otros estudios publicados. No obstante, no encontramos diferencias en el comportamiento clínico ni pronóstico asociados a la presencia de mutaciones en la vía MAPK de los pacientes con HPCL.

La identificación de mutaciones en la vía de señalización MAPK fue un descubrimiento clave en la patogenia de la HCL (55). Esta vía, es esencial para la regulación de diversas funciones celulares, incluyendo la proliferación, diferenciación, supervivencia y apoptosis. La primera mutación, y también la más frecuentemente, descrita fue la mutación en BRAF^{V600E} en casi el 60% de los pacientes con HCL y el 40% de las HPCL (47). Sin embargo, estudios posteriores han identificado alteraciones moleculares recurrentes en otros oncogenes de la

misma vía, incluyendo RAS, MEK y ERK, hecho que produce una activación de la vía MAPK independientemente del estado de BRAF (59,88,89). Aunque en la edad pediátrica parece que las mutaciones en BRAF^{V600E} se relacionan con peores resultados clínicos (52), existen escasos datos sobre su impacto clínico y pronóstico en la población adulta y en concreto en la HPCL.

En nuestro estudio, el primero realizado en España, encontramos que el 31,58% (seis de 19) de los pacientes con HPCL presentaban mutaciones en la vía MAPK y concretamente el 5% (uno de 19) presentaba mutaciones en BRAF^{V600E}, valores por debajo de los reportados en la bibliografía. Creemos que el motivo principal de esta discrepancia podría ser una baja presencia de células HCL en las muestras analizadas. De los 19 pacientes incluidos, sólo 7 muestras fueron catalogadas en estadios celulares. De hecho, de los 3 pacientes en estadio fibrótico en ninguno se detectó mutaciones en la vía MAPK. Esta hipótesis, ya se insinuó en un estudio previo que analizó la prevalencia de mutaciones en la vía MAPK de pacientes con HPCL en diferentes estadios histológicos (80). Los investigadores observaron que la exclusión de los casos fibróticos del análisis global, aumentó de forma significativa los casos positivos para cualquier mutación en la vía MAPK del 62% al 92% (67). Estos hallazgos sugieren que las mutaciones pueden detectarse más fácilmente en lesiones celulares tempranas que en lesiones fibróticas paucicelulares. En nuestra muestra, al seleccionar únicamente los casos de HPCL en estadios celulares se evidenció una tendencia en mejorar la detección de mutaciones en la vía MAPK, que aumentó del 32% al 43% (tres de 7 casos), aunque de forma no estadísticamente significativa. Asimismo, haber obtenido las muestras para detección genética mediante punch en lugar de microdissección como en el resto de los estudios publicados, puede también haber influido en estos resultados. Sin embargo, el micrótopo es una herramienta que no todos los centros hospitalarios disponen y el objetivo de nuestro estudio fue identificar la presencia de mutaciones en situación de práctica habitual. Finalmente, dada la baja frecuencia detectada (inferior al 5%) en las variantes alélicas de los pacientes con HCL, el último consenso de expertos recomienda la utilización de métodos de detección ultrasensibles para

la detección de estas mutaciones (27). No obstante, nuestro grupo ha utilizado el método de secuenciación masiva. Éste, es un método de alta sensibilidad, y que además ha sido ampliamente utilizado en los estudios anteriormente publicados de HCL e HPCL. En realidad, en nuestro estudio se han detectado frecuencias alélicas muy bajas, concretamente inferiores al 5%, en dos de las muestras analizadas. Además, el método de secuenciación masiva ha sido capaz de identificar mutaciones de baja frecuencia alélica en varias muestras de un mismo paciente.

Dentro de las mutaciones concretas encontradas en nuestro estudio, curiosamente, las mutaciones más frecuentemente detectadas fueron en los oncogenes NRAS/KRAS. Concretamente en 4 de los 6 (67%) pacientes en los que se identificaron alteraciones moleculares somáticas. Las mutaciones oncogénicas en NRAS/KRAS se han descrito de forma exclusiva en la HPCL, pero no en casos de HCL sin afectación pulmonar, lo que sugiere una contribución órgano – específica del oncogén RAS en la patogenia de la HPCL (58). Mourah et al, fueron los primeros en describir la presencia de mutaciones en NRAS^{G12V} en el 40% de los pacientes con HPCL (77). Además, detectaron que estas mutaciones ocurrían concomitantemente con las mutaciones en BRAF^{V600E} y ambas mutaciones eran portadas por diferentes clones celulares (77). En un estudio reciente, la teoría del órgano – especificidad de los oncogenes NRAS/RAS se ha podido reproducir en un modelo murino (90). En este estudio, se observó que mediante la inducción en un ratón de mutaciones KRAS^{G12D} se indujeron lesiones pulmonares similares a las de la HPCL (78). Finalmente, las mutaciones en MAP2K1^{Q56P} se han detectado en casi la mitad de los casos negativos de BRAF^{V600E}, considerándose mutaciones mutuamente excluyentes (63,77). Sin embargo, en nuestro estudio sólo se detectó la presencia de mutaciones en MAP2K1^{Q56P} en un único paciente (5%).

