

Utilidad de la glicoproteína Krebs von den Lungen 6 como biomarcador en las enfermedades pulmonares intersticiales difusas

Paloma Millán Billi

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>

UAB

**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Programa de Doctorado en Medicina

Departamento de Medicina

Facultad de Medicina

**Utilidad de la glicoproteína Krebs von den Lungen 6 como biomarcador en las
enfermedades pulmonares intersticiales difusas**

TESIS DOCTORAL presentada por **Paloma Millán Billi** para optar al grado de Doctor

Directores: Dr. Diego Castillo Villegas y Dr. Iván Castellví Barranco

Tutor: Dr. Vicente Plaza Moral

Barcelona, 2025

No hay viento favorable para el que no sabe a qué puerto se dirige

Séneca

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Diego Castillo, por el tiempo dedicado y la paciencia dentro y fuera del hospital. Gracias por las enseñanzas, las oportunidades y la confianza.

Al Dr. Iván Castellví, por embarcarse en esta aventura y por su apoyo. Gracias por hacer la Reumatología más bonita.

Al Dr. Plaza, por permitirme llevar a cabo esta tesis.

A Oriol Sibila y Alfons Torrego, por el aprendizaje en la residencia y el soporte a pesar de la distancia. A Ana, Guille y Silvia, por su cariño y ser ejemplos a seguir.

A Tomás Franquet, por compartir sus conocimientos y pasión por las EPID, no puedo imaginar un mejor maestro de la radiología.

Al equipo de Inmunología de Sant Pau, sin el cual esta tesis no existiría, gracias a Laura y Anaïs por todas las horas dedicadas. Finalmente, gracias a Miriana, cuya ayuda en la parte final de la tesis ha sido fundamental.

A la familia de Neumología de Can Ruti, porque no hay otra manera de describiros. Gracias por acogerme y hacerme sentir en casa. Orgullosa de las amistades forjadas y formar parte de ese equipo. A la mini familia de PFR, por hacer que el día a día sea más llevadero. A Susana e Ivette, por intentar hacerme una reumatóloga amateur, gracias por el cariño.

A Karina Portillo, por el apoyo incondicional dentro y fuera del hospital. Por las charlas, los consejos y los empujones cuando me falta confianza. Por compartir que la vida es mucho más.

A Marta, Silvia y Nicole. Los 3 pilares de esta casa que hemos construido desde la residencia. Es una casa bonita, pero sobre todo sólida y duradera. Gracias infinitas.

A Cris, Víctor, José, Marta, Marc, Johan y Silvia S, por ser mi primera segunda familia en España. No hay espacio suficiente ni palabras para ello, sólo, gracias.

A mis padres, por ser o meu faro, com essa luz incansável e infinita. Por querer parecerme, aunque sea un poquito a los dos. Obrigada por tudo. A mi hermana, por ser mi ancla con el pasado, con la familia, con el presente y con el futuro. Por esos recuerdos que solo nosotras compartimos, gracias por existir y estar a mi lado. Y a José Andrés, por traer ese toque andaluz a la familia y a ambos por regalarnos a Andrea.

A mi familia gallega, a Chus, Jesús, María y Víctor, por ese cariño inmenso, los abrazos y las risas. Por darme un refugio en medio de la tormenta.

A Santi, por su amor sin límites. Por envolverme en su entusiasmo, capacidad de asombro y curiosidad. Por darme siempre el mejor momento del día, pero, sobre todo, por enseñarme a confiar y esperar. Gracias a ti y a nuestro milagro de primavera.

Abreviaturas:

AUC: Área Bajo la Curva	EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
ALAT: Asociación Latinoamericana de Tórax	ERS: European Respiratory Society
ANA: Anticuerpos antinucleares	FEPP: Fibroelastosis Pleuroparenquimatosas Idiopáticas
ANOVA: <i>Analysis Of Variance</i>	FEV1: Volumen Espiratorio Forzado en el Primer Segundo
AR: Artritis Reumatoide	FIAT: Fibrosis Intersticial Asociada a Tabaco
ATS: <i>American Thoracic Society</i>	FPP: Fibrosis Pulmonar Familiar
BR-EPID: Bronquiolitis respiratoria asociada a EPID	FPI: Fibrosis Pulmonar Idiopática
CLEIA: Inmunoensayo Enzimático Quimioluminiscente	FPP: Fibrosis Pulmonar Progresiva
CPI: <i>Composite Physiologic Index</i>	FVC: " <i>Forced Vital Capacity</i> "
TLC: <i>Total Lung Capacity</i>	GAP: " <i>Gender/Age/Physiology</i> "
DE: Desviación Estándar	GGO: " <i>Ground Glass Opacities</i> "
DLCO: Capacidad de difusión del monóxido de carbono	HPCL: Histiocitosis pulmonar de células de Langerhans
EA: Exacerbación aguda	LBA: Lavado Broncoalveolar
EAS: Enfermedades autoinmunes sistémicas	ILA: <i>Interstitial Lung Abnormalities</i>
ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas	IPAF: <i>Interstitial Pneumonia with Autoimmune Features</i>
ENAs: Antígenos Nucleares Extraíbles	JRS: Japan Radiological Society
EPID: Enfermedades Pulmonares Intersticiales Difusas	KL-6: Krebs Von Den Lungen
	LAM: Linfangioleiomiomatosis

MMP: Metaloproteinasas de la Matriz

MUC5B: Gen Mucina 5B

NH: Neumonitis por hipersensibilidad

NIA: Neumonía Intersticial Aguda

NID: Neumonía Intersticial

Descamativa

NII: Neumonías Intersticiales

Idiopáticas

NIL: Neumonía Intersticial Linfoide

NINE: Neumonía Intersticial No

Específica

NIU: Neumonía Intersticial Usual

NOC: Neumonía Organizada

Criptogénica

PFR: Pruebas funcionales respiratorias

pSS: Síndrome de Sjögren Primario

RAE: Real Academia Española

ROC: *Receiver Operating*

Characteristic

SARS-CoV-2: Coronavirus 2 del

Síndrome Respiratorio Agudo Severo

SDRA: Síndrome de Distrés

Respiratorio del Adulto

SP-A: Proteína de Surfactante A

SP-D: Proteína de Surfactante D

SSc: Esclerosis Sistémica

TACAR: Tomografía Axial

Computarizada de Alta Resolución

TIMP: Inhibidores Tisulares de

Metaloproteinasas

TM6M: Test de la Marcha de 6 Minutos

Índice de Tablas y Figuras

Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación de las Neumonías Intersticiales	20
Tabla 2. Estudios realizados sobre KL-6 en EPID	33
Tabla 3. Estudios sobre Neumonitis por hipersensibilidad y niveles séricos de KL-6	35
Tabla 4. Resumen de los estudios realizados sobre KL-6 en EPID-EAS.....	37
Tabla 5. Características clínicas, demográficas y funcionales de los pacientes...	71
Tabla 6. Etiología de todas las EPID incluidas	72
Tabla 7. Características de los pacientes según la FVC	73
Tabla 8. Factores pronósticos asociados a la presencia de EPID	77
Tabla 9. Resumen de los datos demográficos, clínicos, funcionales y analíticos .	80
Tabla 10. Variación de la función pulmonar en el seguimiento.....	84
Tabla 11. Criterios de fibrosis pulmonar progresiva	96
Tabla 12. Principales escalas para la valoración de los pacientes con EPID....	100

Índice de Figuras

Figura 1. Factores asociados a la fibrosis pulmonar.....	21
Figura 2. Proceso diagnóstico de las EPID	23
Figura 3. Principales biomarcadores estudiados en EPID.....	26
Figura 4. Puntos de corte de KL-6 de los principales estudios realizados en EPID	32
Figura 5. Evolución de las publicaciones sobre KL-6 en EPID desde 1989.....	44
Figura 6. Análisis ROC utilizando AUC. Punto de corte óptimo de KL-6 para detectar EPID.	74

Figura 7. Evolución de la sensibilidad y especificidad para detectar EPID según los valores de KL...	75
Figura 8. Punto de corte óptimo para predecir EPID según FVC....	75
Figura 9. Punto de corte óptimo para predecir EPID según DLCO	76
Figura 10. Árbol de inferencia condicional basado en KL-6 y el género.....	78
Figura 11. a) Concentraciones séricas y en LBA en los grupos EPID fibrótica vs no-fibrótica. b) Correlación entre los niveles de KL-6 en LBA y la DLCO al inicio del estudio.....	81
Figura 12. a) Niveles de KL-6 en plasma y LBA durante el seguimiento en los pacientes clasificados como progresivos o no progresivos. b) Correlación entre los niveles de KL-6 séricos y la variación de FVC observada en el estudio.....	82
Figura 13. Análisis ROC utilizando AUC. a) Punto de corte óptimo de KL-6 para detectar EPID fibrótica. b) Punto de corte óptimo de KL-6 para detectar EPID progresiva	83
Figura 14. Modelo predictivo (utilizando “machine learning”) para identificar pacientes con EPID fibrótica... ..	85
Figura 15. Modelo predictivo (utilizando “machine learning”) para identificar pacientes con EPID progresiva.....	87

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	13
SUMMARY	15
1. INTRODUCCIÓN	17
1.1. Enfermedad Pulmonar Intersticial Difusa	
1.1.1. Conceptos generales	19
1.1.2. Fisiopatología	19
1.1.3. Proceso diagnóstico	21
1.1.4. Marcadores pronósticos	22
1.1.5. Manejo terapéutico	24
1.2. Biomarcadores	
1.2.1. Definición	24
1.2.2. Biomarcadores en EPID	25
1.3. Krebs von den Lungen (KL-6)	
1.3.1. Definición y fisiopatología	30
1.3.2. Evidencia disponible sobre KL-6 sérico en EPID	30
1.3.2.1. Diagnóstico de las EPID y KL-6	31
1.3.2.2. EPID asociada a EAS y KL-6	35
1.3.2.3. Progresión de las EPID y KL-6	38
1.3.2.4. Hallazgos radiológicos y KL6	40
1.3.2.5. Monitorización y respuesta al tratamiento y KL-6 ..	40
1.3.3. KL-6 en el lavado broncoalveolar	41
1.3.4. Heterogeneidad en los valores de KL-6	41
2. JUSTIFICACIÓN	47
3. HIPÓTESIS	51

4. OBJETIVOS	55
5. MATERIAL Y MÉTODOS	59
5.1. Estudio 1: El valor diagnóstico de KL-6 en las EPID	
5.1.1. Diseño del estudio y aspectos éticos	61
5.1.2. Población del estudio	61
5.1.3. Variables	62
5.1.4. Análisis estadístico	63
5.2. Estudio 2: KL-6 en plasma y en lavado broncoalveolar como potencial biomarcador en la progresión de las EPID	
5.2.1. Diseño del estudio y aspectos éticos	65
5.2.2. Población del estudio	65
5.2.3. Variables	66
5.2.4. Análisis estadístico	67
6. RESULTADOS	69
6.1. Estudio 1: El valor diagnóstico de KL-6 en las EPID	71
6.2. Estudio 2: KL-6 en plasma y en lavado broncoalveolar como potencial biomarcador en la progresión de las EPID	79
7. DISCUSIÓN	78
8. CONCLUSIONES	92
9. LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN FUTURAS	94
10. BIBLIOGRAFÍA	96
11. ANEXO	117

RESUMEN

Las enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID) son un grupo heterogéneo de enfermedades cuyo diagnóstico, manejo y pronóstico continúa siendo un reto clínico. Los biomarcadores emergen como posibles herramientas para facilitar la detección de las EPID y predecir su progresión.

Krebs von den Lungen o KL-6 es una glicoproteína de alto peso molecular que pertenece a la familia de las MUC1. Se asocia al daño epitelial alveolar, por lo que sus niveles se incrementan en las EPID, principalmente ante la presencia de fibrosis pulmonar. KL-6 ha sido ampliamente estudiado como biomarcador sérico y en menor medida en lavado broncoalveolar (LBA), demostrando su potencial utilidad como herramienta diagnóstica y pronóstica. La mayor parte de los estudios se han realizado en población asiática, encontrándose amplias diferencias en los niveles de KL-6 en diferentes etnias. Esta heterogeneidad se justifica en parte por la influencia genética, dados los polimorfismos en el gen MUC1 en diferentes poblaciones.

Esta tesis doctoral se compone de 2 estudios que pretenden establecer un punto de corte de KL-6 en sangre periférica y en LBA que se asocie a la presencia de EPID y que potencialmente sirva como un biomarcador de progresión de enfermedad en una cohorte europea, en este caso con población española e italiana.

El primer estudio se centra en evaluar el papel de KL-6 sérico como biomarcador para el diagnóstico de EPID. El punto de corte óptimo de KL-6 para identificar a los pacientes con EPID se estableció en 465 U/ml. En el análisis de regresión logística, los niveles de KL-6 fueron un factor independiente para la presencia de EPID y presentaron una correlación inversa con las pruebas funcionales respiratorias (PFR). Sin embargo, no se observaron diferencias en sus valores según el patrón radiológico.

El segundo estudio valora KL-6 como biomarcador para identificar las EPID fibrosantes y potencialmente progresivas, analizando tanto sus niveles séricos como en LBA. Los niveles obtenidos en LBA no permitieron diferenciar pacientes con EPID fibrótica ni predecir su progresión. En cambio, las concentraciones obtenidas en sangre periférica permitieron establecer un punto de corte de KL-6 de 566 U/ml para identificar a pacientes con EPID fibrótica y de 641 U/ml para detectar el fenotipo fibrosante progresivo.

En conjunto, KL-6 es un potencial biomarcador para identificar la presencia de EPID, el predominio de fibrosis y la posible progresión de la enfermedad. Sin embargo, por las diferencias genéticas mencionadas previamente es imprescindible validar estos resultados en cohortes españolas más amplias, y explorar su integración en algoritmos diagnósticos y de seguimiento clínico para mejorar el abordaje personalizado de las EPID.

SUMMARY

Interstitial lung Diseases (ILD) are a heterogeneous group of diseases whose diagnosis, management, and prognosis remain a clinical challenge. Emerging biomarkers are being explored as potential tools to facilitate the detection of ILDs and predict their progression.

Krebs von den Lungen-6 (KL-6) is a glycoprotein with high-molecular-weight that belongs to the MUC1 family. It is associated with alveolar epithelial damage, leading to increased levels in ILDs, particularly in the presence of pulmonary fibrosis. KL-6 has been extensively studied as a serum biomarker and, to a lesser extent, in bronchoalveolar lavage (BAL), demonstrating its potential utility as a diagnostic and prognostic tool. Most studies have been conducted in Asian populations, but differences in KL-6 levels have been observed in other ethnic groups. This heterogeneity can be partially explained by genetic influences, particularly polymorphisms in the MUC1 gene across different populations.

The current work comprises two studies aimed at establishing KL-6 cut-off values in peripheral blood and BAL that correlate with the presence of ILD and may serve as potential biomarkers of disease progression in a European cohort, specifically in Spanish and Italian populations.

The first study focuses on evaluating the role of serum KL-6 as a biomarker for the diagnosis of ILD. In contrast to previously studied cohorts, the optimal KL-6 cut-off value for identifying patients with ILD was established at 465 U/mL. In logistic regression analysis, KL-6 levels were found to be an independent factor associated with the presence of ILD and showed an inverse correlation with pulmonary function test (PFT). However, no significant differences were observed in KL-6 levels across different radiological patterns.

The second study aims to assess KL-6 as a biomarker for identifying fibrotic and potentially progressive ILD, analyzing its levels both in serum and in BAL fluid. KL-6 levels measured in BAL were not effective in distinguishing patients with fibrotic ILD nor in predicting disease progression. Conversely, KL-6 levels in peripheral blood allowed for the determination of a cut-off value of 566 U/mL to identify patients with fibrotic ILD, and 641 U/mL to detect the progressive fibrosing phenotype.

Overall, KL-6 appears to be a promising biomarker for identifying the presence of ILD, the predominance of fibrosis, and potential disease progression. However, due to the aforementioned genetic variability, it is essential to validate these findings in larger Spanish cohorts and to explore the integration of KL-6 into diagnostic and clinical monitoring algorithms to improve the personalized management of ILD

1. INTRODUCCIÓN

1. 1. Enfermedad Pulmonar Intersticial Difusa

1.1.1. Conceptos generales

Las enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID) abarcan a más de 200 entidades que afectan principalmente a estructuras alvéolo-intersticiales, y en ocasiones a las vías aéreas y a la vascularización pulmonar (1). A pesar de compartir características clínicas, pueden diferir en su etiología, hallazgos radiológicos e histológicos. Son consideradas enfermedades minoritarias, siendo la incidencia estimada en España de 7,6 casos por 100.000 habitantes (2). Esta heterogeneidad supone un reto para su diagnóstico y predicción evolutiva.

Las últimas guías de clasificación de las EPID las dividen en 3 grupos: Neumonías Intersticiales Idiopáticas (NII), neumonías primarias o asociadas a procesos no bien definidos y neumonías de causa conocida o asociadas a procesos bien definidos (**Tabla 1**) (3).

1.1.2. Fisiopatología

El desarrollo de las EPID y aparición de fibrosis pulmonar continúan siendo a día de hoy áreas de gran interés e investigación dada su complejidad fisiopatológica, en la que participan diferentes factores y mecanismo interrelacionados. Entre ellos, los factores genéticos desempeñan un papel fundamental no sólo en aquellas enfermedades con un componente hereditario definido como la fibrosis pulmonar familiar (FPF) o la proteinosis alveolar pulmonar, sino también por su interacción con factores ambientales, que sumados a la susceptibilidad individual condicionan la aparición de algunas EPID. La alteración genética puede modular e influir en diversas vías patogénicas implicadas en la fibrosis pulmonar, como la disfunción del epitelio alveolar, la respuesta autoinmune aberrante o las anomalías en la síntesis o metabolismo del surfactante.

Grupo	Subgrupo	Entidades Clínicas
1. Neumonías Intersticiales Idiopáticas (NII)	A. Mayores Fibrosantes crónicas	Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI) Neumonía Intersticial No Específica (NINE)
	Relacionadas con el tabaco	Neumonía Intersticial Descamativa (NID) Bronquiolitis respiratoria asociada a EPID (BR-EPID)
	Agudas / Subagudas	Neumonía Organizada Criptogénica (NOC) Neumonía Intersticial Aguda (NIA)
	B. Ultraminoritarias	• Neumonía Intersticial Linfoide (NIL) • Fibroelastosis Pleuroparenquimatosa Idiopática (FEPP)
	C. No clasificables	
2. Neumonías Intersticiales de causa conocida o asociadas a enfermedades		• EPID asociada a enfermedades del tejido conectivo • Neumoconiosis • Neumonitis por hipersensibilidad • Enfermedades hereditarias asociadas
3. Otras enfermedades intersticiales pulmonares		• Sarcoidosis • Eosinofiliyas pulmonares • Proteinosis alveolar • Microlitiasis alveolar Histiocitosis Pulmonar de células de Langerhans (HPCL) Linfangioleiomiomatosis (LAM) • Amiloidosis • Otras

Tabla 1. Clasificación de las Neumonías Intersticiales.

En definitiva, en los individuos genéticamente predispuestos, las agresiones al epitelio celular desencadenan una respuesta reparadora anómala. Este proceso se caracteriza por la activación de cascadas proinflamatorias y profibróticas, con reclutamiento, proliferación, migración y activación de fibroblastos, conduciendo a un remodelado exagerado y descontrolado de la matriz extracelular (4, 5). La fibrosis pulmonar será, pues, el resultado final de una reparación anómala del daño epitelial que se puede perpetuar incluso en ausencia del estímulo inicial (6, 7) (ver **Figura 1**). Las

agresiones iniciales pueden tener un origen exógeno (la exposición al humo del tabaco, la inhalación de antígenos orgánicos o partículas inorgánicas, así como agentes infecciosos) o endógeno (como en las enfermedades autoinmune sistémicas).

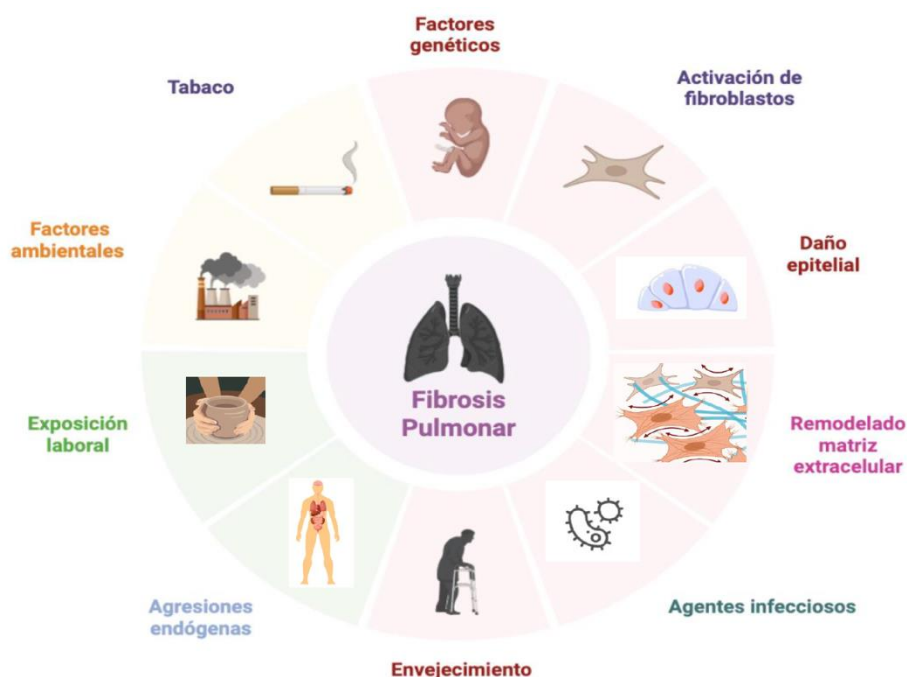


Figura 1. Factores asociados a la fibrosis pulmonar.

1.1.3. Proceso diagnóstico

El proceso diagnóstico de estas entidades requiere una anamnesis detallada, incluyendo en el interrogatorio los antecedentes familiares de EPID, síntomas sugestivos de enfermedades autoinmune sistémicas (EAS) y posibles exposiciones, tanto laborales como domiciliarias. La exploración física suele evidenciar la presencia de crepitantes secos en la auscultación y en ocasiones la presencia de acropaquia.

Dada la heterogeneidad de las EPID y considerando que entre un 5-30% de las EAS pueden debutar con afectación pulmonar (8-12), es fundamental realizar un estudio mediante analítica sanguínea que incorpore marcadores de autoinmunidad (anticuerpo antinuclear o ANA, factor reumatoide, perfil de miositis, entre otros).

El estudio funcional respiratorio se realiza en el diagnóstico y posteriormente como marcador de evolución de la enfermedad. En las EPID, el patrón restrictivo es el más común, y se caracteriza por una disminución de la capacidad pulmonar total (TLC), disminución de la capacidad vital forzada (FVC) y generalmente afectación de la capacidad de difusión del monóxido de carbono (DLCO).

La revisión de la iconografía previa disponible es importante para intentar establecer una línea temporal de la enfermedad, pero para el diagnóstico de la EPID es imprescindible la realización de una Tomografía Axial Computarizada de Alta Resolución (TACAR). Para un estudio de óptima calidad se requiere la obtención de cortes finos (< 2 mm), con imágenes adquiridas en inspiración completa y posteriormente la realización de un estudio espiratorio para descartar atrapamiento aéreo. Se puede realizar un estudio en posición de prono en aquellos pacientes con afectación mínima y sospecha de imágenes compatibles con áreas de hipoventilación. La revisión de las imágenes y definición del patrón radiológico se debe realizar preferentemente por un radiólogo experto en EPID (13).

La obtención de lavado broncoalveolar (LBA) mediante broncoscopia tiene valor diagnóstico sobre todo en la proteinosis alveolar, pero puede ser muy útil como herramienta de soporte en la sospecha de histiocitosis de células de Langerhans, neumonitis por hipersensibilidad, sarcoidosis o la neumonía eosinofílica.

El estudio histológico normalmente se reserva para aquellos casos en los que con las pruebas realizadas previamente no se obtiene un diagnóstico conclusivo. Las muestras histológicas se pueden obtener a través de biopsia transbronquial (pinzas convencionales o mediante criobiopsia) o quirúrgica.

Finalmente, el diagnóstico definitivo se establece en el comité multidisciplinar de EPID, siendo éste el “patrón oro”. La función principal del comité es analizar de forma

global todos los componentes asociados a los pacientes con EPID: clínico, funcional, radiológico, serológico e histopatológico. **(Figura 2).**

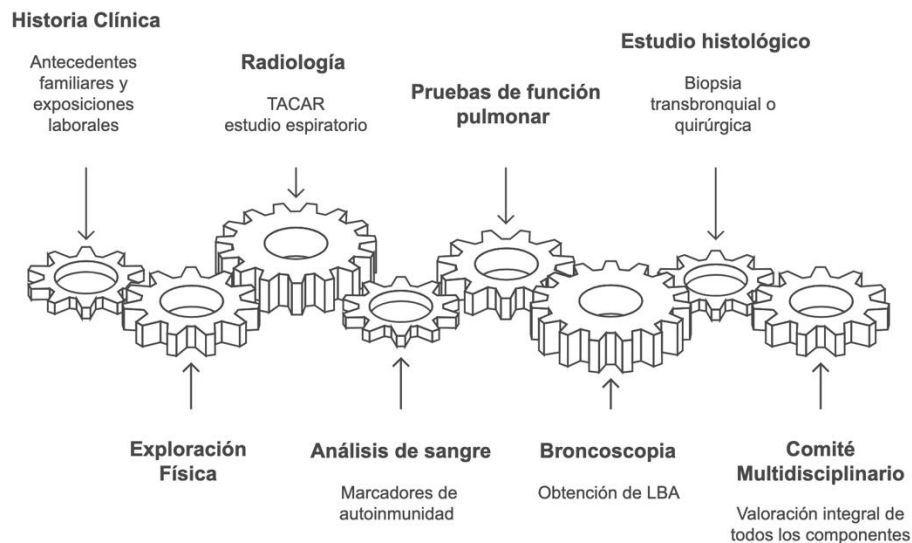


Figura 2. Proceso diagnóstico de las EPID.

1.1.4. Marcadores pronósticos

Se han identificado múltiples factores de riesgo para la progresión de las EPID. Entre ellos, destacan la edad avanzada, el sexo masculino y el hábito tabáquico. Una baja FVC y DLCO al diagnóstico conllevan un aumento del riesgo de progresión a corto plazo (14, 15).

Específicamente en FPI, Du Bois *et al.* (16) demostraron que los pacientes con una disminución de FVC $\geq 10\%$ en 24 semanas tenían casi 5 veces más riesgo de mortalidad en el año consecutivo, así como el descenso de $\geq 10\%$ de la DLCO en 6-12 meses (17).

