



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Regulación de la disfunción telomérica en fibrosis pulmonar

Lurdes Planas Cerezales

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



Bellvitge
Hospital Universitari

IDIBELL
Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge

Regulación de la disfunción telomérica en fibrosis pulmonar

Memoria de tesis doctoral presentada por

Lurdes Planas Cerezales

Para optar al grado de Doctora por la Universidad de Barcelona

Dirigida y tutorizada por

Dra. María Molina Molina

Jefe de Sección, Unidad Funcional de Intersticio Pulmonar, Servicio de Neumología

Hospital Universitario de Bellvitge. IDIBELL. UB

Doctorado en Medicina e Investigación Traslacional

Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud. Universidad de Barcelona

Septiembre de 2023

Agradecimientos

“El aprendizaje es un tesoro que seguirá a su dueño a cualquier lugar”. Este proverbio chino es la mejor forma de describir estos años de investigación en mi tesis doctoral, la cual considero una increíble lección de aprendizaje. Un aprendizaje basado en el método científico, el desarrollo de habilidades, el fomento de la perseverancia y del compromiso, la promoción de la curiosidad, la creatividad y el ingenio. *“En los momentos de crisis, solo la imaginación es más importante que el conocimiento”* dijo Albert Einstein. La imaginación permite crear aquello que la curiosidad pretende indagar haciendo uso de la investigación. Y el trabajo en equipo es, sin duda, la mejor definición de investigación. Por este motivo, aprovecho la ocasión para agradecer a todos aquellos que han hecho que este viaje valga la pena, contribuyendo a mi aprendizaje con su trabajo, tiempo, experiencia, conocimientos y recursos.

En primer lugar, mi mayor y más sincero agradecimiento a mi supervisora, tutora y directora, la Dra. **María Molina Molina**, sin la que esta tesis doctoral no hubiera sido posible. Es difícil encontrar una frase que describa con justicia la magnitud de sus aportaciones, tanto a la presente tesis doctoral como a mi trayectoria académica y profesional. Probablemente no exista, pero considero que su supervisión e incansable implicación han sido determinantes para la finalización de este proceso. Gracias a su ejemplo, su visión innovadora, su entusiasmo, su perseverancia y su guía, que alimentaron mi espíritu investigador a lo largo de estos años. Gracias por abrir mi mente a nuevas ideas, campos de interés y formas de trabajo multidisciplinar, que cambiaron mis perspectivas para siempre y me llevaron a descubrir mi pasión profesional. He intentado aprender lo máximo posible de tu experiencia, brillantez y conocimientos. Me considero muy afortunada por las extraordinarias oportunidades que me has brindado y la sólida formación asistencial y académica que me has proporcionado. Echaré de menos tus contribuciones y, sobre todo, el entusiasmo compartido por comentar y discutir las nuevas publicaciones sobre el tema motivo de esta tesis. Nunca olvidaré los momentos de “fuga de ideas” que, sin duda, contribuyeron a solventar dificultades y alimentar la ilusión por el proyecto. Son incontables los recursos personales y

profesionales que he adquirido en estos años. Mis futuros logros serán en gran medida gracias a todas esas enseñanzas y recursos.

Esta tesis doctoral tampoco hubiera sido posible sin la indispensable contribución de la Dra. **Rosario Perona Abellón** y su equipo, principalmente la Dra. **Elena Garcia Arias Salgado**, por proporcionar los conocimientos y recursos necesarios para desarrollar la técnica metodológica principal del presente proyecto de investigación. Me gustaría agradecerles especialmente su disposición, asesoramiento y apoyo; así como también su contribución a mi conocimiento en el campo de la disfunción telomérica. Siempre serán mis referentes en el tema. Estoy muy agradecida por la oportunidad que me brindaron y su incalculable contribución a mi tesis doctoral y a mi pasión por la biología de los telómeros.

Un especial reconocimiento merece la Dra. **Ana Montes Worboys**, con quién tuve el privilegio de iniciarme en un laboratorio de investigación. No encuentro palabras que puedan expresar mi gran agradecimiento a su paciencia conmigo durante mis primeros meses en el laboratorio, a donde llegué con nulos conocimientos en materia de técnicas de laboratorio y procesamiento de muestras. Gracias a su rigor, su capacidad de trabajo, su metódica organización, su crítica constructiva y su excelencia aprendí las técnicas necesarias para procesar las muestras de la presente tesis doctoral, así como también a desenvolverme en un laboratorio. Le agradezco que me dejara el tiempo y el espacio para procesar yo misma las muestras, lo que sin duda enlentecía su dinámica de trabajo. Eso me proporcionó un bagaje de conocimientos, que sin saberlo en aquel momento, me serían de gran ayuda años más tarde durante la realización de un máster de genética y las consecuentes prácticas de laboratorio. Y que, sin duda, serán imprescindibles para mi futura carrera investigadora. Así mismo también quiero destacar su apoyo incondicional durante mi doctorado. Su compañía y experiencia fueron imprescindibles para hacer frente a los sucesivos retos que se fueron presentando. Sin duda, sus contribuciones fueron, son y serán de gran trascendencia para mi carrera profesional y mi persona.

Mi más significativa gratitud para **Anna Bachs y Josep M Palma** por su incompensable y desinteresada aportación a este proyecto de investigación. Gracias por vuestra implicación y eterna disposición para pinchar las analíticas de los pacientes incluidos en

el estudio. Este proyecto no podría haber contado con un equipo de enfermería más eficiente, diligente y predispuesto al trabajo. Agradezco vuestra gran calidad humana y profesional que, además de ayudarme en el proyecto y enseñarme, también me acompañaron y me apoyaron.

Mi más afectuoso agradecimiento a los **pacientes y sus familias** que colaboraron en este proyecto con sus muestras. Gracias por depositar vuestra confianza en nosotros, por vuestra paciencia durante las largas esperas y por interesaros por los avances del proyecto. Vuestros ánimos y vuestras ganas fueron un gran impulso para todo el equipo investigador, el cual trabaja y trabajará con la ilusión de poder optimizar vuestro “viaje” como pacientes. Nada me gustaría más que esta tesis fuera la base de futuros proyectos de transformación del sistema sanitario, que nos permitan perfeccionar vuestro cuidado personalizando el manejo a vuestras necesidades. Consciente del enorme desafío que eso supone, recuerdo con frecuencia lo que uno de vosotros me dijo durante una larga visita de ensayo: *“a veces hay que soñar con la misma intensidad con la que se trabaja, mientras trabajas por lo que crees”*. Gran consejo de una gran persona que, sin duda, aplicaré.

Es importante reconocer la contribución del **Servicio de Neumología del Hospital Universitari de Bellvitge**, dirigido entonces por el Dr. **Jordi Dorca Sargatal** y actualmente por la Dra. **Salud Santos Pérez**, como paraguas bajo el que se contextualizó esta tesis doctoral. Agradezco mucho el sustento y los puentes institucionales que su apoyo me proporcionaron. Así mismo, también quiero destacar la contribución de todo el *staff* a mi formación como neumóloga, con una especial mención para el Dr. **Federico Manresa**. Gracias por enseñarme una profesión.

Sin duda, este proyecto de investigación es fruto de las ideas, los proyectos y los esfuerzos previos que corresponden a las personas hasta ahora mencionadas. Mi más sincero agradecimiento por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis doctoral confiándome el proyecto de investigación en cuestión. Disfruté mucho de la experiencia e intenté dar siempre lo mejor de mí. Espero no haberos defraudado.

Con gran aprecio personal y respeto profesional quiero destacar el papel de la Dra. **Vanessa Vicens Zygmunt** y la Dra. **Irene Martín Robles** por su afectuosa y alegre acogida

a mi llegada a la Unidad de Intersticio Pulmonar a finales de 2013, por aquel entonces ubicada en un pequeño despacho del sótano del hospital. La falta de espacio se compensaba con un gran ventanal (que nos encantaba) y un fantástico, divertido, empático, inclusivo, dinamizador y docente ambiente de trabajo en equipo, del que tuve la suerte de formar parte. Nunca olvidaré vuestros consejos y enseñanzas. Siempre os recordaré como las mejores referentes que podría haber tenido al inicio de mi etapa como becaria predoctoral. Aunque desde hace años “nuestro” despacho forma parte del gabinete de Urología, un precioso y potente recuerdo de ese equipo y de las personas que lo formaban y dirigían permanecerá ahí donde todo empezó.

Agradezco a **Carlos Machahua Huamani**, mi compañero predoctoral, su incondicional apoyo y ayuda en el laboratorio. Gracias por tu disposición, accesibilidad, empatía y buen carácter. Siempre tenía una pregunta que hacerle, a la que siempre me contestaba con paciencia y humor. Nuestras mutuas charlas motivacionales seguro contribuyeron al desarrollo de esta tesis. No había mejor incentivo que imaginar nuestro futuro investigador, profesional y personal mientras el *timer* descontaba el tiempo para el siguiente paso del protocolo. Me alegro mucho de haber compartido mi etapa predoctoral contigo y espero que se cumpla todo lo que durante años soñaste “*entre pipetas*”.

Así mismo, agradezco a la Dra. **Mercè Palau Benavent** por creer siempre en mí e impulsar mis sueños. Gracias por allanar mi camino durante los últimos años de doctorado con su apoyo, experiencia, perspectiva y consejos. Fue un privilegio coincidir personal y profesionalmente. Nunca olvidaré sus valiosas aportaciones a mi persona. Del mismo modo, a **Gemma, Loli** y **Ma José** por vuestro incondicional e indispensable soporte a nivel profesional y personal. Estoy muy agradecida por todo lo compartido. Vuestras palabras afectuosas, divertidas y alentadoras estarán siempre conmigo. Soy consciente de los buenos deseos que las 4 albergáis para mí y os tendré presentes cada vez que alguno de ellos se cumpla. Al resto de compañeros/as integrantes del **Servicio de Neumología del Hospital de Viladecans** gracias, sobre todo, por vuestra acogida en un momento profesional y personal de gran dificultad para mí.

Cualquier trabajo de investigación también es fruto del apoyo vital que ofrecen las personas que nos estiman, sin el que no sería posible el crecimiento ni el desarrollo de las personas y los profesionales.

A toda **mi gran familia**, mi agradecimiento más profundo y cariñoso. **Mis padres, Gloria y José Ma**, a quienes les estaré eternamente agradecida por darme una infancia feliz sobre la que sustentar mi vida adulta y reafirmar mis valores. Gracias por ser mi ejemplo de familia e inculcarme la perseverancia, el trabajo y el esfuerzo con los que se consigue todo, o casi todo, lo que uno anhela. Poca importancia tienen los días en los que las cosas no salen según lo planeado. Los momentos de frustración son capaces de forjar el carácter necesario para un nuevo intento tras cada fallo, siendo una parte fundamental del proceso. Sin olvidar la implicación, el compromiso y la paciencia con su recompensa diferida. Es así como he visto formar, sustentar y prosperar diversas actividades empresariales en padres, tíos y primos, a pesar de las grandes dificultades que requirieron más de una decisión difícil. Vosotros, que conocéis hasta el último y más mínimo detalle de vuestro trabajo, fuisteis mi gran inspiración para conocer con la mayor sutileza posible todos los aspectos de mi tesis doctoral. Os agradezco vuestro inmenso apoyo a mis decisiones, vuestros ánimos incansables y vuestro amor infinito. Yo también os quiero mucho.

A **mis padrinos, Amelia y Francisco**, gracias por cuidarme, quererme y consentirme. Tuve la suerte de teneros durante muchos años, gracias a los que conservo imborrables recuerdos de infancia y enseñanzas de vida. Siempre os echare de menos, sobre todo, en aquellos momentos en lo que sé que estaríais muy felices por mí. A **Mireia**, mi hermana pequeña. Mi compañera de travesuras. Gracias por existir y estar siempre cuando te necesito. Muy contenta de tenerte a mi lado. A **Xavi**, por cuidar de mi hermana. A ambos, por darme el mejor regalo. Mi sobrina y ahijada, **Abril**.

A mis **amigos/as**, Amparo, Laia, Mark, Gemma, Silvia, Perla, Elena, Óscar, Montse, Vicente, Natalia, Fran, Marta, Joel, Daniela, Carla, Berta, Esther, Marta, Cathy. Gracias por darme vuestro apoyo moral siempre. Muy contenta de haber compartido con vosotros grandes momentos y aventuras. Espero seguir acumulando recuerdos con vosotros.

Y por último, pero no menos importante, mi más sentido y enérgico agradecimiento a mi compañero de vida, **Javier**. Agradezco infinitamente su amor, paciencia, humor, implicación, comprensión y solidaridad con mis proyectos profesionales. Gracias por todo el impulso que siempre me das para convertirme en la mujer que quiero ser. Soy muy afortunada de tenerte y de perseguir sueños contigo. Por muchos más juntos.

Por el tiempo que todos mis seres queridos me han concedido para dedicarme a este proyecto de investigación, un tiempo robado a la historia familiar y personal. Este trabajo es también vuestro y espero que os sintáis orgullosos de él.

Finalmente, quiero expresar mi compromiso de seguir contribuyendo a la ciencia, la medicina, la neumología, al bienestar de nuestros pacientes y al progreso de nuestra sociedad. Trabajaré para que esta tesis doctoral sea solo el comienzo de una carrera científica fructífera, que pueda ser un buen legado de todos aquellos que han contribuido a mi formación como persona, médico, neumóloga e investigadora. Gracias de nuevo por todo lo que habéis hecho por mí.

Financiación

La financiación de la presente tesis doctoral proviene de:

1. Ayudas públicas competitivas de organismos gubernamentales especializados:

Año 2016-2018:

Convocatorias del Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) Instituto de Salud Carlos III

Proyecto: Efecto de la regulación telomérica en fibrosis pulmonar

Expediente: PI15/00710

Investigadora principal: María Molina Molina

Año 2019-2021:

Proyecto: Caracterización de la fibrosis pulmonar telomérica y su regulación biológica

Expediente: PI18/00367

Investigadora principal: María Molina Molina

2. Fundaciones y organizaciones:

Año 2014:

Convocatoria becas SEPAR: Ayudas a la investigación

Proyecto “Envejecimiento celular en la fibrogénesis pulmonar: papel del acortamiento telomérico y posibles vías para su regulación”

Investigadora principal: María Molina Molina

Convocatoria beca Interstici FUCAP

Proyecto “Efecte de la glicació i l’envelliment cel·lular en la fibrogènsi pulmonar: possibles vies per a la seva regulació”

Investigadora principal: María Molina Molina

Año 2015:

PUBLIBECA SEPAR

Proyecto “Factores pronósticos para acortamiento telomérico en pacientes con Fibrosis Pulmonar Idiopática o Familiar”

Investigadora principal: Lurdes Planas Cerezales

Convocatoria becas SEPAR: Ayudas a la investigación. BECA BECARIO

Investigador principal: Lurdes Planas Cerezales

Año 2017:

Convocatoria Becas SEPAR: Ayudas a la investigación

Proyecto “Estudio de la regulación telomérica en fibrosis pulmonar

Investigadora principal: María Molina Molina

Año 2018:

Ayuda Investigación SEPAR - BOEHRINGER Grupo emergente EPID

Proyecto “Estudio longitudinal de la fibrosis pulmonar familiar en España”

Investigador principal: Lurdes Planas Cerezales

Índice de contenido

Índice de figuras	1
Índice de tablas	2
Lista de abreviaturas y acrónimos	3
Enumeración de los artículos de la tesis	5
1. Introducción	6
1.1 Clasificación de la enfermedad pulmonar intersticial difusa.....	9
1.2 Etiología.....	10
1.2.1 Factores de riesgo.....	12
1.2.2 Factores genéticos.....	14
1.2.3 Agregación familiar.....	19
1.3 Envejecimiento celular.....	21
1.3.1 Longitud telomérica como biomarcador de envejecimiento celular.....	24
1.4 Telómeros, telomerasa y telomeropatías.....	28
1.4.1 Estructura y estabilización telomérica.....	29
1.4.2 Telomerasa y replicación telomérica.....	32
1.4.3 Actividad telomerasa, longitud telomérica y envejecimiento.....	34
1.4.4 Telomeropatías primarias y secundarias.....	36
1.4.5 Correlación genotipo – fenotipo.....	40
1.4.6 Mecanismos patológicos del acortamiento telomérico.....	42
1.4.7 Determinantes genéticos y heredabilidad de la longitud telomérica.....	43
1.4.8 Determinantes ambientales de la longitud telomérica.....	45
1.4.9 Métodos de medida de la longitud telomérica.....	46
1.4.10 Longitud telomérica, medicina personalizada y controversias para su uso clínico.....	49
1.5 Envejecimiento, disfunción telomérica y fibrosis pulmonar.....	54
1.5.1 Envejecimiento y fibrosis pulmonar.....	54
1.5.2 Disfunción telomérica y afectación pulmonar.....	56

1.5.3	Disfunción telomérica y fibrosis pulmonar.....	57
1.5.4	Disfunción telomérica y estratificación del riesgo de fibrosis pulmonar.....	58
1.5.5	Valor pronóstico de la disfunción telomérica en fibrosis pulmonar.....	59
1.5.6	Características epidemiológicas, radiológicas y patológicas de la disfunción telomérica en fibrosis pulmonar.....	62
1.5.7	Estudio genético telomérico en la práctica clínica habitual de la fibrosis pulmonar.....	63
2.	Hipótesis.....	66
3.	Objetivos.....	70
4.	Material, métodos y resultados.....	74
4.1	Predictive factors and prognostic effect of telomere shortening in pulmonary fibrosis.....	76
4.2	Lung transplant improves survival and quality of life regardless of telomere dysfunction.....	86
5.	Discusión.....	100
6.	Conclusión.....	115
7.	Bibliografía.....	120

Índice de figuras

Figura 1. Actualización de la clasificación de EPID 2013.....	9
Figura 2. Hipótesis fisiopatológica del desarrollo de la FPI.....	11
Figura 3. Factores implicados en el desarrollo de la FPI.....	12
Figura 4. Fibrosis pulmonar como rasgo complejo.....	18
Figura 5. Hallmarks of aging.....	23
Figura 6. Telómero.....	30
Figura 7. Estructura de los extremos de los telómeros.....	31
Figura 8. Componentes de la telomerasa.....	33
Figura 9. Acortamiento telomérico.....	35
Figura 10. Síndrome telomérico.....	40
Figura 11. Factores que cuestionan el uso de la medida de longitud telomérica en la práctica clínica habitual.....	50

Índice de tablas

Tabla 1. Genes asociados con EPID en la edad adulta.....	16
Tabla 2. Características clínicas de la FPF.....	20
Tabla 3. Determinantes ambientales de la longitud telomérica.....	45
Tabla 4. Técnicas de medida de la longitud telomérica.....	49

Abreviaturas y acrónimos

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFAR	American Federation for Aging Research
AR	Artritis reumatoide
ARN	Ácido ribonucleico
AT	Acortamiento telomérico
CEA	Células epiteliales alveolares
CPFE	Síndrome combinado fibrosis enfisema
DC	Disqueratosis Congénita
DLCO	Capacidad de difusión de monóxido de carbono
EPID	Enfermedades pulmonares intersticiales difusas
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
FPF	Fibrosis pulmonar familiar
FPI	Fibrosis pulmonar idiopática
FUCAP	Fundació Catalana de Pneumologia
FVC	Capacidad vital forzada
GWAS	Genome-wide association studies
ILAs	Interstitial lung abnormalities
LAS	Lung Allocation Score
LT	Longitud telomérica
MEC	Matriz extracelular
miARN	micro ARN
MPPs	Metaloproteinasas

NINE	Neumonía intersticial no específica
NIU	Neumonía intersticial usual
PCR	Polymerase chain reaction
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
RDT	Radioterapia
RGE	Reflujo gastroesofágico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SEPAR	Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica
TRF	Telomere Restriction Fragment
WES	Whole-exome sequencing

Enumeración de los artículos de la tesis

Tesis en formato de compendio de publicaciones

La tesis consta de 8 objetivos y 2 artículos

1. **Planas-Cerezales L**, Arias-Salgado EG, Buendia-Roldán I, Montes-Worboys A, López CE, Vicens-Zygmunt V, Hernaiz PL, Sanuy RL, Leiro-Fernandez V, Vilarnau EB, Llinás ES, Sargatal JD, Abellón RP, Selman M, Molina-Molina M. Predictive factors and prognostic effect of telomere shortening in pulmonary fibrosis. *Respirology*. 2019 Feb;24(2):146-153. doi: 10.1111/resp.13423

Impact factor 2019: 4.88

Quartil 2019: Q1



<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/resp.13423>

2. **Planas-Cerezales L**, Arias-Salgado EG, Berastegui C, Montes-Worboys A, González-Montelongo R, Lorenzo-Salazar JM, Vicens-Zygmunt V, Garcia-Moyano M, Dorca J, Flores C, Perona R, Román A, Molina-Molina M. Lung Transplant Improves Survival and Quality of Life Regardless of Telomere Dysfunction. *Front Med (Lausanne)*. 2021 Jul 30;8:695919. doi: 10.3389/fmed.2021.695919

Impact factor 2021: 4.59

Quartil 2021: Q1



<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2021.695919/full>

1

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

Las enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID) constituyen un grupo amplio y heterogéneo de más de 300 entidades diferentes que cursan con afectación del parénquima pulmonar de diversa etiología, presentaciones clínicas y patrones radiológicos y anatomopatológicos [1]. A pesar de las diferencias, se clasifican conjuntamente puesto que comparten la alteración del espacio alveolo-intersticial con pérdida progresiva de la arquitectura pulmonar, provocando una afectación irreversible del funcionalismo respiratorio y del intercambio de gases [2].

Entre las diferentes EPID, la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es la más frecuente y de peor pronóstico [3]. Presenta un curso clínico progresivo e irrevocable, siendo el trasplante pulmonar el único tratamiento capaz de mejorar la supervivencia cuando el paciente es candidato a ello [3]. Por estos motivos, la FPI ha suscitado un gran interés científico, siendo la EPID más estudiada. No obstante, otras EPID no FPI también pueden presentar un curso fibrosante progresivo asociándose a un peor pronóstico [4].

El desarrollo de fibrosis pulmonar, como fase final de varias EPID, se vehicula mediante complejos mecanismos no totalmente conocidos. Diversos factores genéticos, ambientales y moleculares relacionados con el envejecimiento celular y la activación epitelial alveolar aberrante se han sugerido como elementos clave en la patogenia de la enfermedad [5-9]. Una sólida evidencia científica establece la FPI como una enfermedad por envejecimiento acelerado tisular [9-11]. Y, aunque los mecanismos de dicha asociación aún no se conocen con exactitud, la disfunción telomérica se ha postulado como uno de los más importantes.

La completa elucidación de los mecanismos responsables del envejecimiento celular y de las vías causantes de la fibrogénesis pulmonar es de gran importancia para la comunidad médico-científica dedicada a la EPID. La comprensión de la patogenia de la enfermedad es clave para propiciar el cambio de su historia natural mediante la optimización del manejo diagnóstico – terapéutico, la estratificación del pronóstico y la predicción del riesgo de enfermedad.

1.1 Clasificación de la enfermedad pulmonar intersticial difusa

En el año 2002, la *American Respiratory Society* junto con la *European Respiratory Society* establecieron un consenso internacional para la clasificación de la EPID [12]. Desde entonces, se han producido avances en el conocimiento de algunas entidades, describiendo otras nuevas y detallando nuevos patrones anatomopatológicos. Por este motivo, en el año 2013 ambas sociedades actualizaron la clasificación de la EPID (**Fig. 1**). Esta nueva clasificación reemplaza el histórico *Gold Standard* diagnóstico histológico por un manejo integrado dinámico mediante la valoración multidisciplinar de los casos [1], la cual requiere la integración de la información clínica, radiológica e histológica y la discusión conjunta entre diversos especialistas (Neumología, Radiología, Anatomía Patológica, Reumatología) para llegar a un diagnóstico definitivo.

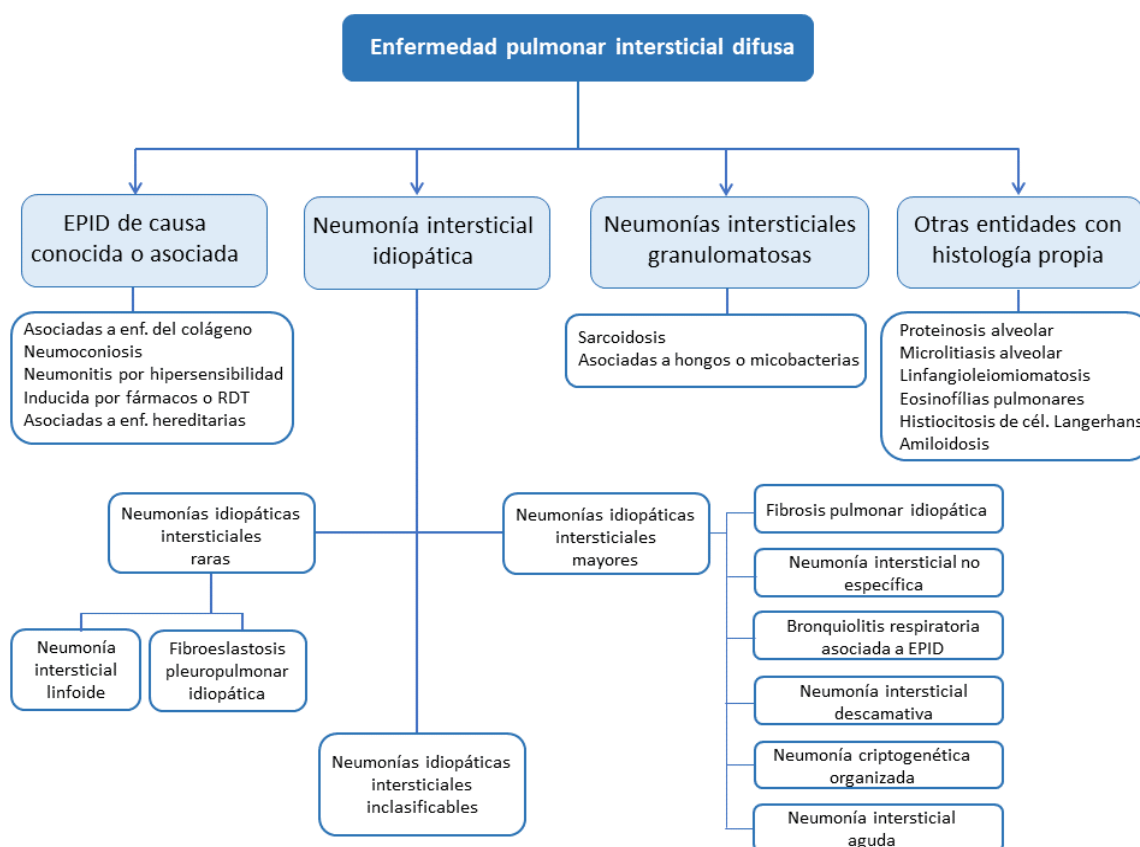


Imagen original de Lurdes Planas Cereales

Figura 1. Actualización de la clasificación de EPID 2013. Según la última actualización, la EPID se clasifica en 4 grandes grupos incluyendo enfermedades ya descritas en la clasificación previa y añadiendo otras nuevas como la fibroelastosis pleuropulmonar idiopática.

1.2 Etiología de la fibrosis pulmonar

El conocimiento fisiopatológico ha ido evolucionando e incorporando las vías patogénicas de envejecimiento como elementos clave en la alteración reparativa epitelio-mesénquimal de la FPI, tal como inicialmente postularon *Moisés Selman* y *Annie Pardo* [6]. De acuerdo a dicha teoría, la fibrosis pulmonar es consecuencia de complejos mecanismos que se fundamentan en la activación aberrante de las células epiteliales alveolares (CEA), las cuales segregan múltiples factores de crecimiento y metaloproteinasas (MPPs), entre otros, induciendo la expansión de fibroblastos y miofibroblastos, la alteración de la membrana basal y la producción exagerada de matriz extracelular (MEC) con la consiguiente alteración de la relación epitelio – mesénquima y la destrucción de la arquitectura pulmonar [6,7,9].

Los mecanismos que comportan la hiperactivación anómala de las CEA no se conocen con exactitud. No obstante, una sólida evidencia científica avala el envejecimiento celular como factor clave en la patogenia de la enfermedad [9-11]. Los pacientes con FPI presentan alteraciones en la mayoría de los mecanismos celulares y moleculares que vehiculan el proceso de envejecimiento [6,9-11,13-16]. Estos se conocen como los “*hallmarks of aging*” e incluyen procesos relacionados con la disfunción mitocondrial, cambios epigenéticos [disregulación de microRNAs o cambios de la metilación del ácido desoxirribonucleico (ADN)], inestabilidad genómica, disfunción telomérica con acortamiento anormal de los telómeros, aumento del estrés oxidativo y la senescencia [17]. Este envejecimiento celular y molecular condiciona una pérdida de la integridad del epitelio alveolar en sujetos genéticamente predispuestos, provocando un deterioro progresivo de la capacidad de responder de forma adecuada a las agresiones externas (contaminación, virus, tabaco, microaspiraciones) repetidas [6,7].

Dicha respuesta celular aberrante se perpetua incluso en ausencia del agente externo dañino. La transición epitelio – mesénquima, la diferenciación celular, migración y senescencia de las CEA y los fibroblastos conducen a un desequilibrio entre los factores antifibróticos y profibróticos, en beneficio de estos últimos. El daño del epitelio/membrana basal perpetua así el remodelado pulmonar caótico y provoca una fibrogénesis pulmonar irreversible [6] (**Fig. 2**).

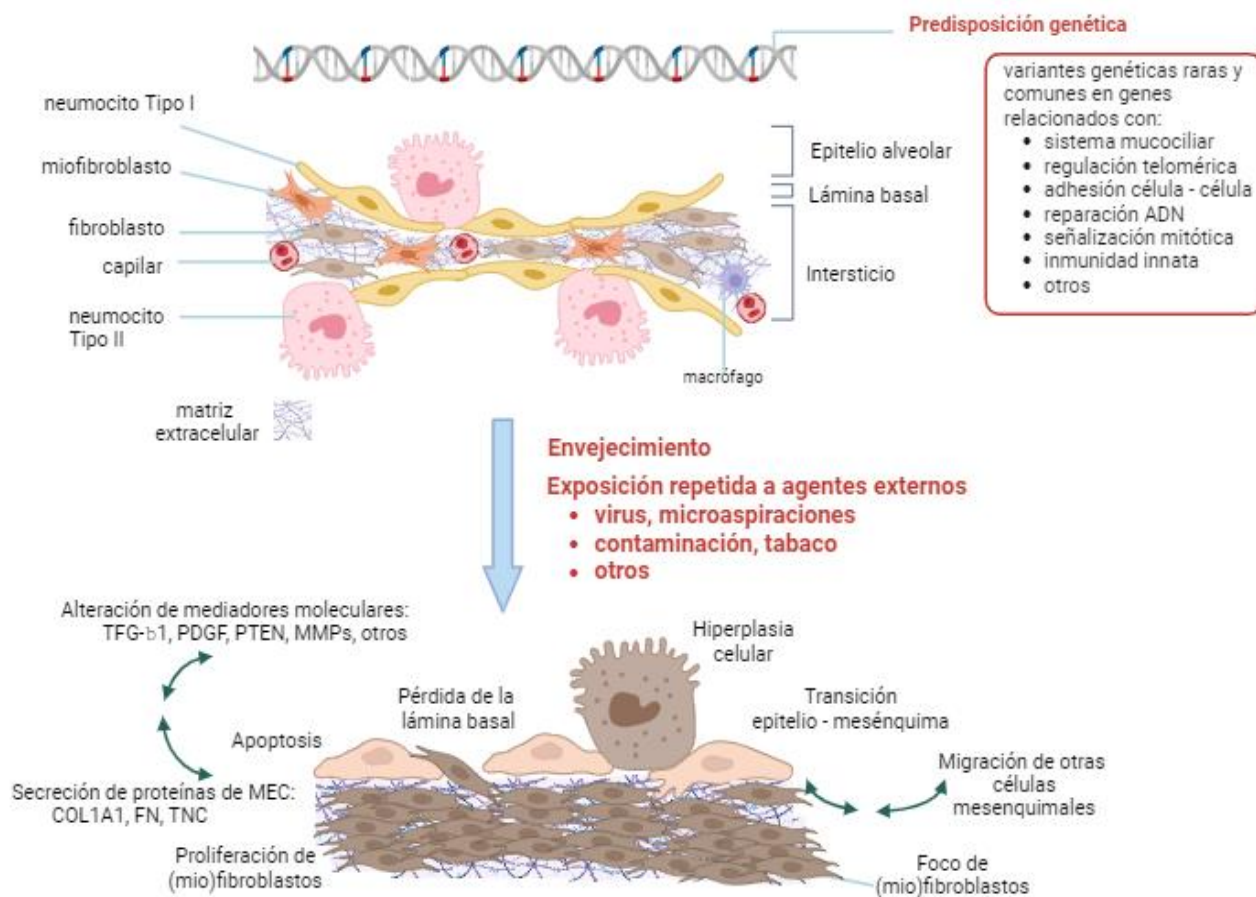


Imagen original de Lurdes Planas Cerezales

Figura 2. Hipótesis fisiopatológica del desarrollo de la FPI. En pacientes genéticamente predispuestos, con limitada capacidad celular reparativa, la exposición repetida a agentes externos dañinos provoca una respuesta aberrante del epitelio alveolar. Esto desencadena un desequilibrio entre mediadores profibróticos y antifibróticos, induciendo la activación y acúmulo de fibroblastos y miofibroblastos, la disrupción de la lámina basal y la producción exagerada de MEC. Este remodelado pulmonar caótico persiste en el tiempo, incluso en ausencia del factor dañino, provocando una fibrogénesis pulmonar irreversible y favoreciendo la progresión de la enfermedad.

Por tanto, la patogenia de la fibrosis pulmonar se enmarca en la conjunción de una arquitectura genética determinada (variantes genéticas implicadas principalmente en la integridad epitelial), una biopatología relacionada con el envejecimiento celular y molecular que dificulta la reparación, y la reprogramación epigenética [9]. En consecuencia, la compleja interacción entre la susceptibilidad genética de un individuo a la activación aberrante de las CEA y la exposición repetida a factores ambientales de riesgo conducen al desarrollo de la enfermedad [6-9].

1.2.1 Factores de riesgo

Los factores que podrían contribuir al desarrollo de la fibrosis pulmonar se han evaluado principalmente en el contexto de la FPI. Ésta es una entidad, por definición, de causa desconocida. No obstante, se han descrito los siguientes potenciales factores de riesgo (Fig. 3)^{3,6,13,18-22}:

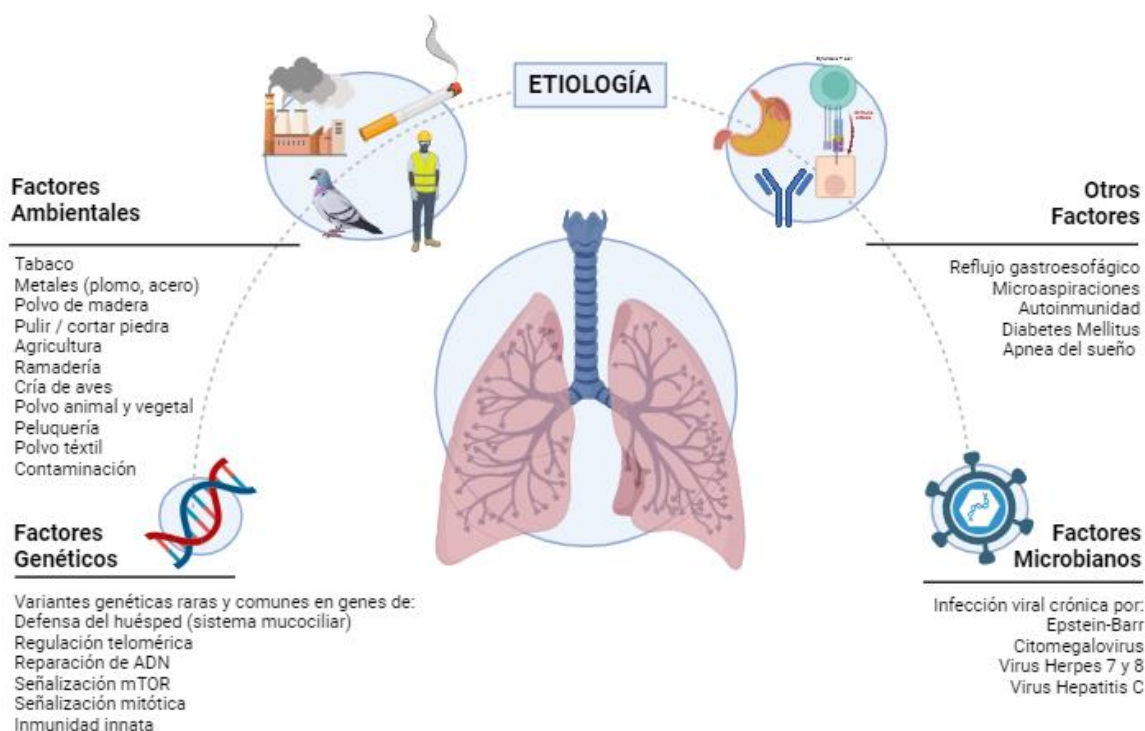


Imagen original de Lurdes Planas Cerezales

Figura 3. Factores implicados en el desarrollo de la FPI. Aunque no se conocen con exactitud los mecanismos responsables de la hiperactivación anómala de las CEA, se han sugerido diversos factores endógenos y exógenos (ambientales) capaces de desencadenar la enfermedad. La exposición ambiental u ocupacional, algunas infecciones víricas, el reflujo gastroesofágico, las microaspiraciones o el tabaco, entre otros, parecen estar implicados en el desarrollo de la FPI en individuos genéticamente predispuestos. Esto confiere el reconocimiento de enfermedad multifactorial.

Factores ambientales y ocupacionales:

El hábito tabáquico se ha asociado fuertemente con la FPI, especialmente en individuos con una dosis acumulada superior a 20 paquetes-año [3]. El riesgo de desarrollar la enfermedad es un 60% superior en fumadores, los cuales presentan la enfermedad a una edad más temprana que los no fumadores [20]. También se ha reportado un mayor riesgo de desarrollar FPI debido a la exposición inhalatoria de una amplia variedad de

factores ambientales u ocupacionales como el polvo de metales (plomo, acero, latón), polvo de madera, agricultura, ganadería, cría de aves, peluquería, entre otros [3,17,18,20,21]. Del mismo modo, algunos estudios epidemiológicos han descrito una asociación de la enfermedad con la contaminación, reportando una mayor incidencia de FPI en países más industrializados [22]. Sin embargo, estos resultados deben interpretarse con cautela debido a que dichos estudios epidemiológicos presentan sesgos y limitaciones [3].

Factores microbianos:

Múltiples estudios han evaluado el rol de la infección viral crónica en la etiopatogenia de la FPI, habiendo detectado la presencia de Citomegalovirus, Virus Herpes 7 y 8, virus Epstein-Barr y virus Hepatitis C en muestras pulmonares de pacientes [3,18,19]. Sin embargo, otros estudios también han reportado una asociación negativa [3]. Esto puede ser debido a que la evaluación de las asociaciones putativas de virus y otros microbios en la FPI presenta factores de confusión en algunos estudios, especialmente en aquellos realizados cuando la enfermedad se trataba con inmunosupresores [3,18]. Por tanto, no es posible concluir con certeza el papel de la infección en la patogenia de la enfermedad. En un futuro, el estudio del microbioma podría ser clave para entender el papel de los microorganismos en el desarrollo de la enfermedad [3,18].

Reflujo gastroesofágico (RGE):

Se hipotetiza que el RGE causa la microaspiración del contenido gástrico, tanto ácido como no ácido, provocando un daño pulmonar persistente que podría contribuir al desarrollo de FPI en individuos genéticamente predispuestos [22]. Esta teoría se fundamenta en diversos modelos animales y en la alta prevalencia de RGE en pacientes con FPI [3,18,22], siendo del 67-94% de los casos [22]. No obstante, se desconoce si los cambios en la presión intratorácica secundarios a la reducción de la distensibilidad pulmonar podrían provocar RGE, el cual a su vez podría contribuir a la progresión de la enfermedad. Los estudios sobre el tratamiento antirreflujo en pacientes con FPI han reportado resultados contradictorios. Mientras algunos estudios retrospectivos han mostrado un efecto positivo en la supervivencia y la reducción de la progresión de

enfermedad y la tos [18,22]; otros han reportado resultados negativos [18]. Por tanto, el papel del RGE en la patogenia de la FPI no puede concluirse con firmeza.

Otros factores:

La ausencia de tolerancia inmunológica en pacientes con FPI se ha sugerido tras objetivar la presencia de 1) autoanticuerpos contra una variedad de antígenos del huésped; y, 2) agregados de linfocitos compuestos por células T CD3⁺ y células B CD20⁺ en el tejido pulmonar adyacente a zonas fibrosantes activas [18,23].

