

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

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

# TESIS DOCTORAL

## BIOMARCADORES EN LINFANGIOLEIOMIOMATOSIS

Tesis presentada para optar al grado de Doctor

**Doctoranda:**

Eva María Revilla López

**Directoras:**

Dra. Berta Sáez Giménez

Dra. Susana Gómez Ollés

**Tutor:**

Dr. Jaume Joan Ferrer Sancho

# UAB

**Universitat Autònoma de Barcelona**

**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**

Programa de Doctorat en Medicina

Departament de Medicina

Barcelona, 2023



*"No great discovery was ever  
made without a bold guess."*

**Isaac Newton**

L'elaboració d'aquesta tesi doctoral és el resultat final d'una etapa no només acadèmica sinó també personal i professional. No hagués pogut completar-la sense l'ajuda de molta gent i espero que aquestes línies us facin justícia.

En primer lloc m'agradaria començar agraint a les meves directores de tesis. A la Dra. Berta Sáez per guiar-me en aquesta tesi doctoral, per ser sempre propera i entusiasta. Gràcies Berta per les ganes i la motivació que m'has transmès durant aquests anys. I a la Dra. Susana Gómez per la teva passió en tots els projectes que hem fet, m'has ensenyat el que vol dir metodologia en estat pur.

Una menció especial al Dr. Antonio Roman, per donar-me la idea de realitzar aquesta tesi doctoral sobre aquesta malaltia. Gràcies per la teva generositat.

Als meus companys de la Unitat de Trasplantament perquè treballar amb ells cada dia és un plaer i fa que la feina sigui més fàcil. Manolo, Cris i Berta perquè junts podríeu governar el món, apreng cada dia de vosaltres.

A la Victoria, l'Alberto i la Meritxell perquè sense la vostra feina al laboratori només tindriem mostres sense resultats.

A tot el servei de pneumologia. Gràcies a tots per aportar una part de la metgessa en que m'he convertit.

A la meva coR Júlia perquè és una de les persones més fortes que conec. Al David, al Christian i a la Marta per sempre fer pinya.

A la Dra. Irene Sansano que tan amablement m'ha cedit les imatges d'histologia que es troben en aquesta tesi.

A totes les malaltes LAM que tant generosament han participat en aquests estudis, gràcies de tot cor sense vosaltres no hagués estat possible.

A la meva mare, perquè sempre m'has recolzat incondicionalment i m'ho has donat tot i sé que ell estaria molt orgullós. Al Jordi i a la Montse pels entrepans de pernil i els farcellets que donen forces per tot.

Guillem gràcies pel teu suport incondicional, per ser sempre la persona que m'agafa la mà i m'ajuda a caminar cap endavant, aquesta tesis és tant meva com teva. I a l'Arnau perquè només amb un somriure teu m'omple d'alegria.



- A**
- AML:** Angiomiolipomas
  - AUC:** Área bajo la curva
- B**
- BHD:** Birt-Hogg-Dubé
- C**
- CA-125:** Cáncer antígeno-125
  - CC:** Cohorte contemporánea
  - CH:** Cohorte histórica
- F**
- FEV<sub>1</sub>:** Volumen espiratorio forzado en 1 segundo
  - FGF-acidic:** Fibroblast growth factor-acidic
- H**
- HCL:** Histiocitosis de células de Langerhans
- I**
- IC:** Intervalo de confianza
- K**
- KL-6:** Krebs von den Lungen 6
- L**
- LAM:** Linfangioleiomiomatosis
- M**
- MILES:** Multicenter International LAM Efficacy of Sirolimus (acrónimo en inglés)
  - MMP:** Metaloproteinasa
  - mTOR:** Mechanistic target of rapamycin (acrónimo en inglés)
- P**
- PDGF-AA:** Platelet derived growth factor-AA protein
  - PFR:** Pruebas de función respiratoria
  - PIGF:** Phosphatidylinositol-glycan biosynthesis class F protein
- R**
- RIQ:** Rango intercuartílico
- S**
- S-LAM:** Linfangioleiomiomatosis esporádica (acrónimo en inglés)
- T**
- TC:** Tomografía computerizada
  - TP:** Trasplante pulmonar
  - TSC:** Complejo esclerosis tuberosa
  - TSC-LAM:** Linfangioleiomiomatosis asociada a esclerosis tuberosa (acrónimo en inglés)
- V**
- VEGF-D:** Factor de crecimiento endotelial vascular - D (acrónimo en inglés)
  - vWF:** Von Willebrand factor





<b>AGRAÏMENTS</b> .....	<b>4</b>
<b>LISTADO DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>7</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>10</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>13</b>
1.1. DEFINICIÓN .....	15
1.2. EPIDEMIOLOGÍA .....	15
1.3. PATOGÉNESIS .....	15
1.3.1. Vías de señalización de la patogénesis de LAM .....	15
1.3.2. Hormonas sexuales .....	16
1.4. PRESENTACIÓN Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS .....	18
1.5. DIAGNÓSTICO .....	18
1.5.1. Función pulmonar .....	18
1.5.2. Manifestaciones radiológicas .....	19
1.5.3. Biomarcadores .....	21
1.5.4. Anatomía patológica .....	22
1.5.5. Criterios diagnósticos .....	23
1.5.6. Diagnóstico diferencial .....	24
1.6. TRATAMIENTO .....	26
1.6.1. Tratamiento farmacológico .....	26
1.6.2. Trasplante pulmonar .....	28
1.6.3. Consideraciones generales de manejo .....	29
<b>2. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO</b> .....	<b>31</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	<b>35</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>39</b>
<b>5. PACIENTES Y MÉTODOS</b> .....	<b>43</b>
5.1. METODOLOGÍA ESPECÍFICA DEL PRIMER ESTUDIO: RESULTADOS A LARGO PLAZO DEL TRATAMIENTO CON SIROLIMUS EN PACIENTES CON LINFANGIOLEIOMIOMATOSIS .....	45
5.1.1. Población de estudio .....	45
5.1.2. Criterios de clasificación de las pacientes .....	45
5.1.3. Tratamiento con sirolimus .....	46
5.1.4. Análisis estadístico .....	46
5.2. METODOLOGÍA ESPECÍFICA DEL SEGUNDO ESTUDIO: ESTUDIO DE DESCUBRIMIENTO DE BIOMARCADORES EN LINFANGIOLEIOMIOMATOSIS .....	47
5.2.1. Población de estudio y datos clínicos .....	47
5.2.2. Recogida y conservación de las muestras sanguíneas .....	48
5.2.3. Análisis de MMP-2, MMP-9, endostatin, FGF acidic, PIGF, thrombospondin-2, VEGF-D, VEGF-R3, angiopoietin-1, PDGF-AA, vWF, KL-6 y CA-125 .....	49
5.2.4. Análisis estadístico .....	49
<b>6. RESULTADOS</b> .....	<b>53</b>
6.1. RESULTADOS DEL PRIMER ESTUDIO: RESULTADOS A LARGO PLAZO DEL TRATAMIENTO CON SIROLIMUS EN PACIENTES CON LINFANGIOLEIOMIOMATOSIS .....	55
6.2. RESULTADOS SEGUNDO ESTUDIO .....	63
<b>7. DISCUSIÓN</b> .....	<b>75</b>
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	<b>85</b>
<b>9. NUEVAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN</b> .....	<b>89</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>93</b>
<b>11. ANEXOS</b> .....	<b>103</b>
11.1. ANEXO I: PUBLICACIONES .....	105
11.1.1. Artículo 1 .....	105
11.1.2. Artículo 2 .....	114
11.2. ANEXO II: COMUNICACIONES EN CONGRESOS .....	123
11.2.1. Comunicación 1 .....	123
11.2.2. Comunicación 2 .....	123
11.2.3. Comunicación 3 .....	123
11.3. ANEXO III: BECAS Y FINANCIAMIENTO .....	124

**RESUMEN**

La linfangioleiomiomatosis (LAM) es una enfermedad rara que afecta casi exclusivamente a mujeres y que de forma progresiva conduce a la insuficiencia respiratoria. Se caracteriza por presentar afectación pulmonar en forma de enfermedad quística difusa, tumores abdominales y acúmulos de líquido quiloso en tórax y abdomen. El diagnóstico se apoya en el biomarcador llamado factor vascular endotelial de crecimiento D (VEGF-D), aunque si éste es negativo no excluye la enfermedad y es necesaria confirmación histológica. El tratamiento se basa en los inhibidores de la proteína quinasa de la diana de rapamicina en células de mamífero, concretamente sirolimus. El objetivo de este trabajo es buscar nuevos biomarcadores y analizar el efecto a largo plazo del tratamiento con sirolimus.

Esta tesis se compone de 2 estudios. El primero es un estudio retrospectivo que incluye 48 pacientes con LAM tratadas con sirolimus y seguidas en nuestro centro, que fueron evaluadas al año y a los 5 años tras el inicio de tratamiento para describir la respuesta a largo plazo. En la evaluación tras 5 años de tratamiento con sirolimus, el 59% de las pacientes presentaron una respuesta positiva, el 30% una respuesta parcial y el 11% no presentaron respuesta (caída del FEV<sub>1</sub> mayor a 75 ml/año). La caída media de FEV<sub>1</sub> (95% IC) durante los 5 años fue de 42 (14 a 70) ml/año en el grupo de respondedoras, -54 (-71 a -36) ml/año en de respondedoras parciales y -84 (-113 a -54) ml/año en el grupo de no respondedoras.

El segundo es un estudio transversal en el que se analizan 13 biomarcadores relacionados con el remodelado de la matriz extracelular, la linfangiogénesis y la angiogénesis en varias cohortes: pacientes LAM (n = 44), pacientes trasplantadas de pulmón por LAM (n = 15), pacientes con otras enfermedades quísticas pulmonares (n = 18) y mujeres sanas (n = 20). De todos los biomarcadores analizados únicamente MMP-2 fue capaz de diferenciar entre LAM, otras enfermedades quísticas pulmonares y voluntarias sanas. El uso combinado de MMP-2 y VEGF-D en forma de puntaje ( $-6.36 + 0.0059 \times \text{VEGF-D} + 0.0069 \times \text{MMP-2}$ ) mejora la precisión diagnóstica (área bajo la curva 0.88 y sensibilidad/especificidad 79/87%) comparado con VEGF-D de forma aislada.

Estudios prospectivos y multicéntricos son necesarios para confirmar estos resultados y poder mejorar las herramientas de diagnóstico y seguimiento en la LAM.

**ABSTRACT**

Lymphangiomyomatosis (LAM) is a rare progressive disease that predominantly affects women and leads to respiratory failure. It is associated with lung cysts, abdominal tumours and chylous fluid accumulations in thorax and abdomen. Vascular endothelial growth factor-D (VEGF-D) is the most commonly used biomarker for diagnosing LAM, however, low levels of VEGF-D do not rule out the diagnosis and lung biopsy is often necessary as well. Treatment is based on inhibition of mammalian target of rapamycin. The objective of this work is to search for new biomarkers of disease and to review the long-term effect of sirolimus.

With this idea we performed 2 studies. Our first study is a retrospective analysis of 48 patients with LAM treated with sirolimus at our reference center. Patients were evaluated after 1 and 5 years of treatment. Among patients treated with sirolimus for five years, 59% patients experienced a positive response, 30% had a partial response and 11% had a negative response (defined as an FEV<sub>1</sub> decline greater than -75 ml/year). The mean FEV<sub>1</sub> slope (95% IC) over 5 years was 42 (14 to 70) ml/year in the responder group, -54 (-71 to -36) ml/year in the partial responder group, and - 84 (- 113 to - 54) ml/year in the non-responder group.

The second study is a cross-sectional study in which 13 biomarkers related to extracellular matrix remodelling, lymphangiogenesis, and angiogenesis are analysed in different cohorts: LAM patients (n=44), LAM lung transplant patients (n=15), patients with other cystic lung diseases (n=18), and healthy women (n=20). MMP-2 was found to be the only biomarker that distinguished between LAM patients, those with other cystic lung diseases and healthy volunteers. MMP-2 and VEGF-D were combined to create a composite score ( $-6.36 + 0.0059 \times \text{VEGF-D} + 0.0069 \times \text{MMP-2}$ ) that improved diagnostic accuracy (area under the curve 0.88 and sensitivity/specificity 79/87%) compared to VEGF-D alone.

Prospective and multicenter studies are needed to confirm these results and improve LAM diagnostic and follow-up tools.



# Introducción



## 1.1. DEFINICIÓN

La linfangioleiomiomatosis (LAM) se considera una enfermedad neoplásica, lentamente progresiva, que afecta a los pulmones formando quistes y que progresivamente desemboca en insuficiencia respiratoria en una o dos décadas<sup>1</sup>. Se caracteriza por la proliferación de unas células musculares anómalas denominadas células LAM<sup>2</sup>, que van formando quistes pulmonares, quilotórax, angiomiolipomas abdominales y linfangioleiomiomas. La LAM puede ocurrir en asociación con el complejo de esclerosis tuberosa (TSC-LAM) o puede ser esporádica (S-LAM). La esclerosis tuberosa (TSC) es un trastorno autosómico dominante que afecta a multitud de órganos: cerebro, piel, ojos, corazón, pulmones, riñones así como sistema nervioso<sup>3</sup> y que está causada por una mutación germinal en los genes *TSC1* y *TSC2*. En cambio, la S-LAM es el resultado de mutaciones somáticas en el gen *TSC2*<sup>4,5</sup>.

## 1.2. EPIDEMIOLOGÍA

Aunque la verdadera prevalencia se cree que es mucho mayor, debido a pacientes no diagnosticadas, se ha descrito una prevalencia aproximadamente entre 3.4 - 7.8 casos de LAM por millón de mujeres, con una incidencia anual de 0.23 - 0.31 millones de casos<sup>6</sup>. La TSC afecta aproximadamente 1 de cada 6000 - 10000 nacimientos vivos y tiene una prevalencia de 8.8 casos por cada 100000 personas<sup>7,8</sup>. La LAM afecta casi exclusivamente a mujeres, típicamente durante su periodo reproductivo, aunque en ocasiones tras la menopausia. En hombres afectados de esclerosis tuberosa la LAM ha sido descrita en muy pocos casos<sup>9,10</sup>.

## 1.3. PATOGÉNESIS

### 1.3.1. Vías de señalización de la patogénesis de LAM

El progreso en la comprensión de la patogénesis y el tratamiento de la LAM se ha basado, en gran medida, en la comprensión de la relación clínica y genética entre la TSC-LAM y la S-LAM. Los genes *TSC1* y *TSC2* codifican las proteínas hamartina y tuberina, respectivamente, que se asocian con la proteína TBC1D7 formando un

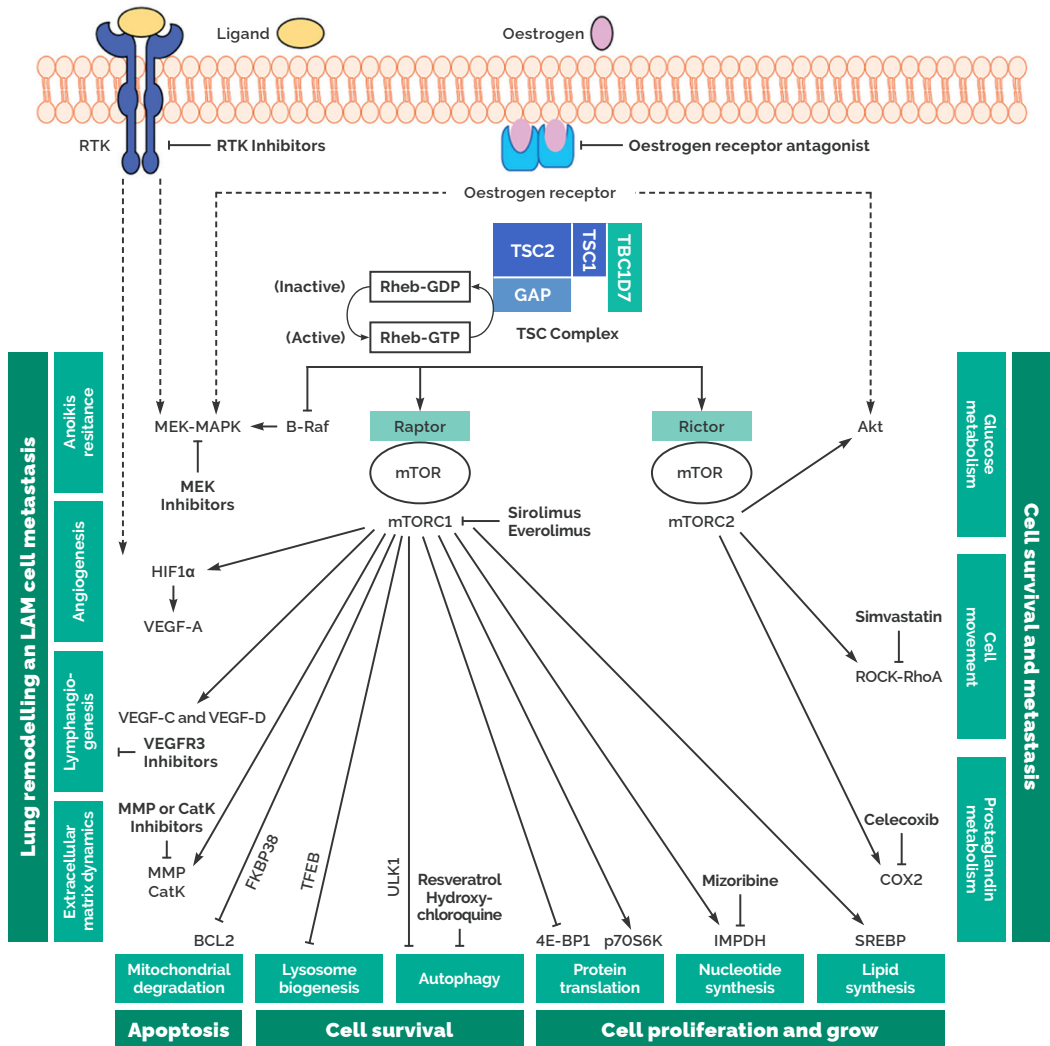


complejo clave para la regulación de la proteína quinasa de la diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR). Esta regulación se realiza mediante una proteína G intermedia llamada Rheb; cuando el complejo se encuentra intacto mantiene a Rheb inactiva en forma de GDP. En la LAM, la fosforilación de la proteína tuberina por acción de la proteína cinasa Akt inactiva el complejo tuberina-hamartina, incrementando los niveles de Rheb-GTP. Esto promueve la asociación de mTOR con la proteína Raptor para formar el complejo mTORC1 que resulta en la fosforilación y activación de una cascada de proteínas incluyendo mTOR, p70S6K y 4E-BP1. En respuesta, aumentan el factor de hipoxia inducible  $\alpha 1$ , los factores de crecimiento vascular endotelial A, C y D (VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D) y la inosina 5' monofosfato deshidrogenasa. Además, la asociación de mTOR con la proteína Rictor para formar el complejo mTOR2 da como resultado la activación de las proteínas Akt, ROCK y la proteína cinasa RhoA así como también la expresión de la ciclooxigenasa 2. La hiperactividad del complejo mTORC1 en las células mutadas promueve el metabolismo anabólico aumentando proteínas, lípidos y la síntesis de nucleótidos lo que lleva a una estimulación inapropiada de la proliferación celular. Además, existe un aumento de la angiogénesis y linfangiogénesis mediante el aumento del factor angiogénico VEGF-A y de los factores linfangiogénicos VEGF-C y VEGF-D. Todos estos nuevos conocimientos sobre la patogénesis de la LAM han llevado a la identificación de posibles vías de tratamiento <sup>11,12</sup> (**Figura 1**).

### **1.3.2. Hormonas sexuales**

Se cree que las hormonas sexuales juegan un papel en el desarrollo y la progresión de la LAM. Esto es debido a una serie de evidencias: existe una afectación casi exclusiva en mujeres <sup>13</sup>; las células LAM expresan receptores de estrógenos y progesterona <sup>14-16</sup>; existen datos publicados de empeoramiento de la enfermedad según el ciclo menstrual <sup>17</sup>, embarazo <sup>18</sup> y después de la exposición a estrógenos <sup>19</sup>; y existe una estabilización del curso de la enfermedad después de la menopausia <sup>20</sup>. A pesar de ello, el papel de los estrógenos en la patogenia de la LAM no está bien definido. Existen trabajos en modelos murinos que han demostrado que el tratamiento con estrógenos

promueve las metástasis pulmonares de las células nulas de tuberina <sup>21</sup>. Además, la progesterona y los estrógenos activan la proteína cinasa Akt y así, estimulan la proliferación y promueven la migración e invasión de las células nulas de tuberina <sup>22</sup>. Es necesario investigar más a fondo los mecanismos moleculares responsables de la acción de los estrógenos en la progresión de la LAM.



**Figura 1:** Vías de señalización en la patogénesis de la LAM. *Adaptado de McCarthy et al.* <sup>11</sup>

## 1.4. PRESENTACIÓN Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

La presentación clínica típica de la LAM consiste en neumotórax espontáneos de repetición en mujeres de 40 - 50 años de edad <sup>23</sup>. Otras manifestaciones frecuentes son disnea progresiva y quilotórax. También, se han descrito otros síntomas respiratorios menos frecuentes como tos, hemoptisis o quiloptisis. En esta enfermedad, la disnea se explica por la presencia de una obstrucción del flujo aéreo debido a la sustitución del parénquima pulmonar sano por los quistes pulmonares <sup>23-25</sup>.

Las manifestaciones extrapulmonares incluyen: linfangioleiomiomas (grandes masas de tejido quístico linfático), colecciones de líquido quiloso en abdomen y angiomiolipomas renales (AML) que son tumores benignos formados por tejido muscular, vasos sanguíneos y grasa <sup>26</sup>. La prevalencia de los AML oscila entre el 30 - 40% entre las mujeres con S-LAM y cerca del 90% entre las mujeres con TSC-LAM.

La TSC, se caracteriza además por la presencia de tumores gliales y hamartomas retinianos, astrocitomas subependimarios de células gigantes y rabdomiomas cardíacos. Hasta el 80% de las mujeres con TSC presentan quistes pulmonares pero sólo entre el 5 y el 10% experimentan síntomas <sup>27</sup>.

## 1.5. DIAGNÓSTICO

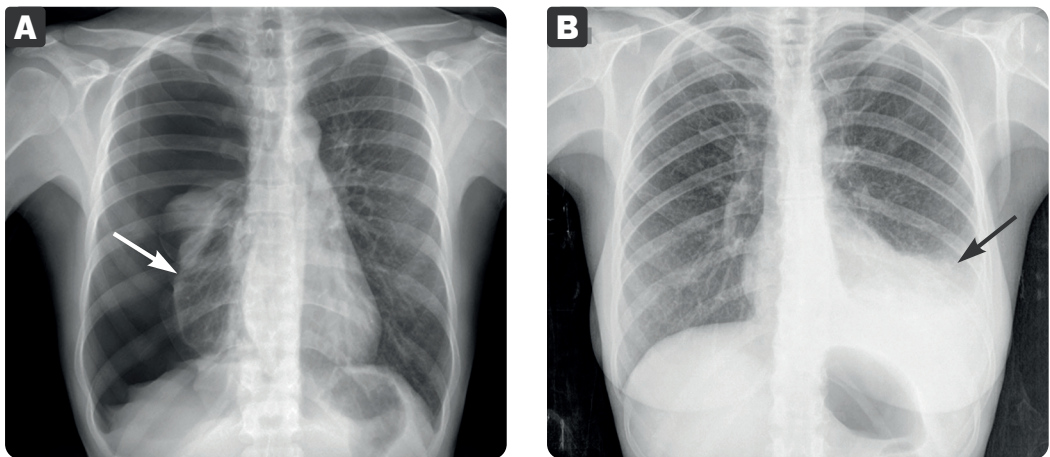
### 1.5.1. Función pulmonar

El trastorno ventilatorio obstructivo y la disminución de la capacidad de difusión pulmonar son las alteraciones en la función pulmonar más frecuentes, aunque hasta un 30% de las pacientes pueden tener unas pruebas de función respiratoria (PFR) dentro de la normalidad <sup>28</sup>. La infiltración difusa del intersticio pulmonar por las células LAM comporta una obstrucción a nivel de los bronquiolos terminales. También se puede detectar una disminución de la capacidad de esfuerzo medida mediante ergometría cardiorrespiratoria <sup>29</sup>. La función pulmonar es útil, además de para el diagnóstico, para determinar la gravedad de la enfermedad y para guiar al clínico con el tratamiento.

Sin tratamiento, la LAM es una enfermedad progresiva y en este escenario, la disminución en el volumen espiratorio forzado en 1 segundo ( $FEV_1$ ) se ha cuantificado entre 60 y 134 ml por año según datos de estudios retrospectivos y ensayos clínicos<sup>30-32</sup>.

### 1.5.2. Manifestaciones radiológicas

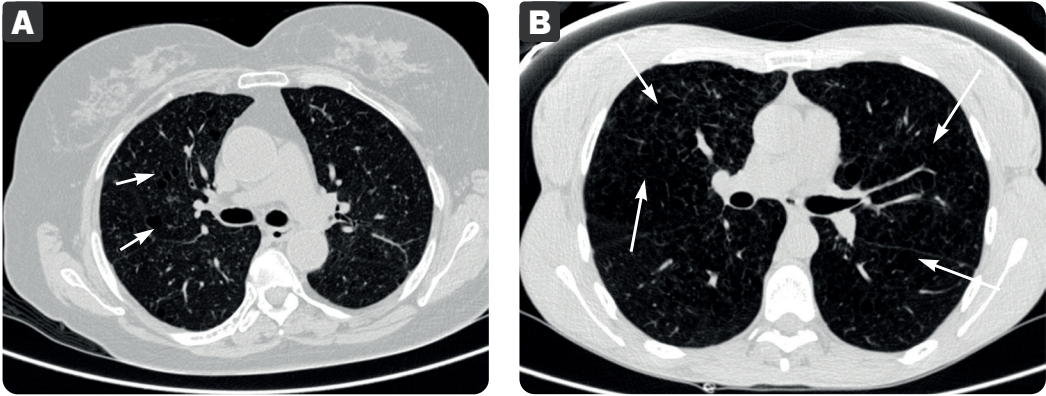
La radiografía de tórax puede ser normal en fases tempranas de la enfermedad, aunque también se puede observar neumotórax o quilotórax (**Figura 2**).



**Figura 2:** **A)** Radiografía de tórax que muestra neumotórax derecho señalado con la flecha blanca en paciente con S-LAM. **B)** Radiografía de tórax que muestra quilotórax señalado con flecha negra en paciente con S-LAM

En el TC de tórax, la manifestación característica son los quistes pulmonares, que son típicamente de paredes finas, múltiples, bien circunscritos, de tamaño entre 2 y 30 mm y con una distribución difusa<sup>33-35</sup>. Con el tiempo, los quistes pueden fusionarse y adquirir una morfología poligonal o atípica<sup>36</sup>, (**Figura 3**).

Otros hallazgos radiológicos que se pueden observar en el TC de tórax incluyen áreas de vidrio deslustrado que pueden ser secundarias a la proliferación de las células LAM, edema pulmonar por congestión linfática, engrosamientos septales, así como quilotórax, derrame pericárdico y dilatación del conducto torácico<sup>35</sup>.



**Figura 3:** **A)** TC de tórax que muestra los quistes característicos de LAM, bien definidos redondos y de paredes finas. **B)** TC de tórax que muestra quistes pulmonares fusionados y un parénquima pulmonar desestructurado en paciente con más de 10 años de evolución de la enfermedad

El TC abdominal es de utilidad en dos escenarios: para detectar la presencia de AML, linfangioleiomiomas o linfadenopatías que apoyaría el diagnóstico de LAM y para el seguimiento de éstos (**Figura 4**).



**Figura 4:** TC abdominal de paciente S-LAM que muestra un angiomiolipoma renal derecho

### **1.5.3. Biomarcadores**

#### **Factor de crecimiento endotelial vascular - D (VEGF-D)**

El VEGF-D es un factor de crecimiento linfangiogénico que está relacionado con la formación de vasos linfáticos y con la diseminación de células tumorales a los ganglios linfáticos. Los niveles de VEGF-D en la mayoría de pacientes LAM son más altos que en controles sanos o en otras enfermedades quísticas incluyendo histiocitosis de células de Langerhans y enfisema <sup>37</sup>. Curiosamente, los niveles de VEGF-D también son más elevados en mujeres con TSC-LAM que en pacientes con esclerosis tuberosa sin afectación quística en el TC de tórax <sup>38</sup>.

*Young et al.* <sup>37</sup> analizaron prospectivamente el biomarcador VEGF-D en 48 mujeres con sospecha de LAM y únicamente TC torácico compatible con quistes pulmonares sin otros hallazgos. Describieron que la asociación de niveles de VEGF-D en suero superiores a 800 pg/ml y la presencia de enfermedad pulmonar quística difusa tiene una especificidad del 100% y una sensibilidad de 60% para distinguir LAM de otras enfermedades quísticas pulmonares <sup>37,38</sup>. No obstante, niveles inferiores a 800 pg/ml no descartan el diagnóstico de LAM <sup>37</sup>. Además, se ha descrito que los niveles de VEGF-D son más altos en pacientes con quilotórax o ascitis quilosa comparando con pacientes que no presentan afectación linfática <sup>39,40</sup>.

