



PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA

EFFECTOS DE LA INFECCIÓN POR COVID-19 SOBRE LA LONGITUD DEL TELÓMERO Y SU RELACIÓN CON LA EVOLUCIÓN A FIBROSIS PULMONAR

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA

Alba Mulet Arabí

Directores:

Dr. D Jaime Signes-Costa Miñana

Dra. D. Pilar González Cabo

Tutor:

Dr. D. Federico V. Pallardó Calatayud

Mayo 2025

INFORME DIRECTORES/AS Y TUTOR/A PARA DEPÓSITO DE TESIS

Director (es) / Codirector (es):

1.- Apellidos y nombre: González Cabo, María Pilar N.I.F 20164778B, Departamento/Instituto: Departamento de Fisiología; Centro: Facultad de Medicina

2.- Apellidos y nombre: Signes-Costa Miñana, Jaime N.I.F. 21441521R, Departamento/Instituto: Departamento de Medicina; Centro: Facultad de Medicina

Tutor o tutora (si procede)

Apellidos y nombre: Pallardó Calatayud, Federico Vicente N.I.F.22685282Z, Departamento de Fisiología; Centro: Facultad de Medicina

Directores/as y tutor/a, respectivamente, de la tesis doctoral: "EFECTOS DE LA INFECCIÓN POR COVID-19 SOBRE LA LONGITUD DEL TELÓMERO Y SU RELACIÓN CON LA EVOLUCIÓN A FIBROSIS PULMONAR"

de D/Dña. Alba Mulet Arabí,

estudiante del Programa de Doctorado **3139 Medicina** (RD99/2011) en Medicina de la Universitat de València, emiten informe favorable (*favorable/desfavorable*) para la realización del depósito y la defensa de la tesis doctoral.

Fecha: 6 de mayo de 2025

Fdo.:

JAIME
SIGNES-
COSTA
MIÑANA -
DNI
21441521R

Director/a

Firmado
digitalmente por
JAIME SIGNES-
COSTA MIÑANA -
DNI 21441521R
Fecha: 2025.05.07
10:22:25 +02'00'

Fdo.:

Firmado por MARIA PILAR
GONZALEZ CABO -
NIF:20164778B
el día 07/05/2025
con un certificado emitido por
ACCVCA-120

Director/a

Fdo.:

Director/a

Fdo.:

FEDERICO
VICENTE|
PALLARDO|
CALATAYUD

Tutor/a

Firmado digitalmente
por FEDERICO VICENTE|
PALLARDO|
CALATAYUD
Fecha: 2025.05.07
09:05:17 +02'00'

ESCUELA DOCTORAL

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultat de Medicina i Odontologia, Av. Blasco Ibañez nº 15, 46010-Valencia, Tel. 963864100 - Fax: 963864173
email: doctorado.medicina@uv.es
Web: www.uv.es/doctoratmedicina



El Dr. D. Jaime Signes- Costa, director, la Dra. D. Pilar González Cabo, directora,
y el Dr. D. Federico V. Pallardó Calatayud, tutor, de la tesis doctoral titulada
“EFECTOS DE LA INFECCIÓN POR COVID-19 SOBRE LA LONGITUD DEL
TELÓMERO Y SU RELACIÓN CON LA EVOLUCIÓN A FIBROSIS PULMONAR”.

Informan que:

D. Alba Mulet Arabí ha realizado bajo nuestra supervisión el trabajo titulado “Efectos de la infección por COVID-19 sobre la longitud del telómero y su relación con la evolución a fibrosis pulmonar” conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universitat de València, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Valencia, 6 de mayo, 2025

AGRADECIMIENTOS

A mi directora Pili, por introducirme al mundo del laboratorio con paciencia, y por ayudarme a comprender y desenvolverme en un mundo que al comienzo me era completamente ajeno. Pero sobre todo por estar siempre disponible cuando lo he necesitado.

A Jaime, por su impulso constante y por alentarme a avanzar más allá de lo que creía posible. Por todo el apoyo que me ha ofrecido, por su implicación a lo largo del tiempo y por todo lo que ha contribuido en mi formación.

A Fede, por haber acompañado esta tesis como tutor, y por aportar una mirada clave que ha enriquecido profundamente el trabajo. Su participación ha sido un verdadero privilegio y sus ideas, han contribuido a orientar y fortalecer este proyecto.

A Pablo, por ser mi mayor apoyo y la persona que ha estado a mi lado en cada paso de este camino. Por su paciencia infinita incluso en los momentos más difíciles.

A mis padres, por estar presentes de forma incondicional. Por haberme transmitido desde siempre la importancia del estudio y del esfuerzo, que me han guiado hasta aquí. A Pau, por seguir siempre cerca, a pesar de la distancia física.

A quienes desde distintos ámbitos colaboraron con este trabajo, por su profesionalismo, disposición y compromiso con la investigación.

A los equipos e instituciones que hicieron posible el desarrollo de esta tesis, por facilitar los medios necesarios y por su contribución al avance del conocimiento. La realización de este trabajo ha sido posible gracias a las siguientes instituciones: Instituto de Salud Carlos III (COV20/01209), Fundación Sociedad Valenciana de Neumología y fondos COVID-19 de la Generalitat Valenciana (GVA).

ÍNDICE DE CONTENIDOS

LISTA DE ABREVIATURAS	9
INTRODUCCIÓN	14
1. TELÓMEROS	19
1.1. LA TELOMERASA	19
1.2. INMUNOSENESCENCIA	21
1.3. INTERCONEXIÓN DE LA TELOMERASA Y LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL	21
2. TELOMEROPATÍAS Y ENFERMEDAD PULMONAR	22
3. FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA	23
3.1. EPIDEMIOLOGÍA Y ETIOLOGÍA	24
3.2. TELÓMEROS EN LA FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA	25
3.3. GENÉTICA EN LA FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA	26
3.4. FIBROSIS PULMONAR FAMILIAR	27
3.5. TRATAMIENTO	27
3.6. PRONÓSTICO	28
3.7. BIOMARCADORES MOLECULARES DE FIBROSIS PULMONAR	29
4. OTRAS ENFERMEDADES INTERSTICIALES Y SU RELACIÓN CON LOS TELÓMEROS	30
5. COVID-19 Y FIBROSIS PULMONAR: EVIDENCIA Y PERSPECTIVAS	31
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	34
MATERIAL Y MÉTODOS	38
1. DISEÑO DEL ESTUDIO	40
2. MEDICIÓN DE LA LONGITUD TELOMÉRICA	41
3. DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES EN SANGRE	42
4. GENOTIPADO SNP	43
5. COHORTES DEL ESTUDIO	43
6. PRUEBAS DE IMAGEN Y DE FUNCIÓN PULMONAR	44
7. ANÁLISIS PROTEÍNAS MITOCONDRIALES	44
8. ASPECTOS ÉTICOS	47
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	47

RESULTADOS	49
1. EVOLUCIÓN DE LA LONGITUD TELOMÉRICA EN PACIENTES TRAS LA COVID-19	51
2. ANÁLISIS BIOMARCADORES DE FIBROSIS	57
3. ACORTAMIENTO TELOMÉRICO Y DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL A LARGO PLAZO TRAS LA COVID-19	62
3.1. IMPACTO DEL COVID-19 SOBRE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MITOCONDRIALES	66
3.2. BIOMARCADORES PARA DIFERENCIAR ENTRE PACIENTES CON Y SIN FIBROSIS	69
DISCUSIÓN	74
Infección grave por SARS-COV-2 y alteraciones a nivel de la longitud telomérica	76
Relación entre la alteración de la longitud del telómero con la aparición de cambios fibróticos y su evolución	78
Análisis de función mitocondrial en leucocitos y su posible correlación con la longitud telomérica y con la fibrosis pulmonar.	82
Biomarcadores de inflamación y fibrosis pulmonar y su correlación con la longitud telomérica y las secuelas pulmonares	85
CONCLUSIONES FINALES	88
BIBLIOGRAFÍA	91

LISTA DE ABREVIATURAS

4HNE	4 hidroxinonenal
ACE 2	Enzima convertidora de angiotensina 2
ACLY	ATP citrato liasa
ACO1	Aconitasa 1
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ALFA F1	Subunidad alfa del complejo F1 de la ATP sintasa
ATP	Adenosín trifosfato
ATS	<i>American Thoracic Society</i>
CMV	Citomegalovirus
COVID	<i>Coronavirus Disease</i>
COX IV	Subunidad IV del complejo IV de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (citocromo c oxidasa)
CPT1	Carnitina palmitoiltransferasa-1
CS	Citrato sintasa
DLCO	Capacidad de difusión del monóxido de carbono
DRP	Proteína relacionada con la dinámica
ENO1	Enolasa 1
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ERS	<i>European Respiratory Society</i>
ETFA	Flavoproteína de Transferencia de Electrones Subunidad Alfa
ETFβ	Flavoproteína de Transferencia de Electrones Subunidad Beta
FAS	Sintasa de ácido graso
FEV1	Forced expiratory volume in 1 second
FISH	<i>Hibridación fluorescente in situ</i>
FPI	Fibrosis pulmonar idiopática
FVC	<i>Forced vital capacity</i>
GAPDH	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
GLS1	Glutaminasa 1
GLUD1	Glutamato deshidrogenasa 1

G6PDH	Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa
GPDI	Glicerol-3-fosfatasa-1
GR	Glutación reductasa
HADHA	Hidroxil-acil-CoA deshidrogenasa subunidad α
HBG	Hemoglobin subunit gamma
IDH1	Isocitrato deshidrogenasa 1
IF1	Factor de inhibición 1 de la ATP sintasa
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de masa corporal
LDH-A	Lactato deshidrogenasa A
MDA	Malondialdehído
MDH2	Malato deshidrogenasa 2
MFN1	Mitofusina 1
MFN2	Mitofusina 2
MMP	Metaloproteinasas de matriz
MPC1	Subunidad 1 del complejo transportador de piruvato mitocondrial
MUC5B	Mucina 5b
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato Reducido
NyTyr	Nitrotirosina
OPA1	Atrofia óptica 1
OXPHOS	Fosforilación oxidativa
PBS-T	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR	Proteína C reactiva
PCR-RT	<i>Real time reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i>
PDH	Piruvato deshidrogenasa
PFR	Pruebas de función respiratoria
PKM2	Piruvato quinasa isoforma M2
PRX3	Peroxirredoxina 3
PRX6	Peroxirredoxina 6
ROS	Especies reactivas del oxígeno
RTL	Longitud telomérica relativa

SDHA	Succinato deshidrogenasa A
SOD 1	Superóxido dismutasa 1
SOD 2	Superóxido dismutasa 2
TCAR	Tomografía computarizada de alta resolución
TRX1	Tioredoxina 1
UCI	Unidad cuidados intensivos
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VMI	Ventilación mecánica invasiva

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Extraída de: Mulet A, Signes-Costa J. Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Telomeres. J Clin Med. enero de 2022;11(23):6893	21
Figura 2. Resumen de casos de pacientes con COVID-19 de una revisión sistemática con patrones histológicos con afectación epitelial, vascular, fibrótica o mixta	33
Figura 3. Evolución del acortamiento telomérico en un año tras una COVID-19 severa	54
Figura 4. Correlación entre la edad y la longitud telomérica relativa (LTR)	55
Figura 5. Los pacientes con fibrosis tienen acortamiento telomérico a largo plazo	57
Figura 6. La edad es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de fibrosis en nuestros pacientes con COVID-19	58
Figura 7. Acortamiento telomérico en pacientes vs. controles de la misma edad y sexo, un año tras la infección por SARS-CoV-2	66
Figura 8. Acortamiento telomérico en ambos grupos de severidad	68
Figura 9. Acortamiento telomérico en pacientes con secuelas fibróticas y sin ellas	67
Figura 10. Niveles de proteínas mitocondriales (expresadas en unidades arbitrarias: a.u.) de pacientes vs. Controles	69
Figura 11. Comparación de concentraciones pico de IL-6 (expresadas en ng/ml) durante el ingreso entre ambos grupos de severidad	70
Figura 12. Comparación entre concentraciones de ETF β y PKM2 entre pacientes que desarrollaron secuelas fibróticas al año, los que no y controles	72
Figura 13. Correlación entre niveles de ACO1 y RTL. A mayor acortamiento telomérico (mayor RTL), menos concentración de ACO1. Esta correlación se pierde en pacientes no fibróticos	73
Figura 14. Representación de la relación secuencial entre la elevación de reactantes de fase aguda producidas por la COVID-19, especialmente la IL-6, que, a su vez, produce una situación de estrés oxidativo, y esto conduce a un daño mitocondrial	84
Tabla 1. Características pacientes grupo evolución	53
Tabla 2. Comparación grupos acortamiento y no acortamiento	55
Tabla 3. Características de los pacientes del estudio de biomarcadores	60
Tabla 4. Función pulmonar de los pacientes durante el seguimiento	61
Tabla 5. Niveles de biomarcadores a los 2 y 12 meses	62
Tabla 6. Regresión logística multivariable para predecir los cambios fibróticos a los 12 meses según los niveles de biomarcadores a los 2 meses	63
Tabla 7. Regresión logística multivariable para predecir el empeoramiento de la DLCO a los 12 meses según los niveles de biomarcadores a los 2 meses	64
Tabla 8. Características de los pacientes grupo completo	65

INTRODUCCIÓN

La pandemia global causada por el COVID-19 ha afectado a más de 600 millones de personas en todo el mundo y se han contabilizado más de seis millones de muertes, según los datos de la Johns Hopkins University (1). En cuanto a los supervivientes, hay mucha preocupación por los efectos a largo plazo que el virus pueda tener sobre ellos y sobre el impacto que puedan tener sobre su calidad de vida. Basándonos en los conocimientos adquiridos por la epidemia previa del síndrome respiratorio agudo severo (SARS) causado por otro coronavirus (SARS-CoV-1) que ocurrió en 2003, parte de los afectados que sobrevivieron desarrollaron secuelas pulmonares fibróticas residuales tras el cuadro agudo, por lo que cabe pensar que, debido a que son virus similares y comparten mecanismos patogénicos, podría ocurrir lo mismo con los pacientes de COVID-19. En el caso del SARS-CoV-1 los estudios que analizaron la evolución de los pacientes a los meses de la enfermedad aguda vieron que hasta en el 30% de ellos había algún tipo de secuela pulmonar (2,3).

En cuanto a la infección por SARS-CoV-2, agente etiológico de la COVID-19, se ha visto en varios estudios que los pacientes a los pocos meses del cuadro agudo padecen secuelas a nivel radiológico y afectación de la función pulmonar, en forma de una restricción pulmonar y sobre todo de alteración de la prueba de difusión de monóxido de carbono (DLCO) (4,5).

Se ha descrito que la lesión pulmonar aguda causada por el SARS genera una desregulación del proceso de cicatrización, con implicación de varias vías controladas por receptores de tirosina quinasa y por metaloproteinasas de matriz. Este mismo mecanismo patogénico es similar al que ocurre en la fibrosis pulmonar idiopática. De momento, no está del todo claro la relación entre SARS-CoV-2 y el desarrollo de fibrosis pulmonar, pero podrían compartir vías comunes.

Por otro lado, en la COVID-19 la incidencia de manifestaciones severas de la enfermedad aumenta con la edad de los pacientes, mostrando mayor mortalidad, lo que sugiere que vías moleculares relacionadas con la edad contribuirían a la gravedad de la COVID-19 (6). El SARS-CoV-2 infecta varios tipos de células, forzando la regeneración y el recambio celular para mantener la homeostasis de los tejidos. Se ha medido la longitud telomérica en células de sangre periférica de individuos con COVID-19, encontrando percentiles más bajos de longitud telomérica y un ritmo más rápido de acortamiento telomérico en los pacientes que han desarrollado patologías más severas de la enfermedad, en todos los rangos de edad. También se han comparado los pacientes con COVID-19 con sujetos de su misma

edad, siendo significativamente mayor la frecuencia de acortamiento telomérico en el grupo con COVID-19 (7,8).

En la mayoría de estudios se ha relacionado la gravedad en el momento agudo de la enfermedad con el acortamiento telomérico, pero las consecuencias a más largo plazo de la COVID-19 en los pacientes con dicho acortamiento son una incógnita.

El acortamiento telomérico se ha relacionado con la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) en múltiples estudios (9,10). Los telómeros son estructuras especializadas que se localizan en los bordes de los cromosomas y que se van acortando progresivamente durante la vida de un individuo, siendo propuestos como la causa molecular primaria del envejecimiento. Son conocidos como un reloj mitótico, ya que marcan la entrada de la célula en la senescencia (11,12).

En los últimos años se han identificado múltiples genes relacionados con los telómeros que causan acortamiento telomérico y que se asocian en porcentajes importantes con la FPI. Más concretamente, las mutaciones en los genes teloméricos se han encontrado en hasta un 25% de los casos de fibrosis pulmonar familiar y en un 1-3% de los pacientes con FPI esporádica (13,14). Además, en casos esporádicos, no asociados con mutaciones en genes teloméricos, el acortamiento telomérico se ha identificado comparando con personas de su misma edad y sexo sin la enfermedad, con un 10% de los pacientes que presentan telómeros tan cortos como los portadores de mutaciones de la telomerasa (15).

El acortamiento telomérico y el envejecimiento que genera en los tejidos, tanto en la FPI como en otras enfermedades intersticiales que presentan un fenotipo fibrosante similar, genera, junto con otros mecanismos desencadenantes una fibrosis del tejido pulmonar y acarrea un peor pronóstico (16,17). Se ha visto previamente que individuos con telómeros cortos, sin diagnóstico de FPI, comparten características fisiopatológicas y pronósticas con la FPI (18).

Por tanto, nuestra hipótesis sería que el daño celular causado por el SARS-CoV-2 en pacientes con neumonía severa sería responsable de un acortamiento telomérico más allá del momento agudo y esta alteración podría relacionarse con la aparición de secuelas fibróticas.

El objetivo principal de esta tesis es analizar las alteraciones a nivel de la longitud telomérica en pacientes con neumonía por SARS-CoV-2, y la relación con la presencia de cambios fibróticos y su evolución.

1. TELÓMEROS

Los telómeros son secuencias repetitivas de nucleótidos, no codificantes (centenares de miles de tándems de "TTAGGG" repetidos). Se encuentran en los extremos de los cromosomas, y su función es dar estabilidad y proteger el ADN de la degradación, preservando así la información genética. En cada división celular, parte de estas secuencias repetitivas se pierden y, por lo tanto, los cromosomas se van acortando progresivamente durante la vida de un individuo (19).

El acortamiento telomérico se considera la causa molecular primaria de envejecimiento debido a que los telómeros acortados limitan la capacidad replicativa de las células madre, bloqueando la capacidad regenerativa de los tejidos y, consecuentemente, entrando en una senescencia celular. Esto, por tanto, conduce al desarrollo de enfermedades asociadas al envejecimiento (20).

1.1. LA TELOMERASA

La telomerasa es una transcriptasa reversa que es capaz de elongar los telómeros de novo añadiendo repeticiones de "TTAGGG" en los extremos de los cromosomas después de la mitosis, previniendo la pérdida de información codificada (21) (**Figura 1**). Se trata de una ribonucleoproteína formada por dos componentes principales: una subunidad de transcriptasa reversa (TERT) y por un componente asociado de ARN no codificante (TERC), el cual se utiliza como un molde para la adición de las repeticiones teloméricas (22). Además, la disqueratina, una proteína con actividad pseudouridilasa, es esencial para la estabilidad de este complejo y para el adecuado ensamblaje de la telomerasa, participando en la homeostasis telomérica.

En la especie humana, junto al ADN telomérico hay un conjunto de seis proteínas que forman el complejo protector denominado shelterina o telosoma: TRF1, TRF2, RAP1, TIN2, TPP1 y POT1 (23). Este complejo participa en la regulación de la actividad de la telomerasa y evita la activación de la respuesta al daño del ADN.

La telomerasa está activa en células madre embrionarias, sin embargo, tras el nacimiento se silencia en la mayoría de células, salvo las células madre pluripotentes y en los compartimientos de células madre adultas. A pesar de estar activa en estas células, esto no es suficiente para contrarrestar el desgaste de los cromosomas asociado a la división celular (24). La inactivación de la telomerasa provoca que los

telómeros se vayan acortando a lo largo de los años. Este acortamiento de los cromosomas desencadena la activación de una respuesta de daño en el ADN por las especies reactivas del oxígeno (ROS) que se van acumulando en el tiempo, y que es mediado por p53 que comporta el fin de la replicación celular e induce senescencia o apoptosis celular (25,26).

La relación entre telómeros y enfermedades en humanos se descubrió de forma casual en el año 1998, al identificar las mutaciones causantes de la disqueratosis congénita, en el gen *DKC1*, que codifica para una proteína del complejo de la telomerasa, la disquerina (27).

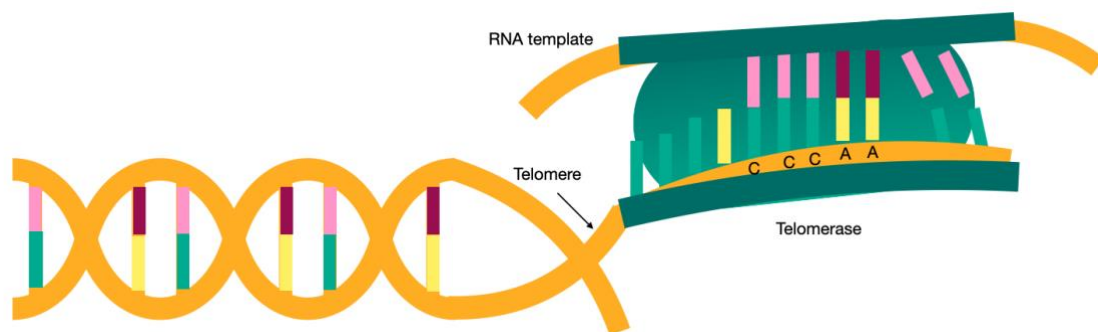


Figura 1 | Estructura básica de los telómeros. Los telómeros protegen los extremos de los cromosomas, evitando su degradación con cada división celular. La telomerasa, con su molde de RNA, sintetiza nuevas repeticiones de ADN telomérico, compensando su acortamiento (28).

Cuando hay mutaciones en genes relacionados con el mantenimiento de los telómeros, las enfermedades correspondientes se conocen como telomeropatías, que son una serie de enfermedades raras y heterogéneas que se caracterizan por un envejecimiento prematuro (29). Estas enfermedades tienen síndromes que se solapan y un mecanismo de disfunción telomérica común, pero tienen síntomas muy variables y diferente edad de aparición. Las telomeropatías clásicas incluyen: el síndrome de Hoyeraal-Hreidarsson, la disqueratosis congénita, la fibrosis pulmonar, la anemia aplásica y la fibrosis hepática. Todas estas enfermedades comparten la misma característica: se observa un envejecimiento precoz de los tejidos. Además, las mutaciones en los genes de la telomerasa son una diana para distintos cánceres y también se ha visto que los telómeros cortos comportan un riesgo de enfermedad cardiovascular.

1.2. INMUNOSENESCENCIA

Además de envejecimiento asociado al acortamiento telomérico, estudios recientes han demostrado la relación entre el acortamiento telomérico y la pérdida de inmunología celular, lo que se denomina inmunosenescencia.

Los linfocitos T activados expresan niveles altos de telomerasa, que facilita la respuesta inmunitaria evitando la senescencia de las células inmunitarias durante la expansión clonal. Sin embargo, esta actividad de la telomerasa no es suficiente para prevenir la inmunosenescencia que ocurre con la edad y que disminuye la respuesta a las infecciones, o a las vacunas (30), como se ha podido ver en la pandemia de la COVID-19, que ha afectado más y de forma más grave a las personas más mayores.

Se han observado células T senescentes como resultados de infecciones crónicas por virus, como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), citomegalovirus (CMV), virus Varicella-Zoster (VVZ), entre otros (31). Al realizar una comparación entre pacientes capaces de controlar la carga viral respecto a aquellos que no lo consiguen, se ha asociado con un acortamiento telomérico mayor en el segundo grupo (32).

Por otro lado, se ha visto una erosión acelerada de los telómeros y disfunción de las mitocondrias de las células T en pacientes infectados por virus. Esto puede ser consecuencia de un recambio celular excesivo, debido a la replicación viral (33). Además, los niveles de telomerasa y su actividad disminuyen en situaciones de estrés (34) y esto podría estar relacionado a su vez con la susceptibilidad a presentar infecciones en esos periodos y a la reactivación de virus crónicos. Por otro lado, el exceso de ROS generado debido al estrés oxidativo en las infecciones virales o en situaciones de inflamación puede causar un envejecimiento prematuro de las células T.