Otros factores de riesgo como la diabetes mellitus [18,22] y la apnea obstructiva del sueño [18,24] también se han postulado recientemente.

1.2.2 Factores genéticos

Múltiples estudios avalan una mayor probabilidad de desarrollar fibrosis pulmonar según la composición genética del individuo [13,25-57], acreditando también el carácter heredable de la enfermedad. La primera evidencia surgió de diversos estudios familiares y con gemelos [25,26,38,43], los cuales describieron una asociación entre FPI y genes relacionados con los sistemas de defensa del huésped y del mantenimiento de la longitud de los telómeros [57].

En las familias estudiadas, se describieron inicialmente 10 genes relacionados con dichos mecanismos, representando alrededor del 25% de los genes asociados con la agregación familiar de fibrosis pulmonar [28,57]. En dichas familias, el fenotipo clínico descrito para los familiares afectados portadores de variantes genéticas fue muy amplio, incluyendo la FPI, la neumonitis por hipersensibilidad, la fibroelastosis pleuroparenquimatosa, la EPID asociada a conectivopatía o la neumonía intersticial no específica (NINE) [58-60]. A pesar de la pobre correlación entre el genotipo y el fenotipo en estos casos, *Newton CA et al.* describieron una rápida progresión fibrosante como manifestación clínica común para los portadores de variantes genéticas relacionadas con la integridad de la longitud telomérica, con independencia del diagnóstico dogmático de un tipo concreto de EPID [60].

El riesgo genético de desarrollar una forma esporádica de FPI también ha sido evaluado. Mediante *genome-wide association studies* (GWAS) se identificaron variantes genéticas

raras y comunes en genes relacionados con la defensa del huésped, el mantenimiento de la longitud de los telómeros, la adhesión célula-célula, la reparación del ADN, la señalización mitótica, la inmunidad innata, la señalización mTOR y/o las vías de señalización profibrótica, entre otras (**Tabla 1**) [44-52, 57]. De estos genes, *MUC5B* presentó la mayor asociación con la FPI, vinculándose con hasta el 30-35% del riesgo de desarrollar la enfermedad [63]. Concomitantemente, la secuenciación del exoma completo, en inglés *whole-exome sequencing* (WES), de casos de EPID asociada a artritis reumatoide (AR) también reportó variantes genéticas en vías de defensa del huésped y de regulación telomérica [63,65].

Los resultados de estos estudios apoyan la contribución de determinados factores genéticos al desarrollo de un fenotipo fibrosante pulmonar. Sin embargo, todavía no es posible calibrar el impacto de dichas variantes genéticas raras y comunes como factores desencadenantes de la enfermedad. Diversos modelos animales han evaluado su efecto biológico [66-68], sugiriendo que no causan directamente fibrosis [58]. Si no, que la variación genética aumenta la susceptibilidad individual al desarrollo de un proceso fibrosante pulmonar [58]. Los individuos adquieren dicha predisposición genética al nacimiento; pero, no todos los portadores de las variantes genéticas raras y comunes presentaran la enfermedad. Y, en caso de hacerlo, ésta se desarrollará lentamente requiriendo décadas para manifestarse [58]. Por tanto, otros factores de riesgo, anteriormente expuestos (**Fig. 3**), son fundamentales en el desarrollo de la enfermedad; y, se consideran potenciales desencadenantes de los complejos mecanismos del proceso fibrosante pulmonar en individuos genéticamente predisuestos [5-7, 58].

Esta teoría etiopatogénica determina la fibrosis pulmonar como un rasgo complejo multifactorial y poligénico [5-8,37,55] (**Fig. 4**) que, como cualquier otra enfermedad compleja, presenta interacciones gen-gen y gen-ambiente, heterogeneidad genética y otros mecanismos de control todavía desconocidos [69,70]. Por este motivo, la interpretación y la aplicación clínica de los datos genómicos es extremadamente complicada en el ámbito de la EPID y, parcialmente explica su “*heretability gap*”[42,71].

Tabla 1. Genes asociados con EPID en la edad adulta

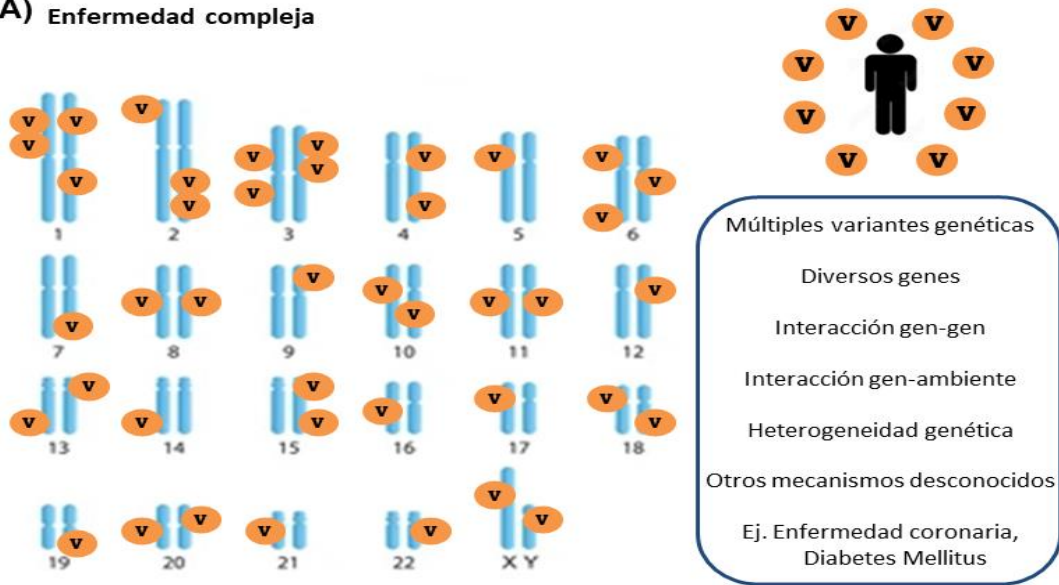
GEN	FUNCIÓN	INFORMACIÓN
GENES IDENTIFICADOS MEDIANTE GWAS		
<i>MUC5B</i>	<p>1. Aclaramiento mucociliar de vía aérea y oído medio</p> <p>2. Implicación en el tránsito del espermatozoides al útero</p> <p>3. El sistema mucociliar se ha asociado con la afectación del íleo y colon en la enfermedad de Crohn y en la colitis ulcerosa</p>	<p>1. El polimorfismo en el promotor de <i>MUC5B</i> es el factor de riesgo de mayor asociación con la FPI. Provoca un aumento de la expresión de <i>MUC5B</i> en los bronquios terminales y en las zonas de panalización.</p> <p>2. 2011: <i>Seibold et al.</i>⁵² describieron asociación entre el alelo T SNP rs35705950, reportando:</p> <p style="text-align: center;">Odds ratio para FPI</p> <p style="text-align: center;">a) heterocigotos: 9,0 (95% CI, 6,2 to 13,1)</p> <p style="text-align: center;">b) homocigotos: 21,8 (95% CI 5,1 to 93,5)</p> <p style="text-align: center;">Odds ratio para casos familiares</p> <p><i>Zhang et al.</i>⁶⁰ confirmaron los hallazgos de <i>Seibold et al.</i>⁵²</p> <p>3. 2013: <i>Hunninghake, G. M et al.</i>⁶¹ reportaron asociación entre <i>MUC5B</i> e "interstitial lung abnormalities" (ILAs), sobre todo en adultos de más de 50 años</p> <p>4. 2018: <i>Juge, P.-A et al.</i>⁶² describieron asociación entre el alelo T SNP rs35705950 con EPID- AR</p>
Otros genes asociados mediante GWAS:	Diversas:	
<i>DSP, FAM13A, ATP11A, OBFC1, TOLLIP, DPP9, MDGA2, TGFB1, SPPL2C, IL8, ELMOD2, TLR3, TP53, DEPTOR, CDKN1A, SPD1, KIF15, MAPT, MUC2, MAD1L1, ZKSCAN1, AKAP13, PSKH1, DNAJB4, HECTD2, GPR157, IVD, KANSL1, RAPGEF2, MOB2, GIPC2, FUT6, ACTRT, ARHGDI3, GMEB2, CRHR1, PKN2, PCSK6</i>	Adhesión celular	Variantes genéticas comunes con pequeño impacto en la enfermedad
	Reparación ADN	Complejas interacciones entre las variantes genéticas y los factores ambientales
	Señalización mitótica	Confieren susceptibilidad a desarrollar la enfermedad
	Señalización mTOR	Algunas de ellas asociadas con supervivencia
	Inmunidad innata	
	Señalización profibrótica	La mayoría de ellas descritas en casos esporádicos de FPI
GENES RELACIONADOS CON FIBROSIS PULMONAR CON MANIFESTACIONES SINDRÓMICAS		
<i>TERT, TERC, RTEL1, PARN, DKC1, NOP10, TIN2, ZCCHC8, ACD, NHP2, NAF1, POT1, RPA</i>	<p>Biología de los telómeros</p> <p>Reparación ADN</p> <p>Senescencia</p>	<p>Variantes genéticas raras y comunes</p> <p>Síndrome telomérico</p> <p>La fibrosis pulmonar es la principal manifestación en el adulto</p> <p>Anticipación genética</p> <p>Implicaciones pronósticas: rápida progresión de la afectación pulmonar con peor supervivencia y alta morbi-mortalidad relacionada con el trasplante, especialmente infecciones y complicaciones hematológicas</p> <p>Acortamiento telomérico</p>
<i>SFTPA1, SFTPA2, SFTPC, ABCA3</i>	Metabolismo del surfactante	<p>Variantes genéticas raras</p> <p><i>SFTPA1, SFTPA2</i>: afectación en adultos</p> <p><i>SFTPC</i>: adultos con alta frecuencia en niños</p> <p><i>ABCA3</i>: inicio enfermedad en la infancia. Raro en adultos</p> <p>Amplia variedad de afectación radiológica: vidrio deslustrado, reticulación, quistes bilaterales de tamaño variable. Afectación predominante de lóbulos superiores</p> <p>Afectación pulmonar no EPID coexiste con la afectación fibrosante pulmonar: enfisema, adenocarcinoma pulmonar</p> <p>No afectación extrapulmonar</p>

<i>HPS1, HPS4, AP3B1</i>	<p>Biogénesis de los organelos de los lisosomas</p> <p>Tráfico de proteínas a lisosomas o a organelos lisosómicos</p>	<p>Síndrome Hermansky-Pudlak (OMIM 203300, 614073, 608233)</p> <p>La afectación fibrosante pulmonar se relaciona sobre todo con <i>HPS1</i></p> <p>Afectación extrapulmonar: sobre todo albinismo y diátesis hemorrágica. Otros: colitis, pérdida de agudez visual, neutropenia, déficit inmune, cardiomiopatía y/o insuficiencia renal</p> <p>Defectos en múltiples organelos citoplasmáticos: lisosomas, granulosomas, gránulos densos plaquetarios</p>
<i>FAM111B</i>	<p>Codifica una proteína con un dominio peptidasa C-terminal involucrado en la reparación del ADN, regulación del ciclo celular y la apoptosis</p>	<p>Poiquidermia hereditaria con afectación de tendones, miopatía y fibrosis pulmonar (OMIM 615704)</p> <p>Fibrosis pulmonar progresiva de inicio en adultos jóvenes</p> <p>Infancia: poiquidermia con telangiectasias, anomalías pigmentarias, lesiones eczematosas, alopecia, hipohidrosis, afectación de tendones, debilidad muscular progresiva, disfagia, severas dificultades de movilización, o silicosis a consecuencia de las contracturas</p> <p>Síndrome COPA (OMIM 616414)</p>
<i>COPA</i>	<p>Tráfico retrógrado de proteínas desde el aparato de Golgi al retículo endoplasmático</p>	<p>Afectación autoinmune pulmonar, renal y articular</p> <p>Afectación de niños y adultos jóvenes. Inicio en la primera o segunda década de vida</p> <p>Afectación extrapulmonar: altos títulos de anticuerpos, artritis inflamatoria, daño articular y alteración renal</p> <p>Penetrancia incompleta</p>
<i>SMPD1</i>	<p>Codifica por esfingomielinasa ácida lisosomal que convierte la esfingomielina a ceramida</p>	<p>Enfermedad Niemann-Pick [o <i>Acid Sphingomyelinase Deficiency (ASMD)</i>] tipo B (OMIM 607616)</p> <p>Causada por una reducción de los niveles de la enzima lisosomal ácido esfingomielinasa, con disminución de la actividad ácido esfingomielinasa</p> <p>Afectación extrapulmonar: afectación crónica progresiva multiorgánica, especialmente progresivo hiperesplenismo, trombocitopenia, aumento del colesterol LDL y triglicéridos con disminución de colesterol HDL</p> <p>Múltiples órganos (pulmón, hígado, bazo, riñón) presentan histiocitos y células residentes espumosas</p> <p>No afectación neurológica</p>
<i>NF1</i>	<p>Codifica la neurofibromina, proteína citoplasmática que regula diversos procesos intracelulares, incluyendo la vía RAS-AMP cíclico, la cascada ERK/MAP quinasa, adenilil ciclasa y el ensamblaje del citoesqueleto</p>	<p>Neurofibromatosis tipo 1 (OMIM 162200)</p> <p>Afectación parenquimatosa del adulto: EPID, bullas</p> <p>Frecuente asociación con hipertensión pulmonar</p> <p>El 50% de los casos son de novo</p> <p>Afectación extrapulmonar: especialmente manchas café con leche, nódulos de Lisch, pecas axilares e inguinales, tumores fibromatosos de piel. Neoplasia (meningioma, neurofibrosarcoma, rabdomiosarcoma, entre otros).</p> <p>Dificultades de aprendizaje (30%), déficit intelectual (10%)</p>

Tabla original de Lurdes Planas Cerezales

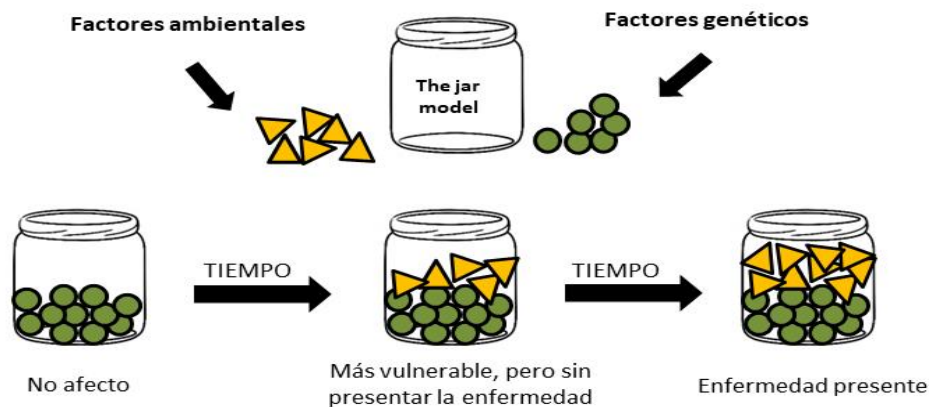
*Enfermedades sindrómicas: únicamente se incluye una breve descripción de cada una de ellas. Las enfermedades monogénicas que cursan con afectación pulmonar fibrosante de presentación en la infancia no se mencionan en esta tabla (Síndrome Cerebro-pulmón-tiroides, Enfermedad de Gaucher tipo 1, Síndrome RIDDLE, vasculopatía asociada a STING)

A) Enfermedad compleja



Modificado de National Human Genome Research Institute

B) The Jar Model



Modificado de Jehannine Austin

Imagen original de Lurdes Planas Cerezales

Figura 4. Fibrosis pulmonar como rasgo complejo. Los rasgos complejos están vehiculados por interacciones gen-gen y gen-ambiente, heterogeneidad genética y otros mecanismos [69]. Por tanto, no presentan una herencia Mendeliana [70,71]. La mayoría de las variantes identificadas solo suponen un discreto incremento del riesgo de enfermedad y explican una pequeña parte de la heredabilidad. **A)** Las interacciones de múltiples variantes en diversos genes junto con la influencia del ambiente resulta en el desarrollo de una enfermedad compleja multifactorial. Los “polygenic risk scores” en FPI han determinado su carácter altamente poligénico con centenares (o incluso miles) de potenciales variantes genéticas asociadas, la mayoría de ellas aún por identificar [46]. **B)** En los rasgos complejos, la “jarra de enfermedad” de cada individuo puede llenarse con dos tipos de factores de riesgo. La cantidad de susceptibilidad genética no cambia con el tiempo; pero los factores ambientales sí pueden incrementarse con los años o las décadas. Una vez que la “jarra de enfermedad” se llena, se desarrolla la enfermedad [72].

1.2.3 Agregación familiar

La mayor evidencia científica de la existencia de una predisposición genética a la fibrosis pulmonar es la agregación familiar de una amplia variedad de fenotipos fibrosantes pulmonares [42,73]. Aunque todavía se desconoce cómo los diferentes tipos de EPID se agrupan en las familias [74], los árboles genealógicos reportados muestran la existencia de familiares afectados de EPID en diversas generaciones sucesivas, mostrando un patrón de herencia autosómica dominante en el 80% de los casos [41]. Concomitantemente, diversos estudios reportan que al menos el 20% de los pacientes con FPI presentan un familiar de primer grado afecto de EPID [38-42], incluso si los familiares crecieron separados en medios diferentes [25,36,37,43], concluyendo que la agregación familiar es el factor de riesgo más importante para el desarrollo de la enfermedad [39,75].

En este contexto, se define la fibrosis pulmonar familiar (FPF) como la presencia de al menos 2 casos de EPID en una familia [33,36-42,73,74]. No es un concepto limitado a la FPI. Si no, que cualquier EPID de causa conocida o desconocida, puede presentarse en un contexto familiar asociada a una alteración genética [40,41,75]. Por tanto, la FPF se manifiesta en un amplio y heterogéneo espectro de presentaciones clínicas [37,41,42,60], incluso entre miembros de la misma familia [60], y con independencia de la variante genética reportada [42,60]. Aunque la neumonía intersticial usual (NIU) es el patrón radiológico y anatomopatológico predominante en muchas series de casos [37], se ha reportado la existencia de hallazgos radiológicos no característicos de EPID en muchos pacientes, lo que complica la clasificación clásica por entidades de los casos [42].

A pesar de la gran heterogeneidad, la FPF tiene 2 características comunes a todas las presentaciones clínicas: 1) una temprana edad de inicio de la enfermedad (edad media de 58-62 años según la serie) [37] con un fenómeno de anticipación genética [37,42]; y, 2) un curso clínico progresivo [42,59,76]. *Cutting CC et al.* reportaron una peor supervivencia de los casos familiares con independencia del tipo de EPID, sugiriendo la necesidad de investigar y considerar la historia familiar de fibrosis pulmonar en la estratificación de riesgo de los pacientes [77]. Por este motivo, la designación de FPF se considera una posible medida pronóstica de mayor utilidad que el diagnóstico dogmático de EPID siendo una herramienta no invasiva y rápida para sopesar los

requerimientos de una intervención asistencial temprana [77]. Las características clínicas de la FPF se resumen en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Características clínicas de la FPF

Características de la FPF	
Edad de inicio	58-62 años ³⁷
Edad de inicio en familiares	Los hijos pueden desarrollar la enfermedad antes que el caso índice (fenómeno de anticipación genética) ^{37,42}
Presentación clínica	<p>EPID idiopática o de causa conocida (más frecuente EPID fibrosantes)^{37,41,42,60}</p> <p>Pobre correlación genotipo - fenotipo</p> <p>Afectación extrapulmonar frecuente (Tabla 1)</p>
Radiología	<p>Patrón NIU 50%³⁷</p> <p>Otros patrones radiológicos No NIU⁴²</p>
Anatomía patológica	<p>Patrón predominante NIU³⁷</p> <p>Otros hallazgos menos frecuentes: NINE, neumonía organizativa, neumonitis por hipersensibilidad, sarcoidosis⁴¹</p>
Pronóstico	La historia familiar es un factor de mal pronóstico (a considerar en la estratificación del riesgo de los pacientes) ⁷⁷

Tabla original de Lurdes Planas Cerezales

Una amplia evidencia científica sugiere que tanto las formas esporádicas como familiares de EPID comparten una misma base genética [27,29,44,53-56,78], que contribuye a cambios patobiológicos comunes y a un progresivo remodelado pulmonar caótico; reflejando el espectro de la predisposición genética al desarrollo de fibrosis pulmonar [27, 78]. Aunque la escasa correlación genotipo – fenotipo no permite establecer un diagnóstico clínico individual de EPID, la identificación de una variante genética patogénica relacionada con el desarrollo de fibrosis pulmonar sí podría en

algunos pacientes y en el contexto clínico adecuado, inferir el curso clínico y una posible afectación extrapulmonar [42]. La gran heterogeneidad clínica de la FPF no incluye únicamente diversos tipos de EPID; sino que, en ocasiones, la fibrosis pulmonar puede presentarse como la afectación pulmonar de algunas enfermedades genéticas o síndromes. Éstas son enfermedades monogénicas que siguen los patrones de herencia Mendeliana y cursan con afectación de diversos órganos y sistemas (**Tabla 1**).

La afectación extrapulmonar más evaluada de la FPF es la relacionada con el síndrome telomérico, dado el valor pronóstico que la disfunción telomérica ha demostrado tener en EPID [60,79]. Además de la afectación extrapulmonar, la FPF también puede presentar de forma concomitante afectación pulmonar no fibrosante, especialmente enfisema y cáncer de pulmón, los cuales se consideran fuertes predictores de FPF [74].

En los últimos años, se han realizado grandes avances en el conocimiento de las características clínicas de la FPF y de la variación genética en EPID. Dos iniciativas internacionales y multidisciplinarias, surgidas respectivamente de la *American Fibrosis Foundation* [80] y de la *European Respiratory Society* [81], han propuesto recientemente un consenso inicial sobre el estudio genético en adultos con EPID fibrosante. Sin embargo, su implementación clínica presenta diversos retos. Entre ellos, la disponibilidad de los medios técnicos y humanos para su implementación y desarrollo, la alta especialización y tecnificación de los equipos humanos, la posibilidad de trabajo multidisciplinar con la inclusión de genetistas y asesores genéticos o equivalentes, la incertidumbre en la interpretación de los resultados de los estudios genéticos y/o la falta de infraestructura para ampliar el estudio a familiares afectados y no afectados candidatos a ello, entre otros.

1.3 Envejecimiento celular

El envejecimiento, o *aging* en inglés, se caracteriza por una pérdida progresiva de la integridad fisiológica, que conduce a un deterioro de las funciones y a una mayor vulnerabilidad a la muerte que afecta a la mayoría de los organismos vivos [17]. El aumento exponencial del conocimiento de las vías moleculares y celulares relacionadas con la vida, la muerte y la enfermedad ha despertado un enorme interés científico por los procesos responsables del envejecimiento celular. En los últimos años, su

investigación ha demostrado tener paralelismos con la investigación previa del cáncer, la cual en el año 2000 culminó con la enumeración de los seis “*hallmarks of cancer*” [82] que posteriormente se ampliaron a diez [83]. A raíz de dichos paralelismos, se estableció la actual teoría conceptual del envejecimiento celular [17].

A priori, el cáncer y el envejecimiento pueden parecer procesos opuestos, considerando que el cáncer es la ganancia aberrante de aptitud celular mientras que el envejecimiento podría considerarse como la pérdida de dicha aptitud [17]. Sin embargo, tras un mayor conocimiento de ambos procesos, el cáncer y el envejecimiento podrían compartir vías moleculares y celulares comunes [17]. Diversas investigaciones han determinado que la causa general del envejecimiento es la acumulación de daño celular en el tiempo [17, 84-86], el cual, concomitantemente, podría proporcionar ciertas ventajas aberrantes a algunas células provocando de forma eventual cáncer [17]. En este contexto, el cáncer y el envejecimiento se consideran como dos manifestaciones de un mismo proceso subyacente: la acumulación de daño celular [17]. Esta teoría conceptual se fundamenta también en la existencia de un crecimiento celular excesivo o una hiperactividad celular incontrolada en varias de las patologías asociadas con envejecimiento celular, como la arterioesclerosis [17,87].

En este marco conceptual, diversas investigaciones se han centrado en describir las vías fisiológicas que provocan el daño celular y/o intentan restablecer la homeostasis, las conexiones entre ambas vías y las posibles intervenciones exógenas capaces de atrasar el envejecimiento [17]. A este respecto, en 2013 *López-Otín C et al.* propusieron y describieron los nueve “*hallmarks of aging*” [17] (**Fig. 5**).

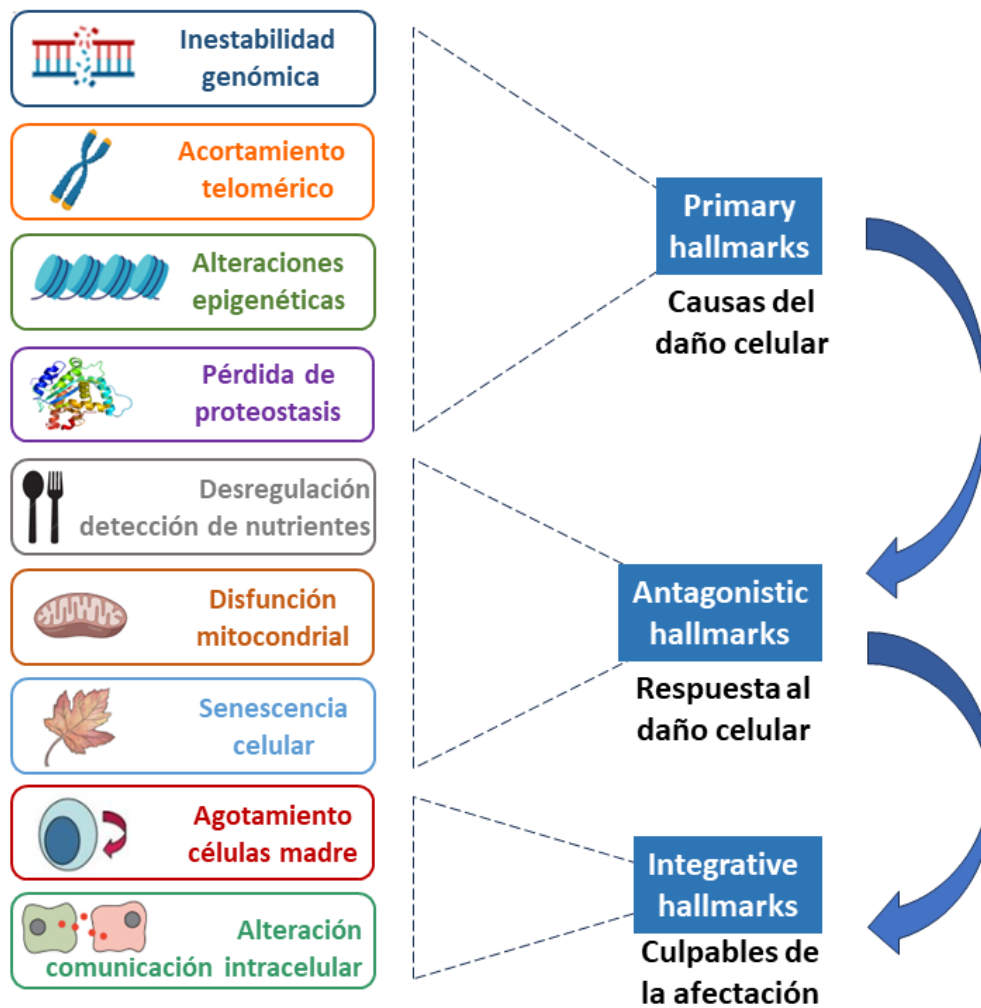


Imagen original de Lurdes Planas Cerezales

Figura 5. Hallmarks of aging. Los nueve “hallmarks of aging” se clasifican en tres categorías según las conexiones funcionales entre ellos. En primer lugar, aquellos “hallmarks” que se consideran ser la causa primaria del daño celular. En el medio, los “hallmarks” que forman parte de la respuesta compensatoria o antagonista al daño celular, que actúan inicialmente mitigando el daño. No obstante, si eventualmente se cronifican o exacerban, se convierten en mecanismos deletéreos. Finalmente, en último lugar, los “hallmarks” integrativos son el resultado de los mecanismos de las categorías anteriores, siendo los últimos responsables de la pérdida funcional asociada al envejecimiento [17].

En enero de 2023, tras una década de grandes avances en el conocimiento de los mecanismos responsables del envejecimiento, López-Otín C et al. actualizaron los

“hallmarks of aging” añadiendo tres nuevos: alteración de la macroautofagia, la inflamación crónica y la disbiosis [88].

1.3.1 Longitud telomérica como biomarcador de envejecimiento celular

Durante las últimas décadas, la longitud telomérica se ha considerado como uno de los mejores biomarcadores de envejecimiento celular [88,89]. La *American Federation for Aging Research* (AFAR) establece que los cuatro criterios que un buen biomarcador de envejecimiento celular debe cumplir son [90]:

1. predecir la esperanza de vida restante mejor que la edad cronológica
2. monitorización de los mecanismos subyacentes al proceso de envejecimiento, pero no de una enfermedad específica
3. ser susceptible de pruebas repetidas no dañinas para el individuo, y
4. ser testable tanto en animales de laboratorio como en humanos

En base a esto, a continuación, se detalla el valor de la longitud telomérica como biomarcador de envejecimiento argumentando las razones a favor y en contra, así como también las controversias actuales según la evidencia científica disponible.

Razones a favor:

La longitud telomérica (LT) presenta diversas propiedades que la hacen adecuada para ser utilizada como biomarcador de envejecimiento. En primer lugar, satisface los criterios 3 y 4 de la AFAR, puesto que su estudio puede realizarse tanto en animales como en humanos, siendo mínimamente invasivo.

En segundo lugar, una sólida evidencia científica establece que los telómeros reducen progresivamente su longitud con la edad de forma fisiológica estableciendo una correlación inversa entre LT y la edad cronológica a lo largo de todo el curso de la vida [88, 89, 91,92]. La reducción crítica de la LT desencadena lo que se ha denominado senescencia replicativa, la cual se considera un mecanismo de señalización de estrés o daño al ADN que protege la integridad del genoma y previene la replicación de células

que podrían albergar alteraciones genéticas [92]. En combinación con otros “*hallmarks of aging*”, la estabilidad genómica podría verse alterada como parte de un proceso de envejecimiento fisiológico dando lugar a un mayor riesgo de enfermedades como el cáncer, la hipertensión, la arterioesclerosis, la cirrosis hepática, la fibrosis pulmonar y la enfermedad cardiovascular entre otras patologías de mayor incidencia en la edad avanzada, en las que se ha reportado acortamiento telomérico (AT) [92, 93-95]. Estas asociaciones sugieren el poder del AT como predictor de enfermedad [89].

En tercer lugar, aunque la LT es parcialmente heredable [96,97], una pérdida acelerada de LT puede ocurrir a consecuencia de factores ambientales y exposiciones como el tabaco, la contaminación, la dieta, el ejercicio o el estrés [92,98-100]; los cuales también contribuyen al desarrollo de enfermedades por envejecimiento como la obesidad, la diabetes mellitus o la enfermedad neurodegenerativa [92, 100-103]. Esto demuestra la gran capacidad de respuesta que tiene la LT tanto a exposiciones adversas como beneficiosas [89].

En cuarto lugar, diversos estudios epidemiológicos han reportado una asociación significativa entre AT, envejecimiento y varios resultados biológicos en términos de morbilidad y mortalidad [88,104,105]. Como ejemplos, *Montiel Rojas D et al.* concluyeron que el AT es un factor de riesgo independiente para el deterioro funcional en las poblaciones europeas de edad avanzada [106]; mientras que *Cawthon RM et al.* reportaron asociación entre AT y una menor supervivencia en individuos de más de 60 años debida a enfermedad cardiovascular o infecciones, sugiriendo la contribución del AT a la mortalidad de muchas de las enfermedades relacionadas con envejecimiento [107].

Finalmente, una de las mayores evidencias sobre el papel de la LT como biomarcador de envejecimiento proviene de algunas enfermedades hereditarias monogénicas que muestran signos de envejecimiento prematuro y que se correlacionan con una LT mucho más reducida que controles sanos de la misma edad [88,108,109]. Estas patologías se han denominado trastornos del espectro telomérico o telomeropatías [88,108,110] y sus síntomas y edades de presentación son muy variables. Sin embargo, comparten mecanismos moleculares heredados genéticamente vinculados con la biología de los

telómeros, presentando fenotipos superpuestos de penetrancia incompleta [88,108,110].

Razones en contra y controversias:

A pesar de las propiedades expuestas, también existe una evidencia científica que cuestiona el papel de la LT como biomarcador de envejecimiento al no cumplir estrictamente los criterios 1 y 2 de la AFAR [88,89,91].

En primer lugar, aunque los modelos *in vitro* e *in vivo* aportan una sólida evidencia científica de que la LT es un reflejo del nivel de senescencia celular y del estrés oxidativo, los estudios epidemiológicos y clínicos son menos concluyentes [88,89,91]. Las asociaciones del AT con el envejecimiento y los resultados biológicos en términos de morbilidad y mortalidad, se han realizado en base a estudios epidemiológicos con criterios de inclusión heterogéneos y enfoques metodológicos y estadísticos muy diversos con resultados no comparables [88,89,91] e, incluso, contradictorios [111-112]. Los estudios animales y sus resultados sobre el impacto del AT en la salud del organismo no son extrapolables a humanos, puesto que la LT es altamente específica de cada especie y las manifestaciones de los modelos animales no son congruentes con un envejecimiento humano normal [91].

En segundo lugar, recientes estudios han sugerido que la LT no sería un buen marcador clínico de envejecimiento funcional en poblaciones de edad avanzada, pero sí podría ser un factor clave en estudios longitudinales centrados en poblaciones jóvenes o de mediana edad [113]. Puesto que las trayectorias del envejecimiento comienzan a divergir en la edad adulta temprana [114], es importante tener en cuenta 1) la posible contribución de la tasa de AT de cada célula y tejido al resto de "*hallmarks of aging*", y 2) la posibilidad de que la LT sea solo un buen biomarcador de envejecimiento de un tejido específico y no del organismo completo [88,89,91]. Aunque los telómeros se acortan con la edad, cada tipo celular tiene una tasa de AT distinta y, por tanto, existen diferentes tasas de envejecimiento de tejidos y órganos en un mismo individuo [88].

Finalmente, el fenómeno del AT relacionado con la edad es extremadamente complejo y muchos de los mecanismos biológicos subyacentes a este proceso todavía no se conocen con exactitud. Existe un gran debate sobre si el AT se comporta como un reloj

mitótico celular o bien como un biomarcador de estrés; o, si forma parte de un mecanismo de transducción de señales de estrés a la célula [89].

En base a lo expuesto, existe una disconformidad sobre el valor de la LT como herramienta para evaluar el grado de envejecimiento de las poblaciones humanas. Y, en ausencia de ensayos clínicos aleatorizados, la relación causal entre LT y capacidad funcional de un individuo durante el envejecimiento sigue siendo motivo de estudio [88,89,91]. En un futuro, importantes cuestiones sobre la tasa normal de AT en humanos y su variación, la medida de LT más relevante biológicamente (LT promedio o la más corta), los factores que pueden acelerar el AT, los factores que pueden mejorar la LT, y el valor predictivo de la tasa de AT para una edad específica y unos resultados de salud concretos, entre otras, deberían ser abordadas. Por este motivo, son necesarios estudios longitudinales de medición de la LT a lo largo de décadas y en poblaciones bien caracterizadas social, médica y biológicamente. Así mismo, los estudios de pacientes centenarios o con síndromes progeroides también podrían ser de gran interés científico [91].

Papel actual de la LT en el envejecimiento celular:

La marcada heterogeneidad de estados de salud observados en individuos de edad avanzada sugiere que, aunque la edad cronológica es un factor de riesgo importante para el deterioro funcional, la edad biológica puede predecir con más exactitud el grado de envejecimiento de un individuo [88,115]. Actualmente, la LT es el predictor de edad biológica más investigado, aunque nuevos predictores como el reloj epigenético están emergiendo.

Una creciente evidencia científica sugiere que diversos predictores de edad biológica pueden reflejar diferentes aspectos del proceso de envejecimiento, reportando vínculos entre algunos de ellos [88,116]. Un ejemplo son los cambios epigenéticos y de expresión génica asociados al AT progresivo [117]. En este escenario, la comunidad científica considera que la combinación de diversos predictores de edad biológica puede ayudar a comprender los complejos mecanismos responsables del envejecimiento y estimar trayectorias individuales de senectud [88,118,119].

Por este motivo, la LT se utiliza cada vez más como un potencial biomarcador en la medicina personalizada [89,104]. A pesar de los efectos pleiotrópicos de los telómeros y de que la tasa de AT, entre otros aspectos, todavía no se conocen con exactitud, la comunidad científico-médica está realizando un gran esfuerzo para poder dar un significado clínico a los valores de LT que permita su uso asistencial. Concretamente, determinar la edad biológica de un individuo para predecir su riesgo de mortalidad y estratificar el riesgo de los pacientes en grupos con diferentes requerimientos asistenciales [104]. Sin embargo, la transferencia del conocimiento molecular de la biología de los telómeros y del envejecimiento a la práctica clínica se ve obstaculizada por una serie de factores biológicos y técnicos, que se detallaran en los siguientes apartados.

1.4 Telómeros, telomerasa y telomeropatías

En 1938, el genetista norteamericano Hermann Joseph Muller acuñó el término “telómero” del griego “telos” (fin) y “meros” (parte). Sus investigaciones con moscas de la especie *Drosophila melanogaster* expuestas a rayos X, evidenciaron que los extremos de los cromosomas irradiados, a diferencia del resto de material genético, no presentaban deleciones o inversiones gracias a la presencia de un casquete protector: el “gen terminal” o “telómero” [120].

A pesar de la importancia de dicho descubrimiento, el gran escepticismo de la época hacia la genética provocó el cese de las investigaciones. Fueron reanudadas 30 años más tarde cuando se empezó a desvelar el proceso de replicación del ADN. James Watson, descubridor de la estructura en doble hélice, identificó el llamado “problema de la replicación terminal”. Según este y debido a las especiales características del proceso replicativo, el extremo 3' no podía ser completamente replicado por la DNA polimerasa provocando un acortamiento de los cromosomas. Tras esto, un desconocido investigador ruso, Alexsei Matveevich Olovnikov, evidenció la vinculación entre “el problema de la replicación terminal” y la senescencia celular, descrita previamente por Leonard Hayflick. Según Olovnikov, el problema de la replicación terminal era la causa del acortamiento progresivo de los telómeros, determinando así el número de divisiones que una célula podía llevar a cabo antes de detener su ciclo celular. El modelo de

Olovnikov postulaba que los telómeros actuaban como un reloj molecular capaz de controlar el proceso de envejecimiento [120]. Por tanto, Olovnikov fue el primer investigador que identificó el problema del acortamiento telomérico y planteó la hipótesis del envejecimiento celular a partir de éste.

Concomitantemente, tanto Olovnikov como Watson sugerían la existencia de un mecanismo celular capaz de mantener la longitud telomérica durante la replicación normal del ADN. Unos años más tarde, en la década de los 70, se descubrió esa estrategia celular: la telomerasa. Elizabeth Blackburn jugó un papel crucial en ese descubrimiento. Sus investigaciones con Joseph Gall centradas en *Tetrahymena thermophila*, un protozoo ciliado; y, posteriormente, con Jack Szostak utilizando la levadura como vector, llevaron al descubrimiento de las secuencias teloméricas y de la enzima que las sintetiza. Blackburn y Szostak sugirieron que la elongación de los telómeros se debía a la actividad de una enzima desconocida que sintetizaba telómero, después llamada telomerasa [120].

A pesar del gran avance en el conocimiento sobre la biología de los telómeros, los resultados probados de las diversas investigaciones entraban en contradicción. Por un lado, se había demostrado la existencia de acortamiento telomérico tras cada división celular; y, por el otro, se había descubierto la replicación telomérica. Esta contradicción obtuvo respuesta tras las investigaciones que Elizabeth Blackburn llevó a cabo con su estudiante Carol Greider en los años 80. Ambas determinaron que el proceso de replicación telomérica tiene lugar de forma independiente al resto del ADN cromosómico mediante un proceso de transcripción inversa realizado por la enzima telomerasa. Además, también describieron las diferentes subunidades que esta enzima posee y los tipos celulares donde expresa su actividad [120]. Debido a estos descubrimientos, Elizabeth Blackburn, Jack Szostak y Carol Greider recibieron el Premio Nobel de Medicina en el año 2009.

1.4.1 Estructura y estabilización telomérica

Los telómeros son estructuras nucleoproteicas muy especializadas formadas por la repetición en tándem de los nucleótidos TTAGGG, siendo ADN no codificante [121] (Fig. 6).