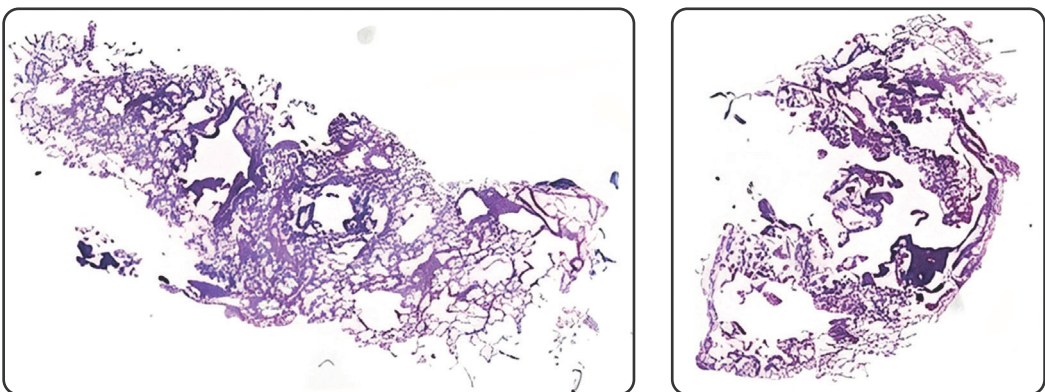
Aunque el valor diagnóstico de VEGF-D está bien establecido, su utilidad clínica para el seguimiento aún no está clara. *Young et al.* <sup>41</sup> en un estudio multicéntrico con una muestra de 87 pacientes, observaron que los niveles basales de VEGF-D se correlacionaban con la gravedad del trastorno ventilatorio obstructivo y con el grado de hiperinsuflación; en esta cohorte, además, los niveles de VEGF-D basal disminuyeron progresivamente a los 6 y 12 meses en el grupo tratado con sirolimus respecto al grupo tratado con placebo. En cambio, en otro trabajo de *Taveira-DaSilva et al.* <sup>42</sup> no se encontró asociación entre los niveles de VEGF-D y la mejoría de la función pulmonar en las pacientes tratadas con sirolimus.

## Metaloproteinasas

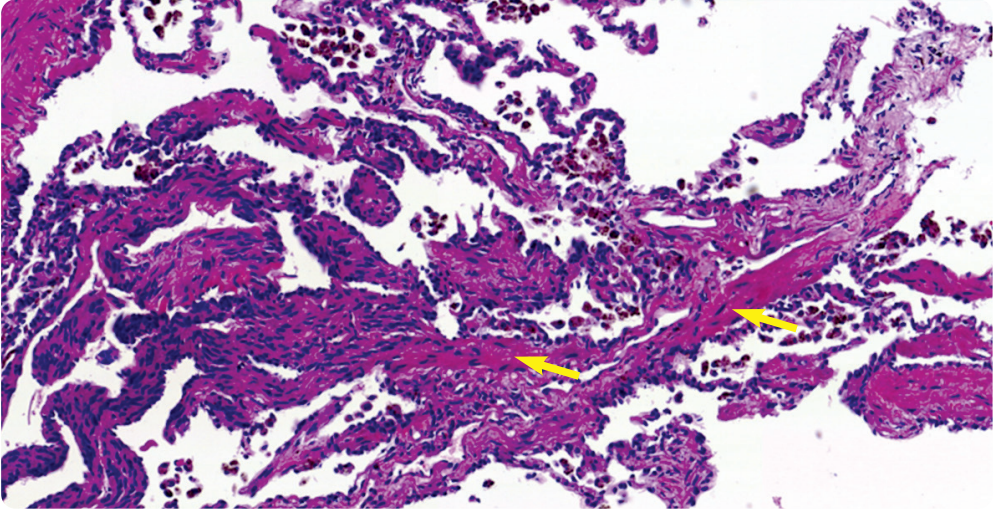
Las metaloproteinasas (MMP) son una familia de endopeptidasas implicadas en diversos procesos: remodelamiento de la matriz celular, angiogénesis, proliferación celular, señalización y migración celular <sup>43</sup>. Además, se han implicado en la patogénesis de la LAM: están presentes en las lesiones quísticas <sup>44</sup> y se han detectado niveles elevados en suero de pacientes LAM <sup>45,46</sup>. Sin embargo, estos estudios solo comparan pacientes LAM con voluntarias sanas. Son necesarios más datos para dilucidar el potencial de las MMPs como biomarcadores en esta enfermedad.

### 1.5.4. Anatomía patológica

Las células LAM se caracterizan por formar pequeñas agrupaciones en los márgenes de las lesiones quísticas y alrededor de bronquiolos, vasos sanguíneos y vasos linfáticos <sup>47</sup>, (**Figura 5**). Son de morfología heterogénea y se pueden clasificar en dos grandes grupos: 1) pequeñas con forma de huso y parecidas a los miofibroblastos, con expresión de proteínas específicas de musculo liso como  $\alpha$ -actina, desmina y vimentina y 2) grandes, parecidas a células epitelioides con abundante citoplasma y que expresan glicoproteína gp100 y anticuerpo monoclonal de melanoma humano negro 45 (HMB45) <sup>2,48</sup>, (**Figura 6**).



**Figura 5:** Biopsia pulmonar de una paciente LAM con tinción de hematoxilina-eosina. Se observan espacios quísticos con paredes finas



**Figura 6:** Biopsia pulmonar de una paciente LAM con tinción de hematoxilina-eosina. Se observan células fusiformes señaladas por las flechas amarillas compatibles con células LAM

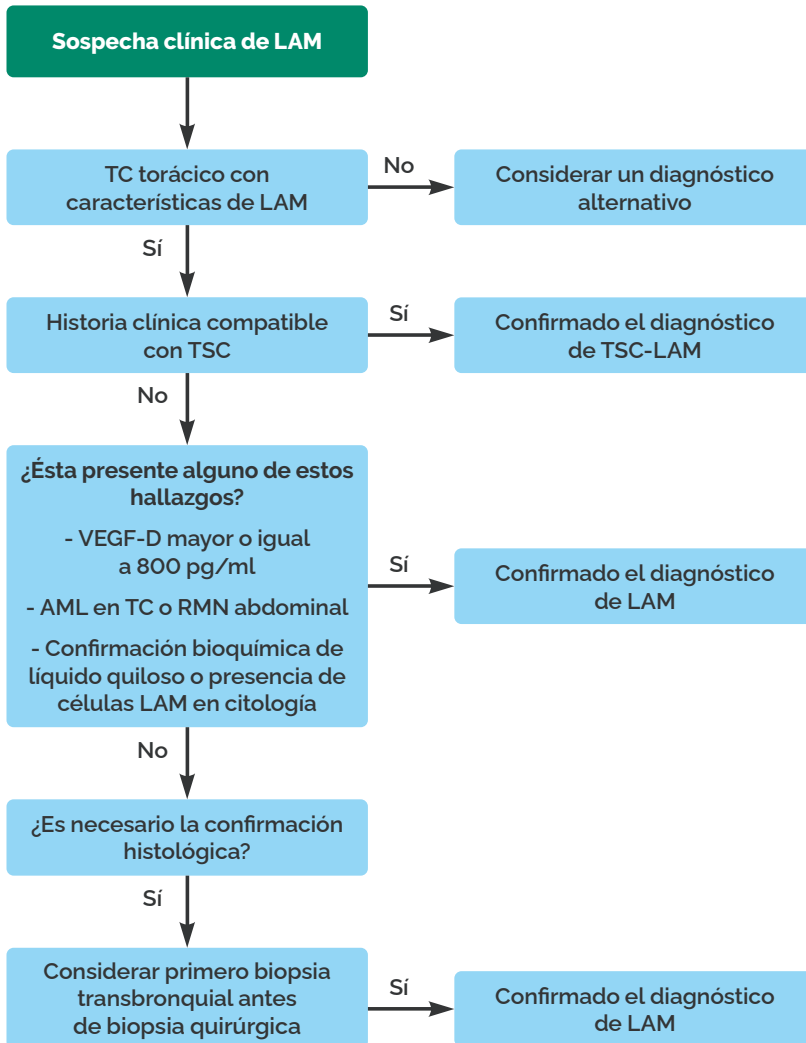
### 1.5.5. Criterios diagnósticos

La Sociedad Torácica Americana conjuntamente con la Sociedad de Patología Respiratoria Japonesa publicaron en 2017 una actualización de las guías de diagnóstico y manejo de la LAM definiendo los criterios diagnósticos de LAM<sup>49</sup>, (ver **Tabla 1** y **Figura 7**). El diagnóstico definitivo de LAM puede establecerse en un paciente con: historia clínica, quistes pulmonares característicos en el TC de tórax y una o más de las características de la tabla.

Diagnóstico definitivo de LAM
Presencia de TSC
Angiomiolipomas renales
VEGF-D $\geq$ 800 pg/ml
Quilotórax o ascitis quilosa confirmada por análisis del fluido
Linfangioleiomiomas
Presencia de células LAM en citología de líquido pleural o ascítico o en nódulos linfáticos
Confirmación histológica de LAM por biopsia pulmonar o biopsia retroperitoneal o de masas pélvicas

**Tabla 1:** Criterios diagnósticos de LAM





**Figura 7:** Algoritmo diagnóstico de LAM

**AML:** angiomiolipomas; **RMN:** resonancia magnética nuclear;  
**TC:** tomografía computerizada; **TSC:** esclerosis tuberosa

### 1.5.6. Diagnóstico diferencial

Es importante establecer el diagnóstico de LAM utilizando el método menos invasivo posible. Cuando el TC torácico muestra quistes pulmonares compatibles con LAM el objetivo es excluir otras enfermedades quísticas pulmonares. El diagnóstico diferencial debe incluir: histiocitosis de células de Langerhans (HCL), síndrome Birt-Hogg-Dubé (BHD), neumonía linfocitaria intersticial (NLI) y amiloidosis (**Tabla 2**).

	LAM	HCL	BHD	NLI	Amliloidosis
<b>Sexo</b>	Mujeres >>> Hombres	Mujeres = Hombres	Mujeres = Hombres	Mujeres > Hombres	Mujeres = Hombres
<b>Tabaco</b>	No	Sí	No	No	No
<b>Antecedentes</b>	Neumotórax, quilotórax, AML renales, lesiones cutáneas si TSC	Neumotórax, diabetes insípida, lesiones óseas líticas	Neumotórax, fibrofolliculomas cutáneos, tumores renales	VIH, enfermedades autoinmunes, Raynaud, SS, VEB, ICV	SS, enfermedades autoinmunes, amiloidosis sistémica
<b>Hallazgos radiológicos</b>	Quistes redondos y uniformes, entre 2 a 20mm, distribución difusa. Puede acompañarse de derrame pleural	Quistes irregulares, 2 a >20mm, predominio lóbulos superiores, sin afectar ángulo costofrénico y preservando bases pulmonares	Quistes redondos o elípticos, <10mm, paredes finas, de localización subpleurales y cerca de vasos	Quistes redondos, 3mm a 10mm, distribución difusa a menudo cerca de vasos	Quistes redondos, 4mm a 45mm, la mayoría >10mm, distribución difusa
<b>Pruebas de laboratorio</b>	VEGF-D	Estudios de diabetes insípida	Estudios genéticos para mutación <i>FLCN</i>	Disproteíнемia policlonal	Disproteíнемia monoclonal
<b>Anatomía patológica</b>	Infiltración de células LAM	CD4a >5% en LBA	Quistes intraparenquimatosos y subpleurales sin células anormales ni componente inflamatorio	Infiltrado intersticial linfocítico policlonal difuso	Depósitos amorfos de proteínas con birrefringencia a la tinción de rojo Congo

**Tabla 2:** Diagnóstico diferencial LAM. *Adaptada de Gupta et al.*<sup>52</sup>

**AML:** angiomiolipomas renales; **BHD:** Birt-Hogg-Dubé; **FLCN:** gen folliculin; **HCL:** histiocitosis de células de Langerhans; **ICV:** inmunodeficiencia común variable; **LBA:** lavado broncoalveolar; **NLI:** neumonía linfocítica intersticial; **SS:** síndrome de Sjögren; **TSC:** esclerosis tuberosa; **VEB:** virus Ebstein Barr; **VIH:** virus inmunodeficiencia humana

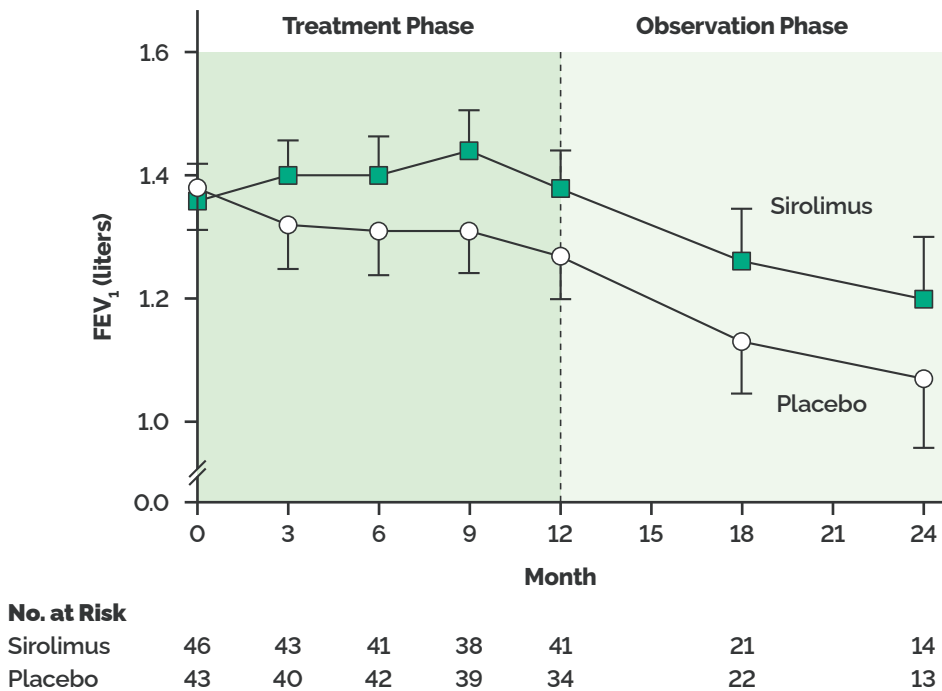
## **1.6. TRATAMIENTO**

### **1.6.1. Tratamiento farmacológico**

Históricamente, se utilizaron diferentes estrategias de tratamiento hormonal: ooforectomía<sup>51,52</sup>, tamoxifeno<sup>53,54</sup>, progesterona<sup>55,56</sup> y agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina<sup>57,58</sup>. Estos tratamientos estaban basados en estudios retrospectivos y series de casos con resultados poco concluyentes. No existen datos de eficacia ni ensayos clínicos de ningún tratamiento hormonal por lo que, en la actualidad, se desaconsejan<sup>59</sup>.

El descubrimiento del papel que tenía la activación del complejo mTORC1 en la patogénesis de la LAM fue clave para iniciar ensayos clínicos con inhibidores de mTOR, en concreto sirolimus (también llamado rapamicina), como potencial tratamiento. El primer ensayo piloto, abierto, no controlado publicado por *Bissler et al.*<sup>60</sup> describió la evolución de 20 pacientes con LAM tratadas con sirolimus durante 12 meses. Tras este período de tratamiento, se suspendió el fármaco, pero se prosiguió el seguimiento de 18 participantes durante 12 meses más. Con esta estrategia se consiguió una disminución de casi el 50% del volumen de los AML al final de los 12 meses de tratamiento. Se observó también mejoría en las PFR durante el tiempo de tratamiento. Si bien de las 4 pacientes que se tenían datos de la función respiratoria en el año de seguimiento posterior a haber finalizado el tratamiento con sirolimus no se observaron cambios en función respiratoria<sup>60</sup>. A partir de estos resultados prometedores, surgió la necesidad de realizar un nuevo ensayo clínico randomizado para valorar el papel de sirolimus en la función pulmonar. El ensayo clínico denominado Multicenter International LAM Efficacy of Sirolimus (MILES)<sup>31</sup> demostró que las pacientes tratadas con sirolimus presentaban estabilización de la función pulmonar comparado con el grupo placebo. En este estudio, se incluyeron 89 pacientes LAM con función pulmonar disminuida ( $FEV_1 < 70\%$  del predicho), que se randomizaron 1:1 para recibir tratamiento con sirolimus o placebo durante 12 meses, seguidos de 12 meses más de observación sin tratamiento. Durante el período de tratamiento la pendiente de  $FEV_1$  fue

de  $-12 \pm 2$  ml/mes en el grupo placebo (43 pacientes) y de  $1 \pm 2$  ml/mes en el grupo de pacientes tratadas con sirolimus (46 pacientes),  $p < 0.001$  (**Figura 8**). El tratamiento con sirolimus también redujo los niveles de VEGF-D en suero y mostró una mejoría en la calidad de vida de las pacientes. Durante el año de seguimiento en el que sirolimus y placebo fueron retirados, la función pulmonar cayó en el grupo de tratamiento y se igualó a la del grupo placebo, lo que sugería la necesidad de tratamiento continuado. Otros estudios han demostrado también que el tratamiento con sirolimus mejora y puede resolver los acúmulos de líquido quiloso<sup>61,62</sup>.



**Figura 8:** Cambios de FEV<sub>1</sub> durante la fase de tratamiento con sirolimus y la fase de observación en el estudio MILES. Adaptada de *McCormack et al.*<sup>31</sup>

En general el tratamiento con sirolimus es bien tolerado; los efectos secundarios más frecuentes son: mucositis, náuseas, diarreas, hipercolesterolemia, acné y edemas en extremidades inferiores. Otros efectos secundarios incluyen: formación de quistes ováricos, dismenorrea, proteinuria, elevación de los enzimas hepáticos, neumonitis<sup>63</sup>.

Se recomienda iniciar tratamiento con sirolimus en las pacientes que: **1)** presentan un  $FEV_1 < 70\%$  del predicho; **2)** pacientes con acúmulos de líquido (quilotórax, ascitis quilosa). Existe controversia en cuanto a la dosis adecuada de tratamiento. En el ensayo clínico MILES, sirolimus se inició con una dosis de 2 mg/día para mantener niveles en sangre entre 5 - 15 ng/ml. Si bien estudios posteriores sugieren que dosis inferiores de sirolimus (niveles en sangre 5 ng/ml) pueden tener la misma eficacia y así se podrían reducir los efectos secundarios del fármaco <sup>63,64</sup> también existe un estudio que demostró que la dosis inferior de sirolimus no era tan efectiva como la dosis convencional <sup>65</sup>. Serán necesario estudios prospectivos comparando la dosis convencional con la dosis inferior para definir la dosis óptima de sirolimus.

Finalmente, en cuanto a los beneficios y riesgos a largo plazo del tratamiento con sirolimus existen pocos datos publicados. Únicamente disponemos de dos que ofrecen datos tras 2 y 4 años de tratamiento respectivamente <sup>66,67</sup>. Quedan todavía muchas preguntas por resolver en cuanto a la eficacia y la seguridad de sirolimus a largo plazo.

## **1.6.2. Trasplante pulmonar**

El trasplante pulmonar (TP) es la única opción terapéutica en pacientes en estadio final de la enfermedad. Los resultados de supervivencia del TP en pacientes LAM son mejores que los datos de supervivencia media del TP publicados en los registros <sup>68</sup>. La cohorte francesa publicó una supervivencia actuarial del 54.4% a los 10 años <sup>69</sup>. Un estudio americano evaluó los resultados de 134 pacientes de que habían sido sometidas a TP entre 2003 y 2017, observando una supervivencia media postrasplante de 12 años con tasas de supervivencia del 94% al año, 73% a los 5 años y 55% a los 10 años <sup>70</sup>. Podemos especular porque este grupo de pacientes tiene mejores resultados que la población promedio de pacientes trasplantados: una posible explicación es que se trata de pacientes jóvenes, con pocas comorbilidades, menos infecciones y colonizaciones preoperatorias y un menor uso de fármacos con efectos secundarios en músculo esquelético.

### 1.6.3. Consideraciones generales de manejo

El tratamiento de las complicaciones y el manejo general de las pacientes LAM se encuentra resumido en la **Tabla 3**.

	Consideraciones	Manejo
Neumotórax <sup>73</sup>	Alto riesgo de recurrencia	Drenaje pleural. Si recurrencia o neumotórax refractario se aconseja pleurodesis
AML <sup>62</sup>	Riesgo de hemorragia	Seguimiento con prueba de imagen cada 12 - 24 meses. Tratamiento con inhibidores mTOR si AML >4cm o múltiples. Embolización si sangrado. Si no responden a inhibidores de mTOR y son de gran tamaño y morfología compleja se aconseja cirugía
Complicaciones linfáticas <sup>63</sup>	Acúmulos de líquido quiloso en pleura o abdomen	Tratamiento con inhibidores mTOR. Ligadura del conducto torácico en casos refractarios o recurrentes
Vacunación		Vacuna anual de la gripe, vacuna contra el neumococo PCV13 y PPSV23, vacuna del herpes zoster
Rehabilitación respiratoria <sup>74</sup>	Mejora capacidad de esfuerzo	En pacientes mal acondicionados físicamente
Oxigenoterapia domiciliaria	Pacientes en insuficiencia respiratoria	En pacientes con desaturación al esfuerzo o pO <sub>2</sub> < 60mmHg
Embarazo <sup>18</sup>	Asociado a empeoramiento de la función respiratoria y aumento de riesgo de neumotórax	Aconsejar a las pacientes del potencial riesgo. Consejo genético en las pacientes TSC-LAM. Detener inhibidores de mTOR antes de la concepción y durante el embarazo

**Tabla 3:** Manejo general de las pacientes LAM. *Adaptado de McCarthy et al.*<sup>11</sup>



# Justificación del trabajo





El tratamiento con inhibidores de la mTOR es el tratamiento estándar para la LAM en la actualidad, si bien existen pocos datos en la literatura acerca de la seguridad y el efecto a largo plazo. El uso de este fármaco se basa en el estudio pivotal MILES en el que las pacientes recibieron sirolimus sólo durante 12 meses.

Por otro lado, para el diagnóstico de LAM, además de la clínica y la radiología se dispone del biomarcador VEGF-D. Si este biomarcador es normal no excluye la enfermedad y es necesario realizar una biopsia pulmonar para llegar al diagnóstico.

Esta tesis doctoral está compuesta de dos estudios: el primero, desde un punto de vista clínico, analiza el efecto a largo plazo del tratamiento con sirolimus en una cohorte de pacientes LAM haciendo hincapié en la función pulmonar. El segundo, es un estudio de herramientas diagnósticas, en el que se evaluó la precisión diagnóstica de biomarcadores relacionados con la matriz extracelular, la afectación linfática y la angiogénesis.

Por tanto, el principal objetivo de esta tesis doctoral es profundizar en el diagnóstico de la LAM y describir el efecto a largo plazo de sirolimus en las pacientes.



# Hipótesis



Existen biomarcadores de la enfermedad que permiten mejorar la precisión diagnóstica y distinguir entre las pacientes que tendrán una respuesta positiva al tratamiento con sirolimus de las que continuarán con una mayor pérdida funcional.



# Objetivos





**Objetivo principal:**

Describir la precisión diagnóstica de los biomarcadores: MMP-2, MMP-9, VEGF-D, receptor 3 de VEGF, angiopoietin-1, endostatin, fibroblast growth factor-acidic (FGF-acidic), phosphatidylinositol-glycan biosynthesis class F protein (PIGF), thrombospondin-2 and platelet derived growth factor-AA protein (PDGF-AA), Von Willebrand factor (vWF), Cáncer antígeno-125 (CA-125), Krebs von den Lungen 6 (KL-6).

**Objetivos secundarios:**

1. Analizar el efecto a largo plazo del tratamiento con sirolimus en una cohorte de pacientes LAM, centrándose en la función pulmonar.
2. Describir el papel del trasplante pulmonar en LAM después de la introducción de sirolimus.



# Pacientes y métodos



## **5.1. METODOLOGÍA ESPECÍFICA DEL PRIMER ESTUDIO: RESULTADOS A LARGO PLAZO DEL TRATAMIENTO CON SIROLIMUS EN PACIENTES CON LINFANGIOLEIOMIOMATOSIS**

### ***5.1.1. Población de estudio***

Estudio retrospectivo sobre la población de pacientes diagnosticadas de LAM, tratadas con sirolimus y seguidas por nuestra unidad desde enero de 1990 a enero de 2020. Se recopilaron datos de sus historias clínicas: edad, método diagnóstico, tratamiento, función pulmonar, presencia de TSC y manifestaciones extrapulmonares como AML renales, quilotórax y/o ascitis quilosa. El estudio fue aprobado por el comité de ética del Hospital Universitario Vall d'Hebron (BSG-SIR-2019-01).

Se obtuvieron espirometría y test de difusión basal, al año, 2 años, 3 años, 4 años y 5 años después del inicio de tratamiento con sirolimus. Las PFR se realizaron según las guías de la Sociedad Europea de Respiratorio<sup>73</sup>. Además, a todas las pacientes se les realizó un TC torácico y abdominal. Únicamente se realizó biopsia pulmonar en las pacientes con afectación pulmonar exclusiva.

El tiempo a evento se calculó según los años que transcurrían desde el inicio de sirolimus hasta la fecha de trasplante o la fecha de muerte, la que ocurriera antes.

### ***5.1.2. Criterios de clasificación de las pacientes***

Las pacientes se clasificaron en dos cohortes de acuerdo con la disponibilidad de sirolimus en el momento del diagnóstico: una cohorte histórica (CH) de pacientes en las que el sirolimus no estaba disponible en el momento del diagnóstico pero que recibieron el tratamiento a partir de 2007 y una cohorte contemporánea (CC), en la que sirolimus se inició inmediatamente después del diagnóstico.

### **5.1.3. Tratamiento con sirolimus**

Desde noviembre 2007, el tratamiento con sirolimus se indicó en los siguientes casos:  $FEV_1 < 80\%$  pred., AML mayores de 4 cm o múltiples. La dosis de sirolimus prescrita era entre 1 a 4 mg al día que se ajustaba para obtener niveles en sangre de sirolimus de entre 5 y 15 ng/ml medidos con cromatografía líquida con espectrometría de masas. Se registraron los efectos secundarios.

Definimos la respuesta al tratamiento con sirolimus basándonos en la tasa de descenso de  $FEV_1$  en pacientes sin tratamiento específico descrita en estudios previos como  $-75$  ml/año<sup>30</sup>. La caída funcional relacionada con la edad en adultos sanos después de los 60 años se ha descrito alrededor de  $-20$  ml/año. Por lo que una mejoría, estabilización o disminución del  $FEV_1$  similar a la caída fisiológica debida a la edad fue considerada como una respuesta positiva al tratamiento con sirolimus. Las pacientes que tuvieron una caída de  $FEV_1$  entre  $-20$  y  $-75$  ml/año fueron consideradas respondedoras parciales. Las pacientes no respondedoras fueron consideradas aquellas que presentaron una caída de  $FEV_1$  mayor a  $-75$  ml/año. La respuesta de sirolimus fue evaluada al año y a los 5 años de tratamiento continuado. Las pacientes que fueron trasplantadas antes de completar 1 año o 5 años con sirolimus no fueron incluidas en los respectivos análisis.

La tasa de disminución de los AML se calculó como el cambio en el diámetro máximo después de un año de tratamiento con sirolimus. Aquellas pacientes que presentaron disminución o estabilidad en la medida de los AML se consideraron respondedoras.

### **5.1.4. Análisis estadístico**

Los datos cualitativos se expresan como frecuencias y porcentajes. Los datos cuantitativos distribuidos normalmente se expresan como media  $\pm$  desviación estándar (DE); los datos no distribuidos normalmente se expresan como mediana y rango intercuartílico (RIQ). Las características demográficas y clínicas de los grupos CH y CC

se compararon mediante el test de ANOVA o de Chi<sup>2</sup>. La función pulmonar de las pacientes no respondedoras, de las respondedoras parciales y de las respondedoras a sirolimus se compararon utilizando el test de Mann Whitney. El tiempo desde el inicio de sirolimus a muerte/trasplante fue determinado mediante curvas de Kaplan-Meier. El análisis de regresión de Cox se utilizó para comparar CH y CC. Un valor de  $p < 0.005$  fue considerado estadísticamente significativo.

Se aplicó un modelo mixto para estimar los cambios en FEV<sub>1</sub>, en cifras absolutas (ml/año) y también en valores predichos (%predicho/año). En estos análisis, la variable tiempo fue tratada como efecto aleatorio. Las pacientes se dividieron en 3 grupos: **1)** respondedoras (si la estimación individualizada era menos de -20 ml/año); **2)** respondedoras parciales (si la estimación individualizada era entre -20 y -75 ml/año); y **3)** no respondedoras (si la estimación individualizada era mayor a -75 ml/año).

El análisis se realizó a través de STATA versión 14 (StataCorp, College Station Texas, TX, USA) y de SPSS versión 27 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

## **5.2. METODOLOGÍA ESPECÍFICA DEL SEGUNDO ESTUDIO:**

### **ESTUDIO DE DESCUBRIMIENTO DE BIOMARCADORES EN LINFAN- GIOLEIOMIOMATOSIS**

#### ***5.2.1. Población de estudio y datos clínicos***

Estudio transversal desde julio 2019 a junio 2020, donde se incluyeron: pacientes diagnosticadas de LAM portadoras o no de TP, pacientes con otras enfermedades quísticas pulmonares y mujeres sanas. La cohorte de pacientes con otras enfermedades quísticas pulmonares incluye pacientes con: histiocitosis de células de Langerhans, enfisema y síndrome Birt-Hogg-Dubé. Las pacientes LAM fueron diagnosticadas por biopsia pulmonar o por presencia de quistes pulmonares en el Tc de tórax más: AML renales, presencia de TSC y/o acumulación de líquido quiloso.



Se revisaron las historias clínicas en relación a: método diagnóstico, tratamiento con sirolimus, embarazo previo, menopausia, función pulmonar, TP, presencia de TSC y afectación extrapulmonar.

El grado de afectación quística fue valorado en los TC torácicos de pacientes LAM y también de pacientes con otras enfermedades quísticas pulmonares. Los pulmones se dividieron en 3 zonas iguales (superior, media e inferior). Se graduó de forma individual y subjetiva en función del volumen pulmonar reemplazado por los quistes en cada zona la afectación, de la siguiente manera: enfermedad leve, menos del 30% de afectación del parénquima pulmonar; enfermedad moderada, los quistes afectan entre 30 - 60%; enfermedad severa, los quistes afectan más del 60%, como se ha descrito previamente<sup>74</sup>. Todos los TC de tórax fueron revisados por el mismo operador.

El análisis de las hormonas sexuales como estradiol, hormona luteinizante, folitropina, progesterona y prolactina, así como las PFR se realizaron en el momento de inclusión al estudio.