1.3. INTERCONEXIÓN DE LA TELOMERASA Y LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL

El envejecimiento celular se caracteriza por un declive en la producción de adenosín trifosfato (ATP) y de la función respiratoria mitocondrial con un aumento de mutaciones en el ADN mitocondrial. Por tanto, esto hace que la medición del daño en el ADN mitocondrial sea una buena manera de medir el estrés oxidativo celular (35). Además, se ha visto que en la mitocondria es dónde se producen la mayoría de ROS (36).

La relación entre la telomerasa y la función mitocondrial se ha descrito en los últimos años. Se ha visto que cuando hay una disfunción mitocondrial hay un acortamiento

telomérico, ya que cuando las mitocondrias funcionan mal, aumenta el estrés oxidativo y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Estos ROS dañan el ADN, incluidas las regiones teloméricas, lo que contribuye al acortamiento de los telómeros.

Por otro lado, la alteración de la telomerasa se producen fallos en el funcionamiento mitocondrial. La telomerasa, en especial su subunidad catalítica TERT, puede localizarse en las mitocondrias y desempeñar funciones protectoras frente al estrés oxidativo. Cuando la telomerasa está alterada o ausente, la célula tiene menos capacidad para manejar el daño oxidativo, lo que compromete la función mitocondrial, con producción subsecuente de ROS. Estos ROS activan respuestas al daño del ADN, afectando a la velocidad de acortamiento de los telómeros. A su vez, el acortamiento telomérico y la alteración de la telomerasa pueden aumentar la disfunción mitocondrial, creando un ciclo vicioso de estrés oxidativo y deterioro celular. Todo esto tiene implicaciones importantes en cuanto a acelerar el envejecimiento y con la aparición de patologías secundarias, como enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas o deterioro cognitivo entre otras (37). Hay muchos estudios en ratones y humanos que enfatizan la importancia del desequilibrio metabólico causado por acortamiento telomérico y daño mitocondrial en la aparición de enfermedades asociadas al envejecimiento (38).

2. TELOMEROPATÍAS Y ENFERMEDAD PULMONAR

Como hemos comentado anteriormente, aunque clásicamente se ha relacionado los telómeros y la telomerasa con el proceso celular del envejecimiento y el cáncer, en las últimas décadas se ha visto que una de las manifestaciones más comunes de la disfunción telomérica en humanos es la patología pulmonar; sobre todo en forma de fibrosis pulmonar o enfisema. El acortamiento telomérico limita el potencial regenerativo del epitelio alveolar, y promueve el remodelado pulmonar en forma de fibrosis, y en algunos casos, sobre todo en mujeres, origina un enfisema (39).

Varios estudios experimentales y genéticos apoyan la hipótesis de que el acortamiento telomérico contribuye a la patogenia de la FPI, sin embargo, esto no parece ser un factor suficiente por sí mismo para el desarrollo de la enfermedad. En un modelo murino, por ejemplo, con delección de la telomerasa, no se observaron cambios fenotípicos. Sin embargo, tras varias generaciones, los ratones con telómeros acortados desarrollaron enfermedades degenerativas, con cambios fenotípicos asociados al

envejecimiento (40,41). Las anomalías de los tejidos, en los ratones knockout para la telomerasa, suelen aparecer a partir de la quinta generación, y a partir de la sexta los ratones son infértiles y la función de progenitores hematopoyéticos está defectuosa (42). Por otro lado, se ha visto que la longitud telomérica es un rasgo heredable de los progenitores y va a contribuir a la transmisión hereditaria de la enfermedad (43). Además, se ha observado un acortamiento mayor con cada generación futura, lo que explicaría el fenómeno de anticipación en algunas enfermedades: los hijos desarrollarán la enfermedad antes que los padres (44). Sin embargo, también se ha demostrado que existe un componente adquirido necesario. Esto se ha podido confirmar con el estudio de gemelos, donde existen modificaciones en la longitud debido al factor ambiental (45), que incluyen el tabaquismo, la dieta, el estatus socioeconómico, el estrés y el estilo de vida (46,47). También se ha visto en algún estudio que la administración de hormonas sexuales podría elongar los telómeros en pacientes con telomeropatías (48). En definitiva, hay un rasgo heredable del acortamiento telomérico que es capaz de implicar mutaciones en distintos genes relacionados con la telomerasa, pero, por otra parte, el acortamiento telomérico puede ser inducido por factores externos.

Se ha relacionado también el acortamiento telomérico con situaciones de estrés metabólico. El estrés oxidativo se ha relacionado con muchas enfermedades, como pueden ser las infecciones, como la producida por el SARS-CoV-2, o por ejemplo en situaciones de inflamación (49). Todo esto va a conducir a la senescencia, con daño del ADN por la vía de la activación de p53, generando disfunción mitocondrial y generando especies reactivas del oxígeno (ROS).

3. FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA

Uno de los ejemplos de síndromes teloméricos es la fibrosis pulmonar idiopática (FPI). Se trata de una enfermedad respiratoria crónica y progresiva con una alta mortalidad que afecta sobre todo a personas mayores, con una edad media al diagnóstico de 66 años (50). La FPI se define como una enfermedad de aparición espontánea (idiopática), y es la forma más común de neumonía intersticial idiopática (51), las cuales deben ser distinguidas de otras enfermedades intersticiales de causa específica, como las que ocurren dentro de una enfermedad autoinmune, como en las enfermedades de tejido conectivo.

3.1 EPIDEMIOLOGÍA Y ETIOPATOGENIA

La FPI se caracteriza por una cicatrización aberrante del pulmón, que se cree que ocurre como una respuesta atípica a una lesión sobre el epitelio. El daño epitelial, por su parte se piensa que es debido a una respuesta fibrótica aberrante con depósito de material denso que reduce la distensibilidad del tejido pulmonar y la capacidad para la difusión de gases (52).

La FPI es reconocida como una enfermedad rara, con una incidencia sobre 10 casos por 100,000 al año en Europa y Estados Unidos (53). Sin embargo, su prevalencia e incidencia están aumentando en los últimos años, sobre todo debido a una mejoría de los métodos diagnósticos, pero también debido al envejecimiento poblacional (54,55).

Los mecanismos etiopatogénicos de la enfermedad no se entienden completamente, y, aunque la FPI es por definición idiopática, se han identificado ciertos factores de riesgo, siendo el tabaquismo uno de los principales para desarrollarla (56). La exposición a otros tóxicos como la piedra, metales, madera y polvos orgánicos también han sido sugeridos como factores de riesgo posibles (57,58). El reflujo gastroesofágico también se cree que puede contribuir en forma de micro aspiraciones, que causan daño en el epitelio de las células alveolares. Sin embargo, es difícil hacer asociaciones teniendo en cuenta su alta prevalencia en la población general.

La edad es otro factor de riesgo relevante, siendo considerada en muchos estudios epidemiológicos una enfermedad asociada a la edad (59,60). Ambas, prevalencia e incidencia aumentan con la edad, y se suele diagnosticar después de la sexta o séptima década de la vida. También existen diferencias en el género, ya que es más frecuente en hombres que en mujeres (61).

Por último, la genética parece tener un papel importante, puesto que entre un 2 y un 20% de los pacientes con FPI tienen otro familiar afecto de la enfermedad; en los casos familiares, la transmisión suele ser autosómica dominante (62). En este momento, se considera que el mayor factor de riesgo para tener FPI es tener otro familiar con la enfermedad. Se han identificado varias mutaciones asociadas con la FPI. Sin embargo, la mayoría de pacientes con mutaciones conocidas tienen otros factores de riesgo adicionales, como la exposición a tóxicos pulmonares. Esto explica a su vez porque hay familiares con la misma mutación y no todos presentan la enfermedad (63).

3.2. TELÓMEROS EN LA FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA

La capacidad de regenerar y reparar el tejido dañado se va reduciendo progresivamente con la edad. Uno de los mecanismos relacionados con el envejecimiento es el acortamiento telomérico. Se han analizado pacientes con FPI familiar que presentan mutaciones en genes relacionados con telómeros y se ha observado una disminución de la actividad de la telomerasa y un acortamiento telomérico prematuro. Por tanto, en la FPI, así como en otras enfermedades con acortamiento telomérico prematuro, este fenómeno conduce a una mala reparación del tejido, que, en el caso del epitelio pulmonar, provoca una cicatrización aberrante del pulmón, y el desarrollo de fibrosis pulmonar.

En los últimos años, múltiples genes relacionados con los telómeros se han identificado como responsables del acortamiento telomérico. Las mutaciones en los genes de telómeros se han encontrado hasta en un 25% de los casos familiares y en 1-3% de casos de FPI esporádica. Además, en los casos esporádicos, sin mutaciones en genes relacionados con los telómeros descritos hasta la fecha, se han observado unos telómeros más acortados si se compara con gente de su misma edad sin la patología. Alrededor del 10% de pacientes presentan telómeros tan cortos como los de portadores de mutaciones de la telomerasa (17,18). También se ha observado que los pacientes con FPI con acortamiento telomérico tienen un peor pronóstico respecto a los que no lo tienen. Esto es importante, ya que se ha visto que el acortamiento telomérico de los padres se transmite a la descendencia, incluso aunque no haya mutaciones en genes relacionados.

Estos hallazgos sugieren que el acortamiento telomérico juega un papel importante en la etiopatogenia de la enfermedad, sin quedar completamente explicado por las mutaciones genéticas en la totalidad de los pacientes. Como comentamos, el acortamiento telomérico puede ser provocado por factores exógenos, como el estrés oxidativo o el tabaquismo, pero también puede ser debido a una proliferación incrementada de las células inmunes (64,65). Por tanto, no siempre va a tener un carácter hereditario, como ocurre en los casos familiares con mutaciones identificadas. A veces, puede tener un origen adquirido que también contribuye al desarrollo de la enfermedad. Pero también es importante tener en cuenta que, aunque los factores genéticos representan un mecanismo etiopatogénico importante, no suelen ser suficientes, dependiendo en la mayoría de casos de otro factor desencadenante. Es decir, se necesita un segundo evento, como por ejemplo el tabaquismo, infecciones virales, reflujo gastroesofágico, etc. para el desarrollo definitivo de la enfermedad.

3.3. GENÉTICA EN LA FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA

En los últimos años, hay evidencia creciente que los factores genéticos juegan un papel importante en la FPI. El hecho de que haya varios familiares afectados de FPI en la misma familia sugiere un mecanismo genético. Pero las mutaciones en estos genes no son exclusivas de las formas familiares, también se han identificado en casos esporádicos (66,67).

Los genes más frecuentemente afectados por mutaciones, todos ellos son genes de integridad telomérica, son los siguientes:

- *TERT*: El gen codificante de la transcriptasa reversa de la telomerasa. Es responsable del 15% de las fibrosis pulmonares familiares (FPF). Hay diferencias de género en esta mutación, siendo las mujeres 11.9 años mayores al diagnóstico que los hombres.
- *TERC*: El gen codificante del componente de RNA de la telomerasa
- *RTEL1*: El regulador de la helicasa de elongación telomérica 1. El locus establecido para la disqueratosis congénita.
- *PARN*: Ribonucleasa específica para la eliminación de la cola de poli(A).

El surfactante pulmonar, es una sustancia lipoproteica con un papel clave para la homeostasis alveolar, ya que reduce la tensión superficial de los alvéolos, evitando su colapso, y así facilitando el intercambio gaseoso. También en la FPI se han identificado casos con mutaciones en genes relacionados con el surfactante, pero son mucho más raras:

- *SFTPC* proteína C del surfactante.
- *SFTPA2* proteína A2 del surfactante.

Existen más pacientes, ya sean familiares o esporádicos con acortamiento telomérico (aproximadamente un 10-30% de todos los pacientes con FPI según estudios (68,69), que con mutaciones detectadas, motivo por el que se cree que la mayoría de los mecanismos genéticos todavía se desconocen.

Aparte del componente genético la epigenética juega un papel importante. Por ejemplo, el gen *TERT* está sobre-expresado en fumadores crónicos y en la mayoría de los casos se asocia a un estrés oxidativo (70).

3.4. FIBROSIS PULMONAR FAMILIAR

La fibrosis pulmonar familiar (FPF) se diagnostica cuando hay dos o más familiares afectados, lo que representa hasta el 20% de los casos con FPI, dependiendo de las series (71,72). Las características demográficas y clínicas de los pacientes con FPF son similares a aquellos pacientes con enfermedad esporádica, excepto por presentar un diagnóstico de la enfermedad a una edad más temprana, siendo diagnosticados entre 3.5 a 12 años antes (73,74); y muestran un peor pronóstico debido a una precoz progresión.

La FPF presenta una amplia gama de fenotipos de fibrosis pulmonar, siendo en la mayoría de casos FPI. Sin embargo, puede haber distintos diagnósticos en la misma familia: neumonitis por hipersensibilidad, neumonía intersticial descamativa, y fibroelastosis pleuropulmonar, entre otras.

Por otra parte, se ha observado que el riesgo de presentar una enfermedad intersticial en los familiares no difiere entre los pacientes con FPI y aquellos con fibrosis pulmonar familiar (75).

3.5 TRATAMIENTO

Actualmente hay dos fármacos aprobados para la FPI. Por un lado, la pirfenidona, que es un agente antifibrótico que inhibe la síntesis de colágeno estimulada por el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), disminuye la matriz extracelular y la proliferación de fibroblastos, actúa a través de múltiples mecanismos inhibiendo el estrés oxidativo, las citoquinas profibróticas y las inflamatorias. El otro fármaco es nintedanib, un bloqueador de los receptores de tirosinas kinasas que colaboran con la síntesis de factores de crecimiento profibróticos. Ambos son capaces de enlentecer la enfermedad, pero ninguno de ellos es capaz de detener su progresión por completo. Hay en marcha varios ensayos clínicos con nuevas moléculas, pero de momento ninguno ha sido aprobado para su uso comercial.

Por el momento, no se dispone de un tratamiento específico para los pacientes con FPI o telomeropatía. En el futuro sería un campo interesante de estudio para elegir un tratamiento más personalizado. Prueba de ello es que un estudio demostró que la longitud telomérica podría ser un buen marcador para determinar el tipo de terapia a administrar. En el ensayo clínico PANTHER-IPF se vio que los pacientes con telómero

acortado tenían una mala respuesta al tratamiento inmunosupresor (76). Esto también se ha comprobado en los pacientes con acortamiento telomérico que son trasplantados y reciben medicación inmunosupresora a largo plazo, ya que tienen una peor supervivencia que aquellos que no tienen acortamiento (77). Por tanto, la medición de la longitud telomérica tendría utilidad en ciertas ocasiones para decidir un tratamiento más personalizado para el paciente.

Otra aproximación terapéutica que se está estudiando es el mantenimiento de la longitud telomérica. Basándose en que las hormonas sexuales regulan la expresión de los genes relacionados con la telomerasa, tanto en cultivos como en modelos animales, se administró danazol para atenuar el desgaste acelerado de los telómeros (48). Los resultados demostraron que casi todos los pacientes (11 de 12 [92%]) ganaban longitud telomérica a los 24 meses del tratamiento.

Otro estudio reciente relacionado con el mantenimiento de los telómeros refiere a un nuevo mecanismo para aumentar la longitud telomérica mediante la transferencia de telómeros desde células T a otro tipo de células del sistema inmune. Los investigadores han descubierto que algunas células pueden adquirir ADN telomérico de otras células, transportado a través de vesículas extracelulares. De momento, se ha estudiado como una manera de potenciar el sistema inmune (78), aunque resultaría muy interesante para poder aplicar a distintas telomeropatías, incluida la FPI.

Por tanto, parece que la modulación de la expresión de la telomerasa y la longitud telomérica podrían ser una herramienta terapéutica para el tratamiento de las enfermedades intersticiales, incluida la FPI.

3.6 PRONÓSTICO

Hasta hace unos 10 años, fecha en la que se comercializaron los antifibróticos, el pronóstico de la FPI era más sombrío que en la mayoría de cánceres, con una supervivencia al diagnóstico de aproximadamente 4 años, al no disponer de tratamiento curativo. La mejoría en el pronóstico de la enfermedad se ha sustentado con el estudio de nuevos fármacos para la FPI y debido a la ampliación de la elegibilidad para el trasplante de pulmón.

Como se ha comentado, la longitud telomérica ajustada por edad en los pacientes con FPI es significativamente más corta que en controles de su misma edad y sexo.

Además, en varios estudios se ha visto que la longitud telomérica es un factor de riesgo independiente, asociando una peor supervivencia, independientemente de identificarse mutaciones en genes relacionados con la telomerasa o no (79).

El mal pronóstico que comporta el acortamiento telomérico en estos pacientes, también se ha visto en relación con el trasplante pulmonar, teniendo mayor número de complicaciones, tanto por el uso de medicación inmunosupresora, con el aumento de efectos secundarios que comporta en estos pacientes, así como debido a un aumento de mortalidad en relación con el acortamiento telomérico (77). Además, se sugiere que la baja supervivencia post-trasplante se debe a mayores tasas de disfunción crónica del aloinjerto pulmonar y con una aparición más precoz de este.

Por otra parte, aunque la edad por sí misma se considera un factor de riesgo para la FPI en general (cuanto más mayor es el paciente, peor pronóstico), se ha visto lo contrario en pacientes con acortamiento telomérico. Cuanto más joven es el paciente en el momento del diagnóstico, peor será su evolución. Esto se explica debido a que cuanto más pronto se presenta la enfermedad fibrótica, más rápido ocurre el proceso de envejecimiento pulmonar (80). Asimismo, el acortamiento telomérico también se ha asociado con un riesgo aumentado de infecciones y de mayor mortalidad cuando estas ocurren (81).

El curso clínico de la enfermedad es variable. El seguimiento se realiza mediante test de función pulmonar, sobre todo la capacidad vital forzada (FVC). El declinar de la FVC se considera uno de los mejores marcadores predictivos de mortalidad en estos pacientes, pero no disponemos, en estos momentos, de algún biomarcador para vaticinar su caída. Consecuentemente, como el acortamiento telomérico predice una mayor susceptibilidad a desarrollar una enfermedad fibrosante progresiva, podría tener utilidad como un factor pronóstico junto con otros biomarcadores, para pronosticar la evolución del paciente y ayudar en la toma de decisiones terapéuticas. En estos momentos, se recomienda su medida antes del trasplante.

3.7 BIOMARCADORES MOLECULARES DE FIBROSIS PULMONAR

El polimorfismo en el gen de la Mucina 5B (*MUC5B*) se ha visto que es un factor de riesgo significativo para la FPI (alelo rs35705950). El *MUC5B* está relacionado con una glicoproteína llamada mucina, la cual es necesaria para la inmunidad innata y para el aclaramiento de las vías aéreas (82). Además, también se ha objetivado que es un

elemento relacionado con el desarrollo de fibrosis en otras enfermedades, como sería la fibrosis asociada a la artritis reumatoide (83) o en la neumonitis por hipersensibilidad (84).

Múltiples moléculas en sangre se han relacionado con la patogénesis de la fibrosis pulmonar, sobre todo en el caso de la FPI, como el antígeno 6 de Krebs Von den Lungen (KL-6), o moléculas relacionadas con la producción de matriz extracelular, como son las metaloproteasas (85). En algunas de ellas, como la osteopontina, la metaloproteasa de matriz (MMP) 7, la molécula de adhesión intracelular y la periostina, se ha valorado su papel como predictores capaces de determinar la progresión de la enfermedad (86). En particular, se ha observado que la periostina está altamente expresada en los pulmones de pacientes con FPI, lo que contribuye al proceso fibrótico al promover el depósito de matrix extracelular (87). Además, se ha identificado como un posible objetivo terapéutico, ya que su inhibición mediante anticuerpos o RNA terapéuticos ha demostrado, en modelos experimentales, reducir la fibrosis (88). Por tanto, la periostina se perfila como un biomarcador con valor tanto pronóstico como terapéutico.

4. OTRAS ENFERMEDADES INTERSTICIALES Y SU RELACIÓN CON LOS TELÓMEROS

El acortamiento telomérico también se ha observado en algunos estudios en otras enfermedades pulmonares intersticiales con fenotipos fibróticos, como la neumonitis por hipersensibilidad, la sarcoidosis, la fibroelastosis pleuroparenquimal y un subgrupo de clasificables, entre otras, confiriéndoles un peor pronóstico, al igual que en la FPI (89).

En estas enfermedades, los telómeros también son más cortos si se comparan con controles de su misma edad y sexo, sin embargo, hay diferencias entre entidades. De entre todas, en la que mayor acortamiento se ha visto es en la FPI, lo que sugiere que en este caso el factor genético parece tener un mayor peso, mientras que en las otras entidades parece que en el acortamiento telomérico pesa más el factor adquirido, a través de respuestas inflamatorias y estrés oxidativo (18).

Por otro lado, también se han identificado mutaciones relacionadas con los genes de los telómeros en otras enfermedades intersticiales fibróticas diferentes de la FPI. Aunque son patologías distintas, comparten un fenotipo similar, de deterioro progresivo. Por ello, si bien el diagnóstico clínico es fundamental para las decisiones terapéuticas y

pronósticas, la presencia de un acortamiento telomérico o una mutación en sus genes relacionados indica un mal pronóstico, independientemente de la enfermedad específica.

5. COVID-19 Y FIBROSIS PULMONAR: EVIDENCIA Y PERSPECTIVAS

La COVID-19 ha afectado a más de 600 millones de personas desde el inicio de la pandemia. Varios estudios han demostrado que aproximadamente un cuarto de los supervivientes del COVID-19 han quedado con secuelas radiológicas y funcionales compatibles con cambios fibróticos, lo que puede llevar a complicaciones respiratorias a largo plazo. En la mayoría de los casos estas secuelas se relacionan con la gravedad de la enfermedad, sin embargo, se han evidenciado también en pacientes con una enfermedad leve, siendo muy probable la posibilidad de que el propio virus sea capaz de tener una acción profibrótica *per se*. Esta capacidad se ha visto en otros virus como el virus de Epstein-Barr, el citomegalovirus o el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (90).

La fisiopatología de la COVID-19, especialmente en sus formas graves, comparte similitudes con enfermedades pulmonares intersticiales como la FPI. Ambas condiciones presentan una respuesta inflamatoria desregulada y daño alveolar difuso que puede evolucionar hacia fibrosis pulmonar. En la COVID-19, la *fase inicial de daño pulmonar e inflamación* se lleva a cabo mediante una liberación de citoquinas y una activación descontrolada del sistema inmune contra el SARS-CoV-2 que generan un entorno inflamatorio persistente que, en algunos pacientes, si esto no se resuelve, puede promover la remodelación del tejido pulmonar y la fibrosis. Existe también una *fase de daño vascular y trombosis*, ya que se ha visto que la COVID-19 está asociada con un daño microvascular que puede exacerbar el daño pulmonar y a su vez, promover los cambios fibróticos. Esta afectación vascular se ha visto que es un factor clave en la progresión a fibrosis pulmonar (91). A lo largo del tiempo, la inflamación que no se ha resuelto y el daño tisular pueden conducir al desarrollo de una fibrosis intersticial. Esto se caracteriza por una proliferación de fibroblastos y depósito de matriz extracelular, dando lugar a la fibrosis del tejido (92). Cuando se han realizado exámenes histológicos de estos pacientes, se han objetivado patrones de daño epitelial y vascular con fibrosis intersticial, siendo esta más evidente a partir de las tres semanas del inicio de la

infección. Estos patrones pueden ocurrir simultáneamente o consecutivamente en los pacientes (93) (**Figura 2**). Por ello, la fibrosis pulmonar asociada a la COVID-19 es el resultado de una interacción compleja entre la infección viral, la respuesta inmune y el daño vascular, produciendo una cicatrización del tejido pulmonar crónica.