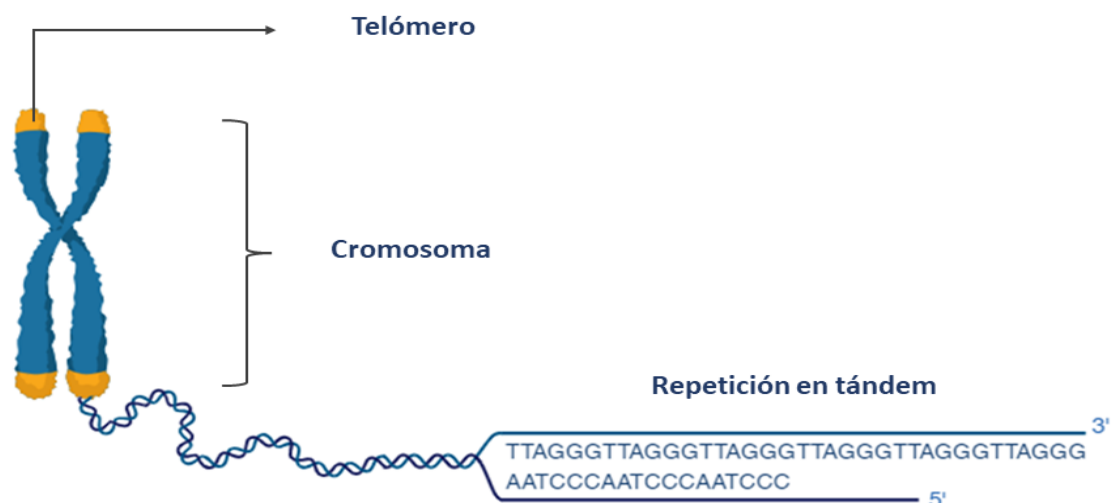


Imagen original de Lurdes Planas Cereales

Figura 6. Telómero Estructura nucleoproteica de ADN no codificante formada por la repetición en tándem de los nucleótidos TTAGGG.

Estas regiones cromosómicas repetitivas tienen una longitud variable entre diferentes organismos y tipos celulares de un mismo organismo [121,122]. En humanos, los telómeros tienen una longitud media de 8-14kb en células de sangre periférica en recién nacidos. Sin embargo, puesto que su tamaño disminuye con la edad, la longitud telomérica media para un individuo de 90 años es de 3-7kb. En cambio, la mayoría de ratones utilizados en investigación tienen unos telómeros con longitud media de 50-100kb. Estas diferencias dificultan mucho el desarrollo de modelos animales para el estudio de las alteraciones teloméricas [121].

Los extremos de los telómeros no están formados por ADN bicatenario. En realidad, la cadena 3' es aproximadamente 75-300 bases más larga que la cadena terminal 5' formando un fragmento de ADN monocatenario sobresaliente. Este fragmento sobresaliente contiene la secuencia TTAGGG y se conoce como la "G-rich strand". Su cadena complementaria contiene la secuencia complementaria CCCTAA, denominada "C-rich strand". La cadena sobresaliente envuelve el ADN telomérico interactuando con él para formar el llamado "T-loop". Como resultado de este bucle, se genera una región de ADN telomérico de triple cadena, conocida como "D-loop", imprescindible para la estabilización de la región terminal de ADN telomérico [121] (Fig. 7).

Los telómeros se estabilizan aún más por la presencia de un complejo proteico muy específico que se asocia al ADN telomérico. Este complejo recibe el nombre de “*shelterin complex*” y está formado por 6 diferentes proteínas: TRF1, TRF2, TIN2, RAP1, TPP1 y POT1 (**Fig. 7**). Por diversos mecanismos, todas ellas son necesarias no solamente para mantener la estructura y la función de los telómeros, sino también para evitar que el ADN telomérico sea reconocido como ADN dañado [121,123]. Adicionalmente, tanto los telómeros como las regiones subtelo méricas están enriquecidas en componentes de heterocromatina, tales como histonas y proteínas HP1 [121,123]. Esto no solamente favorece la estabilidad del telómero; sino también un nivel superior de control para su estructura y longitud [123] mediante la regulación de la actividad telomerasa y de la expresión de diferentes genes [92].

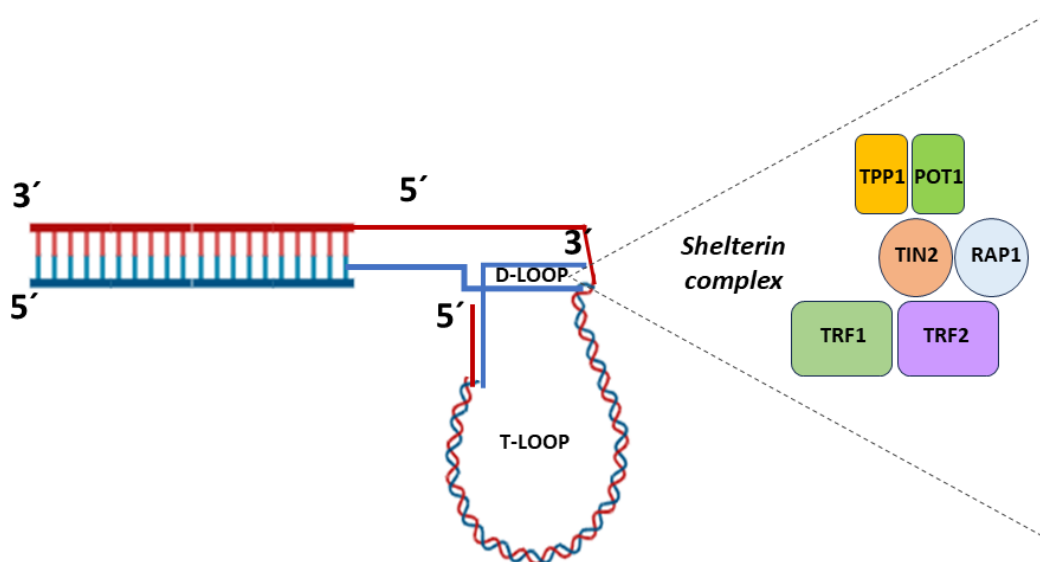


Imagen original de Lurdes Planas Cerezales

Figura 7. Estructura de los extremos de los telómeros Esta estructura previene que el extremo del telómero sea reconocido como un punto de rotura del ADN por parte de los mecanismos de reparación del mismo. El “complejo shelterina” está formado por 6 proteínas: TRF1 se une al ADN telomérico de doble cadena como un dímero junto con TRF2. TIN2 interactúa con TRF1 y TRF2, reclutando al heterodímero POT1/TPP1. POT1 se une con alta afinidad al fragmento “G-rich”. TRF2 interacciona también con RAP1, uniéndola al complejo. Además, los telómeros y las regiones subtelo méricas están enriquecidos en componentes de heterocromatina, incluida la asociación de proteínas HP1 y la trimetilación de la histona 3 lisina 9 y la histona 4 lisina 20, lo que contribuye aún más a su estabilidad [121].

Esta compleja estructura terminal telomérica se encarga de las siguientes funciones:

- proteger la integridad del genoma mediante el mantenimiento de la estabilidad cromosómica. Previene la fusión y la recombinación de los cromosomas y la degradación de los nucleótidos por parte de los mecanismos de reparación del ADN
- asegurar la correcta segregación cromosómica durante la mitosis
- regular la expresión génica mediante el silenciamiento transcripcional de genes cercanos al telómero, llamados TPE (*telomere position effect*), o de otros situados a gran distancia, llamados TPE-OLD (*telomere position effect over long distances*).

Estas funciones de control superior se regulan de forma estricta y dependen de una longitud mínima de repeticiones teloméricas, de la conformación “T-loop” y de la correcta funcionalidad del complejo “shelterina” [92].

1.4.2 Telomerasa y replicación telomérica

En mamíferos, el extremo 3´ del ADN telomérico se alarga mediante el complejo telomerasa a través de un proceso de transcripción inversa. Este complejo enzimático está formado por varias proteínas o subunidades [121] (**Fig. 8**):

- TERT o hTERT (telomerasa transcriptasa inversa): subunidad catalítica de la enzima
- TERC (RNA telomerasa codificada por el gen TERC): subunidad de ácido ribonucleico (ARN) de 454 nucleótidos de longitud utilizada como “*template*” o modelo. Contiene la región complementaria de ARN a la repetición TTAGGG que permite la hibridación al extremo 3´del ADN telomérico. En la síntesis de esta subunidad es necesaria otra enzima: PARN (*Poly(A)-specific ribonuclease*).
- Proteínas estabilizadoras necesarias para el ensamblaje y estabilidad del complejo telomerasa: *dyskerin protein* (codificada por el gen DKC1), NHP2, NOP10 y TCBA1, entre otras.

- Proteínas facilitadoras de la síntesis de DNA telomérico: RTEL1 (regulador de la longitud telomérica) una DNA-helicasa encargada de desplegar el *T-loop*, entre otras

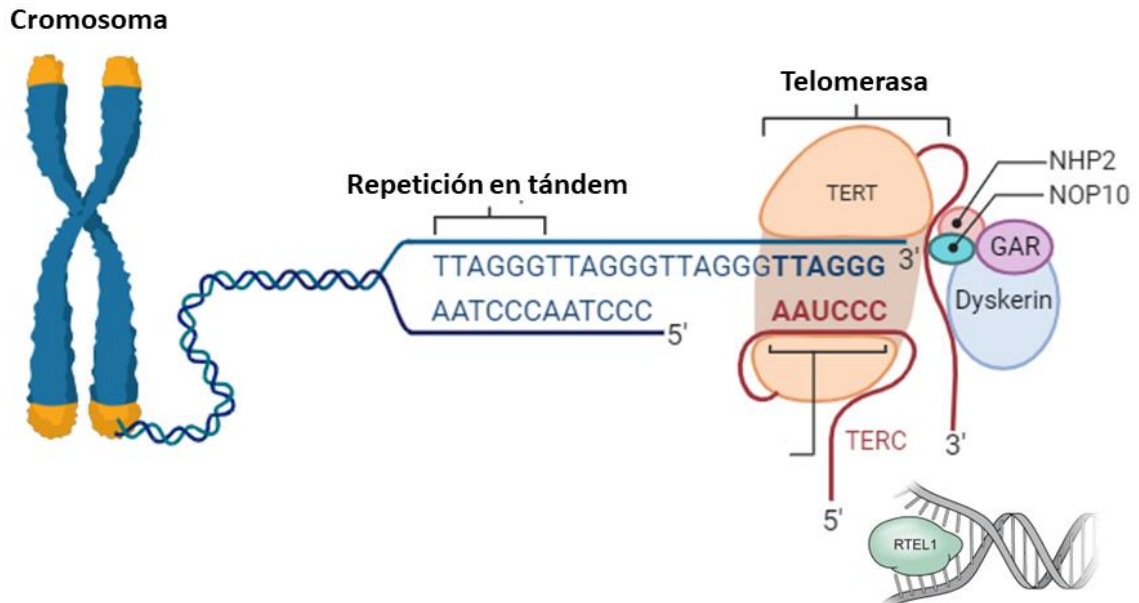


Imagen original de Lurdes Planas Cereales

Figura 8. Componentes de la telomerasa Este complejo enzimático es una ADN polimerasa dependiente de ARN, es decir que puede producir ADN a partir de un molde de ARN mediante un proceso de transcripción inversa. Es responsable del mantenimiento de la longitud de los telómeros mediante la adición sucesiva de secuencias específicas de ADN ricas en el nucleótido guanina (TTAGGG) en el extremo 3' de las cadenas de ADN de los telómeros, situados en los extremos de los cromosomas eucariotas.

La replicación del ADN telomérico requiere de maquinaria enzimática específica, el complejo telomerasa, y de un mecanismo de replicación independiente al resto del material genético. Esto es debido al problema de replicación final del ADN, el cual provoca un acortamiento telomérico de entre 50 y 100 nucleótidos en cada ciclo de replicación y, por lo tanto, en cada división celular [121]. En mamíferos, el extremo final 3' del telómero se alarga gracias a la actividad del complejo telomerasa mediante transcripción inversa [121]. La subunidad catalítica del complejo telomerasa, TERT, se une a TERC, un molde de ARN complementario a la repetición telomérica. Así, TERT añade nucleótidos en dirección 5'-3' utilizando como molde la secuencia de ARN de TERC. Una vez completada la secuencia de ADN complementaria al ARN rica en guaninas,

la secuencia complementaria rica en citosinas se sintetiza a partir de una actividad DNA polimerasa. Tras la secuenciación de ambas cadenas de ADN telomérico, diversas proteínas con actividad helicasa son necesarias para facilitar la elongación telomérica mediante la alteración de la doble cadena de ADN. De esta forma, el complejo telomerasa avanza y repite el mismo mecanismo construyendo el telómero de forma discontinua. Tras sucesivos ciclos de extensión, se genera un extremo 3' más largo que el 5', a partir del cual se sintetizará la cadena retardada mediante la ADN polimerasa. De esta forma, se genera la estructura bicatenaria del telómero [121].

La estructura, estabilidad y replicación teloméricas resultan procesos interconectados que se regulan unos a otros mediante los componentes explicados [121].

1.4.3 Actividad telomerasa, longitud telomérica y envejecimiento

La actividad telomerasa se subordina a la expresión del gen *TERT*, la cual es tejido dependiente, y se supedita a diversas interacciones proteína-proteína que regulan el ensamblaje del complejo proteico y su reclutamiento en los telómeros. Los componentes de la telomerasa, y en particular *TERT*, se expresan a un alto nivel durante el desarrollo embrionario para permitir la alta tasa de proliferación celular existente durante ese periodo. Sin embargo, una vez finalizada esa etapa, la expresión de *TERT* se produce únicamente en las células de la línea germinal y células madre, especialmente en aquellas que presentan una alta tasa de recambio celular como la médula ósea, entre otras. Para el resto de las células humanas adultas, la expresión de *TERT* es baja o está reprimida, por lo que sus telómeros se acortan progresivamente tras cada división celular [121].

Cuando el telómero alcanza una longitud crítica, probablemente cuando el “*T-loop*” no se puede mantener [92], la célula lo identifica como ADN dañado y activa una respuesta celular que provoca el arresto del ciclo celular. La prolongación en el tiempo de este arresto inducirá finalmente la senescencia celular y posterior muerte celular por apoptosis (**Fig. 9**). La mayoría de las células madre específicas de un tejido no expresan suficiente *TERT* que permita replicar los telómeros tras cada división celular; por lo que, su capacidad proliferativa disminuye con la edad. Con el tiempo, el agotamiento de las

células madre impide la renovación de los tejidos. Por este motivo, el AT se ha reconocido como uno de los “hallmarks” del envejecimiento [17,88,121,123].

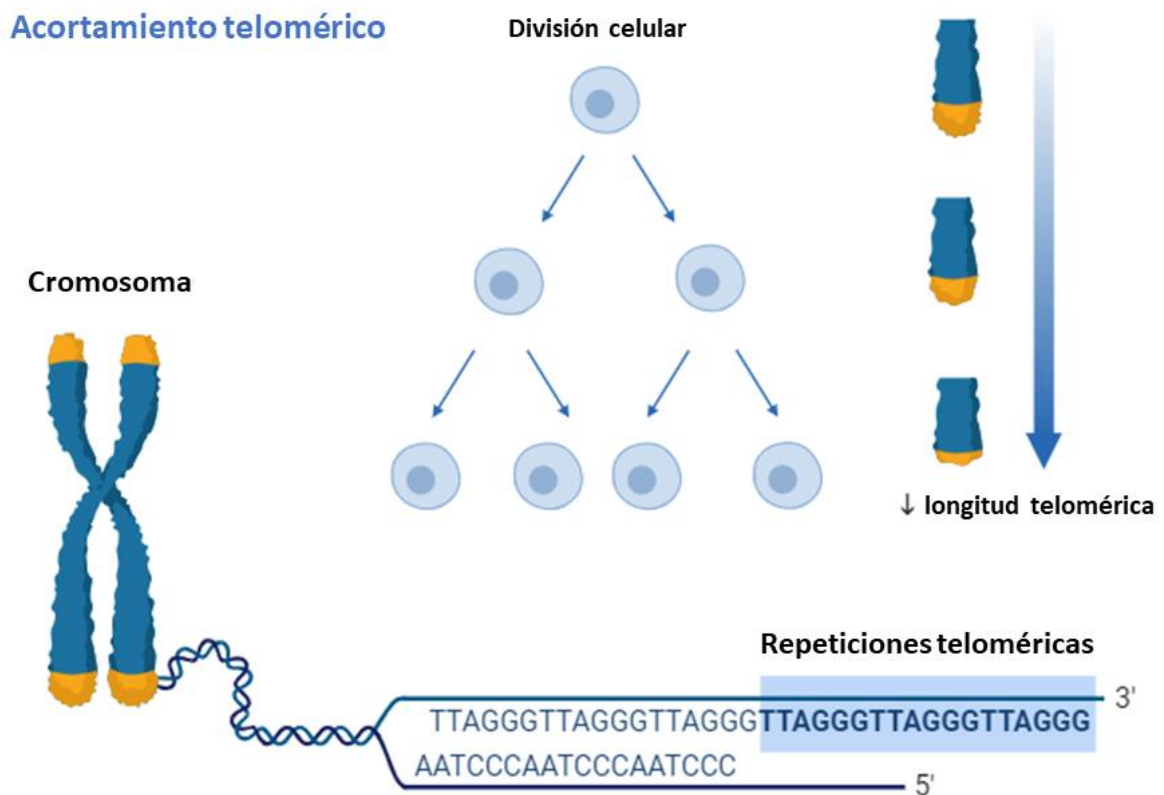


Imagen original de Lurdes Planas Cerezales

Figura 9. Acortamiento telomérico Este proceso puede ocurrir de forma fisiológica con la edad. Sin embargo, diversos factores genéticos, epigenéticos, ambientales y de comportamiento humano pueden impactar en la longitud telomérica, acelerando el AT y contribuyendo al desarrollo de enfermedades por envejecimiento.

En este contexto, las sucesivas divisiones de una célula comportan una pérdida de la viabilidad celular que, junto con el AT, contribuyen a la aparición de enfermedades degenerativas durante el proceso fisiológico de envejecimiento humano. Son ejemplos de esto la infertilidad, la reducción de la viabilidad de las células madre, la reducción del potencial angiogénico, la mala cicatrización de heridas o la arterioesclerosis, entre otros. En este proceso de envejecimiento fisiológico también participan una amplia variedad de factores medioambientales y exposiciones, tales como la contaminación, el tabaco, la dieta, el ejercicio o el estrés. Estos factores pueden acelerar el acortamiento

telomérico y, por tanto, pueden contribuir a la aparición de enfermedades por envejecimiento tales como la diabetes o las patologías neurodegenerativas [92].

Sin embargo, varios síndromes de envejecimiento prematuro muestran un AT acelerado que comporta la aparición de patología degenerativa a una edad más temprana. Este sería el caso de la Ataxia telangiectasia, la Disqueratosis Congénita o el Síndrome de Werner, entre [123]. Estos y otros ejemplos de enfermedades hereditarias monogénicas, con signos de envejecimiento prematuro, presentan una longitud telomérica mucho menor que controles sanos de su misma edad [92].

1.4.4 Telomeropatías primarias y secundarias

Las enfermedades genéticas hereditarias con alteración telomérica (variantes genéticas en genes que codifican para proteínas del complejo telomerasa y/o AT) reciben el nombre de *Telomeropatías*. Este gran grupo de patologías tienen una edad de presentación y una sintomatología muy variable; pero comparten algunas alteraciones genéticas y, por tanto, pueden presentar fenotipos superpuestos con penetrancia incompleta y expresividad variable [92,108,110,123].

Telomeropatías primarias

También se conocen como “*telomere disorders*” o “*telomere maintenance syndromes*”. Se caracterizan por la presencia de variantes genéticas en los genes encargados de mantener la longitud telomérica. La edad de presentación es muy variable y tienen un amplio espectro de síntomas que pueden solaparse. Sin embargo, comparten similares mecanismos moleculares subyacentes; por lo que a menudo presentan una penetrancia variable. Por este motivo, individuos de una misma familia con la misma variante genética pueden presentar fenotipos diferentes.

Concomitantemente, debido a que la heredabilidad de la longitud telomérica puede producir anticipación genética, los individuos con telomeropatías primarias presentan riesgo de enfermedad a una edad más temprana que los casos con alteraciones genéticas en la telomerasa y longitud telomérica normal. Por tanto, el AT heredado puede conducir a una depleción temprana de células madre y/o a la acumulación de

células senescentes; y, así desarrollar una enfermedad a una edad más temprana [92,108,124].

Las primeras investigaciones realizadas en este campo provienen del estudio de enfermedades monogénicas raras de presentación infantil. Sin embargo, actualmente abarcan enfermedades comunes que se manifiestan en la edad adulta. A pesar de la gran variabilidad de fenotipos y enfermedades, el defecto en la longitud telomérica es común a todas ellas. Por este motivo, la agrupación de estas patologías en un mismo síndrome, el síndrome telomérico (**Fig. 10**), es crucial para la toma de decisiones clínicas. Dado que la alteración telomérica en los individuos afectados está presente en sus células madre, la afectación simultánea de varios órganos puede coexistir aunque predomine una enfermedad en concreto [92,108,110,124].

Telomeropatías primarias de la infancia

La primera enfermedad que se relacionó con una mutación de la telomerasa fue la Disqueratosis Congénita (DC) [92,108,124]. Inicialmente, se identificó una variante genética en *DKC1*, gen que codifica para la proteína diskarina. Sin embargo, estos pacientes también pueden presentar variantes genéticas en *TERC*, *TERT*, *TRF1*, *TRF2*, *TINF2*, *NOP10*, entre otros [92,108,124]. Las manifestaciones clínicas características son la hiperpigmentación cutánea, la leucoplasia oral y la distrofia ungueal. La mayoría de pacientes no recibe atención médica hasta la aparición de fallo medular (aplasia medular o linfopenia), fibrosis pulmonar o cáncer; siendo éstas las principales causas de muerte. Otras manifestaciones menos frecuentes son enfisema pulmonar, baja estatura, cirrosis hepática, osteoporosis, abundantes caries dentales y pérdida de pelo. Algunos pacientes presentan efectos secundarios tras trasplante de médula ósea en forma de toxicidad pulmonar y posterior fibrosis [92].

La DC presenta una superposición clínica y genética con el Síndrome de Hoyeraal-Hreidersson, Síndrome de Coats Plus, Síndrome Revesz, entre otros [92,108,124]. Estas manifestaciones clínicas similares se describieron antes de evidenciar que compartían un mismo defecto genético; y, probablemente por ese motivo, su nomenclatura es diferente [108].

Telomeropatías primarias de la edad adulta

En la edad adulta, las alteraciones teloméricas más frecuentes son las variantes genéticas en *TERT* o *TERC*. Su mayor prevalencia se encuentra en individuos afectados de FPI, siendo del 8-15% en casos familiares y del 1-3% en casos esporádicos [108]. Otras variantes genéticas en *PARN* o *RTEL1* también han sido identificadas en estos pacientes. Respecto al AT, aproximadamente el 37% de los casos familiares y el 25% de los esporádicos presenta una longitud telomérica inferior al percentil 10 [92]. En casos familiares, se ha reportado un patrón de herencia autosómica dominante en el 80% de las familias afectas con una penetrancia dependiente de la edad [92,108,124]. Por tanto, los pacientes portadores de variantes genéticas en genes del complejo telomerasa pueden presentar afectación fibrosante pulmonar, especialmente FPI, desde la juventud hasta la vejez; siendo ésta la telomeropatía primaria más frecuente en la edad adulta [92,108,124].

Otras telomeropatías primarias de la edad adulta son la cirrosis hepática, la anemia aplásica o la leucemia mieloide aguda [92,108,124]. Tanto la fibrosis pulmonar como la anemia aplásica y/o la cirrosis hepática pueden presentarse en un mismo paciente, pero en diferentes momentos de su evolución vital. Esto demuestra que el acortamiento telomérico induce disfunción celular en varios tejidos, incluso cuando los pacientes presentan afectación predominante de un órgano [92].

Síndrome telomérico

Dado que todas las telomeropatías primarias presentan un defecto subyacente común, se ha postulado la idoneidad de agruparlas dentro de un mismo síndrome clínico (**Fig. 10**). El fenotipo de las alteraciones teloméricas es muy heterogéneo, por lo que la impresión inicial podría ser que el AT produce casos aislados de FPI, anemia aplásica o DC, entre otras. Sin embargo, los individuos afectados presentan con frecuencia afectación subclínica concomitante en varios órganos, incluso cuando los síntomas predominantes se deben a la afectación de un solo tejido. Por ejemplo, los pacientes con FPI portadores de variantes genéticas en el complejo telomerasa tienen mayor riesgo de desarrollar anemia aplásica o cirrosis hepática. Del mismo modo, los individuos con anemia aplásica y alteraciones teloméricas presentan una mayor incidencia de fibrosis pulmonar tras la

exposición a fármacos tóxicos pulmonares utilizados tras el trasplante medular, incluso sin sintomatología respiratoria previa [108,124]. Por este motivo, la concurrencia de FPI y anemia aplásica, junto con cirrosis hepática, es específica y altamente predictiva de un defecto telomérico [108].

Por otro lado, tras un análisis exhaustivo del órgano afecto, se podría concluir erróneamente que su alteración es de carácter autoinmune, a pesar de su falta de respuesta al tratamiento inmunosupresor. En este contexto, cada una de las entidades enumeradas presenta una amplia y variable afectación, desde alteraciones analíticas inespecíficas y sin traducción sintomática hasta el fallo orgánico, que pueden coexistir en un mismo paciente [124].

Por tanto, las alteraciones teloméricas reúnen diversas entidades que inicialmente fueron consideradas dispares y definen un complejo síndrome de manifestación predominante en la edad adulta. La identificación del amplio espectro de manifestaciones del síndrome telomérico es importante para el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de varias patologías [108].

Telomeropatías secundarias

Estas alteraciones son debidas a variantes genéticas en genes que codifican por proteínas involucradas en la reparación del ADN y la interacción con el complejo shelterina. Los pacientes presentan AT, pero éste no suele ser inferior al percentil 10. Dado que las células somáticas no presentan actividad telomerasa, el daño del ADN telomérico no puede ser reparado provocando una alteración telomérica precoz. Entre estas telomeropatías se encuentra la ataxia telangiectasia, el Síndrome de Bloom, el Síndrome de Werner o el Síndrome de Progeria de Hutchinson-Gilford [92].

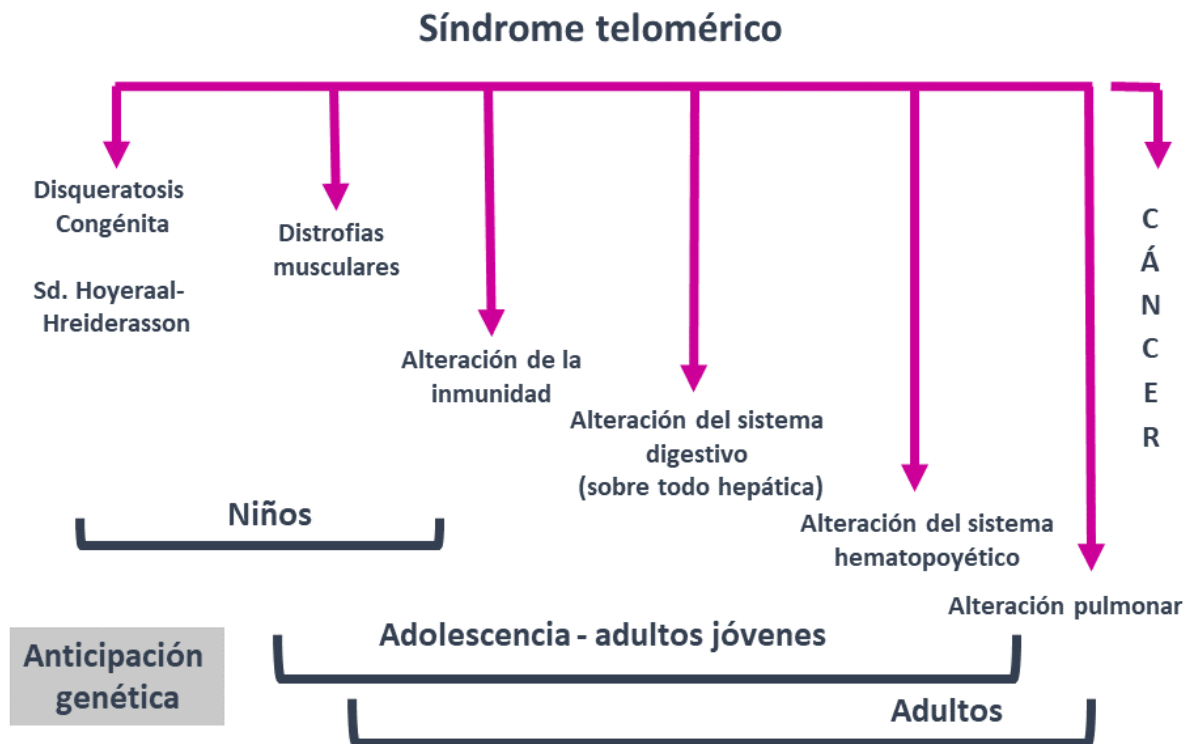


Imagen original de Lurdes Planas Cerezales

Figura 10. Síndrome telomérico Permite comprender las consecuencias del AT progresivo y del desgaste de las células madre por envejecimiento. Su espectro es muy amplio y abarca trastornos comunes relacionados con la edad que podrían catalogarse como idiopáticos. Los avances en el conocimiento de las alteraciones teloméricas han permitido reconocer una entidad clínica distinta que se presenta como un agrupamiento de afectación hematológica, pulmonar y/o hepática, entre otras [108,124].

1.4.5 Correlación genotipo – fenotipo

El síndrome telomérico tiene un comportamiento genético único. Una variante genética patogénica específica no altera directamente el fenotipo; sino que contribuye a un cambio hereditario en el ADN: la longitud del telómero [124]. Debido a esto, la longitud telomérica está altamente implicada en la edad de presentación, el tipo y la severidad de la enfermedad [108,124,125].

Longitud telomérica como modificador de la severidad de la enfermedad

El estudio de las familias portadoras de variantes genéticas en el complejo telomerasa ha permitido evidenciar que la LT es un modificador de la severidad de la enfermedad mediante un mecanismo de anticipación genética. En estas familias, los miembros de mayor edad con telómeros más largos no desarrollaran la enfermedad hasta la década de los 60-70, mientras que su descendencia inmediata puede presentar patología de mayor severidad hacia la mitad de la vida; y, a su vez, la siguiente generación puede verse afectada aún más gravemente en la infancia [92,108,124,125].

Esta anticipación en la edad de presentación y severidad de la enfermedad es simultánea al acortamiento progresivo de los telómeros con cada generación sucesiva. El AT se produce en las células germinales, las cuales presentan una pérdida total o parcial de la actividad telomerasa debido a alguna variante genética; y, en consecuencia, la progeñie hereda los telómeros cada vez más cortos junto con la variante [92,108,124-125].

Longitud telomérica y tipo de enfermedad

El acortamiento progresivo de los telómeros con las sucesivas generaciones provoca también una evolución del tipo de enfermedad. En los progenitores, la fibrosis pulmonar suele ser la manifestación más frecuente; mientras que, en las sucesivas generaciones, el fallo medular es comúnmente la alteración predominante en adultos jóvenes. Según este patrón, la DC se manifestará eventualmente en generaciones posteriores. Por tanto, el espectro completo del síndrome telomérico puede observarse en una sola familia. Sin embargo, se desconoce cuántas generaciones son necesarias para que la alteración evolucione desde una afectación predominantemente pulmonar a una hematológica. Probablemente, el grado de pérdida de función de la telomerasa y la longitud telomérica inicial del miembro precursor de la familia se relacionan con el número de generaciones necesarias [108,124-126].

Esta particularidad de las alteraciones teloméricas plantea un desafío clínico de gran magnitud. Las generaciones más mayores pueden no desarrollar enfermedad hasta años después del diagnóstico de un familiar más joven; y, además, el tipo de enfermedad puede ser diferente. Por tanto, las decisiones clínicas y el consejo genético de estos casos resultan extremadamente difícil [108]. El conocimiento del patrón cambiante de

la enfermedad es necesario para considerar la posibilidad que los descendientes de los pacientes con FPI pueden ser portadores de variantes genéticas en el complejo telomerasa y de AT; y, por tanto, pueden tener riesgo de desarrollar fallo medular o, incluso, DC [125].

1.4.6 Mecanismos patológicos del acortamiento telomérico

El AT produce una respuesta celular muy similar en todos los tejidos: la senescencia celular o apoptosis. Sin embargo, la manifestación fenotípica de estas alteraciones da lugar a una amplia variedad de patologías, citada anteriormente. El modelo animal de ratón “telomerase-knockout” ha permitido proponer qué mecanismos son los responsables de esa diversidad de fenotipos y enfermedades [108,124,126].

Agotamiento de células madre en tejidos con alta tasa de recambio celular

El recambio celular del tejido hematopoyético es notablemente alto, con una tasa estimada de 10^9 células producidas cada hora. La hematopoyesis se basa en un proceso de renovación y diferenciación de células madre oligoclonales. Tanto en humanos como en ratones, el AT provoca defectos cualitativos y cuantitativos de las células madre hematopoyéticas causando el agotamiento de éstas. Existen diversas pruebas de ello. En humanos, la anemia aplásica puede tratarse mediante un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos, evidenciando que el agotamiento de las células madre se debe principalmente a las alteraciones teloméricas que presentan y a la alta sensibilidad del tejido hematopoyético a la LT. Por otro lado, las principales causas de morbi-mortalidad del trasplante hematopoyético son la fibrosis pulmonar o la toxicidad hepática secundarias a los fármacos de acondicionamiento previos al trasplante. Por tanto, en un futuro, la prueba de regímenes terapéuticos de intensidad reducida deberá realizarse en individuos seleccionados con alteraciones teloméricas [126].

Otros tejidos como el epitelio intestinal también presentan una afectación similar que se expresa en forma de atrofia vellosa [108,124,126].

Múltiples estímulos se añaden a las alteraciones teloméricas en tejidos de baja tasa de recambio celular

A diferencia de la médula ósea, el tejido pulmonar tiene una baja tasa de recambio celular: 2% a la semana en el caso de células alveolares epiteliales. Mediante un modelo animal se ha demostrado que, debido a la baja tasa de replicación celular en el pulmón, el defecto telomérico no es suficiente para inducir afectación pulmonar en ratones. Un segundo agravio es necesario. Diversos estudios han comprobado que, en ratones portadores de alteraciones teloméricas, la exposición al humo del tabaco podría provocar un daño adicional a las células epiteliales pulmonares superando su umbral de daño celular y desarrollando un fenotipo de destrucción del espacio aéreo conocido como enfisema. La radiación podría ser otro ejemplo de daño adicional [108,126].

En este escenario, la necesidad pulmonar de un segundo agravio se relaciona, probablemente, con su baja tasa de recambio celular; y, por tanto, con un agotamiento replicativo retardado. Esto explicaría porqué las enfermedades pulmonares secundarias a telomeropatías representan un fenotipo atenuado que se expresa después de la mediana edad [108,124,126].

1.4.7 Determinantes genéticos y heredabilidad de la longitud telomérica

El estudio de las funciones y de la actividad del complejo telomerasa se ha realizado mediante modelos animales en ratones, los cuales presentan una LT mayor (media de 50-70kb) que los humanos (media de 10kb). Por este motivo, la disfunción orgánica en este modelo animal aparece solamente cuando la actividad telomerasa es nula y después de varias generaciones de ratones con telómeros progresivamente más cortos. Las investigaciones con diversas cepas de ratones (mTR^{-/-}, CAST/EiJ) con delección de telomerasa por bioingeniería han demostrado que la telomerasa por sí sola no es esencial. La primera generación de ratones “*telomerase knockout*” no presentó fenotipo alguno. Sin embargo, tras la crianza de generaciones sucesivas, los ratones con telómeros cortos desarrollaron enfermedad degenerativa que fue más evidente en tejidos con alta tasa de recambio celular. Los fenotipos observados para las delecciones de *TERC* y *TERT* fueron idénticos y únicamente presentaron afectación tisular cuando los

telómeros se acortaron. Gracias a estos modelos animales, se estableció que la anticipación genética se debe a un mecanismo de AT progresivo, y que el empeoramiento del fenotipo con las sucesivas generaciones se produce por la acumulación de telómeros disfuncionantes [124,125,127,128].

Por tanto, la ausencia de telomerasa por sí sola no es suficiente para desarrollar una enfermedad degenerativa. El AT es el principal determinante genético para la expresión de un fenotipo y su gravedad [124,125,127,128]; y, además puede limitar la capacidad de regeneración tisular aunque la actividad telomerasa esté presente [128]. Los telómeros cortos son capaces de producir enfermedad degenerativa incluso en un modelo animal de ratón "*telomerase wild-type*". Este hecho tiene implicaciones para individuos normales que heredan telómeros cortos, sugiriendo que el AT puede contribuir, por sí solo y en presencia de telomerasa, a la depleción de células madre limitando la capacidad regenerativa de un tejido [128].

La heredabilidad de la LT también se demostró mediante estudios en humanos. La progeñe de individuos con variantes genéticas en *TERT* o *TERC* tiene telómeros cortos en comparación con controles emparejados por edad, incluso cuando no heredan la variante en cuestión. Adicionalmente, una serie de estudios gemelares y no gemelares han demostrado que la LT parental (especialmente la paterna) influye en la longitud del telómero en los descendientes. *Eisenberg DTA et al.* evidenciaron que la LT del esperma aumenta con la edad del padre; mientras que una mayor edad materna en el momento de la concepción parece asociarse con una LT menor en la descendencia [129]. Estas observaciones apoyan la teoría de que la longitud de los telómeros es un rasgo genéticamente determinado y que el AT probablemente sea suficiente para causar fenotipo. Este aspecto podría ser especialmente relevante para aquellos trastornos con penetrancia dependiente de la edad y, por tanto, considerados como de herencia compleja [108].

En resumen, los determinantes genéticos de la LT son 1) la heredabilidad de la variación genética en regiones no teloméricas, es decir, variantes genéticas en genes relacionados con la LT; y, 2) la variabilidad de LT de los gametos que producen cigotos [89].

1.4.8 Determinantes ambientales de la longitud telomérica

Múltiples hallazgos indican que la LT también puede modularse de forma significativa por diversos factores ambientales y por el estilo de vida a lo largo de la existencia (**Tabla 3**) [89]. *Vaiserman AM et al.* demostraron que las exposiciones en las primeras etapas de la vida pueden afectar al estado de salud y a la longevidad de los individuos directamente expuestos y también a su descendencia [89,130]. Esto es debido a la transmisión parental de la LT, de tipo epigenético [89], expuesta en el apartado anterior. Concomitantemente, las exposiciones ambientales de la vida adulta (**Tabla 3**) también han demostrado tener un impacto en la LT a lo largo de la vida [89].

Una mejor comprensión de los mecanismos de afectación de la LT por parte de los factores ambientales podría conducir al desarrollo de estrategias de prevención o de tratamiento específicamente dirigidas a revertir el efecto dañino en los telómeros, promoviendo así la duración de la salud [89].

Tabla 3. Determinantes ambientales de la longitud telomérica

Primeros años de vida	Edad adulta
Eventos intrauterinos desfavorables	Infecciones
LT al nacer	Estrés psico-emocional
Vida adversa	Nutrición
Bajo nivel socioeconómico de la familia	Actividad física
Negligencia infantil	Consumo de alcohol
Abuso infantil	Estado civil
Baja escolarización de los padres	Intervenciones terapéuticas

Tabla original de Lurdes Planas Cerezales

1.4.9 Métodos de medida de la longitud telomérica

La interpretación adecuada de los resultados de los estudios epidemiológicos centrados en evaluar la LT requiere de la comprensión de la metodología usada para medir dicha longitud y, sobre todo, del conocimiento de la eficiencia y la reproducibilidad, entre otras, de la técnica utilizada. El protocolo habitual se basa en la medición de la LT en leucocitos de sangre periférica. Aunque éstos presentan una LT parecida a la del resto de células hematopoyéticas, podrían no ser un tipo celular adecuado para sustituir el estudio de otros tejidos menos accesibles, puesto que su LT difiere de la del resto de tejidos no hematopoyéticos y presentan tasas de AT diferentes [91,122].