Sirolimus se indicó en pacientes LAM cuando  $FEV_1 < 80\%$ , AML mayores de 4 cm y/o múltiples AML. En pacientes portadoras de TP por LAM, sirolimus se prescribió en el caso de disfunción crónica del injerto o presencia de AML. La dosis prescrita de sirolimus era entre 1 y 4 mg al día ajustado para mantener niveles en sangre entre 5 y 15 ng/ml medido con cromatografía líquida con espectrometría de masas.

El estudio fue aprobado por el comité de ética del Hospital Universitario Vall d'Hebron (Barcelona, España ARB-SIR-2018-01) y se obtuvo consentimiento informado de todas las pacientes.

### ***5.2.2. Recogida y conservación de las muestras sanguíneas***

Las muestras sanguíneas se recogieron en un tubo Advance BD Vacutainer® Plastic SST II, un tubo de citrato BD Vacutainer® y un tubo recubierto de K2EDTA

BD Vacutainer®. El tubo de suero se dejó coagular a temperatura ambiente durante 60 minutos antes de centrifugar a 1,300 g a 4° C durante 10 minutos. El suero obtenido se conservó a -80° C hasta su uso. El tubo de EDTA se centrifugó inmediatamente después de la extracción sanguínea durante 15 minutos a 1,000 g a 4° C. Se sacaron alícuotas de 1ml de plasma y adicionalmente se centrifugaron a 10,000 g a 4° C durante 10 minutos para obtener plasma libre de plaquetas. Todas las muestras de plasma se almacenaron a -70° C hasta su uso.

### **5.2.3. Análisis de MMP-2, MMP-9, endostatin, FGF acidic, PIGF, thrombospondin-2, VEGF-D, VEGF-R3, angiopoietin-1, PDGF-AA, vWF, KL-6 y CA-125**

MMP-2 y MMP-9 en suero se analizaron utilizando el panel Luminex Human Magnetic Assay LXSAHM-02 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). El análisis de la actividad de vWF se realizó mediante ACLTOP 700 LAS utilizando reactivos del mismo proveedor (IL Werfen, Barcelona, España). CA-125 en suero fue medido por análisis por quimioluminiscencia utilizando el analizador automatizado Atellica® con reactivos del mismo proveedor (Siemens Healthcare Diagnostics, Erlangen, Alemania). Endostatin, FGF acidic, PIGF, thrombospondin-2, angiopoietin-1 y PDGF-AA se analizaron utilizando el panel Luminex Human Performance Angiogenesis Magnetic Panel A (6-Plex), R&D Systems. VEGF-R3 se analizó utilizando Luminex Human Magnetic (1-Plex) LXSAHM-01, R&D Systems. VEGF-D se analizó con el kit de ELISA VEGF-D Quantikine® humano, R&D Systems. KL-6 se analizó utilizando un kit de inmunoanálisis por quimioluminiscencia enzimático de Lumipulse G KL-6 IRC (Fujirebio, Tokyo, Japon).

### **5.2.4. Análisis estadístico**

Las variables continuas se expresan en media  $\pm$  DE y mediana (RIQ) según corresponda. Las variables categóricas se expresan como números de casos y proporciones. La normalidad se evaluó en las variables continuas utilizando el test de Shapiro-Wilk y las comparaciones de los grupos se realizaron mediante el test de análisis de varianza (ANOVA). Las variables categóricas se comparaban utilizando el test de Chi<sup>2</sup> o test

de exacto de Fisher, según lo apropiado. Para las comparaciones entre pacientes se utilizó el test Kruskal-Wallis. La curva característica operativa del receptor (ROC) se creó para detectar el punto de corte para establecer la óptima sensibilidad y especificidad de cada biomarcador. El punto de corte del VEGF-D con valor 800 pg/ml también fue analizado. Se realizó un modelo logístico de regresión incluyendo VEGF-D y MMP-2 para crear un *score* compuesto. Se utilizó el test DeLong para comparar las curvas ROC. Un p valor < 0.05 se consideró estadísticamente significativo. SPSS versión 27 (IBM SPSS Statistics, Chicago, IL, USA) y GraphPad Prism 9.1.2 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA) se utilizaron para realizar el análisis.





# Resultados



## **6.1. RESULTADOS DEL PRIMER ESTUDIO: RESULTADOS A LARGO PLAZO DEL TRATAMIENTO CON SIROLIMUS EN PACIENTES CON LINFANGIOLEIOMIOMATOSIS**

Se reclutaron 48 pacientes diagnosticadas de LAM, en seguimiento en nuestro centro y en tratamiento con sirolimus. Diecinueve (40%) pertenecían a la CH y 29 (60%) a la CC. Cuatro (8.3%) de ellas presentaban TSC-LAM. La edad media al inicio de los síntomas y al diagnóstico fue 36 (30 - 44) y 38 (34 - 46) años, respectivamente. Nueve (19%) pacientes estaban en la menopausia al diagnóstico. Tres (6%) pacientes eran fumadoras al momento del diagnóstico y 14 (29%) eran exfumadoras. La disnea fue el síntoma más común en 17 (35%) de las pacientes, seguido de neumotórax en 15 (31%) pacientes. El FEV<sub>1</sub> medio en el diagnóstico fue del 68 ± 26% del FEV<sub>1</sub> predicho. Los métodos diagnósticos fueron: biopsia quirúrgica en 28 (58%), hallazgos clínicos y radiológicos en 12 (25%) y biopsia transbronquial en 8 (17%) pacientes. Tres (6%) diagnósticos fueron incidentales en pacientes asintomáticas.

La duración media del seguimiento fue 11.7 ± 6.9 años desde el diagnóstico y el tiempo medio de tratamiento con sirolimus fue 5.6 ± 3.5 años. Durante el seguimiento, la complicación pleural más frecuente fue el neumotórax que ocurrió en 8 (17%) pacientes, seguida de quilotórax en 4 (8%) pacientes, y derrame pleural trasudado en 3 (6%). Diecinueve (40%) pacientes requirieron pleurodesis y 2 (4%) necesitaron ligadura del conducto torácico. Veinte (42%) pacientes tenían AML; 2 de ellos necesitaron embolización y 2 cirugía. Cinco (10%) pacientes presentaron linfangioleiomiomas abdominales.

De las 48 pacientes LAM reclutadas en el estudio, 9 (19%) pacientes recibieron un TP. Estas pacientes fueron tratadas con sirolimus antes del TP durante una mediana de tiempo de 18 (7 - 42) meses. La espirometría previa al tratamiento con sirolimus demostró un trastorno obstructivo severo: FVC media fue 47 ± 15% pred., FEV<sub>1</sub> fue 26 ± 9% pred. y la relación FEV<sub>1</sub>/FVC fue 45 ± 11%. La espirometría pre-TP mostraba



una FVC media de  $44 \pm 18\%$  pred.,  $FEV_1$  de  $30 \pm 15\%$  y la relación  $FEV_1/FVC$  de  $43 \pm 10\%$ . Después del TP, las pacientes recibieron tacrolimus, micofenolato mofetil y corticosteroides según el protocolo de tratamiento.

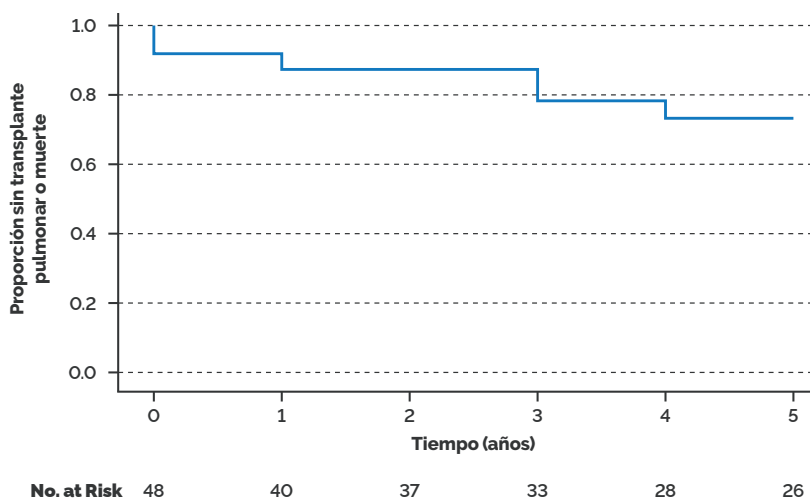
Durante el periodo de estudio, 4 (8%) pacientes fallecieron, sólo una de ellas había recibido TP y falleció por un rechazo celular agudo. Las otras causas de muerte fueron insuficiencia respiratoria, insuficiencia renal y colangiocarcinoma. En la **Tabla 4** se presenta una comparación entre la CH y CC.

	Cohorte histórica n=19	Cohorte contemporánea n=29	p-valor
Edad al diagnóstico (años), mediana (RIQ)	35 (29 - 38)	43 (36 - 46)	0.014
Sintoma inicial, n (%)			0.773
Disnea	7 (37)	10 (34)	
Neumotórax	7 (37)	8 (28)	
Hemoptisis	2 (11)	2 (7)	
Quilotórax	1 (5)	4 (14)	
Asintomática	1 (5)	2 (7)	
Tos	0 (0)	1 (3)	
Dolor abdominal	0 (0)	2 (7)	
Dolor pleurítico	1 (5)	0 (0)	
Método diagnóstico, n (%)			0.042
Biopsia quirúrgica pulmonar	13 (68)	15 (52)	
Clínico radiológico	6 (32)	6 (21)	
Criobiopsia transbronquial	0 (0)	8 (28)	
PFR al diagnóstico, media ± DE mediana (RIQ)			
FVC, ml	2651 ± 1037 2890 (1820 - 3130)	3063 ± 841 3070 (2320 - 3850)	0.137
FVC, % pred.	74 ± 27 77 (55 - 91)	80 ± 20 81 (69 - 98)	0.375
FEV <sub>1</sub> , ml	1638 ± 901 1610 (740 - 2300)	2186 ± 760 2070 (1670 - 2770)	0.028
FEV <sub>1</sub> , % pred.	57 ± 28 59 (30 - 81)	76 ± 22 77 (62 - 94)	0.009
DL <sub>CO</sub> , %	42 ± 21 42 (21 - 63)	60 ± 21 52 (46 - 79)	0.010
Uso de oxígeno domiciliario, n (%)	8 (42)	4 (14)	0.027
TSC asociada, n (%)	3 (16)	1 (3)	0.130
AML, n (%)	12 (63)	8 (28)	0.015
Neumotórax durante el seguimiento			0.025
Número neumotórax/n pacientes	21/6	2/2	
Quilotórax durante el seguimiento			0.130
Número quilotórax/n pacientes	4/3	1/1	
Pleurodesis química	11 (58)	8 (28)	0.044
Ligadura del conducto torácico	0 (0)	2 (7)	0.242
Seguimiento (años), mediana (RIQ)	17 (14 - 22)	8 (5 - 10)	<0.001
TP, n (%)	8 (42)	1 (3)	<0.001
Muerte, n (%)	3 (16)	1 (3)	0.130

**Tabla 4:** Comparación entre cohorte histórica (sirolimus no estaba disponible en el diagnóstico) y cohorte contemporánea

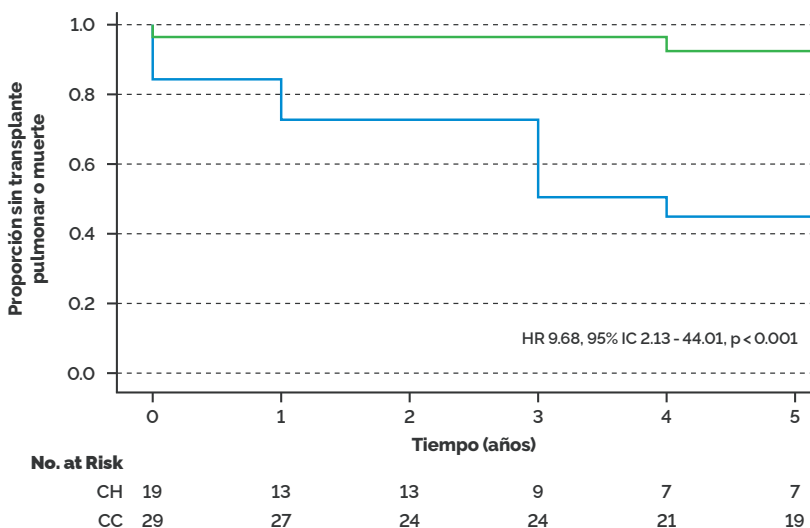
**AML:** angiomiolipoma; **DE:** desviación estándar; **RIQ:** rango intercuartílico;  
**PFR:** pruebas de función respiratoria; **TSC:** complejo de esclerosis tuberosa;  
**TP:** trasplante pulmonar

La tasa de supervivencia libre de muerte y/o trasplante a 1 y 5 años después del inicio de tratamiento con sirolimus fue de 87% y 73% respectivamente (**Figura 9**).



**Figura 9:** Curva de supervivencia Kaplan-Meier libre de muerte/trasplante desde el inicio de tratamiento con sirolimus. Tiempo medio de tratamiento con sirolimus fue 5,6 años

Los pacientes de la CH presentaron un riesgo significativamente elevado a largo plazo de muerte y/o trasplante comparado con los pacientes de la CC (**Figura 10**).



**Figura 10:** Curva de supervivencia Kaplan Meier libre de muerte/trasplante desde el inicio de tratamiento con sirolimus. Cohorte histórica (**azul**) y cohorte contemporánea (**verde**)

### Tratamiento con sirolimus

Cuarenta y ocho pacientes con LAM han sido tratadas en nuestro hospital con sirolimus desde noviembre de 2007. Veintiocho (58%) pacientes iniciaron sirolimus por presentar  $FEV_1 < 80\%$ , 4 (8%) por presentar AML y 16 (33%) por ambas. La dosis media de sirolimus fue  $2.2 \pm 0.8$  mg y los niveles medios en sangre fueron  $7.5 \pm 2.7$  ng/ml.

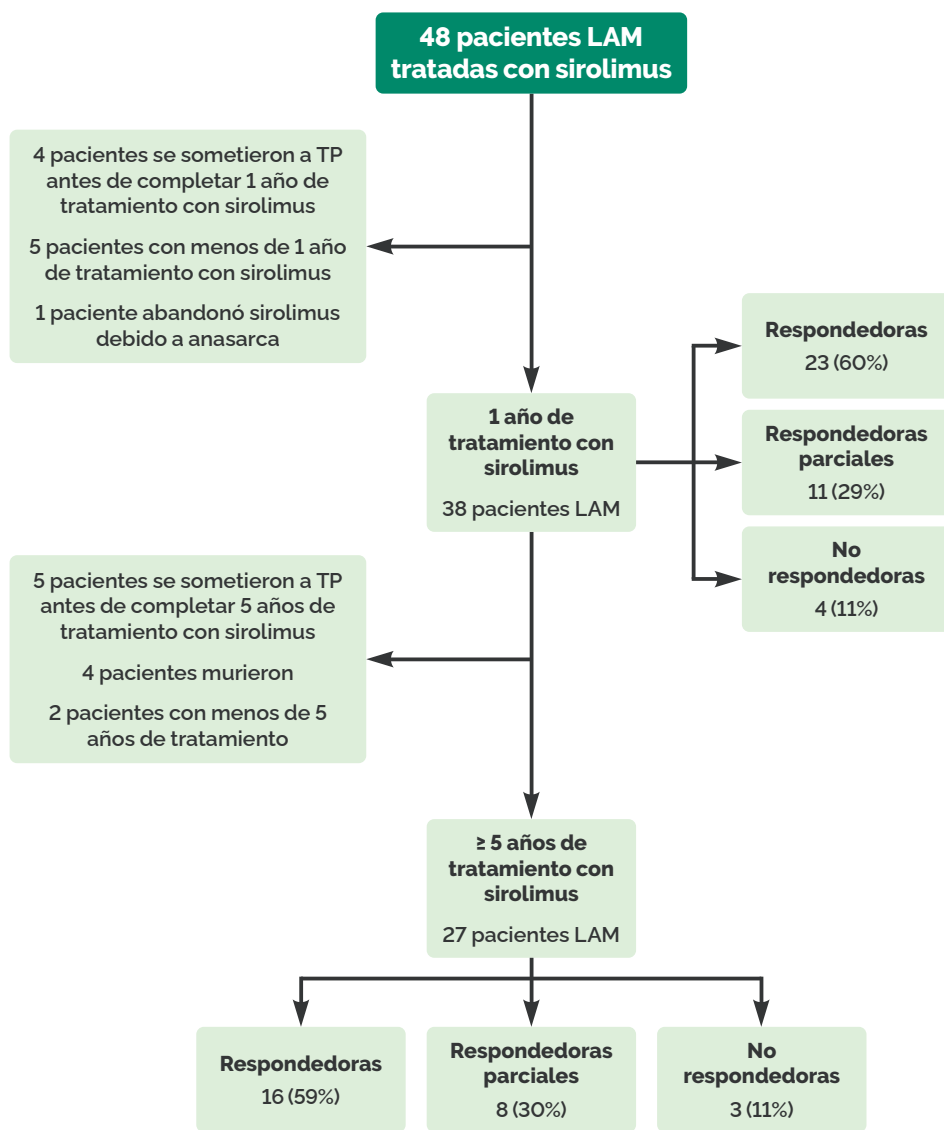
A destacar, únicamente una paciente de la CH desarrolló neumotórax bajo tratamiento con sirolimus, todas las otras pacientes desarrollaron esta complicación antes de empezar el tratamiento. Ninguna paciente desarrolló quilotórax estando en tratamiento con sirolimus (1 paciente de la CC presentó esta complicación antes de iniciar el tratamiento).

En la CH, la mediana de tiempo entre la presentación de síntomas y el inicio de sirolimus fue de 12 (4 - 15) años. En la CC, la mediana de tiempo desde la presentación de los síntomas y el inicio de sirolimus fue 1 (0 - 3) años. La media de los valores espirométricos antes de iniciar sirolimus en la CH y la CC fueron: FVC  $62 \pm 25\%$  pred. vs  $84 \pm 21\%$  pred respectivamente ( $p = 0.002$ ),  $FEV_1$   $41 \pm 21\%$  pred vs  $74 \pm 22\%$  pred ( $p < 0.001$ ),  $DL_{CO}$   $40 \pm 22\%$  vs  $55 \pm 17\%$  ( $p = 0.228$ ).

Los efectos secundarios fueron recogidos de la historia clínica en 16 (33%) pacientes y tendían a ocurrir poco después del inicio de tratamiento y a disminuir con el tiempo. El efecto secundario más frecuente eran las aftas orales que se observaron en 8 (17%) pacientes, seguidos de quistes ováricos en 3 (6%), incremento severo del colesterol en 2 (4%), alteración de las enzimas hepáticas en 2 (4%), anasarca en 1 (2%) y edemas en 1 (2%). Únicamente 1 paciente abandonó el tratamiento con sirolimus debido a edemas y en 3 casos sirolimus fue suspendido temporalmente debido a aftas orales.

Al cierre del estudio, de las 48 pacientes tratadas con sirolimus, 38 (79%) pacientes completaron el tratamiento durante 1 año y 27 (56%) completaron un mínimo de 5 años

(**Figura 11**).



**Figura 11:** Respuesta a sirolimus tras 1 y 5 años de tratamiento

Después de 1 año, se observó una respuesta positiva en 23 (60%) pacientes y una respuesta parcial en 11 (29%). La eficacia a largo plazo se estudió en 27 pacientes que recibieron 5 años o más de tratamiento con sirolimus: 16 (59%) respondedoras, 8 (30%) no respondedoras y 3 (11%) no respondedoras. No existían diferencias en FVC, FEV<sub>1</sub> o DL<sub>CO</sub> en el diagnóstico ni al inicio del tratamiento con sirolimus entre respondedoras, respondedoras parciales y no respondedoras; ver **Tabla 5**. Sin embargo, sí que se

observaron diferencias significativas en FEV<sub>1</sub> después de 5 años de tratamiento con sirolimus teniendo el grupo de las no respondedoras valores más bajos.

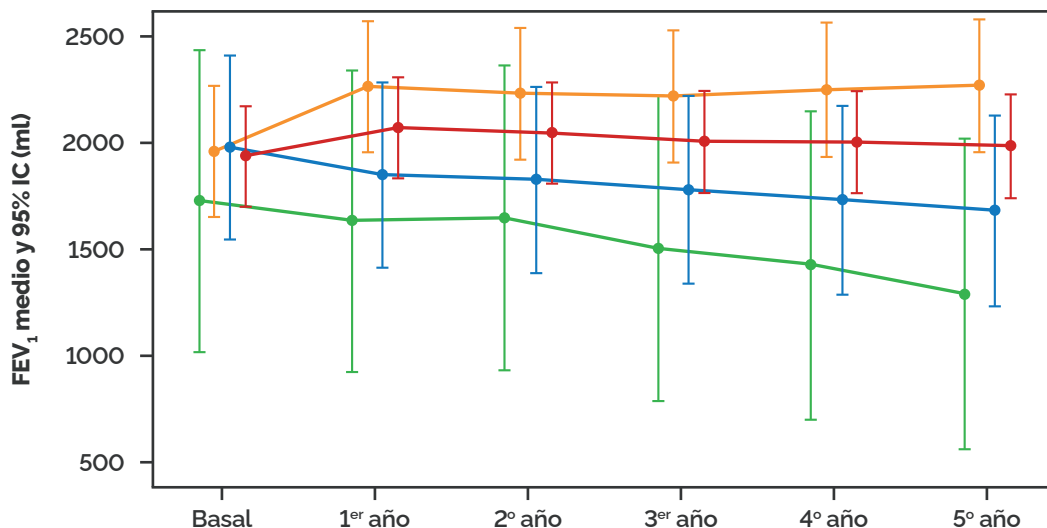
	Respondedoras (n=16)	Respondedoras parcial (n=8)	No respondedoras (n=3)	p valor
Edad al diagnóstico (años), media ± DE	35 ± 6	50 ± 8	39 ± 5	< 0.01
Edad inicio sirolimus (años), media ± DE	38 ± 6	50 ± 8	42 ± 3	0.001
Embarazo antes del diagnóstico, n (%)	9 (31)	4 (50)	3 (67)	0.300
Menopausia al inicio de sirolimus, n (%)	2 (13)	5 (63)	0 (0)	0.017
Neumotórax, n (%)	10 (63)	3 (38)	2 (67)	0.468
Quilotórax, n (%)	4 (25)	0 (0)	0 (0)	0.199
Pleurodesis, n (%)	8 (50)	2 (25)	1 (33)	0.483
FVC (ml), media ± DE antes de sirolimus	2959 ± 825	2854 ± 521	3187 ± 479	0.794
FEV <sub>1</sub> (ml), media ± DE antes de sirolimus	1961 ± 632	1980 ± 602	1730 ± 789	0.831
DL <sub>co</sub> (%), media ± DE antes de sirolimus	52 ± 14	52 ± 16	38 ± 24	0.411
Niveles medios de sirolimus en sangre	8.2 ± 2.9	6.6 ± 2.7	7.1 ± 1.1	0.374

**Tabla 5:** Características de las pacientes según su respuesta de tratamiento con sirolimus a largo plazo

La media (95% Intervalo de confianza (IC)) de la pendiente de FEV<sub>1</sub> durante los 5 años fue de - 0.14 (- 26.13 a 25.85) ml/año en el conjunto de toda la cohorte LAM, 42.55 (14.87 a 70.22) ml/año en el grupo de respondedoras, - 54.00 (- 71.60 a - 36.39) ml/año en el grupo de respondedoras parciales y - 84.19 (- 113.5 a - 54.0) ml/año en el grupo de no respondedoras. El mismo concepto expresado con FEV<sub>1</sub> como porcentaje del predicho (% pred) mostró una diferencia en porcentaje de 0.43 (- 0.55 a 1.41) % pred/año en el total de pacientes LAM, 2.17 (1.25 a 3.09) % pred/año en el grupo de respondedoras, - 1.78 (- 2.50 a - 1.05) % pred/año en el grupo de respondedoras parciales y - 2.96 (- 4.05 a - 1.87) % pred/año en el grupo no respondedoras. La **Tabla 6** resume las diferencias entre FEV<sub>1</sub> al primer año y a los 5 años y la **Figura 12** muestra la predicción lineal de cambios longitudinales del FEV<sub>1</sub> (ml).

	Todas (n=27)	Respondedoras (n=16)	Respondedoras parciales (n=8)	No respondedoras (n=3)	p valor
Pre-sirolimus FEV <sub>1</sub> , ml	1941 (1704 - 2177)	1961 (1653 - 2268)	1980 (1545 - 2414)	1730 (1020 - 2440)	0.831
FEV <sub>1</sub> al 1r año, ml	2073 (1836 - 2310)	2266 (1959 - 2574)	1851 (1416 - 2286)	1637 (926 - 2347)	0.185
FEV <sub>1</sub> al 2º año, ml	2050 (1812 - 2287)	2234 (1925 - 2542)	1831 (1395 - 2268)	1650 (937 - 2363)	0.272
FEV <sub>1</sub> al 3r año, ml	2010 (1771 - 2249)	2219 (1909 - 2530)	1781 (1342 - 2220)	1507 (789 - 2223)	0.180
FEV <sub>1</sub> al 4º año, ml	2007 (1766 - 2247)	2251 (1939 - 2564)	1734 (1292 - 2176)	1430 (708 - 2152)	0.092
FEV <sub>1</sub> al 5º año, ml	1988 (1745 - 2231)	2271 (1955 - 2586)	1683 (1236 - 2129)	1293 (564 - 2022)	0.041

**Tabla 6:** Respuesta del FEV<sub>1</sub> a sirolimus en 27 pacientes tratadas con sirolimus durante 5 años



**Figura 12:** Predicción lineal de cambios longitudinales en FEV<sub>1</sub> (ml) y márgenes predictivos con 95% IC utilizando un modelo lineal mixto.

El color rojo corresponde a todas las pacientes LAM, el grupo de respondedoras en color naranja, las respondedoras parciales en color azul y las no respondedoras en color verde

Once pacientes con AML fueron tratadas con sirolimus durante como mínimo un año. En la **Tabla 7** se observan los tamaños de los AML antes y después de un año de tratamiento: 10 (91%) de las pacientes mostraron una respuesta positiva al tratamiento y sólo una (9%) mostró un incremento del tamaño del tumor. Durante el seguimiento, ninguna paciente presentó síntomas relacionados con los AML.

Pacientes	Número de AML	Tamaño de los antes del tratamiento con sirolimus (cm)	Tamaño de los AML después de 1 año de tratamiento con sirolimus (cm)	Diferencia de FEV <sub>1</sub> después de 1 año de tratamiento con sirolimus (ml)	Tasa de disminución
LAM-1	1	13.5 x 7.8	4.2 x 1.5	-280	-69%
LAM-2	3	2 x 1.5 2 x 2 1.6 x 7	2 x 1.5 2 x 2 1.6 x 7	320	0%
LAM-3	1	2 x 1	2 x 1	40	0%
LAM-4*	3	5 x 2 2.1 x 1 1 x 0.5	6.2 x 3.3 2.1 x 1 1 x 0.5	230	24%
LAM-5	1	0.4 x 0.5	0.4 x 0.5	130	0%
LAM-6	2	1 x 1	1 x 1	660	0%
LAM-7	1	5.5 x 3.5	4.2 x 2.7	40	-23%
LAM-8	1	0.5 x 0.5	0.5 x 0.5	-30	0%
LAM-9	2	2.6 x 1 2 x 1	2.6 x 1 2 x 1	140	0%
LAM-10	1	2 x 1.6	2 x 1.6	90	0%
LAM-11	1	6.6 x 4.5	3.3 x 3.7	20	-50%

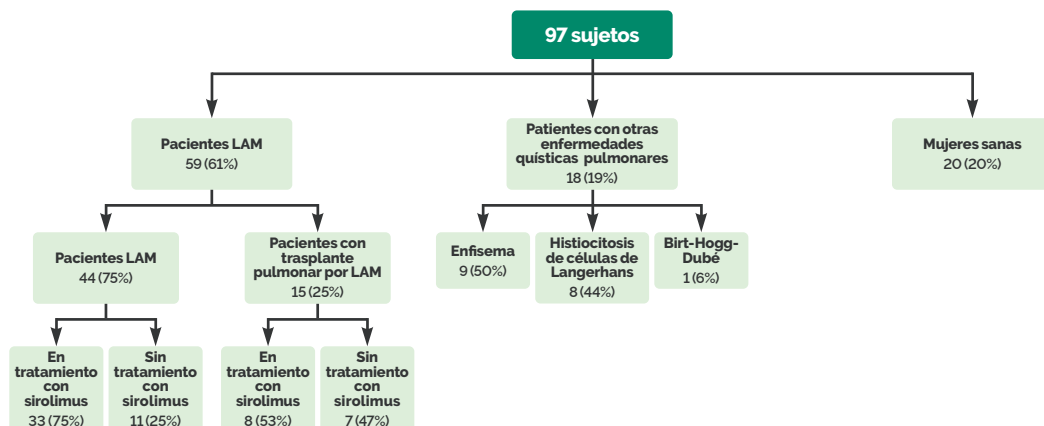
**Tabla 7:** Tasa de disminución de los angiomiolipomas en 1 año de tratamiento con sirolimus.

\***TSC-LAM:** LAM asociada a esclerosis tuberosa

## 6.2. RESULTADOS SEGUNDO ESTUDIO

Se reclutaron 97 participantes: 59 (61%) pacientes LAM, 18 (19%) pacientes con otras enfermedades quísticas pulmonares y 20 (20%) voluntarias sanas. La mediana de tiempo desde el diagnóstico de LAM a la extracción de muestra sanguínea fue 9 (2 - 17) años. Quince (25%) pacientes del grupo LAM habían recibido un TP antes de ser reclutadas; la mediana de tiempo desde el TP a la extracción de la muestra sanguínea fue de 12 (8 - 13) años. Un total de 10 (17%) pacientes tenían TSC-LAM. Dentro del grupo de pacientes con otras enfermedades quísticas pulmonares: 9 (50%) tenían enfisema, 8 (44%) tenían histiocitosis de células de Langerhans y 1 (6%) tenía síndrome de Birt-Hogg-Dubé (**Figura 13**). El método diagnóstico fue: biopsia pulmonar en 46 (78%) pacientes y clínica y hallazgos radiológicos en 13 (22%).