A pesar del creciente conocimiento de las alteraciones moleculares somáticas en la HCL y la HPCL, su relación con la variabilidad clínica característica de la enfermedad sigue sin conocerse. Nuestros resultados muestran que los pacientes con HPCL que presentan alteraciones en la vía MPAK tienden a ser más jóvenes que aquellos sin mutaciones identificadas. Aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas, probablemente por el pequeño tamaño de la muestra. Esta tendencia concuerda con los datos publicados que evidenciaban que los pacientes con HCL en edad pediátrica portadores de mutaciones en BRAF^{V600E} eran más jóvenes que los pacientes sin mutaciones somáticas (47).

Un resultado importante de nuestro estudio, aunque debe tomarse con cautela dada la pequeña muestra analizada, es que no se observó ninguna diferencia en el comportamiento clínico de los pacientes en función de su relación con las mutaciones en la vía MAPK. Estos resultados, contrastan con los encontrados en la HCL de edad pediátrica, en los que la presencia de mutaciones en BRAF^{V600E} se asoció con una mayor recurrencia de la enfermedad, severidad y resistencia a la primera línea de tratamiento (63,64). Sin embargo, una diferencia importante con la HPCL, es que la afectación de órganos de riesgo, que se asocia con la gravedad de la enfermedad en la HCL infantil, rara vez está presente en la HPCL, como en el caso de la presente serie en que sólo un paciente presentó afectación de un órgano de riesgo (hígado).

El antecedente del tabaco es otro factor clave relacionado con la HPCL. La rareza de la HPCL en relación con la prevalencia de tabaquismo en la población general sugiere la presencia de factores predisponentes en los pacientes que desarrollan esta enfermedad. Sin embargo, no encontramos ninguna relación entre el hábito tabáquico y la presencia de mutaciones en la vía MAPK, como se había sugerido en estudios anteriores (61).

Por último, es importante destacar que la evolución de la enfermedad de los pacientes con HPCL basado en los criterios de función pulmonar a lo largo del seguimiento no estuvo influenciado por la detección de mutaciones en la vía MAPK de sus lesiones. Se han publicado escasos datos sobre este tema y son discordantes. Un único estudio demostró la asociación entre el riesgo de progresión de HPCL y la presencia de mutaciones en NRAS (58), sin embargo, este hallazgo no se ha podido demostrar en estudios posteriores (50), tampoco en el nuestro.

Este estudio tiene varias limitaciones importantes e inherentes a la investigación de enfermedades raras. La primera, es la pequeña muestra estudiada, a pesar de que se optó por un estudio multicéntrico para compensar esta limitación, la prevalencia de la HPCL es desconocida y asimismo no todos los pacientes con HPCL disponen de muestras de biopsia pulmonar. La segunda, es el carácter retrospectivo del estudio, motivo por el cual no se pudo establecer un tiempo de seguimiento uniforme para todos los pacientes. Sin embargo, otros estudios realizados en HPCL utilizaron los mismos criterios de seguimiento para establecer la evolución de la enfermedad.

En conclusión, la determinación de mutaciones en la vía MAPK en los pacientes con HPCL de nuestra cohorte es menor que la previamente publicada. Aunque el tamaño de la muestra es limitado, no se han observado diferencias en el comportamiento clínico ni tampoco en el pronóstico de los pacientes con HPCL en función de la presencia de mutaciones en la vía MAPK, datos que deberán confirmarse en estudios con mayores cohortes.

En el segundo estudio, evaluamos si la muestra de LBA de pacientes con HPCL presenta un perfil inflamatorio característico. Cuantificamos los niveles alveolares de 80 citoquinas en pacientes con diferentes EPID, incluidas la HPCL, EPID asociadas al tabaco y la FPI. Nuestros datos proporcionan una fuerte

evidencia de un perfil inflamatorio alveolar que se expresa diferencialmente en los pacientes con HPCL. Observamos un cambio significativo ($p < 0,05$) en 32 proteínas inflamatorias de las 80 analizadas. Curiosamente, el patrón inflamatorio del LBA de los pacientes con HPCL se caracterizó por la regulación positiva de 29 de estas citoquinas en comparación con los pacientes con EPID asociadas al tabaco y 10 citoquinas en comparación con la FPI. A pesar de la naturaleza exploratoria de nuestro estudio, se identificaron citoquinas clave y mediadores inflamatorios que permiten distinguir los pacientes con HPCL de los pacientes con EPID asociadas al tabaco y con FPI. Además, también encontramos que algunas citoquinas se correlacionaron con medidas de resultados clínicos, lo que sugiere su posible importancia clínica en la HPCL.

El LBA es un procedimiento que forma parte del algoritmo diagnóstico en el estudio de las EPID. En la HPCL, el papel del LBA se centra principalmente en excluir la infección dentro del diagnóstico diferencial de los nódulos pulmonares representados en la TCAR torácica y buscar la presencia de células CD1 positivas, que cuando se encuentran en un valor mayor al 5% respaldan el diagnóstico de HPCL (31,91). Sin embargo, creemos que el análisis del LBA podría ofrecer mayor información que el recuento celular citológico. La expresión de genes celulares, el microbioma pulmonar o el análisis proteómico en muestras de LBA ya han mostrado resultados prometedores que podrían mejorar la caracterización de la EPID, incluida la HPCL (92).