Las alteraciones genéticas como el acortamiento telomérico están descritas como factores asociados a la progresión (18). Otras variables como el patrón radiológico de NIU, la extensión de la fibrosis pulmonar y la presencia de hipertensión pulmonar también se han asociado a un peor pronóstico (17-19). Respecto al test de la marcha de 6

minutos (TM6M), la disminución de la distancia recorrida (> 50 metros) y la saturación arterial periférica media de oxígeno ($\leq 88\%$) son predictores de mortalidad en FPI (20) (y en la práctica clínica, extrapolable a otras EPID).

1.1.5. Manejo terapéutico

El tratamiento de estas enfermedades también puede ser muy heterogéneo en función de su etiología, clínica y pronóstico. Algunas entidades disponen de tratamientos específicos como el caso de la LAM, la proteinosis alveolar o las EPID asociadas a EAS. En cambio, las EPID fibrosantes progresivas, que incluyen la FPI, la FPF y la Fibrosis Pulmonar Progresiva (FPP) de otras etiologías, requieren el uso de agentes antifibróticos (pirfenidona y nintedanib). Dentro de las medidas terapéuticas se incluyen el soporte no farmacológico (que engloba la oxigenoterapia y la rehabilitación respiratoria), la detección y tratamiento de comorbilidades (19) y el soporte sintomático o paliativo en fases terminales. Finalmente, la valoración de trasplante pulmonar en casos seleccionados se debe realizar de manera precoz.

Este manejo holístico debe realizarse dentro del concepto de la medicina personalizada. Para ello, el diagnóstico e intervenciones precoces son esenciales para el control de la enfermedad y optimización de la calidad de vida de estos pacientes.

1. 2. Biomarcadores

1.2.1. Definición

El término biomarcador se define como “aquella sustancia que indica la presencia de material biológico o de un proceso fisiológico y que se emplea para diagnosticar una enfermedad”. En nuestro ámbito, el término se aplica a parámetros genéticos, celulares o bioquímicos útiles para el diagnóstico, pronóstico o monitorización de una enfermedad:

“una característica que se mide y evalúa objetivamente como indicador de procesos biológicos normales, procesos patógenos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica” (21). El biomarcador ideal debería cumplir una serie de requisitos:

- Reproducibilidad
- Métodos poco invasivos de obtención de muestras
- Alta sensibilidad si se utilizan como método de cribado
- Alta especificidad si se utilizan como marcadores de confirmación
- Disponer de un amplio rango dinámico, para su utilización en el seguimiento
- Coste asequible

1.2.2. Biomarcadores en EPID

En los últimos años la investigación en EPID ha identificado potenciales biomarcadores dado el creciente interés en la búsqueda de métodos menos invasivos que contribuyan al diagnóstico y a la monitorización de estos pacientes. No obstante, su implementación en el ámbito asistencial sigue siendo limitada y no se incluyen en las guías de práctica clínica nacionales e internacionales. Esto se debe a diferentes motivos, entre ellos las limitaciones técnicas entre laboratorios y países, como en el caso de los biomarcadores genéticos, que requieren una infraestructura especializada y una interpretación específica y experta (22). Otra razón es la heterogeneidad observada en los puntos de corte de estos marcadores entre los estudios realizados, así como la variabilidad entre el método de cuantificación del mismo (ELISA, secuenciación, inmunoensayo). Para obtener una validación e inclusión en futuras guías, es necesario realizar estudios multicéntricos, prospectivos, con suficiente potencia estadística y con protocolos estandarizados. Los diferentes tipos de biomarcadores estudiados en EPID se pueden agrupar según las vías patogénicas implicadas en la fibrosis pulmonar (**Figura 3**).

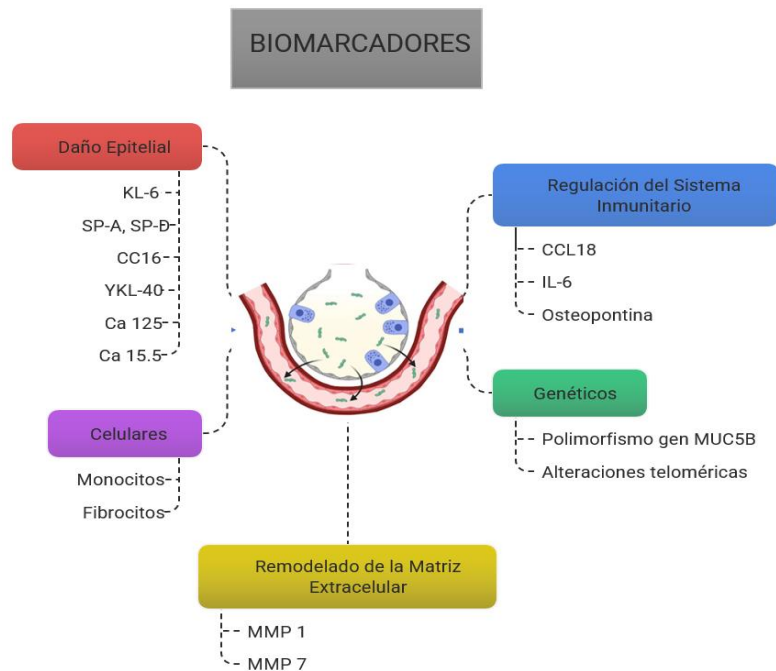


Figura 3. Principales biomarcadores estudiados en EPID.

1.2.2.1. Biomarcadores genéticos

Polimorfismo gen MUC5B

En la región promotora del gen mucina 5B (MUC5B), localizado en el cromosoma 11 (rs3570590), se ha identificado un polimorfismo que podría ser un factor de riesgo para el desarrollo de fibrosis pulmonar, tanto en casos de FPF como en FPI esporádicas (23). Este polimorfismo se ha relacionado más recientemente con otras EPID, como la asociada a artritis reumatoide (24, 25) o la neumonitis por hipersensibilidad (26).

Alteraciones teloméricas

Representan otro grupo de biomarcadores genéticos bien estudiados. Se relacionan con la longitud de los telómeros y las mutaciones en enzimas con actividad telomerasa, crítica en la regulación del acortamiento telomérico. Estas alteraciones

pueden estar presentes en pacientes con FPF y en FPI esporádicas (27) aunque pueden aparecer en otras enfermedades pulmonares crónicas (28).

1.2.2.2. Biomarcadores celulares

Monocitos

Son células fagocíticas mononucleares derivadas de precursores hematopoyéticos en la médula ósea que se diferencian en macrófagos o células dendríticas tras su migración a diferentes tejidos (29). En las EPID, se asocian a los procesos de inflamación crónica y desregulación inmunitaria (30). En un estudio retrospectivo (31) se observó que en los pacientes con FPI un recuento de monocitos mayor de 0,6 GI/L (gigas por litro) se asociaba a un mayor riesgo de progresión, hospitalización y mortalidad al año respecto a aquellos pacientes con un recuento inferior a 0,6 GI/L. Así, su uso como biomarcador tiene un gran potencial por la facilidad en su obtención (analítica sanguínea con hemograma) y el bajo coste de su análisis.

1.2.2.3. Biomarcadores asociados al remodelado de la matriz extracelular

La utilización de biomarcadores proteicos en la fibrosis pulmonar se evaluó dentro del estudio PROFILE. (32). En líneas generales, se observó un aumento de los colágenos tipo 3 y 6 en pacientes con FPI respecto a controles sanos. Además, se encontraron diferencias en los niveles de este tipo de colágenos entre pacientes con enfermedad fibrosante estable y progresiva.

Metaloproteinasas de la matriz (MMP)

Son enzimas proteolíticas cuya principal función es mantener la homeostasis en la formación de la matriz extracelular (MEC), participando en procesos fisiológicos como

la angiogénesis o reparación de heridas. Por tanto, el desequilibrio entre las metaloproteinasas y sus inhibidores tisulares (TIMP) conlleva alteraciones en el remodelado de la matriz.

En la FPI, las MMPs pueden promover respuestas fibróticas a través de diversos mecanismos: aumentando los niveles o la actividad de los mediadores profibróticos, promoviendo la migración anormal de las células epiteliales y de los fibrocitos, e induciendo el cambio de fenotipos de los macrófagos M1 a M2 (33).

Existen diferentes tipos de MMP, entre las cuales destaca la MMP1, que presenta una mayor expresión y es la encargada de degradar el colágeno fibrilar (34). La MMP7 es capaz de degradar múltiples componentes de la MEC. Se ha observado su expresión en la superficie de las células epiteliales y los macrófagos alveolares en pacientes con FPI (35) aunque no es específica de esta enfermedad y puede estar elevada en otras EPID.

La MMP 7 también se ha evaluado en LBA, siendo más elevada en pacientes con FPI (36) que en controles sanos. En otro estudio, se observó que la elevación combinada de MMP 7 y SP-A fue un predictor de supervivencia en pacientes con EPID cuando coexistía con una mayor edad, el descenso de la FVC y ciertas anomalías en la TACAR (37). En resumen, las MMPs desempeñan un papel clave en la regulación de la MEC y, por tanto, en el desarrollo de la fibrosis, destacando la MMP-7 por su posible valor pronóstico en las EPID.

1.2.2.4. Biomarcadores asociados a la regulación del sistema inmunitario

Ligando asociado a la citocina 18 (CCL18)

Se trata de una proteína derivada de los macrófagos alveolares que activa los fibroblastos y la producción de tejido conectivo. En un estudio prospectivo en pacientes con FPI, niveles en sangre > 150 ng/ml se asociaron de manera independiente a una menor supervivencia (38). En otro estudio, el aumento de CCL18 en sangre se correlacionó de

manera inversa con la DLCO y TLC (39), lo que indica un posible papel como biomarcador asociado a la progresión de la enfermedad.

Interleucina-6 (IL-6)

Es una de las interleucinas más estudiadas al presentar una acción pro-inflamatoria y efectos pleiotrópicos. En la EPID asociada a esclerosis sistémica (SSc), se ha observado que sus niveles en sangre preceden el descenso de FVC, DLCO y se asocian a un aumento de mortalidad (40). La principal limitación para su uso es su inespecificidad, ya que se puede observar en otras enfermedades inflamatorias, procesos infecciosos o en daño inflamatorio extrapulmonar. De hecho, se observó un aumento de IL-6 en los pacientes con síndrome de distrés respiratorio del adulto (SDRA) asociado a la neumonía por el coronavirus tipo 2 (SARS-CoV2) (41).

1.2.2.5. Biomarcadores de daño epitelial

Se trata probablemente del grupo con más moléculas estudiadas. Dentro de ellos, destacaremos las proteínas de surfactante y el KL-6, al que dedicaremos un apartado específico.

Proteínas de surfactante (SP)

Las proteínas de surfactante A y D son glucoproteínas hidrofílicas que reducen la tensión superficial y colapso alveolar, y que forman parte del sistema inmunitario innato pulmonar. Son secretadas por las células epiteliales alveolares tipo II y por las células cuboides de los bronquiolos distales. Se han relacionado con la regulación de la síntesis, degradación y depósito de las proteínas de la MEC, así como con la proliferación y actividad fibroblástica (42). En las EPID, se han observado niveles elevados tanto de SP-A como SP-D en pacientes con FPI respecto a controles sanos, así como en SSc progresiva asociada a EPID (43).

1.3. Krebs von den Lungen 6 (KL-6)

1.3.1. Definición y fisiopatología

Krebs von den Lungen o KL-6 es una glicoproteína de alto peso molecular que se expresa en las células alveolares o neumocitos tipo II (44). Pertenece a la familia de las mucinas (MUC1) y participa en procesos de reparación del epitelio alveolar, por lo que su aumento se relaciona con un incremento de la actividad inflamatoria. Así mismo, promueve la proliferación y supervivencia de los fibroblastos pulmonares (45) y regula la diferenciación de miofibroblastos (46), teniendo un papel en la génesis y evolución de la fibrosis pulmonar.

Su detección en sangre periférica se debe al aumento en su producción tras el daño y regeneración del epitelio alveolar, con la consecuente liberación al torrente sanguíneo por el incremento de la permeabilidad capilar (44).

1.3.2. Evidencia disponible de KL-6 sérico en EPID

La primera descripción de KL-6 como marcador específico de las EPID se realizó en 1989, a raíz de un estudio realizado con más de 300 pacientes, que incluyó 77 con EPID, 91 con otras enfermedades pulmonares (enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), cáncer de pulmón) y 160 controles sanos. El análisis del KL-6 se realizó mediante técnicas de inmunoensayo (44). Las principales conclusiones fueron que los niveles séricos de KL-6 estaban elevados en pacientes con EPID, sobre todo con FPI, siendo su aumento sérico menos significativo en otras enfermedades pulmonares (< 500 U/ml) y prácticamente inexistente en controles sanos. Estos hallazgos se correlacionaron, además, con una mayor afectación radiológica y deterioro funcional, principalmente en la medición de la DLCO.

Desde entonces, se han llevado a cabo multitud de estudios con cohortes más amplias, principalmente en población asiática. Tanto es así que en Japón KL-6 se utiliza

actualmente como herramienta de monitorización de pacientes con EPID en la práctica clínica habitual (47).

KL-6 ha sido evaluado en diferentes tipos de EPID, especialmente en la FPI. Los estudios iniciales estuvieron dirigidos principalmente a su papel como herramienta diagnóstica, pero dada su inespecificidad en distinguir entre los subtipos de EPID, su utilidad científica se centró en su valor pronóstico.

1.3.2.1 Diagnóstico de las EPID y KL-6

El principal atractivo de una herramienta como KL-6 a nivel diagnóstico es establecer un punto de corte que sirva al clínico como alarma o “*red flag*” que ponga en marcha otras herramientas diagnósticas más convencionales y validadas que confirmen la patología. En esta línea, se han llevado a cabo una serie de estudios con una variabilidad muy importante entre ellos, de los cuales haremos un breve resumen.

El primer punto de corte de KL-6 sérico para detectar a pacientes con EPID es el de la serie de Kohno *et al.*, que lo estableció entre 500-700 U/ml. Los estudios posteriores, realizados también en población asiática, de carácter retrospectivo y tamaño muestral variable (ver **Tabla 2**), proporcionaron valores similares (**Figura 4**), en general con alta sensibilidad y especificidad. La evidencia obtenida permitió establecer como punto de corte para la detección de EPID (siempre en población asiática) un valor de KL-6 sérico de 500 U/ml.

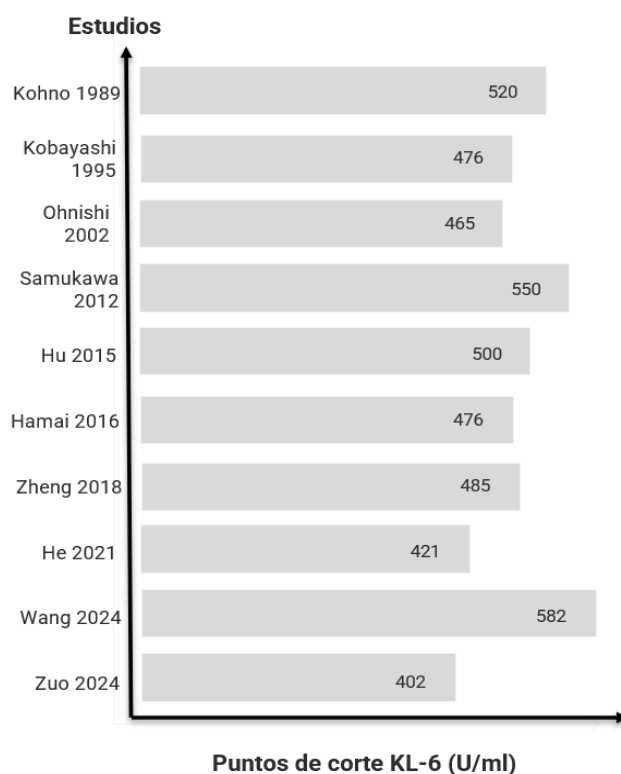


Figura 4. Puntos de corte de KL-6 de los principales estudios realizados en EPID.

Más recientemente, Wang *et al.* (48) realizaron un meta-análisis y revisión sistemática para valorar la eficacia de KL-6 como herramienta diagnóstica en EPID fibrosante, incluyendo 16 estudios en total. El valor de corte promedio obtenido fue de 511 U/ml con una sensibilidad de 87%, especificidad de 91% y área bajo la curva (AUC) de 0,965. Sin embargo, la principal limitación del estudio fue la gran heterogeneidad de los trabajos incluidos, con valores de KL-6 muy dispares, con rangos entre 300-1000 U/ml según la población y la metodología. Curiosamente, en ese meta-análisis, se identificó la raza como fuente de heterogeneidad en la sensibilidad, y la metodología en la especificidad.

Autor, año	País	Tamaño muestral	Punto de corte KL-6 (U/ml)	S (%), E (%), AUC	Prospectivo/ retrospectivo
Kohno, 1989 (44)	Japón	237	520	Desconocido	Retrospectivo
Kobayashi, 1995 (49)	Japón	112	476	E (95%)	Retrospectivo
Ohnishi, 2002 (50)	Japón	115	465	S (93,9%) E (96,3%) AUC 0,95	Retrospectivo
Samukawa, 2012 (51)	Japón	74	550	E (95%) AUC 0,938	Retrospectivo
Hu, 2015 (52)	China	1084	500	S (77,7%) E (94,5%) AUC 0,92	Retrospectivo
Hamai, 2016 (53)	Japón	197	476	S (96,9%) E (98,5%) AUC 0,99	Retrospectivo
Zheng, 2018 (54)	China	133	485	S (85%) E (90%) AUC 0,91	Retrospectivo
He, 2021 (55)	China	138	421	S (91,3%) E (95,6%) AUC 0,933	Retrospectivo
Wang, 2024 (56)	China	222	582	S (76,3%) E (91%) AUC 0,9	Retrospectivo
Zuo, 2024 (47)	China	379	402	S (77,4%) E (93,4%) AUC 0,9	Retrospectivo

Tabla 2. Estudios realizados sobre KL-6 en EPID. S: sensibilidad; E: especificidad; AUC: área bajo la curva.

Los niveles de KL-6 pueden diferir en función de la EPID estudiada, puesto que la fisiopatología subyacente y comportamiento de la enfermedad puede variar entre las diferentes patologías. Así, la FPI, paradigma de la fibrosis pulmonar, presenta niveles más elevados de KL-6, tanto en LBA como en sangre periférica, respecto a otras enfermedades como la sarcoidosis estadio I, la neumonitis por hipersensibilidad y la EAS (57). En el caso de las Neumonías Intersticiales No Específicas fibróticas (NINEf), un estudio con una cohorte de 75 pacientes describió un valor medio de KL-6 sérico de 1787

± 1247 U/ml. Al clasificar esas NINEf en la categoría de IPAF (Interstitial Pneumonia with Autoimmune Features) y no IPAF, los valores de KL-6 fueron significativamente más elevados en el grupo IPAF (58).

Respecto a la Neumonitis por hipersensibilidad (NH) se han realizado múltiples estudios para evaluar el KL-6 en suero (**Tabla 3**), y la mayoría de ellos también fueron realizados en población asiática. En general, se observa una gran heterogeneidad por el carácter retrospectivo y el reducido tamaño muestral, lo que dificulta la determinación de un punto de corte universal. A nivel europeo también disponemos de estudios sobre KL-6 en NH, aunque siguen siendo cohortes relativamente pequeñas y con valores muy diferentes entre sí.

Destacamos el estudio de Okamoto *et al.* por sus hallazgos: se estableció un punto de corte de 1115 U/ml de KL-6 sérico para diferenciar NH fibrótica de FPI, siendo, de manera inesperada, el valor de KL-6 más elevado en los pacientes con Neumonitis por hipersensibilidad (59).

KL-6 también ha sido explorado en la sarcoidosis, silicosis y asbestosis. La mayoría de estudios se ha realizado en sarcoidosis, encontrando niveles más altos respecto a controles (60-62). Además, algún estudio mostró valores de KL-6 progresivamente más elevados en función de los diferentes estadios de la enfermedad, con niveles más altos en pacientes con sarcoidosis estadio IV o fibrótico (63).

Autor, año	País	Tamaño muestral	KL-6 en NH (U/ml)	KL-6 en controles (U/ml)
Takahashi, 2020 (64)	Japón	242	1263 ± 644	207 ± 92,37
Janssen, 2005 (65)	Holanda	87	139,6 ± 894,2	207 ± 66
Yoshikawa, 2007 (66)	Japón	49	2790,4 ± 2607,6	265,8 ± 136,2
Nukui, 2019 (67)	Japón	111	1236 ± 1072,8	191 ± 70,2
d'Alessandro, 2020 (68)	Italia	56	1691 ± 1643	268 ± 148
Mostafa*, 2021 (69)	Egipto	62	1165 ± 283	138,2 ± 69,5
Mostafa **, 2021 (69)	Egipto	44	2020,83 ± 870,77	138,2 ± 69,5
Sanchez-Diez, 2022 (70)	España	91	2805,6 ± 5346,9	283,7 ± 282,6

Tabla 3. Estudios sobre Neumonitis por hipersensibilidad y niveles séricos de KL-6. KL-6: Krebs von den Lungen-6; NH: Neumonitis por hipersensibilidad. *Neumonitis por hipersensibilidad fibrótica; ** Neumonitis por hipersensibilidad no fibrótica. La tabla reúne los estudios con mayor tamaño muestral y realizados en diferentes países.

1.3.2.2 EPID asociada a EAS y KL-6

La identificación y tratamiento de la afectación intersticial en los pacientes con EAS es fundamental por el gran impacto en su morbimortalidad, principalmente en la SSc y en la Artritis Reumatoide (AR) (71, 72). En la práctica clínica, disponemos de recomendaciones de cribado de EPID en ambas enfermedades que se basan fundamentalmente en una anamnesis dirigida sobre síntomas respiratorios, auscultación pulmonar y valoración mediante PFR y pruebas de imagen (73, 74). En el caso de la SSc, se recomienda realizar una TACAR a todos los pacientes al inicio de la valoración de su enfermedad de base (75). Por eso, el uso de herramientas no invasivas como los biomarcadores podría optimizar el manejo diagnóstico, ayudando a delimitar los pacientes con alto riesgo de presentar EPID.

Así, KL-6 ha sido evaluado también en las EAS asociadas a EPID y en el grupo catalogado como IPAF. La **Tabla 4** resume algunos de los estudios realizados. A pesar de la heterogeneidad de los trabajos y de los resultados del punto de corte, en general, se ha observado una buena correlación entre el grado de afectación radiológica, el funcionalismo pulmonar y KL-6 (76-78), por lo que su utilidad se extiende a este tipo de patologías.

Uno de los estudios más interesantes es el realizado por Wang *et al.* (79), en el que se propuso un algoritmo, basado en estudios previos y la experiencia clínica del grupo, para la detección precoz de EPID en pacientes con AR. Éste consistía en la realización de una ecografía y la medición de KL-6 en sangre periférica a todos los pacientes con sintomatología respiratoria. Ante la presencia de un total de líneas B de > 10 en la ecografía torácica y/o un valor de KL-6 > 500 U/ml, se recomendaba la realización de PFR y TACAR para confirmar la presencia de EPID.

Respecto a las IPAF en concreto, Xue *et al.* realizaron un estudio para valorar los niveles de KL-6 y SP-A en este grupo. Los niveles basales de KL-6 fueron más elevados que en controles y presentaban una correlación inversa con la FVC y DLCO. Curiosamente, se encontró una correlación del fenómeno de Raynaud con los niveles de KL-6. En el seguimiento realizado a las 52 semanas se observó que los niveles de KL-6 se correlacionaron con la progresión radiológica (80).

Uno de los primeros estudios europeos en pacientes con SSc (81) describió KL-6 como biomarcador asociado a presencia de EPID, encontrando una asociación con el grado de fibrosis en la TACAR, la afectación cutánea y la actividad de la enfermedad.

El análisis de KL-6 en EAS-EPID se ha extendido a poblaciones distintas a la asiática, incluyendo cohortes más amplias, especialmente en SSc. Sin embargo, aún se

requiere evidencia más sólida e idealmente estratificada por subgrupos de EAS para establecer de manera más precisa puntos de corte de KL-6.

Autor, año	País	Tamaño muestral	Enfermedad	Punto de corte KL-6 (U/ml)	S (%), E (%), AUC
Hant, 2009 (82)	EEUU	66	SSc	500	S (78,8%) E (90%) AUC 0,90
Doishita, 2011 (83)	Japón	240	EAS	509	S (79%) E (93%) AUC 0,89
Fathi, 2011 (84)	Suecia	47	PM / DM	549	S (83%) E (100%)
Benyamine, 2018 (85)	Francia	75	SSc	872	S (77,7%) E (95%) AUC 0,88
Elhai, 2019 (86)	Noruega y Francia	427	SSc	923	S (44%) E (85%) AUC 0,69
Ma, 2020* (87)	China	155	EAS	617	S (82%) E (62%) AUC 0,76
Wang, 2021 (79)	China		AR	500	S (78,8%) E (90%) AUC 0,9
Zhou, 2023 (88)	China	524	EAS	532	AUC 0,73
Xing, 2024 (89)	China	225	EAS Tratados	255,88	AUC 0,92
			No tratados	401	

Tabla 4. Puntos de corte de KL-6 de los principales estudios realizados en EPID. *El estudio realizado por Ma, 2020 (76), es el único con carácter prospectivo de esta serie. S: Sensibilidad; E: Especificidad; AUC: Área bajo la curva; SSc: Esclerosis Sistémica.; EAS: Enfermedad Autoinmune Sistémica; PM: Polimiositis; DM: Dermatomiositis; AR: Artritis Reumatoide.

1.3.2.3 Progresión de las EPID y KL-6

El otro gran atractivo de este biomarcador es su potencial capacidad para predecir la progresión de la enfermedad, de nuevo de forma no invasiva. En este contexto, uno de los retos principales es correlacionar la evolución de KL-6 con las PFR y con los hallazgos radiológicos, que siguen siendo el “patrón de oro” con ese propósito. Así, la mayoría de los estudios sobre KL-6 en cuanto a progresión de EPID han evaluado su asociación con alteraciones en las PFR (57, 58), revelando una correlación inversa entre KL-6, FVC y DLCO, de forma que mayores niveles de KL-6 se correlacionaron con una peor capacidad funcional respiratoria. Por ello, el interés en el uso de KL-6 como marcador de gravedad, progresión y pronóstico se ha incrementado en los últimos años (90-92). Desde el punto de vista radiológico y en relación a la progresión, se ha observado que niveles elevados de KL-6 guardan relación con una mayor extensión de fibrosis en la TACAR (93, 94) y en el caso de la FPI, valores de KL-6 $> 800-1000$ U/ml se asociaron también a una peor supervivencia (95, 96).

En las EPID asociadas a AR, Kim *et al.* objetivaron que un nivel de KL-6 ≥ 640 U/ml se correlacionó de forma independiente con un patrón NIU en la TACAR, mientras que un nivel de KL-6 > 685 U/ml fue un predictor independiente de mortalidad (97). La edad avanzada, el género masculino, la FVC y el patrón NIU fueron otros predictores asociados a mortalidad.