Adicionalmente, es importante tener en cuenta que la LT de los leucocitos representa una longitud promedio de los telómeros de toda la población de leucocitos, la cual está compuesta por granulocitos y linfocitos [91]. Estas subpoblaciones tienen longitudes teloméricas promedio diferentes. Los linfocitos presentan telómeros más cortos que los granulocitos a todas las edades, puesto que los granulocitos están más estrechamente vinculados con las células madre hematopoyéticas, que están menos diferenciadas [91]. Además de la LT absoluta, dichas subpoblaciones también difieren en su tasa de AT. En ambas poblaciones, existe una tasa de reducción de la LT bifásica con una aceleración del AT durante la infancia y la vejez, y una pérdida lineal de LT durante la adolescencia y la edad adulta. Sin embargo, durante las fases de AT más acelerado, los linfocitos presentan una tasa de AT más pronunciada que los granulocitos [91]. Por tanto, las fluctuaciones en estas subpoblaciones celulares específicas podrían afectar en gran medida a la LT promedio de los leucocitos, contribuyendo a la variación intraindividual de LT [91].

Existen diferentes métodos que permiten medir la LT, los cuales presentan una reproducibilidad y precisión método dependiente [91]. Además, cada técnica presenta ventajas y desventajas, midiendo una parte diferente del complejo telomérico. Concomitantemente, cada método presenta un error de medición distinto. Por ejemplo, en y entre los geles para el Southern Blot; o, entre y dentro de los pocillos y placas para la PCR cuantitativa. Dichos errores rara vez se incorporan al análisis estadístico. Debido a la gran heterogeneidad de resultados basados en estudios poblaciones de LT, existe

un debate considerable sobre qué método podría afectar los resultados y debilitar su comparabilidad entre técnicas [91].

Adicionalmente a lo mencionado, tanto Southern Blot como PCR, ambos utilizados sobre todo en estudios epidemiológicos, emiten un resultado en forma de LT media. Se desconoce todavía si la senescencia celular se induce en presencia de un telómero críticamente corto o debido a una longitud promedio de telómeros más corta. Por tanto, se desconoce si estos métodos miden el parámetro telomérico biológicamente más relevante [91].

Las principales técnicas de medida de la LT se detallan a continuación y se resumen en la **Tabla 4** [91,122,131,132]:

- Telomere Restriction Fragment (TRF) – Southern Blot: es la técnica original, siendo una modificación del *Southern Blot*, considerada como el *Gold Standard*. Sus ventajas incluyen una alta reproducibilidad y la expresión de la LT en un valor absoluto usando como unidad el par de bases o, debido al TRF, en fragmentos de restricción terminal. También podría permitir determinar la distribución de la LT, aunque esta medida se utiliza muy poco ya que requiere de la medición de la anchura de las bandas del gel en relación con el ADN de referencia, lo cual es difícil y propenso al error humano [91]. Entre sus desventajas cabe mencionar 1) la necesidad de disponer de una cantidad considerable de ADN (3µg por muestra); y, 2) la medición tanto de las regiones teloméricas como de las subtelo-méricas, lo que podría resultar en una sobreestimación de la LT media [91].
- Quantitative polymerase chain reaction (qPCR): este método mide la LT promedio relativa determinando la proporción relativa de las repeticiones teloméricas (ratio T/S) en comparación con una muestra de referencia. El promedio de LT en pares de bases se calcula multiplicando el ratio T/S por el coeficiente de una ecuación de regresión que describe la relación entre la relación T/S y un conjunto de muestras, cuya longitud absoluta se midió mediante Southern Blot. Las ventajas de la qPCR son 1) requiere menor cantidad de ADN (50ng por muestra); 2) un alto rendimiento; y, 3) menor coste. Sin embargo, su mayor desventaja es gran variabilidad de resultados,

principalmente porqué no existe una muestra de referencia estandarizada. Por este motivo, se ha cuestionado la precisión de la qPCR en estudios epidemiológicos a pesar de su bajo coste y alto rendimiento [91].

- *Flow cytometry* plus FISH: permite medir la LT en cromosomas individuales. Sus ventajas son 1) medir la LT de células individuales de un tipo celular concreto, reportando también la distribución de la LT de ese tipo celular; 2) mayor precisión puesto que utiliza controles de referencia internos y sondas de hibridación altamente específicas de las regiones teloméricas en comparación con las otras técnicas, las cuales introducen errores de medida al incluir las regiones subteloméricas (Southern Blot), perder alguna secuencia al usar sondas de hibridación menos específicas (qPCR), alterar la LT según la enzima de restricción utilizada (Southern Blot) o confiar en la estabilidad de una referencia para medir la LT relativa (qPCR) [91]. Dada la alta especialización técnica y la necesidad de cultivo celular que presenta este método, sus desventajas son 1) elevado coste, 2) menor eficiencia y, 3) mayor experiencia técnica. Esto limita en gran medida su uso en investigaciones poblacionales [91].
- TeSLA: permite medir telómeros de longitud más corta, detectando los telómeros de los extremos de los cromosomas desde <Kb hasta 18kb, lo que permite tener más información sobre las LTs más cortas. Sus ventajas son 1) mejoría de la especificidad y eficiencia de las mediciones de la LT; y, 2) margen de error muy pequeño al detectar y anotar automáticamente los tamaños de banda mediante un software que proporciona la LT promedio y el porcentaje de telómeros más cortos. Sus desventajas son su limitada experiencia y validación [133].
- Métodos bioinformáticos: se trata de técnicas de medición de la LT novedosas y prometedoras que, mediante WGS, calculan la LT utilizando los datos de secuenciación. Existen diversas herramientas: Motif_counter, TelSeq y qMotivo; las cuales mostraron un elevado nivel de concordancia con los resultados de qPCR. Su uso, además de medir la LT, permitiría ampliar el rango de posibles estudios sin coste analítico adicional. Sin embargo, al igual que TeSLA, todavía no disponen de experiencia suficiente [104].

Tabla 4. Técnicas de medida de la longitud telomérica

MÉTODO	MEDIDA	VENTAJAS	DESVENTAJAS
TRF - Southern Blot	Regiones teloméricas y subteloméricas	Considerado el Gold Standard Alta reproducibilidad Expresión de LT en valor absoluto	Cantidad considerable de ADN Sobreestimación de la LT (infraestimación del AT)
qPCR	LT promedio relativa de repeticiones teloméricas (ratio T/S) comparando con muestra de referencia	Menor cantidad de ADN Alto rendimiento Menor coste	Gran variabilidad de resultados Moderada correlación con TRF-Southern Blot Muestra ADN de alta calidad
Flow cytometry plus FISH	LT en cromosomas individuales	Medir LT de un tipo celular concreto Mayor precisión Alta correlación con TRF-Southern Blot Considerado Gold Standard	Alta especialización técnica y requerimiento de cultivo celular. Por lo que tiene: -mayor coste -menor eficiencia -uso limitado
TeSLA	Telómeros de longitud más corta	Especificidad y eficiencia Margen de error muy pequeño	Limitada experiencia y validación
Métodos bioinformáticos	LT usando los datos de WGS	Alta correlación con qPCR Ampliación del rango de estudio sin coste analítico adicional	Limitada experiencia y validación

Tabla original de Lurdes Planas Cerezales

1.4.10 Longitud telomérica, medicina personalizada y controversias para su uso clínico

La implementación de la medida de la LT en la práctica clínica habitual se ve obstaculizada por diversos factores [89,104], que se resumen a continuación (**Fig. 11**):

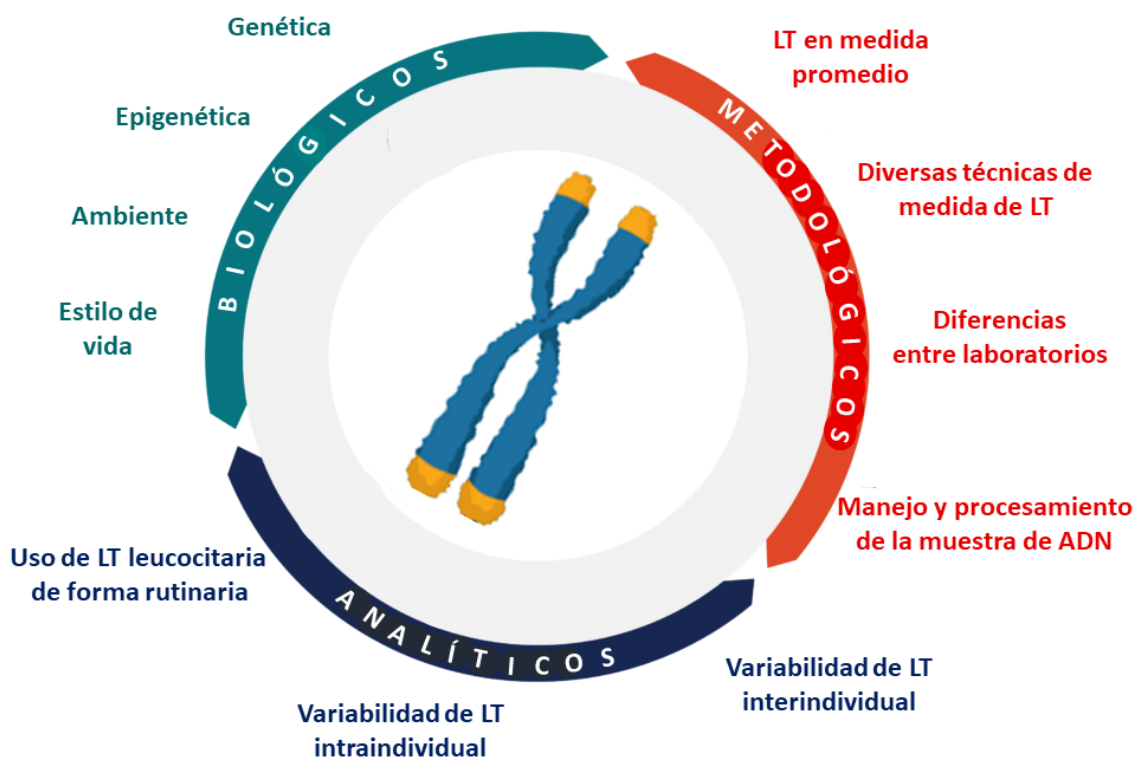


Imagen original de Lurdes Planas Cerezales

Figura 11. Factores que cuestionan el uso de la medida de longitud telomérica en la práctica clínica habitual Diversos factores biológicos, analíticos y metodológicos influyen en la determinación de la LT y, por lo tanto, generan grandes controversias sobre el uso de dicha longitud en estudios epidemiológicos y clínicos, así como también en la práctica clínica habitual. Estas controversias impiden la extensión de la determinación de LT como exploración clínica complementaria y condicionan su limitada disponibilidad a algunos centros que puedan contar con los altos y específicos requerimientos técnicos y humanos necesarios para llevar a cabo la medida y su posterior contextualización clínica.

Factores biológicos:

La LT depende de factores genéticos, epigenéticos, ambientales y de comportamiento humano. Estos factores individuales impiden la identificación de una relación causal clara entre la condición a estudio y los telómeros [104].

Factores pre-analíticos y analíticos:

- Variabilidad interindividual de la LT: se debe a los factores biológicos ya mencionados y se ha comprobado reiteradamente en diversos estudios epidemiológicos. Esta variabilidad interindividual complica sustancialmente la interpretación de los resultados a nivel individual [89].
- Variabilidad intraindividual de la LT: se debe a la variabilidad de LT entre diferentes tejidos de un mismo individuo. Incluso algunos estudios han objetivado variabilidad dentro del mismo tejido dependiendo de la zona de muestreo [134]. Sin embargo, en algunos casos, la correlación de LT entre algunos tejidos puede llegar a ser moderada o alta a pesar de estas diferencias [89,122].
- Determinación de LT en leucocitos de sangre periférica: ésta es la muestra más habitual en estudios humanos puesto que permite evitar procedimientos invasivos. Aunque diversos estudios han objetivado una correlación positiva entre la LT con la de otros tejidos adultos como piel, músculo esquelético o grasa subcutánea, su correlación con tejidos de baja tasa de recambio celular no es tan clara [89]. Concomitantemente, los leucocitos son una población heterogénea formada por diversos tipos celulares como linfocitos, monocitos, granulocitos, etc. Esta composición poblacional leucocitaria es muy variable, incluso en individuos sanos, según diversas exposiciones. Por tanto, la LT leucocitaria es un parámetro muy dinámico que refleja cambios transitorios en el sistema inmunológico que nada tienen que ver con el envejecimiento, como por ejemplo la inflamación o la infección. Por tanto, la variación de la LT leucocitaria refleja la historia de respuesta inmune de un individuo a lo largo de su vida, representando al menos en parte, el envejecimiento del sistema inmunológico del individuo [89]. La hematopoyesis clonal también puede afectar la dinámica de LT leucocitaria. Este proceso aumenta con la edad del individuo y tiene lugar en presencia de determinadas variantes genéticas “*de novo*” del complejo telomerasa y en sujetos con la LT más corta [89]. La aparición de clones hematopoyéticos con mayor potencial replicativo debido a las variantes genéticas “*de novo*” en células madre hematopoyéticas puede permitir que

varios individuos pospongan alcanzar la LT crítica, influenciando así la LT leucocitaria promedio [89].

Factores metodológicos:

- Existencia de diversas técnicas de análisis de LT con resultados expresados en diferentes medidas de longitud, con ventajas y desventajas propias de cada técnica (**Tabla 4**) y con pobre estandarización de uso en estudios humanos.
- Expresión de LT en medidas promedio: muchas de los métodos de análisis de LT expresan sus resultados como LT promedio, la cual se desconoce si es representativa o no de los procesos que vinculan LT con envejecimiento.
- Existencia de variaciones entre laboratorios y entre técnicas: los resultados obtenidos por una técnica y/o laboratorio en concreto pueden diferir sustancialmente, lo que complica su uso en estudios epidemiológicos y clínicos [89].
- La precisión y la reproducibilidad de las mediciones de LT dependen, junto del método de medida y del laboratorio, de otros factores como la recogida, procesamiento, almacenamiento y extracción de las muestras de ADN [89].

Estos factores condicionan la existencia de diversas controversias para el uso clínico rutinario de la medida de LT. En un futuro, el uso de la LT en la práctica clínica habitual requerirá de 1) la optimización de las técnicas de medida para mejorar su sensibilidad, repetibilidad y rendimiento [89]; y, 2) la consideración de que el proceso de envejecimiento es complejo e incluye múltiples vías que actúan a diferentes niveles biológicos, por lo que difícilmente puede medirse con precisión con un solo biomarcador [89, 104].

La medida de cada uno de los *“hallmarks of aging”* mide diferentes aspectos del envejecimiento. Por lo tanto, las estimaciones de edad biológica obtenidas de forma independiente con diferentes enfoques de medición pueden no coincidir entre sí. En este contexto, sería razonable pensar que el uso de la LT puede mejorar el poder predictivo compuesto para estimar la edad biológica, mientras que su uso como biomarcador único es cuestionable en muchos casos. Por este motivo, se considera que varias medidas pueden complementarse unas a otras mejorando el poder predictivo de la medida

compuesta de la edad biológica de un individuo. La implementación de la LT como biomarcador de envejecimiento para estudios epidemiológicos y clínicos deberá contemplar en un futuro este concepto [89,104].

Tras la optimización de las técnicas de medida de LT y de la incorporación del método compuesto de predicción de la edad biológica, la LT debería interpretarse como un estado general del organismo o individuo que se asocia con una potencial susceptibilidad de riesgo para determinadas enfermedades. La medición de la LT podría constituir un método de seguimiento de la salud de un individuo, activando una alerta si el paciente presenta una LT en el percentil más bajo o si su tasa de AT es más rápida de lo habitual [104]. En pacientes de riesgo se podrían desarrollar protocolos de screening y diagnóstico de enfermedades concretas y promover cambios de estilo de vida que puedan retrasar o prevenir la aparición de determinadas enfermedades [104].

Así mismo, el uso de la LT también podría constituir una base sobre la que desarrollar futuras terapias. En este sentido, grandes avances han tenido lugar en el ámbito de ciertas neoplasias. Concretamente, en neoplasias mieloproliferativas se ha desarrollado un inhibidor de la actividad telomerasa, Imelstat (GRN163L), el cual ya dispone de diversos ensayos clínicos en marcha [135]. Del mismo modo, otros grupos de investigación centrados en telomeropatías también han desarrollado terapias capaces de inducir la actividad telomerasa y la proliferación celular, disminuyendo el daño al ADN, el estrés oxidativo y la senescencia celular mediante un péptido, el GSE4, en Disqueratosis Congénita [136] y en fibrosis pulmonar [137].

La aplicación de los telómeros en la medicina personalizada requiere de futuros grandes estudios prospectivos centrados en evaluar el coste beneficio de medir la LT en la práctica clínica habitual. El avance de las técnicas de secuenciación mediante WGS y de análisis bioinformático permitiría desarrollar una técnica de medición basada en datos computacionales únicamente. Esto podría representar un nuevo método de referencia para la determinación de la LT. Sin embargo, la investigación en este campo es esencial, siendo también indispensable establecer una técnica única y bien representativa de medida de LT que permita un progreso más rápido de la investigación de la implicación telomérica en la salud y la enfermedad [104].

1.5 Envejecimiento, disfunción telomérica y fibrosis pulmonar

La edad es el factor de riesgo más importante de las enfermedades relacionadas con el envejecimiento. Por tanto, el incremento de la edad de la población mundial se acompaña de un aumento de la incidencia de enfermedades relacionadas con los mecanismos moleculares y celulares responsables del envejecimiento. Éstas incluyen enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares, metabólicas, entre otras, que provocan la pérdida de las capacidades de los individuos para llevar una vida normal, causan discapacidades o incluso hasta la muerte. Estas enfermedades suponen una gran carga para la economía social y el sistema sanitario [138].

Respecto al pulmón, su envejecimiento fisiológico se basa en cambios estructurales y una pérdida progresiva de su integridad fisiológica que conduce a la alteración de sus funciones. Las modificaciones pulmonares estructurales y funcionales que ocurren de forma habitual con la edad incluyen el estrechamiento de los discos intervertebrales, la pérdida de la fuerza de la musculatura respiratoria, la pérdida de la elasticidad pulmonar, los cambios estructurales de la vía respiratoria con disfunción del sistema mucociliar y de la efectividad de la tos, entre otros. Esto se traduce en una pérdida fisiológica anual de unos 30ml de volumen expirado máximo en el primer segundo y de la capacidad vital forzada (FVC), que también se asocian con una disminución de la capacidad de difusión de monóxido de carbono (DLCO) y de presión arterial de oxígeno [139].

Existen dos tipos de afectación pulmonar relacionada con la edad: aquellas que ocurren en cualquier momento de la vida pero su severidad aumenta con la edad, como el asma o la apnea obstructiva del sueño; y aquellas que ocurren en población de edad avanzada, entre las que se incluyen la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o la FPI [139].

1.5.1 Envejecimiento y fibrosis pulmonar

La fibrosis pulmonar, especialmente la FPI, ocurre en la gran mayoría de casos a partir de la mediana edad y sobre todo en adultos mayores. Esto ha suscitado la consideración de la edad como uno de los factores de mayor riesgo de enfermedad y la concepción de

la FPI como un trastorno relacionado con el envejecimiento. Aunque todavía se desconocen con exactitud los mecanismos que asocian FPI a envejecimiento, la mayoría de los “*hallmarks of aging*” han sido evaluados en pacientes con FPI objetivando que la alteración de los mismos contribuye al proceso reparativo aberrante epitelio-mesénquima y a la progresión de la enfermedad, sugiriendo la existencia de un proceso acelerado de envejecimiento celular [17,139].

- Inestabilidad genómica: el acúmulo de daño al ADN dependiente de la edad es uno de los componentes del envejecimiento más reconocidos al afectar la renovación de las CEA tras un agravio. Diversos estudios han comprobado la existencia de inestabilidad genómica en pacientes con FPI, la cual afecta a genes involucrados en vías celulares críticas para la homeostasis de las CEA participando en la patogénesis de la enfermedad [139].
- Acortamiento telomérico: el AT se considera uno de los mecanismos más influyentes en el proceso de envejecimiento celular. Cuando los telómeros alcanzan su LT crítica, activan una respuesta de daño al ADN que provoca senescencia celular o apoptosis. La disfunción telomérica ha sido ampliamente evaluada en pacientes con FPI y se detallará en los siguientes apartados.
- Senescencia celular: se considera un evento crítico para el envejecimiento y hace referencia al arresto del ciclo celular junto con la expresión de un fenotipo secretor asociado a la senescencia caracterizado por la liberación de factores inflamatorios, reguladores del crecimiento y de remodelación tisular. La senescencia de las CEA, en probable relación con el AT, contribuye al perfil secretor de estas células en la patogenia de la FPI [139]. Del mismo modo, algunos estudios han concluido que los fibroblastos pertenecientes a los focos fibroblásticos de la FPI presentan características propias de células senescentes [139].
- Disfunción mitocondrial: las mitocondrias juegan un papel crucial en la homeostasis celular, la capacidad bioenergética y la longevidad celular al producir la mayor cantidad de ATP y regular la muerte celular programada. El envejecimiento se asocia con la existencia de disfunción mitocondrial, la cual provoca un desequilibrio entre procesos de fisión y fusión celular que resultan en una producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS), que dañan el ADN mitocondrial durante el

metabolismo oxidativo. El acúmulo de ADN mitocondrial dañado y la disminución de la mitofagia resulta en la pérdida de la síntesis de proteínas mitocondriales, llevando a la célula a la senescencia [139]. En pacientes con FPI se ha documentado la existencia de una producción excesiva de ROS y una alteración del balance oxidante/antioxidante pulmonar. Concomitantemente, las CEA en pacientes con FPI presentan una disfunción mitocondrial y una alteración de la mitofagia [139].

- Pérdida de la proteostasis: la homeostasis de las proteínas incluye mecanismos relacionados con la estabilización de proteínas correctamente plegadas y con procesos de degradación proteica mediante dos sistemas proteolíticos implicados en el control de calidad de las proteínas: el sistema de autofagia lisosomal y el sistema ubiquitina-proteasoma. Diversas investigaciones han comprobado una reducción exagerada de la autofagia en pacientes con FPI [139].
- Alteraciones epigenéticas: en pacientes con FPI se han descrito alteraciones tanto en la metilación de regiones del ADN como en la acción de micro ARN (miARN) que provocan el silenciamiento de varios genes anti-fibróticos implicados en la regulación de la actividad de los fibroblastos, provocando un incremento de la actividad profibrogénica [139, 140].

La alteración de estos mecanismos no únicamente contribuye al proceso de respuesta aberrante de las CEA, sino que también se encarga de perpetuar el proceso de fibrogénesis pulmonar contribuyendo a la progresión de la enfermedad.

1.5.2 Disfunción telomérica y afectación pulmonar

El síndrome telomérico tiene su manifestación pulmonar más común en forma de FPI o enfisema [66, 92, 108, 124-127, 141-143]. En ambas patologías, existe una pérdida de la integridad alveolar. En modelos animales de ratón “*telomerase-knockout*” se evidenció que el AT limitaba la capacidad regenerativa alveolar mediante la afectación de las CEA tipo II; e, inducía daño al ADN causando senescencia en las células madre alveolares [66]. Esta disfunción telomérica de las CEA, las cuales son células con una baja tasa de recambio celular, provoca un fenotipo bastante bien tolerado *de novo*. Sin embargo, ante el daño pulmonar de un segundo insulto o agravio, la respuesta celular es catastrófica. Por este motivo, las enfermedades pulmonares “teloméricas” tienen un

fenotipo clínico atenuado que presenta síntomas en la fase adulta avanzada, una media de 4 décadas después que el fallo medular y debido a un proceso evolutivo más lento. En portadores de variantes genéticas en genes del complejo telomerasa, la exposición al humo del tabaco o a tóxicos pulmonares provoca una afectación pulmonar con declive funcional y exacerbaciones que conducen al fallo respiratorio [66]. Un claro ejemplo de patología pulmonar tras exposición a un segundo agravio sería por ejemplo la radiación / radioterapia (RDT) y la consiguiente fibrosis pulmonar y/o neumonitis radica. Diversos estudios, tanto experimentales en modelos animales como observacionales en humanos, han demostrado una alta sensibilidad a la radiación en casos portadores de alteraciones teloméricas [144].

La respuesta celular de las CEA a la disfunción telomérica es la senescencia, a pesar de la cual, el intercambio gaseoso es posible al menos durante un tiempo y de forma parcial, atenuando aún más la aparición de sintomatología respiratoria [66]. Sin embargo, algunos estudios también concluyen que las CEA pueden presentar una proliferación anómala con posterior fallo regenerativo tisular y remodelación pulmonar [142].

Tradicionalmente, la fibrosis pulmonar y el enfisema se han considerado entidades clínicas diferentes. Sin embargo, en los últimos años se ha puesto de manifiesto que hasta el 20% de pacientes pueden presentar de forma concomitante enfisema y EPID [125,142]. En una misma familia, las manifestaciones pulmonares de la disfunción telomérica son heterogéneas y pueden incluir la FPI, el síndrome combinado fibrosis enfisema (CPFE), la EPOC, el asma o el neumotórax [142]. Por este motivo, en diversos foros internacionales se empieza a postular el término de “*lung related telomeropathies*” para designar a aquellas patologías pulmonares que cursan con disfunción telomérica. Sin embargo, todavía no hay suficiente evidencia científica para apoyar esta propuesta.

1.5.3 Disfunción telomérica y fibrosis pulmonar

La disfunción telomérica ha sido ampliamente evaluada en pacientes con fibrosis pulmonar como uno de los “*hallmarks of aging*” esenciales para el desarrollo de la enfermedad [6,9,17,126,145]. La identificación de variantes genéticas raras y comunes

en genes asociados a los telómeros tanto en casos esporádicos como familiares de fibrosis pulmonar apoyó la implicación de la disfunción telomérica en la patogénesis de la enfermedad [44-48,55,58,77,139]. Estas variantes genéticas causan aproximadamente el 20% de los casos de FPI familiar, los cuales presentan AT [139,146-148]. Además, un 20-30% de los casos de FPI esporádica que no son portadores de variantes genéticas en el complejo telomerasa también presentaron AT inferior al percentil 10 en comparación con controles sanos [149].

Las alteraciones mediante las cuales la disfunción telomérica contribuye al desarrollo de la fibrosis pulmonar todavía no se conocen con exactitud. Sin embargo, se ha postulado que las variantes genéticas en el complejo telomerasa o la respuesta proliferativa de las CEA a un agravio repetido conducen a un AT y a su posterior senescencia y/o apoptosis [139]. Mediante estudios pre-clínicos (cultivos in vitro y modelos animales) se ha corroborado esta teoría concluyendo que la senescencia de las CEA dependiente de la disfunción telomérica limita la reparación alveolar y da paso a una señalización mesenquimal profibrótica [139].

En este contexto, diversos estudios se han realizado demostrando no solo la implicación de la disfunción telomérica en la patogenia de la fibrosis pulmonar, sino también su aplicabilidad en el ámbito clínico. Dichas investigaciones han concluido que, en el apropiado contexto clínico, la disfunción telomérica puede estratificar el riesgo de enfermedad y pronosticar su curso evolutivo, lo que supone un gran avance para el manejo personalizado de los pacientes con fibrosis pulmonar.

1.5.4 Disfunción telomérica y estratificación del riesgo de fibrosis pulmonar

Inicialmente, diversos estudios transversales demostraron que los casos esporádicos de FPI presentan una LT significativamente menor que individuos control de la misma edad [13,79,125,149]. En 2008, *Alder JK et al.* reportaron un defecto telomérico global en individuos con FPI describiendo AT en sus linfocitos, granulocitos y CEAs, entre otros tipos celulares [13,125]. También objetivaron que hasta en el 10% de los pacientes del estudio no portadores de variantes genéticas en genes relacionados con el complejo telomerasa y sin historia familiar de EPID, presentaron una LT en el rango de los

pacientes portadores de variantes genéticas relacionadas con los telómeros [13]. Del mismo modo, *Cronkhite JT et al.* también reportaron que una proporción significativa de pacientes con FPI presentaron AT aún en ausencia de variantes genéticas en el complejo telomerasa, sugiriendo una mayor predisposición al desarrollo de la enfermedad para aquellos individuos con AT [149].

En 2015, *Snetselaar R et al.* publicaron un estudio sobre la LT en 359 pacientes con EPID, con y sin agregación familiar, comparándola con la LT de 173 individuos sanos [150]. Las EPIDs incluidas en el estudio fueron: FPI, sarcoidosis, neumonía organizativa, EPID asociada a conectivopatía, neumonitis por hipersensibilidad, EPID asociada al tabaco y NINE. Todas ellas presentaron una LT inferior en comparación con los controles sanos, siendo la sarcoidosis la que mostró una diferencia menor respecto a ellos. Los casos de FPI mostraron un AT mayor en comparación con la sarcoidosis ($p < 0.001$) y al resto de EPIDs. Respecto a las dos enfermedades granulomatosas incluidas en el estudio, la neumonitis por hipersensibilidad presentó una LT menor que la sarcoidosis [150].

En base a estos resultados, se considera que existe una mayor probabilidad de desarrollar fibrosis pulmonar en individuos con los telómeros más cortos de la población, en los cuales también se ha reportado un mayor riesgo de enfermedad extrapulmonar mediada por los telómeros [13,125]. Esta afectación extrapulmonar incluye alteraciones hematológicas como la anemia aplásica o la trombocitopenia, y/o hepáticas como la cirrosis hepática criptogénica, entre otras [13,125].

Por tanto, el AT es un factor de riesgo para desarrollar un fenotipo fibrosante pulmonar que puede coexistir con afectación extrapulmonar en un amplio rango de gravedad, desde anomalías de laboratorio asintomáticas hasta la insuficiencia orgánica [13,108,124,125,149].

1.5.5 Valor pronóstico de la disfunción telomérica en fibrosis pulmonar

Tradicionalmente, la afectación fibrosante pulmonar se ha clasificado como “leve”, “moderada”, “severa” e “incipiente” según parámetros funcionales. Sin embargo, esta definición no está estandarizada y los ensayos clínicos utilizan el umbral FVC del 50-55%

predicho y DLCO 35-40% predicho para separar los pacientes en fase leve a moderada de aquellos con enfermedad severa. De esta manera, se generaliza el control de la progresión de la enfermedad, se pauta tratamiento y se indica el trasplante pulmonar. Sin embargo, la FPI no progresa de forma lineal [151] y las EPID no FPI también pueden presentar un curso clínico variable, incluso progresivo en algunos casos [152]. Por tanto, el único uso de parámetros fisiológicos como la FVC en la estadificación inicial del pronóstico de un paciente probablemente simplifica en exceso dicha estadificación [153].

Las variables demográficas o biológicas no se incluyen de forma rutinaria para el seguimiento de los pacientes ni en la toma de decisiones terapéuticas; y, todavía se desconoce si podrían reflejar diferentes fenotipos biológicos o clínicos siendo relevantes para el tratamiento y/o pronóstico de la enfermedad. En FPI se ha desarrollado un modelo multidimensional de predicción de riesgo, el GAP index [154]. Este modelo de screening establece de forma rápida y simple el riesgo de muerte al primer año teniendo en cuenta la edad, el género, la FVC y la DLCO. Sin embargo, este modelo presenta errores al no cubrir todos los fenotipos biológicos [153].

Por este motivo, existe un gran interés en identificar y desarrollar biomarcadores capaces de facilitar el proceso diagnóstico, pronosticar el curso evolutivo de la enfermedad y predecir la respuesta al tratamiento en el ámbito de la EPID. En este sentido, el valor pronóstico de la disfunción telomérica ha sido ampliamente evaluado apoyando su papel como biomarcador.

En 2014, *Stuart BD et al.* demostraron por primera vez una asociación independiente entre AT y menor supervivencia en FPI [79]. Su estudio observacional con validación independiente de 3 cohortes de pacientes FPI y EPID no FPI de Dallas, Chicago y San Francisco concluyó que, tras ajustar el análisis por variables relevantes como la edad, el género masculino, el porcentaje de FVC previsto y el porcentaje de DLCO previsto, el AT se asoció de forma independiente a una menor supervivencia de la FPI [79]. Esta asociación también se objetivó en las 3 cohortes de validación a pesar de presentar diferentes características demográficas, fisiológicas y de supervivencia basales [79]. Además, estos resultados fueron congruentes con los publicados por *Dai J et al.* en 2015 para una cohorte china de FPI [155].

Respecto a las EPID no FPI, la LT no se asoció significativamente a la supervivencia en el análisis multivariable del estudio de *Stuart BD et al.* [79]. Sin embargo, resultados opuestos se obtuvieron en pacientes con EPID no FPI que eran portadores de variantes genéticas en genes relacionados con los telómeros [59,60]. *Newton CA et al.* describieron un fenotipo progresivo con supervivencia reducida en pacientes con variantes genéticas en cuatro genes relacionados con los telómeros, independientemente del diagnóstico de EPID [60]. Tampoco se reportaron diferencias significativas en la supervivencia entre los diferentes grupos de genes [60]. Resultados similares fueron también descritos por *Borie R et al.* [59], sugiriendo que el efecto de las variantes genéticas relacionadas con los telómeros predice más la progresión acelerada de la fibrosis pulmonar que un diagnóstico clínico y/o un patrón histológico particulares [60]. En consecuencia, y dada la falta de importancia pronóstica de la histopatología y los riesgos asociados con la biopsia pulmonar, *Newton CA et al.* sugirieron equilibrar cuidadosamente los riesgos y beneficios de la biopsia de pulmón para los portadores de variantes genéticas relacionadas con los telómeros [60], recomendando una mayor vigilancia y la derivación temprana para trasplante pulmonar independientemente del diagnóstico de EPID [60].

En este contexto, también se evaluó la morbi-mortalidad del trasplante de pulmón en pacientes con fibrosis pulmonar y disfunción de los telómeros. *Silhan LL et al.* describieron por primera vez una mayor tasa de complicaciones hematológicas e infecciosas con una alta frecuencia de insuficiencia renal y toxicidades raras relacionadas con medicamentos inmunosupresores propios del período postrasplante [156]. Otros autores también reportaron un menor tiempo hasta la aparición de disfunción crónica del injerto pulmonar [157] con inmunidad alterada al citomegalovirus [158]. Los resultados de estos estudios apoyan que los pacientes con fibrosis pulmonar y disfunción telomérica tienen mayor riesgo de presentar una elevada morbilidad y mortalidad post trasplante pulmonar, especialmente aquellos con síndrome mielodisplásico concomitante [159]. En este contexto, *Borie R et al.* propusieron la necesidad de desarrollar recomendaciones específicas sobre la realización de pruebas genéticas teloméricas previas al trasplante y a la evaluación pretrasplante de riesgos, así como un régimen inmunosupresor postrasplante personalizado para pacientes con EPID

y telomeropatía, recomendando equilibrar el uso de tratamiento inmunosupresor para prevenir y afrontar la elevada morbi-mortalidad postrasplante de estos pacientes [159].

Además de en el ámbito del trasplante, la carga de eventos adversos relacionados con los corticosteroides y con otros fármacos inmunosupresores también ha sido evaluada para pacientes con FPI que, antes de la era antifibrótica, habían sido tratados con inmunosupresores [160]. *Newton CA et al.* reportaron una supervivencia significativamente peor en términos de muerte, trasplante, hospitalización y disminución de la FVC para pacientes con disfunción telomérica [160]. En base a los resultados mencionados, se ha sugerido la necesidad de evaluar de forma personalizada el uso de fármacos inmunosupresores en estos pacientes en contexto de una agudización de la enfermedad o del trasplante pulmonar [161].

1.5.6 Características epidemiológicas, radiológicas y patológicas de la disfunción telomérica en fibrosis pulmonar

Tal y como ya se ha citado, cualquier tipo de EPID puede presentar disfunción telomérica. No obstante, la caracterización epidemiológica, radiológica y patológica de la disfunción telomérica en EPID se ha realizado en base al estudio de series de casos y, por tanto, más investigaciones serán necesarias en un futuro.

En 2016, *Newton CA et al.* [60] evaluaron la existencia de diferencias fenotípicas y de curso evolutivo entre 115 pacientes con fibrosis pulmonar portadores de variantes genéticas en *TERT*, *TERC*, *PARN*, y *RTEL1*. El AT de estos casos fue mayor para las variantes en *TERC*, seguido de *TERT*, *RTEL1* y *PARN*. La media de edad al diagnóstico fue estadísticamente significativa entre los diferentes grupos de pacientes: los portadores de variantes genéticas en *TERC* se diagnosticaron a una edad media más temprana (51 años), seguidos de los portadores de variantes en *TERT* (58 años), los portadores de *RTEL1* (60 años) y los casos de *PARN* (64 años). El diagnóstico más frecuente en todos los grupos de pacientes fue la FPI seguida de la fibrosis pulmonar clasificable y de la neumonitis por hipersensibilidad. La fibroelastosis pleuropulmonar presentó mayor prevalencia que las EPIDs asociadas a enfermedad del tejido conectivo.

Además, se valoraron imágenes de TC torácico en 73 pacientes y muestras de biopsia pulmonar quirúrgica en 42 pacientes. Radiológicamente, un 43% de los TCs torácicos objetivó un patrón de NIU, seguido en frecuencia por el patrón de posible NIU y, alrededor del 20%, presentaron patrón inconsistente con NIU. Además, se observó una asociación estadísticamente significativa entre enfisema y tipo de variante genética telomérica ($p=0.0032$). Los portadores de variantes en *RTEL1* (40%) y *TERT* (40%) presentaron enfisema asociado a su EPID ($p=0.026$ y $p=0.028$, respectivamente). Los hallazgos histopatológicos fueron los siguientes: el 50% de las biopsias analizadas presentaron un patrón de NIU. La micropanalización se objetivó en el 73% de los casos; y, la existencia de focos fibroblásticos en el 80.9% de las biopsias analizadas. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes variantes genéticas y el patrón histológico [60].

Respecto a la supervivencia, y tal y como ya se ha comentado en apartado anterior, el análisis de supervivencia demostró que no había diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes entidades diagnósticas. Los casos con FPI presentaron una supervivencia media de 2.75 años (95% CI 1.64-4.61), siendo de 3.11 años (95% CI 2.56-4.82) para los casos no-FPI [60].

1.5.7 Estudio genético telomérico en la práctica clínica habitual de la fibrosis pulmonar

De acuerdo a lo expuesto en los apartados anteriores, las pruebas genéticas teloméricas (medida de la LT y secuenciación de genes relacionados con los telómeros) podrían ser una herramienta de gran utilidad para la práctica clínica en fibrosis pulmonar en términos de beneficios en salud relacionados con la supervivencia y la morbilidad de la EPID y su manejo personalizado.

Sin embargo, la implementación clínica de dichos estudios genéticos tiene aún diversos desafíos que enfrentar y resolver. Tal y como ya se mencionó previamente en los apartados 1.4.9 y 1.4.10 de la presente memoria, la medición de la LT es uno de los mayores retos para la implementación asistencial del estudio genético telomérico, al enfrentar importantes dificultades técnicas que requieren de maquinaria muy específica y personal altamente calificado. A pesar de que se han desarrollado diversos métodos

de análisis de la LT, éstos expresan su resultado en diferentes medidas no comparables entre ellas y presentan diversas ventajas y desventajas (**Tabla 4**), siendo imprescindible llegar a un consenso sobre el método a utilizar asistencialmente.

En segundo lugar, la heredabilidad epigenética de la longitud de los telómeros implica una herencia independiente de una variante genética patogénica en un gen relacionado con los telómeros [162]. La LT por sí sola presenta una heredabilidad del 36% al 78% [149], lo que contribuye al riesgo de enfermedad incluso cuando la variante genética en el complejo telomerasa es “*wild type*” [124]. Esto conduce a la aparición de anticipación genética y fenocopias, afectando a individuos con y sin una variante genética patogénica con un fenotipo fibrosante pulmonar progresivo independientemente del diagnóstico de EPID [42,60,124,125,162]. Concomitantemente, diversos factores influyen en la LT de un individuo a lo largo de su vida, siendo la LT una característica multifactorial (**Fig. 11**) y, por tanto, difícil de estandarizar.

Dadas estas dificultades, la patogenicidad de las variantes genéticas en genes relacionados con los telómeros no es posible predecirla con precisión utilizando únicamente la medida de LT [80]. Sin embargo, la LT sí puede argumentar causalidad dependiendo de la variante genética en concreto y de la historia clínica del paciente [80]. Por este motivo, es necesario interpretar e integrar los datos clínicos, biológicos, computacionales y de segregación, entre otros, de forma adecuada para afrontar las complejidades de la identificación de los determinantes genéticos del acortamiento de los telómeros [80,162].

2

HIPÓTESIS

2. Hipótesis

1. Los pacientes con fibrosis pulmonar y disfunción telomérica pueden presentar afectación extrapulmonar relevante para su manejo clínico
2. Identificar signos clínicos extrapulmonares puede sugerir la existencia de una disfunción telomérica subyacente en pacientes con fibrosis pulmonar sin agregación familiar de EPID
3. Conocer la probabilidad pretest de acortamiento telomérico en EPID sin agregación familiar permitiría seleccionar los pacientes candidatos a estudio genético, optimizando así los recursos sanitarios
4. La edad biológica, expresada mediante el acortamiento telomérico, tiene mayor valor predictivo que la edad cronológica en términos de supervivencia en EPID
5. El acortamiento telomérico impacta en el pronóstico de pacientes con fibrosis pulmonar
6. La disfunción telomérica podría influenciar en la morbilidad y mortalidad postrasplante pulmonar en pacientes con EPID
7. El trasplante pulmonar se considera el único tratamiento que mejora la supervivencia en EPID avanzada para aquellos pacientes que reúnen los criterios requeridos. Sin embargo, la tasa de éxito y posibles complicaciones posteriores pueden ser variables dependiendo de marcadores biológicos.
8. La disfunción telomérica podría asociar mayor mortalidad y morbilidad post-trasplante.