En nuestro estudio, dentro del perfil alveolar diferencial, identificamos varios mediadores inflamatorios con roles bien conocidos en la quimiotaxis como GRO/CXCL1 o TARC/CCL17, reguladores de la remodelación de la matriz como TGF- β y reguladores de metaloproteinasas como TIMP-2 y otros mediadores como leptina o IGFBP-3 que no se asocian comúnmente con EPID.

Los niveles elevados de GRO/CXCL1 y TARC/CCL17 están en consonancia con la gran cantidad de neutrófilos que se encuentran en el LBA, ya que ambas citoquinas tienen una fuerte actividad quimio-atrayente de neutrófilos (93). A pesar de que se han descrito previamente cambios en CXCL1 en varias enfermedades pulmonares (94), se sabe menos sobre el papel de CCL17 en este contexto. CCL17 es un miembro de la familia de quimiocinas CC y se ha asociado tradicionalmente con respuestas inmunitarias de tipo 2 (95). En el pulmón, las fuentes celulares de esta quimioquina incluyen no solo las células epiteliales bronquiales y alveolares, sino también macrófagos M2 y células dendríticas, entre ellas las CL Langerhans (96). El humo del tabaco se ha asociado con niveles elevados de CCL17 (97) y se han encontrado concentraciones elevadas de esta quimioquina en el LBA de pacientes con FPI, lo que sugiere su implicación en la fisiopatología de la fibrosis pulmonar (98,99). De hecho, nuestros datos demuestran un aumento en los niveles de CCL17 en pacientes con FPI en concordancia con lo publicado. No obstante, encontramos que los pacientes con HPCL mostraron niveles significativamente más altos de CCL17 en comparación con FPI y EPID asociadas al tabaco, lo que sugiere un papel de CCL17 en la patogenia de la HPCL.

Por otro lado, la leptina se ha descrito como un nuevo candidato para regular la función inmune pulmonar (100). Además de sus funciones metabólicas, la leptina juega un papel importante en la quimiotaxis de neutrófilos y macrófagos y se ha descrito su asociación con el humo del tabaco y la disfunción pulmonar en varias enfermedades pulmonares como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (101,102). Nuestro estudio, describe por primera vez que los pacientes con HPCL exhibieron niveles elevados de leptina. Además, hemos demostrado correlaciones positivas entre leptina y TARC ($r = 0,83$, $p = 6,13e-10$) y, lo que es más importante, que ambas citoquinas se asociaron con alteraciones de la función pulmonar en pacientes con HPCL, ya que TARC/CCL17 y los niveles de leptina se correlacionaron inversamente con los valores de FEV₁/FVC ($r = -0,81$, $p = <0,001$ y $r = -0,77$, $p = <0,001$). Además, hemos encontrado interacciones importantes con otras citoquinas como OSM o IP-10/CXCL10. Según un estudio,

la expresión de OSM puede estar regulada por la leptina (103), lo que podría justificar nuestros hallazgos. Curiosamente, la OSM se encuentra elevada en varias enfermedades pulmonares crónicas, y se ha descrito su papel en la programación alternativa de macrófagos (macrófagos M2) (104).

Además de la inflamación, la formación de granulomas HPCL se acompaña de remodelación del parénquima pulmonar. Los niveles elevados de TGF- β , MMP, TIMP (inhibidores tisulares de MMP) e IGFBP-3 se ha demostrado que son, al menos en parte, responsables de la destrucción tisular en varias EPID (105). Nuestros resultados, han demostrado que los pacientes con HPCL exhibieron una mayor expresión de TGF- β 2, TIMP-2 e IGFBP-3 en comparación con las EPID asociadas al tabaco y la FPI, probablemente como un reflejo de la remodelación del tejido. Aunque, es importante destacar que los mediadores típicos de fibrosis como IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL-2 y MIG/CXCL9 se expresaron en característicamente en los pacientes con FPI, pero no en los pacientes con HPCL ni EPID asociadas al tabaco.

Finalmente, la matriz de confusión mostró una tasa de discriminación altamente exitosa entre los tres grupos, lo que se traduce en una precisión general del 93,3%. Esto sugiere que el análisis proteómico de las muestras de LBA podría tener valor como herramienta diagnóstica en la HPCL. Sin embargo, se trata de un estudio exploratorio, por lo que este hallazgo deberá validarse en una muestra de mayor tamaño.

A pesar de los resultados prometedores obtenidos, se deben considerar algunas limitaciones a la hora de interpretar los resultados. Como ya se ha comentado previamente, este trabajo ha identificado una huella inflamatoria específica en pacientes con HPCL que podría ser útil para diferenciarla de otras EPID; sin embargo, debido al tamaño relativamente pequeño de la muestra, estos hallazgos requieren una mayor validación. Ésta junto a la ausencia de muestras

de sangre que permitan correlacionar los hallazgos del LBA, son las principales limitaciones del estudio. Además, estudios adicionales podrían ayudar a comprender el papel de las citoquinas identificadas en la patogénesis de la HPCL.

En conclusión, los hallazgos de este estudio muestran que los pacientes con HPCL presentan un perfil diferencial de citoquinas en el LBA que podría ayudar a discriminar esta entidad de otras EPID. Sin embargo, se necesitan más estudios para confirmar el valor de esta huella y su utilidad en la práctica clínica habitual.

