

Dosaje de una glicoproteína rica en histidina en el lavado broncoalveolar de pacientes con enfermedades intersticiales difusas de pulmón

Correspondencia:

Glenda Ernst

Domicilio postal: Hospital Británico, Perdriel 74, Laboratorio

Pulmonar, 1° piso

Buenos Aires, Argentina; (CP1280AEB)

TE: +5411-43096400

E-mail: glenda.uba@gmail.com

Recibido: 03.01.2015

Aceptado: 08.04.2015

Autores: Glenda Ernst¹⁻³, Ezequiel Dantas², Fabián Caro³, Laura Alberti³, Martín Fernández³, Tamara Decima², Eduardo Borsini², Pedro Grynblat¹

¹Hospital Británico, Servicio de Medicina Respiratoria

²INBIRS-UBA-CONICET, Facultad de Medicina

³Hospital de Rehabilitación Respiratoria María Ferrer

Resumen

Introducción: La proteína rica en histidina (HRG) se encuentra en el plasma en altas concentraciones (100-150 µg/ml) y puede interactuar con una gran variedad de moléculas. Se ha sugerido que esta proteína podría actuar como un reactante de fase aguda negativa, e incluso que podría participar en la proliferación de fibroblastos utilizando líneas celulares.

Objetivo: Analizar los niveles de HRG en muestras de lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes con enfermedad intersticial pulmonar difusa (EIPD) y evaluar su relación con la severidad de la enfermedad.

Materiales y métodos: Se incluyeron muestras de 30 pacientes con EIPD y 17 sujetos control. Se dosaron los niveles de HRG en muestras de LBA por ELISA. Se recolectaron los datos función pulmonar.

Resultados: Se encontró un aumento en la concentración de HRG en el LBA de pacientes con EIPD comparado con los sujetos control. Más aún, la concentración de HRG en el LBA fue inversamente proporcional a la capacidad vital forzada (CVF) de los pacientes (spearman r: -0.35; p < 0.05). Sin embargo, el análisis de cada subtipo de EIPD demostró que solo aquellos con fibrosis pulmonar idiopática (FPI) presentaron un incremento significativo respecto del grupo control (5.631.0 ± 303.7pg/ml vs 2.296.0 ± 349.4pg/ml; p < 0.01).

Conclusiones: Se describe por primera vez un aumento del nivel de HRG en pacientes con FPI, aunque nuevos estudios son requeridos para evaluar su rol como biomarcador asociado a la severidad o progresión de la enfermedad.

Palabras clave: enfermedades intersticiales pulmonares difusas, lavado broncoalveolar, fibrosis idiopática pulmonar, proteína rica en histidina

Abstract

Dosage of Histidine Rich Glycoprotein in the Bronchoalveolar Lavage of Patients with Diffuse Interstitial Lung Disease

Introduction: The concentration of Histidine Rich Glycoprotein (HRG) in plasma is high (100-150 µg/ml). HRG interacts with a wide range of molecules. It has been suggested that this protein could act as a negative reactant acute protein and would be able to modulate fibroblast proliferation using cell lines.

Objective: To analyze the levels of HRG in Bronchoalveolar Lavage (BAL) samples from patients with Interstitial Lung Diseases (ILD) and to evaluate its relationship with illness severity.

Materials and Methods: Thirty patients with ILD and 17 control subjects were included. HRG was measured by ELISA. Pulmonary functions tests data were collected.

Results: Increased levels of HRG in BAL samples from ILD patients were found compared with control subjects. Moreover, the levels of HRG showed an inverse correlation with the Forced Vital Capacity (FVC) values from patients with ILD (spearman r: -0.35; p < 0.05).

However, when each subtype of ILD was analyzed, we observed that only patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) showed a significant increase in levels of HRG compared with the control group ($5.631,0 \pm 303,7$ pg/ml vs $2.296,0 \pm 349,4$ pg/ml; $p < 0.01$).