Un estudio de este año evaluó la utilidad de KL-6 sérico y otros marcadores para valorar el deterioro de la función pulmonar y predecir la progresión a corto plazo de la EPID en pacientes con criterios de IPAF (98). Los niveles de KL-6 fueron más elevados en los pacientes con IPAF y EAS-EPID en comparación a los pacientes con EAS sin EPID, aunque no se encontraron diferencias significativas para distinguir estas dos

entidades. Además, KL-6 mostró una correlación positiva con la evaluación cuantitativa de la EPID en la TACAR.

La progresión de la EPID también se ha explorado en pacientes con SSc tratados con ciclofosfamida o micofenolato (99). En ese estudio, niveles elevados de KL-6 se asociaron a la progresión de la EPID y deterioro de las PFR durante un año de seguimiento. Así mismo, estos niveles disminuyeron después del inicio del tratamiento con ambas terapias.

Las mediciones seriadas de KL-6 podrían proporcionar una información pronóstica más específica ya que la tendencia de los niveles puede ser más predictiva que una única medición basal (100). En esta línea, un estudio evalúa la significación pronóstica de los cambios seriados y a largo plazo de los niveles séricos de KL-6. Su aportación respecto a trabajos previos radica en la mejora de la precisión pronóstica cuando se combinan los niveles iniciales de KL-6 con los cambios observados en las mediciones seriadas. De hecho, los autores sugieren que los cambios seriados podrían estar más asociados a un peor pronóstico respecto a la medición única e aislada de KL-6. En ese sentido, se observó que un incremento de 51.8 U/ml al año se correlacionaba con un peor pronóstico (95).

En contrapartida, un meta-análisis centrado principalmente en el riesgo de desarrollar una exacerbación aguda (EA) y en la supervivencia de pacientes con FPI, no encontró una relación estadísticamente significativa entre las concentraciones de KL-6 y la mortalidad en FPI (101). Sin embargo, hay un importante sesgo geográfico (la mayoría de estudios incluidos eran en poblaciones asiáticas) y heterogeneidad por la variedad en el método de medición de KL-6 y la falta de estudios prospectivos.

1.3.2.4 Hallazgos radiológicos y KL-6

En pacientes con EPID, la TACAR es una prueba fundamental para el diagnóstico y valoración de progresión o exacerbaciones de la enfermedad, por lo que en todos los estudios realizados se incluye de manera obligatoria esta exploración. Sin embargo, hay pocos trabajos que valoren de manera específica la relación entre los hallazgos radiológicos y KL-6 (102-104).

Ichiyasu *et al.* (105) valoraron KL-6 como marcador de extensión global en las NINE. En la evaluación específica entre patrones inflamatorios o fibrosantes, no se encontraron correlaciones significativas con los niveles de KL-6 (pero sí con SP-D). Sin embargo, tras la realización de tratamiento dirigido (corticoterapia y en ocasiones otros agentes inmunosupresores) el cambio en la extensión del vidrio deslustrado y bronquiectasias de tracción mostró una alta correlación con los cambios en niveles de KL-6. En la misma línea de investigación, un estudio más reciente (106) comparó los niveles de KL-6 con diferentes hallazgos radiológicos que incluyeron la reticulación, las opacidades en vidrio deslustrado (GGO), la consolidación y la panalización. De éstos, la reticulación mostró la correlación positiva más fuerte con KL-6, siendo considerada por los autores el signo más temprano de progresión radiológica. Dicha correlación fue estadísticamente significativa en pacientes con una extensión de $\geq 5\%$ en la TACAR. Cabe destacar que el estudio utilizó el punto de corte clásico de 500 U/ml, siendo la extensión de la reticulación mayor en pacientes con $KL-6 > 500U/ml$.

1.3.2.5 Monitorización y respuesta al tratamiento y KL-6

El uso de mediciones seriadas de KL-6 para valorar la respuesta terapéutica dirigida también se ha explorado, sobre todo como marcador de eficacia del tratamiento con antifibróticos.

Okuda *et al.* (107) evaluaron los niveles de KL-6 en pacientes con FPI tratados con pirfenidona. El valor medio de KL-6 previo al inicio de la terapia fue 1428 U/ml, y tras el inicio de la terapia antifibrótica esos niveles disminuyeron de manera significativa. Sin embargo, los valores precisos de variación de KL-6 que podrían predecir la progresión de la enfermedad o respuesta terapéutica no fueron especificados.

Respecto al nintedanib, el estudio más relevante mostró un valor medio de KL-6 previo a la terapia de 1043 U/ml en los 22 pacientes con FPI incluidos, aunque no se encontraron diferencias significativas en el cambio de los niveles séricos a los 6 meses del tratamiento (108). En contrapartida, otro estudio retrospectivo en pacientes con FPI reportó que un aumento en los niveles de KL-6 a corto plazo ($\geq 5\%$ en 1 mes) fue un predictor de progresión de enfermedad a pesar de la terapia antifibrótica, tanto con pirfenidona como con nintedanib (109).

Finalmente, y quizás el estudio más interesante, aunque con una cohorte pequeña, evaluó la utilidad en la práctica clínica de varios biomarcadores en pacientes con FPI en tratamiento con antifibróticos. El estudio mostró correlaciones negativas entre los niveles séricos de KL-6 con la FVC y la DLCO en diferentes mediciones durante el seguimiento. Respecto a los pacientes con enfermedad estable, aquellos que progresaron durante el primer año de terapia presentaron niveles de KL-6 > 1328 U/ml, con una especificidad de 72% y sensibilidad de 70%. Se añadió un punto de corte un poco más elevado respecto a series previas, de 673,95 U/ml, con una mayor sensibilidad y especificidad para distinguir la FPI de los controles (94).

1.3.3. KL-6 en lavado broncoalveolar

Paralelamente a la investigación de KL-6 como biomarcador sérico, se ha explorado su uso, aunque en menor medida, como biomarcador en lavado broncoalveolar

(LBA). La realización de una broncoscopia con LBA es un procedimiento habitual en el estudio de las EPID, con escasas complicaciones. Sin embargo, sigue siendo un método invasivo de obtención de muestras y quizás no accesible en todos los centros. Por eso, comparativamente a KL-6 sérico, podría dificultar su implementación en la práctica clínica.

Numerosos estudios, predominantemente en población asiática, se centraron en valorar su utilidad en el diagnóstico y progresión de las EPID, dado que se considera una muestra más directa de los cambios que ocurren en el espacio alveolo-capilar. La correlación entre los niveles de KL-6 en sangre y en LBA también ha sido motivo de investigación (110-113).

De la misma forma que en los estudios en sangre periférica, las cohortes son pequeñas, la mayoría de los estudios son retrospectivos y existe una gran heterogeneidad en la metodología, por lo que es difícil establecer un valor de corte único que sea válido y aplicable a diversas poblaciones y contextos.

Uno de los primeros trabajos realizados (114) comparó los niveles en LBA entre sujetos sanos y pacientes con EPID, incluyendo FPI, sarcoidosis y NH. Se estableció un punto de corte de 340 U/ml para considerar un nivel de KL-6 en LBA como anormalmente alto y que, por tanto, podría diferenciar entre sanos y enfermos. En este estudio, se encontró una correlación significativa entre los niveles de KL-6 en LBA y en sangre.

Niveles inferiores fueron descritos en un estudio exploratorio para predecir la gravedad de las EPID fibrosantes. KL-6 en LBA mostró una correlación inversa con la FVC y la DLCO y el punto de corte de $\geq 72,32$ U/ml predijo enfermedad grave (clasificada como $FVC < 50\%$ y $DLCO < 35\%$). Este estudio no midió los niveles de KL-6 en suero ni su correlación con los del LBA (115).

En cambio, en pacientes con FPI y NINE idiopática se observaron niveles muy diferentes y más elevados (116). Las concentraciones promedio de KL-6 en LBA fueron de más de 700 U/ml en FPI y NINE, sin observarse diferencias entre grupos, con niveles significativamente más bajos en el grupo de controles sanos. Respecto las PFR, el punto de corte de KL-6 asociado a valores más bajos de FVC y DLCO fue de > 1048 U/ml.

Un estudio específico de NH fibrótica también encontró valores medios de KL-6 significativamente más elevados en LBA y en suero respecto trabajos previos. En este caso, se observó una correlación directa positiva y significativa entre las concentraciones de KL-6 en LBA y en suero (117).

En pacientes con sarcoidosis, los niveles de KL-6 en sangre se correlacionaron con el recuento CD4 + en LBA y la ratio CD4/CD8 (118). A destacar, el estudio de d'Alessandro *et al.* (111), en cohorte italiana, que estableció niveles en LBA de KL-6 > 221 U/ml para diferenciar la sarcoidosis de otras EPID.

El trabajo más reciente en este aspecto analizó la expresión de KL-6 sérico y en LBA en pacientes con FPP y no progresiva. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos, siendo los niveles de KL-6 tanto en sangre periférica como en LBA más elevados en las formas progresivas. A pesar de los hallazgos, no se establecieron puntos de corte óptimos para detectar la progresión de la enfermedad (119).

En global, la evidencia científica actual muestra que los niveles de KL-6 en LBA están elevados en pacientes con EPID en comparación con sanos, aunque los valores difieren según las cohortes estudiadas. Así mismo, muchos estudios no establecen un punto de corte ni valoran su correlación con los niveles en sangre, lo que reafirma la necesidad de aumentar la evidencia sobre KL-6 en LBA.

1.3.4. Heterogeneidad en los valores de KL-6

Desde su descripción en 1989, el número de publicaciones sobre KL-6 en las EPID ha incrementado significativamente (**Figura 5**). A pesar de ello, la evidencia actual es muy heterogénea, con valores de corte que varían y que pueden llegar a ser extremadamente dispares. Esto se justifica, al menos parcialmente, por diferencias metodológicas de los estudios, falta de estandarización en los protocolos de medición y puntos de corte, selección del objetivo del estudio y la gran variedad de EPID incluidas.

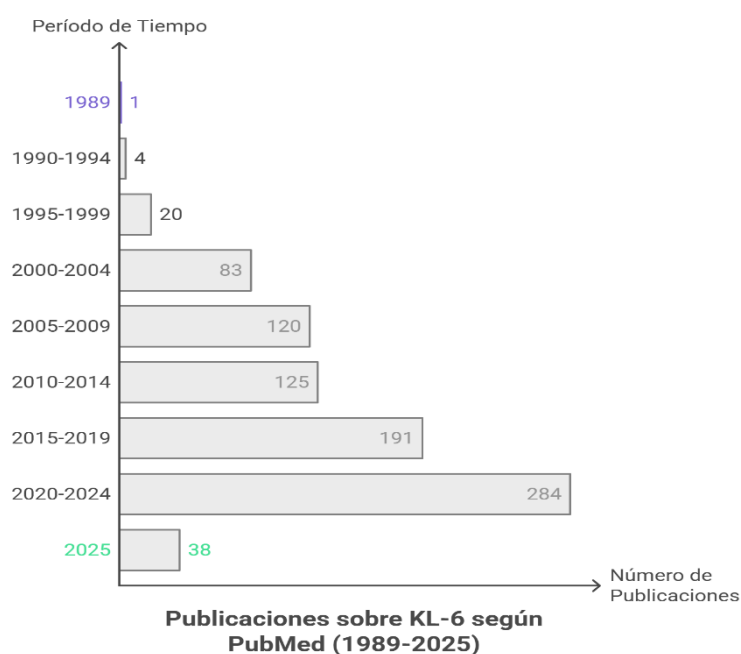


Figura 5. Evolución de las publicaciones sobre KL-6 en EPID desde 1989.

Sin embargo, esa heterogeneidad también presenta una base genética que ha sido objeto de estudio (120). Como se ha mencionado previamente, KL-6 es una glicoproteína de alto peso molecular de la familia MUC1, cuyos polimorfismos genéticos determinan directamente los niveles séricos de KL-6. En este sentido, existen tres estudios principales que destacan la relevancia de estos polimorfismos, uno de ellos realizado en población sana (121).

La influencia genética para esa variabilidad en los niveles de KL-6 se traduce, en primer lugar, en diferencias en su tamaño molecular. El estudio de Shigemura *et al.* (121) reveló que el alelo A está vinculado con un tamaño molecular bajo de KL-6/MUC1 en LBA, mientras que el alelo G se asocia con un tamaño molecular alto. Este estudio sugiere que el comportamiento de flujo de KL-6/MUC1 desde los alvéolos hacia el torrente sanguíneo difiere según los tamaños moleculares determinados genéticamente. Se observó que el flujo de KL-6/MUC1 de alto peso molecular fue un determinante significativo de KL-6 sérico, incluso en sujetos sanos.

En segundo lugar, el polimorfismo de nucleótido único (SNP) rs4072037 en el exón 2 del gen MUC1 influye en los valores obtenidos, con los genotipos G/G asociados a niveles más altos de KL-6, A/A a más bajos, y A/G a niveles intermedios. Esto se debe a que el alelo G se correlaciona con un mayor número de repeticiones en tándem en MUC1, las cuales contienen más antígeno KL-6 (121).

En tercer y último lugar, existen diferencias en la distribución de los polimorfismos del gen MUC1, como demostraron Horimasu *et al.* (122). Este estudio, analizó los niveles de KL-6 en población alemana y japonesa para discriminar a los pacientes con EPID de sanos. Para la cohorte japonesa el valor de corte óptimo obtenido fue de 461 U/ml, pero en la alemana fue de 659 U/ml. Los autores justificaron esas diferencias por la distribución de los polimorfismos del gen MUC1 y dividieron a los sujetos en 3 tipos de genotipos: A/A, A/G y G/G. El genotipo G/G fue mayor en la cohorte alemana, mientras que el A/A fue el predominante en la cohorte japonesa. Por lo tanto, según los autores, la mayor frecuencia de genotipos G/G y A/G observados en la cohorte alemana justificó unos niveles séricos y puntos de corte más elevados que en la población japonesa. El grupo afirmó que, dada la dificultad en poder establecer una determinación

de genotipo en cada paciente, los puntos de cortes para la identificación de EPID deberían determinarse en función de la etnia.

2. JUSTIFICACIÓN

Las EPID son un grupo heterogéneo de enfermedades cuyo diagnóstico se basa en hallazgos clínicos, radiológicos y, en algunos casos, anatomía patológica. Su curso puede ser muy variable, y dado su potencial carácter progresivo es fundamental disponer de herramientas que permitan un diagnóstico precoz y ayuden a predecir su evolución. Actualmente, la monitorización de estas enfermedades se basa principalmente en pruebas funcionales respiratorias, que sin embargo presentan una alta variabilidad paciente-dependiente y como medida única son insuficientes para predecir la evolución. Así, en los últimos años ha surgido un interés creciente en la búsqueda de biomarcadores que contribuyan al diagnóstico precoz y optimicen el seguimiento y manejo terapéutico de las EPID.

En este contexto, ha emergido el papel de KL-6, un biomarcador asociado a daño epitelial que se incrementa en las EPID, principalmente con la presencia de fibrosis pulmonar. KL-6 ha sido estudiado principalmente como biomarcador sérico, y en menor proporción en lavado broncoalveolar. Su utilidad potencial se extiende a múltiples aspectos clínicos, especialmente por su capacidad predictiva y pronóstica. Sin embargo, la mayoría de la evidencia científica actual proviene de cohortes reducidas, de carácter retrospectivo y en población asiática, con una amplia heterogeneidad entre estudios que dificultan su aplicabilidad clínica. Puesto que dicha heterogeneidad y variabilidad en los niveles de KL-6 depende especialmente de polimorfismos genéticos poblacionales, se hace imprescindible evaluar su papel en población europea.

Con este fin, se realizó un estudio en población española con la finalidad de determinar la concentración de KL-6 sérico que se correlacione con la presencia de EPID. Un segundo estudio, añadiendo una cohorte italiana, valoró la utilidad de la medición de KL-6 sérico y en LBA como predictor de progresión de la EPID.

3. HIPÓTESIS

- La detección de enfermedad pulmonar intersticial difusa mediante el biomarcador KL-6 presenta un punto de corte específico en población española.
- Los niveles séricos de KL-6 y en lavado broncoalveolar permiten detectar la presencia de fibrosis y predecir progresión de enfermedad en pacientes con enfermedad pulmonar intersticial difusa.

4. OBJETIVOS

Objetivo principal:

- Identificar el punto de corte óptimo de KL-6 sérico que se asocia a la presencia de EPID en una población española.

Objetivos secundarios:

- Valorar la utilidad de la medición de KL-6 sérico y en lavado broncoalveolar (LBA) para diferenciar patrones fibróticos y no fibróticos en las EPID.
- Establecer la precisión diagnóstica de los niveles séricos de KL-6 en pacientes con EPID y su utilidad como herramienta de cribado.
- Determinar la correlación de los valores séricos de KL-6 con parámetros de funcionalismo pulmonar.
- Determinar la correlación de los valores de KL-6 séricos y en LBA con parámetros radiológicos y con la evolución de la enfermedad.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

Esta tesis doctoral incluye dos estudios sobre el biomarcador KL-6 en las enfermedades pulmonares intersticiales difusas. El primero procura establecer el punto de corte de KL-6 en sangre que permita diagnosticar a las EPID en la población española. El segundo estudio analiza el KL-6 tanto en sangre como en LBA como potencial biomarcador para la progresión de la EPID. A continuación, se detalla la metodología de los estudios mencionados.

5.1. Estudio 1: El valor diagnóstico de KL-6 en las EPID

5.1.1. Diseño del estudio y aspectos éticos

Se trata de un estudio unicéntrico, prospectivo y observacional. El estudio se realizó en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau en Barcelona entre septiembre de 2016 y julio de 2018. El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética (IIBSP-EPI-2018-108) del hospital, siguiendo las recomendaciones recogidas en la Declaración de Helsinki. Todos los participantes firmaron el consentimiento informado previo a su inclusión.

5.1.2. Población del estudio

Se reclutaron pacientes valorados en la consulta monográfica de patología pulmonar intersticial y en la consulta de Reumatología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Los criterios de inclusión fueron: edad mayor de 18 años, capacidad para realizar correctamente las PFR y disponer de una TACAR dentro de los 6 meses previos a la inclusión. Los criterios de exclusión fueron la falta de consentimiento informado por parte del paciente y la imposibilidad de realizar PFR.

Con los resultados de la TACAR y siguiendo los criterios de la “Fleischner Society” los sujetos fueron divididos en grupo EPID o no-EPID.

El grupo EPID estaba compuesto por pacientes con presencia de afectación intersticial pulmonar de cualquier etiología, incluyendo las secundarias a enfermedades autoinmune sistémicas (EAS). El grupo no-EPID incluyó sujetos sanos que se habían sometido a un TACAR por otros motivos (estudio de fibrosis familiar, control de Neumonía Organizada post-infecciosa), pacientes con otras enfermedades respiratorias (asma, EPOC, tromboembolismo pulmonar) y finalmente pacientes con EAS sin evidencia de EPID en la prueba de imagen.

Los pacientes fueron diagnosticados siguiendo las guías actuales y el manejo terapéutico se realizó según práctica clínica habitual, independientemente del objetivo del estudio.

5.1.3. Variables

Clinicas

Se obtuvieron los principales datos demográficos de los sujetos, incluyendo edad, sexo, hábito tabáquico, comorbilidades y tratamiento farmacológico previo.

Radiológicas

La obtención, calidad y procesado de las imágenes, así como la terminología empleada en los informes, se realizaron según las recomendaciones de la “Fleischner Society” (123). Se obtuvieron imágenes de grosor fino (entre 1 y 1,5mm) en inspiración máxima con una serie en espiración para evaluar el atrapamiento aéreo y con reconstrucción de alta resolución. Para su realización, no se utilizó contraste endovenoso. Todas las imágenes fueron revisadas por un radiólogo experto en EPID.

Pruebas funcionales respiratorias

Para determinar el funcionalismo pulmonar se realizó una espirometría simple y medición de la capacidad de transferencia del monóxido de carbono (DLCO) a todos los

pacientes. Con esto, se recopilaban datos sobre la FVC, FEV1, FEV/FVC y DLCO. Los valores de referencia utilizados están basados en las recomendaciones de las sociedades Europea y Española (124, 125)

Estudio de autoinmunidad

Se obtuvo una muestra sanguínea de cada paciente para el cribado de EAS. Se registraron los valores del anticuerpo antinuclear (ANA), de los antígenos nucleares extraíbles (ENAs), los anticuerpos anticitrulinados, la enzima convertidora de angiotensina, del factor reumatoide, de las inmunoglobulinas G y sus subtipos. Así mismo, recogimos información sobre el hemograma (hemoglobina, leucocitos, plaquetas), la función renal y la función hepática.

Medición del valor de KL-6

A partir de las muestras sanguíneas se analizó la concentración de KL-6 en suero. Su medición se realizó mediante un reactivo Lumipulse KL-6 (Fujirebio Europe, NV) basado en la tecnología de inmunoensayo enzimático quimioluminiscente (CLEIA). Los resultados están expresados en U/ml.

5.1.4. Análisis estadístico

Los resultados se presentan como media y desviación estándar (DE) para las variables continuas con distribución normal y como mediana, mínimo, máximo y primer y tercer cuartil para las variables continuas no paramétricas. Los datos categóricos se resumieron en términos de número de sujetos (N), recuentos de frecuencia (n) y porcentajes (%).

La significancia estadística (valor p) para la comparación de los grupos EPID y no-EPID se determinó mediante la prueba t de Student para variables cuantitativas, la prueba exacta de Fisher para variables categóricas y la prueba exacta de Mantel-Haenszel

para variables ordinales. El coeficiente de correlación de Spearman se calculó para verificar la correlación entre FVC y KL-6.

La utilidad de KL-6 sérico como biomarcador diagnóstico para EPID se evaluó mediante el análisis del AUC de la característica operativa del receptor (ROC). El valor de corte óptimo para discriminar a los pacientes con EPID se determinó mediante el estadístico J de Youden, y la tabla de contingencia asociada. Así mismo, para valorar el posible papel de KL-6 como herramienta de cribado, se analizó una tabla de contingencia con una tasa de falsos positivos del 5% y una sensibilidad del 95%. Con el fin de correlacionar mejor los valores de KL-6 con las PFR, se realizó un análisis ROC secundario para identificar EPID según rangos de FVC y DLCO.

Finalmente se realizó un análisis de regresión logística para evaluar los factores independientes asociados a la presencia de EPID y se calculó un árbol de inferencia condicional utilizando KL-6 y el sexo como predictores de EPID. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando SAS®Version 9.4TS1M5 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EE. UU).

5.2. Estudio 2: KL-6 en plasma y en lavado broncoalveolar como potencial biomarcador en la progresión de las EPID

5.2.1. Diseño del estudio y aspectos éticos

Estudio multicéntrico, prospectivo y observacional. El estudio se realizó en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau en Barcelona y en el Hospital Universitario de Siena. El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética de ambos hospitales (IIBSP-EPI-2018-108 y “Markerlung 17431”) siguiendo las recomendaciones recogidas en la Declaración de Helsinki. Todos los participantes firmaron el consentimiento informado previo a su inclusión.

5.2.2. Población del estudio

Se reclutaron pacientes valorados en la consulta monográfica de patología pulmonar intersticial de los servicios de Neumología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y del Hospital Universitario de Siena.

Los criterios de inclusión fueron: edad mayor de 18 años, capacidad para realizar correctamente las PFR, disponer de una TACAR dentro de los 6 meses previos a la inclusión y la realización simultánea de broncoscopia con obtención de lavado broncoalveolar (LBA) y análisis sanguíneo. Los criterios de exclusión fueron la falta de consentimiento informado por parte del paciente y la imposibilidad de realizar PFR.

El diagnóstico de EPID fue determinado en un comité multidisciplinar tras la revisión de la historia clínica, hallazgos radiológicos y serológicos, siguiendo los criterios de la “Fleischner Society”(13).

El seguimiento se realizó mediante control clínico, radiológico (con TACAR) y PFR, en un período entre 9 y 45 meses.

5.2.3. Variables

Clinicas

Se obtuvieron los principales datos demográficos de los sujetos, incluyendo edad, sexo, antecedentes familiares, hábito tabáquico y comorbilidades, incluyendo la presencia de EAS subyacentes.

Se utilizó la definición de fibrosis pulmonar progresiva descrita en las guías de práctica clínica (ATS/ERS/JRS/ALAT)(126), utilizando los resultados del funcionalismo pulmonar, hallazgos radiológicos y variables clínicas.

Radiológicas

La obtención, calidad y procesado de las imágenes, así como la terminología empleada en los informes, se realizaron según las recomendaciones de la Fleischner Society (123). Se obtuvieron imágenes de grosor fino (entre 1 y 1,5mm), en inspiración máxima con una serie en espiración para evaluar el atrapamiento aéreo y con reconstrucción de alta resolución. Para su realización, no se utilizó contraste endovenoso. Todas las imágenes fueron revisadas por un radiólogo experto en EPID. Los pacientes fueron clasificados en EPID fibrótica y no fibrótica según los hallazgos de la TACAR al diagnóstico. La enfermedad progresiva fue clasificada mediante los cambios en las PFR y la progresión fibrótica en TACAR durante el seguimiento (entre 9-45 meses).

Pruebas funcionales respiratorias

Para determinar el funcionalismo pulmonar se realizó una espirometría simple y medición de la capacidad de transferencia del monóxido de carbono a todos los pacientes al inicio del estudio y en el seguimiento. Con esto, se recopilaron datos sobre la FVC, FEV1, FEV/FVC y DLCO. Los valores de referencia utilizados están basados en las recomendaciones de las sociedades europea y española (124, 125).

Estudio de autoinmunidad

Se obtuvo una muestra sanguínea de cada paciente para el cribado de EAS. Se registraron los valores del anticuerpo antinuclear (ANA), de los antígenos nucleares extraíbles (ENAs), de los anticuerpos anticitrulinados, de la enzima convertidora de angiotensina, del factor reumatoide, de las inmunoglobulinas G y sus subtipos. Así mismo, recogimos información sobre el hemograma (hemoglobina, leucocitos, plaquetas), la función renal y la función hepática.

Respecto al LBA, además del análisis de KL-6, se realizó recuento celular con cuantificación de la presencia de macrófagos, neutrófilos, linfocitos, eosinófilos, CD4, CD8 y la relación CD4/CD8. Así mismo, como parte del protocolo de los centros, se completó el análisis con estudio microbiológico para descartar infecciones y citológico (análisis de atipias o alteraciones sugestivas de procesos neoproliferativos).

Medición del valor de KL-6

A partir de las muestras sanguíneas y de LBA se analizaron las concentraciones de KL-6. Su medición se realizó mediante un reactivo Lumipulse KL-6 (Fujirebio Europe, Gent, Bélgica) basado en la tecnología de inmunoensayo enzimático quimioluminiscente (CLEIA). Los resultados están expresados en U/ml.

5.2.4. Análisis estadístico

Los resultados se presentan como medianas y rangos intercuartílicos o media y desviación estándar. Para el análisis comparativo de grupos con distribuciones no normales, se aplicó un ANOVA no paramétrico de una vía (prueba de Kruskal-Wallis), seguido de la prueba de Dunn como método de comparaciones múltiples *post hoc*. La prueba de Chi-cuadrado fue la utilizada para el análisis de las variables categóricas.