3

OBJETIVOS



3. Objetivos

1. Evaluar las características clínicas predictoras de acortamiento telomérico en pacientes con FPI
2. Analizar la probabilidad pretest de acortamiento telomérico en pacientes con FPI
3. Determinar qué pacientes con FPI esporádica serían candidatos a estudio de longitud telomérica
4. Investigar el impacto del acortamiento telomérico sobre la supervivencia en pacientes con FPI (esporádica y familiar)
5. Estudiar el valor predictivo pronóstico del acortamiento telomérico en pacientes con FPI
6. Evaluar la morbilidad, mortalidad y calidad de vida post trasplante pulmonar en pacientes con EPID fibrosante progresiva y disfunción telomérica
7. Analizar la viabilidad del trasplante pulmonar en términos de supervivencia y calidad de vida post trasplante en EPID fibrosante con disfunción telomérica

4

MATERIAL MÉTODOS Y RESULTADOS

4. Material, métodos y resultados

4.1 Predictive factors and prognostic effect of telomere shortening in pulmonary fibrosis

RESUMEN:

El acortamiento anormal de los telómeros, como mecanismo que vincula envejecimiento celular con la FPI, podría ser de utilidad para la práctica clínica. El objetivo de este estudio fue identificar los pacientes con FPI con mayor riesgo de AT e investigar las implicaciones clínicas de dicho acortamiento.



Métodos: se incluyeron pacientes con FPI esporádica de forma consecutiva al diagnóstico y se siguieron clínicamente durante 3 años. Previo al inicio del tratamiento antifibrótico, se analizó la LT en ADN de linfocitos de sangre periférica mediante qPCR y *Southern Blot*. Para validar los resultados de la cohorte española, se utilizaron muestras de ADN de linfocitos de sangre periférica de una cohorte mejicana de pacientes con FPI esporádica. Los resultados se evaluaron según la mortalidad o la necesidad de trasplante de pulmón. Para el análisis estadístico se utilizó un modelo de regresión logística multivariante.

Resultados: La agregación familiar, la edad <60 años y la presencia de alteraciones inmunológicas y/o hematológicas inespecíficas se asociaron con una mayor probabilidad de AT. Durante el periodo de seguimiento del estudio, el 66,6% de los pacientes menores de 60 años con AT falleció o requirió trasplante pulmonar independientemente del grado de afectación funcional respiratoria al diagnóstico. En cambio, los pacientes mayores de 60 años con AT no presentaron de forma significativa peor supervivencia o mayor necesidad de trasplante pulmonar.

Conclusiones: Estos resultados indican que los pacientes con FPI esporádica jóvenes (<60 años) con alguna alteración inmunológica y/o hematológica inespecífica asociada presentaron mayor riesgo de AT con un peor pronóstico.

ORIGINAL ARTICLE

Predictive factors and prognostic effect of telomere shortening in pulmonary fibrosis

LURDES PLANAS-CEREZALES,^{1,2} ELENA G. ARIAS-SALGADO,^{3,4}  IVETTE BUENDIA-ROLDÁN,⁵ ANA MONTES-WORBOYS,^{1,2} CRISTINA ESQUINAS LÓPEZ,^{1,6} VANESA VICENS-ZYGMUNT,² PATRICIO LUBURICH HERNAIZ,⁷ ROGER LLATJÓS SANUY,⁸ VIRGINIA LEIRO-FERNANDEZ,^{9,10} EVA BALCELLS VILARNAU,^{1,11} ERNEST SALA LLINÁS,^{1,12} JORDI DORCA SARGATAL,^{1,2} ROSARIO PERONA ABELLÓN,⁴ MOISÉS SELMAN⁵ AND MARIA MOLINA-MOLINA^{1,2} 

¹Centro de Investigación en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Madrid, Spain; ²Unidad Funcional de Intersticio Pulmonar, Servicio Neumología, Hospital Universitario de Bellvitge, Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL), Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain; ³Advanced Medical Projects, Madrid, Spain; ⁴Instituto de Investigaciones Biomédicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)/Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Centro de Investigación en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid, Spain; ⁵Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, "Ismael Cosío Villegas", México City, Mexico; ⁶Servicio de Neumología, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; ⁷Unidad Funcional de Intersticio Pulmonar, Servicio Radiodiagnóstico, Hospital Universitario de Bellvitge, Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL), Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain; ⁸Unidad Funcional de Intersticio Pulmonar, Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario de Bellvitge, Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL), Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain; ⁹Servicio de Neumología, Complejo Hospitalario Universitario de Vigo (CHUVI), Vigo, Spain; ¹⁰Grupo de Investigación en Respiratorio, Instituto de Investigación Biomédica de Vigo, Vigo, Spain; ¹¹Servicio de Neumología, Hospital del Mar, Instituto Hospital del Mar de Investigaciones Médicas (IMIM), Universidad Pompeu Fabra (UPF), Barcelona, Spain; ¹²Servicio de Neumología, Hospital Son Espases, Instituto de Investigación Sanitaria Islas Baleares (IdISBa), Palma de Mallorca, Spain

ABSTRACT

Background and objective: The abnormal shortening of telomeres is a mechanism linking ageing to idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) that could be useful in the clinical setting. The objective of this study was to identify the IPF patients with higher risk for telomere shortening and to investigate the outcome implications. **Methods:** Consecutive Spanish patients were included at diagnosis and followed up for 3 years. DNA blood samples from a Mexican cohort were used to validate the results found in Spanish sporadic IPF. Prior to treatment, telomere length was measured through quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and Southern blot. Outcome was assessed according to mortality or need for lung transplantation. A multivariate regression logistic model was used for statistical analysis.

Results: Family aggregation, age of <60 years and the presence of non-specific immunological or haematological abnormalities were associated with a higher probability of telomere shortening. Overall, 66.6% of patients younger than 60 years with telomere shortening died or required lung transplantation, independent of functional impairment at diagnosis. By contrast, in patients older than 60 years with telomere shortening,

SUMMARY AT A GLANCE

The study establishes predictive factors for telomere shortening in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and demonstrates clinical implications in pulmonary fibrosis. Sporadic IPF patients younger than 60 years and/or presenting non-specific immunological or haematological abnormalities were at higher risk of telomere shortening. A poor prognosis is more frequently associated with a young disease onset.

the negative impact of telomere shortening in outcome was not significant.

Conclusion: Our data indicate that young sporadic IPF patients (<60 years) with some non-specific immunological or haematological abnormalities had higher risk of telomere shortening, and furthermore, they presented a poorer prognosis.

Key words: familial pulmonary fibrosis, genetics, idiopathic pulmonary fibrosis, telomere disorders, telomere shortening.

INTRODUCTION

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is the most devastating interstitial lung disease (ILD). Although the pathogenesis remains unclear, there is evidence that IPF is an age-related disease. The mechanisms linking IPF to ageing, including abnormal shortening of telomeres,

Correspondence: Maria Molina-Molina, Respiratory Department, University Hospital of Bellvitge, Feixa Larga s/n, 16th Floor, Hospitalet de Llobregat, Barcelona 08907, Spain. Email: mariamolnamolina@hotmail.com

Received 11 November 2017; invited to revise 15 January and 6 May 2018; revised 13 February and 7 July 2018; accepted 12 September 2018 (Associate Editor: Elisabetta Renzoni; Senior Editor: Yuben Moodley).

are currently under study.^{1–11} The frequency of telomerase mutations accounts for 8–15% of cases of familial pulmonary fibrosis (FPF) and 1–3% for sporadic cases, with an autosomal-dominant inheritance and age-dependent penetrance.^{1,6} Importantly, however, telomere attrition has been identified even in the absence of telomerase mutations.^{2,9} There is also evidence that IPF may be more likely to develop in subjects with the shortest telomeres.^{2,7} Thus, telomere shortening is a risk factor in developing the disease. Short telomeres are detected in lymphocytes, granulocytes and alveolar epithelial cells.² Moreover, pulmonary fibrosis may occur in the setting of a complex syndrome in which telomere dysfunction may associate extra-pulmonary manifestations.¹ This systemic effect could explain the post-transplant lung complications and drug-related toxicities.^{12,13} Furthermore, poor patient outcome has been recently associated with short telomeres.^{14,15}

In this context, the identification of a telomere-mediated disorder in lung fibrosis is relevant for prognostic implications, diagnostic approach and treatment of patients facing lung transplant. Therefore, the evaluation of telomere length (TL) would be helpful for personalizing the management of IPF patients. However, two facts must be considered: (i) telomere shortening has been described in a minority of IPF patients^{14,16} and (ii) genetic studies are expensive and complex, and their availability depends on the skilled technicians and economic resources. Thus, optimizing the clinical suspicion of telomere involvement in IPF would be relevant to improve the diagnostic yield. Hence, we evaluated clinical features that help to identify IPF patients with higher risk of telomere shortening.

METHODS

Study cohorts

This observational prospective study was approved by the Ethics Committee of University Hospital of Bellvitge (approval number PR082/13), and all patients signed the written informed consent before inclusion in the study. The derivation cohort consisted of 106 consecutive IPF patients referred to the ILD unit from June 2013, who were evaluated at diagnosis and followed up for 3 years. Lung transplantation and mortality were reported. IPF diagnosis was established in accordance with guidelines.^{17,18} FPF was considered when two or more relatives from the same family were affected.

Epidemiological and clinical data were collected. All patients were tested using the same haematological and immunological panel (Tables S1, S2, Supplementary Information). The criteria for considering non-specific haematological abnormality was the presence of a decrease in the haemoglobin (Hb, <12 g/L for females and <13 g/L for males), platelet (<150 000/L) and/or leucocyte values (<3900/L), following the World Health Organization (WHO) definitions, in at least two different determinations, with no identified cause and no clinical relevance. The criteria for considering non-specific immunological abnormality was the increase of auto-antibodies, in two separate blood analyses, but without the titre required to be considered an immunological domain (Table S2, Supplementary Information). An

expert rheumatologist evaluated every patient with some of these immunological abnormalities. Patients with connective tissue disease (CTD) or interstitial pneumonia with autoimmune features (IPAF), asbestosis or any other type of fibrotic ILD were not included.¹⁹ All patients signed a written informed consent for genetic testing. The telomere study was performed at the moment of diagnosis.

The independent validation cohort (Mexican cohort) consisted of 102 IPF patients, blindly selected, with no history of family aggregation and diagnosed at the 'Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Ismael Cosío Villegas', Mexico City, following published criteria.¹⁷ The normal values for the Mexican cohort were the same except in the evaluation of anaemia; due to the difference in altitude, the WHO definitions were adjusted by altitude (2250 m) and anaemia was considered when Hb was <13.2 g/L in females and <14.8 g/L in males.²⁰ All patients consented to be included for genetic testing and the protocol was approved by the Bioethical Committee.

The control population utilized to obtain the telomere z-score consisted of 243 healthy subjects, with no cancer, no respiratory disease, nor any degenerative disorders such as diabetes, haematological, liver or kidney disease. Seventy-one percent were Caucasian and 29% Hispanic. DNA was obtained by oral swab and peripheral blood. More details are in Figures S1 and S2 (Supplementary Information). The Bioethical Committee approved the protocol and all subjects consented to inclusion.

Sample collection

TL analysis was performed using DNA samples isolated from mouth epithelial cells and peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Oral swabs (Isohelix, SK-2S, Cell Projects Ltd), previously validated in normal subjects and other telomeropathies, were used for collection of cheek epithelial cells and DNA was extracted using a commercial kit (Isohelix, Cell Projects Ltd).^{21–23} DNA from PBMC was obtained as previously described.²⁴

TL analysis

The relative TL was assessed by quantitative polymerase chain reaction (qPCR), as previously described,²⁴ and then was confirmed by Southern blot. The qPCR determines the ratio of telomere (T) repeat copy number to single-copy (S) gene (*36B4*) copy number (T/S ratio) in experimental samples, as compared with a reference DNA sample. This methodology was also validated for the TL measurement in buccal cells. As TL changes with age, a z-score value was obtained to allow the comparisons between individuals of different ages. The z-score compared the T/S value in each individual with the age-matched mean and SD of the values obtained in the controls (individual's value – population mean/population SD, age-matched population of within 9 years on average). The z-score below the 25th percentile of a normal distribution was considered telomere shortening. Severe TL reduction was identified when z-score was below the 10th and 1st percentiles.

Telomere shortening was also measured from blood DNA of each patient by Southern blot analysis of telomere restriction fragment (TRF) (TeloTAGGG Telomere Length Assay, Roche), which was considered the gold standard to determine TL.^{24,25} Correlation of TL measurements by using both methods are detailed in Figure S3 (Supplementary Information). Analysis from both cohorts was done in the same laboratory.

Statistical analysis

Descriptive statistics were expressed as mean (SD) or median (interquartile range) and valid percentage for continuous and categorical data, respectively. The relationship between the length of telomeres and clinical variables was assessed using the chi-square test (exact Fisher test with observed frequencies <5) for categorical variables, whereas continuous variables were tested using t-test (Mann-Whitney U-test when not normally distribution).

Clinical variables that showed association with the presence of telomere shortening on univariate analysis (P -value < 0.1) were used to construct the corresponding multivariate logistic regression backward stepwise model. Receiver operating characteristic (ROC) curves were constructed to predict the presence of telomere shortening. The Hosmer-Lemeshow goodness-of-fit test was performed to assess the overall fit of the model.²⁶ Finally, predictors from this model were used to test the probability of telomere shortening, which was calculated by following this formula: $\text{Exp}(b)$

($1 + \text{Exp}(b)$), where $b = -1.088 + 1.069$ (in the case of presence of immunological abnormalities) + 1.422 (in the case of presence of haematological abnormalities) + 0.987 (if age < 60 years).

The 3-year survival data was calculated through multivariate Cox regression model. Survival graphics were done using the Kaplan-Meier method, and differences were assessed with the log-rank statistic. Hazard ratios (HR) and 95% CI were calculated. Data for mortality analysis were censored at the date of death or lung transplant. Patients lost to follow-up were censored at the last visit date.

All tests were two-tailed, and significance was set at 5%. Statistical software package for Windows (SPSS version 20.0, IBM, Chicago, IL, USA) was used.

RESULTS

Patient characteristics

A total of 106 patients from derivation cohort, 68 IPF and 38 FPF (from 28 different pedigrees) were included. As shown in Table 1, FPF patients were younger than the IPF population ($P = 0.021$), while the male/female ratio was higher in the IPF group ($P = 0.046$). ANA < 1:320 titres were the most common non-specific immunological abnormality. Mild platelet count reductions and mild anaemia were the most prevalent haematological abnormalities (Table 1).

Table 1 Patient characteristics from derivation and Mexican cohorts

	Derivation cohort ($n = 106$)			Mexican cohort ($n = 102$)	
	n (%)		P -value [†]	n (%)	
	FPF patients ($n = 38$)	IPF patients ($n = 68$)		IPF patients ($n = 102$)	P -value [‡]
Age (years, mean (SD))	60.8 (11.9)	66.3 (10.9)	0.021	65.0 (8.3)	0.157
Males	21 (56.8)	52 (76.5)	0.046	85 (83.3)	0.268
Smoking history			0.324		0.521
Non-smoker	17 (45.6)	22 (32.4)		27 (31.8)	
Current smoker	2 (5.4)	2 (2.9)		6 (7.1)	
Former smoker	18 (48.6)	44 (64.7)		52 (61.2)	
Non-specific haematological abnormalities	5 (13.5)	10 (14.7)	0.881	49 (48)	<0.001
Platelet decrease	0 (0.0)	5 (7.4)		10 (9.8)	
Anaemia	4 (10.5)	1 (1.5)		38 (37.2)	
Non-specific immunological abnormalities	11 (29)	11 (16.2)	0.209	34 (33.3)	0.013
ANA 1 < 320 homogenic pattern	3 (7.9)	3 (4.4)		29 (28.4)	
Other	8 (21.1)	8 (11.8)		5 (4.9)	
Signs of telomere syndrome [§]	2 (5.4)	0 (0.0)	0.674	0 (0.0)	NA
Relative telomere length, mean (SD)	1.0 (0.3)	1.3 (0.3)	<0.001	1.65 (0.6)	<0.001
z-Score, mean (SD)	-1.5 (1.0)	-0.6 (0.99)	<0.001	-0.337 (1.5)	0.453
Telomere shortening	31 (81.6)	26 (38.2)	<0.001	42 (41.2)	0.048
<25th Percentile	7 (22.6)	10 (38.4)		20 (47.6)	
<10th Percentile 10	13 (41.9)	8 (30.8)		10 (23.8)	
<1st Percentile	11 (35.5)	8 (30.8)		12 (28.6)	

[†]Mann-Whitney U-test or chi-square test comparing IPF and FPF patients from derivation cohort.

[‡]Mann-Whitney U-test or chi-square test comparing IPF patients from derivation and Mexican cohort.

[§]Signs of telomere syndrome in these two patients included: premature hair greying, menopause and cryptogenic liver cirrhosis. ANA, Anti-Nuclear Antibody; FPF, familial pulmonary fibrosis; IPF, idiopathic pulmonary fibrosis; NA, not applicable.

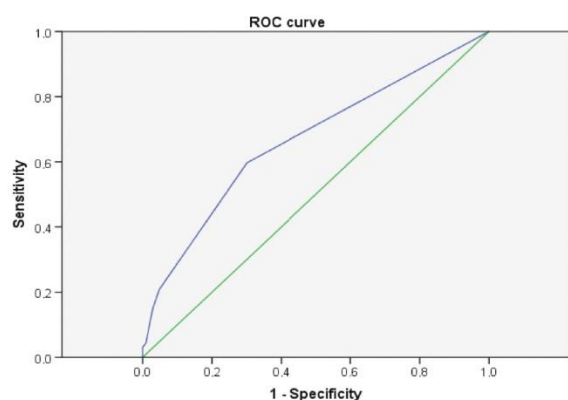


Figure 1 Probability of telomere shortening in idiopathic pulmonary fibrosis patients. Receiver operating characteristic analysis of significant variables derived from the logistic regression model in its capacity to predict presence of telomere shortness (area under the curve: 0.670, SE: 0.044, $P < 0.001$, 95% CI: 0.580–0.751).

Reduced TL was first identified by using oral swab (Supplementary Information, Fig. 1). Peripheral blood telomere shortening was found in 57 of 106 (53.8%) Spanish patients (Table 1). FPF patients presented higher prevalence of telomere shortening (81.6%) with a shorter TL compared with sporadic IPF (38.2%) ($P < 0.001$) (Table 1). A positive correlation was observed between the two sets of TL measurements performed by both the qPCR–Southern blot of blood DNA and by the qPCR on DNA extracted from buccal cells ($R = 0.690$) (Fig. S3, Supplementary Information). One hundred and two sporadic IPF patients from the Mexican cohort were evaluated to validate the predictive factors for telomere shortening in the derivation

cohort by using blood DNA (Fig. S2, Supplementary Information). Table 1 summarizes the Mexican IPF patient characteristics.

Clinical features for predicting telomere shortening

To evaluate whether telomere attrition could be associated with some potential predictive factors, we analysed the differences between patients with and without reduced TL (Table 2). Patients with telomere shortening were younger ($P = 0.001$), without difference in smoking status (Table 2).

The main predictive factor for telomere shortening was family aggregation. To determine whether some clinical variables could be related to telomere shortening in patients with no family aggregation, we performed a multivariate logistic regression analysis. Independent variables were selected from the univariate analysis according to P -value < 0.1 : age transformed as a binary variable (< 60 years), non-specific haematological and immunological abnormalities. Telomere shortening was considered a dependent variable. As shown in Figure 1, IPF patients younger than 60 years and those with non-specific immunological or haematological abnormalities had a higher risk of reduced TL. Pre-test probability modelling including these three independent clinical variables associated with telomere shortening was used. The probability of telomere shortening increased progressively with the number of putative predictors. Therefore, the probability for telomere shortening in an IPF patient without any of these characteristics would be 25.2%, rising to 91.6% for those having all three variables (Table 3). This final model was well calibrated, with P -values of 0.889, by using the Hosmer–Lemeshow test. The capacity of the significant variables derived from the logistic regression model to

Table 2 Patient characteristics according to telomere shortening

	IPF patients from derivation and Mexican cohort $n = 170$		P -value	FPF patients from derivation cohort $n = 38$		P -value
	No telomere shortening $n = 103$	Telomere shortening $n = 67$		No telomere shortening $n = 6$	Telomere shortening $n = 32$	
Age (years, mean (SD))	67.5 (8.6)	62.5 (9.9)	0.001	63 (10.6)	60.0 (12.4)	0.568
Males	81 (78.6)	56 (83.6)	0.426	4 (66.7)	18 (56.5)	0.635
Smoking history			0.354			0.038
Non-smoker	28 (30.8)	21 (33.9)		0 (0)	17 (53.1)	
Current smoker	3 (3.3)	5 (8.1)		1 (16.7)	1 (3.1)	
Former smoker	60 (65.9)	36 (58.1)		5 (83.3)	14 (43.8)	
Non-specific haematological abnormalities	32 (31.1)	25 (37.3)	0.339	1 (16.7)	5 (15.7)	0.947
Non-specific immunological abnormalities	19 (18.4)	26 (38.8)	0.003	2 (33.3)	8 (25)	0.671
Bone marrow aplasia, $n = 68$	0	1 (4)	0.186	0	1 (3.1)	0.661
Signs of telomeric syndrome (early greying hair)	0	0	0.186	0	2 (6.5)	0.661
Relative telomere length, mean (SD)	1.725 (0.53)	1.141 (0.28)	<0.001	1.405 (0.09)	0.979 (0.24)	<0.001
z-Score, mean (SD)	−0.283 (1.06)	−1.539 (0.74)	<0.001	−0.161 (0.23)	−1.794 (0.89)	<0.001

FPF, familial pulmonary fibrosis; IPF, idiopathic pulmonary fibrosis.

Table 3 Probability of telomere shortening in IPF patients with no family aggregation

Presence of immunological abnormalities	Presence of haematological abnormalities	Age < 60 years	Probability of presence of telomere shortness (%)	
–	–	–	25.2	
+	–	–	49.5	
–	+	–	58.3	
–	–	+	47.5	
+	+	–	80.3	
+	–	+	72.5	
–	+	+	78.9	
+	+	+	91.6	
Multivariate logistic regression model for telomere shortening				
Independent variables		OR	95% CI	P-value
Non-specific immunological disorders		2.913	1.409–6.024	0.004
Non-specific haematological disorders		4.145	1.010–17.655	0.049
Age < 60 years		2.684	1.297–5.553	0.008

IPF, idiopathic pulmonary fibrosis.

predict telomere shortening was evaluated through ROC curve with an area under the curve (AUC) of 0.670 (95%CI: 0.580–0.751, $P < 0.001$) (Fig. 1).

Disease outcome and telomere shortening

To evaluate the role of telomere shortening in prognosis, the 3-year survival (lung transplantation and mortality) was compared among patients with and without telomere attrition. Of the 106 patients, 16 (15.1%) returned to their referral hospital and the follow-up was lost. Among the 90 patients who were followed up, 29 patients received anti-fibrotic treatment (pirfenidone $n = 16$, nintedanib $n = 13$, 15 cases with telomere shortening and 14 cases without). 27.8% of IPF patients and 34.4% of FPF died or required lung transplant. Lung transplantation was performed in 12 (13.3%) cases, most of them (83.3%) with telomere shortening. Mortality was reported in 15 (16.7%) patients and 9 (60%) showed telomere shortening. The cause of death was related to IPF progression. No impact of anti-fibrotic treatment was observed on survival differences, although the number of treated cases was limited as both drugs were commercially

approved after the recruitment began. Thus, reduced TL would have a negative impact on the 3-year survival rate (Table 4).

A multivariate logistic COX regression analysed the possible implication of clinical characteristics associated with telomere shortening (immunological or haematological minor abnormalities and age) and disease progression (baseline forced vital capacity (FVC) and diffusing capacity for carbon monoxide (DL_{CO}) and gender). Age was the strongest related factor associated with poor outcome. Remarkably, the 3-year survival rate was significantly lower in younger patients (< 60 years, 44% vs 81%, respectively, $P = 0.010$) (Table 4, Fig. S4 (Supplementary Information)), although all of them had a GAP index I, stage I, at diagnosis. No differences were found in FVC and DL_{CO} among patients ($P > 0.05$). IPF and FPF patients younger than 60 years with telomere shortening presented higher probability for lung transplant or death (HR = 3.579, 95% CI: 1.074–10.900) (Fig. 2).

Data on extra pulmonary affection and non-specific immunological and haematological abnormalities are included in Tables S1–S5 (Supplementary Information).

Table 4 Lung transplant and mortality in patients according to age and telomere shortening

	Age < 60 years ($n = 27$)				Age > 60 years ($n = 63$)			
	IPF $n = 15$		FPF $n = 12$		IPF $n = 46$		FPF $n = 17$	
Final number of patients in follow-up	Telomere shortening $n = 9$	No telomere shortening $n = 6$	Telomere shortening $n = 12$	No telomere shortening $n = 0$	Telomere shortening $n = 15$	No telomere shortening $n = 31$	Telomere shortening $n = 10$	No telomere shortening $n = 7$
% Death or lung transplant	56% ($n = 14$)				19% ($n = 12$)			
Transplant (n)	66.6%	16.6%	66.6%	0	26.6%	19.4%	10%	14.3%
Deaths (n)	5	0	4	0	0	2	1	0
	1	1	4	0	4	4	0	1

FPF, familial pulmonary fibrosis; IPF, idiopathic pulmonary fibrosis.

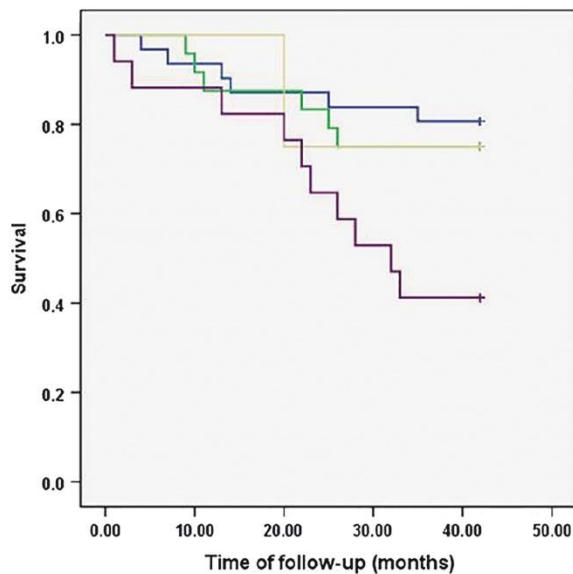


Figure 2 Transplant-free survival (TFS) time according to the presence or absence of telomere shortening (TS) and age lower or higher than 60 years. TFS period was considered the time from study baseline to the date of death or lung transplantation. A combined outcome variable (death or lung transplantation) was estimated. Patients who survived or did not have a transplant throughout follow-up were censored at the date of the end of the study. A total of 26 patients had a transplant or died during follow-up study period. Patients younger than 60 years with TS had statistically lower mean follow-up time ($P = 0.034$). —, Absence of TS and age ≥ 60 years; —, presence of TS and age ≥ 60 years; —, absence of TS and age < 60 years; —, presence of TS and age < 60 years

DISCUSSION

The study reveals for the first time that sporadic IPF patients younger than 60 years display a high pre-test probability for reduced TL that increases even more when non-specific haematological and/or immunological abnormalities are present. Furthermore, telomere shortening would be a valuable marker of outcome, especially in those cases younger than 60 years of age. Therefore, while age has been described as a prognostic factor in the global IPF population (worse prognosis in older patients), our results show the poorest prognosis in young IPF patients with telomere shortening. Hence, telomere (biological) age would be a better prognostic factor than chronological age.

Our most important finding was the different ratio of shortened telomeres depending on the clinical phenotype. Thus, although the overall probability of telomere shortening was 25%, in those patients younger than 60 years of age who presented some non-specific immunological and haematological abnormalities, the probability was almost 100%. In addition, even in IPF patients older than 60 years, the age group at which most of them are diagnosed,¹⁷ the presence of the identified blood or immunological abnormalities may increase suspicion of an impact of telomere shortening on outcome. Family aggregation is the most robust independent predictive factor for telomere shortening.^{27,28} However, another

strong predictive factor evidenced by our results is age, in accordance with the recent data from Newton *et al.*²⁹ and Borie *et al.*³⁰ for telomere mutations in FPF.

A reduction of TL has been recently associated with worse survival in retrospective cohorts.^{12,29–34} Newton *et al.* reported a 2–3-year survival rate in the analysis of telomere-related gene mutations from 64 families. However, the mean age for those mutation carriers was 58 ± 10 years.²⁹ The results from our prospective cohort highlight that the prognosis associated with telomere shortening depends in part on the age of disease onset, suggesting that the sooner the lung fibrotic process develops the faster the lung ageing and disease progression occur. Several hypotheses could explain this observation, including genetic anticipation and higher cell turnover in younger patients with the same gene defect.

Another important novelty of this study is the use of an oral swab as an easy non-invasive method for TL assessment that presents a good correlation with the blood DNA analysis. This test could be performed at the patient's home, thereby facilitating the screening of gene mutation carriers.

The prevalence of telomere attrition in our FPF patients is higher than described, probably as most previous studies considered telomere shortening under the 10th percentile.^{16,35,36} However, other telomere diseases may develop with a telomere reduction under the 25th percentile.³⁷ Furthermore, we also found a negative impact on disease outcome with this degree of telomere reduction.

The main limitations of the present study are the small sample size of the subgroup of patients younger than 60 years (which reduces the statistical power) and the lack of other genetic analysis such as MUC5B or SP gene variants.²⁸ Furthermore, the possible effect of environmental exposures on TL could only be analysed for tobacco.

In conclusion, identification of telomere shortening in pulmonary fibrosis is important in predicting patient outcome. Our study determines a probability pre-test model for telomere shortening that detects IPF patients with higher risk and, therefore, that most benefit from genetic study.

Acknowledgements

The authors thank Laura Pintado Berninches and Carlos Machahua Huamani for the technical laboratory support in the study and Ignacio Escobar Campuzano for his relevant contribution at the MDT case diagnosis as a thoracic surgeon. Furthermore, the authors appreciate the contributions of Anna Bachs and Josep M. Palma in obtaining blood samples, as well as the Spanish association AFEFPI and the IPF group of AIRE for their participation. The authors would like to recognize the contribution of Cristina Vilena for coordination of the Biobank of CIBERES. This study was funded by Instituto de Salud Carlos III through project P115/00710 (Co-funded by European Regional Development Fund, ERDF, a way to build Europe) and project P114-01495-FEDER through the Biomedical National Research Network CIBER, the Spanish and Catalan Respiratory Societies SEPAR and SOCAP, and the research foundations FUCAP and Barcelona Respiratory Network (BRN).

Abbreviations: ANA, Anti-Nuclear Antibody; DL_{CO}, diffusing capacity for carbon monoxide; DNA, deoxyribonucleic acid; FPF, familial pulmonary fibrosis; FVC, forced vital capacity; HR, hazard ratio; ILD, interstitial lung disease; PBMC, peripheral

blood mononuclear cell; qPCR, quantitative PCR; ROC, receiver operating characteristic; T/S ratio, ratio of telomere (T) repeat copy number to single-copy (S) gene (*36B4*) copy number; TFS, transplant-free survival; TL, telomere length; TS, telomere shortening; WHO, World Health Organization.

REFERENCES

- Armanios M. Syndromes of telomere shortening. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2009; **10**: 45–61.
- Armanios M. Telomerase and idiopathic pulmonary fibrosis. *Mutat. Res.* 2012; **730**: 52–8.
- Armanios M, Blackburn E. The telomere syndromes. *Nat. Rev. Genet.* 2012; **13**: 693–704.
- Townsley DM, Dumitriu B, Young NS. Bone marrow failure and the telomeropathies. *Blood* 2014; **124**: 2775–83.
- Armanios M. Telomeres and age-related disease: how telomere biology informs clinical paradigms. *J. Clin. Invest.* 2013; **123**: 996–1002.
- Alder JK, Cogan JD, Brown AF, Anderson CJ, Lawson WE, Lansdorp PM, Phillips JA 3rd, Loyd JE, Chen JJ, Armanios M. Ancestral mutation in telomerase causes defects in repeat addition processivity and manifests in familial pulmonary fibrosis. *PLoS Genet.* 2011; **7**: e1001352.
- Tsakiri KD, Cronkhite JT, Kuan PJ, Xing C, Raghu G, Weissler JC, Rosenblatt RL, Shay JW, Garcia CK. Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007; **104**: 7552–7.
- Hao LY, Armanios M, Strong MA, Karim B, Feldser DM, Huso D, Greider CW. Short telomeres, even in the presence of telomerase, limit tissue renewal capacity. *Cell* 2005; **123**: 1121–31.
- Armanios M, Alder JK, Parry EM, Karim B, Strong MA, Greider CW. Short telomeres are sufficient to cause the degenerative defects associated with aging. *Am. J. Hum. Genet.* 2009; **85**: 823–32.
- Selman M, Pardo A. Revealing the pathogenic and aging-related mechanisms of the enigmatic idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2014; **189**: 1161–72.
- Von Zglinicki T, Martin-Ruiz CM. Telomeres as biomarkers for ageing and age-related diseases. *Curr. Mol. Med.* 2005; **5**: 197–203.
- Silhan LL, Shah PD, Chambers DC, Snyder LD, Riise GC, Wagner CL, Hellström-Lindberg E, Orens JB, Mewton JF, Danoff SK *et al.* Lung transplantation in telomerase mutation carriers with pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. J.* 2014; **44**: 178–87.
- Newton CA, Kozlitiņa J, Lines JR, Kaza V, Torres F, Garcia CK. Telomere length in patients with pulmonary fibrosis associated with chronic lung allograft dysfunction and post-lung transplantation survival. *J. Heart Lung Transplant.* 2017; **36**: 845–53.
- Stuart BD, Lee JS, Kozlitiņa J, Noth I, Devine MS, Glazer CS, Torres F, Kaza V, Girod CE, Jones KD *et al.* Effect of telomere length on survival in idiopathic pulmonary fibrosis: an observational study with independent validation. *Lancet Respir. Med.* 2014; **2**: 557–65.
- Stella GM, Balestro E, Lacedonia D, Baraldo S. Telomeropathies: an emerging spectrum of disorders with important implications for patients with interstitial lung disease. *Minerva Med.* 2016; **107** (Suppl. 1): 9–14.
- Cronkhite JT, Xing C, Raghu G, Chin KM, Torres F, Rosenblatt RL, Garcia CK. Telomere shortening in familial and sporadic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2008; **178**: 729–37.
- Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, Colby TV, Cordier JF, Flaherty KR, Lasky JA *et al.*; ATS/ERS/JRS/ALAT Committee on Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2011; **183**: 788–824.
- Travis WD, Costabel U, Hansell DM, King TE Jr, Lynch DA, Nicholson AG, Reyerson CJ, Ryu JH, Selman M, Wells AU *et al.*; ATS/ERS Committee on Idiopathic Interstitial Pneumonias. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2013; **188**: 733–48.
- Fischer A, Antoniou KM, Brown KK, Cadranel J, Corte TJ, du Bois RM, Lee JS, Leslie KO, Lynch DA, Matteson EL *et al.* An official European Respiratory Society/American Thoracic Society research statement: interstitial pneumonia with autoimmune features. *Eur. Respir. J.* 2015; **46**: 976–87.
- Beall CM, Goldstein MC. Hemoglobin concentration of pastoral nomads permanently resident at 4850–5450 meters in Tibet. *Am. J. Phys. Anthropol.* 1987; **73**: 433–8.
- McMichael GL, Gibson CS, O’Callaghan ME, Goldwater PN, Dekker GA, Haan EA, MacLennan AH, South Australian Cerebral Palsy Research Group. DNA from buccal swabs suitable for high-throughput SNP multiplex analysis. *J. Biomol. Tech.* 2009; **20**: 232–5.
- Finnicum CT, Dolan CV, Willemsen G, Weber ZM, Petersen JL, Beck JJ, Codd V, Boomsma DI, Davies GE, Ehli EA. Relative telomere repeat mass in buccal and leukocyte-derived DNA. *PLoS One* 2017; **12**: e0170765.
- Gadalla SM, Cawthon R, Giri N, Alter BP, Savage SA. Telomere length in blood, buccal cells, and fibroblasts from patients with inherited bone marrow failure syndromes. *Aging (Albany NY)*. 2010; **2**: 867–74.
- Carrillo J, Martínez P, Solera J, Moratilla C, González A, Manguán-García C, Aymerich M, Canal L, Del Campo M, Dapena JL *et al.* High resolution melting analysis for the identification of novel mutations in DKC1 and TERT genes in patients with dyskeratosis congenital. *Blood Cells Mol. Dis.* 2012; **49**: 140–6.
- Gutiérrez-Rodríguez F, Santana-Lemos BA, Scheucher PS, Alves-Paiva RM, Calado RT. Direct comparison of flow-FISH and qPCR as diagnostic tests for telomere length in humans. *PLoS One* 2014; **9**: e113747.
- Hosmer DW, Lemeshow S. *Applied Logistic Regression*, 1st edn. New York, John Wiley and Sons Inc, 1989.
- Steele MP, Speer MC, Loyd JE, Brown KK, Herron A, Slifer SH, Burch LH, Wahidi MM, Phillips JA 3rd, Sporn TA *et al.* Clinical and pathologic features of familial interstitial pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2005; **172**: 1146–52.
- Borie R, Kannengiesser C, Nathan N, Tabèze L, Pradere P, Crestani B. Familial pulmonary fibrosis. *Rev. Mal. Respir.* 2015; **32**: 413–34.
- Newton CA, Batra K, Torrealba J, Kozlitiņa J, Glazer CS, Aravena C, Meyer K, Raghu G, Collard HR, Garcia CK. Telomere-related lung fibrosis is diagnostically heterogeneous but uniformly progressive. *Eur. Respir. J.* 2016; **48**: 1710–20.
- Borie R, Tabèze L, Thabut G, Nunes H, Cottin V, Marchand-Adam S, Prevot G, Tazi A, Cadranel J, Mal H *et al.* Prevalence and characteristics of TERT and TERC mutations in suspected genetic pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. J.* 2016; **48**: 1721–31.
- Thannickal VJ. Mechanistic links between aging and lung fibrosis. *Biogerontology* 2013; **14**: 609–15.
- Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell* 2013; **153**: 1194–217.
- Selman M, López-Otín C, Pardo A. Age-driven developmental drift in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. J.* 2016; **48**: 538–52.
- Dai J, Cai H, Li H, Zhuang Y, Min H, Wen Y, Yang J, Gao Q, Sji J, Yi L. Association between telomere length and survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respirology* 2015; **20**: 947–52.
- Snetselaar R, van Moorsel CH, Kazemier KM, van der Vis JJ, Zanen P, van Oosterhout MF, Grutters JC. Telomere length in interstitial lung diseases. *Chest* 2015; **148**: 1011–8.
- Garcia CK. Idiopathic pulmonary fibrosis: update on genetic disorders. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2011; **8**: 158–62.
- Opresko PL, Shay JW. Telomere-associated aging disorders. *Ageing Res. Rev.* 2017; **33**: 52–66.

38 Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002; **30**: e47.

Supplementary Information

Additional supplementary information can be accessed via the *html* version of this article at the publisher's website.

Figure S1. Telomere length analysis of derivation cohort.

Figure S2. Telomere length analysis of Mexican cohort.

Figure S3. Correlation between the two telomere length assays and the different cell types.

Figure S4. Differences in the 3-year survival time in IPF cases older versus younger than 60 years.

Table S1. Immunological data in IPF/FPF patients of derivation cohort.

Table S2. Haematological data reported in IPF/FPF patients of derivation cohort.

Table S3. Age distribution of the control population.

Table S4. Non-specific immunological/haematological disorders in patients aged <60 years.

Table S5. Non-specific immunological/haematological disorders in patients aged >60 years.

4.2 Lung Transplant Improves Survival and Quality of Life Regardless of Telomere Dysfunction

RESUMEN:

La EPID es la primera indicación de trasplante pulmonar actualmente. La disfunción telomérica se ha asociado con una elevada morbilidad y mortalidad postrasplante pulmonar. En este contexto, el objetivo del estudio fue evaluar la morbimortalidad y la calidad de vida de los pacientes con EPID fibrótica tras el trasplante pulmonar según la presencia o no de disfunción telomérica.