Conclusions: This is the first time that increase of HRG levels from patients with IPF is described. Nevertheless, new studies are required to analyze its role as biomarker associated with severity or progression of the illness.

Key words: Interstitial Lung Diseases, Bronchoalveolar Lavage, Idiopathic Pulmonary Fibrosis, Histidine Rich Glicoprotein

Introducción

La fibrosis pulmonar es una condición irreversible que limita la difusión de los gases a través del intersticio pulmonar y consecuentemente se asocia con una baja expectativa de vida¹. Este proceso, de etiología diversa, se manifiesta por una excesiva acumulación de elementos de la matriz extracelular, producto de una alteración en el proceso de reparación y cicatrización tisular relacionados con una descontrolada activación y proliferación de fibroblastos^{2, 3}.

El paradigma clásico de la inmunología indica que la fibrosis sería una consecuencia de un proceso inflamatorio crónico en el cual participan mediadores celulares y solubles de la inmunidad innata y adaptativa⁴. Si bien en la mayoría de las EIPD se muestran signos de inflamación pulmonar⁵, el mecanismo patogénico que participa en la FPI sería diferente⁶. Se ha postulado que el desarrollo de la FPI estaría mediado por la sucesiva exposición a micro-injurias sobre el epitelio pulmonar, en combinación con un alterado mecanismo de reparación tisular y sobre-activación de miofibroblastos^{7, 8}. Más aún, se ha descrito que algunos factores de la cascada de coagulación podrían estar involucrados en el desarrollo de la fibrosis⁹.

- 1) Los depósitos de fibrina y fibronectina depositados en el área subyacente a los focos fibroblásticos estarían relacionados con la diferenciación epitelial mesenquimática, incluso en ausencia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β)¹⁰.
- 2) La trombina y el factor X activarían proteínas quinasas que contribuirían a la diferenciación de miofibroblastos¹¹.

En este trabajo, se analizaron los niveles de una proteína denominada glicoproteína rica en histidina (HRG)¹². La misma es sintetizada en el

hígado y su concentración es inversamente proporcional a proteína C reactiva, por lo que se definió como una proteína de fase aguda negativa¹³. Su concentración en plasma es elevada ($100-150\mu\text{g/ml}$)¹⁴. Su estructura consta de múltiples dominios¹⁵, permitiendo su interacción con diversos ligandos que incluyen: heparina, fosfolípidos, plasminógeno, fibrinógeno, inmunoglobulina G, C1q, el grupo hemo y Zinc¹⁶⁻¹⁹. La capacidad de esta proteína para interactuar con varios ligandos en forma simultánea permite pensar que HRG podría funcionar como una molécula adaptadora que regula numerosos procesos biológicos. Se la ha relacionado con procesos tales como formación de complejos inmunes, necrosis, adhesión celular, angiogénesis, coagulación y fibrinólisis²⁰.

Previamente, hemos descrito un incremento en el recuento total de células inflamatorias, citoquinas proinflamatorias como interlequina 6 (IL-6)²¹ y en los niveles de ácido hialurónico²² en el LBA de pacientes con EIPD. Sin embargo, estos mediadores inflamatorios no estuvieron incrementados en el LBA de pacientes con FPI.

El objetivo de este estudio fue conocer si existen diferencias en la concentración de la proteína HRG en el LBA de pacientes con EIPD comparados con un grupo control y evaluar su relación con la función pulmonar.

Materiales y métodos

Diseño del Estudio

Se realizó un estudio prospectivo observacional. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital María Ferrer en acuerdo con los principios éticos de la declaración de 1975 de Helsinki y sus actualizaciones posteriores. Todos los individuos que participaron firmaron un consentimiento informado.