La utilidad de KL-6 sérico y en LBA como biomarcador de la presencia de fibrosis y progresión de la enfermedad se evaluó mediante el análisis del AUC de la característica operativa del receptor (ROC).

Con el objetivo de optimizar la distinción entre pacientes con EPID fibrótica y no fibrótica (mediante modelos de clasificación binaria), se conformó un grupo control, con EPID no fibrótica. Posteriormente, se implementó un árbol de decisión basado en el índice de impureza de Gini para discriminar entre ambos grupos, identificando las variables más útiles y con mayor poder discriminativo. El modelo se validó dividiendo los datos en conjuntos de entrenamiento y prueba mediante “*machine learning*”, cuantificando su precisión a través de matrices de confusión. Los umbrales óptimos para clasificar a los pacientes se determinaron mediante el índice de Youden, que procura maximizar la sensibilidad y la especificidad.

Adicionalmente, se examinaron las correlaciones entre variables utilizando el coeficiente de Spearman. Finalmente, para simplificar los datos, se aplicó un análisis de componentes principales (PCA) no supervisado, seleccionando los componentes más relevantes.

El mismo procedimiento se llevó a cabo en la construcción de un segundo modelo que permitiera optimizar la diferenciación entre los pacientes con enfermedad estable y aquellos con progresión. La misma metodología mencionada previamente fue utilizada.

Finalmente, el nivel de significación estadística se estableció en $p < 0.05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 9.3 y XLSTAT (Dotmatics, GraphPad Software, LLC).

6. RESULTADOS

6.1. Estudio 1: El valor diagnóstico de KL-6 en las EPID

Se incluyeron un total de 179 pacientes, de los cuales 102 tenían enfermedad pulmonar intersticial (EPID) y 77 eran controles. La media edad fue de $65,4 \pm 12,9$ años y el 58% eran mujeres. **La Tabla 5** resume las características principales de los grupos.

	Total (n=179)	EPID (n=102)	No EPID (n=77)	P-value
Género, n (%)				
Masculino	75 (41,9%)	55 (53,9%)	20 (26%)	0,0002 (a)
Femenino	104 (58,1%)	47 (46,1%)	57 (74%)	
Edad, años				
Media (DE)	65,4 (12,9)	69,2 (11,7)	60,4 (12,7)	<0,0001 (b)
Tabaquismo, n (%)				
Nunca	99 (53,3%)	52 (51%)	47 (61%)	0,3341
Ex-fumador	58 (32,4%)	37 (36,3%)	21 (27,3%)	
Fumador activo	22 (12,3%)	13 (12,7%)	9 (11,7%)	
FVC (litros)				
Media (DE)	3,2 (1,0)	2,9 (0,9)	3,6 (1,0)	<0,0001 (b)
FVC, %				
Media (DE)	91,8 (21,7)	82,2 (19,7)	105 (16,7)	<0,0001 (b)
FVC <70%, n (%)				
No	146 (83%)	75 (73,5%)	71 (95,9%)	
Yes	30 (17%)	27 (26,5%)	3 (4,1%)	<0,0001 (a)
DLCO, mL/min/mmHg				
Media (DE)	16,4 (6,2)	14,4 (5,7)	19,3 (5,6)	<0,0001 (b)
DLCO %				
Media (DE)	72,7 (20,9)	64,6 (19,3)	83,8 (17,8)	<0,0001 (b)
KL-6, U/mL				
Media (DE)	762 (704,7)	1080,1 (787,7)	340,7 (152)	<0,0001 (b)
Tratameinto inicial				
No	146 (83,4%)	81 (80,2%)	65 (87,8%)	0,2192 (a)
SÍ	29 (16,6%)	20 (19,8%)	9 (12,2%)	0,2192 (a)

Tabla 5. Características clínicas, demográficas y funcionales. (a) Fisher's exact test. (b) Independent student-t. (c) Mantel-Haenszel exact test. DLCO: capacidad de difusión pulmonar de monóxido de carbono; FVC: capacidad vital forzada; EPID: Enfermedad pulmonar intersticial difusa; KL-6: Krebs von den Lungen; DE: Desviación estándar.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos EPID y no EPID en cuanto a edad y sexo, pero no respecto a historia de tabaquismo.

Los principales diagnósticos tras la discusión en comité multidisciplinar fueron la FPI, NINE y Neumonitis por hipersensibilidad. Las EAS con EPID más prevalentes fueron la SSc y el síndrome de Sjögren (pSS) (**Tabla 6**).

Diagnóstico definitivo	n (N=102)	% del total
FPI	7	6,9%
Neumonitis por hipersensibilidad fibrótica	9	8,9%
NINE idiopática	9	8,9%
EPID inclasificable	8	7,8%
Sarcoidosis	3	2,9%
Combinación fibrosis pulmonar-enfisema	9	8,9%
IPAF	4	3,9%
Neumonía intersticial descamativa	2	1,9%
FIAT (fibrosis intersticial asociada a tabaco)	2	1,9%
EAS-ILD	38	37,2%
SSc	16	15,7%
pSS	14	13,7%
AR	3	2,9%
Síndrome antisintetasa	5	4,9%
Neumonía organizada criptogénica	2	1,9%
Otros: “ILA”, FEPP, Toxicidad farmacológica	7	6,8
Neumoconiosis (silicosis, asbestosis)	2	1,9%

Tabla 6. Etiología de todas las EPID incluidas. EPID: Enfermedad Pulmonar Intersticial Difusa; EAS: Enfermedad Autoinmune Sistémica; IPAF: *Interstitial Pneumonia with Autoimmune Features*; SSc: Esclerosis Sistémica; pSS: Síndrome de Sjögren primario; AR: Artritis Reumatoide; FEPP: Fibroelastosis pleuropulmonar; ILA: *Interstitial Lung Abnormalities*.

Respecto al patrón radiológico, el principal fue la NINE en un 43% de pacientes, seguido de NIU en 32% de los pacientes. Se realizó un subanálisis según el patrón radiológico (NIU vs no NIU) que mostró diferencias estadísticamente significativas en cuanto a FVC (< 70%), DLCO, sexo y edad, pero no en relación a los valores de KL-6.

Los resultados de las PFR mostraron un valor de FVC medio de 91,8% y de DLCO de 72,7%. Se observó una diferencia estadísticamente significativa en ambas variables entre el grupo EPID y no EPID. Así mismo, se realizó un análisis por subgrupos, según FVC mayor o menor a 70%, que mostró diferencias en los valores de KL-6, DLCO, el patrón radiológico y el género. No se encontraron diferencias en cuanto a edad o antecedentes de tabaquismo (**Tabla 7**).

Variable	FVC > 70% (n=146)	FVC < 70% (n=30)	P-value
Género, n (%)			
Masculino	56 (38,4%)	18 (60,0%)	0,0413 (a)
Femenino	90 (61,6%)	12 (40,0%)	
Edad, años			
Media (DE)	64,5 (13,0)	68,5 (12,4)	0,1243 (b)
Tabaquismo, n (%)			
Nunca	80 (54,8%)	16 (53,3%)	0,7773 (c)
Exfumador	46 (31,5%)	12 (40,0%)	
Fumador	20 (13,7%)	2 (6,7%)	
DLCO (%) inicial			
Media (DE)	76,4 (19,2)	49,4 (15,2)	<0,0001 (b)
Patrón radiológico			
NIU	16 (21,3%)	12 (44,4%)	0,0261 (a)
NO NIU	59 (78,7%)	15 (55,6%)	
KL-6, U/mL			
Media (DE)	653,2 (547,2)	1340,5 (1.058,4)	0,0015 (b)

Tabla 7. Características de los pacientes según la FVC. Fisher's exact test. (b) Independent Student-t. (c) Mantel-Haenszel exact test. DLCO: capacidad de difusión pulmonar de monóxido de carbono; FVC: capacidad vital forzada; KL-6: Krebs von den Lungen.

El análisis ROC determinó un punto de corte óptimo de KL-6 sérico de ≥ 465 U/ml para detectar la presencia de EPID, con un AUC de 0,9, con sensibilidad de 86% y especificidad de 82%. U/ml (**Figura 6**).

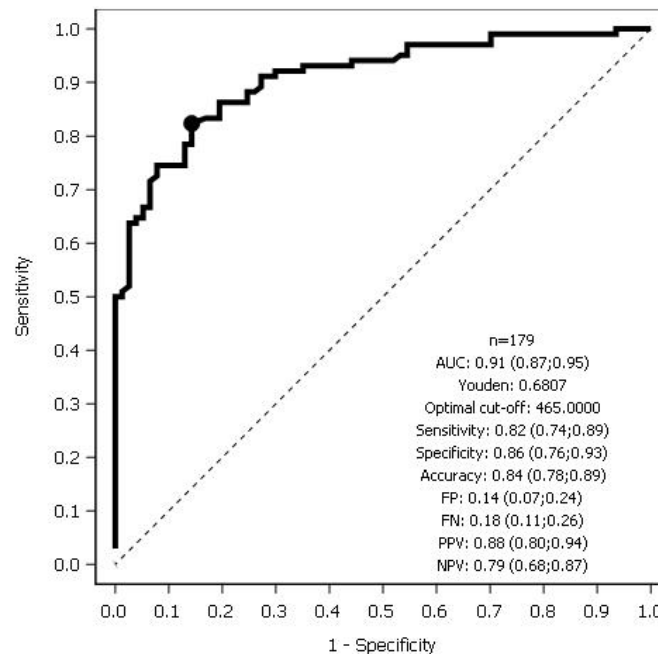


Figura 6. Análisis ROC utilizando AUC. Punto de corte óptimo de KL-6 para detectar EPID.

Para valorar su potencial marcador como herramienta de cribado, se realizó un nuevo análisis ROC para determinar el punto de corte con mayor sensibilidad para la detección de EPID. Se determinó un valor de KL-6 ≥ 307 U/ml, con una sensibilidad de 95% (**Figura 7**).

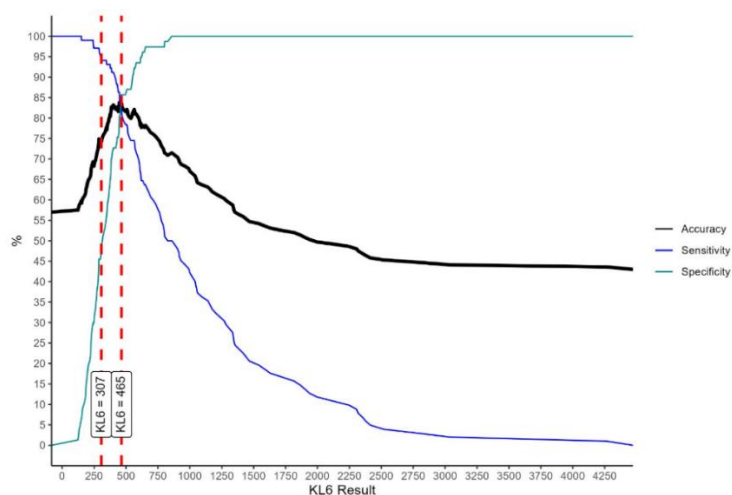


Figura 7. Evolución de la sensibilidad y especificidad para detectar EPID según los valores de KL-6. Representa la variabilidad de la sensibilidad (en verde) y especificidad (en azul) en la detección de EPID según los niveles de KL-6. En el punto de mayor sensibilidad y especificidad (intersección con la línea negra) se establece el punto de corte de 465 U/ml. Para determinar el punto de mayor sensibilidad, únicamente evaluamos la evolución de la gráfica azul, y en este caso, el valor de KL-6 es de 307 U/ml.

En el análisis de KL-6 para predecir la presencia de EPID en función de la FVC, el punto de corte óptimo en el grupo con FVC > 80% fue de 449 U/ml con una sensibilidad de 83% y especificidad de 81%, en cambio en el grupo con FVC entre 50 y 80% el punto de corte fue de 942 U/ml. (**Figura 8**).

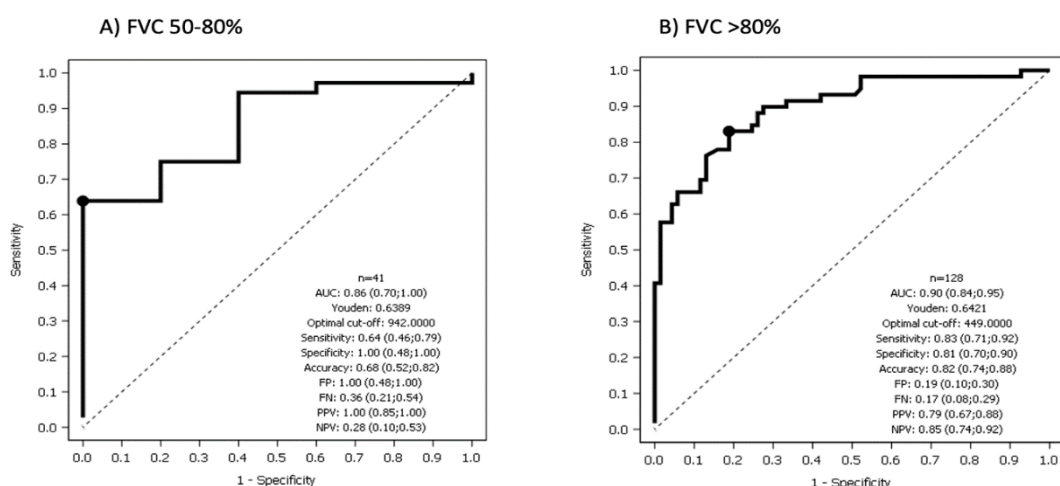


Figura 8. Punto de corte óptimo para predecir EPID según FVC.

Respecto a la DLCO, se dividieron en 3 grupos según la gravedad con los siguientes puntos de corte: DLCO >80%: 424 U/ml (Sensibilidad 82%, Especificidad 74%), DLCO entre 50-80%: 469 U/ml, DLCO <50%: 489 U/ml (**Figura 9**).

Los análisis por subgrupos (EPID, EPID-EAS, no EPID y EAS no EPID) no mostraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de KL-6 entre los grupos EPID y EPID-EAS, ni entre el grupo no EPID y EAS sin EPID.

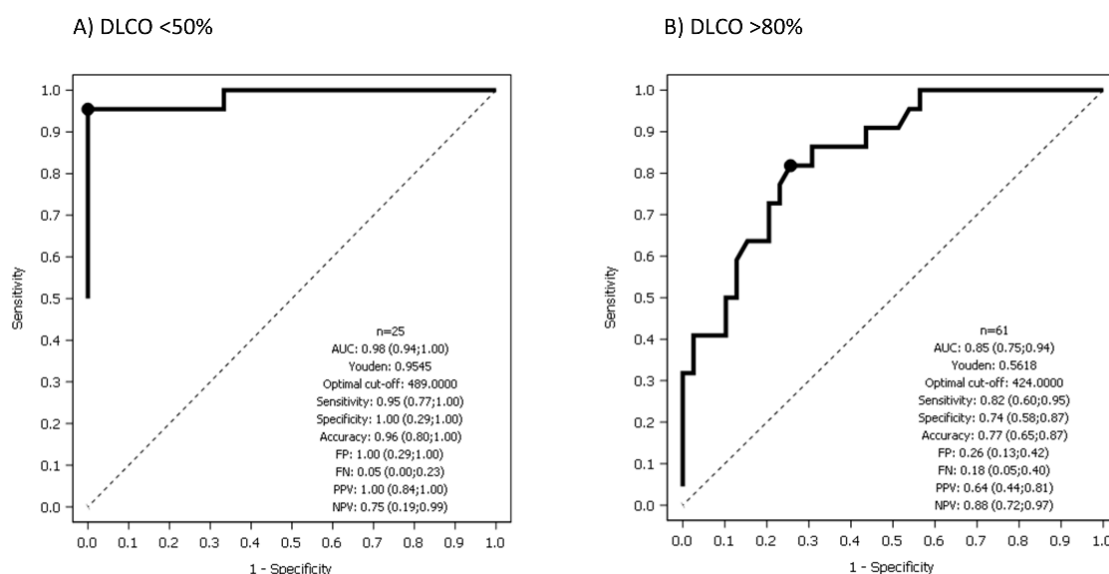


Figura 9. Punto de corte óptimo para predecir EPID según DLCO.

El modelo de regresión logística multivariable identificó como factores independientes asociados a la presencia de EPID el género masculino, los valores elevados de KL-6 y valores disminuidos de FVC y DLCO (**Tabla 8**).

Variable	Modelo logístico multivariable			
	OR	CI 95% (límite inferior)	CI 95% (límite superior)	P-value
Género masculino	2,57	1,37	4,83	0,0032
FVC (%)	0,94	0,90	0,98	0,0036
DLCO (%)	0,96	0,93	0,99	0,0169
KL-6 (por cada aumento de 100 unidades)	2,33	1,57	3,46	< 0,0001

Tabla 8. Factores pronósticos asociados a la presencia de EPID. OR: *odds ratio*; CI: intervalo de confianza; DLCO: capacidad de difusión pulmonar de monóxido de carbono; FVC: capacidad vital forzada; KL-6: Krebs von den Lungen.

Finalmente, se realizó un árbol de inferencia condicional o “*tree model*” para facilitar la predicción o identificación de EPID (**Figura 10**). En resumen, en el género masculino la probabilidad de tener EPID aumentó en un 40% respecto al género femenino cuando el KL-6 es mayor de 364 U/ml. Considerando sólo el valor de KL-6, la probabilidad de EPID aumentó en un 95% en los valores de ≥ 650 U/ml.

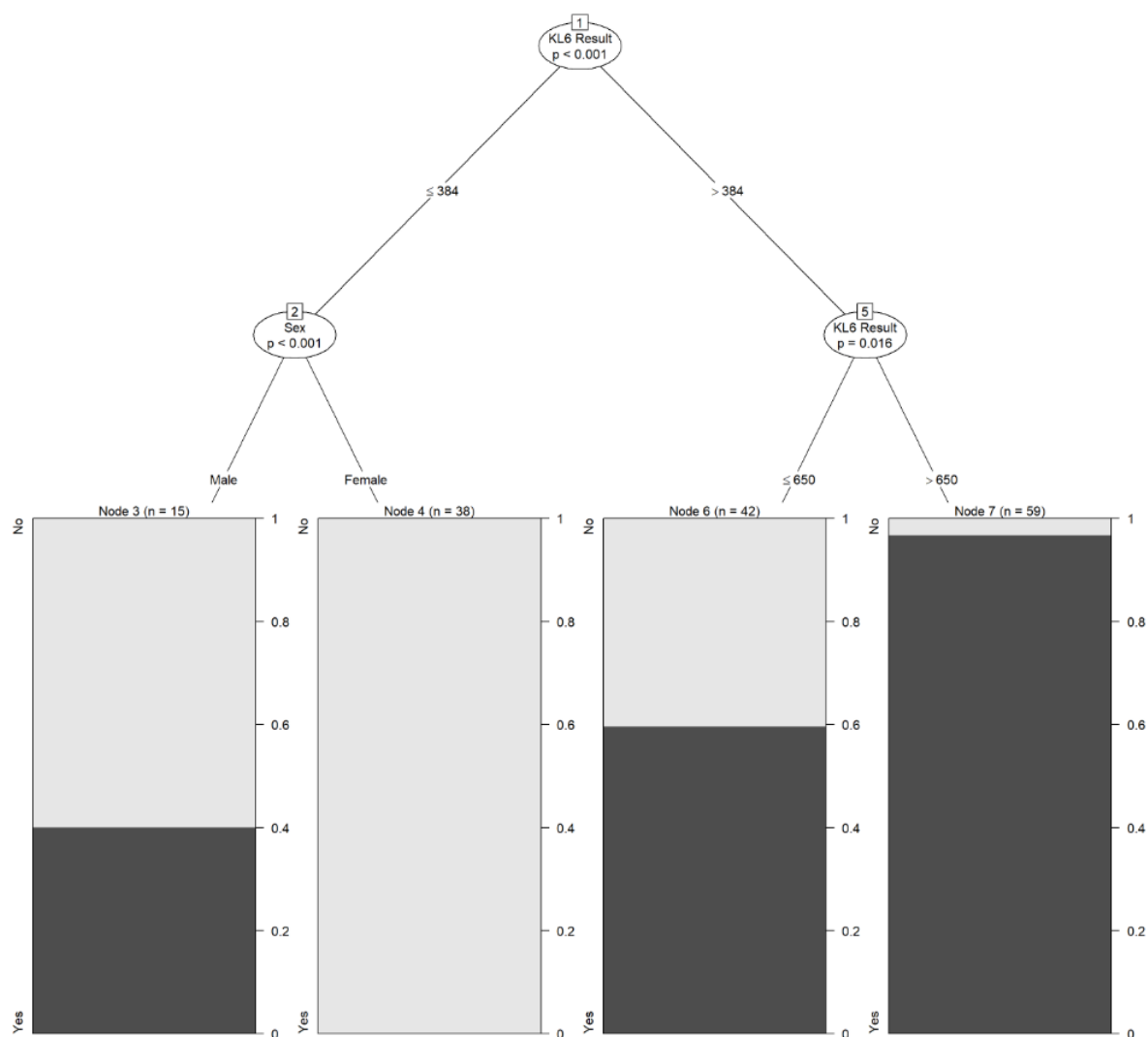


Figura 10. Árbol de inferencia condicional basado en KL-6 y el género. En el modelo realizado, el punto de partida es el valor de KL-6 establecido en 384 U/ml. Cuando a este valor se añade el género masculino la probabilidad de tener una EPID aumenta en un 40% respecto al género femenino (columna izquierda). Por otra parte, si nos centramos únicamente en los valores de KL-6 (mitad derecha de la imagen), sin añadir otras variables, se observa que cuando son ≥ 650 U/ml la probabilidad de tener EPID aumenta en un 95% (columna derecha de la imagen)

6.2. Estudio 2: KL-6 en plasma y en lavado broncoalveolar como potencial biomarcador en la progresión de las EPID.

Se incluyeron un total de 52 pacientes, con una media de edad global de 70,6 años (con rango entre 56-78 años), con leve predominio de género masculino (55,7%). Un 73% de los pacientes tuvieron un patrón fibrótico en la TACAR y 27% mostraron un patrón no fibrótico. La media global de FVC fue de 83% con rango variable entre 51-104% y de DLCO de 55% (rango 43-92%). Respecto a KL-6, la media global en sangre fue de 919,5 U/ml (rango 440-1642) y en LBA de 265,3 U/ml (rango 145-496), sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre grupos, excepto en los valores séricos de KL-6. Tampoco se observaron diferencias en el recuento celular del LBA entre grupos.

Los pacientes con EPID fueron clasificados en dos grupos según los hallazgos radiológicos: fibróticos (n=38) y no fibróticos (n=14). Del total de pacientes incluidos, el principal diagnóstico dentro del grupo de EPID fibrótica fue la FPI (20 pacientes, 38%). En el grupo de EPID no fibrótica el diagnóstico principal fue la Neumonitis por hipersensibilidad (NH) (6 pacientes, 11,5% del total de pacientes incluidos). Los datos demográficos, inmunológicos y clínicos por grupos se presentan en la **Tabla 9**.

Se recogieron sesenta muestras consecutivas de lavado broncoalveolar (LBA) y plasma de pacientes con EPID al inicio del diagnóstico. Tras la exclusión de 8 pacientes con EPID inclasificable e HPCL, finalmente se analizaron 52 muestras.

Parámetros	Fibrótico (n=38)	No fibrótico (N =14)	P-value
Género, n (%)			
Masculino	23 (60%)	6 (43%)	0,2897
Femenino	15 (40%)	8 (57%)	
Edad, años			
Media	73 (64-78)	64 (56-76)	0,219
Tabaquismo, n (%)			
Nunca	12 (31,5%)	8 (57%)	0,1544
Ex-fumador	26 (68,5%)	6 (43%)	
FVC (litros)			
Media	3 (2,4-3,85)	2,9 (1,9-4,3)	0,3271
FVC, %			
Media	82,5 (67-92)	86,5 (51-104)	0,1082
FEV1 (litros)			
Media	2,3 (1,9-2,82)	2,4 (1,3-3)	0,2991
FEV1 (%)			
Media	8,5 (74-90)	78 (60-96)	0,1521
DLCO (inicial) %			
Media	56 (45-73)	52 (43,5-92)	0,1981
KL-6 U/ml			
Media	1059 (691-1642)	541 (440-622)	0,0021
KL-6 LBA (U/ml)			
Media	247 (145-496)	315 (156-414)	0,6597
Diagnósticos			
FPI	20	0	
EAS	5	2	
IPAF	3	1	
NH	2	6	
EPID-BR	5	1	
Sarcoidosis	3	4	
Perfil Celular LBA (%)			
Macrófagos	63	40	0,0851
Neutrófilos	15	14	0,7269
Linfocitos	12	12	0,4298
CD4	66	55	0,2812
CD8	23	31	0,1861
CD4/CD8	2.9	2	0,4910

Tabla 9. Resumen de los datos demográficos, clínicos, funcionales y analíticos. FEV1: Volumen Espiratorio Forzado en el Primer Segundo; DLCO: capacidad de difusión pulmonar de monóxido de carbono; FVC: capacidad vital forzada; KL-6: Krebs von den Lungen; LBA: Lavado Broncoalveolar; NH: Neumonitis por Hipersensibilidad; FPI: Fibrosis Pulmonar Idiopática; EAS: Enfermedad Autoinmune Sistémica; IPAF: “*Interstitial Pneumonia with Autoimmune Features*”.

Las concentraciones plasmáticas de KL-6 fueron significativamente más elevadas en los pacientes con patrón fibrótico en comparación con no fibróticos ($p=0,0021$). En ambos grupos, las concentraciones plasmáticas de KL-6 fueron más elevadas que los niveles en LBA ($p<0,001$ y $p=0,003$, respectivamente) (**Figura 11**). No se observó correlación significativa entre las concentraciones de KL-6 en LBA y plasma, ni diferencias entre los grupos fibrótico y no fibrótico en las concentraciones de KL-6 en LBA. Sin embargo, en la evaluación basal, las concentraciones de KL-6 en LBA se correlacionaron inversamente con los valores de DLCO ($r=-0,3382$, $p=0,0491$).

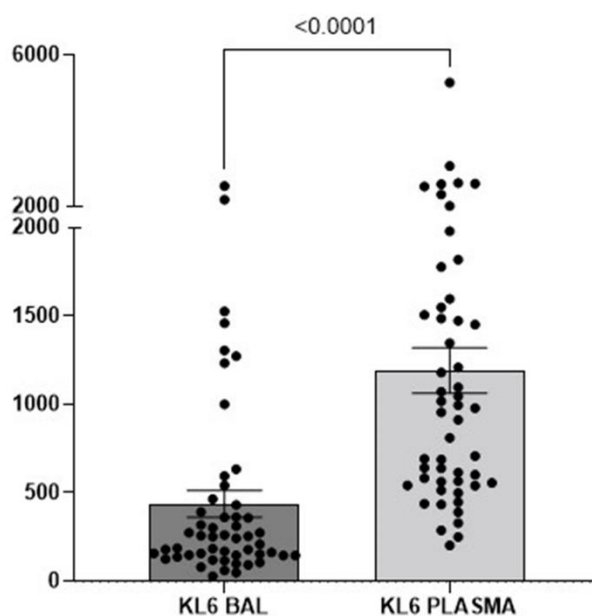


Figura 11. Concentraciones séricas y en LBA en los grupos EPID fibrótica vs no-fibrótica.