**Figura 13:** Sujetos incluidos en el estudio

En cuanto al grado de afectación quística mostrado en los TC de tórax: 8 (18%) pacientes LAM tenían una afectación leve, 14 (32%) de pacientes LAM tenían una afectación moderada, y 22 (50%) de pacientes una afectación severa. Respecto a las pacientes con otras enfermedades quísticas pulmonares: 4 (22%) tenían afectación leve, 6 (33%) tenían afectación moderada y 8 (44%) tenían afectación severa. La disnea fue el síntoma inicial más común registrado en 24 (41%) pacientes LAM, seguido de neumotórax en 21 (36%), quilotórax en 5 (9%), hemoptisis en 1 (2%) y hematuria en 1 (2%). Siete (12%) de los diagnósticos fueron incidentales en pacientes asintomáticas. Veintiocho (47%) pacientes tenían AML renales, 12 (20%) de ellos bilaterales con un tamaño medio de 25 (14 - 42) mm x 24 (13 - 25) mm. Doce (20%) pacientes tenían linfangioleiomiomas. Durante el seguimiento, 24 (41%) pacientes LAM presentaron neumotórax recurrente y 5 (9%) desarrollaron quilotórax recurrente. Respecto al TP, 11 (73%) de las pacientes trasplantadas tenían lesiones extrapulmonares: 8 (53%) tenían AML y 3 (20%) tenían linfangioleiomiomas. Únicamente una paciente presentó recidiva de la LAM después del TP y 7 (47%) desarrollaron disfunción crónica del injerto.

Cuarenta y una (69%) pacientes fueron tratadas con sirolimus: 33 (80%) pacientes LAM sin TP y 8 (20%) pacientes LAM con TP, con una media de tiempo en tratamiento con sirolimus de  $6.9 \pm 2.7$  y  $7.5 \pm 2.7$  años, respectivamente. La dosis media de sirolimus

fue  $2 \pm 0.7$  mg/día y los niveles medios en sangre fueron  $7.6 \pm 4.3$  ng/ml. Once (27%) pacientes presentaron efectos secundarios que tendieron a ocurrir al inicio del tratamiento. El efecto secundario más frecuente fue la aparición de aftas orales, registrado en 6 (15%) pacientes, elevación severa del colesterol en sangre en 2 (5%), edemas en extremidades inferiores en 1 (2%) y acné 1 (2%). Un total de 3 (5%) pacientes LAM iniciaron tratamiento con sirolimus tiempo después de la extracción de la muestra sanguínea para el estudio. Únicamente 3 (30%) pacientes TSC-LAM tomaban tratamiento antiepiléptico y 15 (34%) pacientes LAM utilizaban broncodilatadores, sin diferencias significativas entre TSC-LAM y S-LAM ( $p = 0.7$ ).

	LAM (incluyendo TP) (n=59)	LAM (sin TP) (n=44)	TP (n=15)	Otras enfermedades quísticas pulmonares (n=18)	Voluntarias sanas (n=20)	p valor
Edad al diagnóstico (años), mediana (RIQ)	52 (46 - 62)	51 (44 - 59)	61 (52 - 66)	57 (46 - 60)	51 (47 - 56)	0.037
Menopausa, n (%)	41 (69)	29 (66)	12 (80)	13 (72)	10 (50)	0.381
Embarazo, n (%)	37 (63)	26 (59)	11 (73)	14 (78)	10 (50)	0.392
Exfumadoras, n (%)	21 (36)	17 (39)	4 (27)	11 (61)	3 (15)	<0.001
Fumadoras, n (%)	3 (5)	3 (7)	0 (0)	5 (28)	4 (20)	
IMC (kg/m <sup>2</sup> ), media ± DE	24 ± 4.8	23.6 ± 4	25.2 ± 6.4	24 ± 4.1	23 ± 3.6	0.9214
Hipertensión, n (%)	19 (32)	11 (25)	8 (53)	2 (11)	1 (5)	<0.001
Hipercolesterolemia, n (%)	30 (51)	19 (43)	11 (73)	0 (0)	6 (30)	<0.001
Diabetes mellitus, n (%)	7 (12)	4 (9)	3 (20)	1 (6)	0 (0)	0.320
Insuficiencia renal (FG <60), n (%)	13 (22)	1 (2)	12 (80)	0 (0)	0 (0)	<0.001
<b>PFR, media ± DE</b>						
FVC, ml	2733 ± 847	2927 ± 825	2165 ± 647	2370 ± 978	-	0.012
FVC, % pred.	86 ± 21	91 ± 20	72 ± 18	72 ± 26	-	0.009
FEV <sub>1</sub> , ml	1850 ± 698	1922 ± 728	1638 ± 573	1629 ± 1141	-	0.257
FEV <sub>1</sub> , % pred.	71 ± 22	72 ± 22	69 ± 22	59 ± 35	-	0.298
FEV <sub>1</sub> /FVC, %	68 ± 14	65 ± 15	75 ± 9	61 ± 17	-	0.059
DL <sub>CO</sub> , %	55 ± 25	54 ± 26	68 ± 20	48 ± 30	-	0.337
Oxigenoterapia domiciliaria, n (%)	6 (10)	5 (11)	1 (6)	7 (39)	-	0.012

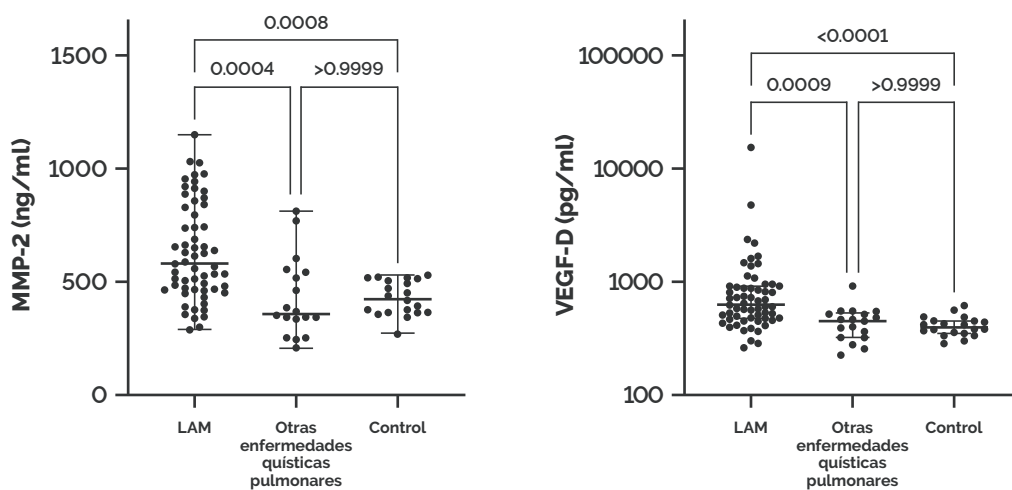
**Tabla 8:** Características demográficas y clínicas de la población a estudio

**IMC:** índice de masa corporal; **FG:** filtrado glomerular

La **Tabla 8** muestra las características demográficas y clínicas de la población del estudio. No existían diferencias entre grupos en lo referente a menopausia, embarazo, índice de

masa corporal pero sí que se encontraron diferencias en hipertensión, hipercolesterolemia e insuficiencia renal entre el grupo de pacientes trasplantadas y el resto. En las PFR, sólo había diferencias en la capacidad vital forzada (FVC) como porcentaje del predicho.

### Distribución de los biomarcadores



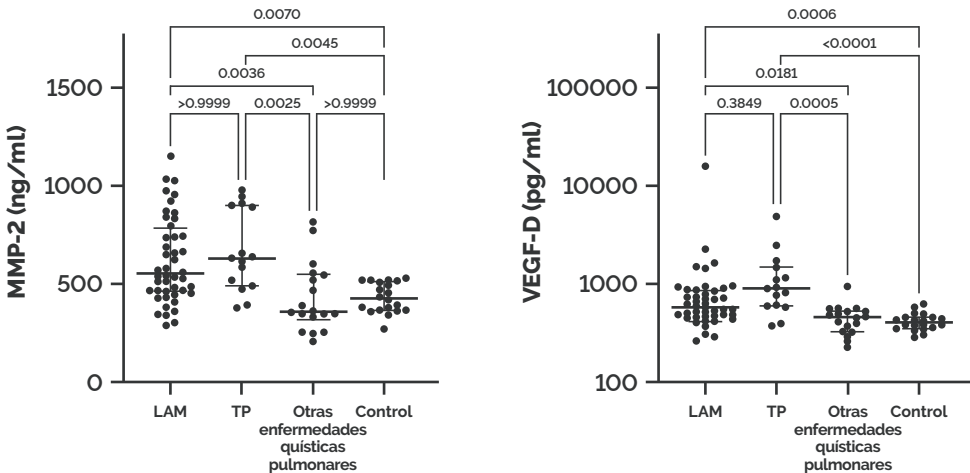
**Figura 14:** Comparación de los niveles de MMP-2 y del factor de crecimiento endotelial vascular D (VEGF-D) entre pacientes con LAM, otras enfermedades quísticas pulmonares y controles sanas. Las líneas indican la mediana y el RIQ

MMP-2 se encontró elevado en las pacientes LAM con una mediana de 578 (465 - 832) ng/ml comparado con las medianas de 360 (314 - 546) ng/ml para el grupo de otras enfermedades quísticas pulmonares y 427 (365 - 513) ng/ml para voluntarias sanas ( $p < 0.0001$ ). MMP-2 fue capaz de diferenciar entre pacientes LAM y pacientes de otras enfermedades quísticas pulmonares ( $p = 0.0004$ ), (**Figura 14**). No se observaron diferencias significativas en los niveles de MMP-2 entre las pacientes S-LAM y TSC-LAM (573 (289 - 1151) vs. 502 (404 - 688) ng/ml ( $p = 0.181$ )). No se observaron diferencias en el grupo LAM respecto a los niveles de MMP-2 y el TP: las pacientes LAM tenían una mediana de 551 (462 - 783) ng/ml comparado con 630 (491 - 901) ng/ml en el grupo de pacientes LAM trasplantadas ( $p > 0.999$ ). Tampoco se encontraron diferencias en el grupo de pacientes LAM respecto al tratamiento con sirolimus: 578 (466 - 874) ng/ml en el grupo tratado con sirolimus comparado con 480 (379 - 656) ng/ml en el grupo

no tratado ( $p = 0.081$ ). La diferencia en los niveles de MMP-2 entre las voluntarias sanas y las pacientes LAM en tratamiento con sirolimus permaneció significativa ( $p = 0.003$ ).

Los niveles séricos de VEGF-D eran superiores en pacientes LAM con una mediana de 629 (482 - 924) pg/ml, comparado con pacientes de otras enfermedades quísticas pulmonares que tenían una mediana de 459 (325 - 530) pg/ml y con las voluntarias sanas con una mediana de 404 (352 - 456) pg/ml. Los niveles de VEGF-D fueron más altos en pacientes TSC-LAM con una mediana de 733 (523 - 928) pg/ml comparado con pacientes S-LAM con una mediana 554 (457 - 790) pg/ml, ( $p = 0.039$ ). Si consideramos a todas las pacientes LAM independientemente del TP, aquellas en tratamiento con sirolimus tenían una mediana de 610 (486 - 886) pg/ml comparado con 658 (452 - 1638) pg/ml de las pacientes sin tratamiento con sirolimus ( $p = 0.457$ ). La diferencia de niveles de VEGF-D entre voluntarias sanas y pacientes LAM en tratamiento con sirolimus se mantuvo significativa ( $p = 0.004$ ).

A destacar, VEGF-D se encontraba elevado en pacientes LAM portadoras de TP, aunque la diferencia con las pacientes LAM no trasplantadas no era significativa (**Figura 15**). La mediana de VEGF-D fue 577 (461 - 861) pg/ml en las pacientes LAM libres de TP vs 893 (589 - 1482) pg/ml en el grupo de TP ( $p = 0.384$ ).

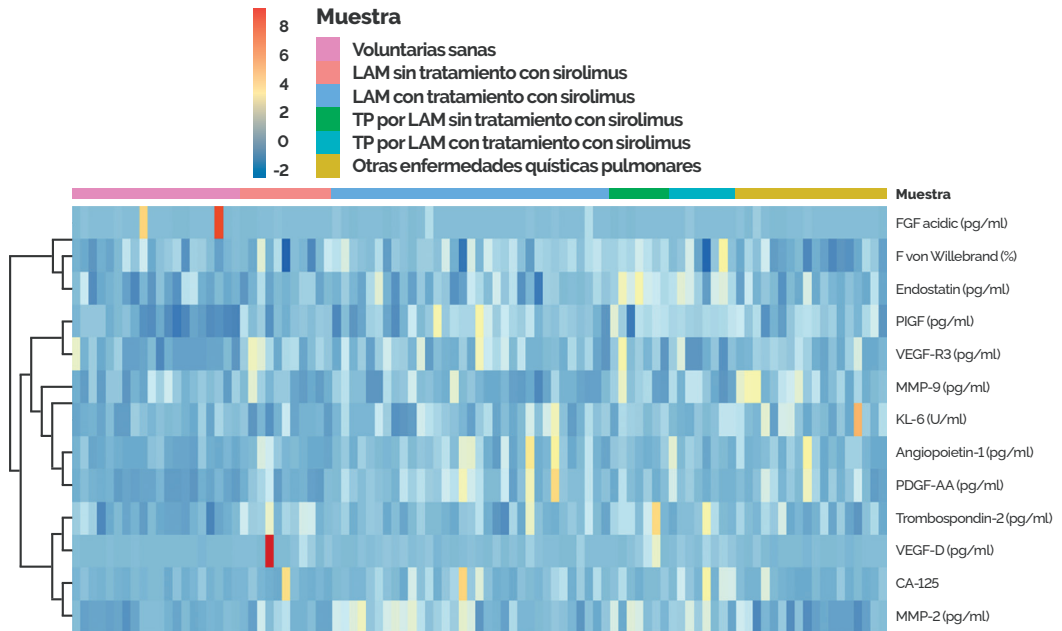


**Figura 15:** Comparación de los niveles de MMP-2 y VEGF-D

Los biomarcadores endostatin, PIGF, thrombospondin-2, VEGF-R3, angiopoietin-1, PDGF-AA, MMP-9, CA-125, vWF, FGF-acidic, y KL-6 no fueron capaces de discriminar entre pacientes LAM, pacientes con otras enfermedades quísticas pulmonares ni voluntarias sanas. La **Tabla 9** muestra los niveles de estos biomarcadores en los diferentes grupos de pacientes. La **Figura 16** muestra un heatmap con los resultados agrupados.

	LAM (n=44)	TP por LAM (n=15)	Otras enfermedades quísticas pulmonares (n=18)	Voluntarias sanas (n=20)	p-valor
Angiopoietin-1 (pg/ml), mediana (RIQ)	7178 (5033 - 13450)	9405 (5911 - 11662)	7603 (4726 - 12581)	3766 (2998 - 6604)	0.0035
CA-125 (U/ml), mediana (RIQ)	15 (1.7 - 25.2)	18.5 (12.6 - 45.3)	8.2 (6.3 - 14.5)	10.4 (7.5 - 12.9)	0.0118
Endostatin (ng/ml), mediana (RIQ)	37 (28 - 51)	72 (55 - 80)	35 (26 - 45)	31 (23 - 39)	<0.0001
FGF acidic (pg/ml), mediana (RIQ)	16 (12.4 - 19.2)	16 (11.4 - 19.2)	16.3 (11.34 - 18.9)	11.6 (10.3 - 20.8)	0.6219
KL-6 (U/ml), mediana (RIQ)	342 (256 - 517)	424 (341 - 535)	415 (290 - 636)	336.5 (237 - 393)	0.1526
MMP-9 (ng/ml), mediana (RIQ)	150 (93 - 209)	208 (90 - 283)	242 (163 - 374)	194 (102 - 229)	0.0246
PDGF-AA (pg/ml), mediana (RIQ)	1020 (768 - 1697)	889 (647 - 1236)	985.5 (702 - 1497)	433.5 (282.8 - 665.8)	<0.0001
PIGF (pg/ml), mediana (RIQ)	3.8 (3.2 - 4.3)	4.5 (4.2 - 4.9)	3.9 (3 - 4.6)	2.4 (1.8 - 3.3)	<0.0001
Thrombospondin-2 (ng/ml), mediana (RIQ)	27 (21 - 36)	31 (24 - 44)	24.5 (16 - 38)	18.5 (15 - 25)	0.0027
VEGF-R3 (pg/ml), mediana (RIQ)	182 (116.3 - 227)	165.1 (61.8 - 193.1)	168.9 (109.2 - 204.5)	86.94 (75.70 - 137.3)	0.0037
vWF (%), mediana (RIQ)	143.9 (121.6 - 175.6)	157.3 (133.5 - 180.8)	97.15 (78 - 139.1)	124.2 (96.75 - 149.8)	0.0030

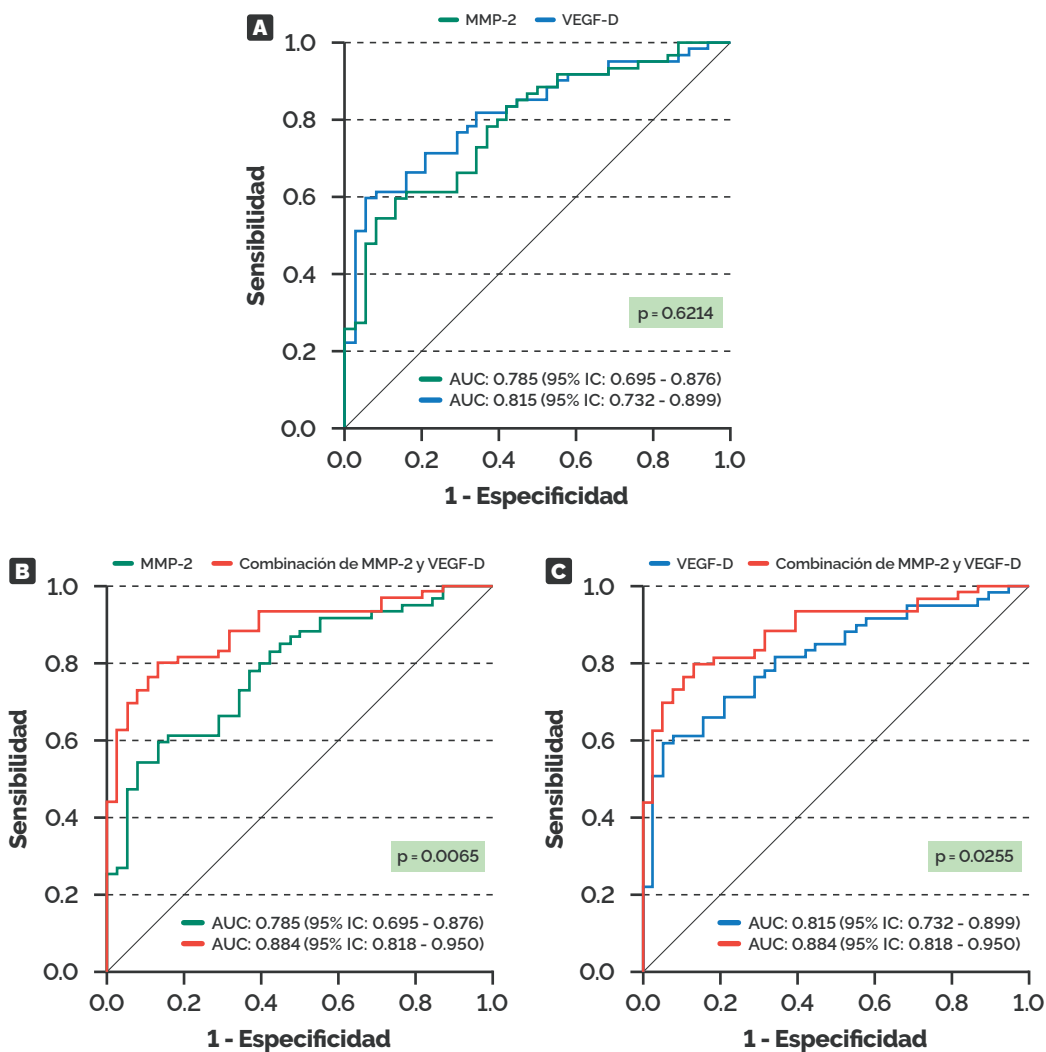
**Tabla 9:** Niveles de los biomarcadores en las pacientes LAM, pacientes TP por LAM, otras enfermedades quísticas y voluntarias sanas



**Figura 16:** *Heatmap* que muestra los resultados agrupados. Cada columna representa un sujeto (agrupados según sean voluntarias sanas, pacientes LAM que no reciben tratamiento con sirolimus, pacientes LAM en tratamiento con sirolimus, pacientes con TP por LAM que no reciben tratamiento con sirolimus, pacientes TP que reciben tratamiento con sirolimus y pacientes con otras enfermedades quísticas pulmonares) y cada fila representa un biomarcador

El área bajo la curva ROC (AUC) de VEGF-D para predecir el diagnóstico de LAM, comparado con pacientes de otras enfermedades quísticas y voluntarias sanas fue 0.815 [95% intervalo de confianza (IC): 0.732 - 0.899,  $p < 0.0001$ ]. El punto de corte de VEGF-D de 578 pg/ml mostró una sensibilidad y especificidad de 59% y 95%, respectivamente, mientras que un valor como punto de corte de 800 pg/ml mostraba una sensibilidad de 36% y una especificidad de 97%, respectivamente. El AUC de MMP-2 fue 0.785 (95% IC: 0.695 - 0.876,  $p < 0.0001$ ). Un punto de corte de 560 pg/ml mostró una sensibilidad de 54% para el diagnóstico de LAM y una especificidad del 92%. Concretamente, un punto de corte de 824 pg/ml tiene una especificidad del 100% para diferenciar LAM de otras enfermedades quísticas pulmones: 15 (25%) LAM cumplen este criterio, 5 de ellas recibieron un TP y 11 están en tratamiento con sirolimus. Un *score* compuesto se construyó combinando MMP-2 y VEGF-D ( $\text{score} = -6.36 + 0.0059 \times \text{VEGF-D} + 0.0069 \times \text{MMP-2}$ ).

El AUC de este score compuesto fue 0.88 (95% IC: 0.82 - 0.95) ( $p < 0.05$  en comparación con VEGF-D o MMP-2 solos), y el mejor corte para el score compuesto fue 0.61, resultando en una sensibilidad/especificidad de 79% / 86% (**Figura 17**).



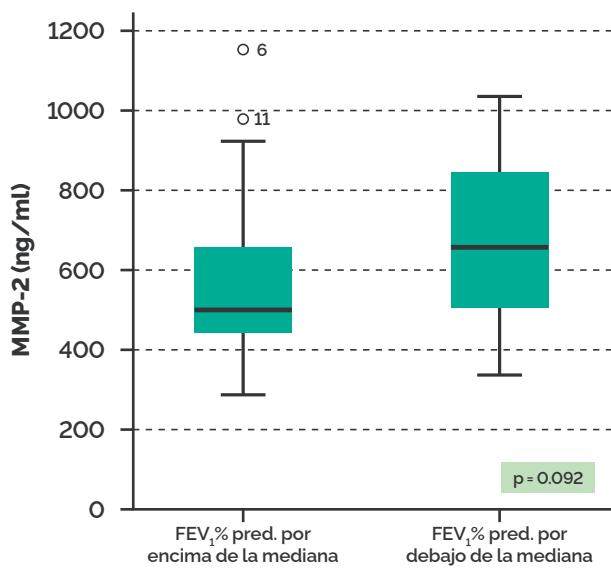
**Figura 17:** **A)** Curvas ROC de MMP-2 (línea verde) y de VEGF-D (línea azul); **B)** Curvas ROC de MMP-2 (línea verde) y de la combinación de MMP-2 y VEGF-D (línea roja). **C)** Curvas ROC de VEGF-D (línea azul) y la combinación de MMP-2 y VEGF-D (línea roja)

No encontramos ninguna correlación entre los valores de MMP-2 ni tampoco los valores de VEGF-D con la edad, los niveles de estradiol, hormona luteinizante, folitropina, progesterona ni prolactina. Tampoco se observó ninguna correlación entre ambos biomarcadores. MMP-2 y VEGF-D no se asociaron con quilotórax ni AML ni recurrencias; VEGF-D se correlacionó con compromiso linfático en cambio MMP-2 no.

Se observó una correlación positiva casi significativa entre los niveles séricos de MMP-2 y la severidad de la afectación quística por TC de tórax: la mediana de los niveles de MMP-2 fue de 458 (305 - 536) ng/ml en el grupo de afectación quística leve, 500 (348 - 783) ng/ml en el grupo de afectación quística moderada y 551 (456 - 782) ng/ml en el grupo de afectación quística severa ( $p = 0.087$ ). Por otra parte, los niveles de VEGF-D no se correlacionaron: la mediana fue de 574 (423 - 919), 503 (405 - 645) y 544 (444 - 816) pg/ml, respectivamente para los 3 grupos ( $p = 0.638$ ).

Observamos una tendencia hacia una asociación entre niveles de MMP-2 en suero y peores parámetros de función pulmonar en pacientes con LAM (excluyendo las pacientes con TP por LAM). En pacientes con  $FEV_1\%$  pred, por debajo de la mediana, los niveles medios de MMP-2 fueron de  $674 \pm 203$  ng/ml, mientras que aquellos con un  $FEV_1\%$  pred. por encima de la mediana los niveles medios de MMP-2 fueron  $562 \pm 226$  ng/ml ( $p = 0.092$ ), (**Figura 18**). Los niveles de VEGF-D no se correlacionaron con parámetros de la función pulmonar.





**Figura 18:** Clasificación de las pacientes LAM según la mediana del FEV<sub>1</sub>% predicho mayor o menor al 73.5%





# Discusión



En la presente tesis doctoral se profundiza en diferentes aspectos relacionados con el diagnóstico y el tratamiento de la LAM. Los resultados del primer capítulo confirman el efecto positivo a largo plazo sobre la función pulmonar del tratamiento con sirolimus en la mayoría de las pacientes LAM. El segundo capítulo demuestra que los niveles de MMP-2 en pacientes LAM son elevados comparados con otras pacientes con enfermedades quísticas y con voluntarias sanas. Si se combinan los biomarcadores VEGF-D y MMP-2 mejora la precisión diagnóstica.

### **Sirolimus estabiliza la función pulmonar a largo plazo**

El hallazgo más destacado del primer estudio fue la demostración de que hasta un 59% de las pacientes LAM tratadas con sirolimus pueden considerarse respondedoras a largo plazo. Este dato se encuentra en consonancia con los resultados del ensayo clínico MILES<sup>31</sup> que demostró la estabilización de la función pulmonar de las pacientes LAM en tratamiento con sirolimus durante 12 meses, si bien, un porcentaje de las pacientes tratadas con sirolimus no respondieron al tratamiento.

Existen pocos datos publicados en la literatura sobre función pulmonar en pacientes LAM en tratamiento con sirolimus a largo plazo. Un estudio americano<sup>75</sup> describió el efecto de sirolimus en 38 pacientes durante una media de 3.4 años de tratamiento; los autores observaron disminución de la tasa de caída de FEV<sub>1</sub>; la media antes del tratamiento con sirolimus fue de -79 ml/año vs 25 ml/año después del tratamiento. *Hu et al.*<sup>67</sup>, en un estudio retrospectivo, también evaluaron el efecto a largo plazo de sirolimus en 11 pacientes durante 4 años de tratamiento, observando una mejoría de FEV<sub>1</sub> limitado al primer año con un incremento medio de 178 ml/año, mientras que a partir del segundo año la pendiente de FEV<sub>1</sub> cambió a una media de -10 ml/año. En un ensayo clínico más reciente, *Takada et al.*<sup>66</sup> trataron a 63 pacientes LAM con sirolimus durante 2 años describiendo una disminución de FEV<sub>1</sub> de -19 ml/año. Ninguno de estos trabajos diferenciaba entre pacientes respondedoras al tratamiento y pacientes que no respondían. En cambio, un estudio observacional<sup>63</sup> señaló que aunque sirolimus

está asociado con reducción de la progresión de la enfermedad, existe una minoría de pacientes en las que continua la caída funcional. Los autores observaron que las pacientes con una pendiente de FEV<sub>1</sub> más favorable tendían a presentar un diagnóstico más reciente de LAM y una mejor función pulmonar al inicio de tratamiento. En nuestra cohorte, no existían diferencias significativas entre pacientes en lo referente a FEV<sub>1</sub> antes del inicio de sirolimus. Las pacientes que consideramos respondedoras tenían una tasa de caída de FEV<sub>1</sub> media durante los 5 años de 42 ml/año comparado con -54 ml/año en las pacientes respondedoras parciales y -84 ml/año en las pacientes no respondedoras. Nuestro estudio aporta datos relevantes en cuanto al tratamiento a largo plazo con sirolimus: de las pacientes tratadas durante 5 años más de la mitad presentaron mejoría de la función pulmonar, un 30% de ellas presentaron una mejoría parcial en la función pulmonar y únicamente un 11% de las pacientes no presentaron mejoría en FEV<sub>1</sub>.

En general, sirolimus es un fármaco bien tolerado. Registramos efectos secundarios en el 33% de las pacientes siendo la mayoría efectos secundarios leves o moderados. Únicamente una paciente tuvo que detener el tratamiento por efectos adversos. En otras series publicadas se describen efectos secundarios parecidos, pero en una proporción mayor en torno a un 50 - 60% de las pacientes<sup>63,66</sup>. *Bee et al.*<sup>63</sup> describieron también casos de neumonitis mientras que nosotros no observamos ninguno. Las diferencias en cuanto a la tasa de efectos secundarios entre nuestro estudio y otros publicados pueden deberse al diseño retrospectivo del nuestro en contraposición de estudios prospectivos. Sin embargo, consideramos que todos los efectos graves fueron descritos.