Pacientes y controles

Pacientes con EIPD: Se analizaron 30 pacientes con EIPD. Los pacientes fueron ambulatorios y ninguno de ellos recibía medicación al momento de la toma de las muestras ya que fueron sometidos a realización de la fibrobroncoscopia con fines diagnósticos. Todos ellos adultos, diagnosticados de acuerdo a los criterios establecidos por la Sociedad Americana de Tórax (ATS) y la Sociedad Respiratoria Europea (ERS)^{23,24}. En todos los pacientes, la confirmación de su enfermedad se realizó mediante la histopatología de las biopsias pulmonares. Todos los pacientes fueron sometidos a una fibrobroncoscopia en la cual se tomaron muestras de LBA en el lóbulo con mayor compromiso tomográfico.

Grupo control: Este grupo incluyó 17 sujetos adultos sin evidencia clínica de EIPD, enfermedad obstructiva crónica, asma o infecciones pulmonares activas. En estos sujetos se realizó una fibrobroncoscopia como control de rutina luego de una cirugía reparadora de estenosis de tráquea. En este grupo se realizó un LBA en el lóbulo medio.

Lavado broncoalveolar (LBA)

El LBA fue realizado de acuerdo a lo descrito previamente²⁵. Brevemente, se inocularon 140 ml de solución salina a temperatura ambiente en bolos de 20 ml con jeringa, los cuales fueron suavemente aspirados. El material recolectado fue homogenizado y una alícuota de 1ml fue conservada a -70°C hasta su utilización.

Ensayo inmunoenzimático (ELISA)

Se realizó el dosaje de los niveles de HRG por ELISA. Se utilizó un kit comercial (Sino Biological, n° de catálogo SEK10836-5) y se siguieron las instrucciones con algunas modificaciones. Brevemente, se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente (TA) las muestras de LBA (diluidas 1/10) en placas previamente sensibilizadas con el anticuerpo de captura y bloqueadas con seroalbúmina bovina al 5%. Se incubaron con el anticuerpo de captura conjugado con la enzima durante 45 min a TA. Se incubaron con el sustrato durante 3 minutos y se leyó la absorbancia a 450 nm.

Test de función pulmonar

Todos los pacientes fueron sometidos a test de función pulmonar (TFP) que incluyó espirometrías, medición de volúmenes pulmonares por pletismografía y la capacidad de difusión de monóxido de carbono (DLCO). Los volúmenes

pulmonares y DLCO fueron realizados de acuerdo a las recomendaciones de la ATS/ERS. Para las mediciones de TFP, se utilizó un pletismógrafo de volumen constante (Platinum Elite DL, Medical Graphics Corporation). Los valores normales predichos fueron referidos a los de Crapo. Los sujetos control sólo realizaron una espirometría. Estos fueron realizados el mismo mes en que se realizó la fibrobroncoscopia.

Análisis estadístico

Los resultados se analizaron utilizando el software Prism 5 (GraphPad, La Jolla, CA). Para la estadística descriptiva se informaron las medias y el desvío estándar. Para comparar las diferencias entre dos grupos se utilizó el test de Mann Withney y cuando se compararon los resultados de tres o más grupos, se utilizó el test no paramétrico de Kruskal Wallis y el test de comparaciones múltiples de Dunn's.

Resultados

Población estudiada

Se incluyeron en este estudio muestras de 30 pacientes con EIPD que fueron sometidos a la fibrobroncoscopia con fines diagnósticos. En 13 de los casos se obtuvo diagnóstico de neumonitis por hipersensibilidad (NH), 5 de sarcoidosis, 7 fueron pacientes diagnosticados con fibrosis idiopática pulmonar (FPI) y finalmente 5 con neumonía intersticial no específica (NINE). Las características demográficas y funcionales de los pacientes se detallan en la Tabla 1.