En relación con la progresión fibrótica, las concentraciones plasmáticas de KL-6 fueron más elevadas que las de LBA tanto en el grupo con progresión ($p<0,0001$) como en el grupo sin progresión ($p=0,0004$) (**Figura 12a**). Se observó una correlación inversa entre las concentraciones plasmáticas de KL-6 al inicio del estudio y el cambio porcentual en la capacidad vital forzada ($\Delta FVC\%$) ($r=-0,35$, $p=0,037$) durante el seguimiento (**Figura 12b**).

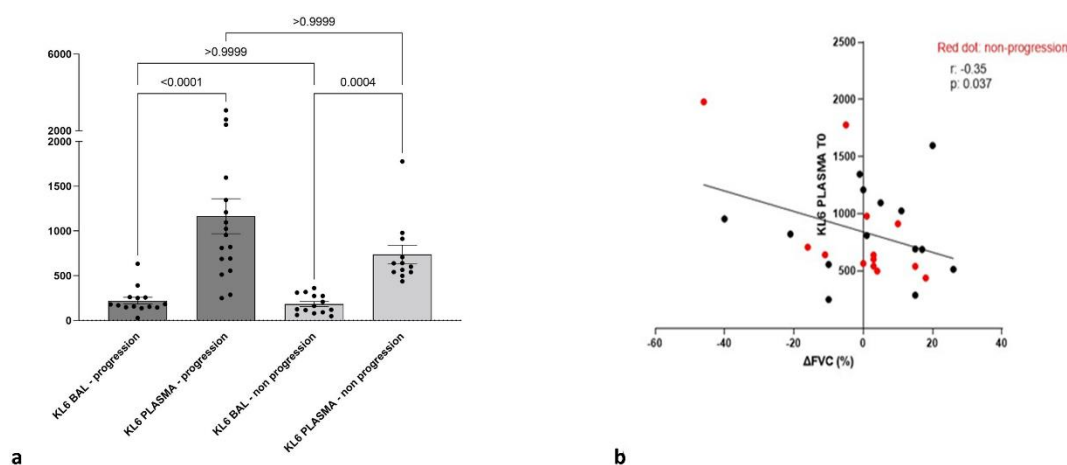


Figura 12. a). Niveles de KL-6 en plasma y LBA durante el seguimiento en los pacientes clasificados como progresivos o no progresivos. b) Correlación entre los niveles de KL-6 séricos y la variación de FVC observada en el estudio.

La curva ROC para correlacionar tanto los niveles de KL-6 sérico como en LBA para detectar enfermedad fibrótica y a pacientes con fenotipo progresivo se muestra en la **Figura 13a y 13b**, respectivamente. Los resultados obtenidos en sangre periférica de KL-6 permitieron establecer un punto de corte óptimo de 566 U/ml para identificar la presencia de fibrosis pulmonar en los pacientes con EPID (Sensibilidad: 89%, Especificidad: 69% y AUC 0,79), y de 641 U/ml para detectar las EPID progresivas (AUC: 0,65, sensibilidad: 76%, especificidad: 53%).

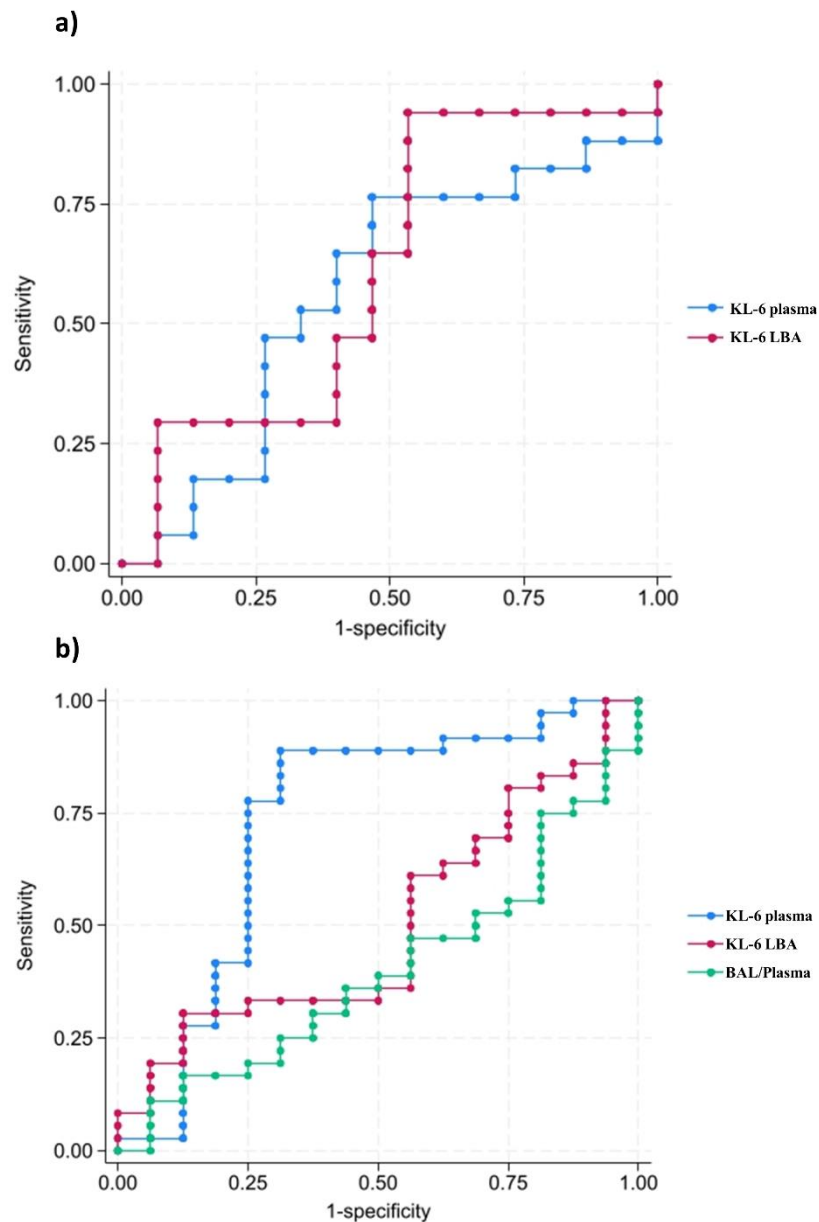


Figura 13. Análisis ROC utilizando AUC. a) Punto de corte óptimo de KL-6 para detectar EPID fibrótica. b) Punto de corte óptimo de KL-6 para detectar EPID progresiva.

La evolución clínica, los cambios radiológicos y los cambios en PFR fueron monitorizados en 32 pacientes con EPID (75% con patrón fibrótico al diagnóstico) durante un seguimiento medio de $27,7 \pm 18,3$ meses. La **Tabla 10** muestra los cambios en los parámetros de función pulmonar en pacientes con EPID estratificados según la

evidencia de progresión fibrótica en TACAR. No se observaron diferencias en la variación de las PFR entre ambos grupos.

Parámetros	Progresivo (n=17)	No Progresivo (n =15)	P-value
Δ FVC (L)	0,3 $\pm$ 0,5	0,03 $\pm$ 0,81	0,2734
Δ FVC (%)	2,35 $\pm$ 16	2,67 $\pm$ 20,4	0,7870
Δ DLCO (%)	-14,62 $\pm$ 9,9	-14,63 $\pm$ 22,47	0,7005

Tabla 10. Variación de la función pulmonar en el seguimiento. DLCO: capacidad de difusión pulmonar de monóxido de carbono; FVC: capacidad vital forzada.

El modelo de árbol de decisión mediante *machine learning* (con validación cruzada por confusión de matriz) para determinar las mejores variables para distinguir los pacientes con EPID fibrótica se muestra en la **Figura 14**. Utilizando las concentraciones de KL-6 séricas y en LBA con parámetros funcionales *al inicio* del estudio, el modelo encontró:

- Una mejoría de 2,133 al utilizar un valor de corte de KL-6 sérico de 571,5 U/ml.
- Una mejoría de 1,000 al utilizar un valor de corte de 113,5% para la FVC.
- Una mejoría de 2,667 al utilizar un valor de corte 91% para la FEV1.

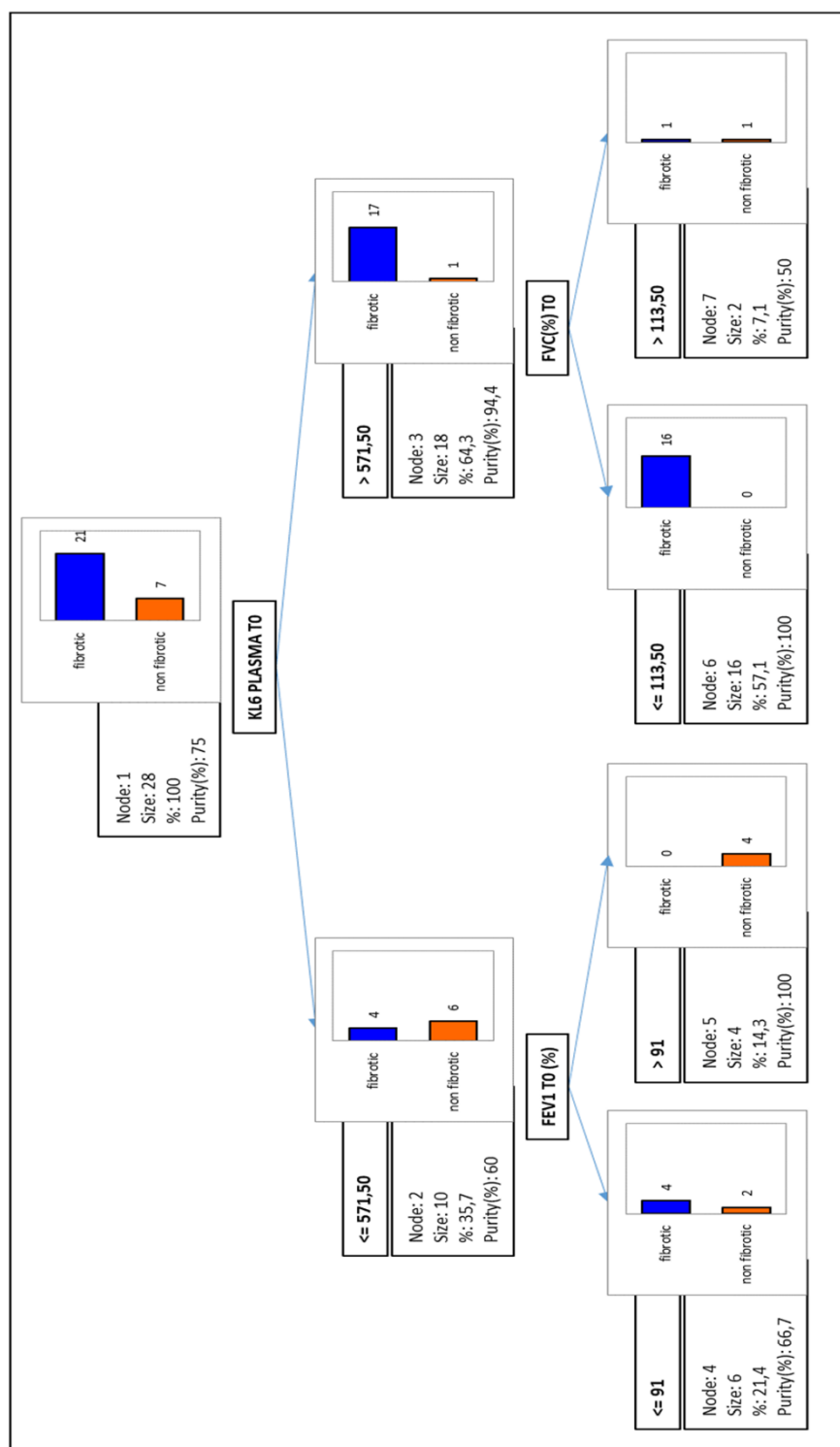


Figura 14. Modelo predictivo (utilizando “machine learning”) para identificar pacientes con EPID fibrótica. El punto de partida es la concentración sérica de KL-6 al inicio del estudio. Cuando este valor es > 571,5 U/ml hay un incremento de 2,133 en la identificación de fibrosis. Si a ese grupo se añade una FVC < 113,5 existe un aumento adicional de 1,000. Con valores de KL-6 < 571,5 U/ml, si la FEV1 < 91% hay un incremento de 2,667 en la identificación de presencia de fibrosis.

El segundo modelo de árbol de decisión, realizado para identificar pacientes con enfermedad progresiva utilizó la concentración de KL-6 sérico y en LBA con parámetros funcionales *al inicio y al seguimiento* (**Figura 15**). El modelo encontró que:

- Valores de KL-6 en LBA al inicio de estudio $> 131,5$ U/ml mejoran en un 1,667 la predicción para identificar pacientes con enfermedad progresiva.
- El cambio de DLCO $> -4,5\%$ (pérdida de más de 4,5% en el seguimiento) y un KL-6 en LBA $> 267,7$ U/ml mejoran en un 2,0 la identificación de pacientes con EPID progresiva.

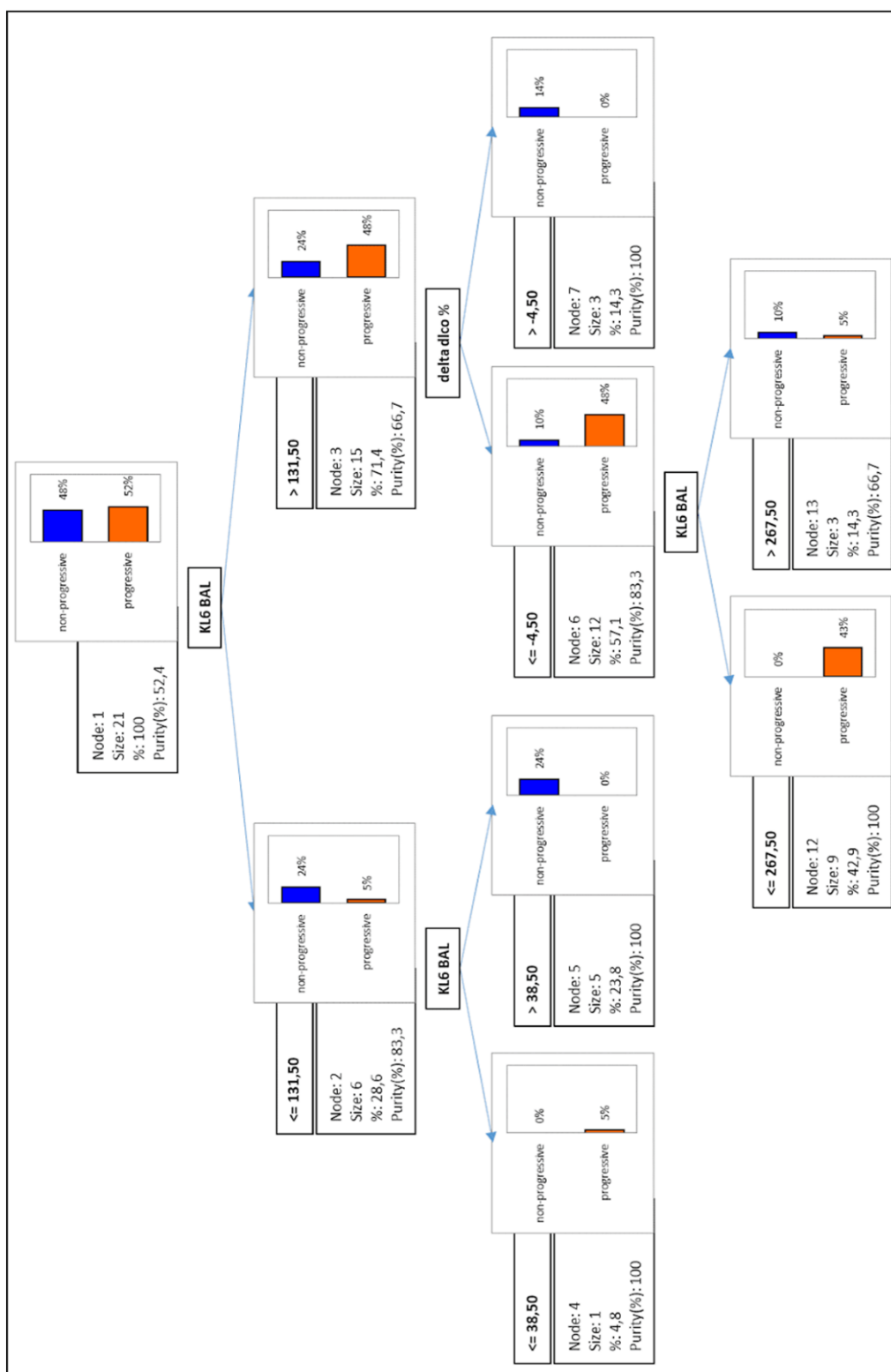


Figura 15. Modelo predictivo (utilizando “machine learning”) para identificar pacientes con EPID progresiva. El punto de partida es la concentración de KL-6 en LBA al inicio del estudio. Cuando este valor es > 131,5 U/ml hay una mejora de 1,667 en la predicción para identificar enfermedad progresiva. Si añadimos el cambio evolutivo de la DLCO (pérdida de más de 4,5% en el seguimiento) y posteriormente un nuevo valor de KL-6 en LBA, esta vez > 267,7 U/ml, existe un incremento en un 2,0 para la identificación de esos pacientes.

7. DISCUSIÓN

Los principales hallazgos de esta tesis son: 1) La determinación de un punto de corte de KL-6 en sangre periférica tanto para la detección de EPID como para la identificación de su progresión en una cohorte europea, cuyo valor es inferior al observado en cohortes asiáticas; 2) La observación de una correlación inversa entre los niveles de KL-6 en LBA y la DLCO, sin poder detectar, sin embargo, la presencia de EPID fibrosante o progresión mediante el estudio de KL-6 en LBA.

Hasta ahora, KL-6 había sido ampliamente estudiado en población asiática, pero los datos disponibles en otras cohortes, como la europea, son escasos. En cohortes asiáticas, el valor óptimo se sitúa en torno a los 500 U/ml (49, 50, 55, 120), cifra que difiere de la reportada en los escasos estudios existentes en poblaciones europeas. Asimismo, existe disparidad en el punto de corte entre cohortes europeas, como evidencian los valores de 459 U/ml en un estudio irlandés y de 872 U/ml en una población francesa (85, 127).

Esa discrepancia se puede explicar en parte por los diferentes polimorfismos rs4072037 del gen MUC1. En un análisis a gran escala (122) con 453 sujetos de origen alemán y japonés, se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los valores de corte para detectar EPID entre las 2 poblaciones (659 U/ml en alemanes y 461 U/ml en japoneses), que se relacionaron en parte con los diferentes polimorfismo de MUC1 entre grupos. Hasta el momento, es el único estudio que ha evaluado diferencias genéticas entre población europea y asiática.

En el primer estudio de esta tesis se realizó la medición de KL-6 en sangre periférica de un grupo con y sin EPID, manteniendo así un grupo control. De forma novedosa, se trata del primer estudio prospectivo realizado en población española con el objetivo de determinar un punto de corte que se asocie a la presencia de EPID.

En nuestra población, un valor de KL-6 de 465 U/ml presentó un AUC de 0,9 para la detección de EPID, con sensibilidad de 86% y especificidad de 82%. En nuestro trabajo, el valor óptimo de KL-6 fue ligeramente inferior al punto de corte establecido en población asiática, pero distan de los reportados por otras cohortes europeas, incluyendo la alemana previamente citada (122), lo que refuerza la necesidad de estandarizar los valores de KL-6 según las características de la población de referencia.

En la práctica clínica habitual, las PFR representan una herramienta básica en la valoración de la gravedad de la EPID al diagnóstico y durante el seguimiento. Dado que son paciente y operador-dependiente, existe un margen de variabilidad y por ello es de especial interés intentar correlacionar sus resultados con un biomarcador más objetivo, estable y no invasivo. Es en este punto en el que nos preguntamos si podíamos encontrar una correlación entre KL-6 y las PFR que aportasen potencial utilidad clínica al biomarcador.

En nuestro estudio, los niveles de KL-6 presentaron una correlación inversa con las PFR (FVC y DLCO), de forma análoga a otras series (93, 122). Con el fin de profundizar en estos hallazgos, realizamos un análisis ROC secundario según rangos de FVC y DLCO. Como era de esperar, los puntos de corte fueron más altos cuanto peor fueron ambos resultados, reflejando una potencial correlación clínico-patológica entre una mayor actividad reparativa alveolar y el funcionalismo pulmonar. Así, el punto de corte óptimo de KL-6 en el grupo con FVC > 80% fue de 449 U/ml, mientras que en el grupo con peor FVC (entre 50 y 80%) fue de 942 U/ml.

Respecto a la DLCO, los pacientes con valores <50%, generalmente asociados a una fase más avanzada de la enfermedad, presentaron concentraciones de KL-6 más elevadas, aunque sin diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Estos

resultados resaltan, de nuevo, el potencial de KL-6 como biomarcador de gravedad y progresión funcional.

Otro valor añadido del estudio fue la exploración del valor de KL-6 como herramienta de cribado. Éste es un punto que no ha sido estudiado previamente y, hasta donde sabemos, éste representa el primer estudio que incluye este aspecto. En nuestra población identificamos un umbral de 307 U/ml con una sensibilidad del 95% para la presencia de EPID. Esta alta sensibilidad se mantuvo incluso en subgrupos con PFR preservadas, sugiriendo un papel significativo de KL-6 en la detección temprana de la enfermedad, particularmente en individuos con factores de riesgo o en pacientes con EAS. El diagnóstico precoz de las EPID, incluidas las asociadas a EAS, es fundamental, siendo conocido el impacto en la supervivencia debido a los retrasos diagnósticos (128-131).

Por último, nuestro modelo de regresión logística multivariable identificó como factores independientes asociados a la presencia de EPID el género masculino, valores elevados de KL-6 y una FVC y DLCO disminuidas. Tanto el género masculino como la alteración en PFR son hallazgos conocidos y esperables en pacientes con EPID. Sin embargo, KL-6 destacó en nuestros resultados como un factor fuertemente asociado a la presencia de EPID de forma independiente, con un OR 2,33 (IC 95% 1,57-3,46; $p < 0,0001$). Este hecho había sido reportado en otras series de origen asiático (44, 87).

De forma paralela a otros estudios, en nuestra cohorte de pacientes con EPID se observó una amplia variabilidad en los niveles de KL-6 ($1081,1 \pm 787,7$ U/ml). En nuestra opinión, este hecho podría relacionarse con las diferentes EPID incluidas, aunque no se realizó un análisis específico por el tamaño muestral disponible. De hecho, otro trabajo con resultados similares a los nuestros sí evaluó el papel de KL-6 en la diferenciación de subgrupos de EPID, y sus resultados mostraron diferencias significativas de los niveles de KL-6 entre las diferentes patologías (47).

Otro de los motivos de la alta variabilidad de nuestros niveles de KL-6 podría estar justificada por diferentes grados de afectación radiológica y de actividad de la enfermedad en el momento de la obtención de la muestra, puesto que el diagnóstico no necesariamente coincide con el inicio de la enfermedad. En cuanto a los hallazgos radiológicos, en nuestro estudio el patrón NINE fue el más frecuente (43%), seguido por el patrón NIU (32%), pero no se encontraron diferencias significativas en los niveles de KL-6 que permitieran diferenciar entre ambos, hallazgo similar a otros estudios anteriores (132, 133). Un trabajo reciente analizó la correlación entre los hallazgos radiológicos (evaluados mediante una escala que incluía el vidrio deslustrado, consolidación, bronquiectasias de tracción y panalización) y los niveles séricos de KL-6, observándose una correlación positiva entre ambos. Sin embargo, no se realizó un análisis directo o valor de corte para distinguir entre un perfil inflamatorio o fibrótico, ni tampoco se estableció un punto que permitiera diferenciar los patrones radiológicos incluidos (134).

Uno de los aspectos más decisivos en el manejo de los pacientes con EPID es confirmar la presencia de fibrosis. Como hemos repasado en la Introducción, la presencia de ésta tiene repercusiones muy importantes a nivel terapéutico y pronóstico, añadiendo una importante carga de mortalidad en aquellos pacientes con EPID fibrosante.

Debido a la relevancia clínica de este aspecto, el segundo estudio de este trabajo de tesis pretendió valorar la capacidad de KL-6 sérico para la detección de fibrosis en pacientes con EPID. Este segundo trabajo es hasta la fecha el primer estudio prospectivo realizado en población europea (incluyendo una cohorte con población española e italiana) para evaluar este aspecto específico.

En nuestra población, el punto de corte que se asoció con la presencia de fibrosis en la TACAR fue establecido en 566 U/ml. A pesar de encontrar diferencias en los valores

séricos de KL-6 entre el grupo de fibrosis y no fibrosis, y en contra de lo previsto, no se identificaron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros de función pulmonar. Posiblemente, estos hallazgos se debieron al reducido tamaño muestral y a la distribución desigual entre grupos (38 en el fenotipo fibrótico y 14 en el no fibrótico), por lo que estos resultados se deben interpretar con cautela.

Los niveles de KL-6 para diferenciar a los pacientes con EPID fibrosante no han sido establecidos en la población europea. De hecho, incluso en población asiática, uno de los estudios que correlacionó niveles de KL-6 con una mayor extensión de la reticulación (signo radiológico de fibrosis), tampoco estableció un punto de corte específico, utilizando el valor “clásico” de 500 U/ml (106).

En la práctica clínica, la identificación de la progresión de estas enfermedades tiene especial relevancia. De hecho, recientemente, se ha caracterizado un fenotipo dentro de las EPID que agrupa a las enfermedades con comportamiento fibrosante progresivo (FPP) (126), lo que corrobora su importancia en este espectro clínico. Los criterios de definición se resumen en la **Tabla 11**. En esta línea, nuestro segundo estudio se dirigió a valorar, entre otros, el potencial de KL-6 como predictor de progresión.

Criterios	Fibrosis Pulmonar Progresiva Si cumplen al menos 2 de los 3 criterios en el último año
Clínicos	Empeoramiento de síntomas respiratorios
Funcionales	Empeoramiento de los parámetros de función pulmonar Disminución absoluta de la FVC >5% Disminución absoluta de DLCO (corregido por Hb)>10%
Radiológicos	Signos de progresión de la enfermedad en la TACAR Aumento de la extensión de bronquiectasias y bronquielectasias por tracción Nuevas áreas de vidrio deslustrado con bronquiectasias de tracción Aparición de nuevas zonas de reticulación Aumento de la extensión o densidad de zonas de reticulación Aparición o aumento de la extensión de las lesiones en panal de abejas Aumento de la pérdida de volumen pulmonar

Tabla 11. Criterios de fibrosis pulmonar progresiva. DLCO: capacidad de difusión pulmonar de monóxido de carbono; FVC: capacidad vital forzada; Hb: Hemoglobina; TACAR: Tomografía Axial Computarizada de Alta Resolución

Nuestro estudio estableció un punto de corte óptimo de 641 U/ml en plasma para identificar aquellos pacientes con fenotipo fibrosante progresivo. Asimismo, observamos una correlación inversa entre las concentraciones séricas de KL-6 y los cambios evolutivos en la FVC, lo que refuerza la teoría de que KL-6 podría ser útil para predecir el deterioro funcional. Estos resultados van en consonancia con los de Ishii *et al.* (132), que demostraron una asociación entre concentraciones basales elevadas de KL-6 y una menor supervivencia. En nuestro caso, el seguimiento de los pacientes fue relativamente corto y no se evaluó la mortalidad a largo plazo.