### **El rol de sirolimus como tratamiento preventivo de complicaciones pleurales y reducción de AML**

Nuestro primer estudio apoya la idea de que el tratamiento con sirolimus protege contra el neumotórax y posiblemente también contra los acúmulos de líquido

quiloso. Únicamente una paciente de nuestra serie, concretamente de la cohorte histórica, presentó recurrencia de neumotórax estando ya en tratamiento con sirolimus y ninguna paciente presentó quilotórax después de haber iniciado sirolimus. *Taveira-DaSilva et al.*<sup>61</sup> en 2011 fueron los primeros en describir la asociación del tratamiento con sirolimus y la reducción o resolución de derrames pleurales y linfangioleiomiomas; pacientes que requerían con frecuencia drenajes pleurales repetidos no los volvieron a necesitar después del inicio de sirolimus. Estos hallazgos han sido descritos también por otros grupos<sup>64,68</sup>.

En relación a los AML, observamos un efecto positivo en la mayoría de los casos de AML después de un año de tratamiento con sirolimus. Un 91% de las pacientes presentaron respuesta al tratamiento con reducción o estabilización de los AML. Estos resultados están en consonancia con los datos publicados por *Bissler et al.*<sup>60</sup>. En su ensayo clínico observaron que después de 1 año de tratamiento con sirolimus, el 80% de las pacientes mostraron una reducción del diámetro máximo de los AML de al menos el 30%. En nuestra serie, más de la mitad de pacientes que presentaron una reducción de los AML. Además, también mostraron una respuesta positiva en términos de función pulmonar, que se podría explicar por el efecto beneficioso del tratamiento en relación a las complicaciones pleurales. *Bissler et al.* describieron el mismo efecto en un 60% de las pacientes con PFR a un año de tratamiento con sirolimus. Por otro lado, *Davies y cols*<sup>76</sup> también demostraron una reducción del 50% del tamaño de los AML, pero en este caso, sin datos de mejoría de la función pulmonar durante el tratamiento con sirolimus.

### **El papel del TP en LAM en las últimas décadas**

En nuestro primer estudio, sólo 9 pacientes tratadas con sirolimus fueron trasplantadas. Hasta la publicación del estudio MILES en 2011 y la aprobación de sirolimus por la *Food and Drug Administration* en 2015, el trasplante pulmonar era la única opción terapéutica para las pacientes con LAM e insuficiencia respiratoria. En nuestra Unidad de TP se han realizado más de 1300 TP de los cuales la LAM representa 2.5% del total de casos.



Desde el inicio del programa de trasplante en nuestro centro en 1990 hasta noviembre 2007 se sometieron a TP 19 pacientes LAM, posterior a 2007 se han trasplantado 9 pacientes. Esta disminución se podría explicar en relación a la aparición de sirolimus como opción terapéutica en estas pacientes y es otro dato relevante que aporta nuestro primer estudio.

Otro dato interesante en relación al TP en pacientes LAM que observamos en nuestro segundo estudio es la elevación de los niveles de VEGF-D en pacientes trasplantadas. Desde nuestro conocimiento este es el primer estudio que mide los niveles de VEGF-D en pacientes LAM trasplantadas. Este resultado apoya la hipótesis de que las células LAM no se originan exclusivamente en los pulmones y que pueden proliferar en otros tejidos<sup>77</sup>. Además, se han identificado células LAM en útero mediante secuenciación de ARN de células individuales<sup>78</sup>. Estos hechos explicarían la posibilidad de recurrencia de la enfermedad tras el trasplante.

### **MMP-2 como biomarcador diagnóstico en LAM**

El diagnóstico de LAM continúa siendo un reto clínico. En los últimos años se ha intensificado la búsqueda de técnicas no invasivas para llegar al diagnóstico como son: el TC torácico asociado a una prueba de imagen abdominal para confirmar la presencia de AML, y el biomarcador VEGF-D en plasma, que combinados nos pueden ayudar al diagnóstico<sup>59</sup>. No obstante, en aquellos casos con enfermedad quística pulmonar y VEGF-D normal no se puede descartar la enfermedad y será necesario la realización de una biopsia pulmonar. Por lo tanto, encontrar nuevos biomarcadores para el diagnóstico de LAM es una cuestión vital. En nuestro segundo estudio, nuestros resultados mostraron que los niveles de MMP-2 eran significativamente elevados en pacientes con LAM comparado con pacientes con otras enfermedades quísticas pulmonares y con voluntarias sanas. Un *score* compuesto de VEGF-D y MMP-2 puede utilizarse como biomarcador para LAM e incrementar la precisión diagnóstica.

Las MMPs son la principal familia de enzimas responsables de la degradación de la matriz extracelular<sup>79</sup> y se relacionan con el remodelado tisular, angiogénesis, inflamación y cicatrización<sup>80</sup>. Están sobreexpresadas en enfermedades pulmonares crónicas como la fibrosis pulmonar idiopática<sup>81,82</sup>, asma<sup>83</sup> y enfisema<sup>84</sup> así como también en proliferación tumoral<sup>85</sup>. El desequilibrio entre las MMPs y sus inhibidores se ha visto implicado en la LAM<sup>43</sup>. Un estudio demostró que un aumento de actividad de las MMPs, en particular de la MMP-2 podría ser responsable de la destrucción de los quistes en LAM<sup>86</sup>. Posteriormente, otros grupos han reproducido estos hallazgos, describiendo niveles elevados de MMP-2 en pacientes con LAM<sup>46,87</sup>.

Existe poca literatura en relación a MMPs y la gravedad de LAM. En un estudio en pacientes LAM sin tratamiento<sup>87</sup> se describió una asociación entre niveles altos de MMP-2 y mejor función pulmonar ( $FEV_1$  y  $DL_{CO}$ ). En esta misma cohorte, en cambio, no encontraron asociación entre VEGF-D y caída de  $FEV_1$ . *Terraneo et al.*<sup>46</sup> describieron hallazgos similares: niveles elevados de MMP-2 se asociaban a menor afectación pulmonar. Estos datos contradicen los hallazgos de nuestro estudio: en nuestro estudio niveles elevados de MMP-2 se asociaron a peor  $FEV_1$  y mayor grado de afectación quística en el TC torácico, lo que parecería razonable; si existe un mayor número de quistes pulmonares, pueda existir mayor destrucción del parénquima pulmonar y esto pueda llevar a una peor función pulmonar.

En conjunto, tanto el trabajo de *Terraneo et al.* como el nuestro, documentan que MMP-2 tiene una habilidad para diagnosticar LAM inferior que VEGF-D. Nuestro estudio va un paso más allá y propone la asociación de los dos biomarcadores para mejorar la precisión del diagnóstico no invasivo.

### **¿Es VEGF-D un buen biomarcador de progresión en LAM?**

En nuestro segundo estudio, encontramos los niveles de VEGF-D elevados de forma significativa en pacientes LAM con una sensibilidad y especificidad similar

a la publicada anteriormente<sup>88</sup>. No obstante, no encontramos asociación entre función pulmonar y niveles de VEGF-D, si bien, al tratarse de un estudio transversal, las muestras se obtuvieron en momentos de evolución de la enfermedad diferentes en cada paciente. Existe controversia en cuanto a la utilidad de VEGF-D como biomarcador pronóstico; *Young et al.*<sup>41</sup> correlacionaron niveles de VEGF-D en el momento del diagnóstico con función pulmonar. *Hirose y cols*<sup>89</sup> describieron una correlación negativa entre VEGF-D y DL<sub>CO</sub> basal pero no encontraron relación entre VEGF-D durante el seguimiento y los cambios de función pulmonar en pacientes con sirolimus. *Taveira-DaSilva et al.*<sup>42</sup> constataron disminución del VEGF-D después del inicio de sirolimus pero tampoco pudieron demostrar una asociación entre la disminución de VEGF-D y mejoría de la función pulmonar.

Nuestro trabajo se centra en una enfermedad minoritaria y por tanto no está exento de limitaciones. Así, una posible limitación es que ambos trabajos están realizados en un único centro; en este sentido más estudios en otros centros son necesarios. La principal limitación del primer estudio, es el diseño retrospectivo que cubre un período extendido de 30 años. Entre los puntos fuertes del estudio destaca la homogeneidad de la atención clínica recibida por las pacientes, ya que fueron tratadas por el mismo equipo clínico, que tiene una vasta experiencia en manejar tratamientos con inhibidores de la mTOR y TP. En el segundo estudio, la principal limitación es que se trata de un estudio transversal con una muestra relativamente pequeña condicionada por la rareza de la enfermedad. Sin embargo, nuestra cohorte de pacientes es similar a otros estudios publicados en LAM. Por otra parte, el número limitado de biomarcadores estudiados también podría considerarse un factor limitante. A pesar de ello, el trabajo presenta fortalezas como es la comparación con un grupo control de pacientes con otras enfermedades quísticas pulmonares.

En resumen, el tratamiento con sirolimus en pacientes LAM estabiliza la función pulmonar a largo plazo, únicamente un 11% de las pacientes no responden al

tratamiento. En cuanto al diagnóstico de LAM, VEGF-D puede mejorar su precisión diagnóstica si se combina con MMP-2. Son necesarios la realización de estudios prospectivos con un mayor número de pacientes para explorar el rol de MMP-2 en la práctica clínica.



# Conclusiones



- 1.** El tratamiento con sirolimus estabiliza la función pulmonar a largo plazo. Un 59% de las pacientes en nuestra serie pueden considerarse respondedoras a 5 años de tratamiento.
- 2.** Sirolimus protege contra neumotórax y quilotórax, así como reduce el tamaño de angiomiolipomas.
- 3.** La combinación de MMP-2 y VEGF-D mejora la precisión diagnóstica de la LAM.





# Nuevas líneas de investigación



Las nuevas líneas de investigación derivadas de nuestro estudio son las siguientes:

- ▶ Determinar los efectos a largo plazo del tratamiento con sirolimus en el pronóstico e identificar tratamientos que puedan combinarse para aumentar su efecto. Son necesarios ensayos clínicos multicéntricos para definir que pacientes están en riesgo de no responder al tratamiento.
- ▶ Nos gustaría realizar un estudio prospectivo, multicéntrico para estudiar los niveles de MMP-2 en otras cohortes de pacientes LAM y también poder estudiar el papel pronóstico de este biomarcador.
- ▶ Realizar otros estudios para profundizar en otros biomarcadores en relación a la matriz extracelular.



# Bibliografía



1. McCormack FX, Travis WD, Colby T V., Henske EP, Moss J. Lymphangioliomyomatosis: calling it what it is: a low-grade, destructive, metastasizing neoplasm. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;186(12):1210–2.
2. Ferrans VJ, Yu ZX, Nelson WK, Valencia JC, Tatsuguchi A, Avila NA, et al. Lymphangioliomyomatosis (LAM): a review of clinical and morphological features. *J Nippon Med Sch.* 2000;67(5):311–29.
3. Randle SC. Tuberous Sclerosis Complex: A Review. *Pediatr Ann.* 2017;46(4):e166–71.
4. Carsillo T, Astrinidis A, Henske EP. Mutations in the tuberous sclerosis complex gene TSC2 are a cause of sporadic pulmonary lymphangioliomyomatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(11):6085–90.
5. Sato T, Seyama K, Fujii H, Maruyama H, Setoguchi Y, Iwakami S, et al. Mutation analysis of the TSC1 and TSC2 genes in Japanese patients with pulmonary lymphangioliomyomatosis. *J Hum Genet.* 2002;47(1):20–8.
6. Harknett EC, Chang WYC, Byrnes S, Johnson J, Lazor R, Cohen MM, et al. Use of variability in national and regional data to estimate the prevalence of lymphangioliomyomatosis. *QJM.* 2011;104(11):971–9.
7. Henske EP, Józwiak S, Kingswood JC, Sampson JR, Thiele EA. Tuberous sclerosis complex. *Nat Rev Dis Prim.* 2016;2:1–18.
8. O’Callaghan FJK, Shiell AW, Osborne JP, Martyn CN. Prevalence of tuberous sclerosis estimated by capture-recapture analysis. *Lancet (London, England).* 1998;351(9114):1490.
9. Wakida K, Watanabe Y, Kumasaka T, Seyama K, Mitani K, Hiraki T, et al. Lymphangioliomyomatosis in a Male. *Ann Thorac Surg.* 2015;100(3):1105–7.
10. Schiavina M, Di Scioscio V, Contini P, Cavazza A, Fabiani A, Barberis M, et al. Pulmonary lymphangioliomyomatosis in a karyotypically normal man without tuberous sclerosis complex. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;176(1):96–8.
11. McCarthy C, Gupta N, Johnson SR, Yu JJ, McCormack FX. Lymphangioliomyomatosis: pathogenesis, clinical features, diagnosis, and management. *Lancet Respir Med.* 2021;9(11):1313–27.
12. Dibble CC, Elis W, Menon S, Qin W, Klekota J, Asara JM, et al. TBC1D7 is a third subunit of the TSC1-TSC2 complex upstream of mTORC1. *Mol Cell.* 2012;47(4):535–46.
13. Gupta N, Vassallo R, Wikenheiser-Brokamp KA, McCormack FX. Diffuse Cystic Lung Disease. Part I. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015;191(12):1354–66.
14. Matsui K, Takeda K, Yu ZX, Valencia J, Travis WD, Moss J, et al. Downregulation of estrogen and progesterone receptors in the abnormal smooth muscle cells in pulmonary lymphangioliomyomatosis following therapy. An immunohistochemical study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161(3 Pt 1):1002–9.
15. Berger U, Khaghani A, Pomerance A, Yacoub MH, Coombes RC. Pulmonary lymphangioliomyomatosis and steroid receptors. An immunocytochemical study. *Am J Clin Pathol.* 1990;93(5):609–14.



16. Logginidou H, Ao X, Russo I, Henske EP. Frequent estrogen and progesterone receptor immunoreactivity in renal angiomyolipomas from women with pulmonary lymphangioliomyomatosis. *Chest*. 2000;117(1):25–30.
17. Sandrini A, Silverstone E, Yates DH. Menstrual cycle variation of retroperitoneal lymphangioliomyomas in lymphangioliomyomatosis. *Intern Med J*. 2011;41(12):832–5.
18. Taveira-Dasilva AM, Johnson SR, Julien-Williams P, Johnson J, Stylianou M, Moss J. Pregnancy in lymphangioliomyomatosis: clinical and lung function outcomes in two national cohorts. *Thorax*. 2020;75(10):904–7.
19. Yano S. Exacerbation of pulmonary lymphangioliomyomatosis by exogenous oestrogen used for infertility treatment. *Thorax*. 2002;57(12):1085–6.
20. Gupta N, Lee HS, Ryu JH, Taveira-DaSilva AM, Beck GJ, Lee JC, et al. The NHLBI LAM Registry: Prognostic Physiologic and Radiologic Biomarkers Emerge From a 15-Year Prospective Longitudinal Analysis. *Chest*. 2019;155(2):288–96.
21. Yu JJ, Robb VA, Morrison TA, Ariazi EA, Karbowiczek M, Astrinidis A, et al. Estrogen promotes the survival and pulmonary metastasis of tuberin-null cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(8):2635–40.
22. Sun Y, Zhang E, Lao T, Pereira AM, Li C, Xiong L, et al. Progesterone and Estradiol Synergistically Promote the Lung Metastasis of Tuberin-Deficient Cells in a Preclinical Model of Lymphangioliomyomatosis. *Horm Cancer*. 2014;5(5):284–98.
23. Johnson SR, Tattersfield AE. Clinical experience of lymphangioliomyomatosis in the UK. *Thorax*. 2000;55:1052–7.
24. Taylor JR, Ryu J, Colby T V, Raffin TA. Lymphangioliomyomatosis. Clinical course in 32 patients. *N Engl J Med*. 1990;323(18):1254–60.
25. Johnson SR. Lymphangioliomyomatosis. *Eur Respir J*. 2006;27(5):1056–65.
26. Avila NA, Kelly JA, Chu SC, Dwyer AJ, Moss J. Lymphangioliomyomatosis: abdominopelvic CT and US findings. *Radiology*. 2000;216(1):147–53.
27. Henske EP, Józwiak S, Kingswood JC, Sampson JR, Thiele EA. Tuberous sclerosis complex. *Nat Rev Dis Prim*. 2016;2.
28. Cohen MM, Pollock-BarZiv S, Johnson SR. Emerging clinical picture of lymphangioliomyomatosis. *Thorax*. 2005;60(10):875–9.
29. Taveira-DaSilva AM, Stylianou MP, Hedin CJ, Kristof AS, Avila NA, Rabel A, et al. Maximal oxygen uptake and severity of disease in lymphangioliomyomatosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168(12):1427–31.
30. Taveira-DaSilva AM, Stylianou MP, Hedin CJ, Hathaway O, Moss J. Decline in lung function in patients with lymphangioliomyomatosis treated with or without progesterone. *Chest*. 2004;126(6):1867–74.
31. McCormack FX, Inoue Y, Moss J, Singer LG, Strange C, Nakata K, et al. Efficacy and Safety of Sunitinib in Lymphangioliomyomatosis. *N Engl J Med*. 2011;364:1595–606.

32. Chang WYC, Cane JL, Kumaran M, Lewis S, Tattersfield AE, Johnson SR, et al. A 2-year randomised placebo-controlled trial of doxycycline for lymphangioliomyomatosis. *Eur Respir J*. 2014;43:1114–23.
33. Trotman-Dickenson B. Cystic lung disease: Achieving a radiologic diagnosis. *Eur J Radiol*. 2014;83(1):39–46.
34. Harari S, Torre O, Moss J. Lymphangioliomyomatosis: what do we know and what are we looking for? *Eur Respir Rev*. 2011;20(119):34–44.
35. Seaman DM, Meyer CA, Gilman MD, McCormack FX. Diffuse cystic lung disease at high-resolution CT. *Am J Roentgenol*. 2011;196(6):1305–11.
36. Johnson SR, Cordier JF, Lazor R, Cottin V, Costabel U, Harari S, et al. European Respiratory Society guidelines for the diagnosis and management of lymphangioliomyomatosis. *Eur Respir J*. 2010;35(1):14–26.
37. Young LR, VanDyke R, Gulleman PM, Inoue Y, Brown KK, Schmidt LS, et al. Serum vascular endothelial growth factor-D prospectively distinguishes lymphangioliomyomatosis from other diseases. *Chest*. 2010;138(3):674–81.
38. Young LR, Inoue Y, McCormack FX. Diagnostic Potential of Serum VEGF-D for Lymphangioliomyomatosis. *N Engl J Med*. 2008;358(2):199–200.
39. Amaral AF, de Oliveira MR, Dias OM, Arimura FE, Freitas CSG, Acencio MMP, et al. Concentration of Serum Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF-D) and Its Correlation with Functional and Clinical Parameters in Patients with Lymphangioliomyomatosis from a Brazilian Reference Center. *Lung*. 2019;197(2):139–46.
40. Glasgow CG, Avila NA, Lin JP, Stylianou MP, Moss J. Serum vascular endothelial growth factor-D levels in patients with lymphangioliomyomatosis reflect lymphatic involvement. *Chest*. 2009;135(5):1293–300.
41. Young LR, Lee HS, Inoue Y, Moss J, Singer LG, Strange C, et al. Serum VEGF-D concentration as a biomarker of lymphangioliomyomatosis severity and treatment response: A prospective analysis of the Multicenter International Lymphangioliomyomatosis Efficacy of Sunitinib (MILES) trial. *Lancet Respir Med*. 2013;1(6):445–52.
42. Taveira-DaSilva AM, Jones AM, Julien-Williams P, Stylianou M, Moss J. Long-Term Effect of Sunitinib on Serum Vascular Endothelial Growth Factor D Levels in Patients With Lymphangioliomyomatosis. *Chest*. 2018;153(1):124–32.
43. Greenlee KJ, Werb Z, Kheradmand F. Matrix Metalloproteinases in Lung: Multiple, Multifarious, and Multifaceted. *Physiol Rev*. 2007;87(1):69.
44. Matsui K, Takeda K, Yu ZX, Travis WD, Moss J, Ferrans VJ. Role for activation of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of pulmonary lymphangioliomyomatosis. *Arch Pathol Lab Med*. 2000;124(2):267–75.
45. Odajima N, Betsuyaku T, Nasuhara Y, Inoue H, Seyama K, Nishimura M. Matrix metalloproteinases in blood from patients with LAM. *Respir Med*. 2009;103(1):124–9.
46. Terraneo S, Lesma E, Ancona S, Imeri G, Palumbo G, Torre O, et al. Exploring the Role of Matrix Metalloproteinases as Biomarkers in Sporadic Lymphangioliomyomatosis and Tuberous Sclerosis Complex. A Pilot Study. *Front Med*. 2021;8:531.

47. Corrin B, Liebow AA, Friedman PJ. Pulmonary lymphangiomyomatosis. A review. *Am J Pathol.* 1975;79(2):348–82.
48. Zhe X, Schuger L. Combined smooth muscle and melanocytic differentiation in lymphangiomyomatosis. *J Histochem Cytochem.* 2004;52(12):1537–42.
49. Gupta N, Finlay GA, Kotloff RM, Strange C, Wilson KC, Young LR, et al. Lymphangiomyomatosis diagnosis and management: High-resolution chest computed tomography, transbronchial lung biopsy, and pleural disease management an Official American thoracic society/Japanese respiratory society clinical practice guideline. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017;196(10):1337–48.
50. Gupta N, Vassallo R, Wikenheiser-Brokamp KA, McCormack FX. Diffuse Cystic Lung Disease. Part II. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015;192(1):17–29.
51. Adamson D, Heinrichs WL, Raybin DM, Raffin TA. Successful treatment of pulmonary lymphangiomyomatosis with oophorectomy and progesterone. *Am Rev Respir Dis.* 1985;132(4):916–21.
52. Banner AS, Carrington CB, Emory WB, Kittle F, Leonard G, Ringus J, et al. Efficacy of oophorectomy in lymphangiomyomatosis and benign metastasizing leiomyoma. *N Engl J Med.* 1981;305(4):204–9.
53. Klein M, Krieger O, Ruckser R, Rosen A, Waldner R, Preis P, et al. Treatment of lymphangiomyomatosis by ovariectomy, interferon alpha 2b and tamoxifen--a case report. *Arch Gynecol Obstet.* 1992;252(2):99–102.
54. A T, MS G, H R. Tamoxifen for lymphangiomyomatosis. *N Engl J Med.* 1982;306(12):745–6.
55. Johnson SR, Tattersfield AE. Decline in lung function in lymphangiomyomatosis: relation to menopause and progesterone treatment. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160(2):628–33.
56. McCarty KS, Mossler JA, McLelland R, Sieker HO. Pulmonary lymphangiomyomatosis responsive to progesterone. *N Engl J Med.* 1980;303(25):1461–5.
57. Harari S, Cassandro R, Chiodini J, Taveira-DaSilva AM, Moss J. Effect of a gonadotrophin-releasing hormone analogue on lung function in lymphangiomyomatosis. *Chest.* 2008;133(2):448–54.
58. Rossi GA, Balbi B, Oddera S, Lantero S, Ravazzoni C. Response to treatment with an analog of the luteinizing-hormone-releasing hormone in a patient with pulmonary lymphangiomyomatosis. *Am Rev Respir Dis.* 1991;143(1):174–6.
59. McCormack FX, Gupta N, Finlay GR, Young LR, Taveira-Da Silva AM, Glasgow CG, et al. Official American thoracic society/Japanese respiratory society clinical practice guidelines: Lymphangiomyomatosis diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016;
60. Bissler JJ, McCormack FX, Young LR, Elwing JM, Chuck G, Leonard JM, et al. Sirolimus for Angiomyolipoma in Tuberous Sclerosis Complex or Lymphangiomyomatosis. *N Engl J Med.* 2008;358(2):140–51.
61. Taveira-Dasilva AM, Hathaway O, Stylianou M, Moss J. Changes in lung function and chylous effusions in patients with lymphangiomyomatosis treated with sirolimus. *Ann Intern Med.* 2011;154(12):797–805.

62. Barrera P, Simons SO, Wessels MJC, Heijdra YF. Efficacy of sirolimus therapy for chylous effusions in lymphangioleiomyomatosis. *Ann Am Thorac Soc*. 2013;10(4):408–9.
63. Bee J, Fuller S, Miller S, Johnson SR. Lung function response and side effects to rapamycin for lymphangioleiomyomatosis: a prospective national cohort study. *Thorax*. 2018;73(4):369–75.
64. Ando K, Kurihara M, Kataoka H, Ueyama M, Togo S, Sato T, et al. Efficacy and safety of low-dose sirolimus for treatment of lymphangioleiomyomatosis. *Respir Investig*. 2013;51(3):175–83.
65. Yoon HY, Hwang JJ, Kim DS, Song JW. Efficacy and safety of low-dose Sirolimus in Lymphangioleiomyomatosis. *Orphanet J Rare Dis*. 2018;13(1).
66. Takada T, Mikami A, Kitamura N, Seyama K, Inoue Y, Nagai K, et al. Efficacy and safety of long-term sirolimus therapy for asian patients with lymphangioleiomyomatosis. *Ann Am Thorac Soc*. 2016;13(11):1912–22.
67. Hu S, Wu X, Xu W, Tian X, Yang Y, Wang ST, et al. Long-term efficacy and safety of sirolimus therapy in patients with lymphangioleiomyomatosis. *Orphanet J Rare Dis*. 2019;14(1):1–7.
68. Yusen RD, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Dipchand AI, Goldfarb S, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-second Official Adult Heart Transplantation Report - 2015; Focus Theme: Early Graft Failure. *J Heart Lung Transplant*. 2015;34(10):1264–77.
69. Reynaud-Gatibert M, Mornex J-F, Mal H, Treilhaud M, Dromer C, Queant S, et al. Lung transplantation for lymphangioleiomyomatosis: The French experience. *Transplantation*. 2008;86(4):515–20.
70. Khawar MU, Yazdani D, Zhu Z, Jandarov R, Dilling DF, Gupta N. Clinical outcomes and survival following lung transplantation in patients with lymphangioleiomyomatosis. *J Heart Lung Transplant*. 2019;38(9):949–55.
71. Almoosa KF, Ryu JH, Mendez J, Huggins JT, Young LR, Sullivan EJ, et al. Management of pneumothorax in lymphangioleiomyomatosis: effects on recurrence and lung transplantation complications. *Chest*. 2006;129(5):1274–81.
72. Araujo MS, Baldi BG, Freitas CSG, Albuquerque ALP, Da Silva CCBM, Kairalla RA, et al. Pulmonary rehabilitation in lymphangioleiomyomatosis: a controlled clinical trial. *Eur Respir J*. 2016;47(5):1452–60.
73. Graham BL, Steenbruggen I, Barjaktarevic IZ, Cooper BG, Hall GL, Hallstrand TS, et al. Standardization of spirometry 2019 update an official American Thoracic Society and European Respiratory Society technical statement. Vol. 200, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. American Thoracic Society; 2019. p. E70–88.
74. Avila NA, Dwyer AJ, Rabel A, Moss J. Sporadic lymphangioleiomyomatosis and tuberous sclerosis complex with lymphangioleiomyomatosis: comparison of CT features. *Radiology*. 2007;242(1):277–85.
75. Yao J, Taveira-DaSilva AM, Jones AM, Julien-Williams P, Stylianou M, Moss J. Sustained effects of sirolimus on lung function and cystic lung lesions in lymphangioleiomyomatosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;190(11):1273–82.

76. Davies DM, De Vries PJ, Johnson SR, McCartney DL, Cox JA, Serra AL, et al. Sirolimus therapy for angiomyolipoma in tuberous sclerosis and sporadic lymphangiomyomatosis: A phase 2 trial. *Clin Cancer Res*. 2011;17(12):4071–81.
77. Kumasaka T, Seyama K, Mitani K, Souma S, Kashiwagi S, Hebisawa A, et al. Lymphangiogenesis-mediated shedding of LAM cell clusters as a mechanism for dissemination in lymphangiomyomatosis. *Am J Surg Pathol*. 2005;29(10):1356–66.
78. Guo M, Yu JJ, Perl AK, Wikenheiser-Brokamp KA, Riccetti M, Zhang EY, et al. Single-cell transcriptomic analysis identifies a unique pulmonary lymphangiomyomatosis cell. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020;202(10):1373–87.
79. Khokha R, Murthy A, Weiss A. Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(9):649–65.
80. Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(12):786–801.
81. Maher TM, Oballa E, Simpson JK, Porte J, Habgood A, Fahy WA, et al. An epithelial biomarker signature for idiopathic pulmonary fibrosis: an analysis from the multicentre PROFILE cohort study. *Lancet Respir Med*. 2017;5(12):946–55.
82. Todd JL, Vinisko R, Liu Y, Neely ML, Overton R, Flaherty KR, et al. Circulating matrix metalloproteinases and tissue metalloproteinase inhibitors in patients with idiopathic pulmonary fibrosis in the multicenter IPF-PRO Registry cohort. *BMC Pulm Med*. 2020;20(1):1–12.
83. Ko FWS, Diba C, Roth M, McKay K, Johnson PRA, Salome C, et al. A Comparison of Airway and Serum Matrix Metalloproteinase-9 Activity Among Normal Subjects, Asthmatic Patients, and Patients With Asthmatic Mucus Hypersecretion. *Chest*. 2005;127(6):1919–27.
84. Mao JT, Tashkin DP, Belloni PN, Baileyhealy I, Baratelli F, Roth MD. All-trans Retinoic Acid Modulates the Balance of Matrix Metalloproteinase-9 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 in Patients With Emphysema. *Chest*. 2003;124(5):1724–32.
85. Abdel-Hamid NM, Abass SA. Matrix metalloproteinase contribution in management of cancer proliferation, metastasis and drug targeting. *Mol Biol Reports* 2021 489. 2021;48(9):6525–38.
86. Hayashi T, Fleming M V., Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Moss J, Ferrans VJ, et al. Immunohistochemical study of matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs) in pulmonary lymphangiomyomatosis (LAM). *Hum Pathol*. 1997;28(9):1071–8.
87. Chang WYC, Cane JL, Blakey JD, Kumaran M, Pointon KS, Johnson SR. Clinical utility of diagnostic guidelines and putative biomarkers in lymphangiomyomatosis. *Respir Res*. 2012;13:34.
88. Seyama K, Kumasaka T, Souma S, Sato T, Kurihara M, Mitani K, et al. Vascular Endothelial Growth Factor-D Is Increased in Serum of Patients with Lymphangiomyomatosis. *Lymphat Res Biol*. 2006;4(3):143–52.
89. Hirose M, Matsumuro A, Arai T, Sugimoto C, Akira M, Kitaichi M, et al. Serum vascular endothelial growth factor-D as a diagnostic and therapeutic biomarker for lymphangiomyomatosis. *PLoS One*. 2019;14(2).