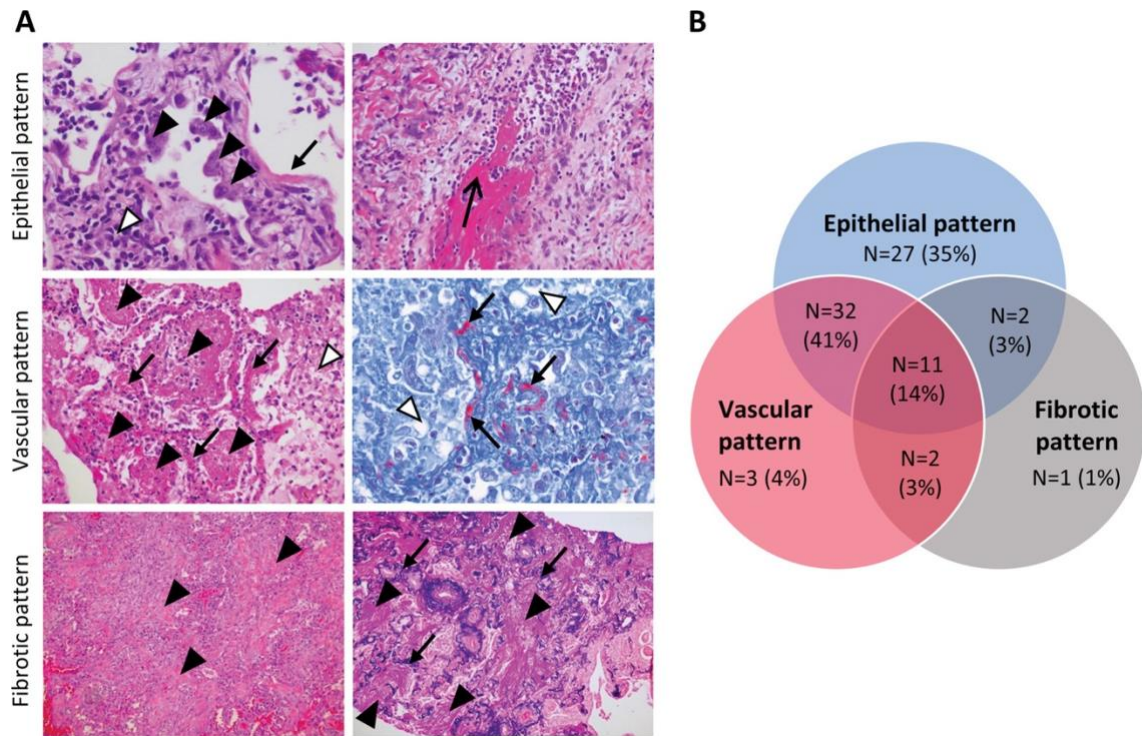


Figura 2 | Resumen de casos de pacientes con COVID-19 de una revisión sistemática con patrones histológicos con afectación epitelial, vascular, fibrótica o mixta (93) Se observan imágenes histológicas de autopsias pulmonares de pacientes COVID-19 que muestran tres patrones de daño: epitelial, vascular y fibrótico. Se observan características como desprendimiento de neumocitos, trombosis, edema y fibroelastosis, lo que refleja la variedad de lesiones pulmonares asociadas al virus.

Este mecanismo es similar al observado en la FPI y otras enfermedades intersticiales, donde el estrés oxidativo, la disfunción celular y la activación de fibroblastos conducen al deterioro estructural del pulmón. Además, en algunos estudios de pacientes COVID-19 se observaron niveles elevados de biomarcadores de fibrosis, similares a los estudiados para patologías intersticiales, en la fase aguda de la infección (94). Los factores de riesgo para desarrollar estos cambios fibróticos también son lo que comúnmente encontramos en pacientes con FPI, como son la edad avanzada y el tabaquismo.

Estas similitudes han llevado a investigar posibles tratamientos antifibróticos para la COVID-19, como los ensayos con nintedanib y pirfenidona, fármacos utilizados en la FPI, con el objetivo de reducir el daño fibrótico en pacientes con COVID-19 grave (95,96).

Entender los mecanismos que producen esta fibrosis pulmonar es clave para desarrollar terapias dirigidas y para manejar las complicaciones respiratorias a largo plazo de los supervivientes de la COVID-19.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

A lo largo de la vida de un individuo se observa un acortamiento telomérico, lo que ha llevado a proponer este fenómeno como la causa molecular primaria del envejecimiento. La fibrosis pulmonar idiopática, es uno de los ejemplos clásicos de síndromes teloméricos, donde se observa un envejecimiento precoz de los tejidos. Los mecanismos patogénicos relacionados con el desarrollo de fibrosis pulmonar asociada a la infección por coronavirus en los pacientes que se recuperan no se conocen en profundidad. Existe controversia sobre si los virus son capaces de desencadenar los mecanismos que provocarán cambios fibróticos pulmonares o simplemente crearán las condiciones para que un segundo estímulo los desarrolle.

Nuestra hipótesis es que la infección respiratoria por SARS-CoV-2, que guarda similitud filogenética con el SARS-CoV, va a ser capaz de provocar cambios fibróticos pulmonares en un gran porcentaje de pacientes que hayan tenido una neumonía bilateral por este virus.

El estudio de la excesiva actividad fibroproliferativa observada en estos pacientes, a través de la determinación de la longitud del telómero en leucocitos circulantes y los posibles cambios en la actividad mitocondrial de dichas células circulantes, apoyada por otros parámetros inflamatorios podría ayudar a dilucidar los mecanismos responsables de la aparición de fibrosis pulmonar y establecer nuevos biomarcadores de potencial uso clínico.

El objetivo principal del proyecto es determinar si infección respiratoria por SARS-CoV-2 puede desarrollar una fibrosis pulmonar y si el acortamiento del telómero, la actividad mitocondrial o parámetros inflamatorios pueden ser buenos biomarcadores predictivos.

Objetivo 1: Determinar si la infección por SARS-COV-2 es capaz de producir alteraciones a nivel de la longitud telomérica de los pacientes afectados.

- Determinar la longitud telomérica en leucocitos circulantes en pacientes con COVID-19 y compararlos con individuos control de su misma edad y sexo.
- Determinar la longitud telomérica en leucocitos circulantes en pacientes con COVID-19 en el momento de la infección aguda y analizar su evolución al año de la infección.

Objetivo 2: Relacionar la alteración de la longitud del telómero con la aparición de cambios fibróticos y su evolución.

Objetivo 3: Estudiar parámetros de función mitocondrial en extractos de leucocitos y su posible correlación con la longitud telomérica y con la fibrosis pulmonar.

Objetivo 4: Determinar biomarcadores de inflamación pulmonar y fibrosis pulmonar y su correlación con los cambios en el fenotipo clínico y con la longitud de los telómeros.

El cumplimiento de los objetivos descritos nos permitiría:

- Evaluar la historia natural de la longitud de los telómeros en leucocitos circulantes en relación con la infección por SARS CoV-2.
- Avanzar en los mecanismos etiopatogénicos de la COVID-19 y la fibrosis pulmonar.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio prospectivo, observacional y multicéntrico para evaluar cambios en la función pulmonar, en la TAC torácica y en biomarcadores en pacientes ingresados en el hospital por neumonía COVID-19. Los centros participantes han sido: Hospital Clínico Universitario de Valencia, Hospital General Universitario de Valencia, Hospital Virgen de la Arrixaca de Murcia, Hospital, Hospital General Universitario de Los Arcos y Hospital Virgen del Rocío de Sevilla.

Factores de inclusión:

- Ingreso hospitalario por clínica y radiología compatible con neumonía por SARS-Cov-2
- Confirmación diagnóstica mediante una prueba positiva RT-PCR (real time reverse transcriptase-polymerase chain reaction).
- Firma del consentimiento informado.

Factores de exclusión:

- Edad <18 años
- Expectativa de vida menor de un año
- Diagnóstico previo de enfermedad intersticial o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

El estudio está aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínico Universitario de Valencia, INCLIVA (Valencia, España). La información demográfica y clínica de los pacientes se recogió de la historia médica electrónica de los diferentes centros desde dónde se extrajo la información para la base de datos.

Tras el alta hospitalaria, los pacientes se citaron a los dos, seis y doce meses con pruebas funcionales respiratorias (PFR), test de 6 minutos marcha y RX de tórax. Se realizó una TAC de tórax cuando persistían lesiones en la RX de tórax y/o alteración de las PFR. También se determinaron biomarcadores séricos relacionados con fibrosis (ver apartado 3).

Se recogieron datos de los pacientes de la historia clínica electrónica, como comorbilidades, variables clínicas obtenidas durante su estancia en urgencias y durante la hospitalización (radiología, hallazgos de laboratorio, signos y síntomas clínicos, marcadores de severidad como el uso de soporte ventilatorio y/o la admisión a la UCI).

Durante las visitas se realizaron los siguientes procedimientos: examen físico, la escala de disnea “modified British Medical Research Council (mMRC)”, PFR, pletismografía, medición de la capacidad de difusión del monóxido de carbono (DLCO) y test de 6 minutos marcha. Se les realizó una Rx tórax a todos los pacientes durante el seguimiento. Cuando hubiera alguna alteración en esta o afectación de las PFR (FVC <80% sin FEV1/FVC < 70 y/o DLCO<80%) se les realizó una TAC torácica de alta resolución (TAC-AR).

2. MEDICIÓN DE LA LONGITUD TELOMÉRICA

Se midió la longitud relativa de los telómeros (97) en los leucocitos de sangre periférica de los pacientes en el momento del ingreso y un año después del alta para una cohorte de 19 pacientes, en el resto de pacientes la medición se hizo únicamente al año. Estas mediciones se compararon entre sí y con un grupo de 60 sujetos control sanos emparejados por edad y sexo seleccionados del CIBERER BioBank y del Biobanco INCLIVA. La longitud de los telómeros se determinó a partir del ADN extraído de las muestras celulares utilizando el kit CMG-732-2 Chemagic DNA Blood 1k H12 para el equipo automatizado CHEMAGIC MSMI (Perkin Elmer). Se evaluó la calidad y la concentración del ADN en el NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Nueva York, EE.UU.) y se ajustaron las muestras a una concentración conocida de 25 ng/μL. Para los estudios longitudinales formamos grupos relacionados con la edad quinquenal y el sexo, incluyendo tanto muestras como controles. Las muestras del mismo individuo en diferentes puntos temporales se mantuvieron en la misma placa con los controles de este grupo. Las longitudes de los telómeros y de los genes de copia única (gen de la β-globina humana) se midieron mediante RT-PCR cuantitativa según lo descrito por Joglekar (97).

Todas las muestras de pacientes y controles se analizaron por triplicado, utilizando el método SYBR green (Fast SYBRGreen master-mix, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.).

Se preparó una mezcla de incluía: 5μl de Fast SYBRGreen Master Mix; 1μl concentración de trabajo del oligo Telomero A o hbg1; 1μl concentración de trabajo del oligo Telomero B o hbg2; 2μl de agua libre de nucleasas; 1μl de muestra (paciente, control, ADN de referencia o agua para el control sin muestra). Como ADN de referencia utilizamos ADN prenatal.

Los oligos se prepararon a diferentes concentraciones de trabajo siguiendo las recomendaciones del protocolo: Telomero A (1µM), Telomero B (3µM), hbg1 (3µM), hbg2 (7µM). La secuencia de los oligos se muestra a continuación:

Telomere (A): CGGTTTGGTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT

Telomere (B): GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT

Human β-globin - hbg1: GCTTCTGACACAACCTGTGTTCCTACTAGC

Human β-globin - hbg2: CACCAACTTCATCCACGTTCCACC

Se utilizó la plataforma PCR RocheLightCycler 480 (Roche, Basilea, Suiza). El perfil de ciclos térmicos utilizados fue: un primer ciclo de 3 min a 95°C (2,63°C/s), un segundo ciclo de 40 ciclos de 15s a 95°C (2,63°C/s), 1 min a 56°C (oligos Telomere) o 58°C (oligos hbg) (2,42°C/s). Se finalizó con un análisis curva melt para confirmar la ausencia de formación de dímeros por parte de los oligos. Se utilizó ADN de referencia para calcular los coeficientes de variabilidad intra e interensayo.

La longitud telomérica relativa (RTL) se determinó como:

$$RTL (\Delta\Delta Ct) = (Ct \text{ hbg M} - Ct \text{ Telómero M}) - (Ct \text{ hbg R} - Ct \text{ Telómero R})$$

donde,

Ct hbg M: Media Ct hbg muestra

Ct Telómero M: Media Ct Telómero muestra

Ct hbg R: Media Ct hbg ADN referencia

Ct Telómero R: Media Ct Telómero ADN referencia

Se muestran los valores absolutos, y los valores más altos de RTL indican acortamiento de los telómeros.

3. DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES EN SANGRE

Se determinaron biomarcadores circulantes del suero de sangre periférica que se centrifugó a 4000 rpm durante 20 minutos, se recogió y almacenó a -80°C en un biobanco. Se utilizaron tres kits multi-análisis de Multiplex® (Merck Millipore, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) para medir los niveles de cuatro biomarcadores en suero/plasma. El primer kit (cat: HMMP2MAG-55K), se utilizó para analizar metaloproteinasas de matriz (MMP): MMP-1 (pg/mL) y MMP-7 (pg/mL) de forma

simultánea. El segundo kit (cat: HCMBMAG-22K), para analizar la periostina (pg/mL), y el tercero, (cat: HCYTA-60K), para analizar el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (pg/mL). Las muestras fueron diluidas 20, 5 y 10 veces respectivamente, utilizando el buffer de dilución incluido en el kit. Todos los controles y muestras se analizaron por duplicado siguiendo el protocolo del fabricante. Las concentraciones de biomarcadores se calcularon utilizando un método de ajuste de curvas logísticas de 5 parámetros de las IMF estándar a través del software xPONENT, incluido en el analizador.

4. GENOTIPADO SNP

Utilizamos el mismo ADN que el utilizado para el estudio de telómeros (ver punto 2). Utilizando como molde el ADN genómico obtenido se realizó una amplificación por PCR de la región genómica donde se localiza el polimorfismo del gen *MUC5B* (rs35705950). Para ello se utilizaron los oligos (rs35705950.dir: 5' GACAGTGACCCACCCAGGG 3'; rs35705950.rev: 5' CCGACTTTGCCCTCGTCCC 3'). Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 1) Desnaturalización 94 °C x 5 min; 2) Amplificación del ADN 94 °C x 20 seg, 56 °C x 30 seg, 72 °C x 30 seg; 3) Extensión durante 5 min a 72 °C.

El fragmento de PCR se purificó utilizando el kit (QIAquick PCR Purification Kit, Cat no. 28106, Qiagen) y se realizó una secuenciación Sanger en un analizador automático (ABI3730xl; Applied Biosystems) para determinar la secuencia del SNP.

5. COHORTES DEL ESTUDIO

Se estudiaron pacientes ingresados en varios hospitales por neumonía bilateral causada por la COVID-19 (ver punto 1).

Dividimos a los pacientes en tres cohortes distintas, con sus respectivos análisis:

- El primer grupo, consiste en una N de 19 pacientes, de los cuales disponemos de la medición telomérica en dos momentos temporales, al inicio de la infección, durante el ingreso, y al año de este. Este grupo es el que denominaremos a partir de este momento, **grupo de evolución**.

- El segundo grupo sería el más grande, con la N total de 135 pacientes (incluidos las 19 del grupo de evolución), de los que disponemos únicamente de la longitud telomérica al año de la enfermedad. A este grupo lo denominamos **grupo completo**. Los estudios de biomarcadores de fibrosis se realizarán sobre el grupo completo.
- Finalmente, el tercer grupo es una selección de 44 pacientes del grupo completo para determinar la función mitocondrial tras dos años de evolución. Este grupo se denominará **grupo mitocondrial**.

6. PRUEBAS DE IMAGEN Y DE FUNCIÓN PULMONAR

La afectación radiológica en radiografía simple de tórax se cuantificó modificando el Radiographic Assessment of Lung Edema (RALE) score para el COVID-19, basado en 8 puntos (98). Los TAC-AR (SOMATOM, Siemens, Germany; AQUILION, Toshiba, Japan; OPTIMA, General Electric, USA), se realizó en posición de decúbito supino en apnea al final de la inspiración. Se realizaron reconstrucciones axiales con un grosor de corte de 1mm, con 1mm de incremento, 512 mm x 512 mm. Un radiólogo experto en enfermedades intersticiales evaluó la TAC-AR. Las imágenes se clasificaron según las guías de la Fleischner Society basándose en la presencia de opacidades en vidrio deslustrado, bandas parenquimatosas, bronquiectasias y reticulaciones (99). Todas las imágenes se almacenaron en un sistema de archivo y comunicación local (PACS). Los cambios fibróticos fueron definidos como la presencia de bronquiectasias de tracción, bandas parenquimatosas, y/o patrón reticular (100).

Se realizaron pruebas de función pulmonar en todos los pacientes (Masterscreen, Jaeger). El protocolo incluía espirometría forzada con volumen espiratorio forzado en 1 minuto (FEV1), capacidad vital forzada (FVC), y el cociente FEV1/FVC y la difusión pulmonar de CO (DLCO). Todos los procedimientos se realizaron según las guías y recomendaciones de la American Thoracic Society y de la European Respiratory Society (101–104).

7. ANÁLISIS PROTEÍNAS MITOCONDRIALES

El análisis se realizó en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” de la Universidad Autónoma de Madrid, UAM en la Universidad Autónoma de Madrid.

Se obtuvieron los extractos proteicos en T-PER (reactivo de extracción de proteínas totales; Thermo Fisher), siguiendo el protocolo de extracción de muestras indicado por PROTEOmAb, de los linfocitos de pacientes COVID y controles. Se midió la concentración de proteínas mediante Bradford.

Una vez medida la proteína, se hicieron las diluciones para dejar todas las muestras a $2 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$, en buffer T-PER. Tras estas diluciones, se preparó la placa, en la cual cada muestra tiene que estar a una concentración de $0.5 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ en buffer 1:4 TPER/PBS (Buffer de printing Array) para tener todas las muestras a la misma densidad y concentración. El volumen que se utiliza en la placa es de $40 \mu\text{l}$ por pocillo.

Curvas estándar:

En todos los arrays se prepararon una serie de curvas estándar que se utilizaron como control positivo, control negativo y otras curvas para cuantificar y/o relacionar la señal obtenida en las muestras con un estándar que es un lisado celular o bien una proteína recombinante. Siempre se utilizó una curva de calibración de BSA como control negativo del experimento y como patrón estándar para la cuantificación de proteína total basándonos en la relación proporcional entre la concentración de BSA y la señal obtenida por la tinción con el colorante sintético Fast Green FCF (Sigma-Aldrich, Ref: F7252). En función del tipo de muestra, se preparó una curva estándar de una línea celular de cáncer de pulmón (A549) para interpolar la señal obtenida en las muestras.

Se imprimieron 10 gotas de 150-160 pl de cada muestra en triplicado en portas recubiertos de nitrocelulosa (ONCYTE SuperNOVA 8pad-Grace Bio-Labs, 705118), usando el Microarrayer de proteínas iTWO-300P (M2-Automation, Inc.), equipado con un micro dispensador (PDMD 183) a humedad (52%) y temperatura (16°C) constantes.

Una vez terminado el proceso de impresión, los “slides” se secaron y procesaron añadiendo en cada pocillo (EXCEPTO en el pocillo del control de carga o FCF) el bloqueo durante aproximadamente 2 horas (Súper G blocking buffer de Grace Bio-labs Ref.105101) a temperatura ambiente. Más tarde, se incubaron a 4°C durante toda la noche. Se dejaron algunos “pads” libres para la incubación únicamente con el anticuerpo secundario como control. Después de esta incubación, se realizaron lavados con PBS-T (*Phosphate-Buffered Saline*) y se incubaron con los anticuerpos secundarios. Los anticuerpos secundarios empleados fueron:

- Para ACs producidos en conejo → (Goat anti-rabbit) SAB4600185-250UL (SIGMA).

- Para ACs producidos en ratón → (Donkey anti-mouse) SAB4600176-250UL (SIGMA).
- Para ACs producidos en cabra → (Donkey anti-goat) A-21447 (Thermo Fisher).

Para el revelado, los microarrays se escanean utilizando el Typhoon 9410 scanner (GE Healthcare, Inc. Madrid, Spain). La media de la intensidad de fluorescencia de los puntos se normaliza en relación a la cantidad de proteína en las muestras, la cual se obtiene del control de carga (FCF).

Se utilizó el programa GenePix Pro 7 (USA). Después de la cuantificación, la intensidad de fluorescencia relativa se convierte en unidades arbitrarias de proteína expresada por nanogramo de proteína, utilizando como patrón la curva estándar de proteína de las A549.

Se analizaron las siguientes proteínas:

- Relacionadas con la glicólisis: GAPDH (gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa), ENO1 (enolasa 1), PK (piruvato quinasa), LDH-A (lactato deshidrogenasa A), GPD1 (glicerol-3-fosfatasa-1).
- Ciclo de ácido tricarboxílico: MPC1 (subunidad 1 del complejo transportador de piruvato mitocondrial), PDH (piruvato deshidrogenasa), CS (citrato sintasa), GLUD1 (glutamato deshidrogenasa 1), SDHA (succinato deshidrogenasa A), MDH2 (malato deshidrogenasa 2).
- GLS1 (glutaminasa 1).
- β -oxidación: CPT1 (carnitina palmitoiltransferasa-1), ETF α (subunidad α de la flavoproteína de transferencia de electrones), ETF β (subunidad β de la flavoproteína de transferencia de electrones), HADHA (hidroxil-acil-CoA deshidrogenasa subunidad α).
- Grupo OXPHOS: CORE 2, COX IV (subunidad IV del citocromo C oxidasa), α F1, IF1 (factor de inhibición 1 de la ATP sintasa).
- Síntesis de lípidos: ACLY (ATP citrato liasa), FAS (sintasa de ácido graso).
- NADPH: ACO1 (aconitasa 1), IDH1 (isocitrato deshidrogenasa 1), G6PDH (glucosa 6 fosfato deshidrogenasa).

- Sistema antioxidante: GR (glutación reductasa), catalasa, SOD1 (superóxido dismutasa 1), PRX6 (peroxirredoxina 6), SOD2 (superóxido dismutasa 2), PRX3 (peroxirredoxina 3), TRX1 (tioredoxina 1).
- Daño oxidativo: MDA (malondialdehído), 4HNE (4 hidroxinonenal), NyTyr (3 nitrotirosina).
- Dinámicas mitocondriales: OPA1 (atrofia óptica 1), MFN1 (mitofusina 1), MFN2 (mitofusina 2), DRP (proteína relacionada con la dinámica).

8. ASPECTOS ÉTICOS

A todos los pacientes se les informó de los procedimientos del estudio y dieron su consentimiento firmado. Los pacientes que no fueran capaces de entender los objetivos del estudio o cumplir el protocolo, fueron excluidos. El estudio se estudió y fue aprobado (versión 3.0; 12 mayo, 2020) por el Comité de Ética del Hospital Clínico de Valencia, INCLIVA (Valencia, España) (2020/149), y por todos los comités de bioética locales.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El estudio se hizo siguiendo las guías: Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) (105).

Las variables cualitativas fueron descritas usando frecuencias y porcentajes, y las cuantitativas mediante medias y desviación estándar.

La normalidad para variables continuas se comprobó con el test de Shaphiro-Wilks, y si no se confirmaba su normalidad, las variables se expresaron como media y rango intercuartílico.

La comparación de medias se realizó usando el test t-Student, pareado o no pareado, según fuera apropiado, cuando había normalidad, si no, usando el test de Mann-Whitney. Para variables cualitativas, las comparaciones de porcentajes entre grupos se realizaron con el test exacto de Fisher para variables dicotómicas o el chi-cuadrado para tablas de contingencia con más de dos categorías. Las relaciones de las variables se establecerán mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

Se realizaron análisis de correlación y ANOVA para evaluar la relación y las diferencias entre las variables estudiadas. Se utilizó una regresión logística multivariable para estudiar los factores asociados con el patrón fibrótico a los 12 meses.

Todos los análisis fueron realizados con el SPSS versión 25. Los test estadísticos con valores de p-valor por encima de 0.05 fueron considerados significativos.

RESULTADOS

1. EVOLUCIÓN DE LA LONGITUD TELOMÉRICA EN PACIENTES TRAS LA COVID-19

Resultados publicados: Mulet A, González-Cabo P, Pallardó FV, Signes-Costa J. *Persistent Pulmonary Fibrotic Sequelae in Patients With Telomere Shortening One Year After Severe COVID-19.* Arch Bronconeumol. 2024;60(1):62-64. doi:10.1016/j.arbres.2023.11.003

Para este estudio utilizamos el grupo de evolución, una subcohorte de 19 pacientes del estudio inicial, que fueron ingresados con neumonía bilateral por SARS-CoV-2. De este grupo disponemos análisis en la fase aguda de la infección y al año tras esta. Las características basales de esta cohorte de pacientes son las siguientes (**Tabla 1**):

Tabla 1 | Características basales de los pacientes:

Variable	Valor
Edad (años)	62.4 ± 7.4
Sexo masculino, n (%)	16 (84.2%)
IMC (kg/m ²)	28.9 ± 4.6
Nunca fumadores, n (%)	9 (47.4%)
Enfermedad pulmonar, n (%)	5 (26.3%)
Hipertensión, n (%)	7 (36.8%)
Diabetes, n (%)	4 (21.1%)
Enfermedad cardiovascular, n (%)	1 (5.3%)
Enfermedad renal crónica, n (%)	1 (5.3%)

Los datos están expresados como n (%) o media (SD).