Numerosos trabajos previos han relacionado valores elevados de KL-6 en sangre periférica con la progresión, exacerbación o mortalidad, asociando esos resultados con

las PFR y la TACAR. Sin embargo, el valor de KL-6 tampoco ha sido definido de forma contundente para predecir progresión. En población asiática se ha establecido un punto de corte de 1000 U/ml, basado en estudios previos con resultados heterogéneos que oscilaron entre 800-1000 U/ml. Respecto a la exacerbación aguda (EA), Ohshimo *et al.* (135) sugirieron un punto de corte de ≥ 1300 U/ml como predictor de EA, mientras que otro estudio estableció un punto de corte inferior (946 U/ml) (136).

Diversos estudios han mostrado que las entidades que comparten este fenotipo fibrosante progresivo presentan una mayor morbilidad (15, 137-139). De hecho, recientemente se ha aprobado el uso de nintedanib como opción terapéutica para pacientes con FPP para enlentecer el curso de la enfermedad (140). Por tanto, la identificación de herramientas no invasivas como KL-6 podría facilitar la detección precoz de la progresión, y tener un impacto clínico significativo en el manejo de estos pacientes.

Así pues, los resultados de nuestra cohorte europea mostraron que los niveles de KL-6 permitieron diferenciar a los pacientes con fenotipo fibrosante progresivo, y, además, establecer un punto de corte para la progresión que fue llamativamente inferior al reportado en población asiática. En este sentido, estos resultados fueron análogos a lo observado en el primer estudio de esta tesis, con menores valores en nuestra población que en la población asiática. Sin embargo, la especificidad del punto de corte que encontramos para identificar la progresión fue bajo, con un AUC de 0,65. Por ello, creemos que estos resultados se tienen que analizar cuidadosamente y ser validados en cohortes más amplias.

El segundo trabajo de la tesis amplió el estudio de KL-6 sérico con su evaluación en LBA, valorando su utilidad en la detección de EPID fibrosante y su progresión.

La broncoscopia es un procedimiento habitual en el estudio de las EPID, con escasas complicaciones en general y que proporciona información del espacio alveolo-intersticial. Es de utilidad tanto para descartar infecciones como para apoyar el diagnóstico de algunas enfermedades como la proteinosis alveolar, la neumonitis por hipersensibilidad o la sarcoidosis. Como parte del proceso diagnóstico de las EPID, aporta información útil cuando se utilizan conjuntamente con parámetros clínicos, radiológicos y funcionales (141).

Nuestra hipótesis al incluir el LBA en el estudio consistía en asumir una mayor concentración de KL-6 tanto en pacientes con EPID fibrótica respecto a EPID no fibrótica, como en pacientes con enfermedad progresiva versus no progresiva. Todo ello, como resultado de una mayor actividad reparadora en el espacio alveolo-intersticial y su detección en el LBA. Sin embargo, y de forma inesperada, los resultados de nuestra cohorte no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos.

Una posible explicación para la ausencia de diferencia en los niveles entre ambos grupos podría ser tanto la influencia del estadio evolutivo de la enfermedad en el momento de la toma de la muestra (fase estable frente a fase aguda), como la localización pulmonar del lavado broncoalveolar.

En general, la literatura disponible muestra una alta variabilidad en los niveles de KL-6 en LBA, probablemente atribuible a la heterogeneidad de las enfermedad incluidas en los estudios y a la ausencia de estandarización metodológica. Por eso, y en línea con nuestros resultados, la mayoría de los estudios no establecen puntos de corte clínicamente validados para KL-6 en LBA.

En nuestro trabajo, las concentraciones de KL-6 sérico fueron superiores a las obtenidas en LBA, de forma similar a los resultados de series anteriores (119). La intención de analizar simultáneamente niveles de KL-6 séricos y en LBA pretendió

evaluar si había una traducción sérica de los cambios fisiopatológicos en el espacio alveolo-intersticial. Sin embargo, en nuestro estudio no encontramos una correlación entre los niveles de KL-6 en sangre y LBA. Estos hallazgos contrastan de algún modo con los de Kohno *et al.* (114) que describieron una relación entre las concentraciones de KL-6 en sangre y LBA en pacientes con neumonitis aguda, si bien sus resultados no son directamente comparables, puesto que se utilizó una metodología analítica diferente (ELISA) y en población con características fisiopatológicas y clínicas distintas.

Una posible hipótesis para explicar esta discordancia entre los valores séricos y de LBA de KL-6 es, como hemos dicho previamente, la influencia del estadio evolutivo de la enfermedad en el momento de la obtención de la muestra. En un contexto clínico ligeramente diferente como el SDRA, un estudio evidenció niveles de KL-6 en LBA significativamente superiores a los séricos, lo que podría reflejar una mayor actividad inflamatoria y reparativa a nivel alveolar durante fases activas de la enfermedad pulmonar (142). Esta hipótesis todavía no ha sido contrastada de forma sólida en el ámbito de las EPID.

Otros hallazgos secundarios pero destacados de nuestro estudio pusieron de manifiesto una correlación inversa entre las concentraciones de KL-6 en LBA y los valores de DLCO al inicio del estudio. Esta observación fue coherente con estudios previos que demostraron que KL-6 en LBA puede comportarse como un marcador de enfermedad avanzada (116).

El comportamiento variable de los valores del biomarcador KL-6 en las series descritas y en la nuestra, pero su clara correlación inversa con PFR y afectación radiológica, nos llevó a considerar su papel dentro de modelos predictivos más complejos, capaces de integrar múltiples variables con abordajes estadísticos no convencionales. Así, se podría valorar de forma más precisa el riesgo de progresión y/o mortalidad.

Actualmente, sólo disponemos de algunas escalas para calcular el riesgo de progresión o mortalidad, aunque ninguna de ellas incluye biomarcadores (**Tabla 12**). Las principales escalas utilizados en pacientes con EPID son el GAP (*Gender-Age-Physiology*) (143), el GAP-ILD (144), el CPI (*Composite Physiologic Index*) (145). De hecho, uno de los pocos estudios que relaciona el KL-6 con la escala GAP se realizó en una cohorte griega mostró que valores elevados de KL-6 se asociaron a un peor curso clínico y supervivencia de la enfermedad (146).

Escala	Variables	Enfermedades valoradas	Uso clínico
GAP	Género, edad, FVC y DLCO	FPI	Pronóstico
GAP-ILD	Género, edad, FVC y DLCO	EPID, no FPI	Pronóstico
CPI	DLCO, FVC, FEV1	FPI y otras EPID	Gravedad y progresión (correlación con el grado de fibrosis en TACAR)

Tabla 12: Principales escalas para la valoración de los pacientes con EPID. DLCO: capacidad de difusión pulmonar de monóxido de carbono; FVC: capacidad vital forzada; TACAR Tomografía Axial Computarizada de Alta Resolución

Así pues, con las posibles limitaciones de las escalas descritas, en nuestro segundo estudio desarrollamos un modelo predictivo mediante árboles de decisión que incluía una metodología con “*machine learning*”. Ésta combinó variables clínicas y KL-6 para identificar, por un lado, a pacientes con enfermedad fibrosante, y por otro, con enfermedad progresiva.

Un primer modelo generado a partir de las concentraciones séricas de KL-6 mostró una mejora en la identificación de pacientes con EPID fibrótica cuando se combinaron con el FEV1 y la FVC. Además, estos hallazgos nos mostraron que aumentando el punto de corte de KL-6 sérico se mejoraba significativamente la

identificación de los pacientes con fibrosis, aunque la normalidad de los valores obtenidos en la FVC sugiere que nuestra cohorte no representó a pacientes con enfermedad avanzada.

El segundo modelo de árbol de decisión fue utilizado para identificar la FPP. A pesar de que los valores de LBA como única variable no fueron capaces de predecir la progresión de los pacientes o identificar el grupo con EPID fibrótica, su combinación con variables funcionales mejoró la probabilidad de la identificación de estos pacientes.

De este modo, la potencial integración de los valores de KL-6 con los hallazgos radiológicos y las PFR como parte de modelos predictivos tiene especial interés en aquellas enfermedades con potencial fenotipo fibrosante progresivo, permitiendo una detección precoz con posible impacto terapéutico.

LIMITACIONES

Existen distintas consideraciones que se deben de tener en cuenta a la hora de interpretar los resultados de estas tesis.

El primer estudio se realizó en un único centro y con un número reducido de pacientes incluidos, si bien nuestro tamaño muestral fue mayor que la mayoría de series europeas y se realizó de forma prospectiva. Por tanto, los resultados deben ser validados en cohortes más amplias. Ambos estudios comparten algunas limitaciones a destacar. La categorización de los patrones radiológicos no se acompañó de una cuantificación del grado de fibrosis en la TACAR, si bien todas las imágenes fueron revisadas por un radiólogo experto en EPID. Por otro lado, la obtención de las muestras en sangre periférica y en LBA se realizó en el momento del diagnóstico, que puede haber variado entre pacientes y en función del estadio evolutivo de su enfermedad, dificultando así su interpretación. Además, el seguimiento limitado de los pacientes dificultó un análisis

específico de la supervivencia entre los grupos y no permitió realizar mediciones seriadas de KL-6, lo que proporcionaría una información más detallada de la evolución de la enfermedad. Finalmente, el tamaño reducido de la muestra no permitió un análisis específico para valorar la capacidad de distinción de KL-6 entre los diferentes tipos de EPID.

El segundo estudio merece un análisis más detallado de sus limitaciones. La inclusión de dos centros obliga a interpretar con cautela los resultados por las posibles diferencias genéticas y de polimorfismos entre la población española e italiana. Además, no fue posible la obtención de material biológico suficiente para realizar un estudio genético de ambas poblaciones. Por otro lado, no se dispuso de un grupo control (cohorte sin EPID) puesto que no se realizó broncoscopia y LBA en sujetos sanos por motivos éticos. Por último, no se recogieron datos específicos del LBA como la cantidad de líquido recuperado y la localización de obtención de la muestra.

8. CONCLUSIONES

- 1) KL-6 es un factor independiente para detectar la presencia de EPID. El punto de corte óptimo de KL-6 sérico para identificar a los pacientes con EPID se estableció en 465 U/ml en nuestra cohorte española. El punto de corte como herramienta de cribado fue 307 U/ml.
- 2) Las concentraciones en plasma de KL-6 se correlacionaron de manera inversa con la FVC y DLCO, reforzando su posible utilidad como marcador de progresión. El punto de corte establecido para detectar las EPID con fenotipo fibrosante progresivo se estableció en 641 U/ml. Para discriminar entre pacientes con EPID fibrótica y no fibrótica el valor óptimo fue 566 U/ml.
- 3) Los niveles de KL-6 en LBA no permitieron diferenciar a los pacientes con EPID fibrótica ni predecir su progresión. En global, no se observó correlación entre las concentraciones de KL-6 en LBA y en plasma, siendo los niveles séricos más elevados en todos los grupos analizados.
- 4) La combinación de KL-6 sérico y en LBA con otras variables y su integración en modelos predictivos mejoró la identificación tanto de pacientes con EPID fibrótica como de pacientes con EPID fibrosante progresiva.

9. LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN FUTURA

A raíz de los resultados de esta tesis, el grupo de investigación se plantea diversas líneas de desarrollo con la finalidad de consolidar los hallazgos y la aplicabilidad en práctica clínica de KL-6.

En primer lugar, se valorará el desarrollo de estudios nacionales multicéntricos con el objetivo de validar los resultados obtenidos en nuestra cohorte. En el contexto de su utilización como herramienta de cribado en pacientes con EAS y riesgo de EPID, se pretende realizar un estudio conjunto con Reumatología para validar el punto de corte obtenido para cribado.

En segundo lugar, anticipamos la inclusión de KL-6 en un modelo que integre variables clínicas, radiológicas, funcionales y demográficas, como parte del proceso futuro de medicina de precisión. Éste debería, probablemente, incluir la detección y análisis de elementos relacionados con proteómica, metabolómica y genómica, entre otros.

10.BIBLIOGRAFÍA

1. Xaubet A, Ancochea J, Blanquer R, Montero C, Morell F, Rodríguez Becerra E, et al. [Diagnosis and treatment of diffuse interstitial lung diseases]. Archivos de bronconeumologia. 2003;39(12):580-600.
2. Xaubet A, Ancochea J, Bollo E, Fernández-Fabrellas E, Franquet T, Molina-Molina M, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR) Research Group on Diffuse Pulmonary Diseases. Archivos de bronconeumologia. 2013;49(8):343-53.
3. Travis WD, Costabel U, Hansell DM, King TE, Jr., Lynch DA, Nicholson AG, et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. Am J Respir Crit Care Med. 2013;188(6):733-48.
4. Kolb M, Vašáková M. The natural history of progressive fibrosing interstitial lung diseases. Respiratory research. 2019;20(1):57.
5. Wuyts WA, Agostini C, Antoniou KM, Bouros D, Chambers RC, Cottin V, et al. The pathogenesis of pulmonary fibrosis: a moving target. The European respiratory journal. 2013;41(5):1207-18.
6. Betensley A, Sharif R, Karamichos D. A Systematic Review of the Role of Dysfunctional Wound Healing in the Pathogenesis and Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Journal of clinical medicine. 2016;6(1).
7. Wijsenbeek M, Cottin V. Spectrum of Fibrotic Lung Diseases. The New England journal of medicine. 2020;383(10):958-68.
8. Gunnarsson R, Aaløkken TM, Molberg Ø, Lund MB, Mynarek GK, Lexberg AS, et al. Prevalence and severity of interstitial lung disease in mixed connective tissue

disease: a nationwide, cross-sectional study. *Annals of the rheumatic diseases*.

2012;71(12):1966-72.

9. Bongartz T, Nannini C, Medina-Velasquez YF, Achenbach SJ, Crowson CS, Ryu JH, et al. Incidence and mortality of interstitial lung disease in rheumatoid arthritis: a population-based study. *Arthritis and rheumatism*. 2010;62(6):1583-91.

10. Zamora-Legoff JA, Krause ML, Crowson CS, Ryu JH, Matteson EL. Patterns of interstitial lung disease and mortality in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2017;56(3):344-50.

11. Mariampillai K, Granger B, Amelin D, Guiguet M, Hachulla E, Maurier F, et al. Development of a New Classification System for Idiopathic Inflammatory Myopathies Based on Clinical Manifestations and Myositis-Specific Autoantibodies. *JAMA neurology*. 2018;75(12):1528-37.

12. Roca F, Dominique S, Schmidt J, Smail A, Duhaut P, Lévesque H, et al. Interstitial lung disease in primary Sjögren's syndrome. *Autoimmunity reviews*. 2017;16(1):48-54.

13. Lynch DA, Sverzellati N, Travis WD, Brown KK, Colby TV, Galvin JR, et al. Diagnostic criteria for idiopathic pulmonary fibrosis: a Fleischner Society White Paper. *The Lancet Respiratory medicine*. 2018;6(2):138-53.

14. Molina-Molina M, Buendia-Roldan I, Castillo D, Caro F, Valenzuela C, Selman M. Diagnostic and Therapeutic Developments in Progressive Pulmonary Fibrosis. *Archivos de bronconeumologia*. 2022;58(5):418-24.

15. Cottin V, Wollin L, Fischer A, Quaresma M, Stowasser S, Harari S. Fibrosing interstitial lung diseases: knowns and unknowns. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society*. 2019;28(151).

16. du Bois RM, Weycker D, Albera C, Bradford WZ, Costabel U, Kartashov A, et al. Forced vital capacity in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: test properties and minimal clinically important difference. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;184(12):1382-9.
17. Nathan SD, Shlobin OA, Weir N, Ahmad S, Kaldjob JM, Battle E, et al. Long-term course and prognosis of idiopathic pulmonary fibrosis in the new millennium. *Chest*. 2011;140(1):221-9.
18. Marinescu DC, Hague CJ, Muller NL, Murphy D, Churg A, Wright JL, et al. CT Honeycombing and Traction Bronchiectasis Extent Independently Predict Survival across Fibrotic Interstitial Lung Disease Subtypes. *Radiology*. 2025;314(2):e241001.
19. Millan-Billi P, Serra C, Alonso Leon A, Castillo D. Comorbidities, Complications and Non-Pharmacologic Treatment in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Medical sciences (Basel, Switzerland)*. 2018;6(3).
20. du Bois RM, Weycker D, Albera C, Bradford WZ, Costabel U, Kartashov A, et al. Six-minute-walk test in idiopathic pulmonary fibrosis: test validation and minimal clinically important difference. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183(9):1231-7.
21. Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? Current opinion in HIV and AIDS. 2010;5(6):463-6.
22. Armanios M. The Role of Telomeres in Human Disease. *Annual review of genomics and human genetics*. 2022;23:363-81.
23. Seibold MA, Wise AL, Speer MC, Steele MP, Brown KK, Loyd JE, et al. A common MUC5B promoter polymorphism and pulmonary fibrosis. *The New England journal of medicine*. 2011;364(16):1503-12.

24. Juge PA, Lee JS, Ebstein E, Furukawa H, Dobrinskikh E, Gazal S, et al. MUC5B Promoter Variant and Rheumatoid Arthritis with Interstitial Lung Disease. *The New England journal of medicine*. 2018;379(23):2209-19.
25. Juge PA, Solomon JJ, van Moorsel CHM, Garofoli R, Lee JS, Louis-Sydney F, et al. MUC5B promoter variant rs35705950 and rheumatoid arthritis associated interstitial lung disease survival and progression. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2021;51(5):996-1004.
26. Ley B, Newton CA, Arnould I, Elicker BM, Henry TS, Vittinghoff E, et al. The MUC5B promoter polymorphism and telomere length in patients with chronic hypersensitivity pneumonitis: an observational cohort-control study. *The Lancet Respiratory medicine*. 2017;5(8):639-47.
27. Molina-Molina M, Planas-Cerezales L, Perona R. Telomere Shortening in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Arch Bronconeumol (Engl Ed)*. 2018;54(1):3-4.
28. Armanios M, Blackburn EH. The telomere syndromes. *Nature reviews Genetics*. 2012;13(10):693-704.
29. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science (New York, NY)*. 2010;327(5966):656-61.
30. Misharin AV, Morales-Nebreda L, Reyfman PA, Cuda CM, Walter JM, McQuattie-Pimentel AC, et al. Monocyte-derived alveolar macrophages drive lung fibrosis and persist in the lung over the life span. *The Journal of experimental medicine*. 2017;214(8):2387-404.
31. Kreuter M, Lee JS, Tzouvelekis A, Oldham JM, Molyneaux PL, Weycker D, et al. Monocyte Count as a Prognostic Biomarker in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2021;204(1):74-81.

32. 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. *The Lancet Respiratory medicine*. 2017;5(12):946-55.
33. Craig VJ, Zhang L, Hagood JS, Owen CA. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2015;53(5):585-600.
34. Vij R, Noth I. Peripheral blood biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2012;159(4):218-27.
35. Fujishima S, Shiomi T, Yamashita S, Yogo Y, Nakano Y, Inoue T, et al. Production and activation of matrix metalloproteinase 7 (matrilysin 1) in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Arch Pathol Lab Med*. 2010;134(8):1136-42.
36. Zhou LF, Jiang L, Li ZH, Kang J. [Change of matrix metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-7 in serum and bronchoalveolar lavage fluid of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis]. *Zhonghua jie he he hu xi za zhi = Zhonghua jiehe he huxi zazhi = Chinese journal of tuberculosis and respiratory diseases*. 2010;33(6):441-4.
37. Song JW, Do KH, Jang SJ, Colby TV, Han S, Kim DS. Blood biomarkers MMP-7 and SP-A: predictors of outcome in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*. 2013;143(5):1422-9.
38. Prasse A, Probst C, Bargagli E, Zissel G, Toews GB, Flaherty KR, et al. Serum CC-chemokine ligand 18 concentration predicts outcome in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;179(8):717-23.

39. Guiot J, Moermans C, Henket M, Corhay JL, Louis R. Blood Biomarkers in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Lung*. 2017;195(3):273-80.
40. De Lauretis A, Sestini P, Pantelidis P, Hoyles R, Hansell DM, Goh NS, et al. Serum interleukin 6 is predictive of early functional decline and mortality in interstitial lung disease associated with systemic sclerosis. *The Journal of rheumatology*. 2013;40(4):435-46.
41. Gubernatorova EO, Gorshkova EA, Polinova AI, Drutskaya MS. IL-6: Relevance for immunopathology of SARS-CoV-2. *Cytokine & growth factor reviews*. 2020;53:13-24.
42. Acosta Fernández O. [Serum markers in idiopathic pulmonary fibrosis. Implications for prognosis]. *Archivos de bronconeumologia*. 2006;42(8):377-9.
43. Greene KE, King TE, Jr., Kuroki Y, Bucher-Bartelson B, Hunninghake GW, Newman LS, et al. Serum surfactant proteins-A and -D as biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *The European respiratory journal*. 2002;19(3):439-46.
44. Kohno N, Kyoizumi S, Awaya Y, Fukuhara H, Yamakido M, Akiyama M. New serum indicator of interstitial pneumonitis activity. Sialylated carbohydrate antigen KL-6. *Chest*. 1989;96(1):68-73.
45. Ohshimo S, Yokoyama A, Hattori N, Ishikawa N, Hirasawa Y, Kohno N. KL-6, a human MUC1 mucin, promotes proliferation and survival of lung fibroblasts. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;338(4):1845-52.
46. Xu L, Yan DR, Zhu SL, Gu J, Bian W, Rong ZH, et al. KL-6 regulated the expression of HGF, collagen and myofibroblast differentiation. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2013;17(22):3073-7.
47. Zuo L, Zhang W, Wang Y, Qi X. Diagnostic Value of Serum KL-6 in Interstitial Lung Diseases. *International journal of general medicine*. 2024;17:3649-61.

48. Wang C, Wang Q, Liu T, Zhu J, Zhang B. Krebs von den Lungen-6 (KL-6) as a diagnostic marker for pulmonary fibrosis: A systematic review and meta-analysis. *Clinical biochemistry*. 2023;114:30-8.
49. Kobayashi J, Kitamura S. KL-6: a serum marker for interstitial pneumonia. *Chest*. 1995;108(2):311-5.
50. Ohnishi H, Yokoyama A, Kondo K, Hamada H, Abe M, Nishimura K, et al. Comparative study of KL-6, surfactant protein-A, surfactant protein-D, and monocyte chemoattractant protein-1 as serum markers for interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165(3):378-81.
51. Samukawa T, Hamada T, Uto H, Yanagi M, Tsukuya G, Nosaki T, et al. The elevation of serum napsin A in idiopathic pulmonary fibrosis, compared with KL-6, surfactant protein-A and surfactant protein-D. *BMC pulmonary medicine*. 2012;12:55.
52. Hu Y, Wang LS, Jin YP, Du SS, Du YK, He X, et al. Serum Krebs von den Lungen-6 level as a diagnostic biomarker for interstitial lung disease in Chinese patients. *The clinical respiratory journal*. 2017;11(3):337-45.
53. Hamai K, Iwamoto H, Ishikawa N, Horimasu Y, Masuda T, Miyamoto S, et al. Comparative Study of Circulating MMP-7, CCL18, KL-6, SP-A, and SP-D as Disease Markers of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Disease markers*. 2016;2016:4759040.
54. Zheng P, Liu X, Huang H, Guo Z, Wu G, Hu H, et al. Diagnostic value of KL-6 in idiopathic interstitial pneumonia. *Journal of thoracic disease*. 2018;10(8):4724-32.
55. He Q, Tang Y, Huang J, Rao Y, Lu Y. The value of KL-6 in the diagnosis and assessment of interstitial lung disease. *American journal of translational research*. 2021;13(8):9216-23.

56. Wang T, Yao Y, Wang Y, Wei W, Yin B, Huang M, et al. Evaluating the diagnostic and therapeutic significance of KL-6 in patients with interstitial lung diseases. *Heliyon*. 2024;10(7):e27561.
57. Zhu C, Zhao YB, Kong LF, Li ZH, Kang J. [The expression and clinical role of KL-6 in serum and BALF of patients with different diffuse interstitial lung diseases]. *Zhonghua jie he he hu xi za zhi = Zhonghua jiehe he huxi zazhi = Chinese journal of tuberculosis and respiratory diseases*. 2016;39(2):93-7.
58. Yamakawa H, Hagiwara E, Ikeda S, Iwasawa T, Otoshi R, Tabata E, et al. Evaluation of changes in the serum levels of Krebs von den Lungen-6 and surfactant protein-D over time as important biomarkers in idiopathic fibrotic nonspecific interstitial pneumonia. *Respiratory investigation*. 2019;57(5):422-9.
59. Okamoto T, Fujii M, Furusawa H, Tsuchiya K, Miyazaki Y, Inase N. The usefulness of KL-6 and SP-D for the diagnosis and management of chronic hypersensitivity pneumonitis. *Respiratory medicine*. 2015;109(12):1576-81.
60. Janssen R, Sato H, Grutters JC, Bernard A, van Velzen-Blad H, du Bois RM, et al. Study of Clara cell 16, KL-6, and surfactant protein-D in serum as disease markers in pulmonary sarcoidosis. *Chest*. 2003;124(6):2119-25.
61. Kitaichi N, Ariga T, Kase S, Yoshida K, Namba K, Ohno S. Usefulness of quantifying serum KL-6 levels in the follow-up of uveitic patients with sarcoidosis. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*. 2006;244(4):433-7.
62. Xue C, Wu N, Li X, Qiu M, Du X, Ye Q. Serum concentrations of Krebs von den Lungen-6, surfactant protein D, and matrix metalloproteinase-2 as diagnostic biomarkers in patients with asbestosis and silicosis: a case-control study. *BMC pulmonary medicine*. 2017;17(1):144.