# Anexos





## 11.1. ANEXO I: PUBLICACIONES

### 11.1.1. Artículo 1

#### Long-term results of sirolimus treatment in lymphangioleiomyomatosis: a single referral centre experience

Revilla-López E, Berastegui C, Méndez A, Sáez-Giménez B, Ruiz de Miguel V, López-Meseguer M, Monforte V, Bravo C, Pujana MA, Ramon MA, Gómez-Ollés S, Roman A; Vall d'Hebron Multidisciplinary Cystic Lung Disease Group. Long-term results of sirolimus treatment in lymphangioleiomyomatosis: a single referral centre experience. *Sci Rep.* 2021;11(1):10171.

www.nature.com/scientificreports

## scientific reports

 Check for updates

### OPEN Long-term results of sirolimus treatment in lymphangioleiomyomatosis: a single referral centre experience

Eva Revilla-López<sup>1</sup>, Cristina Berastegui<sup>1</sup>, Alejandra Méndez<sup>1</sup>, Berta Sáez-Giménez<sup>1</sup>, Victoria Ruiz de Miguel<sup>1</sup>, Manuel López-Meseguer<sup>1</sup>, Víctor Monforte<sup>1,2</sup>, Carlos Bravo<sup>1,2</sup>, Miguel Angel Pujana<sup>3</sup>, Maria Antonia Ramon<sup>1</sup>, Susana Gómez-Ollés<sup>1,2,3</sup>, Antonio Roman<sup>1,2</sup> & The Vall d'Hebron Multidisciplinary Cystic Lung Disease Group\*

There are few published data on long-term treatment with sirolimus in lymphangioleiomyomatosis (LAM). The objective of this study was to describe the long-term effect of sirolimus in a series of LAM patients followed up in a referral centre, focusing on pulmonary function. We retrospectively reviewed a series of 48 patients with LAM diagnosed, followed up and treated with sirolimus in a single centre. Response to sirolimus was evaluated at 1 and 5 years. A negative sirolimus response was defined as an FEV<sub>1</sub> decline greater than -75 ml/year. A mixed-effects model was used to estimate the longitudinal changes in FEV<sub>1</sub> (average slope), both as absolute (ml/year) and as predicted values (%predicted/year). From a total of 48 patients, 9 patients underwent lung transplantation and 4 died during the study. Mean (95% CI) FEV<sub>1</sub> slope over 5 years was -0.14 (-26.13 to 25.85) ml/year in the whole LAM group, 42.55 (14.87 to 70.22) ml/year in the responder group, -54.00 (-71.60 to -36.39) ml/year in the partial responder group and -84.19 (-113.5 to -54.0) ml/year in the non-responder group. After 5 years of sirolimus treatment 59% had a positive response, 30% had a partial response and 11% had a negative response. Our study found that sirolimus treatment had a positive long-term effect on most LAM patients.

Lymphangioleiomyomatosis (LAM) is a rare, slowly progressive disease characterized by the proliferation of abnormal smooth muscle-like cells named LAM cells<sup>1</sup>. This cell proliferation is associated with cystic lung disease, chylous fluid accumulations and abdominal angiomyolipomas and lymphangioleiomyomas<sup>2</sup>. LAM affects almost exclusively adult women and occurs sporadically (S-LAM) or in association with the tuberous sclerosis complex (TSC-LAM). TSC-LAM is caused by mutations in two tumour suppressor genes: *TSC1* and *TSC2*, with consequent loss of function of hamartin and tuberin proteins, respectively<sup>3,4</sup>. S-LAM, by contrast, is not hereditary. Recently, a genome-wide association study was performed and the data suggested that NR2F2 expression may have a role in S-LAM<sup>5</sup>.

In recent years, mTOR inhibitors have emerged as a therapeutic option for LAM. Before 2011, multiple non-evidence-based medical treatments were described, such as hormonal manipulation, oophorectomy or tamoxifen<sup>6,7</sup>, and most eligible LAM patients who developed respiratory failure were referred for lung transplant (LT). After 2011, with the publication of the Multicentre International LAM Efficacy of Sirolimus (MILES) trial<sup>8</sup> and its approval by the *Food and Drug Administration* in 2015, sirolimus was introduced as the first effective treatment in these patients. However, long-term results of sirolimus treatment are scarce<sup>9</sup>.

Our institution developed the first lung transplant program in Spain in 1990. The programme receives national patient referrals with LAM: this provided an impetus to adopt the most recent advances in LAM treatment.

<sup>1</sup>Lung Transplant Program, Department of Pulmonology, Departament de Medicina, Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Passeig Vall d'Hebron, 119-129, 08035 Barcelona, Spain. <sup>2</sup>CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. <sup>3</sup>Program Against Cancer Therapeutic Resistance (ProCURE), Breast Cancer and Systems Biology, Catalan Institute of Oncology (ICO), Bellvitge Institute for Biomedical Research (IDIBELL), L'Hospitalet del Llobregat, Catalonia, Spain. \*A list of authors and their affiliations appears at the end of the paper. <sup>✉</sup>email: susana.go@vhir.org

Sirolimus was introduced, as an off-label use, in LAM patients in November 2007 following the publication of the first trial in renal angiomyolipomas<sup>10</sup>. The objective of the present study was to review the long-term effect of sirolimus in a series of LAM patients followed up in a referral centre, focusing on pulmonary function.

### Patients and clinical assessment

The study retrospectively included all patients with LAM diagnosed, treated with sirolimus and followed up in a tertiary referral centre from January 1990 to January 2020. Data compiled included clinical findings, diagnostic methods, treatment, lung function, presence of tuberous sclerosis and extrapulmonary involvement such as renal angiomyolipoma, pleural or abdominal complications. The Ethics Committee of the Vall d'Hebron University Hospital (Barcelona, Spain BSG-SIR-2019-01) approved the study. Informed consent was waived due to retrospective nature of the study by The Ethics Committee of the Vall d'Hebron University Hospital. All methods in this study were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations.

Pulmonary function tests were performed according to European Respiratory Society guidelines<sup>11</sup>. All FEV<sub>1</sub> values in our study were obtained without bronchodilators. Patients with LAM underwent spirometric variables and diffusing capacity -at baseline, 1 year, 2 years, 3 years, 4 years and 5 years. Thoracic and abdominal CT scan were performed in all patients. Lung biopsy was performed only in patients with exclusive pulmonary involvement; biopsy was generally avoided if patients had lung cysts associated with renal angiomyolipomas.

Time to event was calculated as the number of years between sirolimus initiation to the date of lung transplantation or date of death, whichever came first.

Patients were classified into two cohorts according to the availability of sirolimus at diagnosis: a historical sirolimus cohort (HSC) of patients for whom sirolimus was not available at diagnosis but who received the drug after 2007 and a contemporary cohort (CC), in whom sirolimus was started immediately after the diagnosis.

**Sirolimus treatment.** From November 2007, sirolimus was indicated in the case of FEV<sub>1</sub> < 80%, angiomyolipoma bigger than 4 cm of diameter or multiple angiomyolipomas. Sirolimus was prescribed at a dose between 1 and 4 mg once daily adjusted to obtain target trough blood levels between 5 and 15 ng/ml measured with liquid chromatography-mass spectrometry. Adverse effects and drug interactions were also recorded.

We defined the sirolimus response based on the rate of FEV<sub>1</sub> decline in LAM patients without specific treatment, which has been reported as -75 ml/year<sup>12</sup>. Age-related physiological decline in healthy adults under 60 years old has been reported to be around -20 ml/year<sup>13-15</sup>. Consequently, improvement, stabilization or loss of FEV<sub>1</sub> similar to the physiological decline was considered a positive response to sirolimus. Patients who had an FEV<sub>1</sub> decline rate between -20 and -75 ml/year were considered partial responders. Non-responders had an FEV<sub>1</sub> decline greater than -75 ml/year. Sirolimus response was assessed at 1 year and long-term response at 5 years. Patients who underwent LT before completing 1 or 5 years of sirolimus treatment were not included in the respective analysis.

Angiomyolipomas' shrinkage rate was calculated as the change in maximum diameter after 1 year of sirolimus treatment. Patients with a decrease or stabilization in angiomyolipoma size were considered responders.

**Statistical analysis.** Mixed-effect models were used to estimate the longitudinal changes in FEV<sub>1</sub> (average slope), both as absolute (ml/year) and as predicted values (%predicted/year). In these analyses, time was entered as a random effect. We then categorised individuals into three groups: (1) responders (if the individualised estimate was less than -20 ml/year), (2) partial responders (if the individualised estimate was between -20 and -75 ml/year); and (3) non-responders (if the individualised estimate was greater than -75 ml/year). Qualitative data are expressed as frequencies and percentages. Normally-distributed quantitative data are expressed as mean ± SD; non-normally-distributed data are expressed as median and interquartile range (IQR). The demographic and clinical characteristics of the HSC and CC were compared using ANOVA or chi-square test, as appropriate. Pulmonary function tests (PFT) of non-responders, partial responders and responders to sirolimus were compared using the Mann Whitney test. Time from sirolimus initiation to death/transplantation was assessed using Kaplan-Meier curves. Cox regression analysis was used to compare HSC and CC. The 95% CI was obtained from the mean estimates. A *p*-value < 0.05 was considered statistically significant. Data were analysed using STATA version 14 (StataCorp, College Station, TX, USA) and SPSS version 27 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

### Results

Forty-eight LAM patients diagnosed and followed-up in our outpatient clinic and treated with sirolimus were recruited: 19 (40%) patients correspond to HSC and 29 (60%) to CC. Four (8.3%) of them had LAM associated with TSC. The median age at onset of symptoms and at diagnosis was 36 (30-44) and 38 (34-46) years, respectively. Thirty-nine (81%) patients were pre-menopausal at diagnosis and 9 (19%) were post-menopausal. Three (6%) patients were smokers at diagnosis and 14 (29%) were ex-smokers. Dyspnoea was the most common presenting symptom in 17 (35%) patients followed by pneumothorax in 15 (31%) patients. Mean FEV<sub>1</sub> at diagnosis was 68 ± 26% of the predicted. On thoracic CT, all patients had multiple cystic images with bilateral distribution, predominantly in the middle and lower lobes. The method of diagnosis was surgical lung biopsy in 28 (58%) patients, clinicoradiological findings in 12 (25%) and transbronchial cryobiopsy in 8 (17%). Three (6%) diagnoses were incidental in asymptomatic patients.

The mean duration of follow-up was 11.7 ± 6.9 years from diagnosis and mean time of sirolimus treatment was 5.6 ± 3.5 years. During follow-up, the most common pleural complications were pneumothorax, which occurred in 8 (17%) patients, chylous effusion in 4 (8%), and transudative pleural effusion in 3 (6%). Nineteen (40%) patients needed chemical pleurodesis and 2 (4%) needed thoracic duct ligation. Twenty (42%) patients

	Historical sirolimus cohort n = 19	Contemporary cohort n = 29	p-value
<b>Age at diagnosis (years), median (IQR)</b>	35 (29–38)	43 (36–46)	0.014
<b>Initial symptom, n (%)</b>			0.773
Dyspnoea	7 (37)	10 (34)	
Pneumothorax	7 (37)	8 (28)	
Haemoptysis	2 (11)	2 (7)	
Chylothorax	1 (5)	4 (14)	
Asymptomatic	1 (5)	2 (7)	
Cough	0 (0)	1 (3)	
Abdominal pain	0 (0)	2 (7)	
Pleuritic chest pain	1 (5)	0 (0)	
<b>Diagnostic method, n (%)</b>			0.042
Surgical lung biopsy	13 (68)	15 (52)	
Clinicoradiological	6 (32)	6 (21)	
Transbronchial cryobiopsy	0 (0)	8 (28)	
<b>PFT at diagnosis, mean (SD) median (IQR)</b>			
FVC, ml	2651 (1037) 2890 (1820–3130)	3063 (841) 3070 (2320–3850)	0.137
FVC, % pred	74 (27) 77 (55–91)	80 (20) 81 (69–98)	0.375
FEV <sub>1</sub> , ml	1638 (901) 1610 (740–2300)	2186 (760) 2070 (1670–2770)	0.028
FEV <sub>1</sub> , % pred	57 (28) 59 (30–81)	76 (22) 77 (62–94)	0.009
DL <sub>CO</sub> , %	42 (21) 42 (21–63)	60 (21) 52 (46–79)	0.010
<b>Suppl. oxygen use, n (%)</b>	8 (42)	4 (14)	0.027
<b>Associated TSC, n (%)</b>	3 (16)	1 (3)	0.130
<b>AML, n (%)</b>	12 (63)	8 (28)	0.015
<b>Pneumothorax during follow-up</b>			0.025
Number pneumothorax/n patients	21/6	2/2	
<b>Chylothorax during follow-up</b>			0.130
Number chylothorax/n patients	4/3	1/1	
<b>Chemical pleurodesis</b>	11 (58)	8 (28)	0.044
<b>Thoracic duct ligation</b>	0 (0)	2 (7)	0.242
<b>Follow-up (years), median (IQR)</b>	17 (14–22)	8 (5–10)	<0.001
<b>LT, n (%)</b>	8 (42)	1 (3)	<0.001
<b>Death, n (%)</b>	3 (16)	1 (3)	0.130

**Table 1.** Comparison between historical sirolimus cohort (sirolimus not available at diagnosis) and contemporary cohort. *IQR* interquartile range, *SD* standard deviation, *PFT* pulmonary function test, *TSC* tuberous sclerosis complex, *AML* angiomylipoma, *LT* lung transplantation.

had renal angiomylipoma; 2 of them required embolization and 2 underwent surgery. Other extrapulmonary complications included 5 (10%) cases of abdominal lymphangioliomyomas.

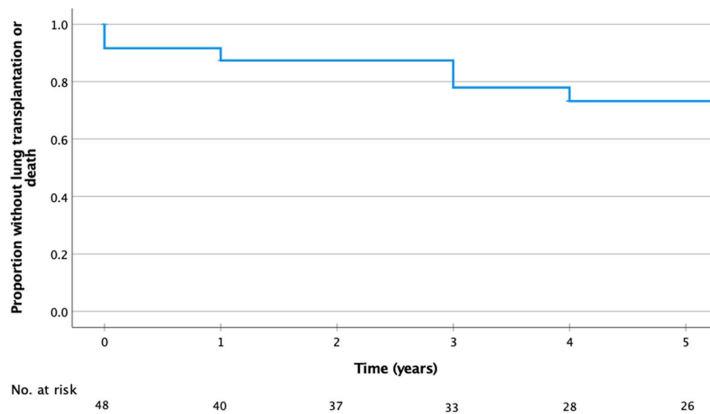
From the study cohort of 48 patients, 9 (19%) patients underwent lung transplantation (LT). These patients were treated with sirolimus before the LT for a median time of 18 (7–42) months. Pre-sirolimus spirometry demonstrated severe obstruction: mean FVC was  $47 \pm 15\%$  pred., FEV<sub>1</sub> was  $26 \pm 9\%$  pred. and FEV<sub>1</sub>/FVC ratio was  $45 \pm 11\%$ . Pre-LT spirometry showed a mean FVC of  $44 \pm 18\%$ , FEV<sub>1</sub> of  $30 \pm 15\%$  and FEV<sub>1</sub>/FVC ratio of  $43 \pm 10\%$ . After LT, patients received tacrolimus, mycophenolate mofetil and steroids as immunosuppression according to the lung transplant unit protocol.

During the study period, 4 (8%) patients died, only one of them had received LT and died from an acute cellular rejection. The other causes of death were respiratory failure, renal failure and cholangiocarcinoma. A comparison between the HSC and CC is presented in Table 1.

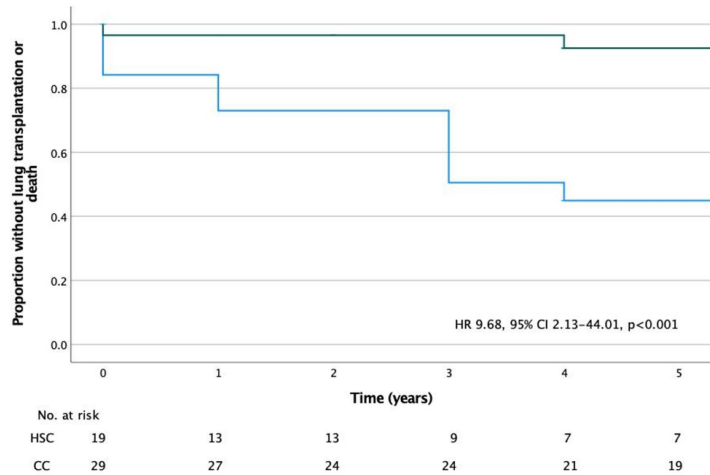
Survival rates free from death and/or transplantation at 1- and 5-years after sirolimus initiation were 87% and 73% respectively (Fig. 1).

HSC patients presented a significantly higher long-term risk of death and/or LT compared to CC (Fig. 2).

**Sirolimus treatment.** From November 2007, 48 patients with LAM were treated at our hospital with sirolimus. Twenty-eight (58%) patients initiated sirolimus because of FEV<sub>1</sub> < 80%, 4 (8%) because of AML and 16 (33%) because of both. Mean sirolimus dose was  $2.2 \pm 0.8$  mg and mean blood trough levels were  $7.5 \pm 2.7$  ng/ml.



**Figure 1.** Kaplan–Meier survival curve free from death/transplantation from the time of sirolimus initiation. Mean time of sirolimus treatment was  $5.6 \pm 3.5$  years.

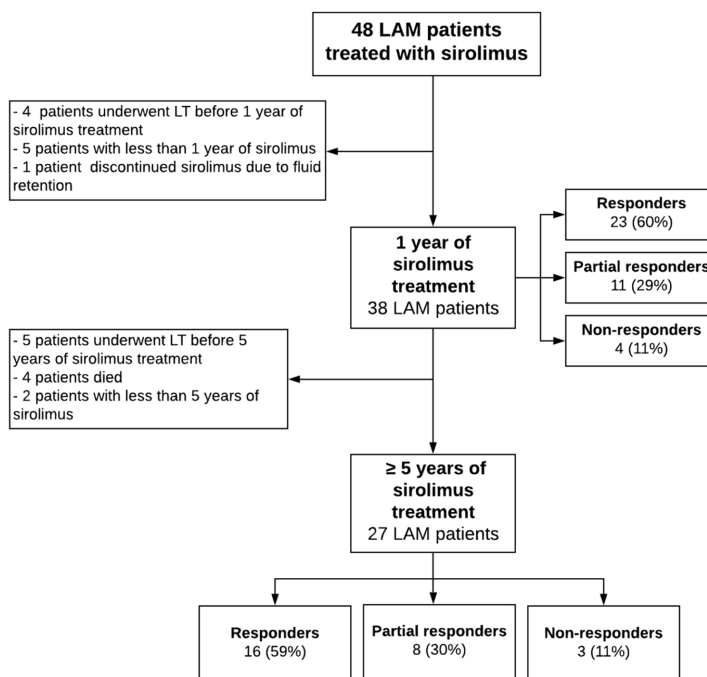


**Figure 2.** Kaplan Meier survival curve free from death/transplantation from the time of sirolimus initiation. HSC (blue) and CC (green).

Of note, only one patient from the HSC developed pneumothorax under sirolimus treatment, while the others developed this complication before they started treatment. No patients developed chylothorax under sirolimus treatment (1 patient from the CC experienced the complication before initiating treatment).

In the HSC, the median time between onset of symptoms and starting sirolimus was 12 (4–15) years. In the CC, the median time from the onset of symptoms to starting sirolimus was 1 (0–3) years. The mean spirometry values before sirolimus in the HSC and CC were: FVC  $62 \pm 25\%$  pred. versus  $84 \pm 21\%$  pred respectively ( $p = 0.002$ ), FEV<sub>1</sub>  $41 \pm 21\%$  pred. versus  $74 \pm 22\%$  pred. ( $p < 0.001$ ), DL<sub>CO</sub>  $40 \pm 22\%$  versus  $55 \pm 17\%$  ( $p = 0.228$ ).

**Safety.** Side effects were recorded in 16 (33%) patients and tended to occur shortly after starting treatment and decrease over time. The most common side effect was oral aphthous ulcers in 8 (17%), ovarian cysts in 3 (6%), severe increase in serum cholesterol in 2 (4%), liver enzyme abnormalities in 2 (4%), anasarca in 1 (2%) and leg



**Figure 3.** Response to sirolimus after 1 and 5 years of treatment.

swelling in 1 (2%). Only 1 patient discontinued sirolimus treatment due to fluid retention and in 3 cases sirolimus was temporarily withdrawn due to oral aphthous ulcers.

**Efficacy.** At the end of the study, of 48 sirolimus-treated patients, 38 (79%) had had treatment for 1 year and 27 (56%) had had a minimum of 5 years' treatment (Fig. 3).

After 1 year, a positive response to sirolimus was observed in 23 (60%) patients and a partial response in 11 (29%) (Fig. 3). Long-term efficacy of sirolimus was studied in 27 patients who had received 5 years or more of sirolimus treatment: 59% were responders, 30% were partial responders and 11% non-responders. There were no differences in FVC, FEV<sub>1</sub> or DL<sub>CO</sub> at diagnosis or before sirolimus treatment between responders, partial responders and non-responders; see Table 2. However, significant differences were observed in FEV<sub>1</sub> after 5-years of sirolimus treatment having non-responders lower values.

Of note, from the responders group, four patients developed chylothorax and only one patient was treated by pleurodesis before sirolimus was initiated. In the other 3 patients, sirolimus was started due to the chylothorax.

Mean (95% CI) FEV<sub>1</sub> slope over 5 years was  $-0.14$  ( $-26.13$  to  $25.85$ ) ml/year in the whole LAM group,  $42.55$  ( $14.87$  to  $70.22$ ) ml/year in the responder group,  $-54.00$  ( $-71.60$  to  $-36.39$ ) ml/year in the partial responder group and  $-84.19$  ( $-113.5$  to  $-54.0$ ) ml/year in the non-responder group. When the 3 patients from the responder group in whom sirolimus was started due to chylothorax were excluded, the FEV<sub>1</sub> slope was  $28.48$  ( $9.05$ – $47.91$ ) ml/year. When using FEV<sub>1</sub> as percentage of predicted (%pred) values, mean (95% CI) FEV<sub>1</sub> slope over 5 years was  $0.43$  ( $-0.55$  to  $1.41$ ) %pred/year in the whole LAM group,  $2.17$  ( $1.25$  to  $3.09$ ) %pred/year in the responder group,  $-1.78$  ( $-2.50$  to  $-1.05$ ) %pred/year in the partial responder group and  $-2.96$  ( $-4.05$  to  $-1.87$ ) %pred/year in the non-responder group. Table 3 summarises the differences in FEV<sub>1</sub> at 1 year and 5 years and Fig. 4 shows the linear prediction of longitudinal changes in FEV<sub>1</sub> (ml).

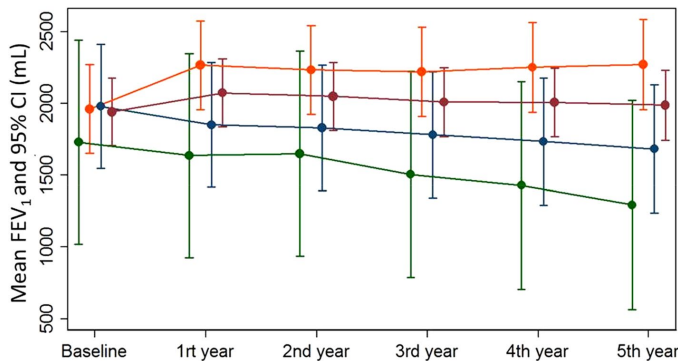
Eleven patients with angiomyolipoma were treated with sirolimus for at least one year. Table 4 shows angiomyolipoma sizes before and after 1 year of sirolimus treatment: 10 (91%) patients showed a response to treatment and only 1 (9%) had an increase in tumour size. During follow-up, no patient presented symptoms related to angiomyolipoma.

Response	Responders (n = 16)	Partial responders (n = 8)	Non-responders (n = 3)	p value
Age at diagnosis (years), mean (SD)	35 (6)	50 (8)	39 (5)	<0.01
Age at start of sirolimus (years), mean (SD)	38 (6)	50 (8)	42 (3)	0.001
Pregnancy before diagnosis, n (%)	9 (31)	4 (50)	3 (67)	0.300
Post-menopausal at sirolimus initiation, n (%)	2 (13)	5 (63)	0 (0)	0.017
Pneumothorax, n (%)	10 (63)	3 (38)	2 (67)	0.468
Chylothorax, n (%)	4 (25)	0 (0)	0 (0)	0.199
Pleurodesis, n (%)	8 (50)	2 (25)	1 (33)	0.483
FVC (ml), mean (SD) before sirolimus	2959 (825)	2854 (521)	3187 (479)	0.794
FEV <sub>1</sub> (ml), mean (SD) before sirolimus	1961 (632)	1980 (602)	1730 (789)	0.831
DL <sub>CO</sub> (%), mean (SD) before sirolimus	52 (14)	52 (16)	38 (24)	0.411
Mean sirolimus blood trough levels	8.2 (2.9)	6.6 (2.7)	7.1 (1.1)	0.374

**Table 2.** Patient’s characteristics according to sirolimus response at 5 years. IQR interquartile range, SD standard deviation.

	All (n = 27)	Responders (n = 16)	Partial responders (n = 8)	Non-responders (n = 3)	p value
Pre-sirolimus FEV <sub>1</sub> , ml	1941 (1704–2177)	1961 (1653–2268)	1980 (1545–2414)	1730 (1020–2440)	0.831
FEV <sub>1</sub> at 1 year, ml	2073 (1836–2310)	2266 (1959–2574)	1851 (1416–2286)	1637 (926–2347)	0.185
FEV <sub>1</sub> at 2-year, ml	2050 (1812–2287)	2234 (1925–2542)	1831 (1395–2268)	1650 (937–2363)	0.272
FEV <sub>1</sub> at 3-year, ml	2010 (1771–2249)	2219 (1909–2530)	1781 (1342–2220)	1507 (789–2223)	0.180
FEV <sub>1</sub> at 4-year, ml	2007 (1766–2247)	2251 (1939–2564)	1734 (1292–2176)	1430 (708–2152)	0.092
FEV <sub>1</sub> at 5-year, ml	1988 (1745–2231)	2271 (1955–2586)	1683 (1236–2129)	1293 (564–2022)	0.041

**Table 3.** FEV<sub>1</sub> response to sirolimus in 27 patients treated with sirolimus for 5 years. Data are shown as Mean (95% CI).



**Figure 4.** Linear prediction of longitudinal changes in FEV<sub>1</sub> (ml) and predictive margins with 95% CI using mixed effect models, in all patients (red), responders (yellow), partial responders (blue) and non-responders (green).

Patients	Number of AML	AML size before sirolimus treatment (cm)	AML size after 1-year of sirolimus (cm)	FEV <sub>1</sub> difference at 1-year of sirolimus treatment (ml)	Shrinkage rate (%)
LAM-1	1	13.5×7.8	4.2×1.5	-280	-69
LAM-2	3	2×1.5 2×2 1.6×7	2×1.5 2×2 1.6×7	320	0
LAM-3	1	2×1	2×1	40	0
LAM-4*	3	5×2 2.1×1 1×0.5	6.2×3.3 2.1×1 1×0.5	230	24
LAM-5	1	0.4×0.5	0.4×0.5	130	0
LAM-6	2	1×1	1×1	660	0
LAM-7	1	5.5×3.5	4.2×2.7	40	-23
LAM-8	1	0.5×0.5	0.5×0.5	-30	0
LAM-9	2	2.6×1 2×1	2.6×1 2×1	140	0
LAM-10	1	2×1.6	2×1.6	90	0
LAM-11	1	6.6×4.5	3.3×3.7	20	-50

**Table 4.** Angiomyolipomas' shrinkage rate at 1 year. AML angiomyolipoma. \*TSC-LAM.

## Discussion

There are few data on long-term pulmonary function results in LAM patients receiving sirolimus. The main finding from this study was that 59% of sirolimus-treated patients were considered responders because they had a sustained spirometric improvement after 5 years of treatment. The MILES trial found that the FEV<sub>1</sub> slope in the sirolimus group gained  $1 \pm 2$  ml per month during the first year of treatment<sup>8</sup>. Although this difference was statistically significant between sirolimus and placebo groups, a substantial number of patients receiving sirolimus treatment had a decrease in FEV<sub>1</sub> during this period. One recent Japanese series of 63 patients treated with sirolimus for 2 years showed an FEV<sub>1</sub> decline rate of between 0.67 and 2.09 ml per month but did not differentiate between responders and non-responders<sup>16</sup>. One study that reported long-term effects of sirolimus in 12 patients found differences in FEV<sub>1</sub> before and after treatment of  $-55 \pm 7$  ml and  $-5 \pm 12$  ml per year, respectively, with a follow-up time of 4.6 years on sirolimus<sup>9</sup>. A Chinese study which evaluated long-term sirolimus effect in 32 patients also found stabilization of pulmonary function after 4 years of sirolimus treatment<sup>17</sup>. It is clear that some patients treated with sirolimus do not respond to treatment and continue to lose lung function<sup>18</sup>. In the present series, 59% of sirolimus-treated patients were considered responders because had a mean FEV<sub>1</sub> slope over 5 years of 42 ml/year vs a mean FEV<sub>1</sub> slope of  $-54$  ml/year in the partial responders vs  $-84$  ml/year in the non-responders. We have also assessed the change of FEV<sub>1</sub>% predictive increasing in mean 2.17% in responders and dropping 2.96% in non-responders per year. In summary, of those treated for 5-years sirolimus treatment led to a clear improvement in lung function in half of the patients and had a modest effect in another 30%. Only 11% of sirolimus-treated patients had no improvement in FEV<sub>1</sub>.