* Enfermedad pulmonar hace referencia a asma, apnea obstructiva, etc.

IMC, índice de masa corporal.

En este grupo de pacientes, determinamos la longitud telomérica en dos tiempos: en el momento del ingreso (T_0) y al año del alta (T_1). La medición de los telómeros se comparó entre los mismos pacientes en los dos tiempos y con una cohorte de 60 controles. Al realizar la comparativa de la longitud telomérica relativa (LTR) de la muestra obtenida al ingreso (T_0) y de la muestra obtenida un año tras el alta (T_1), observamos un acortamiento telomérico significativo (T_0 media = 2.605 ± 0.1453 ; T_1

media = 3.028 ± 0.1617 ; p-valor = 0.0383) (**Figura 3A**). Comparando el grupo evolución con controles evidenciamos una diferencia sustancial en los valores de LTR, confirmando que la infección por SARS-CoV-2 produce acortamiento telomérico (media de controles de LTR = 1.421 ± 0.0825). Concretamente, encontramos que un 94,74% de los pacientes tenían acortamiento telomérico comparado con controles al año del ingreso.

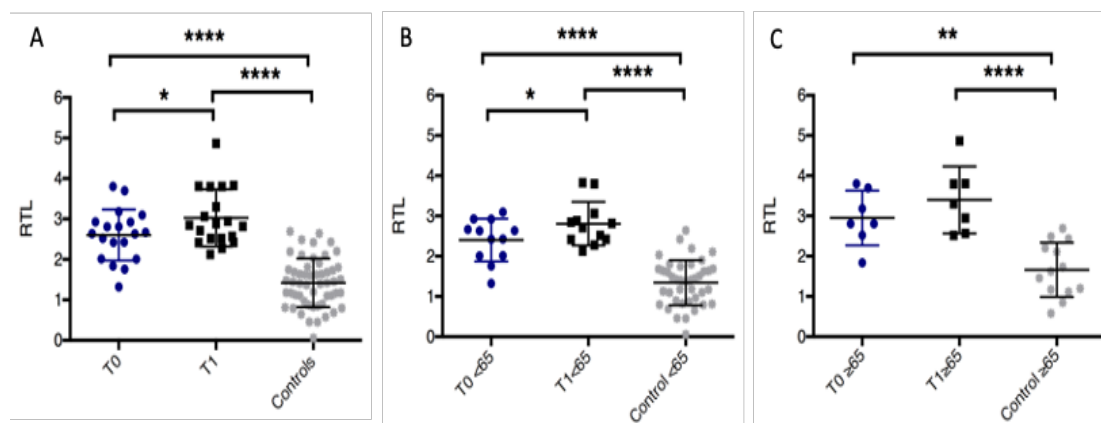


Figura 3 | Evolución del acortamiento telomérico en un año tras un COVID-19 severo. A) Representación de la longitud telomérica relativa (LTR) de pacientes ingresados por neumonía bilateral COVID-19 al ingreso y un año después del alta, comparado con controles, B) Diferencias entre la LTR entre el grupo evolución en pacientes < 65 años frente a controles, C) Diferencias en la LTR entre el grupo evolución en pacientes > 65 años frente a controles. La comparación de la media se realizó con el test t de Student, pareado o no pareado, según fuera apropiado. La longitud telomérica se expresa como el valor absoluto de la longitud telomérica relativa (LTR). Un aumento de la LTR significa que hay acortamiento telomérico. T0: Al ingreso; T1: un año después del alta.

Analizando los valores de LTR de los pacientes estratificando por edad, siendo el corte a los 65 años, la media de LTR aumentaba proporcionalmente con la edad tanto para T0 como para T1 y el grupo control (T0 <65 = 2.40 frente T0 >65 = 3.09; T1 <65 = 2.81 frente T1 >65 = 3.37; Control <65 = 1.34 frente Control >65 = 1.76). Observando las diferencias en el grupo evolución a T0 y T1, a edades más tempranas (<65 años) la longitud del telómero es menor a T1 respecto al T0, pero esta diferencia estadísticamente significativa se perdía en el grupo de mayor edad. En ambos grupos de edad (<65 y > 65) y de tiempos (T0 y T1) se mantenía el acortamiento respecto al grupo control (**Figura 3B-C**). Así pues, el acortamiento telomérico a largo plazo se agrava con la infección por SARS-CoV2 a edades más tempranas. Confirmamos esta observación realizando una correlación entre la longitud telomérica (LTR) y la edad en cada uno de los grupos (controles, T0 y T1). En los controles se mantenía una correlación positiva entre la LTR y la edad avanzada (p=0,05) (**Figura 4A**), como está descrito en la literatura (106). Sin embargo, en ambos grupos de pacientes, a tiempo 0 y a tiempo 1, esta correlación se perdía (**Figura 4B-C**).

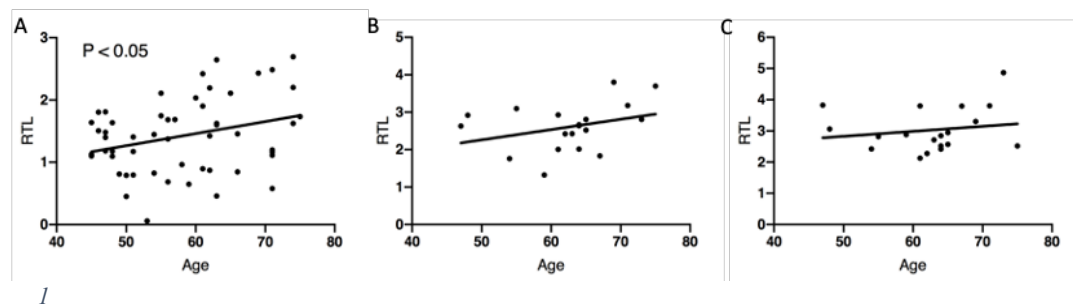


Figura 4 | Correlación entre la edad y la longitud telomérica relativa (LTR). Análisis de correlación de Pearson entre la LTR y la edad en controles (A), en pacientes a T0 (B) y en pacientes a T1 (C). Se realizó una correlación bivariada utilizando el coeficiente de Pearson (A: $r=0.297$; B: $r=0.362$; C: $r=0.170$). La edad está expresada en años. La longitud telomérica relativa está expresada como LTR. T0: al ingreso; T1: al año del alta.

Dentro de nuestra cohorte de pacientes ingresados por COVID-19, algunos de ellos mostraban acortamiento telomérico comparado con el valor inicial medido al ingreso de la cohorte, mientras que otros pacientes no. Por tanto, decidimos dividir a los pacientes en dos grupos de acuerdo con si presentaban acortamiento o no para realizar comparaciones entre ambos grupos. No encontramos ninguna diferencia entre grupos en cuanto a características demográficas ni clínicas (**Tabla 2**). Sin embargo, los pacientes sin acortamiento telomérico mostraban una mejoría en la capacidad funcional pulmonar al año del alta, comparado con las pruebas realizadas durante la primera visita tras el alta (aproximadamente a los dos meses de esta), con significación estadística para el incremento en DLCO (p -valor=0,018).

Tabla 2 | Comparación grupo acortamiento y no acortamiento:

Variable	Acortamiento telomérico (n=14)	No acortamiento (n=5)	Total (n=19)	p-valor
Edad (años)	61.64 ± 7.4	64.6 ± 7.9	62.4 ± 7.4	0.46
Sexo masculino, n (%)	12 (85.7%)	4 (80%)	16 (84.2%)	0.764
IMC (kg/m ²)	28.6 ± 3.4	29.6 ± 7.6	28.9 ± 4.6	0.802
Nunca fumadores, n (%)	7 (50%)	2 (40%)	9 (47.4%)	0.701

Comorbilidades				
*Enfermedad pulmonar, n (%)	4 (28.6%)	1 (20%)	5 (26.3%)	0.709
Hipertensión, n (%)	4 (28.6%)	3 (60%)	7 (36.8%)	0.211
Diabetes, n (%)	2 (14.3%)	2 (40%)	4 (21.1%)	0.226
Enfermedad cardiovascular, n (%)	1 (7.14%)	0 (0%)	1 (5.3%)	0.539
Enfermedad renal crónica, n (%)	0 (0%)	1 (20%)	1 (5.3%)	0.086
Tiempo de hospitalización (días)	26.9 ± 18	27 ± 15.3	27 ± 17	0.994
†Grupos de severidad				
Grupo 1, n (%)	3 (21.4%)	2 (40%)	5 (26.3%)	0.547
Grupo 2, n (%)	2 (14.3%)	0 (0%)	2 (10.5%)	
Grupo 3, n (%)	9 (64.3%)	3 (60%)	12 (63.2%)	
‡Hallazgos de laboratorio				
Linfocitos (x10 ⁹ /L)	0.65 ± 0.3	0.86 ± 0.8	0.704 ± 0.47	0.411
LDH (U/L)	1125.8 ± 413.1	899 ± 315.2	1066.1 ± 394.7	0.283
Proteína C-reactiva (mg/L)	239.9 ± 166.2	202.8 ± 129.5	230.2 ± 154.8	0.658
Fibrinógeno (g/L)	7.7 ± 2.4	9.1 ± 1.9	8.1 ± 2.3	0.239
Dímero-D (ng/mL)	10380.1 ± 13169.9	8609.4 ± 7537.3	9914.1 ± 11770	0.782
IL-6 (pg/mL)	2188.6 ± 1785.5	2927.7 ± 1957.1	2336.4 ± 1773.6	0.539
Ventilación mecánica invasiva, n (%)	9 (60%)	4 (80%)	13 (65%)	0.613
PFR al año de alta				
FVC (%)	107.3 ± 9.9	108.6 ± 9.9	107.6 ± 14	0.86
Cambios en FVC (%)§	14.71 ± 7.52	24.20 ± 12.8	17.21 ± 9.8	0.42
DLCO (%)	82.6 ± 18.6	81.8 ± 9.5	82.4 ± 16.4	0.931
Cambios en DLCO (%)§	17.07 ± 8.3	28.80 ± 9.7	20.16 ± 9.9	0.018

Los datos se expresan como n (%) o media (SD).

*Enfermedad pulmonar: asma, apnea obstructiva de sueño, otras. †Grupos de severidad: 1, sin oxígeno o con gafas nasales; 2, ventilación mecánica no invasiva o gafas nasales de alto flujo; 3: ventilación mecánica invasiva ‡Todos los valores de laboratorio son valores pico menos los linfocitos en los cuales se da el valor más bajo. §Se refiere a la mejoría en los test respiratorios comparado con los realizados a los dos meses después del alta (durante la primera visita).

La comparación de medias se realizó con el test t de Student. Para variables cualitativas, la comparación de porcentajes entre grupos se llevó a cabo con el test exacto de Fisher para valorables dicotómicas o el chi cuadrado para tablas de contingencia con más de dos categorías.

IMC, índice de masa corporal; LDH, lactato deshidrogenasa; IL-6, interleukina 6; PFR, pruebas de función pulmonar; FVC, capacidad vital forzada; DLCO, capacidad de difusión del monóxido de carbono.

Del grupo evolución, durante el ingreso un 63,2% requirieron intubación endotraqueal y ventilación mecánica invasiva. Al año del alta se midieron las pruebas de función pulmonar, encontrando que un 5% tenían una FVC alterada (<80%) y un 50% una difusión disminuida. Al año del alta hospitalaria, un 63,2% de los pacientes tenían cambios fibróticos en el TCAR, un parámetro relevante en este estudio; y muy probablemente fuese debido a la relación bien definida entre la fibrosis pulmonar y el acortamiento telomérico (28). Decidimos estratificar a los pacientes por la presencia o ausencia de cambios fibróticos. Aquellos con signos radiológicos de secuelas fibróticas presentaban un acortamiento telomérico estadísticamente significativo al año de haber sido egresados del hospital (**Figura 5A**), mientras que en los pacientes que no desarrollaban cambios fibróticos no existían diferencias significativas en la longitud del telómero al año de la infección (**Figura 5B**). Por tanto, parece que, de alguna manera, mantener la longitud telomérica previene la aparición de cambios fibróticos en estos pacientes.

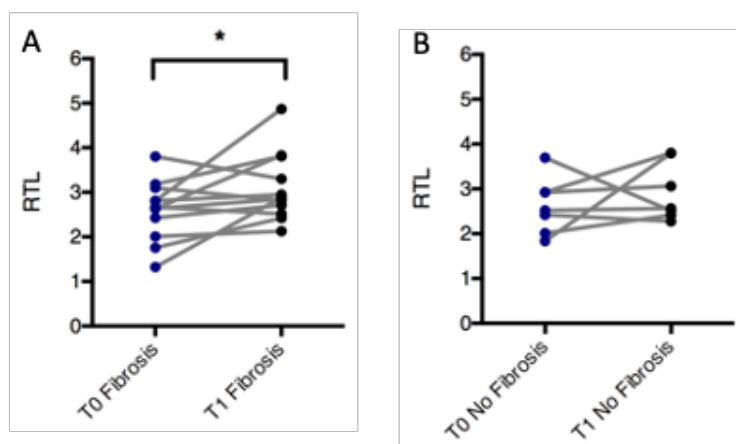


Figura 5 | Los pacientes con fibrosis tienen acortamiento telomérico a largo plazo. Los pacientes se agruparon según la presencia o ausencia de cambios fibróticos. Las gráficas muestran la evolución del acortamiento telomérico (LTR) a T0 y a T1. A) Cambios en LTR en pacientes con fibrosis. B) Cambios en LTR en pacientes sin fibrosis. LTR, longitud telomérica relativa; T0: al ingreso; T1: al año del alta. Las comparaciones de media se realizaron con test t de Student pareado.

Esta relación entre COVID-19 y fibrosis pulmonar nos planteó evaluar dos factores de riesgo de fibrosis ya bien descritos: la edad y la presencia del polimorfismo MUC5B (107). En nuestra serie de pacientes, la edad media era la misma entre ambos grupos de pacientes (los que presentaban acortamiento telomérico y lo que no), y no se vio una asociación positiva entre la edad y el desarrollo de la fibrosis (**Figura 6**).

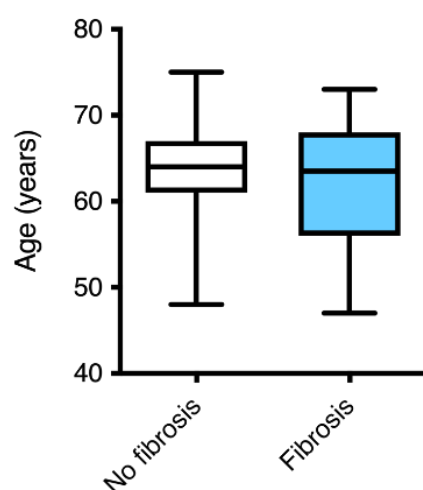


Figura 6 | La edad es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de fibrosis en nuestros pacientes con COVID-19. La gráfica muestra las diferencias de edad media entre los pacientes con y sin secuelas fibróticas al año tras la COVID-19. Las comparaciones entre medias se realizaron mediante el test t de Student no pareado.

Por otra parte, también analizamos, en nuestro grupo de evolución, el polimorfismo descrito en el gen *MUC5B* (rs35705950) que está asociado con un riesgo elevado de desarrollar fibrosis pulmonar. Calculamos los Odds Ratio (OR) que compara las probabilidades de que un genotipo específico se presente en los dos grupos (fibrosis y no fibrosis) a partir de los siguientes datos:

Genotipo	Fibróticos	No fibróticos	Total
GG	8	7	15
GT	4	0	4
TT	0	0	0
Total	12	7	19

En este caso no hemos obtenido ningún paciente con el genotipo TT. Y de la misma manera, no hay ningún paciente en el grupo de los no fibróticos con el genotipo GT. Por eso, para obtener los OR necesitamos hacer una corrección de continuidad.

Los Odds Ratios (OR): GT vs GG $\rightarrow$ OR = 0,44.

El intervalo de confianza (IC 95%) es de 0,008-3,149.

p-valor (Test de Fisher modificado – Mild-p): 0,245

Estos resultados indica que el genotipo GT tiene 0,44 veces más probabilidades de estar en el grupo fibrótico en comparación con GG. Al ser un valor menor de 1 la presencia del alelo T no está asociada con desarrollar fibrosis. El IC 95% es muy amplio, lo que indica una gran incertidumbre en la estimación del OR. Pero el p-valor confirma

que la diferencia observada no es significativa. La muestra es reducida lo que genera una falta de poder estadístico para detectar las asociaciones reales. Pero también es posible que, en nuestra muestra específica, otros factores genéticos o ambientales modifiquen la asociación observada en estudios previos.

Determinamos la frecuencia del alelo G en todo el grupo de evolución, comprobando que era del 89,5 % (0,895) mientras que el alelo T era del 10,5 % (0,105). Por tanto, en nuestro grupo evolución de pacientes COVID-19, la frecuencia del alelo T es similar a la frecuencia en la población europea (0.118) (107).

Así pues, la edad y la presencia del polimorfismo se pueden descartar como factores que influyeron en el desarrollo de fibrosis en estos pacientes. Nuestra hipótesis plantea que el propio virus, debido a su capacidad de inducir el acortamiento telomérico en los pacientes, sería el principal responsable de la aparición de cambios fibróticos.

2. ANÁLISIS BIOMARCADORES DE FIBROSIS

Resultados publicados: *Mulet A, Tarrasó J, Rodríguez-Borja E, et al. Biomarkers of Fibrosis in Patients with COVID-19 One Year After Hospital Discharge: A Prospective Cohort Study. Am J Respir Cell Mol Biol. 2023;69(3):321-327. doi:10.1165/rcmb.2022-0474OC*

El análisis de biomarcadores se realizó sobre el grupo completo, con una N de 135 pacientes. La edad media era de 61 años, y el 58,5% eran hombres. En este estudio dividimos a los pacientes según su severidad en dos grupos: grupo 1 (pacientes que precisaron como mucho soporte respiratorio con gafas nasales) y grupo 2 (pacientes que precisan VNI y/o ONAF, y pacientes que precisan intubación y VMI).

Entre ambos grupos encontramos diferencias en la edad (57.3 vs. 63.7 años; $p=0,005$), el RALE al ingreso (Radiographic Assessment of Lung Edema basado en 8 puntos (98)) (3 vs. 4.3; $p=0.001$), el pico de RALE score (4.2 vs. 6.7; $p=0.001$), la duración de la estancia hospitalaria (9.6 vs. 29.5; $p=0.001$) y todos los parámetros de laboratorio relacionados con la severidad (linfopenia y altas concentraciones de lactato deshidrogenasa, proteína C reactiva, ferritina, fibrinógeno y dímero D) (**Tabla 3**).

Tabla 3 | Características de los pacientes del estudio de biomarcadores:

Variable	Grupo 1 (n=94)	Grupo 2 (n=41)	Total (N=135)	Valor P
Edad (años)	59 (21)	65 (13)	61 (19)	0.005*
Sexo masculino	55 (58.5%)	28 (68.3%)	83 (61.5%)	0.378
IMC (kg/m ²)	27.7 (4.4)	27 (3)	27.5 (4)	0.362
Nunca fumador	57 (60.6%)	27 (65.9%)	84 (62.2%)	0.695
Enfermedad pulmonar*	16 (17%)	7 (17.1%)	23 (17%)	1.00
Hipertensión	34 (36.2%)	13 (31.7%)	47 (34.8%)	0.761
Diabetes	20 (21.3%)	8 (19.5%)	28 (20.7%)	0.999
Enfermedad cardiovascular	13 (13.8%)	3 (7.3%)	16 (11.9%)	0.431
Puntuación RALE al ingreso	3 (1.5)	4.3 (1.6)	3.4 (1.6)	0.001*
Puntuación RALE máxima	4.2 (2)	6.7 (1.2)	5 (2.1)	0.001*
Duración de la hospitalización (días)	9.6 (6)	29.5 (17.6)	15.8 (14.3)	0.001*
Linfocitos, x10 ⁹ /L	1 (0.5)	0.7 (0.5)	0.9 (0.5)	0.004*
LDH, U/L	529.2 (200.1)	897.1 (405.2)	643.6 (326.8)	0.001*
Proteína C reactiva, mg/L	61.9 (74.9)	196 (152.3)	103.9 (121.9)	0.001*
Ferritina, ng/ml	922.9 (843.2)	1628.2 (1.278)	1164.4 (1.062)	0.001*
Fibrinógeno, g/L	6.6 (1.6)	8 (2.1)	7 (1.9)	0.001*
Dímero D, ng/ml	1355.7 (3697)	8247.4 (10083.1)	3498.5 (7117.7)	0.001*

Definición de abreviaturas: IMC = Índice de masa corporal, LDH = Lactato deshidrogenasa, RALE = Evaluación radiográfica del edema pulmonar

*La edad se expresa como media (rango intercuartílico). Los demás datos se expresan como n (porcentaje) o media (DS). Grupo 1: enfermedad hospitalizada leve. Grupo 2: enfermedad hospitalizada grave y crítica. La comparación de medias se realizó mediante la prueba t de Student en presencia de normalidad y, en caso contrario, mediante la prueba U de Mann-Whitney. Para las variables cualitativas, la comparación de porcentajes entre grupos se realizó mediante la prueba exacta de Fisher o la prueba de chi-cuadrado para tablas de contingencia con más de dos categorías.

*Enfermedad pulmonar incluye: asma, apnea obstructiva del sueño y otras.

† Todos los valores de laboratorio son valores máximos, excepto para los linfocitos, donde se muestra el valor más bajo.

A lo largo del año de evolución posterior a la infección, los test de función respiratoria demostraron una mejoría significativa en ambos grupos de pacientes en todos los valores predichos de función pulmonar: FVC (98 vs. 103.9; P=0.001), FEV1 (98.2 vs. 103.2; P=0.001), FEV1/FVC (80.5 vs. 79.3; p = 0.006), DLCO (74.7 vs. 84.1; P=0.001), DLCO,80% (60.9% vs. 39.7%; P=0.001), y la capacidad pulmonar total (92.4 vs. 94.4; p=0.02). También se redujo la disnea clínicamente significativa (modified Medical Research Council dyspnea scale score >2) (20.5 vs. 6.6; p=0.002) [Tabla 4]:

Tabla 4 | Función pulmonar de los pacientes durante el seguimiento:

Variable	1º seguimiento (2 meses)	2º seguimiento (12 meses)	Valor P
FVC, % predicho	98 (17.8)	103.9 (15.1)	0.001*
FEV ₁ , % predicho	98.2 (15.8)	103.2 (14.2)	0.001*
FEV ₁ /FVC, %	80.5 (5.7)	79.3 (4.9)	0.006*
DLCO, % predicho	74.7 (19.3)	84.1 (16.1)	0.001*
DLCO <80%, predicho	70 (60.9%)	46 (39.7%)	0.001*
TLC, % predicho	92.4 (14.8)	94.4 (11.9)	0.02*
Distancia 6MWT, m	554.5 (99.3)	554.8 (102)	0.12
mMRC ≥2	27 (20.5%)	8 (6.6%)	0.002*
Patrón normal en HRCT	63 (46.7%)	80 (63.5%)	0.001*
Cambios fibróticos*	33 (25%)	37 (29.4%)	0.52
Opacidad en vidrio esmerilado	58 (43.9%)	31 (24.6%)	0.001*

Definición de abreviaturas: 6MWT = Prueba de caminata de 6 minutos, FEV₁ = Volumen espiratorio forzado en un segundo FVC = Capacidad vital forzada, TCAR = Tomografía computarizada de alta resolución, mMRC = Escala modificada del Medical Research Council, TLC = Capacidad pulmonar total. Los datos se expresan como n (porcentaje) o media (DS). Las pruebas de función pulmonar se registraron en dos momentos en 117 pacientes. Las exploraciones de TCAR a los 2 meses incluyeron N = 135 pacientes, y las exploraciones a los 12 meses incluyeron N = 126 pacientes. La comparación de la función pulmonar entre el primer y segundo seguimiento se realizó mediante una prueba t directa para variables cuantitativas y la prueba de McNemar para las demás. *Cambios fibrosis: definidos como la presencia de bronquiectasias de tracción, patrón reticular y/o bandas parenquimatosas.