Métodos: los pacientes con EPID fibrosante que se sometieron a trasplante pulmonar se dividieron en 2 grupos, según la presencia o no de disfunción telomérica en el momento del diagnóstico. Se consideró disfunción telomérica la presencia de AT y de variantes genéticas en genes del complejo telomerasa identificadas mediante WES. La evaluación postrasplante incluyó: 1) mortalidad y complicaciones a corto y largo plazo; y, 2) calidad de vida postrasplante.

Resultados: el 55% de los pacientes trasplantados presentaron una variante genética rara en genes relacionados con el complejo telomerasa. Los pacientes con AT necesitaron con mayor frecuencia circulación extracorpórea y presentaron mayor tasa de complicaciones hematológicas en el postoperatorio inmediato, una estancia más prolongada en la unidad de cuidados intensivos y mayor número de ingresos hospitalarios a largo plazo. Sin embargo, la supervivencia al año postrasplante fue superior al 80% independientemente de la presencia de disfunción telomérica, con mejoría de la calidad de vida y retirada de oxigenoterapia.

Conclusiones: La morbilidad postrasplante es mayor en pacientes con disfunción telomérica y difiere según el tiempo transcurrido postrasplante. No obstante, el trasplante pulmonar mejora la calidad de vida a largo plazo y presenta complicaciones manejables con independencia de la disfunción telomérica.



Lung Transplant Improves Survival and Quality of Life Regardless of Telomere Dysfunction

Lurdes Planas-Cerezales¹, Elena G. Arias-Salgado^{2,3}, Cristina Berastegui⁴, Ana Montes-Worboys¹, Rafaela González-Montelongo⁵, José. M. Lorenzo-Salazar⁵, Vanesa Vicens-Zygmunt¹, Marta Garcia-Moyano⁶, Jordi Dorca¹, Carlos Flores^{5,7,8,9}, Rosario Perona^{2,3}, Antonio Román⁴ and María Molina-Molina^{1,9*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Ramóns Falfán-Valencia,
Instituto Nacional de Enfermedades
Respiratorias-México (INER), Mexico

Reviewed by:

Ernesto Juárez,
Hospital de Especialidades, Centro
Médico Nacional Siglo XXI, Mexico
Dmitri Churikov,
INSERM U1068 Centre de Recherche
en Cancérologie de Marseille
(CRCM), France

*Correspondence:

María Molina-Molina
mariamolinamolina@hotmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Pulmonary Medicine,
a section of the journal
Frontiers in Medicine

Received: 15 April 2021

Accepted: 27 May 2021

Published: 30 July 2021

Citation:

Planas-Cerezales L,
Arias-Salgado EG, Berastegui C,
Montes-Worboys A,
González-Montelongo R,
Lorenzo-Salazar JM,
Vicens-Zygmunt V, Garcia-Moyano M,
Dorca J, Flores C, Perona R, Román A
and Molina-Molina M (2021) Lung
Transplant Improves Survival and
Quality of Life Regardless of Telomere
Dysfunction. *Front. Med.* 8:695919.
doi: 10.3389/fmed.2021.695919

¹ILD Multidisciplinary Unit, Hospital Universitari Bellvitge, IDIBELL, Universitat de Barcelona, Hospitalet de Llobregat, Spain, ²Biomedical Research Institute CSIC/UAM, IdIPAZ, Madrid, Spain, ³Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, ⁴Respiratory Department, Institute of Research, Hospital Universitari Vall d'Hebrón, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, ⁵Genomics Division, Instituto Tecnológico y de Energías Renovables, Santa Cruz de Tenerife, Spain, ⁶Respiratory Department, Hospital Universitario Cruces, Barakaldo, Spain, ⁷Research Unit, Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Santa Cruz de Tenerife, Spain, ⁸Instituto de Tecnologías Biomédicas, Universidad de La Laguna, Santa Cruz de Tenerife, Spain, ⁹Centro Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

Introduction: Fibrotic interstitial lung diseases (ILDs) are the first indication for lung transplantation (LT). Telomere dysfunction has been associated with poor post-transplant outcomes. The aim of the study was to evaluate the morbi-mortality and quality of life in fibrotic ILDs after lung transplant depending on telomere biology.

Methods: Fibrotic ILD patients that underwent lung transplant were allocated to two arms; with or without telomere dysfunction at diagnosis based on the telomere length and telomerase related gene mutations revealed by whole-exome sequencing. Post-transplant evaluation included: (1) short and long-term mortality and complications and (2) quality of life.

Results: Fifty-five percent of patients that underwent LT carried rare coding mutations in telomerase-related genes. Patients with telomere shortening more frequently needed extracorporeal circulation and presented a higher rate of early post-transplant hematological complications, longer stay in the intensive care unit (ICU), and a higher number of long-term hospital admissions. However, post-transplant 1-year survival was higher than 80% regardless of telomere dysfunction, with improvement in the quality of life and oxygen therapy withdrawal.

Conclusions: Post-transplant morbidity is higher in patients with telomere dysfunction and differs according to elapsed time from transplantation. However, lung transplant improves survival and quality of life and the associated complications are manageable.

Keywords: interstitial lung disease, pulmonary fibrosis, genetics, telomere shortening, telomere disorders, lung transplantation

INTRODUCTION

Fibrotic interstitial lung diseases (ILDs) are comprised of parenchymal lung disorders with progressive, irreversible fibrosis that present a devastating clinical course (1). Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is the most lethal fibrotic ILD. Although new anti-fibrotic medications slow disease progression, lung transplantation (LT) remains the treatment option that improves lung function and survival in those cases that can benefit from this procedure (2). After several years with an increasing trend, fibrotic ILD is often now reported as the first indication for LT (3).

In previous studies, pulmonary fibrosis has been linked to aging and repair defects, especially telomere attrition (4–14). Rare coding mutations in telomere-maintenance genes (*TERT*, *TERC*, *PARN*, *RTEL1*, *DKC1*, *TINF2*, *NAF1*, *ACD*, *NOPI0*, *NHP2*) and telomere shortening have been identified in different fibrotic ILDs, irrespective of family aggregation (4–6, 9, 10, 12, 15, 16). Regardless of gene mutations and ILD diagnoses (17), telomere shortening has been associated with disease progression, reduced survival, and poor LT outcomes (18, 19). Telomeric disease onset frequently appears in young adults; therefore, LT may be necessary in most patients (18). However, some reports have shown a high morbidity and mortality related to LT in fibrotic ILD cases with telomere defects (20–25). Furthermore, increased immunosuppressive drug-related toxicities have also been reported (26, 27), especially during post-transplant prophylaxis regimens (20–22), probably due to the associated T cell immunodeficiency (28). Nevertheless, most studies evaluating the effect of telomere dysfunction in LT lack a control group that allow to differentiate those effects only attributed to this biological defect (20–24).

A systematic assessment of telomere length in the pre-transplant study could be useful for optimizing LT protocol among fibrotic ILD cases. However, limited data exists about the LT in pulmonary fibrosis depending on telomere biology and the different technical interventional approaches. The aim of the study was to compare the morbidity, mortality, and quality of life of fibrotic ILD patients that underwent LT with and without telomere dysfunction.

MATERIALS AND METHODS

Study Population

This prospective observational study included 20 patients from the ILD Unit of Hospital Universitari de Bellvitge (HUB) with any form of fibrotic ILD that underwent LT at the Hospital Universitari Vall d'Hebrón, in Barcelona. The Ethics Committee of HUB approved the study and all patients provided written informed consent before inclusion. A telomere genetic study was performed at the moment of diagnosis. Diagnosis was performed following the international clinical guidelines for ILDs (29–31). Patients were recruited at the time of referral to the LT evaluation, with a post-transplant follow-up period of at least 3 months. Patients were excluded if they did not consent to the telomere genetic test.

Clinical data were prospectively recorded from patient inclusion. Surgical, post-surgical procedure, and management protocols were blinded to the laboratory tests and followed national and international guidelines (32, 33). The Lung Allocation Score (LAS) was used to assess the allocating process of donated lungs. The decision for unilateral vs. bilateral lung transplant was based on the presence of pulmonary hypertension or microbiological colonization. In those cases, a bilateral lung transplant was performed. A standard immunosuppression regimen was initiated after LT and adjusted as tolerated. The prophylaxis for cytomegalovirus (CMV) was initiated after the surgical procedures in all patients, using ganciclovir 3–5 mg/kg/12 h during the Intensive Care Unit (ICU) stay, followed by valganciclovir 900 mg/day when oral intake was tolerated. The treatment was maintained for 12 months in serum-negative pre-transplant cases and 6 months for those serum-positive. The post-transplant evaluation included: (1) type of complications observed during the first 24 h, the first 30 days, and after the first month; and, (2) assessment of the quality of life after 6 months of LT based on an improvement of forced vital capacity (FVC) and health status questionnaires (K-BILD and ATAQ-IPF), oxygen therapy withdrawal and declared independence for daily life activities.

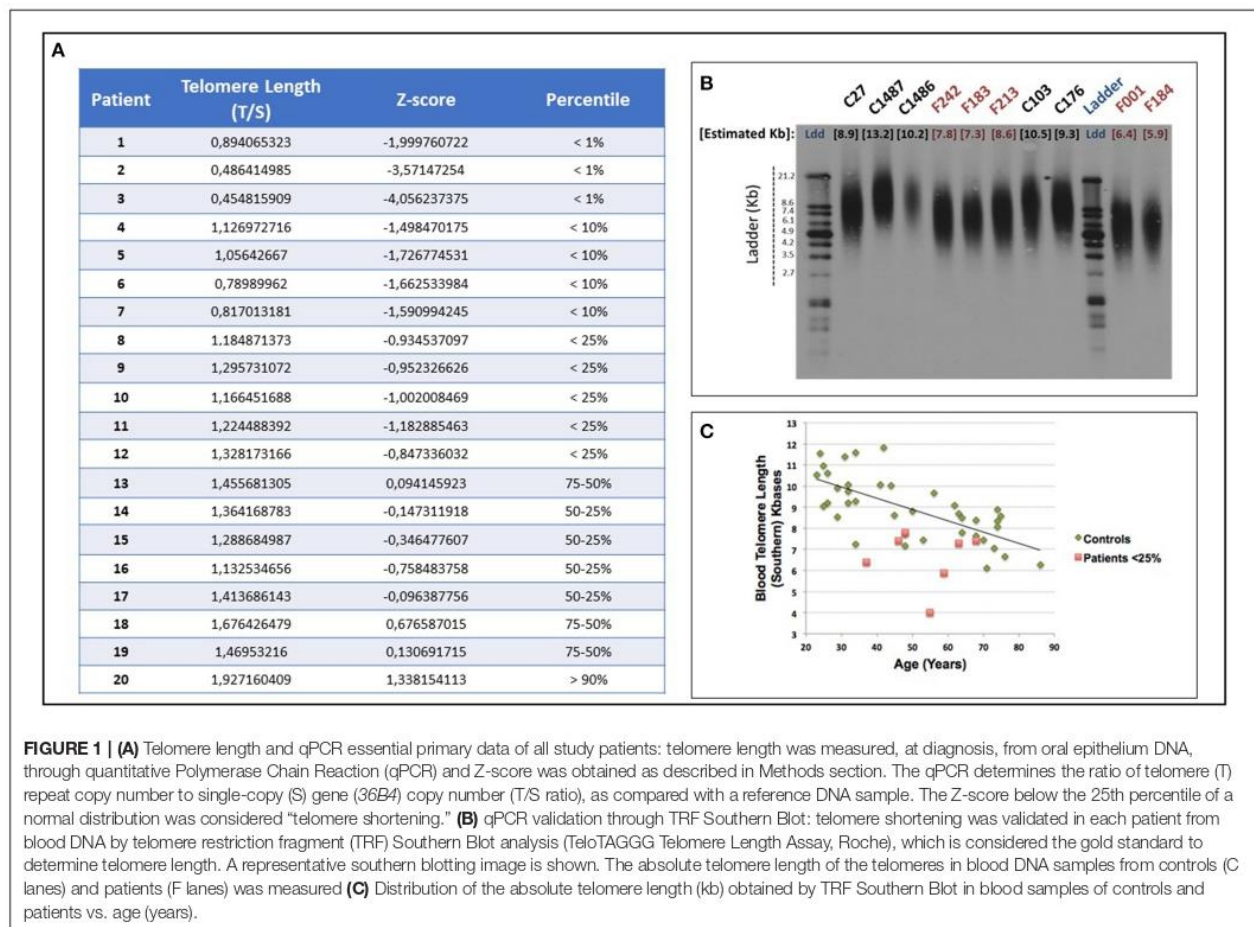
Telomere Genetic Studies

The telomere genetic study was performed at fibrotic ILD diagnosis and consisted of: (1) a telomere length screening of DNA isolated from mouth epithelial cells (oral swab) using a commercial DNA isolation kit (Isohelix, Cell Projects Ltd.) (34) and further validation based on DNA from peripheral blood; (2) a sequencing analysis of the known telomere related-genes (TRG) described so far as a cause of pulmonary fibrosis. The assessment of telomere dysfunction in donors was unavailable in our study due to the great inherent lung transplant technical difficulties.

Telomere Length Analysis

The relative telomere length was performed in the Instituto de Investigaciones Biomédicas (CSIC/UAM) and initially assessed by quantitative polymerase chain reaction (qPCR), as previously described (19, 35, 36). Since telomere length changes with age, a Z-score value was obtained to allow the comparisons of the telomere length between individuals of different ages. The Z-score compared the Telomere Shortening T/S ratio value in each individual with the age-matched mean and standard deviation (SD) of the values obtained in the controls. The Z-score below the 25th percentile of a normal distribution was considered as “short telomere.” A severe telomere length reduction was identified when Z-score was below the 10th percentile.

Telomere shortening was confirmed by telomere restriction fragment (TRF) assay (TeloTAGGG Telomere Length Assay, Roche) from peripheral blood DNA of each patient, as previously described (36, 37) (Figure 1). A positive correlation ($r = 0.689$) was observed between the two sets of telomere length measurements performed by either the qPCR on DNA extracted from buccal cells or by the Southern Blot of blood DNA,



in accordance with a previous study published by Demanelis et al. (38).

The control population for telomere Z-score calculation consisted of 243 healthy subjects, with no respiratory disease, cancer, or any degenerative disorders such as diabetes, hematological, liver, or kidney disease. Other characteristics from the control population were described previously (19). Oral swab and peripheral blood sample were also processed in controls for DNA isolation. The same protocol described above was followed to process control DNA samples.

Sequencing Analysis and Identification of Rare Coding Mutations in TRG

Patients with telomere shortening were subjected to whole-exome sequencing to obtain genetic variation at the telomere maintenance genes. Whole-exome sequences were obtained by the Instituto Tecnológico y de Energías Renovables (ITER). Briefly, DNA samples were processed with Nextera DNA Exome Kit with dual indexes following the manufacturer's recommendations (Illumina Inc., San Diego, CA). Library sizes were evaluated on a TapeStation 4200 (Agilent Technologies,

Santa Clara, CA) and their concentration determined by the Qubit dsDNA HS Assay (Thermo Fisher, Waltham, MA). Samples were sequenced along with 1% of a PhiX control V3 to an average depth >50X (after removal of duplicate reads) on a HiSeq 4000 instrument (Illumina Inc.) with paired-end 75-base reads. Reads were preprocessed with bcl2fastq v2.18 and aligned (>99.70% of reads were mapped) to hg19 with BWA-MEM 0.7.15-r1140 (39). BAM files were processed with SAMtools v1.3 (40) and Picard v2.10.10, and small insertion/deletions (indels) and single nucleotide variants (SNVs) were identified with the HaplotypeCaller following the Best Practices workflow recommendations for germline variant calling in GATK (v3.8) (41). Detected variants were annotated for frequency in gnomAD, function and pathogenic potential with SnpEff v4.3 (42) and ANNOVAR v18.04.16 (43) based on data from different sources. We simplified the prioritization of pathogenicity potential by focusing only on the results in the previously-known TRG: *TERT* (chr5:1,253,262–1,295,184), *TERC* (chr3:169,482,308–169,482,848), *DCK1* (chrX:153,991,031–154,005,964), *PARN* (chr16:14,529,558–14,726,585), *RTEL1* (chr20:62,289,163–62,328,416), *TINF2* (chr14:24,708,849–24,711,880), and *TERF1* (chr8:73,921,097–73,960,357). Among

the TRG set, we prioritized the variants that were likely to alter the function of the encoded proteins based on a CADD phred score >15 (standard threshold for deleteriousness) and rareness in the population (<0.5% in genomAD). On those patients that these criteria did not evidence a prioritized variant, we opted for prioritizing one variant applying more liberal filters but showing a predicted damage potential based on the effect (frameshift, stop gain/loss, splice site, codon deletion, non-synonymous change, etc.). Given the uncertainty in their pathogenic potential, we will refer to the prioritized variants as rare coding mutations thereafter.

Statistical Analysis

Categorical variables were presented as the number of cases and percentages, while continuous variables were presented as the mean and SD or median and the interquartile range (IQR). In continuous variables, the group means were compared using the Student's *t*-test and the group medians were compared with the Mann-Whitney U-test. Fisher's exact test or a Pearson's χ^2 -test were applied to assess the relationship between categorical variables. Time until death was assessed using the Kaplan–Meier estimator. Analyses were performed with R 3.4.0 (44). A *p*-value <0.005 was considered statistically significant.

RESULTS

Patient Characteristics

From 274 fibrotic ILD patients that had been tested for telomere attrition at diagnosis, 20 cases underwent LT from June 2013 to October 2018. Telomere attrition was identified in 12 (60%) patients and rare coding mutations in TRG in 11 of them (55% of the cohort) (Supplementary Table 1). Patients underwent LT at a younger age if telomere dysfunction was present. Idiopathic pulmonary fibrosis and FPF were the most frequent diagnoses. The anti-fibrotic therapy was prescribed in 12 patients at diagnosis (Table 1).

A similar pre-transplant functional status was reported for patients with or without telomere dysfunction (Table 2). Oxygen therapy was prescribed in all patients with telomere dysfunction ($n = 12$, 100%), with a median time of prescription of 12.5 months (range 11.0–16.2); and in 7 (87.5%) patients without telomere disorders with a median prescription time of 9.0 months (range 7.5–12.5) ($p = 0.090$). The pre-transplant health status questionnaires ATAQ and K-BILD were scored in the entire patient series. Patients with telomere dysfunction presented a worse pre-transplant health status compared to the patients without telomere disorders, with a median ATAQ score of 108 (8.27) and a median K-BILD score of 22.5 (16.0), ($p = 0.032$ and $p = 0.036$, respectively) (Table 2).

Regarding the LAS score, the patients with telomere disorders had a median LAS of 43.1 (range 38.4–51.3) with no statistically significant difference from patients without telomere dysfunction ($p = 0.283$) (Table 2). Despite the median time from diagnosis to the LT was lower in those cases with telomere dysfunction ($p = 0.076$), the time on the waiting list was similar among the patients with and without telomere disorders ($p = 0.877$) (Table 2).

Surgical Procedure and Immediate Post-surgery Requirements

Unilateral LT was performed in 14 (70.0%) cases. In both groups of patients, with and without telomere disorders, unilateral LT was the main choice.

Although no statistically significant differences were found during the surgical procedure, more cases with telomere dysfunction required extracorporeal circulation (ECC); among four patients, three of them presented telomere dysfunction. A longer time for ECC was registered for the telomere dysfunction group (median 150 min, range 122–244). The time of ischemia was also longer for patients with telomere disorders (median 6.88 h, range 5.25–7.69) (Table 3).

Regarding the first 24 h after LT, 15% of overall cases presented relevant complications, including hemodynamic instability, phrenic or diaphragmatic paresis, hypovolemic shock, thrombocytopenia, and primary graft dysfunction (Supplementary Table 2). No significant differences were observed by telomere dysfunction ($p = 0.495$) (Table 3). However, mild hematological complications during the first 24 h after LT were only reported in patients with telomere disorders (Supplementary Table 2).

Concerning the ICU admission period, the average stay was longer for patients with telomere dysfunction with a median of 30.0 days [(range 7.75–40.8 days, $p = 0.352$)] (Table 3). Time of respiratory support required, difficult weaning, and tracheostomy did not differ significantly due to the presence of telomere dysfunction ($p = 1.000$) (Table 3).

Complications and Morbidity After Lung Transplant

We analyzed the complications reported and hospital admission requirements after LT. More than one complication per patient was reported regardless of telomere dysfunction ($p = 1.000$) (Table 4). During the first month, complications were present in 9 (81.8%) patients with telomere disorders, and in all patients ($n = 8$, 100%) without ($p = 0.485$) (Table 4). Renal failure was the main complication in the overall population (Supplementary Table 3). A higher rate of primary graft dysfunction and hypovolemic shock was more frequently reported for patients with telomere dysfunction; while phrenic or diaphragmatic paresis and hemodynamic instability were more present in patients without. The main hematological complication, thrombocytopenia, was only described in telomere dysfunction group, although pre-transplant thrombocytopenia was only present in one of those cases (Supplementary Table 3).

After the first month of LT, all patients with telomere dysfunction ($n = 11$, 100%) and 7 (87.5%) patients without telomere disorders had complications ($p = 0.421$). As shown in Table 4, endocrine dysfunction and infections were predominant in both groups. Chronic lung allograft dysfunction (CLAD) and post-transplant CMV replication were higher in patients without telomere alterations [$n = 5$ (62.5%) and $n = 7$, (87.5%) respectively]. However, patients with telomere dysfunction showed a lower rate of CMV negativity after Valganciclovir ($n = 4$, 44.4%) with a higher rate of hematological complications

TABLE 1 | Patient characteristics.

	All patients (n = 20)	With telomere shortening (n = 12)	Without telomere shortening (n = 8)	P-value
Age at lung transplant [years, mean (SD)]	56.6 (9.39)	51.8 (9.18)	63.8 (3.11)	0.001
Gender (n, %)				
- Males	15 (75.0)	9 (75.0)	6 (75.0)	1.000
- Females	5 (25.0)	3 (25.0)	2 (25.0)	
Smoking history at diagnosis (n, %):				
- Non-smoker	3 (15.0)	2 (16.7)	1 (12.5)	1.000
- Current smoker	3 (15.0)	2 (16.7)	1 (12.5)	
- Former smoker	14 (70.0)	8 (66.7)	6 (75.0)	
Diagnosis (n, %):				
- IPF	8 (40.0)	4 (33.3)	4 (50.0)	0.961
- FPF	8 (40.0)	5 (41.6)	3 (37.5)	
- HP	1 (5.0)	0 (0.0)	1 (12.5)	
- CPFE	1 (5.0)	1 (8.3)	0 (0.0)	
- DIP	1 (5.0)	1 (8.3)	0 (0.0)	
- CTD-ILD	1 (5.0)	1 (8.3)	0 (0.0)	
Pre-transplant treatment (n, %):				
- Pirfenidone	7 (35.0)	2 (16.6)	5 (62.5)	0.062
- Nintedanib	5 (25.0)	3 (25.0)	2 (25.0)	1.000
- Corticosteroids	4 (20.0)	2 (16.6)	2 (25.0)	1.000
- Corticosteroids + immunosuppressive drug	5 (25.0)	5 (41.6)	0 (0.0)	0.055
Telomere shortening (n, %):				
- n, below 1 st percentile	3 (25.0)	3 (25.0)	0 (0.0)	NA
- n, below 10 th percentile	4 (33.3)	4 (33.3)	0 (0.0)	
- n, below 25 th percentile	5 (41.7)	5 (41.7)	0 (0.0)	
Relative telomere length [mean, (SD)]	1.13 (0.33)	0.95 (0.29)	1.40 (0.17)	0.001
Z-score [mean, (SD)]	-1.15 (1.22)	-1.83 (1.04)	-0.006 (0.44)	0.001
Likely causal variants in telomere-maintenance genes (n = 18) (n, %):	11 (55.0)	10 (83.3)	1 (12.5)	NA
- RTEL1	5 (45.5)	5 (50.0)	0 (0.0)	
- DKC1	2 (18.2)	2 (20.0)	0 (0.0)	
- PARN	1 (9.1)	0 (0.0)	1 (100)	
- TERT	3 (27.3)	3 (30.0)	0 (0.0)	

IPF, idiopathic pulmonary fibrosis; FPF, familial pulmonary fibrosis; HP, hypersensitivity pneumonitis; CPFE, combined pulmonary fibrosis and emphysema; DIP, desquamative interstitial pneumonia; CTD-ILD, connective tissue disease-associated interstitial lung disease; NA, not applicable.

due to CMV treatment ($n = 3$, 33.3%) (Table 4). Long-term complications are summarized in Supplementary Table 4. The type of complications according to telomere dysfunction and time after LT are summarized in Table 5.

Regarding hospital admissions after LT, patients with telomere dysfunction presented more hospitalizations ($p = 0.033$) and 2.9 times higher risk for readmission [Incidence Rate Ratio of 2.91, 95%CI = 1.11–7.59, ($p = 0.029$)] (Table 4). Infections were the main cause of readmission in both groups of patients (Table 6).

Survival and Quality of Life After Lung Transplant

At the end of the study, 17 of 20 subjects (85%) survived after transplantation: 10/12 with telomere dysfunction (83.3%) and 7/8 (87.5%) without. Survival after LT is represented in Figure 2A. Patients with telomere shortening had a median post-transplant follow-up period of 39 months (range of 27–50 months) with

two deaths reported. One subject died after bilateral LT due to multi-organ failure in the first 24 h; and the other patient died after 17 months of post-transplant follow-up due to stage IIIB cervical squamous-cell carcinoma. Both had a telomere length below the 10th percentile and one of them carried a rare coding RTEL1 gene mutation (chr20:62317210). No TRG mutations were identified in the other patient. The median post-transplant follow-up period in patients without telomere dysfunction was 15 months (range of 12–19) with one death reported after 17 months of unilateral LT due to CLAD. The time from diagnosis to LT was shorter in those cases with telomere dysfunction. Therefore, we also analyzed survival from diagnosis to the end of the study period. No significant differences were found between both groups; 5 years (range 5–6 years) vs. 6 years (range 4–7 years), with and without telomere dysfunction, respectively.

Post-transplant quality of life assessment reported a significant improvement in respiratory functional and health status for

TABLE 2 | Pre-transplant functional status.

	All patients (n = 20)	With telomere shortening (n = 12)	Without telomere shortening (n = 8)	P-value
LAS [median, (Q1;Q3)]	40.3 (37.3;46.0)	43.1 (38.4;51.3)	39.1 (36.9;41.2)	0.283
Time from diagnosis to transplant [months, mean (SD)]	42.1 (32.1)	36.2 (36.7)	51.0 (23.3)	0.284
Time from diagnosis to transplant [months, median (Q1;Q3)]	33.1 (24.0;50.3)	26.5 (21.9;36.3)	51.2 (30.8;67.6)	0.076
Waiting list time [months, median (Q1;Q3)]	5.00 (1.75;8.00)	5.00 (2.75;7.25)	4.00 (1.00;9.25)	0.877
FVC [L, mean (SD)]	1.87 (0.44)	1.96 (0.39)	1.73 (0.50)	0.294
FVC [%, mean (SD)]	45.3 (11.1)	45.9 (13.8)	44.5 (5.92)	0.764
DLCO [%, mean (SD)]	22.8 (5.71)	21.2 (6.06)	24.7 (5.10)	0.255
Basal SatO ₂ <90% in WT6m [n, mean (SD)]	79.2 (5.76)	79.2 (5.14)	79.0 (6.97)	0.932
6-min walk test distance [n, mean (SD)]	292 (83.5)	274 (77.7)	319 (89.9)	0.267
Oxygen therapy (n, %)	19 (95)	12 (100)	7 (87.5)	0.400
Time with oxygen therapy before transplant [months, mean (SD)]	12.8 (5.55)	14.3 (6.02)	10.1 (3.63)	0.076
Time with oxygen therapy before transplant [months, median (Q1;Q3)]	12.0 (9.00;15.5)	12.5 (11.0;16.2)	9.00 (7.50;12.5)	0.090
ATAQ score [mean (SD)]	102 (13.3)	108 (8.27)	92.6 (14.4)	0.032
K-BILD score [mean (SD)]	28.4 (15.1)	22.5 (16.0)	36.7 (9.20)	0.036

LAS, lung allocation score; FVC, forced vital capacity; DLCO, diffusion capacity for carbon monoxide; LT, lung transplant.

TABLE 3 | Surgical technique and immediate post-operative requirements.

	All patients (n = 20)	With telomere shortening (n = 12)	Without telomere shortening (n = 8)	P-value
Type of lung transplant (n, %):				1.000
- Unilateral	14 (70.0)	8 (66.7)	6 (75.0)	
- Bilateral	6 (30.0)	4 (33.3)	2 (25.0)	
Ischemia time [h, mean (SD)]	6.61 (2.82)	6.86 (2.55)	6.23 (3.33)	0.658
Ischemia time [h, median (Q1;Q3)]	6.42 (4.75;7.69)	6.88 (5.25;7.69)	5.42 (4.22;6.83)	0.354
Extracorporeal circulation need (n, %)	4 (20.0)	3 (25.0)	1 (12.5)	0.619
Extracorporeal circulation time [min, median (Q1;Q3)]	122 (88.0;197)	150 (122;244)	70.0 (70.0;70.0)	0.180
Stay in ICU [days, median (Q1;Q3)]	22.0 (7.50;36.5)	30.0 (7.75;40.8)	17.0 (7.00;22.5)	0.352
Post-operative complications in the first 24 h (n, %)	18 (90.0)	10 (83.3)	8 (100)	0.495
Difficult weaning (n, %) (n = 19)	10 (52.6)	6 (54.5)	4 (50.0)	1.000
Tracheostomy (n, %) (n = 19)	10 (52.6)	6 (54.5)	4 (50.0)	1.000

all patients. The mean FVC increase after LT for the entire study population was 0.55 L ($p = 0.0003$) [95%CI: 0.21–0.89]. As shown in **Figure 3**, pre-transplant FVC-values (L) and the absence of family aggregation significantly influenced the post-transplant FVC-value (L) ($p = 0.007$, respectively). Regarding the health status, a significant improvement was reported overall through ATAQ-IPF and K-BILD scores, with $p < 0.001$ for both questionnaires. No differences in ATAQ-IPF and K-BILD post-transplant scores were found in telomere dysfunction patient group (**Table 7**). Likewise, no differences were found for declared daily life activity independence and active life after LT among patients with and without telomere disorders. Nine out of 10 (90%) patients with telomere dysfunction reported daily life activity independence, and 6 out of 10 (60%) had an active life ($p = 1.000$). In addition, oxygen therapy withdrawal was possible in 16 out of 17 (94.1%) patients of the overall population: 9 out of 10 (90.0%) with telomere dysfunction and 7 out of 7 (100%) without it (**Table 7**).

Lung Transplant in Familial Pulmonary Fibrosis

Family aggregation was reported in 8 (40.0%) patients and telomere shortening was present in 5 (62.5%) of them. Rare coding TRG mutations were identified in 4 out of 8 (50.0%) patients. A similar pre-transplant functional status was reported according to family aggregation without differences in the time from diagnosis to the LT (**Supplementary data Table 5**). PPF cases presented a non-significant higher rate of difficult weaning and a greater need for tracheostomy. No differences were found in the ratio of the other complications during the first 24 h and the first month. Long-term complications were reported in all patients. Those cases without family aggregation presented a trend of higher rate for mechanical, nephrological, hematological, endocrine, and infectious complications (**Supplementary Table 5**). Survival after transplantation according to family aggregation is represented in **Figure 2B**.

TABLE 4 | Long-term complications after lung transplant.

	All patients (n = 20)	With telomere shortening (n = 12)	Without telomere shortening (n = 8)	P-value
> 1 complication after transplant (n, %)* (n = 20)	18 (90.0)	11 (91.7)	7 (87.5)	1.000
Post-operative complications in the first 24 h (n, %)	18 (90.0)	10 (83.3)	8 (100)	0.495
Complications during the first month (n, %)	17 (89.5)	9 (81.9)	8 (100)	0.485
Complications after the first month (n, %) (n = 19)	18 (94.7)	11 (100)	7 (87.5)	0.421
Allograft dysfunction (n, %)	8 (42.1)	3 (27.3)	5 (62.5)	0.181
Nephrological complications (n, %)	7 (35.0)	4 (33.3)	3 (37.5)	1.000
Positive pre-transplant CMV serology (n, %)	18 (90.0)	11 (91.7)	7 (87.5)	1.000
Post-transplant CMV replication (n, %) (n = 19)	14 (73.7)	7 (63.6)	7 (87.5)	0.338
Hematological alterations due to CMV treatment (n, %) (n = 15)	4 (26.7)	3 (33.3)	1 (16.7)	0.604
CMV negativity after treatment (n, %) (n = 16)	9 (56.2)	4 (44.4)	5 (71.4)	0.358
Infectious complications (n, %)	12 (60.0)	6 (50.0)	6 (75.0)	0.373
Hematological complications (n, %)	6 (30.0)	4 (33.3)	2 (25.0)	1.000
Endocrine complications (n, %)	15 (75.0)	9 (66.7)	7 (87.5)	0.603
Hospital admissions after transplant [median (Q1;Q3)] (n = 19)	1.0 (0.00;3.00)	2.00 (1.00;3.00)	0.00 (0.00;1.25)	0.033

* >1 complication at any time after lung transplant.

TABLE 5 | Post-transplant complications according to telomere dysfunction and time after lung transplantation.

Type of post-transplant complications	First 24 h		During the first month		After the first month	
	Telomere shortening	No telomere shortening	Telomere shortening	No telomere shortening	Telomere shortening	No telomere shortening
Endocrine (n, %)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	8 (67)	7 (88)
Post-transplant CMV replication (n, %)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	7 (58)	7 (88)
Infectious (n, %)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (50)	6 (75)
Allograft dysfunction (n, %)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (25)	5 (62)
Hemodynamic dysfunction (n, %)	4 (33)	3 (38)	3 (25)	3 (38)	0 (0.0)	0 (0.0)
Hematological (n, %)	4 (33)	0 (0.0)	2 (17)	0 (0.0)	4 (33)	2 (25)
Mechanical (n, %)	3 (25)	3 (38)	2 (17)	3 (38)	0 (0.0)	0 (0.0)
Primary graft dysfunction (n, %)	2 (17)	1 (12)	2 (17)	1 (12)	0 (0.0)	0 (0.0)
Donor lung infection (n, %)	0 (0.0)	1 (12)	0 (0.0)	1 (12)	0 (0.0)	0 (0.0)
Atrial fibrillation (n, %)	2 (17)	0 (0.0)	1 (8)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Renal (n, %)	1 (8)	1 (12)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (33)	3 (38)
Miopathy of critical patient (n, %)	1 (8)	0 (0.0)	1 (8)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

DISCUSSION

Previous studies have analyzed LT morbidity and mortality in patients with telomere abnormalities with controversial results (19–25). Our study reveals for the first time a long-term positive LT outcome in overall fibrotic ILD population regardless of telomere dysfunction. Furthermore, we report the order in appearance and the frequency of the subsequent complications according to elapsed time from transplantation and presence of telomere dysfunction. Therefore, while a higher rate of LT complications has previously been reported in patients with telomeropathy (19–25), our study highlights the long-term benefits of LT despite telomere dysfunction by optimizing the knowledge and the management of transplant morbidity.

Our main finding was the benefit of LT in survival of fibrotic ILD regardless of telomere dysfunction. We report a good LT outcome in the overall study population with a survival rate >80% and a similar post-transplant follow-up. Previous studies have also evaluated the impact of transplantation for pulmonary fibrosis in ILD patients carrying telomere disorders. Swaminathan et al. reported a significantly higher risk of death for patients carrying variants in *TERT*, *RTEL1*, or *PARN* (25); while Newton et al. showed the association between telomere length below the 10th percentile and worse post-transplant survival (23). Although this poor outcome was related to systemic complications of telomere dysfunction, Borie et al. reported no differences in survival between controls and telomerase mutation carriers with higher risk for hematological complications (21). Similarly, Silhan et al. also described a reasonable post-transplant

TABLE 6 | Causes for hospital admission after lung transplant.

Patient	Family aggregation	Percentile telomere length	Likely causal gene(s)	Hospital admissions after transplant	Infectious cause	Other causes
PATIENTS WITHOUT TELOMERE SHORTENING						
1	Yes	75–50 th	Not tested	1	Urinary sepsis	None
2	No	50–25 th	Not tested	1	Lower right lobe pneumonia (<i>P. aeruginosa</i>)	None
3	No	50–25 th	Not tested	1	Respiratory infection (Rhinovirus)	CLAD
PATIENTS WITH TELOMERE SHORTENING						
4	No	<25 th	TERT	1	None	Cervical lymphadenectomy (M1 squamous cell carcinoma of unknown primary origin)
5	Yes	<25 th	TERT	3	Respiratory infection (MRSA) Empyema (<i>S. aureus</i>)	Suspected unconfirmed CLAD
6	No	<25 th	RTEL1	3	Acute gastroenteritis Elbow abscess Influenza A virus infection	None
7	Yes	<25 th	DKC1	3	CMV viremia Lower right lobe pneumonia + non-complicated parapneumonic pleural effusion	Fever of unknown origin
8	No	<10 th	RTEL1	1	None	CLAD
9	No	<10 th	Not found	2	None	Pulmonary embolism Cervix squamous cell carcinoma stage IIIB
10	No	<10 th	RTEL1	3	Respiratory infection (Respiratory syncytial virus) Bacteremia (<i>P. aeruginosa</i>) Influenza b virus infection	None
11	No	<1 th	DKC1	6	Respiratory infection (x2) Perianal condylomatosis	Acute ILD exacerbation in native lung ILD progression in native lung (X2)
12	Yes	<1 th	Not found	1	Cavitated pneumonia (<i>P. aeruginosa</i>) + bacteremia (<i>P. aeruginosa</i>)	None

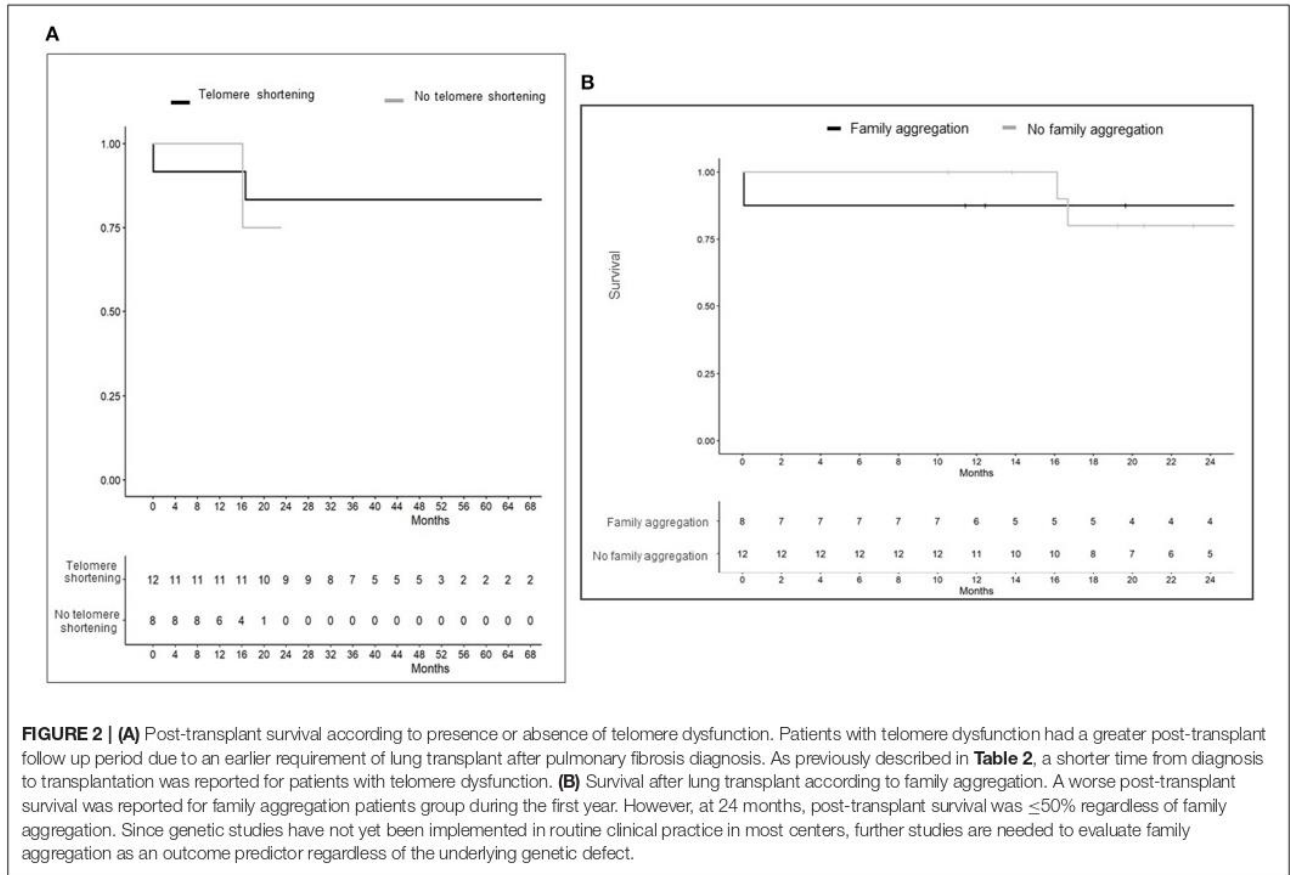
survival despite a higher rate of post-transplant complications (20). In addition, LT feasibility was also assessed for other telomeropathies like dyskeratosis congenital (45) and in the case of multiple solid organ transplantation (46) with a favorable long-term post-transplant outcome.