TABLA 1. Características de los pacientes con EPID (n=30)

Características	Medias (SD) o %
Edad (años)	53.0 (14.7)
Sexo masculino (%)	60.0 %
Pacientes ex tabaquistas (%)	40.0 %
Fumador actual (%)	0.0 %
CVF (L)	2.6 (0.9)
CVF (% del predicho)	70.5%
VEF1(L)	2.1 (0.7)
VEF1 (% del predicho)	66.7 %
DLCO (L de CO/min/mmHg)	14.4 (5.5)
DLCO (% del predicho)	50.7 %
CPT (L)	3.9 (1.9)
CPT (% del predicho)	71.3 %

Metros recorridos en el test de marcha de 6 minutos (mts)
461.8 (95.7)

El grupo control incluyó 17 sujetos de 42.2 ± 4.9 años, que requirieron la realización de una broncoscopia como seguimiento de una cirugía reparativa debido a una estenosis traqueal post-intubación. Se incluyeron sujetos sin evidencia clínica de EIPD, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma o infecciones activas. Se realizó una espirometría, en la cual se observó que la CVF osciló entre 90 y 102%. Respecto del estado fumador, solo un sujeto era fumador activo al momento de la broncoscopia; uno de ellos era ex-fumador y el resto nunca había fumado.

Incremento en los niveles de HRG en LBA de los pacientes con EIPD respecto del grupo control

Como puede observarse en la Figura 1A, se encontró un significativo aumento en la concentración de la glicoproteína HRG en las muestras de LBA de los pacientes con EIPD respecto de los sujetos control ($4.469,0 \pm 1851,0$ vs $2.296,0 \pm 349,4$ pg/ml, $p < 0.001$ respectivamente). Sin embargo, cuando se analizaron los valores de HRG de cada subtipo de EIPD, se encontró que solo en el LBA de los pacientes con FPI hubo un incremento significativo respecto del grupo control ($5.631,0 \pm 303,7$ pg/ml; $p < 0.01$). El resto de los grupos analizados mostraron una gran variabilidad en los niveles de HRG y no mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto de los sujetos control (Figura 1B).

Relación entre la concentración de los niveles de HRG en el LBA con la función pulmonar

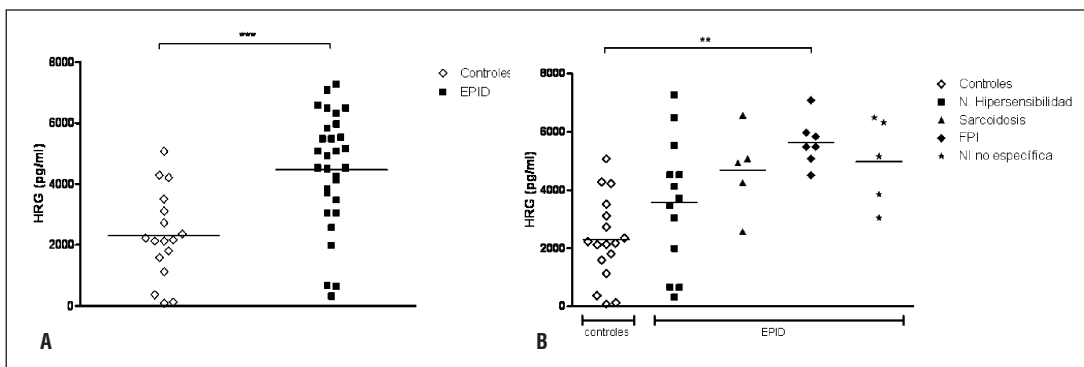
Se encontró una correlación inversa entre la concentración de HRG en el LBA y la CVF de los pacientes

con EIPD (spearman $r: -0.35$; $p < 0.05$). Tal como puede observarse en la Figura 2, los pacientes con niveles más elevados de HRG en el LBA mostraron menores valores de CVF. Esta correlación con otras variables como DLCO o capacidad pulmonar total (CPT) mostraron resultados no significativos (spearman $r: -0.2$ and -0.1 respectivamente).