8. CONCLUSIONES

8. Conclusiones

1. En los pacientes con histiocitosis pulmonar de células de Langerhans de nuestro entorno, dentro de los que se engloban estadios histológicos celulares y también fibróticos, se identifican menos mutaciones en la vía MAPK que en los casos seleccionados en estadio celular reportados en la bibliografía.
2. La identificación de mutaciones recurrentes en la vía MAPK no se relaciona con variables clínicas ni de evolución de la enfermedad en los pacientes con histiocitosis pulmonar de células de Langerhans. Sin embargo, dada la pequeña muestra de pacientes incluida, estos resultados deben ser tomados con cautela.
3. El lavado broncoalveolar de los pacientes con histiocitosis pulmonar de células de Langerhans permite identificar perfiles de citoquinas y quimioquinas que son capaces de diferenciarlos de otras enfermedades clásicamente relacionadas con el tabaco. Por lo que podría plantearse como un procedimiento diagnóstico menos invasivo en los pacientes que no sean candidatos a biopsia pulmonar.
4. Dentro de las citoquinas más predominantes identificadas en el lavado broncoalveolar de los pacientes con histiocitosis pulmonar de células de Langerhans, los niveles elevados de TARC/CCL17, Leptina, OSM e IP-10/CXCL10 se han relacionado con una peor función pulmonar descrita como un menor índice de FEV₁/FVC, aunque no se ha traducido en valores de FEV₁.

9. LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN FUTURA

9. Líneas de investigación futura

Está previsto continuar con la identificación de mutaciones en la vía MAPK y ampliar el estudio a nivel nacional. Concretamente, se ha propuesto participar a los centros hospitalarios españoles que forman parte del Programa Integrativo de Investigación de EPID (PII de EPID) dentro de la Sociedad Española de Neumología (SEPAR).

10. BIBLIOGRAFÍA

10. Bibliografía

1. M Posada De la Paz, C Martín-Arribas, A Ramírez, A Villaverde, I Abitua. Rare diseases. Concept, epidemiology and state of the question in Spain. *Anales Sis San Navarra*. 2008;31:9–20.
2. A Xaubet, J Ancochea, R Blanquer, C Montero, F Morell, E Rodríguez, et al. Grupo de Investigación de Enfermedades Pulmonares Intersticiales Difusas. Área de Técnicas y Trasplante SEPAR. Diagnosis and treatment of diffuse interstitial lung diseases. *Arch Bronconeumol*. 2003;39(12):580–600.
3. Demedts M, Costabel U. ATS/ERS international multidisciplinary consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Eur Respir J*. 2002;19(5):794–6.
4. Flaherty KR, Fell C, Aubry MC, Brown K, Colby T, Costabel U, et al. Smoking related idiopathic interstitial pneumonia: Results of an ERS/ATS Task Force. *Eur Respir J*. 2014;44(3):594.
5. Cottin V, Inoue Y, Selman M, Ryerson CJ, Wells AU, Agusti A, et al. Syndrome of Combined Pulmonary Fibrosis and Emphysema An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Research Statement. *Am J Respir Crit Care Med*. 2022;206(4):E7–41.
6. Girschikofsky M, Arico M, Castillo D, Chu A, Doberauer C, Fichter J, et al. Management of adult patients with Langerhans cell histiocytosis: recommendations from an expert panel on behalf of Euro-Histio-Net. *Orphanet J Rare Dis*. 2013;8:72.
7. Vassallo R, Harari S, Tazi A. Current understanding and management of pulmonary Langerhans cell histiocytosis. *Thorax*. 2017;72:937–45.
8. Emile JF, Abla O, Fraitag S, Horne A, Haroche J, Donadieu J, et al. Revised classification of histiocytoses and neoplasms of the macrophage-dendritic cell lineages. *Blood*. 2016;127(22):2672–81.

9. Suri HS, Yi ES, Nowakowski GS, Vassallo R. Pulmonary langerhans cell histiocytosis. *Orphanet J Rare Dis.* 2012;7:16.
10. Gaensler EA, Carrington CB. Open biopsy for chronic diffuse infiltrative lung disease: clinical, roentgenographic, and physiological correlations in 502 patients. *Ann Thorac Surg.* 1980;30(5):411–26.
11. Vassallo R, Ryu JH, Schroeder DR, Decker PA, Limper AH. Clinical outcomes of pulmonary Langerhans'-cell histiocytosis in adults. *N Engl J Med.* 2002;346(7):484–90.
12. Feuillet S, Louis L, Bergeron A, Berezne A, Dubreuil ML, Polivka M, et al. Pulmonary Langerhans cell histiocytosis associated with Hodgkin's lymphoma. *Eur Respir Rev.* 2010;19(115):86–8.
13. F Basset CN, M F Rousseau. Histiocytosis X histogenetic arguments for a Langerhans cell origin. *Biomedicine.* 1973;18:365–71.
14. Geissmann F, Lepelletier Y, Freitag S, Valladeau J, Bodemer C, Debré M, et al. Differentiation of Langerhans cells in Langerhans cell histiocytosis. *Blood.* 2001;97(5):1241–8.
15. A J Hance. Pulmonary immune cells in health and disease: dendritic cells and Langerhans' cells. *Eur Respir J.* 1993;6(8):1213–20.
16. Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell.* 2001;106(3):255–8.
17. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:767–811.
18. Tazi A. Adult pulmonary Langerhans' cell histiocytosis. *Eur Respir J.* 2006;27(6):1272–85.
19. Kambouchner M, Basset F, Marchal J, Uhl JF, Hance AJ, Soler P. Three-dimensional characterization of pathologic lesions in pulmonary langerhans cell histiocytosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166(11):1483–90.