No se encontraron cambios a lo largo del tiempo en la prueba de los 6 minutos marcha.

Los hallazgos radiológicos revelaron que, en ambos grupos, el número de pacientes con una TAC de alta resolución (TCAR) normal incrementó a lo largo del tiempo (46.7% vs. 63.5%; p=0.001), mientras que el porcentaje de pacientes con opacidades en vidrio deslustrado disminuyeron (43.9% vs. 24.6%; p=0.001). Sin embargo, el porcentaje de pacientes que desarrollaron cambios fibróticos de los 2 a los 12 meses no cambió significativamente (25% vs. 29.4%; p=0.520). El vidrio deslustrado suele ser la expresión de una inflamación a nivel pulmonar, por eso tiene sentido que en las fases más precoces de la infección hubiera más pacientes con estos hallazgos radiológicos, y que, a lo largo del tiempo se fuera resolviendo, así como se resuelve la fase inflamatoria a nivel celular. Sin embargo, los pacientes que empezaron a desarrollar cambios fibróticos en la fase temprana, aquellos cuyo estado de inflamación no resolvió bien y empezaron a provocar daño epitelial con la consecuente de formación de tejido fibrótico, no ha cambiado. Incluso, podemos observar que ha aumentado discretamente a lo largo del

año de la infección. Esto es, como se ha visto en otras entidades, porque la fibrosis pulmonar es irreversible, y en todo caso, puede progresar si existen estímulos que la perpetúen (**Tabla 4**).

El análisis de biomarcadores de fibrosis se realizó en el plasma de los pacientes en dos momentos: a los 2 y a los 12 meses de la infección. En cuanto al análisis a los 2 meses, encontramos diferencias en la severidad (entre los grupos 1 y 2, anteriormente mencionados) en los niveles de periostina (0.8893 vs. 1.437 ng/ml; $p=0.001$) y MMP-7 (8.7249 vs. 15.2181 ng/ml; $p=0.001$). A los 12 meses, no se encontró ninguna diferencia entre grupos respecto a los niveles de todos los biomarcadores analizados. Se ha visto que la periostina y las metaloproteasas, especialmente la 7, están relacionadas con el proceso fibrótico, siendo la periostina una inductora de la producción de MMP-7. Esta interacción contribuye a la degradación y remodelado de la matriz extracelular, facilitando la progresión de la fibrosis. Con nuestros resultados en pacientes COVID-19 observamos que estas proteínas relacionadas con la progresión de la fibrosis se encuentran más expresadas en la fase aguda en pacientes más graves, con las consecuencias que esto podrá traer a largo plazo (**Tabla 5**).

Tabla 5 | Niveles de biomarcadores a los 2 y 12 meses

Biomarcadores	Grupo 1 (n=94)	Grupo 2 (n=41)	Total (N=135)	Valor P
2 meses				
Periostina, ng/ml	0.889 (0.386)	1.437 (0.918)	1.055 (0.647)	0.001
MMP-1, ng/ml	7.858 (8.569)	9.660 (8.140)	8.405 (8.452)	0.256
MMP-7, ng/ml	8.724 (5.798)	15.218 (10.856)	10.696 (8.216)	0.001
VEGF, pg/ml	203.2 (221.7)	258.9 (226.0)	220.1 (236.4)	0.209
12 meses				
Periostina, ng/ml	0.553 (0.256)	0.628 (0.306)	0.576 (0.273)	0.149
MMP-1, ng/ml	8.992 (7.562)	9.175 (7.934)	9.046 (7.645)	0.899
MMP-7, ng/ml	10.025 (5.851)	11.135 (4.601)	10.351 (5.520)	0.293

Definición de abreviaturas: MMP = Metaloproteinasa de matriz, VEGF = Factor de crecimiento endotelial vascular.

Los datos se expresan como media (desviación estándar). Grupo 1: enfermedad leve. Grupo 2: enfermedad moderada-severa.

La comparación de medias se realizó utilizando la prueba t de Student.

Realizamos una regresión logística multivariable, para analizar la posible utilidad de los biomarcadores a los 2 meses para predecir los cambios fibróticos a los 12 meses, observando que la periostina mostraba resultados significativos (odds ratio, 1.0014; 95% intervalo de confianza, 1.0001–1.0023; $p = 0.003$) (**Tabla 6**). En el caso de los

biomarcadores obtenidos a los 12 meses ninguno mostró relación con los cambios fibróticos a los 12 meses.

Tabla 6 | Regresión logística multivariable para predecir los cambios fibróticos a los 12 meses según los niveles de biomarcadores a los 2 meses:

Variable	Análisis Univariable OR (IC 95%)	Valor P	Análisis Multivariable OR (IC 95%)	Valor P
Periostina, ng/ml	1.0016 (1.0008-1.0026)	<0.001	1.0014 (1.0001-1.0023)	0.003
MMP-1, ng/ml	1.0001 (1.0001-1.0001)	0.017	—	—
MMP-7, ng/ml	1.0001 (1.0000-1.0001)	0.001	—	—
VEGF, pg/ml	1.0009 (0.9993-1.0025)	0.248	—	—
Edad (años)	1.0577 (1.0218-1.0995)	0.003	1.0543 (1.0122-1.1033)	0.015
Grupos de gravedad	6.6917 (2.9072-16.0560)	<0.001	3.2971 (1.2726-8.6155)	0.014
Sexo	0.7765 (0.3372-1.7231)	0.541	—	—

Definición de abreviaturas: IC = Intervalo de confianza OR = Odds ratio
Las variables para el análisis multivariable fueron seleccionadas utilizando el criterio de información de Akaike en un procedimiento de pasos hacia adelante y hacia atrás. Todas las variables presentadas fueron candidatas para la selección.

En relación con los test de función pulmonar, la periostina a los 2 meses se asociaba con un empeoramiento de la DLCO a los 12 meses (odds ratio, 1.0006; 95% intervalo de confianza, 1.0000–1.0013; $p = 0.047$) (**Tabla 7**). Sin embargo, no se encontró ningún efecto con los biomarcadores obtenidos a los 12 meses.

Tabla 7 | Regresión logística multivariable para predecir el empeoramiento de la DLCO a los 12 meses según los niveles de biomarcadores a los 2 meses:

Variable	Análisis Univariable OR (IC 95%)	Valor P	Análisis Multivariable OR (IC 95%)	Valor P
Periostina, ng/ml	1.0004 (0.9999-1.0011)	0.126	1.0006 (1.0000-1.0013)	0.047
MMP-1, ng/ml	1.0000 (0.9999-1.0000)	0.855	—	—
MMP-7, ng/ml	1.0000 (0.9999-1.0000)	0.104	—	—
VEGF, pg/ml	0.9995 (0.9978-1.0011)	0.566	—	—
Edad (años)	1.0445 (1.0108-1.0827)	0.013	1.0437 (1.0086-1.0837)	0.0184
Grupos de gravedad	1.8276 (0.8118-4.1396)	0.145	—	—
Sexo	2.9282 (1.3499-6.4923)	0.007	3.646 (1.579-8.771)	0.003

Definición de abreviaturas: IC = Intervalo de confianza, OR = Odds ratio

Las variables para el análisis multivariable fueron seleccionadas utilizando el criterio de información de Akaike en un procedimiento de pasos hacia adelante y hacia atrás. Todas las variables presentadas fueron candidatas para la selección.

Por consiguiente, en nuestro estudio sobre pacientes con neumonía bilateral por COVID-19, hemos demostrado que los biomarcadores previamente descritos en otros tipos de fibrosis pulmonar también son útiles para evaluar la fibrosis inducida por la COVID-19. La periostina y la MMP-7 se encuentran elevadas en la fase aguda en los pacientes más graves, lo que posiblemente favorezca el proceso de fibrosis en estos casos. Además, observamos que los pacientes con niveles más altos de periostina en la fase aguda presentaban una correlación con la presencia de secuelas fibróticas. Estos hallazgos sugieren que los mecanismos fisiopatológicos responsables de la fibrosis tras la infección por SARS-CoV-2 son similares a los observados en las enfermedades intersticiales pulmonares

3. ACORTAMIENTO TELOMÉRICO Y DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL A LARGO PLAZO TRAS LA COVID-19

Está bien descrito que existe un acortamiento telomérico en la fase aguda de la COVID-19, pero no se habían realizado estudios sobre este acortamiento a largo plazo. Analizamos el acortamiento telomérico y los cambios en la función mitocondrial

que pueden manifestarse, a largo plazo, tras la infección por COVID-19. Este estudio se llevó a cabo utilizando las muestras obtenidas de los pacientes un año después de haber contraído la enfermedad, ya que queríamos evaluar las posibles repercusiones en la biología celular y el envejecimiento acelerado asociado a la infección.

Para ello, utilizamos el grupo completo, compuesto por 132 pacientes. Las características basales de esta cohorte de pacientes son las siguientes (**Tabla 8**):

Tabla 8 | Características de los pacientes del grupo completo

Variable	Valor
Edad (años)	60 ($\pm$ 11,8)
Sexo masculino	81 (61,8%)
Índice de Masa Corporal (IMC, kg/m ²)	27,52 ($\pm$ 4,01)
Nunca fumadores	80 (61,1%)
Comorbilidades	
Enfermedad pulmonar*	22 (16,8%)
Hipertensión	47 (35,9%)
Diabetes	28 (21,4%)
Enfermedad cardiovascular	16 (12,2%)
Enfermedad renal crónica	2 (1,5%)
Duración de la estancia hospitalaria (días)	15,9 ($\pm$ 14,46)
Tiempo en UCI (días)	4,35 ($\pm$ 9,97)
Grupos de severidad	
Grupo 1 (enfermedad menos grave)	91 (69,5%)
Grupo 2 (enfermedad más grave)	40 (30,5%)
Pruebas de función pulmonar al año del ingreso	
Capacidad Vital Forzada (FVC, %)	104,17% ($\pm$ 15,25)
Difusión pulmonar de monóxido de carbono (DLCO, %)	83,84% ($\pm$ 16,33)
Cambios fibróticos en la TCAR al año tras el ingreso	38 (29%)

Los datos se expresan como n (%) o medias (SD). *Enfermedad pulmonar: asma, apnea obstructiva del sueño, otras. Grupo 1: enfermedad leve. Grupo 2: enfermedad moderada-severa.

Para el análisis de telómeros, del grupo completo de 135 pacientes, dispusimos de 131 muestras, ya que 4 de ellas tuvieron que ser excluidas por problemas de calidad. La edad media fue de 60 años y el 61,8% eran hombres.

Para realizar el ensayo de longitud telomérica, medimos la RTL de los pacientes al año de la hospitalización y lo comparamos con controles de su rango de edad y mismo sexo. Agrupamos a los pacientes en tres grupos en base a su edad para facilitar el análisis: de 30 a 49 años, de 50 a 69 años y mayores de 70. Observamos una diferencia evidente entre pacientes y controles en sus RTL, confirmando que la infección por SARS-CoV-2 disminuye la longitud de los telómeros a largo plazo (**Figura 7**).

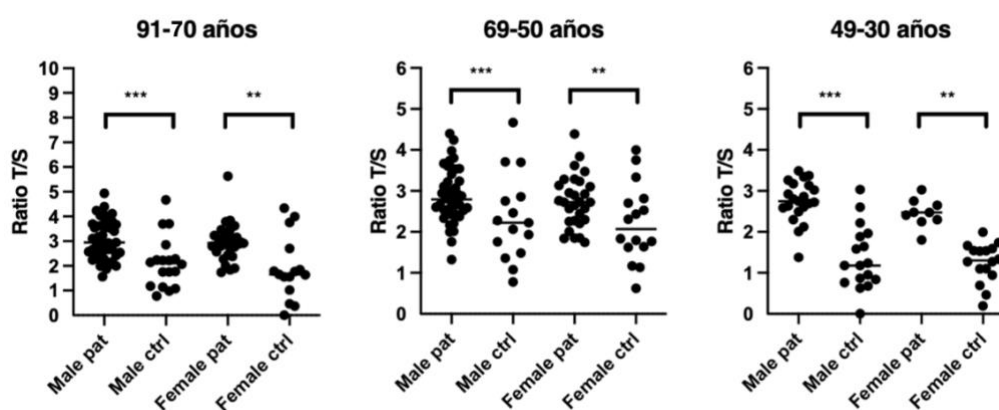


Figura 7 | Acortamiento telomérico en pacientes vs. controles de la misma edad y sexo, un año tras la infección por SARS-CoV-2. Observamos que en todos los grupos de edad existe un acortamiento de telómeros en los pacientes tras la COVID-19 respecto a controles pareados

Al realizar la división de los pacientes basándonos en la formación de grupos dependiendo de las características clínicas y la severidad de la infección (grupo 1: pacientes que precisaron como mucho soporte respiratorio con gafas nasales y grupo 2: pacientes que precisan VNI y/o ONAF, y pacientes que precisan intubación y VMI); no encontramos diferencias respecto al acortamiento telomérico al año (**Figura 8**).

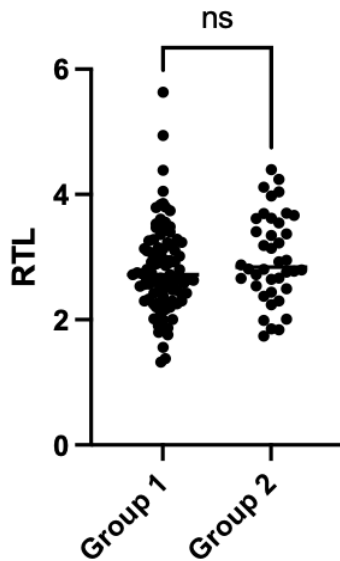


Figura 8 | Acortamiento telomérico en ambos grupos de severidad. Se observa una distribución similar en cuanto a la RTL en ambos grupos de gravedad. Por tanto, la gravedad del ingreso no determina que haya un mayor acortamiento telomérico.

Un porcentaje de nuestros pacientes presentaban secuelas fibróticas, así que nos interesó comprobar si existía alguna asociación entre el acortamiento telomérico a largo plazo y estos cambios fibróticos. Tampoco observamos ninguna relación estadísticamente significativa entre el acortamiento telomérico y las secuelas fibróticas (Figura 9).

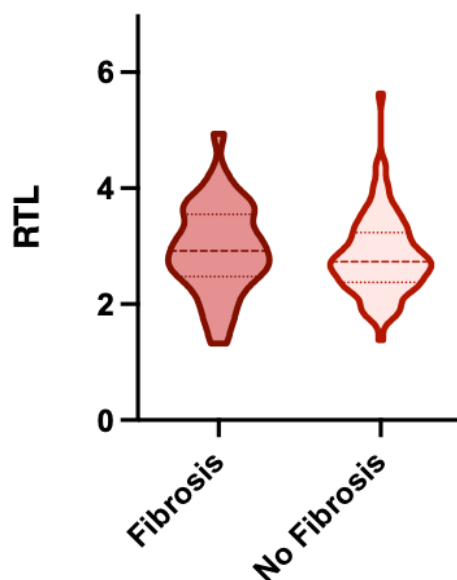


Figura 9 | Acortamiento telomérico en pacientes con secuelas fibróticas y sin ellas. La gráfica en violín muestra como las poblaciones son diferentes, ya que los pacientes con signos fibróticos presentan un mayor acortamiento de los telómeros, pero sin llegar a ser estadísticamente significativa la diferencia.

Decidimos de nuevo, analizar el polimorfismo en el gen *MUC5B* (rs35705950) en este grupo completo de pacientes debido a su asociación con el riesgo de desarrollar fibrosis pulmonar, obteniendo los siguientes datos:

Genotipo	Fibróticos	No fibróticos	Total
GG	30	83	113
GT	8	8	16
TT	0	2	2
Total	38	93	131

Calculamos con esto un OR del genotipo GT de 2.77 vs. GG, lo que sugiere una posible asociación con la fibrosis, aunque con un p-valor no estadísticamente significativo (0.0769). El genotipo TT no permite un cálculo de OR confiable, ya que no hay pacientes fibróticos con este genotipo. También determinamos la frecuencia del alelo G en este grupo siendo del 92.37% (0.924) mientras que el alelo T era del 7.63% (0.076); siendo de nuevo esta última, similar a la población europea (107).

Consecuentemente en nuestro grupo no podemos decir que existiera una predisposición genética previa a la infección viral para desarrollar fibrosis, reforzando nuestra hipótesis de que únicamente el propio virus es el responsable de estas secuelas.

3.1. IMPACTO DEL COVID-19 SOBRE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MITOCONDRIALES

Decidimos realizar un estudio mitocondrial debido a que distintos autores han demostrado el papel clave de la mitocondria en el envejecimiento prematuro del epitelio pulmonar, muy especialmente en las células que expresan la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) (108,109). Nuestro objetivo era correlacionar los cambios clínicos previstos en los pacientes con los posibles cambios teloméricos y de la actividad mitocondrial. Además, queríamos comprobar si las alteraciones descritas en las células troncales ACE2 tienen un remedo en los leucocitos circulantes procedentes de pacientes que han tenido neumonías bilaterales y en lo que se espera que se produzcan procesos fibróticos pulmonares a medio-largo plazo.

Para eso, dos años tras la infección aguda, recogimos sangre de un subgrupo de pacientes (n=42) de la serie anteriormente analizada para obtener leucocitos, y

medimos proteínas relacionadas con la función mitocondrial. Comparamos los niveles de expresión de las proteínas de los extractos derivados de los pacientes del estudio respecto a los controles, encontrando diferencias significativas en proteínas de la glicolisis (ENO1), proteínas del ciclo de Krebs (SDHA y MDH2), relacionadas con el daño oxidativo (NytTyr), relacionadas con la generación de poder reductor (G6PDH e IDH1) y proteínas relacionadas con la fosforilación oxidativa (OXPHOS) (ALFA-F1 y COX IV) (**Figura 10**).

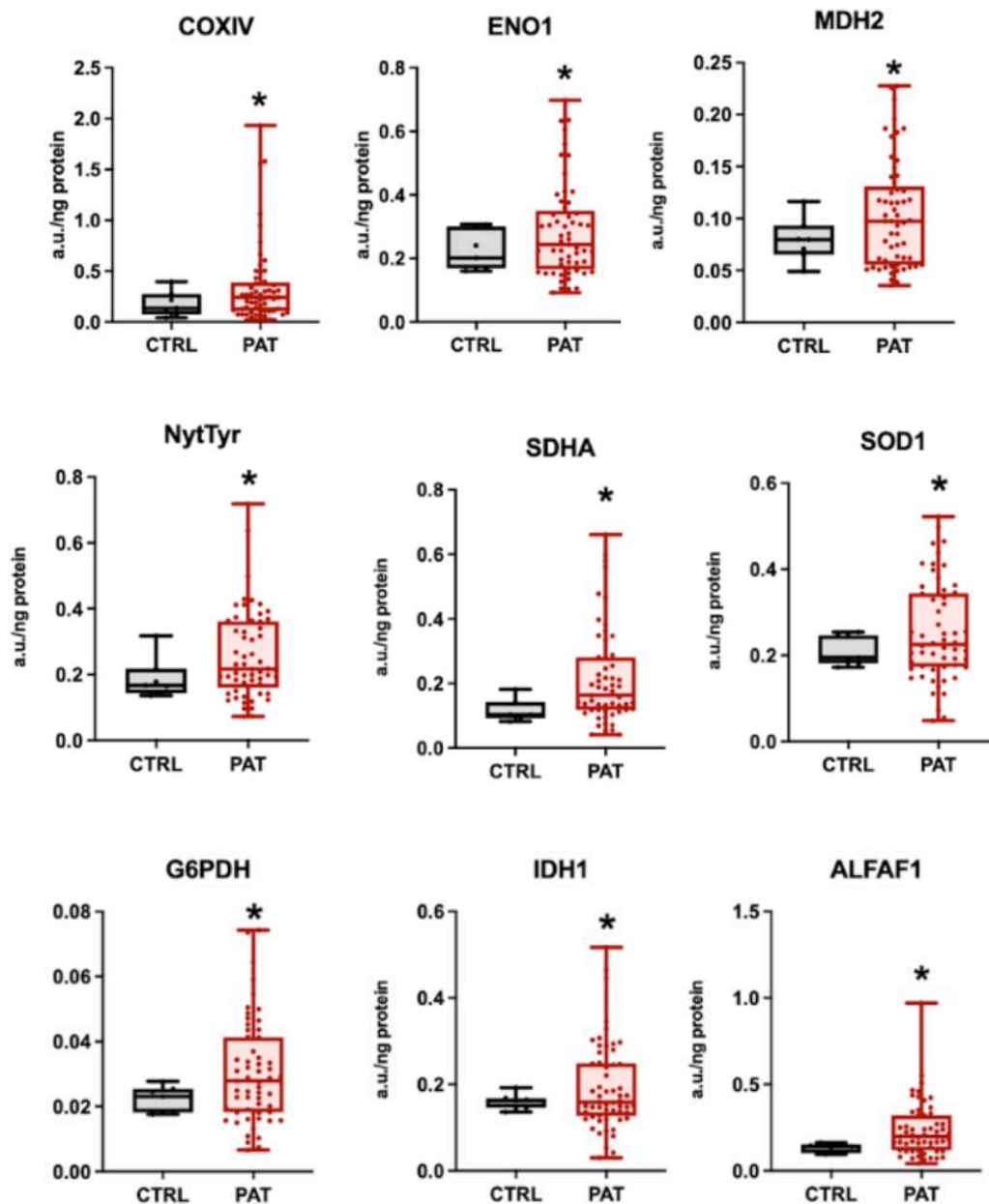


Figura 10 | Niveles de proteínas mitocondriales (expresadas en unidades arbitrarias: a.u.) de pacientes vs. controles. Se observa un aumento de expresión de varias de estas proteínas en los pacientes en comparación con los controles.

COXIV: Cytochrome c Oxidase Subunit IV; ENO1: Enolasa 1; MDH2: Malato deshidrogenasa 2; NitTyr: Nitrotirosina; G6PDH: glucosa 6 fosfato deshidrogenasa; IDH1: Isocitrato deshidrogenasa; ALFAF1: ATP Sintasa Subunidad Alfa F1; SDHA: Succinato deshidrogenasa subunidad A; SOD1: Superóxido dismutasa

Como previamente habíamos encontrado una asociación entre los niveles de periostina a los 2 meses del alta hospitalaria y cambios fibróticos a los 12 meses; decidimos estudiar la posible relación entre los valores de periostina y la función mitocondrial a largo plazo. Encontramos una correlación positiva con niveles aumentados de COX-IV a los 2 años (p valor = 0,012; r = 0,38). Este resultado es interesante, ya que la periostina es un factor clave en la fibrosis, especialmente en órganos como pulmón, corazón e hígado, donde regula la proliferación y migración de fibroblastos (110). La disfunción mitocondrial, incluida la alteración en la expresión de COX-IV, está implicada en la fibrosis y la inflamación crónica. En modelos de FPI, se ha visto que la periostina puede influir en el metabolismo celular y la función mitocondrial, lo que indirectamente afectaría la actividad de COX-IV (111).

La IL-6 ha desempeñado un papel clave en la infección por SARS-CoV-2, con niveles significativamente elevados durante la fase aguda de la enfermedad. Este marcador se ha utilizado ampliamente para identificar a los pacientes con cuadros más graves de COVID-19. De forma coherente con estos hallazgos, en nuestro estudio también observamos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos según su nivel de severidad. **(Figura 11).**

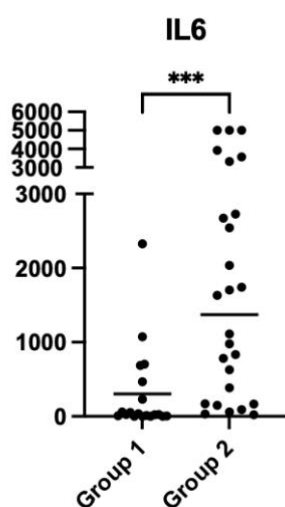


Figura 11 | Comparación de concentraciones pico de IL-6 (expresadas en ng/ml) durante el ingreso entre ambos grupos de severidad. Se observan valores mucho más altos en aquellos pacientes más severos.

