



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE MEDICINA

Expresión diferencial de reactantes de fase aguda en distintos tipos
celulares de pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

Trabajo que presenta la licenciada Carmen Calero Acuña

para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía

Sevilla, 2012

D. JOSE LUIS LOPEZ-CAMPOS BODINEAU, PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

CERTIFICA: Que Dña. Carmen Calero Acuña, Licenciada en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo titulado “EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE REACTANTES DE FASE AGUDA EN DISTINTOS TIPOS CELULARES DE PACIENTES CON ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA”. Revisado el presente trabajo por creer que reúne las condiciones necesarias, estimamos que puede ser presentado como Tesis Doctoral.

En Sevilla, 2012

Director de tesis, Dr. Jose Luis López-Campos Bodineau.

Tutor de tesis, Dr. Francisco Capote Gil

Doctoranda, Carmen Calero Acuña

Tabla de contenido

Introducción.....	1
Concepto.....	2
Estadíos de la enfermedad.....	5
Diagnóstico	7
Epidemiología.	11
Prevalencia.....	12
Mortalidad.....	15
Morbilidad.....	17
Impacto económico.....	18
Patogenia.....	18
Inflamación local.....	20
Estrés oxidativo.	22
Proteasas.	22
Apoptosis.....	23
Consecuencias de la inflamación local.....	24
Fisiopatología.....	29
Inflamación sistémica	31
Consecuencias de la Inflamación sistémica.	34
Enfermedad cardiovascular.	34

Desnutrición y miopatía.	35
Osteoporosis	36
Diabetes.	37
Depresión y ansiedad.	37
Anemia.	38
Cáncer de pulmón.	38
Reactantes de Fase Aguda:.....	39
Hipótesis.....	44
Objetivos	44
Método.	45
Extracción de la muestra quirúrgica.	47
Instrumentos de medida.....	47
Trabajo de laboratorio	50
Análisis estadístico.....	52
Resultados.....	54
Descripción de la muestra	54
Objetivo 1. Explorar la existencia de una expresión génica de RFA en sujetos sanos y compararla con los pacientes con EPOC.....	58
Objetivo 2. Comparar la expresión génica de PCR y AAS en el tejido bronquial y en parénquima de pulmón humano.	67
Objetivo 3. Determinar la expresión de PCR y AAS en células epiteliales, macrófagos y fibroblastos pulmonares humanos.	72

Objetivo 4. Comparar la expresión génica de RFA en dichos grupos celulares entre pacientes con EPOC frente a fumadores sanos.....	78
Discusión.....	92
Anexo I. información al paciente y consentimiento informado.....	105
Anexo II. Cuestionario estandarizado de recogida de datos clínicos.....	108
Bibliografía.....	110

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Características basales de los casos y controles participantes en el estudio.....	55
Tabla 2. Descripción de las neoplasias de los casos y controles.	56
Tabla 3. Matriz de correlaciones en expresión de PCR entre grupos celulares en sujetos sin EPOC.	77
Tabla 4. Matriz de correlaciones en expresión de PCR entre grupos celulares en sujetos con EPOC.	83

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Expresión de proteína C reactiva (PCR) en casos (arriba) y controles (abajo) según la localización anatómica.	59
Figura 2. Expresión de amiloide A sérico 1 (AAS1) en casos (arriba) y controles (abajo) según la localización anatómica.	60
Figura 3. Expresión de amiloide A sérico 2 (AAS2) en sujetos sanos (arriba) y en casos (abajo) según la localización anatómica.	61
Figura 4. Expresión de amiloide A sérico 4 (AAS4) en sujetos sanos (arriba) y en casos (abajo) según la localización anatómica.	62
Figura 5. Comparación de la expresión de PCR entre casos y controles en bronquio (arriba) y parénquima (abajo).	63
Figura 6. Comparación de la expresión de AAS1 entre casos y controles en bronquio (arriba) y parénquima (abajo).	64
Figura 7. Comparación de la expresión de AAS2 entre casos y controles en bronquio (arriba) y parénquima (abajo).	65
Figura 8. Comparación de la expresión de AAS4 entre casos y controles en bronquio (arriba) y parénquima (abajo).	66
Figura 9. Expresión relativa de PCR en bronquio con respecto al parénquima ($p=0,012$).	68
Figura 10. Expresión relativa de AAS1 en bronquio con respecto al parénquima bronquio.	69
Figura 11. Expresión relativa de AAS2 en bronquio con respecto al parénquima.	70
Figura 12. Expresión relativa de AAS4 en bronquio con respecto al parénquima.	71