20. Vassallo R, Ryu JH, Colby T v., Hartman T, Limper AH. Pulmonary Langerhans' cell histiocytosis. *N Engl J Med.* 2000;342(26):1969–78.
21. Sundar KM, Gosselin M v., Chung HL, Cahill BC. Pulmonary Langerhans cell histiocytosis: emerging concepts in pathobiology, radiology, and clinical evolution of disease. *Chest.* 2003;123(5):1673–83.
22. Castillo D, Martin-Arroyo I, Moreno A, Balcells E, Villar A, Vicens-Zygmunt V, et al. Adult pulmonary Langerhans' cell histiocytosis: approach to the reality of the Spanish population. *Med Clin.* 2014;143(10):433–9.
23. Tazi A, Marc K, Dominique S, de Bazelaire C, Crestani B, Chinet T, et al. Serial computed tomography and lung function testing in pulmonary Langerhans' cell histiocytosis. *Eur Respir J.* 2012;40(4):905–12.
24. Brauner MW, Grenier P, Tijani K, Battesti JP, Valeyre D. Pulmonary Langerhans cell histiocytosis: evolution of lesions on CT scans. *Radiology.* 1997;204(2):497–502.
25. Crausman RS, Jennings CA, Tuder RM, Ackerson LM, Irvin CG, King TE. Pulmonary histiocytosis X: pulmonary function and exercise pathophysiology. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;153(1):426–35.
26. Tazi A, Marc K, Dominique S, de Bazelaire C, Crestani B, Chinet T, et al. Evaluation Of The Course Of Adult Pulmonary Langerhans Cell Histiocytosis By Serial Lung Function Tests. *American Thoracic Society International Conference Meetings Abstracts.* 2011;A1620–A1620.
27. Goyal G, Tazi A, Go RS, Rech KL, Picarsic JL, Vassallo R, et al. International expert consensus recommendations for the diagnosis and treatment of Langerhans cell histiocytosis in adults. *Blood.* 2022;139(17):2601–21.
28. Housini I, Tomashefski JF, Cohen A, Crass J, Kleinerman J. Transbronchial biopsy in patients with pulmonary eosinophilic granuloma. Comparison with findings on open lung biopsy. *Arch Pathol Lab Med.* 1994;118(5):523-30.

29. Haslam P, Baughman RP. Report of ERS Task Force: guidelines for measurement of acellular components and standardization of BAL. *Eur Respir J*. 1999;14(2):245–8.
30. Chollet S, Soler P, Dournovo P, Richard MS, Ferrans VJ, Basset O. Diagnosis of pulmonary histiocytosis X by immunodetection of Langerhans cells in bronchoalveolar lavage fluid. *Am J Pathol*. 1984;115(2):225-32.
31. Auerswald U, Barth J, Magnussen H. Value of CD-1-positive cells in bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of pulmonary histiocytosis X. *Lung*. 1991;169(6):305–9.
32. Lommatzsch M, Bratke K, Stoll P, Mülleneisen N, Prall F, Bier A, et al. Bronchoalveolar lavage for the diagnosis of Pulmonary Langerhans cell histiocytosis. *Respir Med*. 2016;119:168–74.
33. Takizawa Y, Taniuchi N, Ghazizadeh M, Enomoto T, Sato M, Jin E, et al. Bronchoalveolar lavage fluid analysis provides diagnostic information on pulmonary Langerhans cell histiocytosis. *J Nippon Med Sch*. 2009;76(2):84–92.
34. Collin M, Bigley V, McClain KL, Allen CE. Cell(s) of Origin of Langerhans Cell Histiocytosis. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2015;29(5):825–38.
35. Vermaelen K, Pauwels R. Pulmonary dendritic cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172(5):530–51.
36. Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Ait-Yahia S, Vaure C, Chemin K, et al. Regulation of dendritic cell recruitment by chemokines. *Transplantation*. 2002;73(1 Suppl):S7-11.
37. Homey B, Dieu-Nosjean MC, Wiesenborn A, Massacrier C, Pin JJ, Oldham E, et al. Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3 alpha/CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis. *J Immunol*. 2000;164(12):6621–32.
38. Cook DN, Prosser DM, Forster R, Zhang J, Kuklin NA, Abbondanzo SJ, et al. CCR6 mediates dendritic cell localization, lymphocyte homeostasis, and immune responses in mucosal tissue. *Immunity*. 2000;12(5):495–503.