Another relevant aspect is the potential role of sirolimus as a preventive treatment of pleural complications. The present study supports the idea that sirolimus may have some preventive effect against pneumothorax and, probably, chylothorax. Intuitively, it could be that chylothorax disappearances after sirolimus treatment might be the cause of pulmonary function improvement in those patients with chylothorax. But, chylothorax improvement is in fact secondary to sirolimus treatment. This good response of patients with chylothorax to sirolimus treatment had also been observed by Takada and colleagues<sup>16</sup>.

In the present series, only 9 patients treated with sirolimus were submitted to LT. The role of LT for LAM patients has evolved over time. During the 1980s, 1990s and early 2000s, the only choice for LAM patients with respiratory failure was LT, and LAM was a rare indication for LT<sup>19</sup>. In our series with more than 1100 LTs, LAM represents 2.5% of the total LT caseload. There was only one LAM patient who received LT and belong to CC.

The differences between the HSC and the CC, could be explained by several factors. Although the introduction of sirolimus in the treatment of LAM seems the likely main cause of these differences, other factors such as increased knowledge and interest in LAM in recent years, the development of a specialist referral centre, and earlier diagnosis with higher functional reserve could explain the better results in the CC cohort. All these factors are likely to have influenced the overall improved survival in LAM patients in the last decade and the current perception that LT in LAM will become anecdotal. Perhaps, though, this scenario is somewhat optimistic: we must add a note of caution as our data showed that sirolimus had no effect in 11% of patients with LAM at 5-years.

We observed a positive effect in most cases of angiomyolipoma after one year of treatment, but no effect in 9%. These results are in line with the study published by Bissler et al. that reported no effect in 20% of cases<sup>10</sup>. Also, we found that more than half of the patients who had a positive response in terms of reduction and stabilization of angiomyolipomas had a positive pulmonary functional response. Bissler and colleagues reported the same effect in 7 out of 11 patients who had PFT data at 1 year of sirolimus treatment. Davies et al. also reported, in 12 patients, a 50% decrease in angiomyolipoma size without a significant improvement in lung function during sirolimus therapy. None of the authors reported any data on a correlation between angiomyolipoma and pulmonary function response<sup>10,20</sup>.



Regarding safety, we recorded side effects in 33% of patients, mainly mild or moderate, and only 1 patient discontinued sirolimus due to side effects. Other authors observed the same spectrum of side effects but in 50% to 59% of patients<sup>16,21</sup>. We did not observe any cases of pneumonitis, something that has previously been described<sup>21</sup>. One of the reasons for these differences could be the retrospective design of our study in contrast with other prospective studies<sup>16,21</sup>. However, we consider that all serious adverse events were reported and recorded.

The main limitation of the study is its retrospective, single-centre design. The number of LAM patients included in the study was conditioned by the rarity of the disease and covers an extended period of 30 years; this is a limitation for most LAM studies. The strengths include the homogeneity of the clinical care and criteria, as most patients were treated by the same team, who had extensive experience with mTOR inhibitors, LT, and the long-term follow-up of sirolimus-treated patients.

In conclusion, sirolimus treatment in LAM has a long-term positive or moderate effect in most patients. LT remains the treatment of choice in LAM patients with respiratory failure. Determining the long-term effects of sirolimus on survival, the mechanisms that preclude treatment response and identifying potential biomarkers are important future priorities.

Received: 12 May 2020; Accepted: 12 April 2021

Published online: 13 May 2021

## References

- Corrin, B., Liebow, A. A. & Friedman, P. J. Pulmonary lymphangiomyomatosis. A review. *Am. J. Pathol.* **79**, 348–382 (1975).
- Gupta, N. *et al.* Lymphangiomyomatosis diagnosis and management: high-resolution chest computed tomography, transbronchial lung biopsy, and pleural disease management an official American Thoracic Society/Japanese Respiratory Society Clinical Practice Guideline on behalf of. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **196**, 1337–1348 (2017).
- Carsillo, T., Astrinidis, A. & Henske, E. P. Mutations in the tuberous sclerosis complex gene TSC2 are a cause of sporadic pulmonary lymphangiomyomatosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 6085–6090 (2002).
- Sato, T. *et al.* Mutation analysis of the TSC1 and TSC2 genes in Japanese patients with pulmonary lymphangiomyomatosis. *J. Hum. Genet.* **47**, 20–28 (2002).
- Kim, W. *et al.* A genome-wide association study implicates NR2F2 in lymphangiomyomatosis pathogenesis. *Eur. Respir. J.* **53**, 1900329 (2019).
- Harari, S., Cassandro, R., Chiodini, J., Taveira-DaSilva, A. M. & Moss, J. Effect of a gonadotrophin-releasing hormone analogue on lung function in lymphangiomyomatosis. *Chest* **133**, 448–454 (2008).
- Tomasian, A., Greenberg, M. S. & Rumerman, H. Tamoxifen for lymphangiomyomatosis. *N. Engl. J. Med.* **306**, 745–746 (1981).
- McCormack, F. X. *et al.* Efficacy and safety of sirolimus in lymphangiomyomatosis. *N. Engl. J. Med.* **364**, 1595–1606 (2011).
- Yao, J. *et al.* Sustained effects of sirolimus on lung function and cystic lung lesions in lymphangiomyomatosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **190**, 1273–1282 (2014).
- Bissler, J. J. *et al.* Sirolimus for angiomyolipoma in tuberous sclerosis complex or lymphangiomyomatosis. *N. Engl. J. Med.* **358**, 140–151 (2008).
- Graham, B. L. *et al.* Standardization of spirometry 2019 update an official American Thoracic Society and European Respiratory Society technical statement. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **200**, E70–E88 (2019).
- Taveira-DaSilva, A. M., Stylianou, M. P., Hedin, C. J., Hathaway, O. & Moss, J. Decline in lung function in patients with lymphangiomyomatosis treated with or without progesterone. *Chest* **126**, 1867–1874 (2004).
- Brandstetter, R. & Kazemi, H. Aging and the respiratory system. *Med. Clin. N. Am.* **67**, 419–431 (1983).
- Janssens, J. P., Pache, J. C. & Nicod, L. P. Physiological changes in respiratory function associated with ageing. *Eur. Respir. J.* **13**, 197–205 (1999).
- Kubota, M. *et al.* Reference values for spirometry, including vital capacity, in Japanese adults calculated with the LMS method and compared with previous values. *Respir. Investig.* **52**, 242–250 (2014).
- Takada, T. *et al.* Efficacy and safety of long-term sirolimus therapy for asian patients with lymphangiomyomatosis. *Ann. Am. Thorac. Soc.* **13**, 1912–1922 (2016).
- Hu, S. *et al.* Long-term efficacy and safety of sirolimus therapy in patients with lymphangiomyomatosis. *Orphanet J. Rare Dis.* **14**, 1–7 (2019).
- Xu, K. F., Tian, X., Yang, Y. & Zhang, H. Rapamycin for lymphangiomyomatosis: optimal timing and optimal dosage. *Thorax* **73**, 308–310 (2018).
- Rossano, J. W. *et al.* The registry of the international society for heart and lung transplantation: nineteenth pediatric heart transplantation report—2016; focus theme: primary diagnostic indications for transplant. *J. Heart Lung Trans.* **35**, 1170–1184 (2016).
- Davies, D. M. *et al.* Sirolimus therapy for angiomyolipoma in tuberous sclerosis and sporadic lymphangiomyomatosis: a phase 2 trial. *Clin. Cancer Res.* **17**, 4071–4081 (2011).
- Bee, J., Fuller, S., Miller, S. & Johnson, S. R. Lung function response and side effects to rapamycin for lymphangiomyomatosis: a prospective national cohort study. *Thorax* **73**, 369–375 (2018).

## Author contributions

E.R.L.: researched and analysed the data and wrote the article. A.M.: participated in the data collection. C.B., B.S.G., V.R.M., M.L.M., V.M., C.B., M.A.P., A.R. and A.S.: critically reviewed the article. M.A.R.: analysed the data. S.G. and A.R.: designed the study.

## Funding

E.R.L. received a pre-doctoral Grant from the Spanish Society of Pulmonology and Thoracic Surgery.

## Competing interests

S.G.O. has been paid congress expenses by Teva and Actelion. The other authors have no conflicts of interest to disclose.

## Additional information

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to S.G.-O.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

### The Vall d'Hebron Multidisciplinary Cystic Lung Disease Group

Irene Bello<sup>4</sup>, Rosa Burgos<sup>5</sup>, Roser Escobar<sup>1</sup>, Carla Ferrándiz-Pulido<sup>6</sup>, Alba Gómez<sup>7</sup>, Esther Pallisa<sup>8</sup>, Gloria Palomares<sup>9</sup>, Sabina Salicrú<sup>10</sup>, Ana Lucía Sánchez Martínez<sup>8</sup>, Irene Sansano<sup>11</sup> & Joana Sellarés<sup>12</sup>

<sup>4</sup>Lung Transplant Unit, Department of Thoracic Surgery, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain. <sup>5</sup>Nutritional Support Unit, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain. <sup>6</sup>Department of Dermatology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain. <sup>7</sup>Physical Medicine and Rehabilitation Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain. <sup>8</sup>Department of Radiology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain. <sup>9</sup>Department of Psychiatry, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain. <sup>10</sup>Department of Obstetrics and Gynaecology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain. <sup>11</sup>Department of Pathology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain. <sup>12</sup>Nephrology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain.

## 11.1.2. Artículo 2

### Lymphangioleiomyomatosis: Searching for potential biomarkers

Revilla-López E, Ruiz de Miguel V, López-Meseguer M, Berastegui C, Boada-Pérez M, Mendoza-Valderrey A, Arjona-Peris M, Zapata-Ortega M, Monforte V, Bravo C, Roman A, Gómez-Ollés S, Sáez-Giménez B. Lymphangioleiomyomatosis: Searching for potential biomarkers. *Front Med (Lausanne)*. 2023;10:1079317.

 frontiers | Frontiers in Medicine

TYPE Original Research  
PUBLISHED 02 February 2023  
DOI 10.3389/fmed.2023.1079317



#### OPEN ACCESS

EDITED BY  
Jin Woo Song,  
Asan Medical Center, Republic of Korea

REVIEWED BY  
Elena Lesma,  
University of Milan, Italy  
Elzbieta Radzikowska,  
National Institute of Tuberculosis and Lung  
Diseases, Poland

\*CORRESPONDENCE  
Susana Gómez-Ollés  
✉ susana.go@whir.org

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

RECEIVED 25 October 2022  
ACCEPTED 16 January 2023  
PUBLISHED 02 February 2023

CITATION  
Revilla-López E, Ruiz de Miguel V,  
López-Meseguer M, Berastegui C,  
Boada-Pérez M, Mendoza-Valderrey A,  
Arjona-Peris M, Zapata-Ortega M, Monforte V,  
Bravo C, Roman A, Gómez-Ollés S and  
Sáez-Giménez B (2023)  
Lymphangioleiomyomatosis: Searching for  
potential biomarkers.  
*Front. Med.* 10:1079317.  
doi: 10.3389/fmed.2023.1079317

COPYRIGHT  
© 2023 Revilla-López, Ruiz de Miguel,  
López-Meseguer, Berastegui, Boada-Pérez,  
Mendoza-Valderrey, Arjona-Peris,  
Zapata-Ortega, Monforte, Bravo, Roman,  
Gómez-Ollés and Sáez-Giménez. This is an  
open-access article distributed under the terms  
of the [Creative Commons Attribution License  
\(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). 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.

## Lymphangioleiomyomatosis: Searching for potential biomarkers

Eva Revilla-López<sup>1,2</sup>, Victoria Ruiz de Miguel<sup>3</sup>,  
Manuel López-Meseguer<sup>1</sup>, Cristina Berastegui<sup>1</sup>,  
Meritxell Boada-Pérez<sup>3</sup>, Alberto Mendoza-Valderrey<sup>3</sup>,  
Marta Arjona-Peris<sup>1</sup>, Marta Zapata-Ortega<sup>1</sup>, Victor Monforte<sup>1,4</sup>,  
Carlos Bravo<sup>1,4</sup>, Antonio Roman<sup>1,4</sup>, Susana Gómez-Ollés<sup>2,3,4\*</sup> and  
Berta Sáez-Giménez<sup>1,2,5</sup>

<sup>1</sup>Lung Transplant Program, Department of Pulmonology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain, <sup>2</sup>Department of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, <sup>3</sup>Department of Pulmonology, Vall d'Hebron Institut de Recerca, Barcelona, Spain, <sup>4</sup>CIBER de Enfermedades Respiratorias, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, <sup>5</sup>Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

**Background:** Vascular endothelial growth factor-D (VEGF-D) is the most commonly used biomarker for diagnosing lymphangioleiomyomatosis (LAM). However, lung biopsy is often necessary as well; therefore, defining new biomarkers for LAM is crucial. The aim of this study was to describe the diagnostic accuracy of a variety of biomarkers.

**Methods:** We assessed 13 analytes in serum related to extracellular matrix remodeling, lymphatic involvement and angiogenesis in a cohort of patients with LAM, comparing them with patients with other cystic lung diseases (OCLD) and healthy women. A scoring method based on the cut-point of each VEGF-D and metalloproteinase-2 (MMP-2) was used to evaluate the diagnostic performance of the marker combination.

**Results:** A total of 97 subjects were recruited: 59 (61%) LAM patients, 18 (19%) OCLD patients, and 20 (20%) healthy female controls. MMP-2 was the only extracellular matrix remodeling biomarker able to differentiate LAM patients from OCLD and healthy patients. Serum MMP-2 was higher in LAM patients [median 578 (465–832) ng/ml] than in patients with OCLD and healthy controls [medians 360 (314–546) and 427 (365–513) ng/ml, respectively ( $p < 0.0001$ )]. The area under ROC curve (AUC) of MMP-2 was 0.785 and that of VEGF-D 0.815 ( $p = 0.6214$ ). The sensitivity/specificity profiles of each biomarker (54/92% for MMP-2, 59/95% for VEGF-D) yielded a composite score ( $-6.36 + 0.0059 \times \text{VEGF-D} + 0.0069 \times \text{MMP-2}$ ) with higher accuracy than each component alone (AUC 0.88 and sensitivity/specificity 79/87%).

**Conclusion:** Combining MMP-2 and VEGF-D may increase diagnostic accuracy for LAM.

#### KEYWORDS

lymphangioleiomyomatosis, biomarkers, serum, metalloproteinases, VEGF-D, diagnose

## 1. Introduction

Lymphangioliomyomatosis (LAM) is a rare multisystem disease that predominantly affects women and is characterized by the proliferation of abnormal smooth muscle-like cells named LAM cells (1). LAM is secondary to mutations in the tuberous sclerosis complex (TSC) genes, mainly TSC2, which cause the activation of the mammalian target of rapamycin (mTOR) complex (2). LAM cells proliferate in the lungs and the axial lymphatic system, but also invade the airways, pulmonary artery, diaphragm, aorta, and retroperitoneal fat tissue (3, 4).

Serum levels of vascular endothelial growth factor-D (VEGF-D), a ligand for the lymphatic growth-factor receptor VEGFR-3/Flt-4, are higher in most LAM patients than in healthy controls or in patients with other cystic lung diseases (OCLD) (5, 6). It has been suggested that a VEGF-D level of  $> 800$  pg/ml and the presence of pulmonary cysts is diagnostic for LAM (7). However, a VEGF-D level of  $< 800$  pg/ml does not rule out the diagnosis (6). A wide range of VEGF-D levels has been described (8); they are higher in patients with lymphatic disease who develop chylous pleural effusion or ascites than in those without lymphatic involvement, which may explain these findings (9), although the variability may also be due to the differences in the assay kits used and in the access to standardized tests (10). Even though the diagnostic value of VEGF-D is well established, its clinical utility to monitor follow-up and treatment response is not clear (11). Therefore, the search for new LAM biomarkers continues.

In addition to lymphatic involvement, extracellular matrix remodeling, and angiogenesis in LAM (12), other biomarkers may be related to these biological processes. Matrix metalloproteinases (MMP) are a family of endopeptidases involved not only in extracellular matrix degradation but also in cell proliferation, differentiation, cell signaling, and migration (13). Associations between MMP and destructive lesions caused by LAM have been demonstrated (14) and elevated MMP-2, MMP-7, and MMP-9 levels have been observed in serum of LAM patients (15–17). However, these studies only compared LAM patients with healthy controls.

Angiopoietin-1, endostatin, fibroblast growth factor-acidic (FGF-acidic), phosphatidylinositol-glycan biosynthesis class F protein (PIGF), thrombospondin-2 and platelet derived growth factor-AA protein (PDGF-AA) are biomarkers associated with angiogenesis. Little information is available on these biomarkers in LAM; only one study has reported higher levels of endostatin with LAM associated with TSC than in patients with sporadic LAM (S-LAM) and healthy volunteers (18). Von Willebrand factor (vWF) is a protein associated with angiogenesis (19) and is reduced in LAM patients compared to healthy controls (20). Cancer antigen-125 (CA-125) and Krebs von den Lungen 6 (KL-6) are also related to LAM: CA-125 levels have been associated with pleural effusions and reduced pulmonary function (21) and KL-6 levels are higher than in other lung diseases (22).

Thus, the objective of the present study was to describe the diagnostic accuracy of a range of biomarkers in a cohort of

LAM patients compared to patients with other cystic diseases and healthy volunteers.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Subjects and clinical data

A cross-sectional study was conducted from July 2019 to June 2020. The study population comprised LAM patients with or without lung transplantation (LT), patients with OCLD and healthy females. The cohort of OCLD included Langerhans cell histiocytosis, emphysema, and Birt-Hogg-Dubé syndrome. LAM patients were diagnosed by lung biopsy or by the presence of lung cysts plus: renal angiomyolipomas, tuberous sclerosis, or chylous effusions.

Clinical findings, diagnostic methods, sirolimus treatment, childbirth, menopausal status, lung function, LT, presence of tuberous sclerosis, and extrapulmonary involvement were retrospectively recorded from electronic clinical records.

Cystic lung involvement was graded according to thoracic CT scans in LAM patients and in OCLD patients. Lungs were divided into three equal zones (upper, middle, and lower). Based on the lung volume replaced by cysts within each zone, cyst involvement was graded individually and subjectively as follows: mild disease, less than 30%; moderate disease, cysts involve 30–60%; severe disease, cysts involve greater than 60%, as previously reported (23). All CT scans were retrospectively reviewed by the same operator.

Analysis of sex hormones such as estradiol, luteinizing hormone, follitropin, progesterone, and prolactin, as well as pulmonary function tests (PFTs) were performed at the time of inclusion in the study. PFT followed the American Thoracic Society (ATS)/European Respiratory Society protocols (24).

Sirolimus was indicated in LAM patients in the case of FEV1  $< 80\%$ , an angiomyolipoma larger than 4 cm in diameter or multiple angiomyolipomas. In LAM patients who underwent LT, sirolimus was prescribed in the case of chronic lung allograft dysfunction (CLAD) or angiomyolipomas. Sirolimus was given at a dose between 1 and 4 mg once daily adjusted to obtain target trough blood levels between 5 and 15 ng/ml measured with liquid chromatography-mass spectrometry.

The Ethics Committee of the Vall d'Hebron University Hospital (Barcelona, Spain ARB-SIR-2018-01) approved the study and written informed consent was obtained from all subjects.

### 2.2. Blood collection and storage

Blood samples were collected in one BD Vacutainer® Plastic SST II Advance Tube, one BD Vacutainer® Citrate Tube, and one BD Vacutainer® spray-coated K2EDTA tube. The serum tube was allowed to clot at room temperature for 60 min prior to centrifugation at 1,300 g at 4°C for 10 min. Serum was obtained and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until used. The EDTA tube was immediately centrifuged after the blood extraction for 15 min at 1,000 g at 4°C. Plasma was aliquoted into 1 ml aliquots, and then an additional centrifugation was performed at 10,000 g at 4°C for 10 min to obtain platelet-free plasma. All plasma samples were stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until used.

### 2.3. MMP-2, MMP-9, endostatin, FGF acidic, PIGF, thrombospondin-2, VEGF-D, VEGF-R3, angiopoietin-1, PDGF-AA, vWF, KL-6, and CA-125 assays

Serum MMP-2 and MMP-9 were measured using Luminex Human Magnetic Assay LXSAMH-02 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). vWF activity assay was performed on ACLTOP 700 LAS using reagents from the same supplier (IL Werfen, Barcelona, Spain). Serum CA-125 was measured by chemiluminescence assay using Atellica<sup>®</sup> automated analyzer with reagents from the same supplier (Siemens Healthcare Diagnostics, Erlangen, Germany). Endostatin, FGF acidic, PIGF, thrombospondin-2, angiopoietin-1, and PDGF-AA were measured using Luminex Performance Human Angiogenesis Magnetic Panel A (6-Plex), R&D Systems. VEGF-R3 was measured using Luminex Human Magnetic Assay (1-Plex) LXSAMH-01, R&D Systems. VEGF-D was measured by a human VEGF-D Quantikine<sup>®</sup> ELISA kit, R&D Systems. KL-6 was measured using a chemiluminescence enzyme immunoassay (CLEIA) by Lumipulse G KL-6 IRC (Fujirebio, Tokyo, Japan).

### 2.4. Statistical analysis

Continuous variables are expressed as means  $\pm$  standard deviation (SD) and as medians and interquartile range (IQR). Categorical variables are expressed as numbers of cases and proportions. Normality was evaluated in continuous variables using the Shapiro–Wilk test and comparisons of groups were made using analysis of variance (ANOVA). Categorical variables were compared using the chi-square test or Fisher's exact test, as appropriate. For comparisons between patients the Kruskal–Wallis test was used, as appropriate. A receiver operating characteristic (ROC) curve was created to detect the cut-off point to establish the optimal sensitivity and specificity of each biomarker. The previously reported VEGF-D cut-off value of 800 pg/ml was also analysed. A logistic regression model including VEGF-D and MMP-2 was used to create a composite score. The DeLong test was used to compare ROC curves. A  $p$ -value  $< 0.05$  was considered statistically significant. SPSS 27.0 software version (IBM SPSS Statistics, Chicago, IL, USA) and GraphPad Prism 9.1.2 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA) were used for the analysis.

## 3. Results

A total of 97 subjects were recruited: 59 (61%) LAM patients, 18 (19%) OCLD patients, and 20 (20%) healthy female controls. Median time from LAM diagnosis to blood sample collection was 9 (2–17) years. A total of 15 (25%) of the LAM patients had undergone LT prior to recruitment; median time from LT to blood sample collection was 12 (8–13) years. A total of 10 (17%) patients had LAM associated with TSC (TSC-LAM): 2 of them (20%) underwent LT and 6 (75%) were under sirolimus treatment. A total of 9 (50%) of the OCLD patients had emphysema, 8 (44%) had Langerhans cell histiocytosis and 1 (6%) had Birt–Hogg–Dubé syndrome (Figure 1). The method of LAM diagnosis was lung biopsy in 46 (78%) patients, and clinical and radiological findings in 13 (22%).

Regarding cystic lung involvement showed in CT scans: 8 (18%) LAM patients had mild disease, 14 (32%) LAM patients had moderate

disease, and 22 (50%) LAM patients had severe disease. As for OCLD patients: 4 (22%) had mild disease, 6 (33%) had moderate disease, and 8 (44%) had severe disease. Dyspnea was the most common initial symptom, recorded in 24 (41%) LAM patients, followed by pneumothorax in 21 (36%), chylothorax in 5 (9%), hemoptysis in 1 (2%), and hematuria also in 1 (2%). A total of 7 (12%) diagnoses were incidental in asymptomatic patients. A total of 28 (47%) patients had renal angiomyolipomas, 12 (20%) of those were bilateral and median size was 25 (14–42) mm  $\times$  24 (13–25) mm. A total of 12 (20%) patients had lymphangiomyomas. During follow-up, 24 (41%) LAM patients presented recurrent pneumothorax and 5 (9%) developed recurrent chylothorax. No multifocal micronodular pneumocyte hyperplasia was observed on any thoracic CT. Concerning LT, 11 (73%) of them were bilateral and 4 (27%) were single. A total of 11 (73%) LT patients had extrapulmonary lesions: 8 (53%) had angiomyolipomas and 3 (20%) had lymphangiomyomas. Only one patient had relapse of LAM after LT and 7 (47%) of them developed CLAD.

A total of 41 (69%) LAM patients were treated with sirolimus: 33 (80%) non-LT patients and 8 (20%) LT patients, with a mean time under sirolimus treatment of  $6.9 \pm 2.7$  and  $7.5 \pm 2.7$  years, respectively. Mean sirolimus dose was  $2 \pm 0.7$  mg/day and mean blood trough levels were  $7.6 \pm 4.3$  ng/ml. Side effects were recorded in 11 (27%) patients and tended to occur early after starting treatment. The most common side effect was the appearance of oral ulcers, recorded in 6 (15%) patients, severe increases in serum cholesterol in 2 (5%), liver enzyme abnormalities in 1 (2%), leg swelling in 1 (2%), and acne in 1 (2%). A total of 3 (5%) LAM patients started sirolimus treatment after the collection of the blood sample for the study. Only 3 (30%) TSC-LAM patients took antiepileptic drugs and 15 (34%) LAM patients were on bronchodilators, with no differences between TSC-LAM and S-LAM ( $p = 0.7$ ). The proportion of patients under other treatments were also comparable between the two groups (Supplemental Table 1).

Table 1 shows the main demographic and clinical characteristics of the study population. There were no differences between groups in post-menopause status, pregnancy, or body mass index, but differences were found in hypertension, hypercholesterolemia, and renal failure between the group of transplanted patients and the rest. In the PFTs, there were only differences in force vital capacity (FVC) as percentage of predicted value.

### 3.1. Distribution of serum biomarkers between groups

Serum MMP-2 was highest in LAM patients, with a median of 578 (465–832) ng/ml compared with medians of 360 (314–546) ng/ml for OCLD and 427 (365–513) ng/ml for healthy controls ( $p < 0.0001$ ) (Figure 2). MMP-2 was able to differentiate between LAM and OCLD patients ( $p = 0.0004$ ). Differences in MMP-2 levels between S-LAM and TSC-LAM were non-significant: median values were 573 (289–1,151) and 502 (404–688) ng/ml, respectively ( $p = 0.181$ ). There were no differences in the LAM group regarding MMP-2 levels and LT: LAM patients had a median of 551 (462–783) ng/ml compared with one of 630 (491–901) ng/ml in LAM LT patients ( $p > 0.999$ ). There were no significant differences either in the LAM group regarding MMP-2 levels and sirolimus treatment: LAM with sirolimus treatment had a median of 578 (466–847) ng/ml, while LAM without sirolimus treatment had a median of 480 (379–656) ng/ml ( $p = 0.081$ ). The difference in MMP-2 levels between

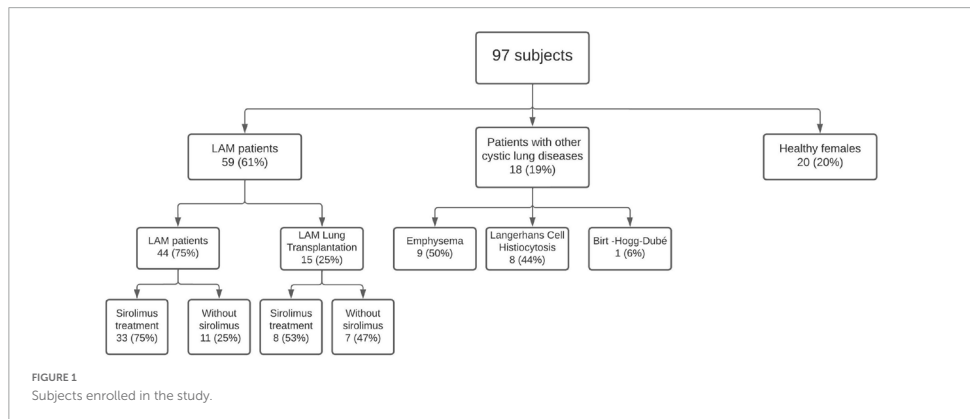


TABLE 1 Demographic and clinical characteristics of the study population.

	LAM (including LT) <i>n</i> = 59	LAM (no LT) <i>n</i> = 44	LT ( <i>n</i> = 15)	OCLD ( <i>n</i> = 18)	Healthy controls ( <i>n</i> = 20)	<i>p</i> -value
Age (years), median (IQR)	52 (46–62)	51 (44–59)	61 (52–66)	57 (46–60)	51 (47–56)	0.037
Post-menopause [ <i>n</i> (%)]	41 (69)	29 (66)	12 (80)	13 (72)	10 (50)	0.381
Pregnancy [ <i>n</i> (%)]	37 (63)	26 (59)	11 (73)	14 (78)	10 (50)	0.392
Ex-smokers [ <i>n</i> (%)]	21 (36)	17 (39)	4 (27)	11 (61)	3 (15)	<0.001
Smokers [ <i>n</i> (%)]	3 (5)	3 (7)	0 (0)	5 (28)	4 (20)	
BMI (kg/m <sup>2</sup> ), mean ± SD	24 ± 4.8	23.6 ± 4	25.2 ± 6.4	24 ± 4.1	23 ± 3.6	0.9214
Hypertension [ <i>n</i> (%)]	19 (32)	11 (25)	8 (53)	2 (11)	1 (5)	<0.001
Hypercholesterolemia [ <i>n</i> (%)]	30 (51)	19 (43)	11 (73)	0 (0)	6 (30)	<0.001
Diabetes mellitus [ <i>n</i> (%)]	7 (12)	4 (9)	3 (20)	1 (6)	0 (0)	0.320
Renal failure (GFR < 60) [ <i>n</i> (%)]	13 (22)	1 (2)	12 (80)	0 (0)	0 (0)	<0.001
<b>PFT (mean ± SD)</b>						
FVC (ml)	2,733 ± 847	2,927 ± 825	2,165 ± 647	2,370 ± 978	–	0.012
FVC (% pred.)	86 ± 21	91 ± 20	72 ± 18	72 ± 26	–	0.009
FEV1 (ml)	1,850 ± 698	1,922 ± 728	1,638 ± 573	1,629 ± 1,141	–	0.257
FEV1 (% pred.)	71 ± 22	72 ± 22	69 ± 22	59 ± 35	–	0.298
FEV1/FVC (%)	68 ± 14	65 ± 15	75 ± 9	61 ± 17	–	0.059
DLCO (%)	55 ± 25	54 ± 26	68 ± 20	48 ± 30	–	0.337
Supplemental oxygen [ <i>n</i> (%)]	6 (10)	5 (11)	1 (6)	7 (39)	–	0.012

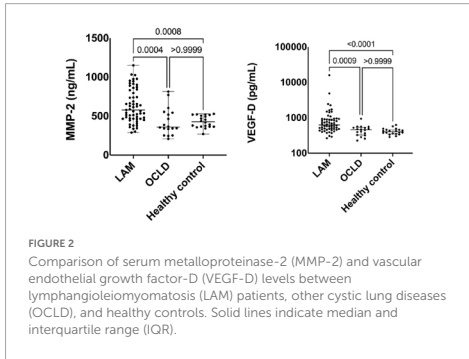
LT, lung transplantation; OCLD, other cystic lung diseases; IQR, interquartile range; SD, standard deviation; BMI, body mass index; GFR, glomerular filtration rate (ml/min/1.73 m<sup>2</sup>); PFT, pulmonary function test.

healthy controls and LAM patients under sirolimus remained significant ( $p = 0.003$ ). Also, the levels of MMP-2 were comparable among patients with and without bronchodilators: median value was 625 (404–843) and 543 (465–738) ng/ml, respectively ( $p = 0.98$ ).