63. Bergantini L, Bianchi F, Cameli P, Mazzei MA, Fui A, Sestini P, et al. Prognostic Biomarkers of Sarcoidosis: A Comparative Study of Serum Chitotriosidase, ACE, Lysozyme, and KL-6. *Disease markers*. 2019;2019:8565423.
64. Takahashi T, Munakata M, Ohtsuka Y, Satoh-Kamachi A, Sato R, Homma Y, et al. Serum KL-6 concentrations in dairy farmers. *Chest*. 2000;118(2):445-50.
65. Janssen R, Grutters JC, Sato H, van Velzen-Blad H, Zanen P, Kohno N, et al. Analysis of KL-6 and SP-D as disease markers in bird fancier's lung. Sarcoidosis, vasculitis, and diffuse lung diseases : official journal of WASOG. 2005;22(1):51-7.
66. Yoshikawa S, Tsushima K, Yasuo M, Fujimoto K, Kubo K, Kumagai T, et al. Hypersensitivity pneumonitis caused by *Penicillium citrinum*, not *Enoki* spores. *American journal of industrial medicine*. 2007;50(12):1010-7.
67. Nukui Y, Yamana T, Masuo M, Tateishi T, Kishino M, Tateishi U, et al. Serum CXCL9 and CCL17 as biomarkers of declining pulmonary function in chronic bird-related hypersensitivity pneumonitis. *PloS one*. 2019;14(8):e0220462.
68. d'Alessandro M, Bergantini L, Cameli P, Vietri L, Lanzarone N, Alonzi V, et al. Krebs von den Lungen-6 as a biomarker for disease severity assessment in interstitial lung disease: a comprehensive review. *Biomarkers in medicine*. 2020;14(8):665-74.
69. Mostafa AI, Salem AE, Ahmed HAM, Bayoumi AI, Halim RMA, Samie RMA. Role of Krebs von den Lungen-6 (KL-6) in Assessing Hypersensitivity Pneumonitis. *Tuberculosis and respiratory diseases*. 2021;84(3):200-8.
70. Sánchez-Díez S, Munoz X, Ojanguren I, Romero-Mesones C, Espejo D, Villar A, et al. YKL-40 and KL-6 Levels in Serum and Sputum of Patients Diagnosed With Hypersensitivity Pneumonitis. *The journal of allergy and clinical immunology In practice*. 2022;10(9):2414-23.

71. Singh N, Varghese J, England BR, Solomon JJ, Michaud K, Mikuls TR, et al. Impact of the pattern of interstitial lung disease on mortality in rheumatoid arthritis: A systematic literature review and meta-analysis. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2019;49(3):358-65.
72. Hax V, Bredemeier M, Didonet Moro AL, Pavan TR, Vieira MV, Pitrez EH, et al. Clinical algorithms for the diagnosis and prognosis of interstitial lung disease in systemic sclerosis. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2017;47(2):228-34.
73. Narváez J, Aburto M, Seoane-Mato D, Bonilla G, Acosta O, Candelas G, et al. Screening criteria for interstitial lung disease associated to rheumatoid arthritis: Expert proposal based on Delphi methodology. *Reumatol Clin (Engl Ed)*. 2023;19(2):74-81.
74. Rodríguez Portal JA, Brito García N, Díaz Del Campo Fontecha P, Valenzuela C, Ortiz AM, Nieto MA, et al. SER-SEPAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis-related interstitial lung disease. Part 1: Epidemiology, risk factors and prognosis. *Reumatol Clin (Engl Ed)*. 2022;18(8):443-52.
75. Rahaghi FF, Hsu VM, Kaner RJ, Mayes MD, Rosas IO, Saggarr R, et al. Expert consensus on the management of systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. *Respiratory research*. 2023;24(1):6.
76. Lee YS, Kim HC, Lee BY, Lee CK, Kim MY, Jang SJ, et al. The Value of Biomarkers as Predictors of Outcome in Patients with Rheumatoid Arthritis-Associated Usual Interstitial Pneumonia. *Sarcoidosis, vasculitis, and diffuse lung diseases : official journal of WASOG*. 2016;33(3):216-23.
77. Avouac J, Cauvet A, Steelandt A, Shirai Y, Elhai M, Kuwana M, et al. Improving risk-stratification of rheumatoid arthritis patients for interstitial lung disease. *PloS one*. 2020;15(5):e0232978.

78. Fields A, Potel KN, Cabuhal R, Aziri B, Stewart ID, Schock BC. Mediators of systemic sclerosis-associated interstitial lung disease (SSc-ILD): systematic review and meta-analyses. *Thorax*. 2023;78(8):799-807.
79. Wang Y, Chen S, Zheng S, Lin J, Hu S, Zhuang J, et al. The role of lung ultrasound B-lines and serum KL-6 in the screening and follow-up of rheumatoid arthritis patients for an identification of interstitial lung disease: review of the literature, proposal for a preliminary algorithm, and clinical application to cases. *Arthritis research & therapy*. 2021;23(1):212.
80. Xue M, Cai C, Zeng Y, Xu Y, Chen H, Hu H, et al. Krebs von den Lungen-6 and surfactant protein-A in interstitial pneumonia with autoimmune features. *Medicine*. 2021;100(4):e24260.
81. Bonella F, Volpe A, Caramaschi P, Nava C, Ferrari P, Schenk K, et al. Surfactant protein D and KL-6 serum levels in systemic sclerosis: correlation with lung and systemic involvement. *Sarcoidosis, vasculitis, and diffuse lung diseases : official journal of WASOG*. 2011;28(1):27-33.
82. Hant FN, Ludwicka-Bradley A, Wang HJ, Li N, Elashoff R, Tashkin DP, et al. Surfactant protein D and KL-6 as serum biomarkers of interstitial lung disease in patients with scleroderma. *The Journal of rheumatology*. 2009;36(4):773-80.
83. Doishita S, Inokuma S, Asashima H, Nakachi S, Matsuo Y, Rokutanda R, et al. Serum KL-6 level as an indicator of active or inactive interstitial pneumonitis associated with connective tissue diseases. *Internal medicine (Tokyo, Japan)*. 2011;50(23):2889-92.
84. Fathi M, Barbasso Helmers S, Lundberg IE. KL-6: a serological biomarker for interstitial lung disease in patients with polymyositis and dermatomyositis. *Journal of internal medicine*. 2012;271(6):589-97.

85. Benyamine A, Heim X, Resseguier N, Bertin D, Gomez C, Ebbo M, et al. Elevated serum Krebs von den Lungen-6 in systemic sclerosis: a marker of lung fibrosis and severity of the disease. *Rheumatology international*. 2018;38(5):813-9.
86. Elhai M, Hoffmann-Vold AM, Avouac J, Pezet S, Cauvet A, Leblond A, et al. Performance of Candidate Serum Biomarkers for Systemic Sclerosis-Associated Interstitial Lung Disease. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)*. 2019;71(6):972-82.
87. Ma H, Lu J, Song Y, Wang H, Yin S. The value of serum Krebs von den lungen-6 as a diagnostic marker in connective tissue disease associated with interstitial lung disease. *BMC pulmonary medicine*. 2020;20(1):6.
88. Zhou A, Tang H, Peng W, Wang Y, Tang X, Yang H, et al. KL-6 levels in the connective tissue disease population: typical values and potential confounders-a retrospective, real-world study. *Frontiers in immunology*. 2023;14:1098602.
89. Xing H, Liang H. The clinical value of KL-6 for predicting the occurrence and severity of connective tissue disease-associated interstitial lung disease is not affected by CTD type or treatment. *PeerJ*. 2024;12:e17792.
90. Kumánovics G, Görbe E, Minier T, Simon D, Berki T, Czirják L. Follow-up of serum KL-6 lung fibrosis biomarker levels in 173 patients with systemic sclerosis. *Clinical and experimental rheumatology*. 2014;32(6 Suppl 86):S-138-44.
91. Choi MG, Choi SM, Lee JH, Yoon JK, Song JW. Changes in blood Krebs von den Lungen-6 predict the mortality of patients with acute exacerbation of interstitial lung disease. *Scientific reports*. 2022;12(1):4916.
92. Rai M, Parthasarathi A, Beeraka NM, Kaleem Ullah M, Malamardi S, Padukudru S, et al. Circulatory Serum Krebs von Den Lungen-6 and Surfactant Protein-D Concentrations Predict Interstitial Lung Disease Progression and Mortality. *Cells*. 2023;12(9).

93. Guo L, Yang Y, Liu F, Jiang C, Yang Y, Pu H, et al. Clinical Research on Prognostic Evaluation of Subjects With IPF by Peripheral Blood Biomarkers, Quantitative Imaging Characteristics and Pulmonary Function Parameters. Arch Bronconeumol (Engl Ed). 2020;56(6):365-72.
94. Majewski S, Szewczyk K, Żal A, Białas AJ, Miłkowska-Dymanowska J, Piotrowski WJ. Serial Measurements of Circulating KL-6, SP-D, MMP-7, CA19-9, CA-125, CCL18, and Periostin in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis Receiving Antifibrotic Therapy: An Exploratory Study. Journal of clinical medicine. 2021;10(17).
95. Wakamatsu K, Nagata N, Kumazoe H, Oda K, Ishimoto H, Yoshimi M, et al. Prognostic value of serial serum KL-6 measurements in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. Respiratory investigation. 2017;55(1):16-23.
96. Satoh H, Kurishima K, Ishikawa H, Ohtsuka M. Increased levels of KL-6 and subsequent mortality in patients with interstitial lung diseases. Journal of internal medicine. 2006;260(5):429-34.
97. Kim HC, Choi KH, Jacob J, Song JW. Prognostic role of blood KL-6 in rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease. PloS one. 2020;15(3):e0229997.
98. Miądlukowska E, Miłkowska-Dymanowska J, Białas AJ, Makowska JS, Lewandowska-Polak A, Puła A, et al. Serum KL-6 and SP-D: Markers of Lung Function in Autoimmune-Related Interstitial Lung Diseases. International journal of molecular sciences. 2025;26(3).
99. Volkmann ER, Wilhalme H, Tashkin DP, Kim GHJ, Goldin J, Haussmann A, et al. Treatment Response Biomarkers for Systemic Sclerosis-Associated Interstitial Lung Disease. Arthritis care & research. 2025;77(6):753-9.

100. Sokai A, Tanizawa K, Handa T, Kanatani K, Kubo T, Ikezoe K, et al. Importance of serial changes in biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *ERJ open research*. 2017;3(3).
101. Aloisio E, Braga F, Puricelli C, Panteghini M. Prognostic role of Krebs von den Lungen-6 (KL-6) measurement in idiopathic pulmonary fibrosis: a systematic review and meta-analysis. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2021;59(8):1400-8.
102. Kinoshita F, Hamano H, Harada H, Kinoshita T, Igishi T, Hagino H, et al. Role of KL-6 in evaluating the disease severity of rheumatoid lung disease: comparison with HRCT. *Respiratory medicine*. 2004;98(11):1131-7.
103. Jiang Y, Luo Q, Han Q, Huang J, Ou Y, Chen M, et al. Sequential changes of serum KL-6 predict the progression of interstitial lung disease. *Journal of thoracic disease*. 2018;10(8):4705-14.
104. Sieiro Santos C, Antolín SC, Lorenzo JC, Garay CL, Morales CM, de Miguel EB, et al. KL6 and IL-18 levels are negatively correlated with respiratory function tests and ILD extent assessed on HRCT in patients with systemic sclerosis-related interstitial lung disease (SSc-ILD). *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2024;65:152366.
105. Ichiyasu H, Ichikado K, Yamashita A, Iyonaga K, Sakamoto O, Suga M, et al. Pneumocyte biomarkers KL-6 and surfactant protein D reflect the distinct findings of high-resolution computed tomography in nonspecific interstitial pneumonia. *Respiration; international review of thoracic diseases*. 2012;83(3):190-7.
106. Shin B, Oh YJ, Kim J, Park SG, Lee KS, Lee HY. Correlation between CT-based phenotypes and serum biomarker in interstitial lung diseases. *BMC pulmonary medicine*. 2024;24(1):523.

107. Okuda R, Hagiwara E, Baba T, Kitamura H, Kato T, Ogura T. Safety and efficacy of pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis in clinical practice. *Respiratory medicine*. 2013;107(9):1431-7.
108. Nakamura M, Okamoto M, Fujimoto K, Ebata T, Tominaga M, Nouno T, et al. A retrospective study of the tolerability of nintedanib for severe idiopathic pulmonary fibrosis in the real world. *Annals of translational medicine*. 2019;7(12):262.
109. Choi MG, Choi SM, Lee JH, Kim JY, Song JW. Blood Krebs von den Lungen-6 levels predict treatment response to antifibrotic therapy in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory research*. 2022;23(1):334.
110. Feng H, Zhao Y, Li Z, Kang J. Real-life experiences in a single center: efficacy of pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis and fibrotic idiopathic non-specific interstitial pneumonia patients. *Therapeutic advances in respiratory disease*. 2020;14:1753466620963015.
111. d'Alessandro M, Carleo A, Cameli P, Bergantini L, Perrone A, Vietri L, et al. Correction to: BAL biomarkers' panel for differential diagnosis of interstitial lung diseases. *Clinical and experimental medicine*. 2020;20(2):217.
112. Wakamatsu K, Nagata N, Kumazoe H, Hara M, Asai S, Noda N, et al. Prognostic performance of Krebs von den Lungen-6, surfactant protein A, surfactant protein D levels in the serum and bronchoalveolar lavage fluid in chronic fibrosing interstitial pneumonia: a retrospective study. *BMC pulmonary medicine*. 2024;24(1):404.
113. Lin L, Zhao Y, Li Z, Li Y, Wang W, Kang J, et al. Expression of S100A9 and KL-6 in common interstitial lung diseases. *Medicine*. 2022;101(17):e29198.

114. Kohno N, Awaya Y, Oyama T, Yamakido M, Akiyama M, Inoue Y, et al. KL-6, a mucin-like glycoprotein, in bronchoalveolar lavage fluid from patients with interstitial lung disease. *The American review of respiratory disease*. 1993;148(3):637-42.
115. Shadrach BJ, Dutt N, Elhence P, Banerjee M, Chauhan NK, Jalandra RN, et al. Clinical Utility of Bronchoalveolar Lavage Neutrophilia and Biomarkers for Evaluating Severity of Chronic Fibrosing Interstitial Lung Diseases. *Cureus*. 2023;15(7):e42162.
116. Bennett D, Salvini M, Fui A, Cillis G, Cameli P, Mazzei MA, et al. Calgranulin B and KL-6 in Bronchoalveolar Lavage of Patients with IPF and NSIP. *Inflammation*. 2019;42(2):463-70.
117. Lanzarone N, Gentili F, Alonzi V, Bergantini L, d'Alessandro M, Rottoli P, et al. Bronchoalveolar lavage and serum KL-6 concentrations in chronic hypersensitivity pneumonitis: correlations with radiological and immunological features. *Internal and emergency medicine*. 2020;15(7):1247-54.
118. Miyoshi S, Hamada H, Kadowaki T, Hamaguchi N, Ito R, Irifune K, et al. Comparative evaluation of serum markers in pulmonary sarcoidosis. *Chest*. 2010;137(6):1391-7.
119. Soccio P, Moriondo G, d'Alessandro M, Scioscia G, Bergantini L, Gangi S, et al. Role of BAL and Serum Krebs von den Lungen-6 (KL-6) in Patients with Pulmonary Fibrosis. *Biomedicines*. 2024;12(2).
120. Ishikawa N, Hattori N, Yokoyama A, Kohno N. Utility of KL-6/MUC1 in the clinical management of interstitial lung diseases. *Respiratory investigation*. 2012;50(1):3-13.
121. Shigemura M, Konno S, Nasuhara Y, Shijubo N, Shimizu C, Nishimura M. Serum KL-6 concentrations are associated with molecular sizes and efflux behavior of

KL-6/MUC1 in healthy subjects. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2013;424:148-52.

122. Horimasu Y, Hattori N, Ishikawa N, Kawase S, Tanaka S, Yoshioka K, et al. Different MUC1 gene polymorphisms in German and Japanese ethnicities affect serum KL-6 levels. *Respiratory medicine*. 2012;106(12):1756-64.

123. Hansell DM, Bankier AA, MacMahon H, McLoud TC, Müller NL, Remy J. Fleischner Society: glossary of terms for thoracic imaging. *Radiology*. 2008;246(3):697-722.

124. García-Río F, Calle M, Burgos F, Casan P, Del Campo F, Galdiz JB, et al. Spirometry. Spanish Society of Pulmonology and Thoracic Surgery (SEPAR). *Archivos de bronconeumologia*. 2013;49(9):388-401.

125. Graham BL, Brusasco V, Burgos F, Cooper BG, Jensen R, Kendrick A, et al. 2017 ERS/ATS standards for single-breath carbon monoxide uptake in the lung. *The European respiratory journal*. 2017;49(1).

126. Raghu G, Remy-Jardin M, Richeldi L, Thomson CC, Inoue Y, Johkoh T, et al. Idiopathic Pulmonary Fibrosis (an Update) and Progressive Pulmonary Fibrosis in Adults: An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med*. 2022;205(9):e18-e47.

127. Kennedy B, Branagan P, Moloney F, Haroon M, O'Connell OJ, O'Connor TM, et al. Biomarkers to identify ILD and predict lung function decline in scleroderma lung disease or idiopathic pulmonary fibrosis. *Sarcoidosis, vasculitis, and diffuse lung diseases : official journal of WASOG*. 2015;32(3):228-36.

128. Lancaster L, Bonella F, Inoue Y, Cottin V, Siddall J, Small M, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: Physician and patient perspectives on the pathway to care from

symptom recognition to diagnosis and disease burden. *Respirology* (Carlton, Vic). 2022;27(1):66-75.

129. Spagnolo P, Ryerson CJ, Putman R, Oldham J, Salisbury M, Sverzellati N, et al. Early diagnosis of fibrotic interstitial lung disease: challenges and opportunities. *The Lancet Respiratory medicine*. 2021;9(9):1065-76.

130. Hoyer N, Prior TS, Bendstrup E, Shaker SB. Diagnostic delay in IPF impacts progression-free survival, quality of life and hospitalisation rates. *BMJ open respiratory research*. 2022;9(1).

131. Cano-Jiménez E, Vázquez Rodríguez T, Martín-Robles I, Castillo Villegas D, Juan García J, Bollo de Miguel E, et al. Diagnostic delay of associated interstitial lung disease increases mortality in rheumatoid arthritis. *Scientific reports*. 2021;11(1):9184.

132. Ishii H, Mukae H, Kadota J, Kaida H, Nagata T, Abe K, et al. High serum concentrations of surfactant protein A in usual interstitial pneumonia compared with non-specific interstitial pneumonia. *Thorax*. 2003;58(1):52-7.

133. Jehn LB, Costabel U, Boerner E, Wälscher J, Theegarten D, Taube C, et al. Serum KL-6 as a Biomarker of Progression at Any Time in Fibrotic Interstitial Lung Disease. *Journal of clinical medicine*. 2023;12(3).

134. Qin H, Xu XP, Zou J, Zhao XJ, Wu HW, Zha QF, et al. Krebs von den Lungen-6 associated with chest high-resolution CT score in evaluation severity of patients with interstitial lung disease. *Pulmonology*. 2019;25(3):143-8.

135. Ohshimo S, Ishikawa N, Horimasu Y, Hattori N, Hirohashi N, Tanigawa K, et al. Baseline KL-6 predicts increased risk for acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory medicine*. 2014;108(7):1031-9.

136. Kakugawa T, Yokota S, Ishimatsu Y, Hayashi T, Nakashima S, Hara S, et al. Serum heat shock protein 47 levels are elevated in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Cell stress & chaperones*. 2013;18(5):581-90.
137. Olson AL, Brown KK, Swigris JJ. Understanding and optimizing health-related quality of life and physical functional capacity in idiopathic pulmonary fibrosis. *Patient related outcome measures*. 2016;7:29-35.
138. Sgalla G, Iovene B, Calvello M, Ori M, Varone F, Richeldi L. Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and management. *Respiratory research*. 2018;19(1):32.
139. George PM, Spagnolo P, Kreuter M, Altinisik G, Bonifazi M, Martinez FJ, et al. Progressive fibrosing interstitial lung disease: clinical uncertainties, consensus recommendations, and research priorities. *The Lancet Respiratory medicine*. 2020;8(9):925-34.
140. Flaherty KR, Wells AU, Cottin V, Devaraj A, Walsh SLF, Inoue Y, et al. Nintedanib in Progressive Fibrosing Interstitial Lung Diseases. *The New England journal of medicine*. 2019;381(18):1718-27.
141. Meyer KC, Raghu G, Baughman RP, Brown KK, Costabel U, du Bois RM, et al. An official American Thoracic Society clinical practice guideline: the clinical utility of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185(9):1004-14.
142. Kondo T, Hattori N, Ishikawa N, Murai H, Haruta Y, Hirohashi N, et al. KL-6 concentration in pulmonary epithelial lining fluid is a useful prognostic indicator in patients with acute respiratory distress syndrome. *Respiratory research*. 2011;12(1):32.

143. Ley B, Ryerson CJ, Vittinghoff E, Ryu JH, Tomassetti S, Lee JS, et al. A multidimensional index and staging system for idiopathic pulmonary fibrosis. *Annals of internal medicine*. 2012;156(10):684-91.
144. Ryerson CJ, Vittinghoff E, Ley B, Lee JS, Mooney JJ, Jones KD, et al. Predicting survival across chronic interstitial lung disease: the ILD-GAP model. *Chest*. 2014;145(4):723-8.
145. Wells AU, Desai SR, Rubens MB, Goh NS, Cramer D, Nicholson AG, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: a composite physiologic index derived from disease extent observed by computed tomography. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(7):962-9.
146. Domvri K, Organtzis I, Apostolopoulos A, Fouka E, Kontakiotis T, Papakosta D. Prognostic Value of Serum Biomarkers in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis in Relation to Disease Progression. *Journal of personalized medicine*. 2023;13(9).

11.ANEXO

Millan-Billi P, Castellví I, Martinez-Martinez L, Mariscal A, Barril S, D'Alessandro M, Franquet T, Castillo D. Diagnostic Value of Krebs von den Lungen (KL-6) for Interstitial Lung Disease: A European Prospective Cohort. Arch Bronconeumol. 2024 Jun;60(6):350-355. English, Spanish. doi: 10.1016/j.arbres.2024.03.028. Epub 2024 Apr 6. PMID: 38644152.

Archivos de Bronconeumología 60 (2024) 350–355



Original Article

Diagnostic Value of Krebs von den Lungen (KL-6) for Interstitial Lung Disease: A European Prospective Cohort



Paloma Millan-Billi^{a,b,c,d}, Iván Castellví^{c,d,e}, Laura Martinez-Martinez^{c,f,g}, Anais Mariscal^{c,f,g}, Silvia Barril^{b,g,h}, Miriana D'Alessandroⁱ, Tomás Franquet^j, Diego Castillo^{b,c,d,*}

^a Respiratory Medicine Department, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

^b Respiratory Medicine Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

^c Sant Pau Biomedical Research Institute (IIB-Sant Pau), Barcelona, Spain

^d Medicine Department, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

^e Rheumatology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

^f Immunology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

^g Cellular Biology, Physiology, and Immunology Department, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

^h Respiratory Medicine Department, Hospital Universitario Arnau de Vilanova, Lleida, Spain

ⁱ Respiratory Diseases Unit, Department of Medical and Surgical Sciences and Neurosciences, University of Siena, Siena, Italy

^j Radiology Department, Thoracic Unit, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 January 2024

Accepted 31 March 2024

Available online 6 April 2024

Keywords:

Lung biomarkers

Interstitial lung disease

Krebs von den Lungen

KL-6

Serum biomarkers

Non-specific interstitial pneumonia

ABSTRACT

Introduction: Krebs von den Lungen 6 (KL-6) is a mucin-1 glycoprotein produced by type II pneumocytes. High levels of KL-6 in blood may be found in patients with lung fibrosis. In Asia this biomarker is used for diagnosis and prognosis in interstitial lung diseases (ILD). There is a lack of information regarding KL-6 cut-off point for diagnosis and prognosis in European population. The aim of this study was to establish the cut-off point for serum KL-6 associated with the presence of ILD in the Spanish population.

Methods: Prospective study including subjects who underwent chest HRCT, PFTs and autoimmune blood analysis. Two groups were created: non-ILD subjects and ILD patients. Serum KL-6 concentrations were measured using a Lumipulse KL-6 reagent assay and the optimal cut-off value was evaluated by a ROC analysis. Data on demographics and smoking history was also collected.

Results: One hundred seventy-nine patients were included, 102 with ILD. Median serum KL-6 values overall were 762 U/mL, 1080 (± 787) U/mL for the ILD group vs 340 (± 152) U/mL for the non-ILD group ($p < 0.0001$). The main radiological pattern was NSIP (43%). ROC analysis showed greater specificity (86%) and sensitivity (82%) for KL-6 465 U/mL for detecting ILD patients. The multivariate logistic regression model pointed to the male sex, higher KL-6 values, lower FVC and low DLCO values as independent factors associated with ILD.

Conclusion: Serum KL-6 values greater than 465 U/mL have excellent sensitivity and specificity for detecting ILD in our Spanish cohort. Multicentre studies are needed to validate our results.

© 2024 SEPAR. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introduction

Interstitial lung disease (ILD) refers to a heterogenous group of diseases that mainly affect the alveolar–interstitial space and that share common features, such as the presence of lung fibrosis.¹ Diagnosis is based on clinical, radiological and, if necessary, histological findings. Follow-up consists mainly of clinical evaluation, pulmonary function tests (PFTs), and chest high-resolution computed tomography (HRCT). However, there is a growing interest in serum biomarkers as a non-invasive means of early detection and follow-up of patients with ILD.

Abbreviations: ANA, antinuclear antibody; AUC, area under the curve; CLEIA, chemiluminescent enzyme immunoassay; CTD, connective tissue disease; DLCO, lung diffusing capacity for carbon monoxide; ENA, extractable nuclear antigen; FEV1, forced expiratory volume in the first second; FVC, forced vital capacity; HRCT, high-resolution computed tomography; ILD, interstitial lung disease; IPF, idiopathic pulmonary fibrosis; KL-6, Krebs von den Lungen; NSIP, non-specific interstitial pneumonia; PFT, pulmonary function test; ROC, receiver operating characteristic; SD, standard deviation; STROBE, Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology; UIP, usual interstitial pneumonia.

* Corresponding author.

E-mail address: dcastillo@santpau.cat (D. Castillo).

<https://doi.org/10.1016/j.arbres.2024.03.028>

0300-2896/© 2024 SEPAR. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

El material y copyright de este artículo pertenecen a la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR).

The therapeutic and prognostic impact of ILD in connective tissue disease (CTD) is especially important given the high associated morbidity and mortality.^{2–4} In fact, for all patients with systemic sclerosis, a recent expert consensus⁵ recommends screening for ILD that includes HRCT, PFTs, and chest auscultation. Early detection is crucial since ILD may already be at an advanced stage by the time symptoms appear or PFT results are altered.

Krebs von den Lungen 6 (KL-6) is a mucin-1 glycoprotein produced by type II pneumocytes. High levels of alveolar KL-6⁶ and blood KL-6⁷ may be found in patients with lung fibrosis due to epithelial damage, pneumocyte regenerating activity, and increased vascular permeability.

KL-6 has been extensively studied in Asia,⁸ mainly in the Japanese population, where values are used in current clinical practice to diagnose⁹ and especially to evaluate ILD progression. KL-6 implications for idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) diagnosis and prognosis¹⁰ has also been explored for fibrosing lung diseases associated with CTD,^{11,12} including systemic sclerosis.¹³

Nonetheless, there is a lack of information regarding KL-6 cut-off points, diagnostic and prognostic value for the European population. Therefore, the aim of this study was to establish the cut-off point for serum KL-6 associated with the presence of ILD in the Spanish population.