39. Burnham K, Robb L, Scott CL, O’Keeffe M, Shortman K. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on the generation of epidermal Langerhans cells. *J Interferon Cytokine Res.* 2000;20(12):1071–6.
40. Borkowski TA, Letterio JJ, Farr AG, Udey MC. A role for endogenous transforming growth factor beta 1 in Langerhans cell biology: the skin of transforming growth factor beta 1 null mice is devoid of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med.* 1996;184(6):2417–22.
41. Tazi A, Bonay M, Bergeron A, Grandsaigne M, Hance AJ, Soler P. Role of granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) in the pathogenesis of adult pulmonary histiocytosis X. *Thorax.* 1996;51(6):611–4.
42. Asakura S, Colby T v., Limper AH. Tissue localization of transforming growth factor-beta1 in pulmonary eosinophilic granuloma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;154(5):1525–30.
43. Annels NE, da Costa CET, Prins FA, Willemze A, Hogendoorn PCW, Egeler RM. Aberrant chemokine receptor expression and chemokine production by Langerhans cells underlies the pathogenesis of Langerhans cell histiocytosis. *J Exp Med.* 2003;197(10):1385–90.
44. Misery L, Rougier N, Crestani B, Faure M, Claudy A, Schmitt D, et al. Presence of circulating abnormal CD34+ progenitors in adult Langerhans cell histiocytosis. *Clin Exp Immunol.* 1999;117(1):177–82.
45. Brabencova E, Tazi A, Lorenzato M, Bonay M, Kambouchner M, Emile JF, et al. Langerhans cells in Langerhans cell granulomatosis are not actively proliferating cells. *Am J Pathol.* 1998;152(5):1143–9.
46. Marchal J, Kambouchner M, Tazi A, Valeyre D, Soler P. Expression of apoptosis-regulatory proteins in lesions of pulmonary Langerhans cell histiocytosis. *Histopathology.* 2004;45(1):20–8.
47. Tazi A, Moreau J, Bergeron A, Dominique S, Hance AJ, Soler P. Evidence that Langerhans cells in adult pulmonary Langerhans cell histiocytosis are mature

- dendritic cells: importance of the cytokine microenvironment. *J Immunol.* 1999;163(6):3511–5.
48. Fleming MD, Pinkus JL, Alexander SW, Tam C, Loda M, Sallan SE, et al. Coincident expression of the chemokine receptors CCR6 and CCR7 by pathologic Langerhans cells in Langerhans cell histiocytosis. *Blood.* 2003;101(7):2473–5.
 49. Bracke KR, D'hulst AI, Maes T, Moerloose KB, Demedts IK, Lebecque S, et al. Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation and emphysema are attenuated in CCR6-deficient mice. *J Immunol.* 2006;177(7):4350–9.
 50. Vassallo R, Walters PR, Lamont J, Kottom TJ, Yi ES, Limper AH. Cigarette smoke promotes dendritic cell accumulation in COPD; a Lung Tissue Research Consortium study. *Respir Res.* 2010;11(1).
 51. Mogulkoc N, Veral A, Bishop PW, Bayindir Ü, Pickering CAC, Egan JJ. Pulmonary Langerhans' cell histiocytosis: Radiologic resolution following smoking cessation. *Chest.* 1999;115(5):1452–5.
 52. Wolters PJ, Elicker BM. Subacute onset of pulmonary langerhans cell histiocytosis with resolution after smoking cessation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014;190(11):e64.
 53. Willman CL, Busque L, Griffith BB, Favara BE, McClain KL, Duncan MH, et al. Langerhans'-cell histiocytosis (histiocytosis X)--a clonal proliferative disease. *N Engl J Med.* 1994;331(3):154–60.
 54. Yousem SA, Colby T v., Chen YY, Chen WG, Weiss LM. Pulmonary Langerhans' cell histiocytosis: molecular analysis of clonality. *Am J Surg Pathol.* 2001;25(5):630–6.
 55. Badalian G, Vergilio JA, Degar BA, MacConaill LE, Brandner B, Calicchio ML, et al. Recurrent BRAF mutations in Langerhans cell histiocytosis. *Blood.* 2010;116(11):1919–23.

56. Arceci RJ. Biological and therapeutic implications of the BRAF pathway in histiocytic disorders. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2014;(34):e441–5.
57. Fiskus W, Mitsiades N. B-Raf Inhibition in the Clinic: Present and Future. *Annu Rev Med*. 2016;67:29–43.
58. Mourah S, How-Kit A, Meignin V, Gossot D, Lorillon G, Bugnet E, et al. Recurrent NRAS mutations in pulmonary Langerhans cell histiocytosis. *European Respiratory Journal*. 2016 Jun 1;47(6):1785–96.
59. Chakraborty R, Hampton OA, Shen X, Simko SJ, Shih A, Abhyankar H, et al. Mutually exclusive recurrent somatic mutations in MAP2K1 and BRAF support a central role for ERK activation in LCH pathogenesis. *Blood*. 2014;124(19):3007–15.
60. Brown NA, Furtado LV, Betz BL, Kiel MJ, Weigelin HC, Lim MS, et al. High prevalence of somatic MAP2K1 mutations in BRAF V600E-negative Langerhans cell histiocytosis. *Blood*. 2014;124(10):1655–8.
61. Roden AC, Hu X, Kip S, Parrilla Castellar ER, Rumilla KM, Vrana JA, et al. BRAF V600E expression in langerhans cell histiocytosis: Clinical and immunohistochemical study on 25 pulmonary and 54 extrapulmonary cases. *American Journal of Surgical Pathology*. 2014;38(4):548–51.
62. Yousem SA, Dacic S, Nikiforov YE, Nikiforova M. Pulmonary Langerhans cell histiocytosis: profiling of multifocal tumors using next-generation sequencing identifies concordant occurrence of BRAF V600E mutations. *Chest*. 2013;143(6):1679–84.
63. Berres ML, Lim KPH, Peters T, Price J, Takizawa H, Salmon H, et al. BRAF-V600E expression in precursor versus differentiated dendritic cells defines clinically distinct LCH risk groups. *J Exp Med*. 2014;211(4):669–83.
64. Héritier S, Emile JF, Barkaoui MA, Thomas C, Fraitag S, Boudjemaa S, et al. BRAF Mutation Correlates With High-Risk Langerhans Cell Histiocytosis and

Increased Resistance to First-Line Therapy. *Journal of Clinical Oncology*. 2016 Sep 1;34(25):3023–30.