Así pues, realizamos una correlación entre los niveles de IL-6 durante el ingreso y los valores de proteínas mitocondriales a los 2 años, encontrando correlaciones significativas entre niveles elevados de IL-6 en el momento agudo y niveles elevados de ENO1 (p valor = 0,022; r = 0,52) y PKM2 (p valor < 0,005; r = 0,77) a largo plazo. Esta relación resulta coherente debido a que IL-6 es una citocina proinflamatoria clave en la respuesta inmune y la inflamación crónica (112). La enolasa, particularmente la enolasa neuronal específica y la enolasa α , pueden actuar como un autoantígeno y estar involucrada en enfermedades inflamatorias (113). En condiciones inflamatorias, la IL-6 puede inducir cambios en la expresión de enzimas metabólicas, incluidas la enolasa.

Para comprobar como el grado de acortamiento podía tener algún reflejo en la expresión de proteínas mitocondriales a largo plazo, dividimos a los pacientes en función del grado de acortamiento telomérico, seleccionando aquellos con un acortamiento por encima del percentil 90, para su edad y sexo. En ese grupo de mayor acortamiento, encontramos disminuidas las proteínas ETF β y PKM2. La ETF β es una proteína mitocondrial involucrada en la oxidación de ácidos grasos y aminoácidos, transfiriendo electrones a la cadena de transporte de electrones. La disfunción mitocondrial, inducida por el estrés oxidativo y la ineficiencia en la respiración celular aumenta el daño en el ADN y acelera el acortamiento telomérico. En células envejecidas, la disminución de ETF β puede contribuir a la acumulación de ROS, promoviendo daño en los telómeros y senescencia celular (114). Por otro lado, la PKM2 es una isoforma de la piruvato quinasa, una enzima clave en la glucólisis, regulando el metabolismo energético y el crecimiento celular. En cáncer y células proliferativas, PKM2 favorece el metabolismo aeróbico/glucólisis sobre la respiración mitocondrial, lo que puede alterar la homeostasis redox y afectar la estabilidad del ADN, incluidos los telómeros (115). Se ha observado que PKM2 puede regular la expresión de genes involucrados en el mantenimiento telomérico, modulando la actividad de factores como c-Myc y HIF-1 α (116). En ciertos contextos, PKM2 puede translocarse al núcleo y afectar la transcripción de genes asociados con la replicación telomérica (117,118).

3.2. BIOMARCADORES PARA DIFERENCIAR ENTRE PACIENTES CON Y SIN FIBROSIS

Nuestro objetivo final era identificar un biomarcador, o un conjunto de ellos, capaz de predecir la progresión a fibrosis pulmonar tras la infección por COVID-19. Para ello,

analizamos si las proteínas mitocondriales que habíamos detectado alteradas y asociadas a distintos marcadores de la enfermedad podían correlacionarse con el desarrollo de secuelas fibróticas.

Para diferenciar entre pacientes que desarrollaron secuelas fibróticas y aquellos que no, analizamos los niveles de proteínas mitocondriales en ambos grupos. Encontramos diferencias significativas en la expresión de ETF β y PKM2: los pacientes sin secuelas fibróticas no mostraron variaciones en comparación con los controles, mientras que aquellos con secuelas fibróticas presentaron un aumento en ambas proteínas respecto a ambos grupos (**Figura 12**). Esto indica que el incremento de ETF β y PKM2 es exclusivo del grupo con secuelas fibróticas. Cabe destacar que estas mismas proteínas también se encontraban alteradas en los pacientes con mayor acortamiento telomérico, lo que refuerza la idea de que el acortamiento telomérico y la fibrosis pulmonar están íntimamente relacionados, y que la desregulación de estas proteínas puede formar parte de un mecanismo común subyacente.

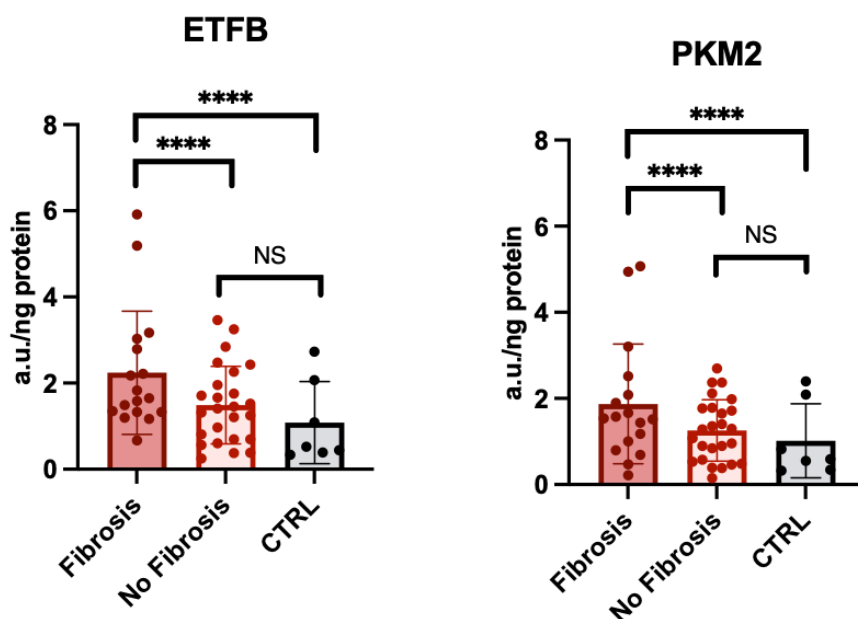


Figura 12 | Comparación entre concentraciones de ETF β y PKM2 entre pacientes que desarrollaron secuelas fibróticas al año, los que no y controles. Se observan niveles más elevados tanto de ETF β como de PKM2 en los pacientes con fibrosis respecto a aquellos que no desarrollan cambios fibróticos y respecto a los controles.

ETF β : electron transfer flavoprotein- β ; PKM2: pyruvate kinase M2

Profundizando en la relación entre el acortamiento telomérico y la fibrosis pulmonar, evaluamos posibles alteraciones en proteínas mitocondriales, centrándonos

exclusivamente en el grupo de pacientes que desarrollaron secuelas fibróticas. Esta vez, diferenciamos a los pacientes según presentaran un acortamiento telomérico superior al percentil 90.

Encontramos diferencias significativas en los niveles de ACO1 (aconitasa 1 citosólica) en función del grado de acortamiento telomérico. Lo más destacable fue la existencia de una correlación inversa entre la longitud relativa de los telómeros (RTL) y los niveles de ACO1 en pacientes con fibrosis: a mayor acortamiento telomérico, menores niveles de ACO1. Esta correlación no se observó en los pacientes sin cambios fibróticos (**Figura 13**).

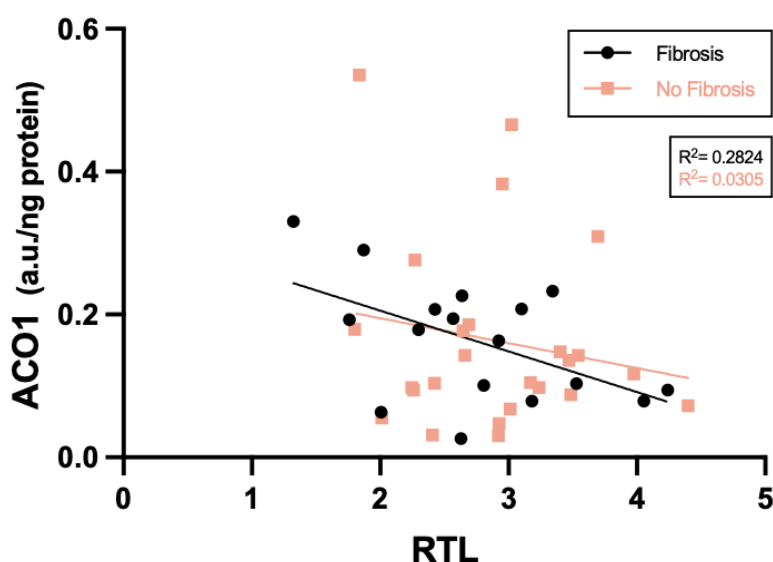


Figura 13: Correlación entre niveles de ACO1 y RTL. A mayor acortamiento telomérico (mayor RTL), menos concentración de ACO1. Esta correlación se pierde en pacientes no fibróticos.

ACO1: Aconitase 1

Aunque ACO1 no participa directamente en el mantenimiento de los telómeros, su desregulación podría reflejar un entorno celular desfavorable, caracterizado por estrés oxidativo, alteraciones mitocondriales y dismetabolismo del hierro, todos ellos factores que también promueven el acortamiento telomérico. Por tanto, nuestros resultados sugieren que la disminución de ACO1 en este contexto podría representar una adaptación celular asociada a la progresión de la fibrosis pulmonar.

DISCUSIÓN

La incidencia de manifestaciones graves y fatales de la COVID-19 aumenta con la edad de los pacientes, lo que sugiere que las vías moleculares relacionadas con la edad contribuyen a la gravedad de la COVID-19 (119).

El SARS-CoV-2 infecta diversos tipos de células, incluidas las células alveolares tipo II (ATII) de los pulmones. Estas células son estructuras clave del epitelio pulmonar distal, donde desarrollan su respuesta inmune innata y sirven como progenitoras de las células alveolares tipo I, contribuyendo a la reparación y regeneración del epitelio alveolar (120).

Además, las células T activadas expresan altos niveles de telomerasa, lo que facilita la respuesta inmune y previene la senescencia de las células inmunes durante la expansión clonal. Asimismo, se ha observado erosión acelerada de los telómeros y disfunción mitocondrial en células T de pacientes infectados por virus (31), posiblemente debido a un recambio celular excesivo como consecuencia de la replicación viral. Por lo tanto, es plausible que la infección viral pueda dañar estos tipos de células, forzando un aumento del recambio de células regenerativas (8). Esto señala una posible conexión entre la linfopenia y el acortamiento telomérico en estos pacientes.

Diversos autores han medido la longitud de los telómeros en células sanguíneas periféricas de individuos con COVID-19, encontrando percentiles más bajos en longitud y una tasa más rápida de desgaste telomérico en todos los rangos de edad de pacientes que desarrollaron patologías más graves en la COVID-19 (7,8). Aunque estos estudios correlacionaron la gravedad aguda de la enfermedad con el acortamiento de los telómeros, las consecuencias a largo plazo de la COVID-19 en pacientes con telómeros acortados no han sido publicadas.

Infección grave por SARS-COV-2 y alteraciones a nivel de la longitud telomérica

Durante la pandemia de COVID-19, se evidenció que las personas de mayor edad eran las más gravemente afectadas. Este hallazgo sugiere que el envejecimiento podría constituir un factor de riesgo para el desarrollo de formas graves de la enfermedad, al igual que ocurre en otras enfermedades pulmonares intersticiales, como la FPI. En este contexto, diversos estudios han explorado la longitud telomérica en pacientes con COVID-19, dada su estrecha relación fisiopatológica con el envejecimiento.

Los resultados de estas investigaciones indican que la COVID-19 se asocia con un acortamiento de los telómeros, especialmente en los casos más graves, y que este

fenómeno podría estar vinculado con la severidad del cuadro clínico (7). Se ha observado que los supervivientes a la infección por SARS-CoV-2 presentan una edad biológica superior a su edad cronológica, con signos de acortamiento telomérico. Estos cambios moleculares podrían actuar como biomarcadores útiles para comprender las secuelas a largo plazo de la enfermedad. Asimismo, se ha encontrado que los pacientes con COVID-19 que presentan telómeros más cortos durante la fase aguda de la infección tienen un mayor riesgo de desenlaces adversos, como ingreso en UCI o muerte, independientemente de la edad cronológica, lo cual podría explicar parte de la variabilidad en el pronóstico entre pacientes. Este acortamiento telomérico también se ha relacionado con marcadores inflamatorios de fase aguda.

No obstante, la mayoría de estos estudios se han llevado a cabo en fases tempranas, pocas semanas después del alta hospitalaria, por lo que aún no se ha determinado si el acortamiento telomérico observado es un fenómeno transitorio durante la infección activa o si persiste a largo plazo.

En nuestro estudio, determinamos la longitud telomérica en el grupo total de pacientes (**grupo completo**), donde obtuvimos la medición al año del alta. En este grupo hemos comparado la longitud telomérica de los pacientes con la de controles apareados por edad y rangos de edad, observando que todos presentan un acortamiento telomérico significativo al año del ingreso. Además, este acortamiento es evidente en todos los grupos de edad. En otras palabras, la edad en el momento de la infección no es un factor determinante (a pesar de que habitualmente se acentúa con la edad), ya que esta alteración puede presentarse en todos los grupos de edad. Asimismo, tampoco encontramos ningún antecedente médico pre-infección que hiciera a unos pacientes más susceptibles de presentar este acortamiento, ni la severidad del cuadro infeccioso agudo.

En un subgrupo de pacientes (**grupo evolución**), realizamos una medición del telómero en el momento inicial del ingreso y otra al año del alta. En este subestudio, examinamos la evolución de la longitud de los telómeros en cada paciente respecto a sí mismo. Tras un año de seguimiento, el análisis de RLT en estos pacientes evidenció un acortamiento progresivo, confirmando la pérdida telomérica a lo largo del tiempo. No observamos diferencias en las características clínicas basales ni en la gravedad de la infección aguda entre los pacientes que presentaron acortamiento telomérico y aquellos que no. Estos hallazgos sugieren que la infección por SARS-CoV-2 podría ser el principal factor responsable del acortamiento telomérico observado en esta cohorte de pacientes.

En comparación con lo previamente publicado, en nuestra cohorte hemos evidenciado que el acortamiento telomérico no constituye un fenómeno que se produce únicamente en la fase aguda del proceso infeccioso ni en relación con la respuesta inflamatoria asociada, sino que persiste en el tiempo. Desde una perspectiva clínica, este acortamiento podría traducirse en un envejecimiento biológico acelerado, con implicaciones a largo plazo como mayor riesgo de enfermedades crónicas, disfunción inmunitaria o susceptibilidad a COVID persistente. Por tanto, la vigilancia del estado telomérico podría aportar valor pronóstico en la recuperación post-COVID.

Relación entre la alteración de la longitud del telómero con la aparición de cambios fibróticos y su evolución

Múltiples estudios han demostrado que los pacientes con COVID-19 presentan secuelas pulmonares fibróticas, que en ciertos casos pueden persistir a largo plazo (121). Por otra parte, se ha relacionado el acortamiento telomérico con enfermedades fibróticas (39,122), siendo la FPI la más prevalente y estudiada (123), y varios estudios también vinculan el acortamiento telomérico con otros tipos de entidades nosológicas relacionadas con el desarrollo de fibrosis pulmonar (18,124).

A la luz de esto, en nuestro estudio nos propusimos analizar la evolución de la longitud de los telómeros en pacientes ingresados por COVID-19 y su relación con las secuelas fibróticas radiológicas 12 meses después de la infección.

En el **grupo evolución**, dónde analizamos la pérdida telomérica a lo largo del año posterior tras la infección, observamos que el acortamiento telomérico estaba asociado exclusivamente a los pacientes que desarrollaron cambios fibróticos. Al dividir la cohorte según la presencia o ausencia de estos cambios, solo los pacientes con afectación fibrótica mostraron una reducción significativa en la longitud telomérica. Estos resultados sugieren que el mantenimiento de la integridad telomérica podría desempeñar un papel protector frente al desarrollo de fibrosis pulmonar tras la infección por SARS-CoV-2.

No se observaron diferencias significativas entre los pacientes con o sin acortamiento en términos del uso de ventilación mecánica invasiva (VMI), observándose una mayor tendencia al uso de VMI en el grupo que no presentó acortamiento. Este hallazgo podría descartar los cambios fibróticos como secundarios a una posible complicación del uso de la ventilación, aunque insistimos que se trata de una muestra reducida de pacientes.

La frecuencia del alelo rs35705950 de MUC5B, reconocido como marcador genético de predisposición a fibrosis pulmonar no fue superior a la reportada en la población general. Esto sugiere que nuestros pacientes no presentaban un riesgo genético previo asociado al desarrollo de la fibrosis antes de la infección por SARS-CoV-2.

Tampoco encontramos diferencias en el acortamiento telomérico entre los grupos de gravedad, lo que contrasta con lo reportado en otros estudios, donde se ha observado una asociación entre el acortamiento telomérico y una mayor gravedad de la infección aguda por COVID-19. (8). Esta discrepancia podría explicarse por el hecho de que todos nuestros pacientes presentaban un grado elevado de gravedad, son pacientes que han estado hospitalizados en un servicio de Neumología, con neumonía bilateral e incluso requiriendo ingreso en UCI. Por ejemplo, en comparación con el estudio de Sánchez-Vázquez *et al.*, todos nuestros pacientes se ubicarían en el grupo 3 de gravedad según su clasificación (pacientes con infiltrados pulmonares > 50%). Además, aunque varios estudios han relacionado la gravedad de la enfermedad con la aparición de secuelas pulmonares, también se han documentado estas secuelas en casos leves, posiblemente debido al papel profibrótico del virus (125). Por tanto, el acortamiento telomérico podría explicar las secuelas pulmonares observadas a largo plazo incluso en pacientes con formas menos graves de la enfermedad, como han señalado otros autores.

Proponemos que, más que la gravedad de la enfermedad, lo que realmente determinaría las secuelas fibróticas son las alteraciones en la longitud de los telómeros activada por el SARS-CoV-2, lo que podría explicarse por el posible papel profibrótico del virus en sí, sin influencia de otros factores externos descritos, como son el uso de ventilación mecánica, un proceso infeccioso-inflamatorio grave, determinantes genéticos como el alelo rs35705950 de MUC5B o la edad avanzada. Por lo tanto, en nuestra cohorte los cambios fibróticos podrían explicarse mayoritariamente por el SARS-CoV-2.

Además, nuestro estudio demuestra por primera vez una asociación entre el acortamiento telomérico y el desarrollo de cambios fibróticos a largo plazo en pacientes con COVID-19. También observamos que aquellos pacientes que no presentaban acortamiento telomérico muestran una mejor recuperación funcional pulmonar. Aunque aún no es posible determinar cómo evoluciona este acortamiento a largo plazo debido a la limitación temporal del seguimiento, estudios previos en enfermedades pulmonares intersticiales han evidenciado que la reducción en la longitud telomérica se asocia con un peor pronóstico del paciente, aparición temprana de fibrosis y menor supervivencia (10,80).

Sin embargo, en el grupo completo de pacientes, cuando analizamos la longitud telomérica relativa al año respecto al grupo control, no pudimos demostrar una relación estadísticamente significativa entre el acortamiento telomérico y la persistencia de secuelas fibróticas. A pesar de esto, como desarrollaremos a continuación, sí evidenciamos una serie de alteraciones relacionadas con la fisiopatología de la fibrosis en estos pacientes. Esto es un aspecto relevante a considerar, ya que en el grupo de evolución analizamos el acortamiento telomérico inducido por el SARS-CoV-2 en comparación con la longitud telomérica basal de cada individuo, en lugar de medirla en relación con personas sanas (como fue el caso del grupo completo). Por tanto, más que la presencia o ausencia de un telómero acortado, lo realmente significativo podría ser el grado de desgaste sobre el telómero que el virus ha provocado respecto a los niveles iniciales de cada individuo. Varios estudios sugieren que la tasa de acortamiento telomérico podría ser un biomarcador más efectivo para ciertos desenlaces, como la supervivencia, en comparación con la longitud telomérica en sí. Además, se ha visto que la tasa de acortamiento muchas veces se correlaciona inversamente con la longitud telomérica inicial, lo que significa que individuos con telómeros más largos experimentan un mayor desgaste (126). Tanto la longitud telomérica como la tasa de acortamiento son importantes, pero su relevancia puede depender del resultado del proceso biológico específico que se esté estudiando. La longitud telomérica es un marcador bien establecido del envejecimiento y del riesgo de enfermedad, mientras que la tasa de acortamiento puede aportar información adicional, especialmente en la predicción de la supervivencia y en la comprensión de la dinámica celular. Por consiguiente, en nuestro estudio, el desgaste telomérico provocado por el virus en el transcurso de un año, en comparación con los niveles basales de cada individuo, podría ser un mejor predictor de las secuelas fibróticas desarrolladas en ese mismo periodo. En cambio, el acortamiento telomérico relativo a personas sanas podría estar más vinculado a disfunciones celulares persistentes y un mayor riesgo de complicaciones a largo plazo, lo que resalta la importancia de evaluar ambos parámetros para una comprensión más completa del impacto del SARS-CoV-2 en el envejecimiento celular y la recuperación postinfección.

Nuestros resultados muestran que la infección por SARS-CoV-2 provoca un acortamiento telomérico significativo un año después de la infección, y que este fenómeno podría estar relacionado con la aparición de secuelas a largo plazo. Aunque nuestra cohorte se compone de pacientes con formas graves de la enfermedad, los resultados obtenidos ofrecen una base sólida para plantear futuras investigaciones en poblaciones más amplias y heterogéneas. La realización de investigaciones más

amplias podría tener un impacto considerable, especialmente dado el elevado número de personas afectadas a nivel global y la importancia del acortamiento telomérico, considerado uno de los principales mecanismos moleculares del envejecimiento (43). En este contexto, nuestros hallazgos sugieren que las personas que han sufrido una enfermedad grave por COVID-19, con neumonía bilateral podrían estar en riesgo de presentar un envejecimiento celular prematuro, con todas las consecuencias clínicas y funcionales que ello implica, como una mayor susceptibilidad a enfermedad crónicas (cardiovasculares, metabólicas, neurodegenerativas, entre otras) y la disminución de la capacidad de respuesta inmunitaria (127).

Los estudios de longitud telomérica podrían desempeñar un papel clave en la planificación del seguimiento a largo plazo de los pacientes que han padecido COVID-19, especialmente aquellos con formas graves de la enfermedad. Se ha observado que el acortamiento telomérico identificado en las células alveolares tipo II (ATII) también se refleja en los monocitos, lo cual resulta especialmente relevante. Diversos estudios han demostrado que la longitud telomérica en ambos tipos celulares muestra una fuerte correlación, lo que valida el uso de los monocitos como una fuente fiable para esta medición (80). Esto respalda la utilidad de la sangre periférica como un modelo accesible, reproducible y mínimamente invasivo para evaluar el envejecimiento celular. Esta metodología no solo facilita la monitorización longitudinal en la práctica clínica, sino que también podría integrarse como biomarcador pronóstico para un seguimiento personalizado. En este sentido, nuestro enfoque metodológico representa un buen modelo y es clínicamente aplicable para la evaluación del impacto molecular a largo plazo de la infección por SARS-CoV-2.

En nuestros datos existen unas limitaciones importantes que deben ser tenidas en cuenta. En primer lugar, el tamaño de la muestra es reducido, ya que únicamente se pudo analizar la longitud telomérica al inicio y al año de evolución en un número limitado de pacientes. Además, la cohorte está compuesta exclusivamente por pacientes que tuvieron una forma grave de la enfermedad, con ingreso hospitalario debido a neumonía bilateral. Esto limita la posibilidad de generalizar los resultados a la población general de pacientes con COVID-19, especialmente aquellos con formas leves o moderadas de la infección.

En definitiva, nuestros resultados sugieren que el acortamiento telomérico inducido por el SARS-CoV-2 podría constituir un factor clave en la aparición de secuelas a largo plazo, más allá de la gravedad inicial de la enfermedad o de otros factores de riesgo conocidos. Este hallazgo refuerza la idea de que la COVID-19 no solo desencadena un

proceso inflamatorio agudo, sino que puede dejar una huella molecular duradera que contribuye al envejecimiento celular y a la disfunción tisular. Hemos demostrado que la evaluación de la longitud telomérica a través de métodos accesibles como la medición en sangre periférica es una técnica con gran valor tanto para la investigación como para la práctica clínica. Aunque será necesario validar estos hallazgos en cohortes más amplias y heterogéneas, nuestro estudio ofrece una base robusta con un modelo metodológico reproducible para la caracterización del impacto molecular a largo plazo del SARS-CoV-2.

Análisis de función mitocondrial en leucocitos y su posible correlación con la longitud telomérica y con la fibrosis pulmonar.

Las secuelas más frecuentemente descritas tras la COVID-19 son los cambios fibróticos persistentes (128,129). Sin embargo, hay otras alteraciones producidas a nivel celular que también han sido descritas, como el acortamiento telomérico o el estrés oxidativo (130). Aunque menos descrita, la disfunción mitocondrial también ha sido estudiada, y se hipotetiza que es la causa de los conocidos “síndromes post-COVID-19” (131).