Discusión

Las EIPD constituyen un conjunto heterogéneo de enfermedades caracterizadas por la acumulación de células inflamatorias, factores de crecimiento, citoquinas inmuno-moduladoras y la expansión de células mesenquimáticas productoras de proteínas de la matriz extracelular que afectan la arquitectura del parénquima pulmonar. FPI continúa siendo la entidad con peor pronóstico; las exacerbaciones, el deterioro progresivo de la función pulmonar y la condición refractaria a la gran mayoría de los tratamientos contribuyen a mantener una elevada tasa de mortalidad²⁶.

Se ha descrito previamente la participación de algunos factores de la cascada de coagulación en la patogénesis de la FPI. Estos se activarían a través de vías de señalización como los receptores PAP (familia de receptores de superficie que se activan mediante interacción con proteinasas)²⁷. El Factor X sería localmente producido y activado dentro de los focos fibroblásticos, lo que promovería la diferenciación y activación de los fibroblastos a miofibroblastos²⁸. Lo que es más, se han realizado estudios clínicos utilizando tratamientos con anti-coagulantes en pacientes con FPI, aunque su utilidad permanece controvertida²⁹⁻³¹.



Figuras 1. Niveles de HRG en el LBA. A) Resultados obtenidos en muestras de pacientes con EIPD respecto de los sujetos control. B) Resultados obtenidos en las muestras de pacientes con diferentes sub-tipos de EIPD estudiados, respecto del grupo control. Se observan en la figuras sin relleno los resultados obtenidos con los controles y en las figuras con relleno en negro los resultados obtenidos en los pacientes con EIPD. **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

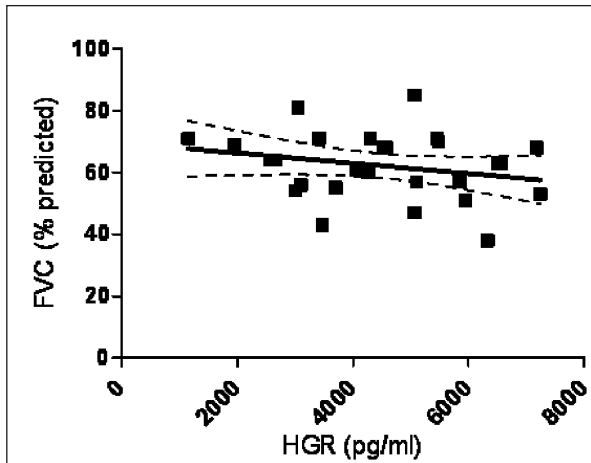


Figura 2. Correlación entre los niveles de HRG en LBA y la CVF en los pacientes con EIPD.

Numerosa evidencia avala la participación de la proteína HRG en la regulación de los procesos que ocurren durante la cascada de coagulación^{32, 33}. Brown y Parish han analizado el rol de HRG en los procesos fibróticos utilizando líneas celulares de fibroblastos murinos³⁴. Debido a su alta afinidad por algunos factores como heparán sulfato, la HRG sería capaz de modular la proliferación las células previamente mencionadas.

El rol de esta glicoproteína en pacientes con FPI no ha sido descrito aún. En este trabajo se encontró un significativo incremento en los niveles de HRG en muestras de LBA de pacientes con FPI. Este hallazgo, descrito por primera vez en esta patología, tendría poca implicancia como bio-marcador ya que la realización de un LBA no es una práctica de rutina en este tipo de pacientes; sin embargo, podría ser indicio de la potencial participación de HRG en el proceso fibrótico. Resultados preliminares indicarían que este aumento en el LBA estaría relacionado con una disminución de los niveles de HRG en el plasma³⁵, aunque nuevos estudios son necesarios para confirmar nuestra hipótesis.

Se encontró una relación estadísticamente significativa entre la concentración de HRG y la CVF en los pacientes con EIPD. Los resultados aquí mostrados podrían sugerir que el incremento de los niveles de esta proteína en el LBA estaría asociado con una menor CVF; aunque no fue objetivo de este trabajo el estudio de la HRG como un biomarcador ya que esto requeriría un diseño longitudinal.