65. Lorillon G, Tazi A. How I manage pulmonary Langerhans cell histiocytosis. *Eur Respir Rev*. 2017;26(145).
66. Morimoto A, Shimazaki C, Takahashi S, Yoshikawa K, Nishimura R, Wakita H, et al. Therapeutic outcome of multifocal Langerhans cell histiocytosis in adults treated with the Special C regimen formulated by the Japan LCH Study Group. *Int J Hematol*. 2013;97(1):103–8.
67. Derenzini E, Fina MP, Stefoni V, Pellegrini C, Venturini F, Broccoli A, et al. MACOP-B regimen in the treatment of adult Langerhans cell histiocytosis: experience on seven patients. *Ann Oncol*. 2010;21(6):1173–8.
68. Duan MH, Han X, Li J, Zhang W, Zhu TN, Han B, et al. Comparison of vindesine and prednisone and cyclophosphamide, etoposide, vindesine, and prednisone as first-line treatment for adult Langerhans cell histiocytosis: A single-center retrospective study. *Leuk Res*. 2016;42:43–6.
69. Ng Wing Tin S, Martin-Duverneuil N, Idbaih A, Garel C, Ribeiro M, Parker J, et al. Efficacy of vinblastine in central nervous system Langerhans cell histiocytosis: a nationwide retrospective study. *Orphanet J Rare Dis*. 2011;6(1):83.
70. Goyal G, Abeykoon JP, Hu M, Young JR, Shah M v., Bennani NN, et al. Single-agent cladribine as an effective front-line therapy for adults with Langerhans cell histiocytosis. *Am J Hematol*. 2021;96(5):E146–50.
71. Lorillon G, Bergeron A, Detourmignies L, Jouneau S, Wallaert B, Frija J, et al. Cladribine is effective against cystic pulmonary Langerhans cell histiocytosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186(9):930–2.
72. Nasser M, Traclet J, Cottin V. Effect of cladribine therapy on lung cysts in pulmonary Langerhans cell histiocytosis. *ERJ Open Res*. 2018;4(1):00089-2017.

73. Lazor R, Etienne-Mastroianni B, Khouatra C, Tazi A, Cottin V, Cordier JF. Progressive diffuse pulmonary Langerhans cell histiocytosis improved by cladribine chemotherapy. *Thorax*. 2009;64(3):274–5
74. Donadieu J, Larabi IA, Tardieu M, Visser J, Hutter C, Sieni E, et al. Vemurafenib for Refractory Multisystem Langerhans Cell Histiocytosis in Children: An International Observational Study. *J Clin Oncol*. 2019;37(31):2857–65.
75. Haroche J, Cohen-Aubart F, Emile JF, Arnaud L, Maksud P, Charlotte F, et al. Dramatic efficacy of vemurafenib in both multisystemic and refractory Erdheim-Chester disease and Langerhans cell histiocytosis harboring the BRAF V600E mutation. *Blood*. 2013;121(9):1495–500.
76. Radzikowska E. Update on Pulmonary Langerhans Cell Histiocytosis. *Front Med (Lausanne)*. 2021;7:581-582.
77. Dauriat G, Mal H, Thabut G, Mornex JF, Bertocchi M, Tronc F, et al. Lung transplantation for pulmonary langerhans' cell histiocytosis: a multicenter analysis. *Transplantation*. 2006;81(5):746–50.
78. Tazi A, de Margerie C, Naccache JM, Fry S, Dominique S, Jouneau S, et al. The natural history of adult pulmonary Langerhans cell histiocytosis: a prospective multicentre study. *Orphanet J Rare Dis*. 2015;10(1).
79. Castellsagué J, Burgos F, Sunyer J, Barberà JA, Roca J. Prediction equations for forced spirometry from European origin populations. Barcelona Collaborative Group on Reference Values for Pulmonary Function Testing and the Spanish Group of the European Community Respiratory Health Survey. *Respir Med*. 1998;92(3):401–7.
80. Kamionek M, Ahmadi Moghaddam P, Sakhdari A, Kovach AE, Welch M, Meng X, et al. Mutually exclusive extracellular signal-regulated kinase pathway mutations are present in different stages of multi-focal pulmonary Langerhans cell histiocytosis supporting clonal nature of the disease. *Histopathology*. 2016;69(3):499–509.