The controversial results reported so far are probably due to a wide dispersion of methods and lack of control group in most studies (19–25). Moreover, a broad variety of transplant centers were involved in the previous studies with great heterogeneity of national organ transplant programs and center-specific pre-surgical, surgical, and post-surgical procedures. Very few randomized studies have been conducted in LT for the general population leaving some topics with a lack of evidence and outcomes far from optimal for many patients (47). Hence, making decisions in LT is sometimes highly controversial and requires an evidence-experience balance. Considering these arguments, we prospectively assessed LT outcomes according to telomere dysfunction as the only differential biological marker among recipients in our single-transplantation center cohort. No differences were found in pre-transplant functional status for the

overall study population despite the younger mean age of the telomere dysfunction group of patients, the fibrotic ILD and/or the pre-transplant treatment prescription.

An important issue when considering survival is to investigate the quality of patient survival. Although morbidity and mortality have previously been assessed in fibrotic ILD with telomeropathy (20–25), knowledge is lacking about outcomes in terms of quality of life. Our study describes for the first time the post-transplant benefits in quality of life despite telomere disorders and their complications. The enhancement of post-transplant quality of life was reported for the overall study population through the improvement of ATAQ and K-BILD scores and the feasibility for independent and active life with oxygen withdrawal. Hence, our study shows quality of life gains for transplanted ILD patients regardless of telomere dysfunction.

However, this favorable effect needs to be balanced with the higher rate of post-transplant morbidity reported for telomeropathies. Therefore, our research thoroughly investigates the morbidity profiles according to elapsed time from transplantation. The post-transplant appearance and



Predictors	MODEL A			MODEL B		
	Estimates	CI	P value	Estimates	CI	P value
(Intercept)	0.54	-0.96 - 2.04	0.492	-1.03	-3.32 - 1.26	0.391
Pre-transplant FVC	0.90	0.16 - 1.63	0.029	0.98	0.37 - 1.58	0.007
No telomere dysfunction	0.48	-0.17 - 1.13	0.168	0.09	-0.60 - 0.78	0.803
No family aggregation				-0.88	-1.43 - -0.33	0.007
Age at lung transplant				0.04	0.00 - 0.08	0.094
Observations	19			19		
R ² / adjusted R ²	0.287/0.197			0.593/0.477		

FIGURE 3 | Post-transplant FVC (L) models. We analyzed the impact in post-transplant FVC of the following variables: the pre-transplant FVC, the age at the time of lung transplantation and the absence of telomere dysfunction and pulmonary fibrosis family aggregation. A statistically significant impact in post-transplant FVC was reported for pre-transplant FVC and the absence of family aggregation. The absence of telomere dysfunction did not statistically impact in post-transplant FVC.

TABLE 7 | Quality of life after lung transplant.

	All patients (n = 20)	With telomere shortening (n = 12)	Without telomere shortening (n = 8)	P-value
Post-transplant FVC [L, mean (SD)]	2.42 (0.77)	2.31 (0.51)	2.57 (1.05)	0.524
Post-transplant FVC [%, mean (SD)]	60.4 (17.6)	53.0 (12.7)	70.4 (19.0)	0.045
Post-transplant ATAQ score [mean (SD)]	58.2 (12.9)	60.6 (15.0)	54.7 (9.16)	0.333
Post-transplant K-BILD score [mean (SD)]	60.1 (9.14)	60.1 (9.66)	60.0 (9.10)	0.983
Oxygen withdrawal after transplantation (n, %)	16 (94.1)	9 (90.0)	7 (100)	1.000
Independence for daily life activities after transplantation (n, %)	15 (88.2)	9 (90.0)	6 (85.7)	1.000
Active life after transplantation (n, %)	11 (64.7)	6 (60.0)	5 (71.4)	1.000

Independence for daily life activities: feeding, personal hygiene and dressing tasks without help. Active life: to be able to return to work and/or hobbies.

predominance of complications could be chronological and change according to successive clinical requirements after transplantation and patient susceptibility. Telomere dysfunction is associated with immunodeficiency (28) and poor outcomes of immunosuppressive drugs (26, 27). Thereby, it could explain our higher rate of hospital admissions after transplantation for the telomere dysfunction group due to a wide variety of infections. The post-transplant antibiotic prophylaxis in these cases is a hypothesis that still needs to be evaluated. The CMV post-transplant prophylaxis performed could explain a similar rate of CMV relapsing viremia in those cases with or without telomere dysfunction, deviating from previous reports (24). Although a similar effect, CMV prophylaxis toxicity was mainly reported in telomere dysfunction cases as thrombocytopenia or leukopenia. Hematological complications are highly associated with telomeropathy (20, 21) and may complicate further due to ECC in the early post-transplant period and long-term drug toxicities.

The main limitations of the present study are the small sample size of our series and the lack of a validation cohort. However, LT experience and protocols may differ among centers, which represents a major difficulty for homogeneously increasing the number of cases or finding a proper validating cohort with patients screened for telomere length at diagnosis.

Hence, increasing the knowledge about when and why each complication appears would set specific prevention and management strategies in order to tip the balance in favor of survival benefits. Pre-transplant work-up considerations should include telomere disorders in order to establish variations in care (48). However, wider evidence is clearly needed to identify interventions that work best for this subset of ILD patients.

In conclusion, our results support the survival gains of lung transplant regardless of telomere disorders.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are publicly available. This data can be found in the European Variation Archive (EVA), accession numbers PRJEB46414 and ERZ2875159.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Ethics Committee of Hospital Universitari de Bellvitge. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

The participation level of each author is the following: LP-C and MM-M had full access to all of the data in the study, and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis, including and especially any adverse effects, and contributed to statistical analysis and interpretation. LP-C served as principal author. MM-M served as corresponding author. LP-C, EA-S, CB, RP, AM-W, CF, AR, and MM-M contributed to the study concept and design. LP-C, CB, VV-Z, MG-M, AR, and MM-M contributed to identification and inclusion of patients and clinical data collection. LP-C, EA-S, AM-W, RG-M, JL-S, VV-Z, MG-M, JD, CF, RP, AR, and MM-M contributed to patient's sample collection and processing. LP-C, EA-S, AM-W, RG-M, JL-S, CF, RP, and MM-M contributed to analysis and interpretation of data for the work. LP-C, EA-S, CB, RG-M, JL-S, AM-W, CF, RP, AR, and MM-M contributed to the writing of the manuscript. All authors contributed to review critically of the draft and approved the final manuscript.

FUNDING

This study was funded by Instituto de Salud Carlos III through project PI18/00367 (Co-funded by European Regional Development Fund, ERDF, a way to build Europe), Spanish Society of Respiratory (SEPAR), Barcelona Respiratory Network (BRN), and Fundació Ramón Pla Armengol. RP laboratory was funded by grants PI20-00335 (Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III, Spain supported by FEDER funds). MM-M was funded by grants PI18/00367 (Fondo de Investigaciones Sanitarias, ISCIII, Spain, supported by FEDER funds), AC19/00006 (Projects of International Programs, ISCIII, Spain, supported by FEDER funds), Cohorte FPI CIBERES-ISCIII, Barcelona Respiratory Network-Foundation

Ramon Pla Armengol, Spanish Society of Respiratory (SEPAR), and Catalan Society of Respiratory (SOCAP-FUCAP). CF was funded by Ministerio de Ciencia e Innovación (grant RTC-2017-6471-1; AEI/FEDER, UE), and by Cabildo Insular de Tenerife (CGIEU0000219140).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Josep M Palma, nurse specialist for ILD Unit of Hospital Universitari de Bellvitge, for his contribution obtaining blood samples; the Biobank

HUB-ICO-IDIBELL (PT17/0015/0024) integrated in the Spanish National Biobanks Network for their collaboration; and CERCA Programme/Generalitat de Catalunya. We are also grateful to all the patients involved in the study and their families.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2021.695919/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Cottin V, Wollin L, Fischer A, Quresma M, Stowasser S, Harari S. Fibrosing interstitial lung diseases: knowns and unknowns. *Eur Respir Rev.* (2019) 28:180100. doi: 10.1183/16000617.0100-2018
- Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med.* (2011) 183:788–824. doi: 10.1164/rccm.2009-040GL
- Chambers DC, Cherkh WS, Goldfarb SB, Hayes D Jr, Kucheryavaya AY, Toll AE, et al. The International Thoracic Organ Transplant Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: thirty-fifth adult lung and heart-lung transplant report-2018; focus theme: multiorgan transplantation. *J Heart Lung Transplant.* (2018) 37:1169–83. doi: 10.1016/j.healun.2018.07.020
- Armanios M. Syndromes of telomere shortening. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* (2009) 10:45–61. doi: 10.1146/annurev-genom-082908-150046
- Armanios M. Telomerase and idiopathic pulmonary fibrosis. *Mutat Res.* (2012) 730:52–8. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.10.013
- Armanios M, Blackburn E. The telomere syndromes. *Nat Rev Genet.* (2012) 13:693–704. doi: 10.1038/nrg3246
- Townsend DM, Dumitriu B, Young NS. Bone marrow failure and the telomeropathies. *Blood.* (2014) 124:2775–83. doi: 10.1182/blood-2014-05-526285
- Armanios M. Telomeres and age-related disease: how telomere biology informs clinical paradigms. *J Clin Invest.* (2013) 123:996–1002. doi: 10.1172/JCI66370
- Alder JK, Cogan JD, Brown AF, Anderson CJ, Lawson WE, Lansdorp PM, et al. Ancestral mutation in telomerase causes defects in repeat addition processivity and manifests in familial pulmonary fibrosis. *PLoS Genet.* (2011) 7:e1001352. doi: 10.1371/journal.pgen.1001352
- Tsakiri KD, Cronkhite JT, Kuan PJ, Xing C, Raghu G, Weissler JC, et al. Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2007) 104:7552–7. doi: 10.1073/pnas.0701009104
- Hao LY, Armanios M, Strong MA, Karim B, Feldser DM, Huso D, et al. Short telomeres, even in the presence of Telomerase, limit tissue renewal capacity. *Cell.* (2005) 123:1121–31. doi: 10.1016/j.cell.2005.11.020
- Armanios M, Alder JK, Parry EM, Karim B, Strong MA, Greider CW. Short telomeres are sufficient to cause the degenerative defects associated with aging. *Am J Hum Genet.* (2009) 85:823–32. doi: 10.1016/j.ajhg.2009.10.028
- Selman M, Pardo A. Revealing the pathogenic and aging-related mechanisms of the enigmatic idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* (2014) 189:1161–72. doi: 10.1164/rccm.201312-2221PP
- Von Zglinicki T, Martin-Ruiz CM. Telomeres as biomarkers for ageing and age-related diseases. *Curr Mol Med.* (2005) 5:197–203. doi: 10.2174/1566524053586545
- Snetselaar R, van Moorsel CHM, Kazemier KM, van der Vis JJ, Zanen P, van Oosterhout MFM, et al. Telomere length in interstitial lung diseases. *Chest.* (2015) 148:1011–8. doi: 10.1378/chest.14-3078
- Borie R, Kannengiesser C, Nathan N, Tabèze L, Pradère P, Crestani B. Familial pulmonary fibrosis. *Rev Mal Respir.* (2015) 32:413–34. doi: 10.1016/j.rmr.2014.07.017
- Newton CA, Batra K, Torrealba J, Kozlitina J, Glazer CS, Aravena C, et al. Telomere-related lung fibrosis is diagnostically heterogeneous but uniformly progressive. *Eur Respir J.* (2016) 48:1710–20. doi: 10.1183/13993003.00308-2016
- Molina-Molina M, Borie R. Clinical implications of telomere dysfunction in lung fibrosis. *Curr Opin Pulm Med.* (2018) 24:440–4. doi: 10.1097/MCP.0000000000000506
- Planas-Cerezales L, Arias-Salgado EG, Buendia-Roldán I, Montes-Worboys A, López CE, Vicens-Zygmunt V, et al. Predictive factors and prognostic effect of telomere shortening in pulmonary fibrosis. *Respirology.* (2019) 24:146–53. doi: 10.1111/resp.13423
- Silhan LL, Shah PD, Chambers DC, Snyder LD, Riise GC, Wagner CL, et al. Lung transplantation in telomerase mutation carriers with pulmonary fibrosis. *Eur Respir J.* (2014) 44:178–87. doi: 10.1183/09031936.00060014
- Borie R, Kannengiesser C, Hirschi S, Le Pavec J, Mal H, Bergot E, et al. Groupe d'Etudes et de Recherche sur les Maladies "Orphelines" Pulmonaires (GERM"O"™). Severe hematologic complications after lung transplantation in patients with telomerase complex mutations. *J Heart Lung Transplant.* (2015) 34:538–46. doi: 10.1016/j.healun.2014.11.010
- Tokman S, Singer JP, Devine MS, Westall GP, Aubert JD, Tamm M, et al. Clinical outcomes of lung transplant recipients with telomerase mutations. *J Heart Lung Transplant.* (2015) 34:1318–24. doi: 10.1016/j.healun.2015.05.002
- Newton CA, Kozlitina J, Lines JR, Kaza V, Torres F, Garcia CK. Telomere length in patients with pulmonary fibrosis associated with chronic lung allograft dysfunction and post-lung transplantation survival. *J Heart Lung Transplant.* (2017) 36:845–53. doi: 10.1016/j.healun.2017.02.005
- Popescu I, Mannem H, Winters SA, Hoji A, Silveira F, McNally E, et al. Impaired cytomegalovirus immunity in idiopathic pulmonary fibrosis lung transplant recipients with short telomeres. *Am J Respir Crit Care Med.* (2019) 199:362–76. doi: 10.1164/rccm.201805-0825OC
- Swaminathan AC, Neely ML, Frankel CW, Kelly FL, Petrovski S, Durham MT, et al. Lung transplant outcomes in patients with pulmonary fibrosis with telomere-related gene variants. *Chest.* (2019) 156:477–85. doi: 10.1016/j.chest.2019.03.030
- Newton CA, Zhang D, Oldham JM, Kozlitina J, Ma SE, Martinez FJ, et al. Telomere length and use of immunosuppressive medications in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* (2019) 200:336–47. doi: 10.1164/rccm.201809-1646OC
- Molina-Molina M. Telomere shortening behind the harm of immunosuppressive therapy in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* (2019) 200:274–5. doi: 10.1164/rccm.201812-2330ED
- Wagner CL, Hanumanthu VS, Talbot CC Jr, Abraham RS, Hamm D, Gable DL, et al. Short telomere syndromes cause a primary T cell immunodeficiency. *J Clin Invest.* (2018) 128:5222–34. doi: 10.1172/JCI120216
- American Thoracic Society, European Respiratory Society. American Thoracic Society/European Respiratory Society international multidisciplinary consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med.* (2002) 165:277–304. doi: 10.1164/ajrccm.165.2.ats01
- Travis WD, Costabel U, Hansell DM, King TE Jr, 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) 188:733–48. doi: 10.1164/rccm.201308-1483ST
31. Raghun 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:e44–68. doi: 10.1164/rccm.201807-1255ST
 32. Orens JB, Estenne M, Arcasoy S, Conte JV, Corris P, Egan JJ, et al. International guidelines for the selection of lung transplant candidates: 2006 update—a consensus report from the Pulmonary Scientific Council of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J Heart Lung Transplant.* (2006) 25:745–55. doi: 10.1016/j.healun.2006.03.011
 33. Weill D, Benden C, Corris PA, Dark JH, Davis RD, Keshavjee S, et al. A consensus document for the selection of lung transplant candidates: 2014. An update from the Pulmonary Transplantation Council of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J Heart Lung Transplant.* (2015) 34:1–15. doi: 10.1016/j.healun.2014.06.014
 34. McMichael GL, Gibson CS, O'Callaghan ME, Goldwater PN, Dekker GA, Haan EA, et al. DNA from buccal swabs suitable for high-throughput SNP multiplex analysis. *J Biomol Tech.* (2009) 20:232–5.
 35. Cawthon, RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.* (2002) 30:e47. doi: 10.1093/nar/30.10.e47
 36. Arias-Salgado EG, Galvez E, Planas-Cerezales L, Pintado-Berniches L, Vallespin E, Martinez P, et al. Genetic analyses of aplastic anemia and idiopathic pulmonary fibrosis patients with short telomeres, possible implication of DNA-repair genes. *Orphanet J Rare Dis.* (2019) 14:82. doi: 10.1186/s13023-019-1046-0
 37. Carrillo J, Martínez P, Solera J, Moratilla C, González A, Manguán-García C, et al. High resolution melting analysis for the identification of novel mutations in DKC1 and TERT genes in patients with dyskeratosis congenita. *Blood Cells Mol Dis.* (2012) 49:140–6. doi: 10.1016/j.bcmd.2012.05.008
 38. Demanelis K, Jasmine F, Chen LS, Chernoff M, Tong L, Delgado D, et al. Determinants of telomere length across human tissues. *Science.* (2020) 369:eaz6876. doi: 10.1126/science.eaz6876
 39. Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* (2010) 26:589–95. doi: 10.1093/bioinformatics/btp698
 40. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* (2009) 25:2078–9. doi: 10.1093/bioinformatics/btp352
 41. DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, Hartl C, et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet.* (2011) 43:491–8. doi: 10.1038/ng.806
 42. Cingolani P, Platts A, Wang le L, Coon M, Nguyen T, Wang L, et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin).* (2012) 6:80–92. doi: 10.4161/fly.19695
 43. Yang H, Wang K. Genomic variant annotation and prioritization with ANNOVAR and wANNOVAR. *Nat Protoc.* (2015) 10:1556–66. doi: 10.1038/nprot.2015.105
 44. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing.* Vienna: R Found Stat Comput. Available online at: <http://www.R-Project.org/> (accessed February 10, 2015).
 45. Giri N, Lee R, Faro A, Huddleston CB, White FV, Alter BP, et al. Lung transplantation for pulmonary fibrosis in dyskeratosis congenita: case report and systematic literature review. *BMC Blood Disord.* (2011) 11:3. doi: 10.1186/1471-2326-11-3
 46. Lebeer M, Wuyts WA, Cassiman D, Laleman W, Nevens F, Pirenne J, et al. Multiple solid organ transplantation in telomeropathy: case series and literature review. *Transplantation.* (2018) 102:1747–55. doi: 10.1097/TP.0000000000002198
 47. Abelson D, Glanville AR. Controversies and emerging topics in lung transplantation. *Breathe (Sheff).* (2018) 14:278–87. doi: 10.1183/20734735.027018
 48. Courtwright AM, Lamattina AM, Takahashi M, Trindade AJ, Hunninghake GM, Rosas IO, et al. Shorter telomere length following lung transplantation is associated with clinically significant leukopenia and decreased chronic lung allograft dysfunction-free survival. *ERJ Open Res.* (2020) 6:00003-2020. doi: 10.1183/23120541.00003-2020
- Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.
- Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.
- Copyright © 2021 Planas-Cerezales, Arias-Salgado, Berastegui, Montes-Worboys, González-Montelongo, Lorenzo-Salazar, Vicens-Zygmunt, Garcia-Moyano, Dorca, Flores, Perona, Román and Molina-Molina. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

5

DISCUSIÓN



5. Discusión

En los últimos años, el envejecimiento celular acelerado y su implicación en la fisiopatología de la fibrosis pulmonar están siendo ampliamente evaluados, especialmente en la FPI. Ésta es la EPID fibrótica más frecuente y de peor pronóstico con una afectación crónica, progresiva e irreversible de causa desconocida [3]. Aunque su evolución clínica es devastadora, se han descrito diferencias en el curso clínico y la supervivencia de los pacientes afectados [18,19,154,163].

En este contexto, uno de los grandes retos asistenciales de la FPI es pronosticar la evolución de los pacientes en el momento del diagnóstico. Con este fin, en los últimos años se han desarrollado varias escalas multidimensionales de predicción de riesgo, como por ejemplo el índice GAP [154] o el ROSE [164]. Ambos utilizan variables demográficas y de funcionalismo respiratorio, entre otras, que demostraron mediante regresión logística su valor predictivo en FPI. A pesar de su utilidad clínica, estos modelos de predicción de riesgo no tienen en cuenta los datos epidemiológicos o biológicos de los pacientes y, por tanto, no cubren todos los fenotipos biológicos y/o clínicos existentes [153].

La edad cronológica es una de las variables pronósticas incluida en dichos modelos. Su relevancia en la fisiopatología de la enfermedad se sugiere considerable, puesto que la edad media de presentación de la FPI es entre los 65-70 años con una incidencia que aumenta con la edad [165]. Sin embargo, diversos estudios han demostrado la existencia de un envejecimiento celular acelerado que contribuye al desarrollo y a la progresión de la FPI [17,139], reportando alteraciones en todos los “*hallmarks of aging*” y sugiriendo que la edad biológica sería un factor determinante en la patogénesis de la enfermedad. Los resultados de nuestra investigación apoyan esta teoría y muestran que la edad telomérica (o biológica) podría ser una variable pronóstica en FPI mucho más significativa que la edad cronológica.

Como concepto fisiológico, la edad biológica establece la edad funcional de cada célula de un organismo sin tener en cuenta el factor tiempo ni afectar de forma homogénea a todos las células, tejidos u organismos. Su estimación es posible gracias a biomarcadores

como la LT o la metilación de genes asociados con el envejecimiento. El AT, como medida de esa edad telomérica o biológica, es el “*hallmark of aging*” que establece la mejor teoría actual del envejecimiento, siendo motivo de estudio en diversas enfermedades. Por este motivo, su presencia y valor pronóstico en FPI han sido extensamente evaluados, siendo postulado como potencial biomarcador capaz de estratificar el riesgo en estos pacientes [60,79].

En este contexto, se sugiere que la determinación de la LT podría ser de gran utilidad clínica en FPI y vehicularía el inicio de su manejo personalizado, abriendo el debate sobre las indicaciones del consecuente estudio genético de determinación de LT y análisis de la variación genética en el complejo telomerasa. Nuestra investigación propone un modelo de probabilidad pretest de AT en FPI, el cual permitiría identificar aquellos pacientes con una alta probabilidad de disfunción telomérica al diagnóstico, siendo candidatos a estudio genético telomérico.

Dicho modelo de probabilidad pretest se basa en la existencia de diferentes proporciones de LT en función del fenotipo de los pacientes, uno de los principales resultados de nuestro trabajo de investigación. Aunque la probabilidad global pretest de AT en FPI fue del 25%, los pacientes más jóvenes de 60 años con alteraciones hematológicas e inmunológicas inespecíficas presentaron una probabilidad pretest de AT superior al 90%.

El efecto combinado de dichas variables clínicas está en concordancia con las bases biológicas de la disfunción telomérica y del envejecimiento, orientando su función en la patogénesis de la enfermedad. Respecto a la variable “alteraciones hematológicas inespecíficas” y la variable “alteraciones inmunológicas inespecíficas”, ambas valoradas como independientes en nuestro modelo de regresión logística multivariante para AT en FPI, su significación estadística evidencia la subyacente telomeropatía presente en estos pacientes. Los casos con FPI y AT pueden presentar con frecuencia una afectación subclínica concomitante, especialmente a nivel hematológico y/o inmunológico, aunque sus síntomas predominantes se deban a la afectación del tejido pulmonar. Estas sutiles alteraciones son mucho más frecuentes que los cuadros larvados incluidos en el clásico síndrome telomérico. Por tanto, es razonable objetivar que el AT en pacientes con FPI

pueda predecirse con la existencia de alteraciones extrapulmonares inespecíficas concomitantes a dicho nivel.

La agrupación de afectaciones en diversos tejidos con un único mecanismo patológico subyacente permite reconocer el síndrome telomérico. Su manifestación clínica más frecuente en la edad adulta es la FPI [108,124]; sin embargo, la identificación de su amplio espectro de afectaciones clínicas tiene importantes implicaciones en el diagnóstico, manejo, tratamiento y seguimiento de varias patologías [108]. Por este motivo, además de su valor predictivo de AT, las alteraciones inmunológicas y/o hematológicas concomitantes deberían ser consideradas en el manejo holístico de los pacientes con FPI, especialmente, en relación a las posibles complicaciones y/o efectos adversos de algunos tratamientos como la RDT, los inmunosupresores u otros tóxicos pulmonares [156,161].

Por su parte, la variable “edad inferior a 60 años” evidencia que los pacientes con AT, y por tanto con mayor edad biológica, pueden presentar una enfermedad por envejecimiento tiempo antes de lo que la edad cronológica podría condicionar. Este hallazgo remarca la relevancia de la edad biológica en la patogénesis de la FPI y sugiere la utilidad de su determinación en la estimación de la susceptibilidad de un individuo al desarrollo de enfermedades por envejecimiento.

Concomitantemente, nuestros resultados también demuestran que la edad biológica tiene un mayor valor pronóstico en FPI que la edad cronológica. Una significativa menor supervivencia, evaluada en términos de mortalidad y necesidad de trasplante pulmonar a 3 años, fue objetivada en los casos de FPI más jóvenes de 60 años con AT. En estos pacientes, clasificados al diagnóstico como GAP I – estadio I, la aplicación de las convencionales escalas multidimensionales de riesgo infraestimaría su pronóstico, dada probablemente la temprana edad de debut de su enfermedad. Sin embargo, la incorporación del AT, o en su defecto de la probabilidad pretest de AT, como biomarcador pronóstico en su evaluación inicial permitiría ampliar el espectro de fenotipos biológicos incluidos en la predicción de riesgo, aumentado su consistencia y fiabilidad.

De nuestro estudio también se desprende que el valor pronóstico de la edad biológica y, en consiguiente del AT, dependen en parte de la edad de presentación de la enfermedad. Es decir, cuanto antes se presenta la afectación fibrosante pulmonar en la vida de un individuo, mayor envejecimiento celular acelerado se produce y más rápido progresa la enfermedad. La anticipación genética, típica de las telomeropatías y vehiculizada por la heredabilidad de la LT, podría explicar este fenómeno. El AT heredado y la consiguiente depleción temprana de células madre y/o acumulación de células senescentes, provocaría el desarrollo de una enfermedad a una edad más temprana y de mayor severidad que los antepasados con una LT superior [92,108,124]. El acortamiento progresivo de los telómeros con cada generación sucesiva condicionaría, por tanto, la anticipación de la edad de presentación y la severidad de la enfermedad [92,108,124-125].

Sin embargo, a pesar de que la “edad menor de 60 años” fue la variable más fuertemente asociada con mal pronóstico en nuestro estudio, también se describió una peor supervivencia a 3 años en los casos de FPI con AT y edad superior a los 60 años en comparación con los pacientes sin AT de cualquier edad. En ambos grupos de pacientes con AT, tanto jóvenes como mayores de 60 años, la peor supervivencia estuvo siempre relacionada con la progresión de la FPI.

Estos resultados ponen de manifiesto las importantes implicaciones clínicas del AT para la FPI y evidencian su valor pronóstico en esta enfermedad. Así mismo, nuestros hallazgos son congruentes con los diversos estudios previos realizados en diferentes cohortes de FPI independientes, las cuales, indistintamente de sus diferentes características demográficas, fisiológicas y de supervivencia basales, presentan una menor supervivencia en presencia de AT [59,60,79,155].

Respecto a la EPID no FPI, las cuales también presentan una LT menor en comparación a controles sanos [150], la presencia de variantes genéticas en el complejo telomerasa condiciona una peor supervivencia y una mayor tasa de progresión [59,60]. En nuestro trabajo de investigación, los portadores de variantes genéticas en *RTEL1*, *DCK1* y *TERT* fueron los únicos pacientes con AT que, además, requirieron someterse a trasplante pulmonar a una edad media de 51 años, edad significativamente menor a la de los casos sin AT. Estos resultados ponen de manifiesto una vez más la relevancia de la edad

telomérica o biológica en la fisiopatología de la enfermedad y evidencian nuevamente el papel de la disfunción telomérica como biomarcador pronóstico en EPID fibrosante.

Además, y en línea con estudios previos [59,60], nuestros hallazgos también secundan la existencia de un fenotipo progresivo con supervivencia reducida en presencia de variantes genéticas en el complejo telomerasa con independencia del tipo de EPID al diagnóstico. En este contexto sugieren que las variantes genéticas en el complejo telomerasa pueden predecir mucho mejor el curso clínico progresivo acelerado de la fibrosis pulmonar que un diagnóstico clínico y/o patrón radiológico/histológico en particular.

El mencionado valor pronóstico de las variantes genéticas en el complejo telomerasa, y de la disfunción telomérica en general, se asocia significativamente con la agregación familiar de EPID. La historia familiar de fibrosis pulmonar es el factor de mayor riesgo para el desarrollo de EPID [39] y el factor predictivo más robusto de AT [37, 41]. En nuestra investigación, el 81,6% de los casos con FPI familiar presentaron acortamiento de los telómeros, siendo severo o muy severo en un 77,4% de ellos. La tasa de AT en casos de FPI esporádica fue significativamente menor, corroborando la asociación entre disfunción telomérica y agregación familiar de EPID. Otro dato de gran relevancia de nuestra investigación es la edad media de presentación de la enfermedad. En los casos familiares, la edad media fue significativamente menor que en los casos de FPI esporádica, lo que nuevamente demuestra que los individuos con mayor AT y, por tanto, mayor edad biológica desarrollan fibrosis pulmonar tiempo antes de lo que la edad cronológica podría condicionar.

Asociado a esto, la literatura científica también describe el valor pronóstico de los antecedentes familiares de EPID [77]. Según *Cutting CC et al.*, la historia familiar de fibrosis pulmonar predice una menor supervivencia tanto para FPI como para EPID no FPI. De hecho, en su estudio los pacientes con EPID no FPI y antecedentes familiares de fibrosis pulmonar presentaron una peor supervivencia, siendo similar a la devastadora evolución de la FPI esporádica [77]. Nuestros resultados fueron congruentes con *Cutting CC et al.* En nuestro proyecto de investigación, la FPI esporádica y la FPF fueron los diagnósticos mayormente reportados entre los pacientes trasplantados incluidos en el estudio. Esto sostiene que los casos con antecedentes familiares de EPID tienen un

riesgo único para una enfermedad más progresiva, demostrando que la historia familiar de fibrosis pulmonar es más predictiva del pronóstico que la clasificación clínica de la EPID [77].

En base a esto, se plantea como el algoritmo diagnóstico terapéutico de la EPID debería incluir la historia familiar como útil modificador del pronóstico y considerar el potencial valor del estudio genético telomérico. Dada la capacidad de predicción pronóstica que tanto la agregación familiar como la disfunción telomérica han demostrado, diversos autores recomiendan balancear cuidadosamente las indicaciones, los riesgos y los beneficios de la biopsia pulmonar en portadores de variantes genéticas teloméricas [60], advirtiendo de la necesidad de un seguimiento clínico estrecho y derivación temprana a trasplante pulmonar con independencia del tipo de EPID.

En conformidad con lo mencionado y con nuestros resultados, la EPID fibrosante en pacientes jóvenes con disfunción telomérica y/o antecedentes familiares de fibrosis pulmonar tiene una elevada probabilidad de presentar un curso clínico rápidamente progresivo con independencia del tipo de EPID, de una menor edad de presentación de la enfermedad y del tratamiento pautado. Actualmente, el trasplante pulmonar sigue siendo el tratamiento que permite mejorar la función pulmonar y la supervivencia de aquellos casos candidatos que se puedan beneficiar del procedimiento [3]. De hecho, en los últimos años, la EPID se considera la primera indicación de trasplante pulmonar [166]. En este contexto, y teniendo en cuenta que la mayoría de los casos de EPID familiar y/o con disfunción telomérica reportados presentan una edad inferior a los 60 años, el trasplante pulmonar sería muy probablemente considerado como único potencial tratamiento de su EPID rápidamente progresiva en ausencia de contraindicaciones para el mismo.

Por este motivo, la comunidad científica tiene un creciente interés en evaluar la viabilidad del trasplante pulmonar en presencia de disfunción telomérica. Diversas investigaciones han corroborado que su valor pronóstico no únicamente abarca la supervivencia y el curso evolutivo de la EPID; si no también la morbilidad y mortalidad asociadas al trasplante pulmonar. *Swaminathan et al.* reportaron un significativo mayor riesgo de muerte post trasplante en portadores de variantes genéticas en *TERT*, *RTEL1*, o *PARN* [167]; mientras que *Newton et al.* describieron una peor supervivencia post

trasplante asociada con AT severo, inferior al percentil 10 [157]. En ambos estudios, la elevada mortalidad fue debida a una elevada tasa de complicaciones sistémicas asociadas a la disfunción telomérica.

En base a estos resultados, diversos foros internacionales han cuestionado si el trasplante pulmonar es factible en estos pacientes dadas las múltiples complicaciones, la elevada mortalidad y la escasez de donantes. Estas consideraciones podrían tener un significativo impacto en los pacientes con EPID y sus familias. Por esta razón, nuestra investigación también evaluó la viabilidad del trasplante pulmonar, comparando la morbi-mortalidad post trasplante según la presencia o no de disfunción telomérica.

En concordancia con lo ya publicado, nuestro estudio también reportó una mayor morbilidad post trasplante en EPID con AT y/o variantes genéticas en el complejo telomerasa. Sin embargo, nuestra principal y novedosa contribución científica, fue determinar que esa mayor tasa de complicaciones post trasplante es manejable; y, qué en caso de proporcionar el correcto manejo, el trasplante pulmonar también mejora la calidad de vida y la supervivencia de la EPID con disfunción telomérica.

Este impacto positivo del trasplante fue congruente con otras investigaciones previamente publicadas. *Borie et al.* reportaron la misma supervivencia post trasplante entre controles y portadores de variantes genéticas en el complejo telomerasa [159]. Así mismo, *Silhan et al.* describieron una razonable supervivencia post trasplante en presencia de disfunción telomérica a pesar de una elevada morbilidad [156]. Adicionalmente, la viabilidad del trasplante pulmonar también se evaluó para otras telomeropatías, como la disqueratosis congénita [168] o en casos con necesidad de trasplante doble de hígado y pulmón [169], reportando también un favorable resultado a largo plazo.

Los resultados que se desprenden tanto de nuestro estudio como de los mencionados son controvertidos y poco comparables. Esto se debe a la elevada dispersión de diseños y métodos utilizados y a la ausencia de un grupo control en la mayoría de los estudios centrados en trasplante pulmonar [156-159,167,170,]. Además, en dichas investigaciones, participaron una amplia variedad de centros trasplantadores con una gran heterogeneidad de protocolos de trasplante pulmonar, tanto nacionales como

propios de cada hospital, así como también de procedimientos prequirúrgicos, quirúrgicos y post quirúrgicos muy variables. En población general, se han llevado a cabo muy pocos estudios de trasplante pulmonar aleatorizados; por lo que todavía existe una falta de evidencia en algunas áreas y los resultados del trasplante pulmonar están lejos de ser óptimos para muchos pacientes [171]. En este escenario, la toma de decisiones en trasplante pulmonar es a veces un proceso muy controvertido y requiere de un equilibrio entre la evidencia y la experiencia.

Considerando estos argumentos, nuestra investigación presenta las siguientes fortalezas. Se realizó una evaluación prospectiva de los resultados del trasplante pulmonar en EPID según la presencia o no de disfunción telomérica, como único marcador biológico diferencial entre los receptores. Nuestra cohorte de pacientes se trasplantó en un único centro trasplantador, por lo que se sometió al mismo protocolo de trasplante pulmonar. Así mismo, tampoco se observaron diferencias en el estado funcional previo al trasplante ni en la puntuación LAS entre los pacientes incluidos, a pesar del tipo de EPID fibrótica, la prescripción terapéutica previa al trasplante y la menor edad del grupo de pacientes con disfunción telomérica.

Como aspecto novedoso, nuestro trabajo de investigación evaluó por primera vez el grado de calidad de vida con el que los pacientes sobreviven al trasplante pulmonar. Con independencia de la disfunción telomérica, se observó una mejoría global de la calidad de vida post trasplante siendo factible recuperar una vida activa y retirar el soporte de oxígeno. Sin embargo, a pesar del consecuente impacto positivo, estos resultados no disponen de evidencia científica previa con la que compararse y su reproducibilidad depende en gran parte de aspectos como el manejo post quirúrgico, la rehabilitación, el acceso a determinados cuidados, entre otros; todos ellos muy variables según las condiciones socioeconómicas del país, del centro trasplantador y del paciente trasplantado.

En cualquier caso, nuestro proyecto de investigación describe que el impacto positivo del trasplante pulmonar tanto en la supervivencia como en la calidad de vida en pacientes con telomeropatía debe balancearse con su elevada morbilidad postrasplante. Por este motivo, uno de los principales objetivos de nuestro estudio fue investigar los perfiles de morbilidad para analizar qué estrategias de prevención y/o

manejo de dichas complicaciones serían óptimas a cada fase del post trasplante. Nuestros resultados evidenciaron que la aparición y predominancia de las complicaciones post trasplante podría ser cronológica y fluctuar según 1) los requerimientos clínicos asistenciales propios de cada fase del post operatorio y del post trasplante a largo plazo; y, 2) la susceptibilidad del paciente.

Dicha susceptibilidad condiciona que la morbilidad reportada esté en íntima relación con las manifestaciones sistémicas del defecto telomérico. Por ejemplo, la disfunción telomérica se ha asociado con inmunodeficiencia [172] y con una elevada tasa de efectos adversos y complicaciones en relación con el tratamiento inmunosupresor [160,161]. Esto podría explicar la mayor tasa de ingresos hospitalarios post trasplante en contexto de una amplia variedad de infecciones en el grupo de pacientes con trastornos teloméricos. La profilaxis antibiótica de estos casos es una hipótesis que aún no ha sido evaluada. Sin embargo, la profilaxis post trasplante del CMV sí tiene experiencia previa y, en nuestro estudio, podría explicar la similar tasa de replicación del virus con independencia de la disfunción telomérica; resultados totalmente opuestos a los de estudios previos [158]. No obstante, a pesar de la similar tasa de replicación, los pacientes con alteraciones teloméricas presentaron efectos adversos derivados de la toxicidad medular de la profilaxis del CMV, especialmente trombocitopenia y leucopenia.

Las complicaciones hematológicas también están altamente asociadas con la disfunción telomérica [156,159]. En nuestro estudio, junto con las infecciones, las complicaciones hematológicas fueron predominantes y se presentaron únicamente en pacientes con disfunción telomérica, sobre todo, durante el post operatorio inmediato y el primer mes post trasplante. Este hallazgo podría estar en clara relación con el uso de la circulación extracorpórea, la cual fue necesaria durante mayor tiempo en el acto quirúrgico de los pacientes con disfunción telomérica. Aunque este dato no alcanzó la significación estadística en nuestro análisis, sí supone una potencial estrategia de predicción y prevención de complicaciones que asegure el éxito del trasplante pulmonar en presencia de disfunción telomérica. Del mismo modo, la existencia de un síndrome mielodisplásico concomitante previo al trasplante pulmonar podría también incrementar aún más la tasa de complicaciones hematológicas post trasplante; lo que

pone de manifiesto la necesidad de desarrollar recomendaciones específicas para esos pacientes [159].

En base a esto, conocer cuando y por qué aparecen las complicaciones post trasplante permite establecer posibles estrategias de prevención y gestión de las mismas, capaz de inclinar la balanza de la elevada morbilidad de la disfunción telomérica a favor de los beneficios en supervivencia; siendo necesaria la evaluación pre trasplante de riesgos, el equilibrio del uso del tratamiento inmunosupresor y la valoración de la susceptibilidad genética de los pacientes [159].

De acuerdo a todo lo expuesto, la disfunción telomérica y su valor pronóstico abren la puerta a la estratificación de pacientes en EPID y ponen de manifiesto la necesidad de un manejo customizado. En este contexto, se considera cada vez más imprescindible evaluar de forma individualizada el manejo de estos casos y sus familiares haciendo especial énfasis en la necesidad de equilibrar las indicaciones de la biopsia pulmonar, el uso de fármacos inmunosupresores, la posible afectación extrapulmonar concomitante y la elevada morbilidad post trasplante.