Material and Methods

Study Design

Our prospective study, performed at Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona, Spain) from September 2016 to July 2018, was approved by the Hospital Ethics Committee and complied with all clinical guidelines (protocol code: ILBSP-EPI-2018-108). Patients signed an informed consent before inclusion in the study. Results are reported following “Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology” (STROBE) guidelines.¹⁴

Population

Patients from the respiratory medicine and rheumatology outpatients clinic were prospectively recruited. Inclusion criteria were age more than 18 years old, ability to perform PFTs and chest HRCT performed within the last 6 months before inclusion. In the ILD group, we included patients with interstitial lung involvement on chest HRCT following the Fleischner's society criteria.¹⁵ Note that this group was composed by all ILD aetiologies including CTD. The non-ILD group included healthy subjects that underwent a chest HRCT for other reasons (patients under study of pulmonary familiar fibrosis, cases of resolved post-infectious organizing pneumonia), patients with other respiratory conditions (e.g. asthma, bronchiectasis, COPD and pulmonary embolism) and CTD patients with no HRCT evidence of ILD. Exclusion criteria were the inability to perform PFTs and unsigned informed consent.

Patients were diagnosed following current guidelines and were managed independently for the purpose of the study. ILD cases were reviewed by a multidisciplinary decision committee.

Data Collection

All included patients underwent complete blood analysis including serological antinuclear antibody (ANA) and extractable nuclear antigen (ENA) screening to test for autoimmunity and serum KL-6. PFTs, including spirometry, and diffusing capacity for carbon monoxide (DLCO) (helium dilution technique; Master Screen Body Diffusion, Jaeger) were also performed. PFT results and reference values were those recommended by the relevant European and Spanish societies.^{16–18} Data were also collected on

demographics, smoking history, comorbidities, and pharmacological treatment. All subjects underwent HRCT that was reviewed by a radiologist with ILD expertise (TF). Fleischner Society recommendations were followed for imaging procedures and radiology pattern classification.^{19,20}

KL-6 Analysis

Serum KL-6 concentrations, expressed in U/mL, were measured using a Lumipulse KL-6 reagent assay (Fujirebio Europe, NV) based on the chemiluminescent enzyme immunoassay (CLEIA) technology, following manufacturer instructions.

Statistical Analysis

Continuous data were summarized in terms of the number of observations, mean, standard deviation (SD), median, minimum, maximum, and first and third quartiles. Categorical data were summarized in terms of the number of subjects (*N*), frequency counts (*n*), and percentages (%). Statistical significance (*p*-value) in comparing the ILD and non-ILD groups was determined by the Student *t*-test for quantitative variables, Fisher's exact test for categorical variables, and the Mantel–Haenszel exact test for ordinal variables. Spearman's correlation coefficient was calculated to check for correlation between FVC and KL-6. *p*-Values for test multiplicity were not corrected.

The usefulness of serum KL-6 as a diagnostic biomarker for ILDs was evaluated by receiver operating characteristic (ROC) area under the curve (AUC) analysis. The optimal cut-off value to discriminate patients with ILD from healthy subjects or non-ILD patients was determined by Youden's *J* statistic, and the associated contingency table (cut-off value vs presence of ILD) summarized results for accuracy, disagreement, sensitivity, specificity, false positives, false negatives, positive predicted values, negative predicted values, Kappa index values, and McNemar's *p*-values. Also analyzed was a contingency table with a 5% false positive rate and 95% sensitivity. Logistic regression analysis was conducted to analyze how sex, FVC values, and KL-6 levels modified the ILD risk, and a conditional inference tree was computed using KL-6 and sex as predictors of ILD.

All statistical analyses were performed using SAS® Version 9.4 TS1M5 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) in a secure and validated environment.

Results

A total of 179 patients were included, 102 with ILD. Mean (SD) age was 65.4 (12.9) years and 58% (*n* = 104) were women. The main characteristics of the ILD and non-ILD groups are summarized in Table 1. There were statistically significant differences between the ILD and non-ILD groups regarding age and sex, but not smoking history.

Diagnoses (after multidisciplinary committee discussion) were as follows: IPF, 7 (6.9%); fibrotic non-specific interstitial pneumonitis (NSIP), 9 (8.9%); and fibrotic hypersensitivity pneumonitis, 9 (8.9%). Systemic sclerosis and Sjögren syndrome were the most prevalent CTDs in the ILD group patients: 16 (15.7%) and 14 (13.7%), respectively (see all ILD etiologies/diagnoses in Supplementary material Table 1).

The main radiological pattern was NSIP in 77 patients (43%), followed by usual interstitial pneumonia (UIP) in 57 (32%). Sub-analysis by radiological pattern showed statistically significant differences between the UIP and non-UIP groups for FVC <70%, DLCO, sex, and age but not for baseline KL-6 (see Supplementary material Table 2).

Table 1
Patient Demographic, Clinical, and Functional Respiratory Test Characteristics.

	Total (n = 179)	ILD (n = 102)	Non-ILD (n = 77)	p-Value
Sex, n (%)				
Male	75 (41.9%)	55 (53.9%)	20 (26.0%)	0.0002 ^a
Female	104 (58.1%)	47 (46.1%)	57 (74.0%)	
Age, years				
Mean (SD)	65.4 (12.9)	69.2 (11.7)	60.4 (12.7)	<0.0001 ^b
Smoking, n (%)				
Never	99 (53.3%)	52 (51.0%)	47 (61.0%)	0.3341 ^c
Formerly	58 (32.4%)	37 (36.3%)	21 (27.3%)	
Currently	22 (12.3%)	13 (12.7%)	9 (11.7%)	
FVC (L)				
Mean (SD)	3.2 (1.0)	2.9 (0.9)	3.6 (1.0)	<0.0001 ^b
FVC, %				
Mean (SD)	91.8 (21.7)	82.2 (19.7)	105.0 (16.7)	<0.0001 ^b
FVC <70%, n (%)				
No	146 (83.0%)	75 (73.5%)	71 (95.9%)	<0.0001 ^a
Yes	30 (17.0%)	27 (26.5%)	3 (4.1%)	
DLCO, mL/min/mmHg				
Mean (SD)	16.4 (6.2)	14.4 (5.7)	19.3 (5.6)	<0.0001 ^b
DLCO initial value, %				
Mean (SD)	72.7 (20.9)	64.6 (19.3)	83.8 (17.8)	<0.0001 ^b
KL-6, U/mL				
Mean (SD)	762.0 (704.7)	1080.1 (787.7)	340.7 (152.0)	<0.0001 ^b
Initial treatment				
No	146 (83.4%)	81 (80.2%)	65 (87.8%)	0.2192 ^a
Yes	29 (16.6%)	20 (19.8%)	9 (12.2%)	0.2192 ^a

DLCO: lung diffusing capacity for carbon monoxide; FVC: forced vital capacity; ILD: interstitial lung disease; KL-6: Krebs von den Lungen; SD: standard deviation.

^a Fisher's exact test.^b Independent Student t-test.^c Mantel-Haenszel exact test.

Mean (SD) FVC was 91.8% (21.7%) and mean (SD) DLCO was 72.7% (21%). Statistically significant difference was observed for FVC and DLCO between the ILD group and the non-ILD group ($p < 0.01$). Group sub-analysis according to FVC >70% vs <70% revealed differences in KL-6, DLCO, UIP vs non-UIP radiology patterns, and sex. No differences were found with respect to age or smoking history (Table 2).

KL-6 Values and ROC Analysis

Mean (SD) serum KL-6 values overall were 762 (704) U/mL, and were 1080 (787) U/mL for the ILD group vs 340 (152) U/mL for the non-ILD group ($p < 0.0001$).

Fig. 1 depicts results of the ROC analysis using AUC, showing greater specificity (86%) and sensitivity (82%) for KL-6 ≥ 465 U/mL for patients with ILD. ROC analysis to determine the optimal cut-off value for screening purposes showed 95% sensitivity for KL-6 ≥ 307 U/mL. Fig. 2 depicts sensitivity and specificity values according to KL-6 values and the chosen cut-off points.

In order to establish a better correlation between KL-6 values and PFT we performed a secondary ROC analysis to identify ILD based on FVC and DLCO ranges. An optimal KL-6 cut-off point was 449 U/mL for FVC greater than 80% group (sensitivity 83%, specificity 81%) and 942 U/mL for FVC between 50 and 80%. As for DLCO, the optimal cut-off was 424 U/mL for DLCO greater than 80% (sensitivity 82%, specificity 74%), 469 U/mL for DLCO between 50 and 80% and 489 U/mL for DLCO <50% (see Supplementary material Figs. 1 and 2).

Sub-analyses of ILD, ILD-CTD, non-ILD, and non-ILD-CTD groups revealed no statistically significant differences in KL-6 values between the ILD and ILD-CTD groups, or between the non-ILD and non-ILD-CTD groups.

Table 2
Patients Characteristics According to FVC <70%.

	FVC >70% (n = 146)	FVC <70% (n = 30)	p-Value
Sex			
Male	56 (38.4%)	18 (60.0%)	0.0413 ^a
Female	90 (61.6%)	12 (40.0%)	
Age			
Mean (SD)	64.5 (13.0)	68.5 (12.4)	0.1243 ^b
Tobacco history			
Never	80 (54.8%)	16 (53.3%)	0.7773 ^c
Former smoker	46 (31.5%)	12 (40.0%)	
Smoker	20 (13.7%)	2 (6.7%)	
DLCO (%) initial			
Mean (SD)	76.4 (19.2)	49.4 (15.2)	<0.0001 ^b
KL-6 value			
Mean (SD)	653.2 (547.2)	1340.5 (1058.4)	0.0015 ^b
HRCT pattern			
Non-UIP	59 (78.7%)	15 (55.6%)	0.0261 ^a
UIP	16 (21.3%)	12 (44.4%)	
UIP	16 (21.3%)	12 (44.4%)	

DLCO: lung diffusing capacity for carbon monoxide; FVC: forced vital capacity; HRCT: high-resolution computed tomography; KL-6: Krebs von den Lungen; SD: standard deviation.

^a Fisher's exact test.^b Independent Student t-test.^c Mantel-Haenszel exact test.

The multivariate logistic regression model pointed to male sex, higher KL-6 values, lower FVC and low DLCO values as independent factors associated with ILD (Table 3).

Finally, Fig. 3 depicts the conditional inference tree model to facilitate ILD prediction/identification, starting with an initial KL-6

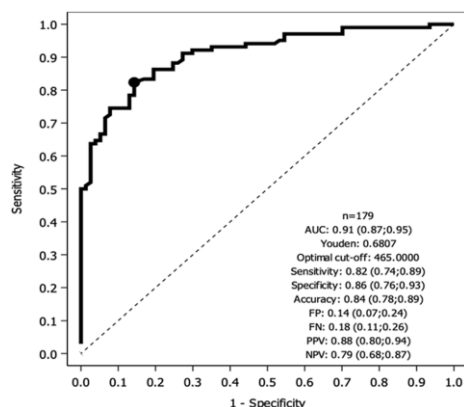


Fig. 1. ROC analysis using area under curve.

value of 364 U/mL and then including sex and a second KL-6 value of 650 U/mL. In men compared to women, the probability of ILD increased by 40% when KL-6 was below 364 U/mL. Considering only the KL-6 value, the probability increased by 95% from 650 U/mL onwards.

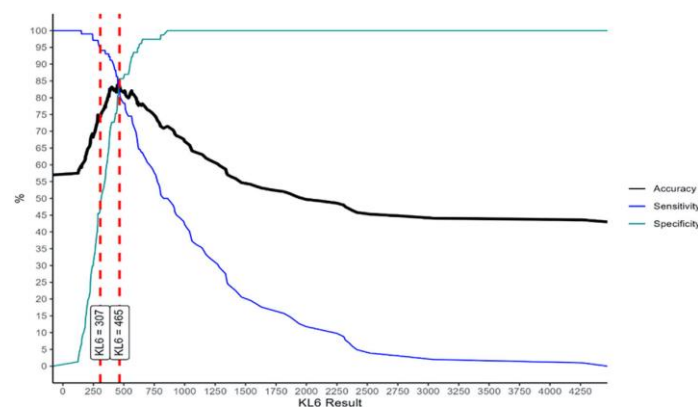


Fig. 2. Evolution of sensitivity and specificity depending on KL-6 values.

Table 3
Prognostic Factors for Interstitial Lung Disease.

N = 152	Logistic Multivariate Model			
	OR	95% CI Lower Limit	95% CI Upper Limit	Wald Test p-Value
Gender (male vs female)	2.57	1.37	4.83	0.0032
FVC (%)	0.94	0.90	0.98	0.0036
DLCO (%)	0.96	0.93	0.99	0.0169
KL-6 (for each increase of 100 units)	2.33	1.57	3.46	<0.0001

OR: odds ratio; CI: confidence interval; DLCO: lung diffusing capacity for carbon monoxide; FVC: forced vital capacity; KL-6: Krebs von den Lungen.

Discussion

The serum KL-6 cut-off value for ILD diagnosis in the European population has not been elucidated. In this prospective study, we found that 465 U/mL was the optimal KL-6 cut-off for the presence of ILD, while a KL-6 cut-off of 307 U/mL showed greater sensitivity for screening purpose. As reported in other series,^{7,21} serum KL-6 levels are independently correlated with the presence of ILD. Our population showed a wide range of KL-6 values. This variability might be attributed to the diverse ILD etiologies and the varying degrees of disease extension and activity at the time of inclusion.

High variability in KL-6 cut-off values for ILD diagnostic purposes has been observed in different populations. In Asian cohorts, mainly Japanese, the optimal cut-off is around 500 U/mL,^{22–25} a value that differs from those reported in the few studies of KL-6 that exist for European populations. A small-scale retrospective Irish study with 34 patients²⁶ reported an optimal KL-6 cut-off of 459 U/mL, similar to that of our cohort. In contrast, for a retrospective French series of 75 patients, aimed at detecting ILD in patients with systemic sclerosis, a higher KL-6 value of 872 U/mL was reported, with specificity of 95%.²⁷ Horimasu et al.²⁸ performed a landmark large-scale study (453 subjects) that compared serum KL-6 levels in German and Japanese ILD patients and healthy subjects, and also evaluated *MUC1* polymorphisms that could affect KL-6 levels; the authors reported an optimal cut-off value of 659 U/mL for the German subjects and 461 U/mL for the Japanese subjects, concluding, after a genotype analysis, that this cut-off difference was partially due to different distributions of the *MUC1* rs4072037 genotypes. Moreover, and as was the case in our study, KL-6 was found to be an independent factor for ILD presence and was not correlated with age or smoking.

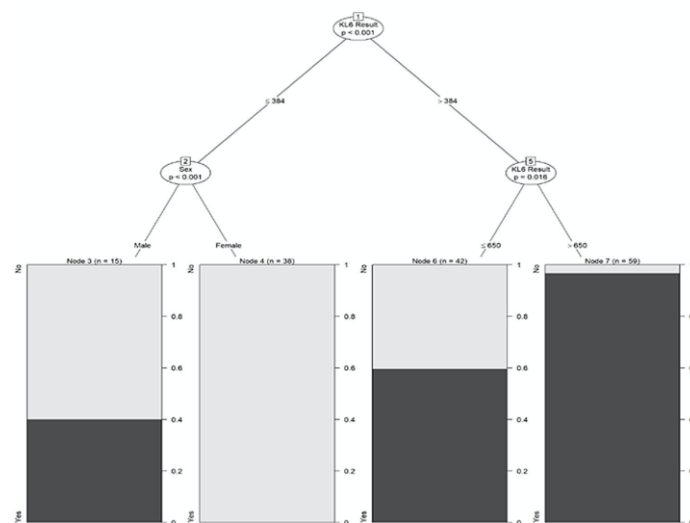


Fig. 3. Decision tree model.

The findings of Horimasu et al.²⁸ reinforce the hypothesis of variations between populations and also point to differences reflecting different genetic bases. This would suggest that KL-6 values are not absolute and that KL-6 cut-off values may need to be established and validated for specific populations.

Another finding for our cohort was an optimal KL-6 cut-off for ILD screening purposes of 307 U/mL with up to 95% sensitivity. This high sensitivity was kept in a subgroup analysis with preserve PFT, which highlights KL-6 utility for early stages of disease. Early diagnosis of ILD is currently a challenge, particularly for ILD-CTD, as diagnostic delay^{29–31} has a significant impact on survival.³² Further investigations are needed to facilitate early detection aimed at changing the natural course of this disease.

Drawing on the logistic regression analysis, we created a conditional inference tree based on KL-6 values and sex, as potentially useful to predict ILD. A recent study also used a decision tree to predict ILD, but based on smoking history and age as well as KL-6 levels.³³ We suggest that our simple screening tool, based on KL-6 and sex, may be useful in clinical practice for ILD screening purposes.

Regarding radiology findings, NSIP was the main pattern (43%) followed by UIP (32%). In a subgroup analysis comparing the UIP and non-UIP groups, no statistically significant differences in serum KL-6 values were evident, a finding similar to other studies that found no KL-6 level differences between patients with UIP and NSIP.^{34,35}

Our subgroup analysis for FVC pointed to higher KL-6 levels in patients with FVC <70%, corroborating the study by Horimasu et al.²⁸ who reported that serum KL-6 levels were inversely correlated with FVC and DLCO values. A correlation between KL-6 baseline levels and the annual changes of PFTs has also been found in another recent study.³⁶

The main limitations of our study are its single-centre nature and the relatively small number of included patients. Furthermore, although radiology patterns were established, the degree of fibrosis was not quantified in the HRCT scans. As a strength, our study was prospective and included a control group.

Conclusions

Our data show that serum KL-6 values greater than 465 U/mL have excellent sensitivity and specificity for detecting ILD. KL-6 values could be used to screen for ILD risk for instance in patients with CTD. Multicentre studies are needed to validate our results.

Author's Contributions

PMB, DC and IC conceived the idea and designed the methods. DC, SB and PMB collected the data. LMM and AM performed the KL-6 analysis. TF and MA contributed to the analysis and interpretation of data. All the authors reviewed the results and approved the final manuscript.

Funding

This study was supported by Fujirebio (product supply).

Conflicts of Interest

D. Castillo reports personal fees and non-financial support from Roche, grants, personal fees and non-financial support from Boehringer-Ingelheim, grants from Fujirebio, personal fees from Veracyte, outside the submitted work. D. Castillo is part of the Editorial board of *Archivos de Bronconeumología* and declare that they have remained outside the evaluation and decision-making process in relation to this article.

P. Millán-Billi, I. Castellví, L. Martínez-Martínez, A. Mariscal, S. Barril, Miriana D'Alessandro and T. Franquet declare no conflicts of interest.

Appendix A. Supplementary Data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.arbres.2024.03.028](https://doi.org/10.1016/j.arbres.2024.03.028).

References

1. Xaubet A, Ancochea J, Blanquer R, Montero C, Morell F, Rodríguez Becerra E, et al. Diagnosis and treatment of diffuse interstitial lung diseases. Arch Bronconeumol. 2003;39:580–600.
2. Castelnovo FV, Moua T. Detection and management of interstitial lung diseases associated with connective tissue diseases. ACR Open Rheumatol. 2021;3:295–304.
3. Cerro Chiang G, Parimon T. Understanding interstitial lung diseases associated with connective tissue disease (CTD-ILD): genetics cellular pathophysiology, and biologic drivers. Int J Mol Sci. 2023;24:2405.
4. Oliveira RP, Ribeiro R, Melo L, Grima B, Oliveira S, Alves JD. Connective tissue disease-associated interstitial lung disease. Pulmonology. 2022;28:113–8.
5. Rahaghi FF, Hsu VM, Kaner RJ, Mayes MD, Rosas IO, Saggart R, et al. Expert consensus on the management of systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. Respir Res. 2023;24:6.
6. Kohno N, Awaya Y, Oyama T, Yamakido M, Akiyama M, Inoue Y, et al. KL-6, a mucin-like glycoprotein, in bronchoalveolar lavage fluid from patients with interstitial lung disease. Am Rev Respir Dis. 1993;148:637–42.
7. Kohno N, Kyoizumi S, Awaya Y, Fukuhara H, Yamakido M, Akiyama M. New serum indicator of interstitial pneumonitis activity. Sialylated carbohydrate antigen KL-6. Chest. 1989;96:68–73.
8. Xue M, Guo Z, Cai C, Sun B, Wang H. Evaluation of the diagnostic efficacies of serological markers KL-6, SP-A, SP-D CCL2, and CXCL13 in idiopathic interstitial pneumonia. Respiration. 2019;98:534–45.
9. Zheng P, Liu X, Huang H, Guo Z, Wu G, Hu H, et al. Diagnostic value of KL-6 in idiopathic interstitial pneumonia. J Thorac Dis. 2018;10:4724–32.
10. Wakamatsu K, Nagata N, Kumazoe H, Oda K, Ishimoto H, Yoshimi M, et al. Prognostic value of serial serum KL-6 measurements in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. Respir Investig. 2017;55:16–23.
11. Chen F, Lu X, Shu X, Peng Q, Tian X, Wang G. Predictive value of serum markers for the development of interstitial lung disease in patients with polymyositis and dermatomyositis: a comparative and prospective study. Int Med J. 2015;45:641–7.
12. Lee JS, Lee EY, Ha YJ, Kang EH, Lee YJ, Song YW. Serum KL-6 levels reflect the severity of interstitial lung disease associated with connective tissue disease. Arthritis Res Ther. 2019;21:58.
13. Kuwana M, Shirai Y, Takeuchi T. Elevated serum Krebs von den Lungen-6 in early disease predicts subsequent deterioration of pulmonary function in patients with systemic sclerosis and interstitial lung disease. J Rheumatol. 2016;43:1825–31.
14. von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gøtzsche PC, Vandenbroucke JP. The Strengthening of Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. Int J Surg. 2014;12:1495–9.
15. Hansell DM, Bankier AA, MacMahon H, McLoud TC, Müller NL, Remy J. Fleischner Society: glossary of terms for thoracic imaging. Radiology. 2008;246:697–722.
16. García-Río F, Calle M, Burgos F, Casan P, Del Campo F, Galdiz JB, et al. Spirometry. Spanish Society of Pulmonology and Thoracic Surgery (SEPAR). Arch Bronconeumol. 2013;49:388–401.
17. Graham BL, Brusasco V, Burgos F, Cooper BG, Jensen R, Kendrick A, et al. 2017 ERS/ATS standards for single-breath carbon monoxide uptake in the lung. Eur Respir J. 2017;49:1600016.
18. Wanger J, Clausen JL, Coates A, Pedersen OF, Brusasco V, Burgos F, et al. Standardisation of the measurement of lung volumes. Eur Respir J. 2005;26:511–22.
19. Hansell DM, Goldin JG, King TE Jr, Lynch DA, Richeldi L, Wells AU. CT staging and monitoring of fibrotic interstitial lung diseases in clinical practice and treatment trials: a position paper from the Fleischner Society. Lancet Respir Med. 2015;3:483–96.
20. Lynch DA, Sverzellati N, Travis WD, Brown KK, Colby TV, Galvin JR, et al. Diagnostic criteria for idiopathic pulmonary fibrosis: a Fleischner Society White Paper. Lancet Respir Med. 2018;6:138–53.
21. Ma H, Lu J, Song Y, Wang H, Yin S. The value of serum Krebs von den Lungen-6 as a diagnostic marker in connective tissue disease associated with interstitial lung disease. BMC Pulm Med. 2020;20:6.
22. Kobayashi J, Kitamura S. KL-6: a serum marker for interstitial pneumonia. Chest. 1995;108:311–5.
23. Ohnishi H, Yokoyama A, Kondo K, Hamada H, Abe M, Nishimura K, et al. Comparative study of KL-6, surfactant protein-A, surfactant protein-D, and monocyte chemoattractant protein-1 as serum markers for interstitial lung diseases. Am J Respir Crit Care Med. 2002;165:378–81.
24. Ishikawa N, Hattori N, Yokoyama A, Kohno N. Utility of KL-6/MUC1 in the clinical management of interstitial lung diseases. Respir Investig. 2012;50:3–13.
25. He Q, Tang Y, Huang J, Rao Y, Lu Y. The value of KL-6 in the diagnosis and assessment of interstitial lung disease. Am J Transl Res. 2021;13:9216–23.
26. Kennedy B, Branagan P, Moloney F, Haroon M, O'Connell OJ, O'Connor TM, et al. Biomarkers to identify ILD and predict lung function decline in scleroderma lung disease or idiopathic pulmonary fibrosis. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis. 2015;32:228–36.
27. Benyamine A, Heim X, Resseguier N, Bertin D, Gomez C, Ebo M, et al. Elevated serum Krebs von den Lungen-6 in systemic sclerosis: a marker of lung fibrosis and severity of the disease. Rheumatol Int. 2018;38:813–9.
28. Horimasu Y, Hattori N, Ishikawa N, Kawase S, Tanaka S, Yoshioka K, et al. Different MUC1 gene polymorphisms in German and Japanese ethnicities affect serum KL-6 levels. Respir Med. 2012;106:1756–64.
29. Lancaster L, Bonella F, Inoue Y, Cottin V, Siddall J, Small M, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: physician and patient perspectives on the pathway to care from symptom recognition to diagnosis and disease burden. Respirology (Carlton, Vic). 2022;27:66–75.
30. Spagnolo P, Ryerson CJ, Putman R, Oldham J, Salisbury M, Sverzellati N, et al. Early diagnosis of fibrotic interstitial lung disease: challenges and opportunities. Lancet Respir Med. 2021;9:1065–76.
31. Hoyer N, Prior TS, Bendstrup E, Shaker SB. Diagnostic delay in IPF impacts progression-free survival, quality of life and hospitalisation rates. BMJ Open Respir Res. 2022;9:e001276.
32. Cano-Jiménez E, Vázquez Rodríguez T, Martín-Robles I, Castillo Villegas D, Juan García J, Bollo de Miguel E, et al. Diagnostic delay of associated interstitial lung disease increases mortality in rheumatoid arthritis. Sci Rep. 2021;11:9184.
33. Zhou A, Tang H, Peng W, Wang Y, Tang X, Yang H, et al. KL-6 levels in the connective tissue disease population: typical values and potential confounders—a retrospective, real-world study. Front Immunol. 2023;14:1098602.
34. Ishii H, Mukae H, Kadota J, Kaida H, Nagata T, Abe K, et al. High serum concentrations of surfactant protein A in usual interstitial pneumonia compared with non-specific interstitial pneumonia. Thorax. 2003;58:52–7.
35. Jehn LB, Costabel U, Boerner E, Walscher J, Theegarten D, Taube C, et al. Serum KL-6 as a biomarker of progression at any time in fibrotic interstitial lung disease. J Clin Med. 2023;12:1173.
36. Guo L, Yang Y, Liu F, Jiang C, Yang Y, Pu H, et al. Clinical research on prognostic evaluation of subjects with IPF by peripheral blood biomarkers quantitative imaging characteristics and pulmonary function parameters. Arch Bronconeumol (Engl Ed). 2020;56:365–72.