Los hallazgos de este trabajo forman parte un protocolo en curso, enfocado en comprender la participación de la HRG en el desarrollo de los pro-

cesos fibróticos en pacientes con FPI. Estudios más detallados, incrementando el número de pacientes, podrían contribuir al desarrollo de nuevos blancos terapéuticos para esta desafiante enfermedad.

Conflictos de intereses: GE es docente de Inmunología de la Universidad de Buenos Aires, ha recibido financiación del laboratorio DOSA para concurrir a congresos de medicina respiratoria. MF ha recibido financiación del laboratorio Tuteur para concurrir a congresos de medicina respiratoria.

Bibliografía

- King TE Jr, Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* 2011; 378 (9807): 1949-61.
- Wick G, Grundtman C, Mayerl C et al. The immunology of fibrosis. *Annu Rev Immunol* 2013; 31: 107-35.
- Duffield JS, Luper M, Thannickal VJ, Wynn TA. Host responses in tissue repair and fibrosis. *Annu Rev Pathol* 2013; 8: 241-76.
- Wick G, Backovic A, Rabensteiner E et al. The immunology of fibrosis: innate and adaptive responses. *Trends Immunol* 2010; 31(3): 110-9.
- Zibrak JD, Price D. Interstitial lung disease: raising the index of suspicion in primary care. *NPJ Prim Care Respir Med* 2014; 24: 14054.
- Blackwell TS, Tager AM, Borok Z et al. Future directions in idiopathic pulmonary fibrosis research. An NHLBI workshop report. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 189(2): 214-22.
- Noble PW, Barkauskas CE, Jiang D. Pulmonary fibrosis: patterns and perpetrators. *J Clin Invest* 2012; 122(8): 2756-62.
- Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 5: 349-63.
- Chambers RC, Scotton CJ. Coagulation cascade proteinases in lung injury and fibrosis. *Proc Am Thorac Soc* 2012; 9(3): 96-101.
- Scotton CJ, Krupiczko MA, Konigshoff M et al. Increased local expression of coagulation factor X contributes to the fibrotic response in human and murine lung injury. *J Clin Invest* 2009; 119: 2550-63.
- Bogatkevich GS, Tourkina E, Silver RM, Ludwicka-Bradley A. Thrombin differentiates normal lung fibroblasts to a myofibroblast phenotype via the proteolytically activated receptor-1 and a protein kinase C-dependent pathway. *J Biol Chem* 2001; 276: 45184-92.
- Wakabayashi S. New insights into the functions of histidine-rich glycoprotein. *Int Rev Cell Mol Biol* 2013; 304: 467-93.
- Saigo K, Yoshida A, Ryo R, Yamaguchi N, Leung LL. Histidine-rich glycoprotein as a negative acute phase reactant. *Am J Hematol* 1990; 34: 149-50.
- Poon IKH, Patel KK, Davis DS, Parish CR, Hulett MD. Histidine-rich glycoprotein: the Swiss Army knife of mammalian plasma. *Blood* 2011; 117: 2093-101.
- Koide T, Foster D, Yoshitake S, Davie EW. Amino acid sequence of human histidine-rich glycoprotein derived from the nucleotide sequence of its cDNA. *Biochemistry* 1986; 25: 2220-25.
- Walz DA, Bacon-Baguley T, Kendra-Franczak S, DePoli P. Binding of thrombospondin to immobilized ligands: specific interaction with fibrinogen, plasminogen, histidine-rich