Serum VEGF-D level was higher in LAM with a median of 629 (482–924) pg/ml, than in OCLD [median 459 (325–530) pg/ml], and healthy controls [median 404 (352–456) pg/ml] (Figure 2). Levels of VEGF-D were higher in TSC-LAM patients [median 733 (523–928) pg/ml] compared with S-LAM [median 554 (457–790) pg/ml] ( $p = 0.039$ ). Considering all LAM patients irrespective of LT, those

under sirolimus treatment had a median VEGF-D of 610 (486–886) pg/ml compared to 658 (452–1,638) pg/ml in those without treatment ( $p = 0.457$ ). The difference in VEGF-D levels between healthy controls and LAM patients under sirolimus remained significant ( $p = 0.004$ ). Patients without bronchodilators showed higher VEGF-D levels [median 709 (521–893) pg/ml] compared to those under treatment [median 458 (400–548) pg/ml] ( $p = 0.004$ ).

Of note, VEGF-D was persistently elevated in LAM patients after LT though the difference with regard to those without LT was not significant (Figure 3). Median VEGF-D was 577 (461–861) pg/ml



**FIGURE 2**  
Comparison of serum metalloproteinase-2 (MMP-2) and vascular endothelial growth factor-D (VEGF-D) levels between lymphangioliomyomatosis (LAM) patients, other cystic lung diseases (OCLD), and healthy controls. Solid lines indicate median and interquartile range (IQR).

in LT-free LAM vs. 893 (589–1,482) pg/ml in the LAM LT group ( $p = 0.384$ ).

Endostatin, PIGF, thrombospondin-2, VEGF-R3, angiopoietin-1, PDGF-AA, MMP-9, CA-125, vWF, FGF-acidic, and KL-6 biomarkers were not able to discriminate between LAM patients and OCLD patients or healthy volunteers (Table 2 and Supplementary Figures 1, 2).

The area under ROC curve (AUC) of VEGF-D to predict LAM diagnosis, compared with OCLD and healthy volunteers, was 0.815 [95% confidence interval (CI): 0.732–0.899,  $p < 0.0001$ ]. A VEGF-D cut-off level of 578 pg/ml showed a sensitivity and specificity of 59 and 95%, respectively, whereas a cut-off value of 800 pg/ml had a sensitivity of 36 and a specificity of 97%, respectively. The AUC of MMP-2 was 0.785 (95% CI: 0.695–0.876,  $p < 0.0001$ ). A cut-off level of 560 pg/ml showed a sensitivity of 54% for LAM diagnosis and a specificity of 92%. Specifically, a cut-off value of 824 pg/ml had a specificity of 100% to differentiate LAM from OCLD patients: 15 (25%) LAM patients fulfilled this criterion, 5 of them received a LT and 11 were under sirolimus treatment. A composite marker was therefore constructed combining MMP-2 and VEGF-D (score =  $-6.36 + 0.0059 \times \text{VEGF-D} + 0.0069 \times \text{MMP-2}$ ). The

AUC for this composite score was 0.88 (95% CI 0.82–0.95) ( $p < 0.05$  compared to either VEGF-D or MMP-2 alone), and the best cut-off for the composite score was 0.61, resulting in a sensitivity/specificity of 79/86% (Figure 4).

We did not find any correlation between either MMP-2 or VEGF-D values and age, estradiol, luteinizing hormone, follitropin, progesterone, or prolactin levels. Nor was there any correlation between the two biomarkers. MMP-2 and VEGF-D were not associated with chylothorax or angiomylipomas or with recurrences; VEGF-D correlated with lymphatic involvement, but MMP-2 did not.

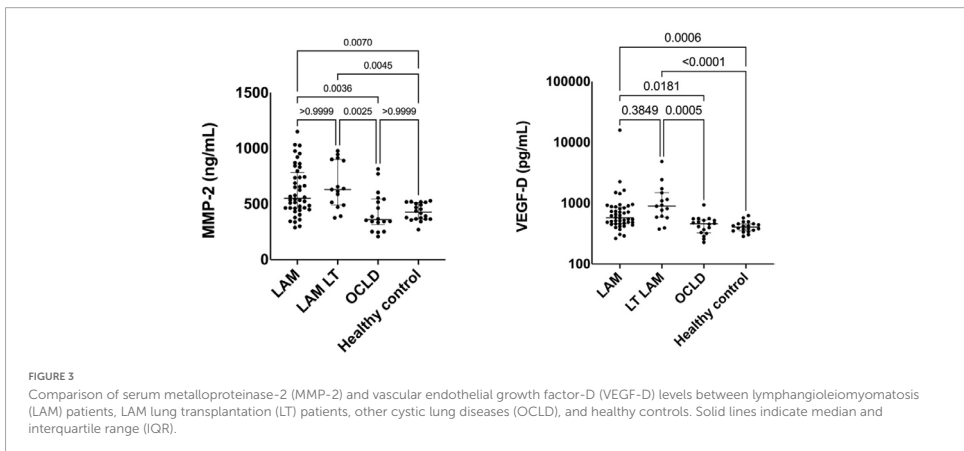
There was a nearly significant positive correlation between the levels of serum MMP-2 and the severity of the cystic lung involvement by CT: median MMP-2 was 458 (305–536) ng/ml in the mild disease group, 500 (348–783) ng/ml in the moderate disease group, and 551 (456–782) ng/ml in the severe disease group ( $p = 0.087$ ). On the other hand, levels of serum VEGF-D were not correlated: median values were 574 (423–919), 503 (405–646), and 544 (444–816) pg/ml, respectively, for the three groups ( $p = 0.638$ ).

We observed a tendency toward an association between higher levels of serum MMP-2 and worse lung function parameters in LAM patients who had not undergone LT. In patients with FEV1% pred. below the median, mean MMP-2 was  $674 \pm 203$  ng/ml, while in those above median FEV1% pred. it was  $562 \pm 226$  ng/ml ( $p = 0.092$ ), (Figure 5). VEGF-D did not correlate with lung function parameters.

#### 4. Discussion

Finding new diagnostic biomarkers for LAM is a pressing issue. Our results show that serum levels of MMP-2 are significantly higher in patients with LAM compared to patients with OCLD and healthy volunteers. A composite score combining VEGF-D and MMP-2 can be used as a diagnostic biomarker for LAM and can increase the accuracy of the diagnosis.

Associated with lymphangiogenesis and lung remodeling, MMPs are components of the extracellular matrix that promote collagen and elastin degradation (13). MMPs are overexpressed in a number of

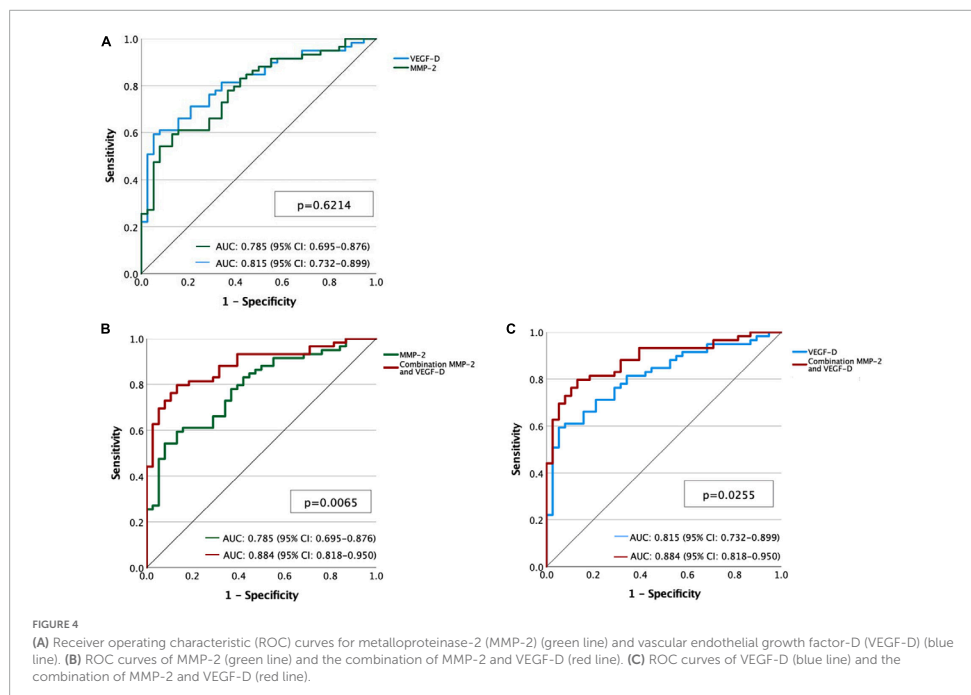


**FIGURE 3**  
Comparison of serum metalloproteinase-2 (MMP-2) and vascular endothelial growth factor-D (VEGF-D) levels between lymphangioliomyomatosis (LAM) patients, LAM lung transplantation (LT) patients, other cystic lung diseases (OCLD), and healthy controls. Solid lines indicate median and interquartile range (IQR).

TABLE 2 Biomarker levels from LAM patients, QOLT LAM patients, OCLD and healthy controls.

	LAM patients (n = 44)	LT LAM (n = 15)	OCLD (n = 18)	Healthy controls (n = 20)	p-value
Angiopoietin-1 (pg/ml), median (IQR)	7,178 (5,033–13,450)	9,405 (5,911–11,662)	7,603 (4,726–12,581)	3,766 (2,998–6,604)	0.0035
CA-125 (U/ml), median (IQR)	15 (1.7–25.2)	18.5 (12.6–45.3)	8.2 (6.3–14.5)	10.4 (7.5–12.9)	0.0118
Endostatin (ng/ml), median (IQR)	37 (28–51)	72 (55–80)	35 (26–45)	31 (23–39)	<0.0001
FGF acidic (pg/ml), median (IQR)	16 (12.4–19.2)	16 (11.4–19.2)	16.3 (11.34–18.9)	11.6 (10.3–20.8)	0.6219
KL-6 (U/ml), median (IQR)	342 (256–517)	424 (341–535)	415 (290–636)	336.5 (237–393)	0.1526
MMP-9 (ng/ml), median (IQR)	150 (93–209)	208 (90–283)	242 (163–374)	194 (102–229)	0.0246
PDGF-AA (pg/ml), median (IQR)	1,020 (768–1,697)	889 (647–1,236)	985.5 (702–1,497)	433.5 (282.8–665.8)	<0.0001
PIGF (pg/ml), median (IQR)	3.8 (3.2–4.3)	4.5 (4.2–4.9)	3.9 (3–4.6)	2.4 (1.8–3.3)	<0.0001
Thrombospondin-2 (ng/ml), median (IQR)	27 (21–36)	31 (24–44)	24.5 (16–38)	18.5 (15–25)	0.0027
VEGF-R3 (pg/ml), median (IQR)	182 (116.3–227)	165.1 (61.8–193.1)	168.9 (109.2–204.5)	86.94 (75.70–137.3)	0.0037
vWF (%), median (IQR)	143.9 (121.6–175.6)	157.3 (133.5–180.8)	97.15 (78–139.1)	124.2 (96.75–149.8)	0.0030

CA-125, cancer antigen-125; FGF-acidic, fibroblast growth factor-acidic; KL-6, Krebs von den Lungen 6; LAM, lymphangioloiomatosis; LT, lung transplantation; MMP, matrix metalloproteinases; OCLD, other cystic lung diseases; PDGF-AA, platelet derived growth factor-AA protein; PIGF, phosphatidylinositol-glycan biosynthesis class F protein; TSC, tuberous sclerosis complex; VEGF-D, vascular endothelial growth factor-D; vWF, von Willebrand factor.

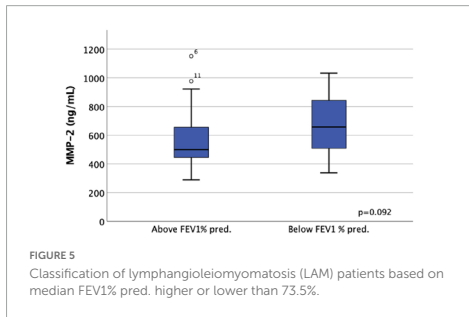


chronic pulmonary diseases, including idiopathic pulmonary fibrosis (25, 26), asthma (27), and emphysema (28), as well as tumor proliferation (29). Hayashi et al. (30) demonstrated increased activity of MMPs, particularly MMP-2, which might be responsible for the cystic destruction of the lung parenchyma in LAM. Furthermore, these authors observed that the immunohistochemical heterogeneity of LAM cells was associated with different patterns; for example,

larger LAM cells stained more strongly for MMP-2, MMP-9, and Human Melanoma Black-45 monoclonal antibody. According to other authors, the disproportion between MMPs and their tissue inhibitors may also lead to the cystic destruction of lung parenchyma (31).

Few studies have been published on MMPs and LAM. Chang et al. (17) found significantly higher MMP-2 serum levels among





LAM patients, but they only compared them with healthy volunteers and excluded patients taking sirolimus and LT. Those authors hypothesized that MMP-2 may decrease in advanced disease, in view of an association they found between MMP-2 levels and better lung function. In contrast, we found that MMP-2 was associated with poorer lung function. Considering that a higher number of cysts, and therefore more lung destruction, impairs lung function, an increase in MMP-2 seems plausible in patients with poorer outcomes. In fact, we found a trend for an association between serum MMP-2 levels and the degree of lung involvement by CT.

A recent study explored the role of MMP-2 and MMP-7 as biomarkers for S-LAM and TSC-LAM in comparison to healthy controls (16). In both S-LAM and TSC-LAM patients, serum MMP-2 levels were higher than in controls, while MMP-seven levels were higher in TSC-LAM patients than in controls and S-LAM patients. However, higher levels of those biomarkers did not appear to correlate with worse lung function parameters. In the same study (16), MMP-2 did not have the same ability to diagnose LAM disease as VEGF-D, in agreement with our data; however, in that study the authors did not attempt to combine biomarkers in order to increase diagnostic accuracy. A Japanese study used semi-quantitative analyses to assess serum activity of MMP-9 and MMP-2 in LAM patients and compared them with healthy females (15). MMP-9 serum activity was significantly higher than in controls, but MMP-2 activity did not differ between groups. Due to the semi-quantitative nature of the method used for the analysis, the results of that study may differ from ours.

In addition, some authors have investigated the role of doxycycline, an MMP inhibitor, on LAM progression. Pimenta et al. (32) observed a decrease in MMP-2 levels after doxycycline treatment but this was not associated with functional improvement. On the other hand, Chang et al. (33) did not find differences in MMP-two levels after 2 years of doxycycline. Altogether, further studies should clarify the prognostic role of MMP-2 in LAM. We found VEGF-D levels to be significantly higher in LAM patients, with similar sensitivity and specificity values to those recorded in previous studies (6, 34). Young et al. (35) discovered significant correlations between measurements of VEGF-D at LAM diagnosis and lung function parameters. In contrast, we did not detect any association between lung function and serum VEGF-D levels, but our measurements were not made at baseline. Along the same lines, Young et al. (6) did not find any correlation in their cross-sectional study. Even though we observed no differences in VEGF-D levels between patients who received sirolimus and those who did not, this finding could be explained by the fact that patients not

receiving sirolimus might have milder disease. In addition, the levels of pre-treatment VEGF-D are not available due to the design of the study. According to Taveira-DaSilva et al. (11) pre-sirolimus VEGF-D decreased especially in patients with lymphatic involvement, but they were unable to demonstrate an association between VEGF-D decline and lung function changes following sirolimus treatment. As a biomarker for monitoring the progression of LAM disease, VEGF-D has several limitations, a circumstance that highlights the importance of further research in this area.

Another relevant finding from our study is that VEGF-D remained high in LAM patients after LT. This result supports the hypothesis that LAM cells do not originate exclusively in the lungs, and that they may also proliferate in other tissues (36). Recently, Guo et al. (37) identified the presence of LAM cells in the uterus through single-cell RNA sequencing. To our knowledge, ours is the first study to measure VEGF-D after LT in LAM patients.

The main limitation of this study is its cross-sectional design. Also, the sample size was relatively small but this was due to the rarity of the disease and is a drawback for most LAM studies. The strengths of the study include the homogeneity of the clinical care and criteria, as all patients were treated by the same team.

In conclusion, a composite two-biomarker assay combining MMP-2 and VEGF-D enhances diagnostic accuracy. However, further longitudinal studies with larger patient populations are needed to confirm the usefulness of MMP-2 in clinical practice. The study also showed that serum levels of VEGF-D remained elevated in LAM patients even after LT.

## Data availability statement

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

## Ethics statement

The studies involving human participants were reviewed and approved by the Ethics Committee of the Vall d'Hebron University Hospital. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

## Author contributions

ER-L was responsible for collecting blood samples, data analysis, statistics, and writing of the manuscript. VR and AM-V were responsible for sample analysis and critically reviewed the manuscript. ML-M, CBe, MB-P, MA-P, MZ-O, VR, CBr, and AR critically reviewed the manuscript. SG-O and BS-G were responsible for study design and critical review. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## Funding

This project was supported by the Spanish Society of Pulmonology and Thoracic Surgery (SEPAR), grant number: PI 638/2018. The funders have no role in study design, data and analysis collection, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Acknowledgments

We thank the individuals who provided their blood samples, and the AELAM foundation for its continued support for LAM research. The logistic regression model has been carried out in the Statistics and Bioinformatics Unit (UEB) Vall d'Hebron Hospital Research Institute (VHIR).

## 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.

## References

- Johnson S, Taveira-Dasilva A, Moss J. Lymphangioliomyomatosis. *Clin Chest Med.* (2016) 37:389–403.
- Carsillo T, Astrinidis A, Henske E. Mutations in the tuberous sclerosis complex gene TSC2 are a cause of sporadic pulmonary lymphangioliomyomatosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2000) 97:6085–90.
- Kumasaka T, Seyama K, Mitani K, Sato T, Souma S, Kondo T, et al. Lymphangiogenesis in Lymphangioliomyomatosis. *Am J Surg Pathol.* (2004) 28:1007–16.
- Seyama K, Kumasaka T, Kurihara M, Mitani K, Sato T. Lymphangioliomyomatosis: a disease involving the lymphatic system. *Lymphat Res Biol.* (2010) 8:21–31.
- Young L, Inoue Y, McCormack F. Diagnostic potential of serum VEGF-D for lymphangioliomyomatosis. *N Engl J Med.* (2008) 358:199–200.
- Young L, VanDyke R, Gulleman P, Inoue Y, Brown K, Schmidt L, et al. Serum vascular endothelial growth factor-D prospectively distinguishes lymphangioliomyomatosis from other diseases. *Chest.* (2010) 138:674–81. doi: 10.1378/chest.10-0573
- Gupta N, Finlay G, Kotloff R, Strange C, Wilson K, Young L, et al. Lymphangioliomyomatosis diagnosis and management: high-resolution chest computed tomography, transbronchial lung biopsy, and pleural disease management an Official American thoracic society/Japanese respiratory society clinical practice guideline. *Am J Respir Crit Care Med.* (2017) 196:1337–48. doi: 10.1164/rccm.201709-1965ST
- Amaral A, de Oliveira M, Dias O, Arimura F, Freitas C, Acencio M, et al. Concentration of serum vascular endothelial growth factor (VEGF-D) and its correlation with functional and clinical parameters in patients with lymphangioliomyomatosis from a brazilian reference center. *Lung.* (2019) 197:139–46. doi: 10.1007/s00408-018-00191-3
- Glasgow C, Avila N, Lin J, Stylianou M, Moss J. Serum vascular endothelial growth factor-D levels in patients with lymphangioliomyomatosis reflect lymphatic involvement. *Chest.* (2009) 135:1293–300. doi: 10.1378/chest.08-1160
- McCarthy C, Gupta N, Johnson S, Yu J, McCormack F. Lymphangioliomyomatosis: pathogenesis, clinical features, diagnosis, and management. *Lancet Respir Med.* (2021) 9:1313–27.
- Taveira-Dasilva A, Jones A, Julien-Williams P, Stylianou M, Moss J. Long-term effect of sirolimus on serum vascular endothelial growth factor D levels in patients with lymphangioliomyomatosis. *Chest.* (2018) 153:124–32.
- Ji R. Lymphatic endothelial cells, lymphangiogenesis, and extracellular matrix. *Lymphat Res Biol.* (2006) 4:83–100.
- Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2014) 15:786–801.
- Matsui K, Takeda K, Yu Z, Travis W, Moss J, Ferrans V. Role for activation of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of pulmonary lymphangioliomyomatosis. *Arch Pathol Lab Med.* (2000) 124:267–75.
- Odajima N, Betsuyaku T, Nasuhara Y, Inoue H, Seyama K, Nishimura M. Matrix metalloproteinases in blood from patients with LAM. *Respir Med.* (2009) 103:124–9.
- Terraneo S, Lesma E, Ancona S, Imeri G, Palumbo G, Torre O, et al. Exploring the role of matrix metalloproteinases as biomarkers in sporadic lymphangioliomyomatosis and tuberous sclerosis complex. A pilot study. *Front Med.* (2021) 8:605909. doi: 10.3389/fmed.2021.605909
- Chang W, Cane J, Blakey J, Kumaran M, Pointon K, Johnson S. Clinical utility of diagnostic guidelines and putative biomarkers in lymphangioliomyomatosis. *Respir Res.* (2012) 13:34. doi: 10.1186/1465-9921-13-34

## 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.

## Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2023.1079317/full#supplementary-material>

- Lamattina A, Poli S, Kidambi P, Bagwe S, Courtwright A, Louis P, et al. Serum endostatin levels are associated with diffusion capacity and with tuberous sclerosis-associated lymphangioliomyomatosis. *Orphanet J Rare Dis.* (2019) 14:72. doi: 10.1186/s13023-019-1050-4
- Lenting P, Casari C, Christophe O, Denis CV. Von willebrand factor: the old, the new and the unknown. *J Thromb Haemost.* (2012) 10:2428–37.
- Banville N, Burgess J, Jaffar J, Tjin G, Richeldi L, Cerri S, et al. A quantitative proteomic approach to identify significantly altered protein networks in the serum of patients with lymphangioliomyomatosis (LAM). *PLoS One.* (2014) 9:e105365. doi: 10.1371/journal.pone.0105365
- Glasgow C, Pacheco-Rodriguez G, Steagall W, Haughey M, Julien-Williams P, Stylianou M, et al. CA-125 in disease progression and treatment of lymphangioliomyomatosis. *Chest.* (2018) 153:339–48. doi: 10.1016/j.chest.2017.05.018
- D'Alessandro M, Bergantini L, Cameli P, Perillo F, Remediani L, Refini R, et al. Prognostic role of KL-6 in lymphangioliomyomatosis patients. *Minerva Med.* (2021) 113:727–29. doi: 10.23736/S0026-4806.21.07322-5
- Avila N, Dwyer A, Rabel A, Moss J. Sporadic lymphangioliomyomatosis and tuberous sclerosis complex with lymphangioliomyomatosis: comparison of CT features. *Radiology.* (2007) 242:277–85. doi: 10.1148/radiol.2421051767
- Graham B, Steenbruggen I, Barjaktarevic I, Cooper B, Hall G, Hallstrand T, et al. Standardization of spirometry 2019 update an official American thoracic society and European respiratory society technical statement. *Am J Respir Crit Care Med.* (2019) 200:E70–88. doi: 10.1164/rccm.201908-1590ST
- Maher T, Oballa E, Simpson J, Porte J, Habgood A, Fahy W, et al. An epithelial biomarker signature for idiopathic pulmonary fibrosis: an analysis from the multicentre PROFILE cohort study. *Lancet Respir Med.* (2017) 5:946–55. doi: 10.1016/S2213-2600(17)30430-7
- Todd J, Vinisko R, Liu Y, Neely M, Overton R, Flaherty K, et al. Circulating matrix metalloproteinases and tissue metalloproteinase inhibitors in patients with idiopathic pulmonary fibrosis in the multicenter IPF-PRO registry cohort. *BMC Pulm Med.* (2020) 20:64. doi: 10.1186/s12890-020-1103-4
- Ko F, Diba C, Roth M, McKay K, Johnson P, Salome C, et al. A comparison of airway and serum matrix metalloproteinase-9 activity among normal subjects, asthmatic patients, and patients with asthmatic mucus hypersecretion. *Chest.* (2005) 127:1919–27. doi: 10.1378/chest.127.6.1919
- Mao J, Tashkin D, Belloni P, Baileyhealy I, Baratelli F, Roth M. All-trans retinoic acid modulates the balance of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in patients with emphysema. *Chest.* (2003) 124:1724–32. doi: 10.1378/chest.124.5.1724
- Abdel-Hamid N, Abass S. Matrix metalloproteinase contribution in management of cancer proliferation, metastasis and drug targeting. *Mol Biol Rep.* (2021) 48:6525–38.
- Hayashi T, Fleming MV, Stetler-Stevenson W, Liotta L, Moss J, Ferrans V, et al. Immunohistochemical study of matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs) in pulmonary lymphangioliomyomatosis (LAM). *Hum Pathol.* (1997) 28:1071–8. doi: 10.1016/S0046-8177(97)90061-7
- Nascimento E, Baldi B, Mariani A, Annoni R, Kairalla R, Pimenta S, et al. Immunohistological features related to functional impairment in lymphangioliomyomatosis. *Respir Res.* (2018) 19:83. doi: 10.1186/s12931-018-0797-9

32. Pimenta S, Baldi B, Kairalla R, Carvalho C. Doxycycline use in patients with lymphangiomyomatosis: biomarkers and pulmonary function response. *J Bras Pneumol.* (2013) 39:5–15. doi: 10.1590/s1806-37132013000100002
33. Chang W, Cane J, Kumaran M, Lewis S, Tattersfield A, Johnson S, et al. A 2-year randomised placebo-controlled trial of doxycycline for lymphangiomyomatosis. *Eur Respir J.* (2014) 43:1114–23.
34. Seyama K, Kumasaka T, Souma S, Sato T, Kurihara M, Mitani K, et al. Vascular endothelial growth factor-D is increased in serum of patients with lymphangiomyomatosis. *Lymphat Res Biol.* (2006) 4:143–52.
35. Young L, Lee H, Inoue Y, Moss J, Singer L, Strange C, et al. Serum VEGF-D concentration as a biomarker of lymphangiomyomatosis severity and treatment response: a prospective analysis of the multicenter international lymphangiomyomatosis efficacy of sirolimus (MILES) trial. *Lancet Respir Med.* (2013) 1:445–52. doi: 10.1016/S2213-2600(13)70090-0
36. Kumasaka T, Seyama K, Mitani K, Souma S, Kashiwagi S, Hebisawa A, et al. Lymphangiogenesis-mediated shedding of LAM cell clusters as a mechanism for dissemination in lymphangiomyomatosis. *Am J Surg Pathol.* (2005) 29:1356–66. doi: 10.1097/01.pas.0000172192.25295.45
37. Guo M, Yu J, Perl A, Wikenheiser-Brokamp K, Riccetti M, Zhang E, et al. Single-cell transcriptomic analysis identifies a unique pulmonary lymphangiomyomatosis cell. *Am J Respir Crit Care Med.* (2020) 202:1373–87. doi: 10.1164/rccm.201912-2445OC

## **11.2. ANEXO II: COMUNICACIONES EN CONGRESOS**

### **11.2.1. Comunicación 1**

E. Revilla Lopez, C. Berastegui, B. Saez, A. Mendez, M. Lopez Meseguer, I. Sansano, S. Gomez Olles, A. Roman. Long-term sirolimus treatment in Lymphangioliomyomatosis. Comunicación oral. European Respiratory Society Congress 2019.

*Eur Respir J 2019; 54: Suppl. 63, PA3687.*

### **11.2.2. Comunicación 2**

E. Revilla Lopez, B. Saez Gimenez, C. Berastegui, M. Barrecheguren, M. Lopez Meseguer, V. Monforte, S. Gomez Olles, C. Bravo, A. Roman. Lung Transplantation Outcomes in Lymphangioliomyomatosis.

*J of Heart Lung Transplant, 2020; 39 (4S): 760*

### **11.2.3. Comunicación 3**

E M Revilla Lopez, M Boada, V Ruiz De Miguel, S Gomez Ollés, B Saez. Exploring the role of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) as a biomarker in lymphangioliomyomatosis. Comunicación oral. European Respiratory Society Congress 2022.

*Eur Respir J 2022; 60: Suppl. 66, 144.*

### **11.3. ANEXO III: BECAS Y FINANCIAMIENTO**

Eva Revilla López recibió una beca predoctoral de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR) en 2019.

El segundo estudio que compone esta tesis doctoral fue financiado con una beca de investigación de SEPAR: 638/2018.