Cuando analizamos las proteínas mitocondriales en las muestras de pacientes tras dos años después de la infección aguda, encontramos alteraciones en varias de ellas comparadas con sujetos sanos. Algunas de estas proteínas están relacionadas con el estrés oxidativo, el cual ha sido ampliamente reconocido como elemento clave en las infecciones virales (132), y específicamente, en la COVID-19 (133). También, en el síndrome post-COVID-19, se han descrito alteraciones en el metabolismo de los ácidos grasos (134), con un incremento de la glucólisis. En nuestro estudio hemos observado un aumento de las concentraciones de proteínas relacionadas con la glucólisis en pacientes comparado con controles. Asimismo, se ha descrito que esta hiperglucólisis conduce a un incremento de producción de citoquinas proinflamatorias y ROS. En consonancia con este mecanismo, en nuestros pacientes también hemos observado un incremento de los metabolitos del NADPH, lo que sugiere una activación del metabolismo oxidativo. Este fenómeno podría estar vinculado al daño mitocondrial indirecto producido por el SARS-CoV-2, el cual se ha relacionado con la interacción del virus con el receptor de la enzima convertidora de angiotensina II (ACE2). Cuando las células se infectan, se produce una disminución de la expresión de este receptor, lo que conlleva la sobreexpresión de la angiotensina II y su unión a los receptores de ACE.

Esta interacción aumenta la actividad de la NADPH oxidasa, causando así un incremento de la producción de ROS (135).

Los niveles de IL-6 han sido cruciales en la fisiopatología de la COVID-19, encontrando niveles más elevados en los pacientes más graves (136), como es el caso de nuestro estudio. La relevancia de los niveles de IL-6 ha sido tal que incluso se han utilizado para decidir o guiar el tipo de tratamiento a seguir (137). Algunos estudios han planteado la hipótesis de que niveles elevados de IL-6 podrían actuar como desencadenantes de una respuesta redox, promoviendo la generación de especies reactivas del oxígeno, lo que a su vez contribuiría a la disfunción mitocondrial (131). Un incorrecto funcionamiento de la mitocondria perpetuaría el estado de estrés oxidativo, favoreciendo un círculo vicioso de inflamación crónica y daño oxidativo sostenido (138).



Figura 14 | Representación de la secuencia patológica en la COVID-19: aumento de reactantes de fase aguda, inducción de estrés oxidativo y daño mitocondrial. La imagen representa la secuencia patológica observada en pacientes COVID-19, en la que se produce una elevación de reactantes de fase aguda, destacando la interleucina-6 (IL-6). Esta respuesta inflamatoria contribuye a un aumento del estrés oxidativo, lo cual favorece el daño mitocondrial, implicando una disfunción celular que puede agravar el estado clínico del paciente

COVID-19: Coronavirus disease 2019; IL6: Interleuquina-6

En estudios post-mortem en pulmones de pacientes fallecidos por la COVID-19 se ha observado un incremento de la respuesta inflamatoria, estrés oxidativo y daño mitocondrial (139–141). En nuestro estudio hemos evidenciado que los pacientes

COVID-19 presentaban niveles elevados de IL-6 durante la hospitalización, promovida por la infección con el SARS-CoV-2, además de alteraciones a largo plazo en proteínas que determinan la correcta función mitocondrial. **(Figura 14)**. Asimismo, detectamos una relación entre la inflamación sistémica en fase aguda, medida por IL-6 y periostina, y la persistencia de la disfunción mitocondrial que persiste a largo plazo después de la infección. Esta transición desde la inflamación aguda hacia un estado de estrés oxidativo crónico podría representar un mecanismo clave en la progresión hacia fibrosis, fenómeno descrito también en enfermedades pulmonares crónicas.

Nuestros hallazgos refuerzan la hipótesis de que la disfunción mitocondrial inducida por el SARS-CoV-2 junto con el acortamiento telomérico constituyen mecanismos clave en la fisiopatología de las secuelas pulmonares a largo plazo, en particular en la aparición de cambios fibróticos persistentes. El daño mitocondrial induce la producción de mitoquinas, que son moléculas de respuesta al estrés celular, cuyas alteraciones se han vinculado a procesos de envejecimiento acelerado (142). En nuestra cohorte, observamos diferencias en los niveles de proteínas mitocondriales, como ETF β y PKM, en pacientes con acortamiento telomérico severo (por encima del percentil 90), y estas mismas proteínas permitieron distinguir entre pacientes con y sin cambios fibróticos radiológicos, lo que sugiere su valor como biomarcadores diferenciales. La fibrosis pulmonar, el acortamiento telomérico y la disfunción mitocondrial se interrelacionan en un ciclo patológico que agrava la progresión de enfermedades pulmonares (143). Se ha descrito que el acortamiento telomérico puede inducir estrés oxidativo y alterar la función mitocondrial, reduciendo la capacidad celular para mantener la homeostasis energética (144). Esta disfunción mitocondrial conlleva una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno, que contribuyen a la inflamación crónica y al daño tisular, perpetuando el ciclo de fibrosis y deterioro pulmonar.

En este contexto, nuestros resultados apuntan a un posible modelo fisiopatológico compartido entre la fibrosis pulmonar post-COVID-19 y la fibrosis pulmonar que se observa en las enfermedades intersticiales como la FPI, ya que ambas entidades comparten factores de riesgo como edad avanzada, sexo masculino y comorbilidades asociadas (145). En nuestro grupo de pacientes observamos una correlación entre niveles bajos de ACO1 (una proteína sensible al estrés oxidativo y reguladora del metabolismo del hierro) y un mayor acortamiento telomérico, lo que coincide con hallazgos descritos en estudios experimentales en los que se ha visto que esta proteína parece tener un rol significativo en la fisiopatología de la FPI (146,147). Esta relación añade peso a la idea de una fisiopatología convergente entre ambas entidades.

Otro hecho relevante fue que la disfunción mitocondrial persiste largo tiempo después del aclaramiento del virus de los tejidos, lo que podría explicar algunos de los síntomas prolongados observados en pacientes con “*Long COVID-19*”. De hecho, la disfunción mitocondrial se reconoce como uno de los posibles mecanismos para el desarrollo de esta condición (148), por lo que entender los metabolitos implicados puede abrir nuevas vías para su diagnóstico y tratamiento. En este sentido, la medición de biomarcadores de disfunción mitocondrial podría desempeñar un papel relevante en la detección precoz y en la monitorización de las secuelas crónicas post- COVID-19, así como en la identificación de pacientes con mayor riesgo de desarrollar “*Long COVID-19*”.

Un aspecto destacable de nuestro estudio es que las alteraciones mitocondriales detectadas a partir de muestras sanguíneas fueron similares a las descritas en estudios realizados en células obtenidas directamente de biopsias pulmonares, lo que valida el uso de sangre periférica como herramienta accesible y menos invasiva para el estudio de estas alteraciones en la práctica clínica.

Biomarcadores de inflamación y fibrosis pulmonar y su correlación con la longitud telomérica y las secuelas pulmonares

La fibrosis pulmonar es una condición crónica caracterizada por la disfunción de mecanismos de reparación tisular, que producen un depósito excesivo de matriz extracelular con pérdida progresiva de la función pulmonar. Es el desenlace final de muchas enfermedades con etiologías distintas, como son las enfermedades intersticiales, dentro de las que están la FPI, las secundarias a enfermedades autoinmunes o a tóxicos pulmonares, etc. La predicción temprana de la fibrosis antes de la aparición de manifestaciones clínicas evidentes sigue siendo un desafío. Actualmente, la investigación se centra en la identificación de biomarcadores moleculares que reflejan etapas subclínicas del proceso fibrótico, entre los que se incluyen algunas citoquinas, proteasas de matriz extracelular y factores de crecimiento.

En este contexto, en nuestro estudio analizamos en sangre periférica biomarcadores de fibrogénesis descritos en la fibrosis pulmonar, sobre todo en FPI, y analizamos su relación con las secuelas funcionales y radiológicas a los 12 meses de la neumonía bilateral COVID-19.

Encontramos diferencias entre grupos de severidad a los 2 meses en los niveles de periostina y MMP-7. Sin embargo, solo la periostina a los 2 meses fue capaz de predecir

la presencia de secuelas fibróticas y funcionales (alteración de la DLCO) a los 12 meses. La periostina es una proteína de matriz extracelular que ejerce su función uniéndose a moléculas de integrina en la superficie de las células diana (149). Por tanto, es una proteína esencial para la cicatrización de heridas, estabilizando el entrecruzamiento de colágeno (150), y la mediación en la remodelación del tejido (151). La medición de los niveles basales de periostina en pacientes con FPI se ha propuesto como un buen biomarcador de progresión de enfermedad, porque hay un aumento de sus concentraciones en plasma en pacientes con una FPI progresiva, lo que refleja la presencia de áreas de fibrosis activas en los pulmonares (84,87). Como en la FPI, el SARS-CoV-2 induce un daño directo sobre el epitelio alveolar, produciendo una liberación de mediadores de inflamación y disrupción de la membrana basal a través de la MMP, para permitir el acceso de células inflamatorias al foco de la herida (121).

Algunos estudios han encontrado concentraciones elevadas de periostina en los pulmones y la sangre de pacientes con COVID-19 severo. En una muestra pequeña de pacientes con COVID-19 severo, Zeng *et al.* (152) demostraron aumento de factores extracelulares en el lavado broncoalveolar (incluyendo la periostina), en comparación con pacientes con COVID-19 no severo. Otro estudio demostró que las concentraciones de periostina en sangre obtenidas al ingreso fueron significativamente elevadas en pacientes con COVID-19 comparadas con gente sana y que las concentraciones de periostina persistían elevadas al mes del ingreso, en pacientes con COVID-19 severo (153).

En cuanto a su papel como biomarcador de secuelas pulmonares, nuestros resultados demuestran una asociación significativa entre las concentraciones de periostina medidas a los 2 meses post-infección y la presencia de secuelas fibróticas detectadas en la TCAR, así como con alteraciones persistentes en la DLCO observadas a los 12 meses. Este hallazgo posiciona a la periostina como un potencial predictor temprano de daño pulmonar a largo plazo tras la infección por SARS-CoV-2.

Actualmente no hay datos sobre la evolución de la periostina y otros biomarcadores tras un año de infección por el SARS-CoV-2. Nuestra hipótesis es que los cambios en los valores de periostina son debidos a la relación temporal con el daño tisular agudo causado por el virus. Aunque las concentraciones de periostina permanezcan elevadas en el grupo severo a los 2 meses de la enfermedad, la infección aguda ha resuelto por completo al año, y los valores de periostina del grupo 2 de severidad, se reducen a más del 50%, equiparándose con las del grupo de menos severidad. Sin embargo, el daño

tisular ya se ha establecido, por lo que las lesiones fibróticas resultantes permanecerán visibles, a pesar de la normalización de biomarcador.

Durante el seguimiento de nuestra cohorte, detectamos que un 25% de los pacientes desarrollaron cambios fibróticos tras la COVID-19. No obstante, estas secuelas permanecieron estables durante el periodo de seguimiento del estudio, sin presentar evidencia de cumplir criterios de enfermedad fibrótica progresiva, por el momento. Debido al horizonte temporal del estudio, no conocemos cuál será la evolución de estas alteraciones a largo plazo. Ignoramos si estos cambios fibróticos podrían desencadenar una fibrosis pulmonar progresiva verdadera. Biomarcadores como la periostina podrían hipotéticamente guiarnos sobre qué pacientes seguir a largo plazo, ya que unos niveles elevados han demostrado estar relacionada con la persistencia de secuelas fibróticas a los 12 meses.

En conclusión, algunos biomarcadores, obtenidos a los 2 meses del alta hospitalaria, están relacionados con la severidad de la COVID-19; sin embargo, solo los niveles de periostina a los 2 meses podrían predecir de manera temprana la presencia de secuelas pulmonares radiológicas y funcionales a los 12 meses.

Con nuestros resultados hemos evidenciado que la infección por SARS-CoV-2 produce un acortamiento telomérico independiente de la edad, un efecto que persiste al menos un año tras la fase aguda, y que podría contribuir al envejecimiento acelerado. Adicionalmente, hemos encontrado una correlación entre la presencia de secuelas fibróticas al año de la infección y el acortamiento telomérico de los pacientes respecto a su longitud inicial. Asimismo, identificamos la periostina y la IL-6 como biomarcadores clave en la fase aguda de la infección, que nos sirven como predictores de secuelas fibróticas a largo plazo y posiblemente relacionadas con mecanismos inflamatorios compartidos en las enfermedades intersticiales. Además, observamos que estos marcadores de fase aguda también se asocian con una disfunción mitocondrial prolongada, lo cual, a su vez, se relaciona con el acortamiento telomérico y las secuelas fibróticas. Todos estos hallazgos refuerzan la necesidad de definir mejor el “*long-COVID-19*” y sugieren el potencial de biomarcadores no invasivos, como los obtenidos en nuestro estudio en sangre periférica, abriendo nuevas posibilidades diagnósticas y pronósticas para el manejo de las secuelas post-COVID-19 con potencial uso en otras patologías pulmonares con mecanismos fisiopatológicos similares.

CONCLUSIONES FINALES

1. La infección por SARS-CoV-2 induce un acortamiento telomérico, en los leucocitos de sangre periférica, independientemente de la edad. Este efecto persiste al menos un año tras la infección, y sugiere un impacto duradero a nivel celular, con posibles implicaciones en el envejecimiento acelerado y la vulnerabilidad a enfermedades crónicas.
2. El acortamiento sostenido de la longitud de los telómeros por el SARS-CoV-2, incluso un año después de la infección, se asocia directamente con la presencia de secuelas pulmonares de carácter fibrótico. Por tanto, el mantenimiento de la integridad telomérica podría desempeñar un papel protector frente al desarrollo de fibrosis pulmonar en el contexto post-COVID-19.
3. La periostina ha demostrado ser un predictor temprano de daño pulmonar a largo plazo tras la infección por SARS-CoV-2. Su identificación precoz facilitaría estrategias preventivas o terapéuticas dirigidas a minimizar el daño pulmonar residual. Dado que la periostina también está implicada en la patogénesis de la FPI y otras enfermedades intersticiales, su papel en la COVID-19 indicaría un mecanismo inflamatorio y profibrótico compartido.
4. Se ha evidenciado una relación entre los marcadores de fase aguda (periostina e IL-6) y una disfunción mitocondrial persistente, lo que sugiere una alteración prolongada del metabolismo celular tras la infección por SARS-CoV-2.
5. Existe una correlación inversa entre los niveles de aconitasa ACO1 y la longitud telomérica en pacientes con fibrosis. Esto refuerza la existencia de un eje patogénico común entre la disfunción mitocondrial, el acortamiento telomérico y el desarrollo de secuelas fibróticas. Así, la desregulación mitocondrial sería un factor determinante en la progresión del daño pulmonar crónico post-COVID.

BIBLIOGRAFÍA

1. Johns Hopkins Coronavirus Resource Center [Internet]. [citado 26 de octubre de 2022]. COVID-19 Map. Disponible en: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>
2. Hui DS, Wong KT, Ko FW, Tam LS, Chan DP, Woo J, et al. The 1-year impact of severe acute respiratory syndrome on pulmonary function, exercise capacity, and quality of life in a cohort of survivors. *Chest*. octubre de 2005;128(4):2247-61.
3. Hui DS, Joynt GM, Wong KT, Gomersall CD, Li TS, Antonio G, et al. Impact of severe acute respiratory syndrome (SARS) on pulmonary function, functional capacity and quality of life in a cohort of survivors. *Thorax*. mayo de 2005;60(5):401-9.
4. Sonnweber T, Sahanic S, Pizzini A, Luger A, Schwabl C, Sonnweber B, et al. Cardiopulmonary recovery after COVID-19: an observational prospective multicentre trial. *Eur Respir J*. abril de 2021;57(4):2003481.
5. Guler SA, Ebner L, Aubry-Beigelman C, Bridevaux PO, Brutsche M, Clarenbach C, et al. Pulmonary function and radiological features 4 months after COVID-19: first results from the national prospective observational Swiss COVID-19 lung study. *Eur Respir J*. abril de 2021;57(4):2003690.
6. Águila-Gordo D, Martínez-Del Río J, Mazoterías-Muñoz V, Negreira-Caamaño M, Nieto-Sandoval Martín de la Sierra P, Piqueras-Flores J. [Mortality and associated prognostic factors in elderly and very elderly hospitalized patients with respiratory disease COVID-19]. *Rev Espanola Geriatr Gerontol*. octubre de 2021;56(5):259-67.
7. Froidure A, Mahieu M, Hoton D, Laterre PF, Yombi JC, Koenig S, et al. Short telomeres increase the risk of severe COVID-19. *Aging*. 26 de octubre de 2020;12(20):19911-22.
8. Sanchez-Vazquez R, Guío-Carrión A, Zapatero-Gaviria A, Martínez P, Blasco MA. Shorter telomere lengths in patients with severe COVID-19 disease. *Aging*. 11 de enero de 2021;13(1):1-15.
9. Dressen A, Abbas AR, Cabanski C, Reeder J, Ramalingam TR, Neighbors M, et al. Analysis of protein-altering variants in telomerase genes and their association with MUC5B common variant status in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: a candidate gene sequencing study. *Lancet Respir Med*. agosto de 2018;6(8):603-14.
10. Alder JK, Chen JJL, Lancaster L, Danoff S, Su S chih, Cogan JD, et al. Short telomeres are a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2 de septiembre de 2008;105(35):13051-6.

11. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*. 31 de mayo de 1990;345(6274):458-60.
12. Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature*. 30 de agosto de 1990;346(6287):866-8.
13. Lee JS, McLaughlin S, Collard HR. Comprehensive care of the patient with idiopathic pulmonary fibrosis. *Curr Opin Pulm Med*. septiembre de 2011;17(5):348-54.
14. Wagner CL, Hanumanthu VS, Talbot CC, Abraham RS, Hamm D, Gable DL, et al. Short telomere syndromes cause a primary T cell immunodeficiency. *J Clin Invest*. 128(12):5222-34.
15. Alder JK, Armanios M. Telomere-mediated lung disease. *Physiol Rev*. octubre de 2022;102(4):1703-20.
16. Stuart BD, Choi J, Zaidi S, Xing C, Holohan B, Chen R, et al. Exome sequencing links mutations in PARN and RTEL1 with familial pulmonary fibrosis and telomere shortening. *Nat Genet*. mayo de 2015;47(5):512-7.
17. Cronkhite JT, Xing C, Raghu G, Chin KM, Torres F, Rosenblatt RL, et al. Telomere shortening in familial and sporadic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 de octubre de 2008;178(7):729-37.
18. Snetselaar R, van Moorsel CHM, Kazemier KM, van der Vis JJ, Zanen P, van Oosterhout MFM, et al. Telomere length in interstitial lung diseases. *Chest*. octubre de 2015;148(4):1011-8.
19. McDonough JE, Martens DS, Tanabe N, Ahangari F, Verleden SE, Maes K, et al. A role for telomere length and chromosomal damage in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res*. 9 de julio de 2018;19(1):132.
20. Martínez P, Blasco MA. Telomere-driven diseases and telomere-targeting therapies. *J Cell Biol*. 3 de abril de 2017;216(4):875-87.
21. Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell*. diciembre de 1985;43(2 Pt 1):405-13.
22. Giardini MA, Segatto M, da Silva MS, Nunes VS, Cano MIN. Telomere and telomerase biology. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2014;125:1-40.

23. Palm W, de Lange T. How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet.* 2008;42:301-34.
24. Marion RM, Strati K, Li H, Tejera A, Schoeftner S, Ortega S, et al. Telomeres acquire embryonic stem cell characteristics in induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 6 de febrero de 2009;4(2):141-54.
25. d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, et al. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature.* 13 de noviembre de 2003;426(6963):194-8.
26. Hemann MT, Strong MA, Hao LY, Greider CW. The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell.* 5 de octubre de 2001;107(1):67-77.
27. Heiss NS, Knight SW, Vulliamy TJ, Klauck SM, Wiemann S, Mason PJ, et al. X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions. *Nat Genet.* mayo de 1998;19(1):32-8.
28. Mulet A, Signes-Costa J. Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Telomeres. *J Clin Med.* enero de 2022;11(23):6893.
29. Revy P, Kannengiesser C, Bertuch AA. Genetics of human telomere biology disorders. *Nat Rev Genet.* febrero de 2023;24(2):86-108.
30. Hathcock KS, Jeffrey Chiang Y, Hodes RJ. In vivo regulation of telomerase activity and telomere length. *Immunol Rev.* junio de 2005;205:104-13.
31. Bellon M, Nicot C. Telomere Dynamics in Immune Senescence and Exhaustion Triggered by Chronic Viral Infection. *Viruses.* 5 de octubre de 2017;9(10):289.
32. Lichterfeld M, Mou D, Cung TDH, Williams KL, Waring MT, Huang J, et al. Telomerase activity of HIV-1-specific CD8⁺ T cells: constitutive up-regulation in controllers and selective increase by blockade of PD ligand 1 in progressors. *Blood.* 1 de noviembre de 2008;112(9):3679-87.
33. Tedone E, Huang E, O'Hara R, Batten K, Ludlow AT, Lai TP, et al. Telomere length and telomerase activity in T cells are biomarkers of high-performing centenarians. *Aging Cell.* febrero de 2019;18(1):e12859.
34. de Punder K, Heim C, Wadhwa PD, Entringer S. Stress and immunosenescence: the role of telomerase. *Psychoneuroendocrinology.* marzo de 2019;101:87-100.

35. Saretzki G. Telomerase, mitochondria and oxidative stress. *Exp Gerontol.* agosto de 2009;44(8):485-92.
36. Wallace DC. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet.* 2005;39:359-407.
37. Zheng Q, Huang J, Wang G. Mitochondria, Telomeres and Telomerase Subunits. *Front Cell Dev Biol.* 6 de noviembre de 2019;7:274.
38. Gao X, Yu X, Zhang C, Wang Y, Sun Y, Sun H, et al. Telomeres and Mitochondrial Metabolism: Implications for Cellular Senescence and Age-related Diseases. *Stem Cell Rev Rep.* 2022;18(7):2315-27.
39. Alder JK, Armanios M. Telomere-mediated lung disease. *Physiol Rev.* 1 de octubre de 2022;102(4):1703-20.
40. Strong MA, Vidal-Cardenas SL, Karim B, Yu H, Guo N, Greider CW. Phenotypes in *mTERT*^{-/-} and *mTERT*^{-/-} mice are due to short telomeres, not telomere-independent functions of telomerase reverse transcriptase. *Mol Cell Biol.* junio de 2011;31(12):2369-79.
41. Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs | Nature [Internet]. [citado 22 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/33345>
42. Calado RT, Young NS. Telomere diseases. *N Engl J Med.* 10 de diciembre de 2009;361(24):2353-65.
43. Njajou OT, Cawthon RM, Damcott CM, Wu SH, Ott S, Garant MJ, et al. Telomere length is paternally inherited and is associated with parental lifespan. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 17 de julio de 2007;104(29):12135-9.
44. Martinez-Delgado B, Yanowsky K, Inglada-Perez L, Domingo S, Urioste M, Osorio A, et al. Genetic Anticipation Is Associated with Telomere Shortening in Hereditary Breast Cancer. *PLoS Genet.* 28 de julio de 2011;7(7):e1002182.
45. Huda N, Tanaka H, Herbert BS, Reed T, Gilley D. Shared environmental factors associated with telomere length maintenance in elderly male twins. *Aging Cell.* octubre de 2007;6(5):709-13.