- glycoprotein, and fibronectin. *SeminThromb Hemost* 1987; 13(3): 317-25.
17. Vu TT, Stafford AR, Leslie BA, Kim PY, Fredenburgh JC, Weitz JI. Histidine-rich glycoprotein binds fibrinogen with high affinity and competes with thrombin for binding to the gamma'-chain. *J Biol Chem* 2011; 286(35): 30314-23.
 18. Poon IK, Hulett MD, Parish CR. Histidine-rich glycoprotein is a novel plasma pattern recognition molecule that recruits IgG to facilitate necrotic cell clearance via Fc gamma RI on phagocytes. *Blood* 2010; 115(12): 2473-82.
 19. Jones AL, Hulett MD, Parish CR. Histidine-rich glycoprotein binds to cell-surface heparan sulfate via its N-terminal domain following Zn²⁺ chelation. *J Biol Chem* 2004; 279(29): 30114-22.
 20. Jones AL, Hulett MD, Parish CR. Histidine-rich glycoprotein: A novel adaptor protein in plasma that modulates the immune, vascular and coagulation systems. *Immunol Cell Biol* 2005; 83(2): 106-18.
 21. Ernst G, Caro F, Galíndez F, Rodríguez Moncalvo JJ, Grynblat P. Citoquinas inflamatorias del lavado broncoalveolar en pacientes con enfermedades pulmonares intersticiales difusas: Utilidad en estudios de investigación. *Rev Am Med Resp* 2014; 3: 221-31.
 22. Ernst G, Jancic C, Auteri S et al. Increased Levels of Hyaluronic Acid in Bronchoalveolar Lavage from Patients with Interstitial Lung Diseases, Relationship with Lung Function and Inflammatory Cells Recruitment. *Modern Research in Inflammation* 2014; 3(2): 27-36.
 23. American Thoracic Society, European Respiratory Society. American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 277-304.
 24. Travis WD, Costabel U, Hansell DM, King Jr TE, Lynch DA, Nicholson AG. An Official American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement: Update of the International Multidisciplinary Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 188: 733-48.
 25. Meyer KC, Raghu G, Baughman RP et al. An Official American Thoracic Society Clinical Practice Guideline: The Clinical Utility of Bronchoalveolar Lavage Cellular Analysis in Interstitial Lung Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 185: 1004-14.
 26. Raghu G, Collard HR, Egan JJ et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: IPF evidence-based guidelines for diagnosis and treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 83: 788-824.
 27. Chambers RC, Scotton CJ. Coagulation cascade proteinases in lung injury and fibrosis. *Proc Am Thorac Soc* 2012; 9: 96-101.
 28. Scotton CJ, Krupiczkoj MA, Königshoff M et al. Increased local expression of coagulation factor X contributes to the fibrotic response in human and murine lung injury. *J Clin Invest* 2009; 119: 2550-63.
 29. Bogatkevich GS, Nietert PJ, Silver RM, Highland KB. Rationale for anticoagulant therapy of pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 189(3): 362-3.
 30. Kinder BW, Collard HR, King TE Jr. Anticoagulant therapy and idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 2006; 130(1): 302-3.
 31. Kubo H, Nakayama K, Yanai M et al. Anticoagulant therapy for idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 2005; 128(3): 1475-82.
 32. Poon IK, Patel KK, Davis DS, Parish CR, Hulett MD. Histidine-rich glycoprotein: the Swiss Army knife of mammalian plasma. *Blood* 2011; 117(7): 2093-101.
 33. Jones AL, Hulett MD, Parish CR. Histidine-rich glycoprotein: A novel adaptor protein in plasma that modulates the immune, vascular and coagulation systems. *Immunol Cell Biol* 2005; 83(2): 106-18.
 34. Brown KJ, Parish CR. Histidine-rich glycoprotein and platelet factor 4 mask heparan sulfate proteoglycans recognized by acidic and basic fibroblast growth factor. *Biochemistry* 1994; 33(46): 13918-27.
 35. Ernst G, Dantas E, Caro F et al. Decreased Plasmatic Levels of Histidine-Rich Glycoprotein in Patients With Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Relationship With Lung Diffusion Capacity and Walking Test. *Chest* 2014; 146 (4_MeetingAbstracts): 372A.