81. Qiagen. GeneRead DNA FFPE Kit Handbook. <https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=8b47a2af-ced6-414a-9038-8f836c758e11&lang=en>.
82. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, et al. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol*. 2011;29(1):24–6.
83. Xaubet A, Ancochea J, Bollo E, Fernández-Fabrellas E, Franquet T, Molina-Molina M, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR) Research Group on Diffuse Pulmonary Diseases. *Arch Bronconeumol*. 2013;49(8):343–53.
84. Raghu G, Remy-Jardin M, Myers JL, Richeldi L, Ryerson CJ, Lederer DJ, et al. Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018;198(5):e44–68.
85. Travis WD, Costabel U, Hansell DM, King TE, Lynch DA, Nicholson AG, et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188(6):733–48.
86. Hansell DM, Bankier AA, MacMahon H, McLoud TC, Müller NL, Remy J. Fleischner Society: glossary of terms for thoracic imaging. *Radiology*. 2008;246(3):697–722.
87. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D607–13.
88. Nelson DS, Halteren AV, Quispel WT, van den Bos C, Bovée JVM, Patel B, et al. MAP2K1 and MAP3K1 mutations in Langerhans cell histiocytosis. *Genes Chromosomes Cancer*. 2015;54(6):361–8.

89. Mourah S, How-Kit A, Meignin V, Gossot D, Lorillon G, Bugnet E, et al. Recurrent NRAS mutations in pulmonary Langerhans cell histiocytosis. *Eur Respir J*. 2016;47(6):1785–96.
90. Kamata T, Giblett S, Pritchard C. KRASG12D expression in lung-resident myeloid cells promotes pulmonary LCH-like neoplasm sensitive to statin treatment. *Blood*. 2017;130(4):514–26.
91. Lommatzsch M, Bratke K, Stoll P, Mülleneisen N, Prall F, Bier A, et al. Bronchoalveolar lavage for the diagnosis of Pulmonary Langerhans cell histiocytosis. *Respir Med*. 2016;119:168–74.
92. Salvador-Corres I, Quirant-Sanchez B, Teniente-Serra A, Centeno C, Moreno A, Rodríguez-Pons L, et al. Detection of Autoantibodies in Bronchoalveolar Lavage in Patients with Diffuse Interstitial Lung Disease. *Arch Bronconeumol*. 2021;57(5):351–8.
93. Sawant K v., Xu R, Cox R, Hawkins H, Sbrana E, Kolli D, et al. Chemokine CXCL1-Mediated Neutrophil Trafficking in the Lung: Role of CXCR2 Activation. *J Innate Immun*. 2015;7(6):647–58.
94. Liang M, Jiang Z, Huang Q, Liu L, Xue Y, Zhu X, et al. Clinical Association of Chemokine (C-X-C motif) Ligand 1 (CXCL1) with Interstitial Pneumonia with Autoimmune Features (IPAF). *Sci Rep*. 2016;6:38949
95. Lieberam I, Lieberam I F. The murine beta-chemokine TARC is expressed by subsets of dendritic cells and attracts primed CD4+ T cells. *Eur J Immunol*. 1999;29(9):2684–94.
96. Catherine J, Roufosse F. What does elevated TARC/CCL17 expression tell us about eosinophilic disorders? *Semin Immunopathol*. 2021;43(3):439–58.
97. Nureki SI, Miyazaki E, Ando M, Kumamoto T, Tsuda T. CC chemokine receptor 4 ligand production by bronchoalveolar lavage fluid cells in cigarette-smoke-associated acute eosinophilic pneumonia. *Clin Immunol*. 2005;116(1):83–93.

98. Yogo Y, Fujishima S, Inoue T, Saito F, Shiomi T, Yamaguchi K, et al. Macrophage derived chemokine (CCL22), thymus and activation-regulated chemokine (CCL17), and CCR4 in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res.* 2009;10(1).
99. Belperio JA, Dy M, Murray L, Burdick MD, Xue YY, Strieter RM, et al. The role of the Th2 CC chemokine ligand CCL17 in pulmonary fibrosis. *J Immunol.* 2004;173(7):4692–8.
100. Vernooij JHJ, Drummen NEA, van Suylen RJ, Cloots RHE, Möller GM, Bracke KR, et al. Enhanced pulmonary leptin expression in patients with severe COPD and asymptomatic smokers. *Thorax.* 2009;64(1):26–32.
101. Hansel NN, Gao L, Rafaels NM, Mathias RA, Neptune ER, Tankersley C, et al. Leptin receptor polymorphisms and lung function decline in COPD. *Eur Respir J.* 2009;34(1):103–10.
102. Kim JS, Anderson MR, Podolanczuk AJ, Kawut SM, Allison MA, Raghu G, et al. Associations of Serum Adipokines With Subclinical Interstitial Lung Disease Among Community-Dwelling Adults: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Chest.* 2020;157(3):580–9.
103. Yang WH, Tsai CH, Fong YC, Huang YL, Wang SJ, Chang Y sen, et al. Leptin induces oncostatin M production in osteoblasts by downregulating miR-93 through the Akt signaling pathway. *Int J Mol Sci.* 2014;15(9):15778–90.
104. Richards CD, Botelho F. Oncostatin M in the Regulation of Connective Tissue Cells and Macrophages in Pulmonary Disease. *Biomedicines.* 2019;7(4):95.
105. Christopher J Green 1 JMH 2, CEB 3, AB 4, SE 5, JG 4, YBS 1. Role of IGF-I, IGF-II and IGFBP-3 in lung function of males: the Caerphilly Prospective Study. *Int J Mol Epidemiol Genet.* 2014;5(2):112–9.