46. Es E, Eh B, J L, Fs D, Ne A, Jd M, et al. Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 12 de julio de 2004 [citado 22 de noviembre de 2022];101(49). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15574496/>
47. Woo J, Suen EWC, Leung JCS, Tang NLS, Ebrahim S. Older men with higher self-rated socioeconomic status have shorter telomeres. *Age Ageing*. septiembre de 2009;38(5):553-8.
48. Dm T, B D, D L, A B, B W, C C, et al. Danazol Treatment for Telomere Diseases. *N Engl J Med* [Internet]. 19 de mayo de 2016 [citado 22 de noviembre de 2022];374(20). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27192671/>
49. Poljšak B, Fink R. The protective role of antioxidants in the defence against ROS/RNS-mediated environmental pollution. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:671539.
50. Glass DS, Grossfeld D, Renna HA, Agarwala P, Spiegler P, Kasselmann LJ, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: Molecular mechanisms and potential treatment approaches. *Respir Investig*. septiembre de 2020;58(5):320-35.
51. Navaratnam V, Fleming KM, West J, Smith CJP, Jenkins RG, Fogarty A, et al. The rising incidence of idiopathic pulmonary fibrosis in the U.K. *Thorax*. junio de 2011;66(6):462-7.
52. Lederer DJ, Martinez FJ. Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *N Engl J Med*. 10 de mayo de 2018;378(19):1811-23.
53. Hutchinson J, Fogarty A, Hubbard R, McKeever T. Global incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis: a systematic review. *Eur Respir J*. septiembre de 2015;46(3):795-806.
54. Martinez FJ, Collard HR, Pardo A, Raghu G, Richeldi L, Selman M, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Nat Rev Dis Primer*. 20 de octubre de 2017;3:17074.
55. Raghu G, Chen SY, Yeh WS, Maroni B, Li Q, Lee YC, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis in US Medicare beneficiaries aged 65 years and older: incidence, prevalence, and survival, 2001-11. *Lancet Respir Med*. julio de 2014;2(7):566-72.
56. Oh CK, Murray LA, Molfino NA. Smoking and idiopathic pulmonary fibrosis. *Pulm Med*. 2012;2012:808260.

57. Nett RJ, Cummings KJ, Cannon B, Cox-Ganser J, Nathan SD. Dental Personnel Treated for Idiopathic Pulmonary Fibrosis at a Tertiary Care Center - Virginia, 2000-2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 9 de marzo de 2018;67(9):270-3.
58. Baumgartner KB, Samet JM, Coultas DB, Stidley CA, Hunt WC, Colby TV, et al. Occupational and environmental risk factors for idiopathic pulmonary fibrosis: a multicenter case-control study. Collaborating Centers. *Am J Epidemiol.* 15 de agosto de 2000;152(4):307-15.
59. Lin Y, Xu Z. Fibroblast Senescence in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:593283.
60. Hutchinson JP, McKeever TM, Fogarty AW, Navaratnam V, Hubbard RB. Increasing global mortality from idiopathic pulmonary fibrosis in the twenty-first century. *Ann Am Thorac Soc.* octubre de 2014;11(8):1176-85.
61. Esposito DB, Lanes S, Donneyong M, Holick CN, Lasky JA, Lederer D, et al. Idiopathic Pulmonary Fibrosis in United States Automated Claims. Incidence, Prevalence, and Algorithm Validation. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 de noviembre de 2015;192(10):1200-7.
62. García-Sancho C, Buendía-Roldán I, Fernández-Plata MR, Navarro C, Pérez-Padilla R, Vargas MH, et al. Familial pulmonary fibrosis is the strongest risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med.* diciembre de 2011;105(12):1902-7.
63. Diaz de Leon A, Cronkhite JT, Katzenstein ALA, Godwin JD, Raghu G, Glazer CS, et al. Telomere lengths, pulmonary fibrosis and telomerase (TERT) mutations. *PloS One.* 19 de mayo de 2010;5(5):e10680.
64. Andrews NP, Fujii H, Goronzy JJ, Weyand CM. Telomeres and Immunological Diseases of Aging. *Gerontology.* junio de 2010;56(4):390-403.
65. Valdes AM, Andrew T, Gardner JP, Kimura M, Oelsner E, Cherkas LF, et al. Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *Lancet Lond Engl.* 20 de agosto de 2005;366(9486):662-4.
66. Tsakiri KD, Cronkhite JT, Kuan PJ, Xing C, Raghu G, Weissler JC, et al. Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1 de mayo de 2007;104(18):7552-7.

67. Jenkins G. Demystifying pulmonary fibrosis. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 1 de septiembre de 2020;319(3):L554-9.
68. Zhang K, Xu L, Cong YS. Telomere Dysfunction in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:739810. Published 2021 Nov 11. doi:10.3389/fmed.2021.739810
69. Bilgili H, Białas AJ, Górski P, Piotrowski WJ. Telomere Abnormalities in the Pathobiology of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *J Clin Med*. 2019;8(8):1232. Published 2019 Aug 16. doi:10.3390/jcm8081232
70. Velagacherla V, Mehta CH, Nayak Y, Nayak UY. Molecular pathways and role of epigenetics in the idiopathic pulmonary fibrosis. *Life Sci*. 15 de febrero de 2022;291:120283.
71. Zhang D, Newton CA. Familial Pulmonary Fibrosis: Genetic Features and Clinical Implications. *Chest*. noviembre de 2021;160(5):1764-73.
72. Fernandez BA, Fox G, Bhatia R, Sala E, Noble B, Denic N, et al. A Newfoundland cohort of familial and sporadic idiopathic pulmonary fibrosis patients: clinical and genetic features. *Respir Res*. 1 de agosto de 2012;13(1):64.
73. Lee HL, Ryu JH, Wittmer MH, Hartman TE, Lymp JF, Tazelaar HD, et al. Familial idiopathic pulmonary fibrosis: clinical features and outcome. *Chest*. junio de 2005;127(6):2034-41.
74. van Moorsel CHM, van Oosterhout MFM, Barlo NP, de Jong PA, van der Vis JJ, Ruven HJT, et al. Surfactant protein C mutations are the basis of a significant portion of adult familial pulmonary fibrosis in a dutch cohort. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 de diciembre de 2010;182(11):1419-25.
75. Hunninghake GM, Quesada-Arias LD, Carmichael NE, Martinez Manzano JM, Poli De Frías S, Baumgartner MA, et al. Interstitial Lung Disease in Relatives of Patients with Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 de mayo de 2020;201(10):1240-8.
76. Newton CA, Zhang D, Oldham JM, Kozlitina J, Ma SF, Martinez FJ, et al. Telomere Length and Use of Immunosuppressive Medications in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 de agosto de 2019;200(3):336-47.

77. Newton CA, Kozlitina J, Lines JR, Kaza V, Torres F, Garcia CK. Telomere length in patients with pulmonary fibrosis associated with chronic lung allograft dysfunction and post-lung transplantation survival. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. agosto de 2017;36(8):845-53.
78. Lanna A, Vaz B, D'Ambra C, Valvo S, Vuotto C, Chiurchiù V, et al. An intercellular transfer of telomeres rescues T cells from senescence and promotes long-term immunological memory. *Nat Cell Biol*. octubre de 2022;24(10):1461-74.
79. Stuart BD, Lee JS, Kozlitina J, Noth I, Devine MS, Glazer CS, et al. Effect of telomere length on survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: an observational cohort study with independent validation. *Lancet Respir Med*. julio de 2014;2(7):557-65.
80. Planas-Cerezales L, Arias-Salgado EG, Buendia-Roldán I, Montes-Worboys A, López CE, Vicens-Zygmunt V, et al. Predictive factors and prognostic effect of telomere shortening in pulmonary fibrosis. *Respirol Carlton Vic*. febrero de 2019;24(2):146-53.
81. Cohen S, Janicki-Deverts D, Turner RB, Casselbrant ML, Li-Korotky HS, Epel ES, et al. Association between telomere length and experimentally induced upper respiratory viral infection in healthy adults. *JAMA*. 20 de febrero de 2013;309(7):699-705.
82. Sauleda J, Núñez B, Sala E, Soriano JB. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Epidemiology, Natural History, Phenotypes. *Med Sci*. 29 de noviembre de 2018;6(4):110.
83. Juge PA, Lee JS, Ebstein E, Furukawa H, Dobrinskikh E, Gazal S, et al. MUC5B Promoter Variant and Rheumatoid Arthritis with Interstitial Lung Disease. *N Engl J Med*. 6 de diciembre de 2018;379(23):2209-19.
84. Okamoto T, Dobrinskikh E, Hennessy CE, Liu N, Schwarz MI, Evans CM, et al. Muc5b plays a role in the development of inflammation and fibrosis in hypersensitivity pneumonitis induced by *Saccharopolyspora rectivirgula*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 1 de septiembre de 2022;323(3):L329-37.
85. Inoue Y, Kaner RJ, Guiot J, Maher TM, Tomassetti S, Moiseev S, et al. Diagnostic and Prognostic Biomarkers for Chronic Fibrosing Interstitial Lung Diseases With a Progressive Phenotype. *Chest*. agosto de 2020;158(2):646-59.

86. Clynick B, Corte TJ, Jo HE, Stewart I, Glaspole IN, Grainge C, et al. Biomarker signatures for progressive idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*. marzo de 2022;59(3):2101181.
87. Uchida M, Shiraishi H, Ohta S, et al. Periostin, a matricellular protein, plays a role in the induction of chemokines in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012;46(5):677-686. doi:10.1165/rcmb.2011-0115OC
88. Tomaru A, Kobayashi T, Hinneh JA, et al. Oligonucleotide-targeting periostin ameliorates pulmonary fibrosis. *Gene Ther*. 2017;24(11):706-716. doi:10.1038/gt.2017.80
89. Jz G, T M, M S, J O, Y H, T S, et al. An analysis of telomere length in sarcoidosis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci [Internet]*. noviembre de 2007 [citado 23 de enero de 2023];62(11). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18000138/>
90. Huang WJ, Tang XX. Virus infection induced pulmonary fibrosis. *J Transl Med*. 7 de diciembre de 2021;19:496.
91. Ackermann M, Verleden SE, Kuehnel M, et al. Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19. *N Engl J Med*. 2020;383(2):120-128. doi:10.1056/NEJMoa2015432
92. Kramer D, Hilton R, Roman J. Pulmonary fibrosis and COVID-19. *Am J Med Sci*. 23;366(4):245-253. doi:10.1016/j.amjms.2023.07.006
93. Polak SB, Van Gool IC, Cohen D, von der Thüsen JH, van Paassen J. A systematic review of pathological findings in COVID-19: a pathophysiological timeline and possible mechanisms of disease progression. *Mod Pathol*. 2020;33(11):2128-2138. doi:10.1038/s41379-020-0603-3
94. Vianello A, Guarnieri G, Braccioni F, Lococo S, Molena B, Cecchetto A, et al. The pathogenesis, epidemiology and biomarkers of susceptibility of pulmonary fibrosis in COVID-19 survivors. *Clin Chem Lab Med*. 23 de febrero de 2022;60(3):307-16.
95. Zhou X, Yang D, Kong X, Wei C, LvQiu S, Wang L, et al. Case Report: Pirfenidone in the Treatment of Post-COVID-19 Pulmonary Fibrosis. *Front Med*. 2022;9:925703.

96. Saiphoklang N, Patanayindee P, Ruchiwit P. *The Effect of Nintedanib in Post-COVID-19 Lung Fibrosis: An Observational Study*. *Crit Care Res Pract*. 26 de septiembre de 2022;2022:9972846.
97. Joglekar MV, Satoor SN, Wong WKM, Cheng F, Ma RCW, Hardikar AA. *An Optimised Step-by-Step Protocol for Measuring Relative Telomere Length*. *Methods Protoc*. 3 de abril de 2020;3(2):27.
98. Wong HYF, Lam HYS, Fong AHT, Leung ST, Chin TWY, Lo CSY, et al. *Frequency and Distribution of Chest Radiographic Findings in Patients Positive for COVID-19*. *Radiology*. agosto de 2020;296(2):E72-8.
99. Hansell DM, Bankier AA, MacMahon H, McLoud TC, Müller NL, Remy J. *Fleischner Society: glossary of terms for thoracic imaging*. *Radiology*. marzo de 2008;246(3):697-722.
100. Antonio GE, Wong KT, Hui DSC, Wu A, Lee N, Yuen EHY, et al. *Thin-section CT in patients with severe acute respiratory syndrome following hospital discharge: preliminary experience*. *Radiology*. septiembre de 2003;228(3):810-5.
101. Travis WD, Costabel U, Hansell DM, King TE, Lynch DA, Nicholson AG, et al. *An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias*. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 de septiembre de 2013;188(6):733-48.
102. 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*. enero de 2017;49(1):1600016.
103. Quanjer PH, Stanojevic S, Cole TJ, Baur X, Hall GL, Culver BH, et al. *Multi-ethnic reference values for spirometry for the 3-95-yr age range: the global lung function 2012 equations*. *Eur Respir J*. diciembre de 2012;40(6):1324-43.
104. Stanojevic S, Graham BL, Cooper BG, Thompson BR, Carter KW, Francis RW, et al. *Official ERS technical standards: Global Lung Function Initiative reference values for the carbon monoxide transfer factor for Caucasians*. *Eur Respir J*. septiembre de 2017;50(3):1700010.
105. STROBE [Internet]. [citado 19 de agosto de 2024]. STROBE. Disponible en: <https://www.strobe-statement.org/>

106. Turner KJ, Vasu V, Griffin DK. *Telomere Biology and Human Phenotype*. *Cells*. 2019;8(1):73. Published 2019 Jan 19. doi:10.3390/cells8010073
107. Lee MG, Lee YH. A meta-analysis examining the association between the *MUC5B* rs35705950 T/G polymorphism and susceptibility to idiopathic pulmonary fibrosis. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc Al*. junio de 2015;64(6):463-70.
108. Maremanda KP, Sundar IK, Li D, Rahman I. Age-Dependent Assessment of Genes Involved in Cellular Senescence, Telomere, and Mitochondrial Pathways in Human Lung Tissue of Smokers, COPD, and IPF: Associations With SARS-CoV-2 COVID-19 ACE2-TMPRSS2-Furin-DPP4 Axis. *Front Pharmacol*. 2020;11:584637.
109. Bueno M, Calyeca J, Rojas M, Mora AL. Mitochondria dysfunction and metabolic reprogramming as drivers of idiopathic pulmonary fibrosis. *Redox Biol*. junio de 2020;33:101509.
110. O'Dwyer DN, Moore BB. The role of periostin in lung fibrosis and airway remodeling. *Cell Mol Life Sci CMLS*. diciembre de 2017;74(23):4305-14.
111. Liu ZY, Lin LC, Liu ZY, Song K, Tu B, Sun H, et al. N6-Methyladenosine-mediated phase separation suppresses NOTCH1 expression and promotes mitochondrial fission in diabetic cardiac fibrosis. *Cardiovasc Diabetol*. 28 de septiembre de 2024;23(1):347.
112. Jones SA, Jenkins BJ. Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer. *Nat Rev Immunol*. diciembre de 2018;18(12):773-89.
113. Huang WC, Chuang CF, Huang YT, Chung IC, Chen ML, Chuang TY, et al. Monoclonal enolase-1 blocking antibody ameliorates pulmonary inflammation and fibrosis. *Respir Res*. 14 de noviembre de 2023;24(1):280.
114. Macchione F, Salviati L, Bordugo A, Vincenzi M, Camilot M, Teofoli F, et al. Multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency in elderly carriers. *J Neurol*. mayo de 2020;267(5):1414-9.
115. Wang J, Zhu W, Han J, Yang X, Zhou R, Lu H, et al. The role of the HIF-1 α /ALYREF/PKM2 axis in glycolysis and tumorigenesis of bladder cancer. *Cancer Commun*. 15 de mayo de 2021;41(7):560-75.

116. Feng J, Li J, Wu L, Yu Q, Ji J, Wu J, et al. Emerging roles and the regulation of aerobic glycolysis in hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res CR*. 6 de julio de 2020;39(1):126.
117. Yang W, Zheng Y, Xia Y, Ji H, Chen X, Guo F, et al. ERK1/2-dependent phosphorylation and nuclear translocation of PKM2 promotes the Warburg effect. *Nat Cell Biol*. diciembre de 2012;14(12):1295-304.
118. Wu Y, Tang L, Huang H, Yu Q, Hu B, Wang G, et al. Phosphoglycerate dehydrogenase activates PKM2 to phosphorylate histone H3T11 and attenuate cellular senescence. *Nat Commun*. 10 de marzo de 2023;14:1323.
119. Becerra-Muñoz VM, Núñez-Gil IJ, Eid CM, García Aguado M, Romero R, Huang J, et al. Clinical profile and predictors of in-hospital mortality among older patients hospitalised for COVID-19. *Age Ageing*. 26 de febrero de 2021;50(2):326-34.
120. Ruaro B, Salton F, Braga L, Wade B, Confalonieri P, Volpe MC, et al. The History and Mystery of Alveolar Epithelial Type II Cells: Focus on Their Physiologic and Pathologic Role in Lung. *Int J Mol Sci*. 4 de marzo de 2021;22(5):2566.
121. Safont B, Tarraso J, Rodriguez-Borja E, Fernández-Fabrellas E, Sancho-Chust JN, Molina V, et al. Lung Function, Radiological Findings and Biomarkers of Fibrogenesis in a Cohort of COVID-19 Patients Six Months After Hospital Discharge. *Arch Bronconeumol*. febrero de 2022;58(2):142-9.
122. Luppi F, Kalluri M, Faverio P, Kreuter M, Ferrara G. Idiopathic pulmonary fibrosis beyond the lung: understanding disease mechanisms to improve diagnosis and management. *Respir Res*. 17 de abril de 2021;22(1):109.
123. Duckworth A, Gibbons MA, Allen RJ, Almond H, Beaumont RN, Wood AR, et al. Telomere length and risk of idiopathic pulmonary fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease: a mendelian randomisation study. *Lancet Respir Med*. marzo de 2021;9(3):285-94.
124. Courtwright AM, El-Chemaly S. Telomeres in Interstitial Lung Disease: The Short and the Long of It. *Ann Am Thorac Soc*. febrero de 2019;16(2):175-81.
125. John AE, Joseph C, Jenkins G, Tatler AL. COVID-19 and pulmonary fibrosis: A potential role for lung epithelial cells and fibroblasts. *Immunol Rev*. julio de 2021;302(1):228-40.

126. Nordfjäll K, Svenson U, Norrback KF, Adolfsson R, Lenner P, Roos G. The individual blood cell telomere attrition rate is telomere length dependent. *PLoS Genet.* 2009;5(2):e1000375. doi:10.1371/journal.pgen.1000375
127. Ferrucci L, Fabbri E. Inflammageing: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. *Nat Rev Cardiol.* 2018;15(9):505-522. doi:10.1038/s41569-018-0064-2
128. Han X, Fan Y, Alwalid O, Li N, Jia X, Yuan M, et al. Six-month Follow-up Chest CT Findings after Severe COVID-19 Pneumonia. *Radiology.* abril de 2021;299(1):E177-86.
129. Tarraso J, Safont B, Carbonell-Asins JA, Fernandez-Fabrellas E, Sancho-Chust JN, Naval E, et al. Lung function and radiological findings 1 year after COVID-19: a prospective follow-up. *Respir Res.* 12 de septiembre de 2022;23(1):242.
130. Mongelli A, Barbi V, Gottardi Zamperla M, Atlante S, Forleo L, Nesta M, et al. Evidence for Biological Age Acceleration and Telomere Shortening in COVID-19 Survivors. *Int J Mol Sci.* 7 de junio de 2021;22(11):6151.
131. Georgieva E, Ananiev J, Yovchev Y, Arabadzhiev G, Abrashev H, Abrasheva D, et al. COVID-19 Complications: Oxidative Stress, Inflammation, and Mitochondrial and Endothelial Dysfunction. *Int J Mol Sci.* 4 de octubre de 2023;24(19):14876.
132. Santus P, Danzo F, Zuffi A, Pini S, Saad M, Visconti A, et al. Oxidative stress and viral Infections: rationale, experiences, and perspectives on N-acetylcysteine. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* noviembre de 2022;26(22):8582-90.
133. Chernyak BV, Popova EN, Prikhodko AS, Grebenchikov OA, Zinovkina LA, Zinovkin RA. COVID-19 and Oxidative Stress. *Biochem Biokhimiia.* diciembre de 2020;85(12):1543-53.
134. Ajaz S, McPhail MJ, Singh KK, Mujib S, Trovato FM, Napoli S, et al. Mitochondrial metabolic manipulation by SARS-CoV-2 in peripheral blood mononuclear cells of patients with COVID-19. *Am J Physiol - Cell Physiol.* 1 de enero de 2021;320(1):C57-65.
135. Ward C, Schlichtholz B. Post-Acute Sequelae and Mitochondrial Aberration in SARS-CoV-2 Infection. *Int J Mol Sci.* 21 de agosto de 2024;25(16):9050.

136. Pustake M, Tambolkar I, Giri P, Gandhi C. SARS, MERS and CoVID-19: An overview and comparison of clinical, laboratory and radiological features. *J Fam Med Prim Care*. enero de 2022;11(1):10-7.
137. WHO Rapid Evidence Appraisal for COVID-19 Therapies (REACT) Working Group, Shankar-Hari M, Vale CL, Godolphin PJ, Fisher D, Higgins JPT, et al. Association Between Administration of IL-6 Antagonists and Mortality Among Patients Hospitalized for COVID-19: A Meta-analysis. *JAMA*. 10 de agosto de 2021;326(6):499-518.
138. Wibowo A, Pranata R, Lim MA, Akbara MR, Martha JW. Endotheliopathy marked by high von Willebrand factor (vWF) antigen in COVID-19 is associated with poor outcome: a systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis*. abril de 2022;117:267-73
139. Xu WT, An XB, Chen MJ, Ma J, Wang XQ, Yang JN, et al. A Gene Cluster of Mitochondrial Complexes Contributes to the Cognitive Decline of COVID-19 Infection. *Mol Neurobiol*. 14 de septiembre de 2024;
140. Singh KK, Chaubey G, Chen JY, Suravajhala P. Decoding SARS-CoV-2 hijacking of host mitochondria in COVID-19 pathogenesis. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 1 de agosto de 2020;319(2):C258-67.
141. Saleh J, Peyssonnaud C, Singh KK, Edeas M. Mitochondria and microbiota dysfunction in COVID-19 pathogenesis. *Mitochondrion*. septiembre de 2020;54:1-7.
142. Conte M, Martucci M, Chiariello A, Franceschi C, Salvioli S. Mitochondria, immunosenescence and inflammaging: a role for mitokines? *Semin Immunopathol*. octubre de 2020;42(5):607-17.
143. Lahousse L, Moyse E, Krantic S, Brusselle GG. Understanding age-related diseases: report of the 2015 Ageing Summit. *Eur Respir J*. 1 de enero de 2016;47(1):5-9.
144. Lin J, Epel E. Stress and telomere shortening: Insights from cellular mechanisms. *Ageing Res Rev*. enero de 2022;73:101507.
145. Cîrjăliu RE, Deacu M, Gherghișan I, Marghescu A Ștefania, Enciu M, Băltășescu GI, et al. Clinicopathological Outlines of Post-COVID-19 Pulmonary Fibrosis

Compared with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Biomedicines*. 17 de junio de 2023;11(6):1739.

146. Fukumoto J, Lin M, Banday MM, Patil SS, Krishnamurthy S, Breitzig M, et al. Aberrant Expression of ACO1 in Vasculatures Parallels Progression of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Front Pharmacol*. 2022;13:890380.

147. Li M, Wang K, Zhang Y, Fan M, Li A, Zhou J, et al. Ferroptosis-Related Genes in Bronchoalveolar Lavage Fluid Serves as Prognostic Biomarkers for Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Front Med*. 2021;8:693959.

148. Gay L, Desquiret-Dumas V, Nagot N, Rapenne C, Van de Perre P, Reynier P, et al. Long-term persistence of mitochondrial dysfunctions after viral infections and antiviral therapies: A review of mechanisms involved. *J Med Virol*. septiembre de 2024;96(9):e29886.

149. Nanri Y, Nunomura S, Terasaki Y, Yoshihara T, Hirano Y, Yokosaki Y, et al. Cross-Talk between Transforming Growth Factor- β and Periostin Can Be Targeted for Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. febrero de 2020;62(2):204-16.

150. Horiuchi K, Amizuka N, Takeshita S, Takamatsu H, Katsuura M, Ozawa H, et al. Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression to periosteum and periodontal ligament and increased expression by transforming growth factor beta. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. julio de 1999;14(7):1239-49.

151. Conway SJ, Izuhara K, Kudo Y, Litvin J, Markwald R, Ouyang G, et al. The role of periostin in tissue remodeling across health and disease. *Cell Mol Life Sci CMLS*. abril de 2014;71(7):1279-88.

152. Zeng HL, Chen D, Yan J, Yang Q, Han QQ, Li SS, et al. Proteomic characteristics of bronchoalveolar lavage fluid in critical COVID-19 patients. *FEBS J*. septiembre de 2021;288(17):5190-200.

153. Cabalak M, Doğan S, Bal T, Dikmen N. Serum periostin levels in COVID-19: Is it useful as a new biomarker? *Int J Clin Pract*. noviembre de 2021;75(11):e14728.