Este manejo personalizado depende en gran medida de la incorporación del estudio genético telomérico al algoritmo diagnóstico de la EPID. Recientemente, las indicaciones de estudio genético se han consensado en dos propuestas internacionales multidisciplinarias [173,174]. Sin embargo, el uso clínico del estudio genético telomérico aún no es ampliamente accesible y su disponibilidad es heterogénea entre centros, regiones y países. La elevada complejidad técnica y la gran especialización de los recursos humanos implicados en la interpretación de los datos genómicos son probablemente dos de las mayores limitaciones para la aplicación clínica de las pruebas genéticas teloméricas de forma homogénea a nivel mundial. Y, aunque los costes derivados de dichas técnicas son cada vez menores, su valor económico todavía podría ser demasiado elevado en países en vías de desarrollo y/o subdesarrollados.

Nuestro modelo de probabilidad pretest de AT en FPI podría contribuir a mejorar la equidad en términos de genética en salud. Puesto que permite reconocer qué pacientes tienen una alta probabilidad pretest de AT, su utilización podría ayudar a seleccionar los pacientes que más se beneficiarían del estudio genético y de la inversión de los recursos

existentes. Así mismo, y especialmente para aquellos centros o países en los que la realización del estudio genético sea totalmente inviable, el reconocimiento de las variables clínicas predictoras de AT en un paciente con FPI podría propiciar un estrecho seguimiento sistemático de las posibles complicaciones derivadas de la alta sospecha de una disfunción telomérica subyacente.

Otra novedad importante que nuestro estudio de investigación aporta es el uso de un frotis o *swab* del epitelio yugal como método fácil y no invasivo para evaluar la LT, el cual presenta una buena correlación con la LT del ADN de leucocitos de sangre periférica. En este método, la recogida de la muestra no requiere de personal especializado, siendo factible realizarlo en el mismo domicilio del paciente. Esto, además de reducir el impacto de la asistencia sanitaria en la vida del enfermo, también ayuda a reducir los costes sanitarios derivados del desplazamiento al hospital y de la realización de exploraciones, optimizando la gestión de recursos.

Las limitaciones de nuestro estudio se enumeran a continuación. En primer lugar, el pequeño tamaño muestral para el subgrupo de pacientes con edad inferior a los 60 años y los diferentes subgrupos de nuestra cohorte de EPID fibrótica trasplantada. Esto condiciona una reducción del poder estadístico del estudio. Sin embargo, es importante considerar que la EPID es una enfermedad rara con una baja incidencia poblacional. En consecuencia, la incidencia de EPID en menores de 60 años es aún menor y la proporción de pacientes trasplantados es por tanto mucho inferior.

En segundo lugar, el tabaco ha sido la única exposición ambiental recogida en nuestro estudio. Puesto que la LT se ve determinada e influenciada por factores genéticos y ambientales multifactoriales, la ausencia de datos sobre exposiciones adicionales podría condicionar la reproducibilidad de los resultados.

En tercer lugar, no fue posible analizar la variación genética en genes del complejo telomerasa en los pacientes incluidos en el modelo de probabilidad pretest de AT en FPI, así como tampoco para validar las variables clínicas predictoras de AT. Esto reduce la validez interna de nuestro estudio.

Finalmente, en cuarto lugar, la ausencia de una cohorte de validación para nuestra cohorte de EPID fibrótica trasplantada condiciona la reproducibilidad de los resultados.

Sin embargo, la experiencia en el manejo del trasplante y los protocolos asistenciales difieren entre centros y países, lo que representa una enorme dificultad para incrementar de forma homogénea el número de casos o encontrar una cohorte de validación apropiada.

6

CONCLUSIÓN

6. Conclusión

1. Las variables clínicas “edad inferior a 60 años”, “presencia de alteraciones hematológicas inespecíficas” y “presencia de alteraciones inmunológicas inespecíficas” predicen la existencia de acortamiento telomérico en fibrosis pulmonar idiopática.
2. La probabilidad pretest de acortamiento telomérico en fibrosis pulmonar idiopática puede evaluarse mediante un modelo de probabilidad que incluye las variables clínicas predictoras identificadas. A mayor número de variables predictoras presentes, mayor probabilidad de acortamiento telomérico.
3. Los pacientes con fibrosis pulmonar idiopática esporádica con mayor probabilidad de acortamiento telomérico son: menores de 60 años, con alteraciones inmunológicas y hematológicas inespecíficas, siendo candidatos ideales para estudio genético telomérico.
4. El acortamiento telomérico se asocia con una reducción significativa de la supervivencia en fibrosis pulmonar idiopática esporádica y una rápida progresión de la enfermedad.
5. El acortamiento telomérico es un potencial biomarcador pronóstico en fibrosis pulmonar idiopática capaz de predecir el curso clínico de la enfermedad.
6. La disfunción telomérica asocia una elevada morbilidad post trasplante pulmonar en enfermedad pulmonar intersticial difusa fibrótica progresiva, sin impactar negativamente en la supervivencia post trasplante ni en la calidad de vida a largo plazo.
7. La viabilidad del trasplante pulmonar y sus beneficios a largo plazo en pacientes con enfermedad pulmonar intersticial difusa fibrótica y disfunción telomérica son

factibles optimizando el conocimiento y el manejo de su elevada morbilidad post trasplante.

7

BIBLIOGRAFÍA

7. Bibliografía

1. Travis WD, Costabel U, Hansell DM, King TE Jr, Lynch DA, Nicholson AG, et al; ATS/ERS Committee on Idiopathic Interstitial Pneumonias. 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 Sep 15;188(6):733-48.
2. Greiffo FR, Eickelberg O, Fernandez IE. Systems medicine advances in interstitial lung disease. *Eur Respir Rev.* 2017;26:170021.
3. Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, et al; ATS/ERS/JRS/ALAT Committee on Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011 Mar 15;183(6):788-824.
4. Raghu G, Remy-Jardin M, Richeldi L, Thomson CC, Inoue Y, Johkoh T, et al. Idiopathic Pulmonary Fibrosis (an Update) and Progressive Pulmonary Fibrosis in Adults: An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med.* 2022 May 1;205(9):e18-e47.
5. Wuyts WA, Agostini C, Antoniou KM, Bouros D, Chambers RC, Cottin V, et al. The pathogenesis of pulmonary fibrosis: a moving target. *Eur Respir J.* 2013 May;41(5):1207-18.
6. Selman M, Pardo A. Revealing the pathogenic and aging-related mechanisms of the enigmatic idiopathic pulmonary fibrosis. an integral model. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014 May 15;189(10):1161-72.
7. Goodwin AT, Jenkins G. Molecular Endotyping of Pulmonary Fibrosis. *Chest.* 2016 Jan;149(1):228-37.
8. Spagnolo P, Kropski JA, Jones MG, Lee JS, Rossi G, Karampitsakos T, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: Disease mechanisms and drug development. *Pharmacol Ther.* 2021 Jun;222:107798.

9. Selman M, López-Otín C, Pardo A. Age-driven developmental drift in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. J.* 2016; 48: 538–52.
10. Thannickal, V.J. Mechanistic links between aging and lung fibrosis. *Biogerontology* 14, 609–615 (2013).
11. Meiners S, Eickelberg O, Königshoff M. Hallmarks of the ageing lung. *Eur Respir J.* 2015 Mar;45(3):807-27.
12. American Thoracic Society; European Respiratory Society. American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 Jan 15;165(2):277-304. doi: 10.1164/ajrccm.165.2.ats01. Erratum in: *Am J Respir Crit Care Med* 2002 Aug 1;166(3):426.
13. Alder JK, Chen JJ, Lancaster L, Danoff S, Su SC, Cogan JD, et al. Short telomeres are a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Sep 2;105(35):13051-6.
14. Demopoulos K, Arvanitis DA, Vassilakis DA, Siafakas NM, Spandidos DA. MYCL1, FHIT, SPARC, p16(INK4) and TP53 genes associated to lung cancer in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Cell Mol Med.* 2002 Apr-Jun;6(2):215-22.
15. Bueno M, Lai YC, Romero Y, Brands J, St Croix CM, Kamga C, et al. PINK1 deficiency impairs mitochondrial homeostasis and promotes lung fibrosis. *J Clin Invest.* 2015 Feb;125(2):521-38. doi: 10.1172/JCI74942. Epub 2014 Dec 22.
16. Korfei M, von der Beck D, Henneke I, Markart P, Ruppert C, Mahavadi P, et al. Comparative proteome analysis of lung tissue from patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), non-specific interstitial pneumonia (NSIP) and organ donors. *J Proteomics.* 2013 Jun 24;85:109-28.
17. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell.* 2013 Jun 6;153(6):1194-217.

18. Sauleda J, Núñez B, Sala E, Soriano JB. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Epidemiology, Natural History, Phenotypes. *Med Sci (Basel)*. 2018 Nov 29;6(4):110.
19. Xaubet A, Ancochea J, Molina-Molina M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Med Clin (Barc)*. 2017 Feb 23;148(4):170-175.
20. Kärkkäinen M, Kettunen HP, Nurmi H, Selander T, Purokivi M, Kaarteenaho R. Effect of smoking and comorbidities on survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res*. 2017;18:160.
21. Paolocci G, Folletti I, Torén K, Ekström M, Dell’Omo M, Muzi G, et al. Occupational risk factors for idiopathic pulmonary fibrosis in Southern Europe: A case-control study. *BMC Pulm Med*. 2018;18:75.
22. Ley B, Collard HR. Epidemiology of idiopathic pulmonary fibrosis. *Clin Epidemiol*. 2013;5:483–92.
23. Hoyne GF, Elliott H, Mutsaers SE, Prêle CM. Idiopathic pulmonary fibrosis and a role for autoimmunity. *Immunol Cell Biol*. 2017 Aug;95(7):577-583.
24. Kim JS, Podolanczuk AJ, Borker P, Kawut SM, Raghu G, Kaufman JD, et al. Obstructive Sleep Apnea and Subclinical Interstitial Lung Disease in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Ann Am Thorac Soc*. 2017 Dec;14(12):1786-1795.
25. Bonanni PP, Frymoyer JW, Jacox RF. A family study of idiopathic pulmonary fibrosis. A possible dysproteinemic and genetically determined disease. *Am J Med*. 1965 Sep;39:411-21.
26. Javaheri S, Lederer DH, Pella JA, Mark GJ, Levine BW. Idiopathic pulmonary fibrosis in monozygotic twins: the importance of genetic predisposition. *Chest*. 1980;78:591–4
27. Taskar VS, Coultas DB. Is idiopathic pulmonary fibrosis an environmental disease? *Proc Am Thorac Soc*. 2006;3(4):293–298.
28. Kropski JA, Blackwell TS, Loyd JE. The genetic basis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*. 2015;45(6):1717–1727.

29. van Moorsel CH, Hoffman TW, van Batenburg AA, Klay D, van der Vis JJ, Grutters JC. Understanding Idiopathic Interstitial Pneumonia: A Gene-Based Review of Stressed Lungs. *Biomed Res Int*. 2015;2015:304186.
30. Mathai SK, Yang IV, Schwarz MI, Schwartz DA. Incorporating genetics into the identification and treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *BMC Med*. 2015 Sep 24;13:191.
31. Mathai SK, Newton CA, Schwartz DA, Garcia CK. Pulmonary fibrosis in the era of stratified medicine. *Thorax*. 2016 Dec;71(12):1154-1160.
32. Kaur A, Mathai SK, Schwartz DA. Genetics in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Pathogenesis, Prognosis, and Treatment. *Front Med*. 2017;4:154.
33. Adegunsoye A, Vij R, Noth I. Integrating Genomics Into Management of Fibrotic Interstitial Lung Disease. *Chest*. 2019 May;155(5):1026-1040.
34. Garcia CK, Talbert JL. Pulmonary Fibrosis Predisposition Overview. 2005 Jan 21 [updated 2022 May 12]. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, Amemiya A, editors. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2023.
35. Garcia CK. Insights from human genetic studies of lung and organ fibrosis. *J Clin Invest*. 2018 Jan 2;128(1):36-44.
36. Lawson WE, Loyd JE. The genetic approach in pulmonary fibrosis: can it provide clues to this complex disease? *Proc Am Thorac Soc*. 2006 Jun;3(4):345-9.
37. Steele MP, Speer MC, Loyd JE, Brown KK, Herron A, Slifer SH, et al. Clinical and pathologic features of familial interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Nov 1;172(9):1146-52.
38. Fernandez BA, Fox G, Bhatia R, Sala E, Noble B, Denic N, et al. A Newfoundland cohort of familial and sporadic idiopathic pulmonary fibrosis patients: clinical and genetic features. *Respir Res*. 2012 Aug 1;13(1):64.

39. García-Sancho C, Buendía-Roldán I, Fernández-Plata MR, Navarro C, Pérez-Padilla R, Vargas MH, et al. Familial pulmonary fibrosis is the strongest risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med*. 2011 Dec;105(12):1902-7.
40. Loyd JE. Pulmonary fibrosis in families. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003 Sep;29(3 Suppl):S47-50.
41. Borie R, Kannengiesser C, Nathan N, Tabèze L, Pradère P, Crestani B. Familial pulmonary fibrosis. *Rev Mal Respir*. 2015 Apr;32(4):413-34.
42. Zhang D, Newton CA. Familial Pulmonary Fibrosis: Genetic Features and Clinical Implications. *Chest*. 2021 Nov;160(5):1764-1773.
43. Swaye P, Van Ordstrand HS, McCormack LJ, Wolpaw SE. Familial Hamman-Rich syndrome. Report of eight cases. *Dis Chest*. 1969 Jan;55(1):7-12.
44. Fingerlin TE, Murphy E, Zhang W, Peljto AL, Brown KK, Steele MP, et al. Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for pulmonary fibrosis. *Nat Genet*. 2013 Jun;45(6):613-20.
45. Allen RJ, Porte J, Braybrooke R, Flores C, Fingerlin TE, Oldham JM, et al. Genetic variants associated with susceptibility to idiopathic pulmonary fibrosis in people of European ancestry: a genome-wide association study. *Lancet Respir Med*. 2017 Nov;5(11):869-880.
46. Allen RJ, Guillen-Guio B, Oldham JM, Ma SF, Dressen A, Paynton ML, et al. Genome-Wide Association Study of Susceptibility to Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020 Mar 1;201(5):564-574.
47. Allen RJ, Stockwell A, Oldham JM, Guillen-Guio B, Schwartz DA, Maher TM, et al. Genome-wide association study across five cohorts identifies five novel loci associated with idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax*. 2022 Aug;77(8):829-833.
48. Lorenzo-Salazar JM, Ma SF, Jou J, Hou PC, Guillen-Guio B, Allen RJ, et al. Novel idiopathic pulmonary fibrosis susceptibility variants revealed by deep sequencing. *ERJ Open Res*. 2019 Jun 10;5(2):00071-2019.

49. Fingerlin TE, Zhang W, Yang IV, Ainsworth HC, Russell PH, Blumhagen RZ, et al. Genome-wide imputation study identifies novel HLA locus for pulmonary fibrosis and potential role for auto-immunity in fibrotic idiopathic interstitial pneumonia. *BMC Genet.* 2016 Jun 7;17(1):74.
50. Mathai SK, Pedersen BS, Smith K, Russell P, Schwarz MI, Brown KK, et al. Desmoplakin Variants Are Associated with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016 May 15;193(10):1151-60.
51. Hao Y, Bates S, Mou H, Yun JH, Pham B, Liu J, et al. Genome-Wide Association Study: Functional Variant rs2076295 Regulates Desmoplakin Expression in Airway Epithelial Cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 2020 Nov 1;202(9):1225-1236.
52. Dhindsa RS, Mattsson J, Nag A, Wang Q, Wain LV, Allen R, et al. Identification of a missense variant in SPDL1 associated with idiopathic pulmonary fibrosis. *Commun Biol.* 2021 Mar 23;4(1):392.
53. Seibold MA, Wise AL, Speer MC, Steele MP, Brown KK, Loyd JE, et al. A common MUC5B promoter polymorphism and pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* 2011 Apr 21;364(16):1503-12.
54. Spagnolo P, Grunewald J, du Bois RM. Genetic determinants of pulmonary fibrosis: evolving concepts. *Lancet Respir Med.* 2014 May;2(5):416-28.
55. Spagnolo P, Cottin V. Genetics of idiopathic pulmonary fibrosis: from mechanistic pathways to personalised medicine. *J Med Genet.* 2017 Feb;54(2):93-99.
56. King, C.S., Aryal, S., Nathan, S.D. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Phenotypes and Comorbidities. Online edition. Meyer, K., Nathan, S. Ed. *Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Respiratory Medicine.* Humana Press, Cham; 2019
57. Peljto AL, Blumhagen RZ, Walts AD, Cardwell J, Powers J, Corte TJ, et al. Idiopathic Pulmonary Fibrosis Is Associated with Common Genetic Variants and Limited Rare Variants. *Am J Respir Crit Care Med.* 2023 Jan 5.
58. Wolters PJ. A recurring theme in pulmonary fibrosis genetics. *Eur Respir J.* 2017 May 11;49(5):1700545.

59. Borie R, Tabèze L, Thabut G, Nunes H, Cottin V, Marchand-Adam S, et al. Prevalence and characteristics of TERT and TERC mutations in suspected genetic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J.* 2016 Dec;48(6):1721-1731.
60. Newton CA, Batra K, Torrealba J, Kozlitina J, Glazer CS, Aravena C, et al. Telomere-related lung fibrosis is diagnostically heterogeneous but uniformly progressive. *Eur Respir J.* 2016 Dec;48(6):1710-1720.
61. Zhang Y, Noth I, Garcia J. G. N, Kaminski, N. A variant in the promoter of MUC5B and idiopathic pulmonary fibrosis. (Letter) *New Eng. J. Med.* 364: 1576-1577, 2011
62. Hunninghake G. M., Hatabu H, Okajima Y, Gao W, Dupui J, Latourelle J. C., et al. MUC5B promoter polymorphism and interstitial lung abnormalities. *New Eng. J. Med.* 368: 2192-2200, 2013
63. Juge PA, Lee J S, Ebstein E, Furukawa H, Dobrinskikh E, Gazal S, et al. MUC5B promoter variant and rheumatoid arthritis with interstitial lung disease. *New Eng. J. Med.* 379: 2209-2219, 2018
64. Evans CM, Fingerlin TE, Schwarz MI, Lynch D, Kurche J, Warg L, Yang IV, Schwartz DA. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Genetic Disease That Involves Mucociliary Dysfunction of the Peripheral Airways. *Physiol Rev.* 2016 Oct;96(4):1567-91.
65. Juge PA, Borie R, Kannengiesser C, Gazal S, Revy P, Wemeau-Stervinou L, et al. Shared genetic predisposition in rheumatoid arthritis-interstitial lung disease and familial pulmonary fibrosis. *Eur Respir J.* 2017 May 11;49(5):1602314.
66. Alder JK, Barkauskas CE, Limjunyawong N, Stanley SE, Kembou F, Tuder RM, et al. Telomere dysfunction causes alveolar stem cell failure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Apr 21;112(16):5099-104.
67. Naikawadi RP, Disayabutr S, Mallavia B, Donne ML, Green G, La JL, et al. Telomere dysfunction in alveolar epithelial cells causes lung remodeling and fibrosis. *JCI Insight.* 2016 Sep 8;1(14):e86704.

68. Lawson WE, Cheng DS, Degryse AL, Tanjore H, Polosukhin VV, Xu XC, et al. Endoplasmic reticulum stress enhances fibrotic remodeling in the lungs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jun 28;108(26):10562-7.
69. Singh, A. Complex Traits. In: Gellman, M.D., Turner, J.R. (eds) *Encyclopedia of Behavioral Medicine*. Springer, New York, NY. 2013
70. Boyle EA, Li YI, Pritchard JK. An Expanded View of Complex Traits: From Polygenic to Omnigenic. *Cell*. 2017 Jun 15;169(7):1177-1186.
71. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorf LA, Hunter DJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*. 2009 Oct 8;461(7265):747-53.
72. Holly Landrum Peay, Jehannine Claire Austin. *How to Talk with Families About Genetics and Psychiatric Illness*. Nueva York. W. W. Norton & Company. 2011
73. Lee HY, Seo JB, Steele MP, Schwarz MI, Brown KK, Loyd JE, et al. High-resolution CT scan findings in familial interstitial pneumonia do not conform to those of idiopathic interstitial pneumonia. *Chest*. 2012 Dec;142(6):1577-1583.
74. Terwiel M, Grutters JC, van Moorsel CHM. Clustering of lung diseases in the family of interstitial lung disease patients. *BMC Pulm Med*. 2022 Apr 7;22(1):134.
75. Kropski JA. Familial Interstitial Lung Disease. *Semin Respir Crit Care Med*. 2020 Apr;41(2):229-237.
76. Bennett D, Mazzei MA, Squitieri NC, Bargagli E, Refini RM, Fossi A, et al. Familial pulmonary fibrosis: Clinical and radiological characteristics and progression analysis in different high resolution-CT patterns. *Respir Med*. 2017 May;126:75-83.
77. Cutting CC, Bowman WS, Dao N, Pugashetti JV, Garcia CK, Oldham JM, et al. Family History of Pulmonary Fibrosis Predicts Worse Survival in Patients With Interstitial Lung Disease. *Chest*. 2021 May;159(5):1913-1921.
78. Mathai SK, Schwartz DA, Warg LA. Genetic susceptibility and pulmonary fibrosis. *Curr Opin Pulm Med*. 2014 Sep;20(5):429-35.

79. Stuart BD, Lee JS, Kozlitina J, Noth I, Devine MS, Glazer CS, et al. Effect of telomere length on survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: an observational cohort study with independent validation. *Lancet Respir Med*. 2014 Jul;2(7):557-65.
80. Newton CA, Oldham JM, Applegate C, Carmichael N, Powell K, Dilling D, et al. Pulmonary Fibrosis Foundation Genetic Testing Work Group. The Role of Genetic Testing in Pulmonary Fibrosis: A Perspective From the Pulmonary Fibrosis Foundation Genetic Testing Work Group. *Chest*. 2022 Aug;162(2):394-405.
81. Borie R, Kannengiesser C, Antoniou K, Bonella F, Crestani B, Fabre A, et al. European Respiratory Society statement on familial pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*. 2023 Mar 16;61(3):2201383.
82. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70.
83. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74.
84. Kirkwood TB. Understanding the odd science of aging. *Cell*. 2005 Feb 25;120(4):437-47.
85. Vijg J, Campisi J. Puzzles, promises and a cure for ageing. *Nature*. 2008 Aug 28;454(7208):1065-71.
86. Gems D, Partridge L. Genetics of longevity in model organisms: debates and paradigm shifts. *Annu Rev Physiol*. 2013;75:621-44.
87. Blagosklonny MV. Aging: ROS or TOR. *Cell Cycle*. 2008 Nov 1;7(21):3344-54.
88. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell*. 2023 Jan 19;186(2):243-278.
88. Mensà E, Latini S, Ramini D, Storci G, Bonafè M, Olivieri F. The telomere world and aging: Analytical challenges and future perspectives. *Ageing Res Rev*. 2019 Mar;50:27-42.
89. Vaiserman A, Krasnienkov D. Telomere Length as a Marker of Biological Age: State-of-the-Art, Open Issues, and Future Perspectives. *Front Genet*. 2021 Jan 21;11:630186.

90. AFFAR, A. F. A. R. Biomarkers of aging: An introduction to aging science brought to you by the American federation for aging research. American federation for aging research, New York, NY (2016)
91. Sanders JL, Newman AB. Telomere length in epidemiology: a biomarker of aging, age-related disease, both, or neither? *Epidemiol Rev.* 2013;35(1):112-31.
92. Opresko PL, Shay JW. Telomere-associated aging disorders. *Ageing Res Rev.* 2017 Jan;33:52-66.
93. Willeit P, Willeit J, Mayr A, Weger S, Oberhollenzer F, Brandstätter A, et al. Telomere length and risk of incident cancer and cancer mortality. *JAMA.* 2010 Jul 7;304(1):69-75.
94. Haycock PC, Heydon EE, Kaptoge S, Butterworth AS, Thompson A, Willeit P. Leucocyte telomere length and risk of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2014 Jul 8;349:g4227.
95. Aubert G, Lansdorp PM. Telomeres and aging. *Physiol Rev.* 2008 Apr;88(2):557-79.
96. Slagboom PE, Droog S, Boomsma DI. Genetic determination of telomere size in humans: a twin study of three age groups. *Am J Hum Genet.* 1994 Nov;55(5):876-82.
97. Graakjaer J, Pascoe L, Der-Sarkissian H, Thomas G, Kolvraa S, Christensen K, et al. The relative lengths of individual telomeres are defined in the zygote and strictly maintained during life. *Aging Cell.* 2004 Jun;3(3):97-102.
98. Grahame TJ, Schlesinger RB. Oxidative stress-induced telomeric erosion as a mechanism underlying airborne particulate matter-related cardiovascular disease. *Part Fibre Toxicol.* 2012 Jun 19;9:21.
99. Theall KP, Brett ZH, Shirtcliff EA, Dunn EC, Drury SS. Neighborhood disorder and telomeres: connecting children's exposure to community level stress and cellular response. *Soc Sci Med.* 2013 May;85:50-8.
100. Hoxha M, Dioni L, Bonzini M, Pesatori AC, Fustinoni S, Cavallo D, et al. Association between leukocyte telomere shortening and exposure to traffic pollution: a cross-sectional study on traffic officers and indoor office workers. *Environ Health.* 2009 Sep 21;8:41

101. Zierer J, Kastenmüller G, Suhre K, Gieger C, Codd V, Tsai PC, et al. Metabolomics profiling reveals novel markers for leukocyte telomere length. *Aging (Albany NY)*. 2016 Jan;8(1):77-94.
102. Mundstock E, Zatti H, Louzada FM, Oliveira SG, Guma FT, Paris MM, et al. Effects of physical activity in telomere length: Systematic review and meta-analysis. *Ageing Res Rev*. 2015 Jul;22:72-80.
103. Freitas-Simoes TM, Ros E, Sala-Vila A. Telomere length as a biomarker of accelerated aging: is it influenced by dietary intake? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2018 Nov;21(6):430-436.
104. Gorenjak V, Akbar S, Stathopoulou MG, Visvikis-Siest S. The future of telomere length in personalized medicine. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2018 Mar 1;23(9):1628-1654.
105. Gao X, Zhang Y, Mons U, Brenner H. Leukocyte telomere length and epigenetic-based mortality risk score: associations with all-cause mortality among older adults. *Epigenetics*. 2018;13(8):846-857.
106. Montiel Rojas D, Nilsson A, Ponsot E, Brummer RJ, Fairweather-Tait S, Jennings A, et al. Short Telomere Length Is Related to Limitations in Physical Function in Elderly European Adults. *Front Physiol*. 2018 Aug 10;9:1110.
107. Cawthon RM, Smith KR, O'Brien E, Sivatchenko A, Kerber RA. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet*. 2003 Feb 1;361(9355):393-5.
108. Armanios M, Blackburn EH. The telomere syndromes. *Nat Rev Genet*. 2012 Oct;13(10):693-704.
109. Vulliamy T, Marrone A, Goldman F, Dearlove A, Bessler M, Mason PJ, et al. The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Nature*. 2001 Sep 27;413(6854):432-5.
110. Savage SA, Bertuch AA. The genetics and clinical manifestations of telomere biology disorders. *Genet Med*. 2010 Dec;12(12):753-64.

111. Pérez LM, Amaral MA, Mundstock E, Barbé-Tuana FM, Guma FT, Jones MH, et al. Effects of Diet on Telomere Length: Systematic Review and Meta-Analysis. *Public Health Genomics*. 2017;20(5):286-292.
112. Mundstock E, Zatti H, Louzada FM, Oliveira SG, Guma FT, Paris MM, et al. Effects of physical activity in telomere length: Systematic review and meta-analysis. *Ageing Res Rev*. 2015 Jul;22:72-80.
113. Brown LL, Zhang YS, Mitchell C, Ailshire J. Does Telomere Length Indicate Biological, Physical, and Cognitive Health Among Older Adults? Evidence from the Health and Retirement Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2018 Nov 10;73(12):1626-1632.
114. Belsky DW, Caspi A, Houts R, Cohen HJ, Corcoran DL, Danese A, et al. Quantification of biological aging in young adults. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Jul 28;112(30):E4104-10.
115. Lowsky DJ, Olshansky SJ, Bhattacharya J, Goldman DP. Heterogeneity in healthy aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2014 Jun;69(6):640-9.
116. Vetter VM, Meyer A, Karbasiyan M, Steinhagen-Thiessen E, Hopfenmüller W, Demuth I. Epigenetic Clock and Relative Telomere Length Represent Largely Different Aspects of Aging in the Berlin Aging Study II (BASE-II). *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2019 Jan 1;74(1):27-32.
117. Shay JW. Telomeres and aging. *Curr Opin Cell Biol*. 2018 Jun;52:1-7.
118. Khan SS, Singer BD, Vaughan DE. Molecular and physiological manifestations and measurement of aging in humans. *Aging Cell*. 2017 Aug;16(4):624-633.
119. Belsky DW, Moffitt TE, Cohen AA, Corcoran DL, Levine ME, Prinz JA, et al. Eleven Telomere, Epigenetic Clock, and Biomarker-Composite Quantifications of Biological Aging: Do They Measure the Same Thing? *Am J Epidemiol*. 2018 Jun 1;187(6):1220-1230.
120. Lilian C Huiré, M.S.C. Telómeros y telomerasa: breve recuento de una historia iniciada por Hermann Muller y Bárbara McClintock. *Colombia Médica*. Vol 37 Nº 4, 2006
121. Rosario Perona, Laura Iarriccio, Laura Pintado-Berninches, Javier Rodríguez-Centeno, Cristina Manguan-García, Elena García, et al. Molecular Diagnosis and

Precision Therapeutic Approaches for Telomere Biology Disorders, Telomere Marcelo L. Ed. Larramendy, IntechOpen, 2016

122. Demanelis K, Jasmine F, Chen LS, Chernoff M, Tong L, Delgado D, et al. Determinants of telomere length across human tissues. *Science*. 2020 Sep 11;369(6509):eaaz6876.

123. Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet*. 2005 Aug;6(8):611-22.

124. Armanios M. Syndromes of telomere shortening. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2009;10:45-61.

125. Armanios M. Telomerase and idiopathic pulmonary fibrosis. *Mutat Res*. 2012 Feb 1;730(1-2):52-8.

126. Armanios M. Telomeres and age-related disease: how telomere biology informs clinical paradigms. *J Clin Invest*. 2013 Mar;123(3):996-1002.

127. Armanios M, Alder JK, Parry EM, Karim B, Strong MA, Greider CW. Short telomeres are sufficient to cause the degenerative defects associated with aging. *Am J Hum Genet*. 2009 Dec;85(6):823-32.

128. Hao LY, Armanios M, Strong MA, Karim B, Feldser DM, Huso D, et al. Short telomeres, even in the presence of telomerase, limit tissue renewal capacity. *Cell*. 2005 Dec 16;123(6):1121-31.

129. Eisenberg DTA, Kuzawa CW. The paternal age at conception effect on offspring telomere length: mechanistic, comparative and adaptive perspectives. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2018 Mar 5;373(1741):20160442.

130. Vaiserman AM, Koliada AK, Jirtle RL. Non-genomic transmission of longevity between generations: potential mechanisms and evidence across species. *Epigenetics Chromatin*. 2017 Jul 27;10(1):38.

131. Khincha PP, Dagnall CL, Hicks B, Jones K, Aviv A, Kimura M, et al. Correlation of Leukocyte Telomere Length Measurement Methods in Patients with Dyskeratosis Congenita and in Their Unaffected Relatives. *Int J Mol Sci*. 2017 Aug 13;18(8):1765.

132. Molina-Molina M, Borie R. Clinical implications of telomere dysfunction in lung fibrosis. *Curr Opin Pulm Med*. 2018 Sep;24(5):440-444.
133. Lai TP, Zhang N, Noh J, Mender I, Tedone E, Huang E, et al. A method for measuring the distribution of the shortest telomeres in cells and tissues. *Nat Commun*. 2017 Nov 7;8(1):1356.
134. Semeraro MD, Smith C, Kaiser M, Levinger I, Duque G, Gruber HJ, et al. Physical activity, a modulator of aging through effects on telomere biology. *Aging (Albany NY)*. 2020 Jun 23;12(13):13803-13823.
135. Imetelstat.info: Information about imetelstat:the first clinical stage telomerase inhibitor [Internet] [Consultado el 3 agosto 2023] Disponible en: <https://imetelstat.eu/> (2017)
136. Iarriccio L, Manguán-García C, Pintado-Berninches L, Mancheño JM, Molina A, Perona R, et al. A Small Dyskerin- and GSE24.2-Related Peptide, Induces Telomerase Activity, Cell Proliferation and Reduces DNA Damage, Oxidative Stress and Cell Senescence in Dyskerin Mutant Cells. *PLoS One*. 2015 Nov 16;10(11):e0142980.
137. Pintado-Berninches L, Montes-Worboys A, Manguan-García C, Arias-Salgado EG, Serrano A, Fernandez-Varas B, et al. GSE4-loaded nanoparticles a potential therapy for lung fibrosis that enhances pneumocyte growth, reduces apoptosis and DNA damage. *FASEB J*. 2021 Mar;35(3):e21422.
138. Guo J, Huang X, Dou L, Yan M, Shen T, Tang W, et al. Aging and aging-related diseases: from molecular mechanisms to interventions and treatments. *Signal Transduct Target Ther*. 2022 Dec 16;7(1):391.
139. Selman M, Buendía-Roldán I, Pardo A. Aging and Pulmonary Fibrosis. *Rev Invest Clin*. 2016 Mar-Apr;68(2):75-83.
140. Yang I V, Schwartz DA. Epigenetics of idiopathic pulmonary fibrosis. *Transl Res*. 2015;165:48–60.
141. Gansner JM, Rosas IO. Telomeres in lung disease. *Transl Res*. 2013 Dec;162(6):343-52.

142. Alder JK, Guo N, Kembou F, Parry EM, Anderson CJ, Gorgy AI, et al. Telomere length is a determinant of emphysema susceptibility. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Oct 15;184(8):904-12.
143. Stanley SE, Merck SJ, Armanios M. Telomerase and the Genetics of Emphysema Susceptibility. Implications for Pathogenesis Paradigms and Patient Care. *Ann Am Thorac Soc*. 2016 Dec;13 Suppl 5(Suppl 5):S447-S451.
144. Stanley SE, Rao AD, Gable DL, McGrath-Morrow S, Armanios M. Radiation Sensitivity and Radiation Necrosis in the Short Telomere Syndromes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2015 Dec 1;93(5):1115-7.
145. von Zglinicki T, Martin-Ruiz CM. Telomeres as biomarkers for ageing and age-related diseases. *Curr Mol Med*. 2005 Mar;5(2):197-203.
146. Armanios MY, Chen JJ, Cogan JD, Alder JK, Ingersoll RG, Markin C, et al. Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*. 2007 Mar 29;356(13):1317-26.
147. Tsakiri KD, Cronkhite JT, Kuan PJ, Xing C, Raghu G, Weissler JC, et al. Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 May 1;104(18):7552-7.
148. Lawson WE, Loyd JE, Degryse AL. Genetics in pulmonary fibrosis--familial cases provide clues to the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Med Sci*. 2011 Jun;341(6):439-43.
149. Cronkhite JT, Xing C, Raghu G, Chin KM, Torres F, Rosenblatt RL, et al. Telomere shortening in familial and sporadic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 Oct 1;178(7):729-37.
150. Snetselaar R, van Moorsel CHM, Kazemier KM, van der Vis JJ, Zanen P, van Oosterhout MFM, et al. Telomere length in interstitial lung diseases. *Chest*. 2015 Oct;148(4):1011-1018.
151. Ley B, Collard HR, King TE Jr. Clinical course and prediction of survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Feb 15;183(4):431-40.

152. Raghu G, Remy-Jardin M, Richeldi L, Thomson CC, Inoue Y, Johkoh T, et al. Idiopathic Pulmonary Fibrosis (an Update) and Progressive Pulmonary Fibrosis in Adults: An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med*. 2022 May 1;205(9):e18-e47.
153. Kolb M, Collard HR. Staging of idiopathic pulmonary fibrosis: past, present and future. *Eur Respir Rev*. 2014 Jun;23(132):220-4.
154. Ley B, Ryerson CJ, Vittinghoff E, Ryu JH, Tomassetti S, Lee JS, et al. A multidimensional index and staging system for idiopathic pulmonary fibrosis. *Ann Intern Med*. 2012 May 15;156(10):684-91.
155. Dai J, Cai H, Li H, Zhuang Y, Min H, Wen Y, et al. Association between telomere length and survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respirology*. 2015 Aug;20(6):947-52.
156. Silhan LL, Shah PD, Chambers DC, Snyder LD, Riise GC, Wagner CL, et al. Lung transplantation in telomerase mutation carriers with pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*. 2014 Jul;44(1):178-87.
157. Newton CA, Kozlitina J, Lines JR, Kaza V, Torres F, Garcia CK. Telomere length in patients with pulmonary fibrosis associated with chronic lung allograft dysfunction and post-lung transplantation survival. *J Heart Lung Transplant*. 2017 Aug;36(8):845-853.
158. Popescu I, Mannem H, Winters SA, Hoji A, Silveira F, McNally E, et al. Impaired Cytomegalovirus Immunity in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Lung Transplant Recipients with Short Telomeres. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019 Feb 1;199(3):362-376.
159. Borie R, Kannengiesser C, Hirschi S, Le Pavec J, Mal H, Bergot E, et al. Severe hematologic complications after lung transplantation in patients with telomerase complex mutations. *J Heart Lung Transplant*. 2015 Apr;34(4):538-46.
160. Newton CA, Zhang D, Oldham JM, Kozlitina J, Ma SF, Martinez FJ, et al. Telomere Length and Use of Immunosuppressive Medications in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019 Aug 1;200(3):336-347.

161. Molina-Molina M. Telomere Shortening Is behind the Harm of Immunosuppressive Therapy in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2019 Aug 1;200(3):274-275.
162. Xing C, Garcia CK. Epigenetic inheritance of telomere length obscures identification of causative PARN locus. *J Med Genet.* 2016 May;53(5):356-8.
163. Ley B, Collard HR, King TE Jr. Clinical course and prediction of survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011 Feb 15;183(4):431-40.
164. Mura M, Porretta MA, Bargagli E, Sergiacomi G, Zompatori M, Sverzellati N, et al. Predicting survival in newly diagnosed idiopathic pulmonary fibrosis: a 3-year prospective study. *Eur Respir J.* 2012 Jul;40(1):101-9.
165. Maher TM, Bendstrup E, Dron L, Langley J, Smith G, Khalid JM, et al. Global incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res.* 2021 Jul 7;22(1):197.
166. Chambers DC, Cherikh WS, Harhay MO, Hayes D Jr, Hsich E, Khush KK, et al. The International Thoracic Organ Transplant Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-sixth adult lung and heart-lung transplantation Report-2019; Focus theme: Donor and recipient size match. *J Heart Lung Transplant.* 2019 Oct;38(10):1042-1055.
167. Swaminathan AC, Neely ML, Frankel CW, Kelly FL, Petrovski S, Durham MT, et al. Lung Transplant Outcomes in Patients With Pulmonary Fibrosis With Telomere-Related Gene Variants. *Chest.* 2019 Sep;156(3):477-485.
168. Giri N, Lee R, Faro A, Huddleston CB, White FV, Alter BP, et al. Lung transplantation for pulmonary fibrosis in dyskeratosis congenita: Case Report and systematic literature review. *BMC Blood Disord.* 2011 Jun 15;11:3.
169. Lebeer M, Wuyts WA, Cassiman D, Laleman W, Nevens F, Pirenne J, et al. Multiple Solid Organ Transplantation in Telomeropathy: Case Series and Literature Review. *Transplantation.* 2018 Oct;102(10):1747-1755.

170. Tokman S, Singer JP, Devine MS, Westall GP, Aubert JD, Tamm M, et al. Clinical outcomes of lung transplant recipients with telomerase mutations. *J Heart Lung Transplant*. 2015 Oct;34(10):1318-24.
171. Abelson D, Glanville AR. Controversies and emerging topics in lung transplantation. *Breathe (Sheff)*. (2018) 14:278–87.
172. Wagner CL, Hanumanthu VS, Talbot CC Jr, Abraham RS, Hamm D, Gable DL, et al. Short telomere syndromes cause a primary T cell immunodeficiency. *J Clin Invest*. 2018 Dec 3;128(12):5222-5234.
173. Newton CA, Oldham JM, Applegate C, Carmichael N, Powell K, Dilling D, et al. Pulmonary Fibrosis Foundation Genetic Testing Work Group. The Role of Genetic Testing in Pulmonary Fibrosis: A Perspective From the Pulmonary Fibrosis Foundation Genetic Testing Work Group. *Chest*. 2022 Aug;162(2):394-405.
174. Borie R, Kannengiesser C, Antoniou K, Bonella F, Crestani B, Fabre A, et al. European Respiratory Society statement on familial pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*. 2023 Mar 16;61(3):2201383.