Figura 13. Expresión relativa de PCR en los grupos celulares estudiados de sujetos control.	73
Figura 14. Expresión relativa de AAS1 en los grupos celulares estudiados de sujetos control.	74
Figura 15. Expresión relativa de AAS2 en los grupos celulares estudiados de sujetos control.	75
Figura 16. Expresión relativa de AAS4 en los grupos celulares estudiados de sujetos control.	76
Figura 17. Expresión relativa de PCR en los grupos celulares estudiados de sujetos con EPOC.	79
Figura 18. Expresión relativa de AAS1 en los grupos celulares estudiados de sujetos con EPOC.	80
Figura 19. Expresión relativa de AAS2 en los grupos celulares estudiados de sujetos con EPOC.	81
Figura 20. Expresión relativa de AAS4 en los grupos celulares estudiados de sujetos con EPOC.	82
Figura 21. Comparación de la expresión relativa de PCR entre casos y controles. a) fibroblastos, b) epiteliales, c) macrófagos.....	84
Figura 22. Comparación de la expresión relativa de AAS1 entre casos y controles. a) fibroblastos, b) epiteliales, c) macrófagos.....	86
Figura 23. Comparación de la expresión relativa de AAS2 entre casos y controles. a) fibroblastos, b) epiteliales, c) macrófagos.....	88
Figura 24. Comparación de la expresión relativa de AAS4 entre casos y controles. a) fibroblastos, b) epiteliales, c) macrófagos.....	90

ABREVIATURAS.

AAS: amiloide A sérico

CI: capacidad inspiratoria

CIE: clasificación internacional de enfermedades

CPT: capacidad pulmonar total

CRF: capacidad residual funcional

CV: capacidad vital

DMO: densidad mineral ósea

EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica

FEV1: volumen espirado en el primer segundo

FVC: capacidad vital forzada

IC: capacidad inspiratoria

IL: interleucina

LABA: broncodilatador de acción larga

LDL: lipoproteína de baja densidad

MMP: metaloproteasas de matriz extracelular

mMRC: escala modificada del Medical Research Council

NF-KB: factor de transcripción Kappa Beta

NHANES: National Health and Nutrition Examination Survey

NK-KB: factor nuclear KB

OCFA: obstrucción crónica al flujo aéreo

PaCO₂: presión parcial arterial de carbónico

PaO₂: presión parcial arterial de oxígeno

PCR: proteína C reactiva

RFA: reactantes de fase aguda

SEPAR: Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica

SFB: suero fetal bovino

SPSS: Statistical Package for Social Sciences

TLC: capacidad pulmonar total

TLR: receptores tipo Toll

TNF α : factor de necrosis tumoral α

Introducción.

La presente Tesis Doctoral se enmarca en el estudio de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) como enfermedad pulmonar con repercusión sistémica y se basa en el estudio de la expresión celular diferencial de marcadores inflamatorios inespecíficos haciendo un especial hincapié en la importancia de los reactantes de fase aguda.

Con objeto de centrar la exposición de la metodología y poder valorar adecuadamente los resultados, iniciaremos el presente trabajo realizando una revisión de la situación actual del tema. En concreto, revisaremos los siguientes apartados:

- EPOC. Concepto actual. Donde se revisarán los aspectos principales del concepto actual de la enfermedad, así como su estadificación funcional.
- Conceptos básicos sobre su diagnóstico y detección en pacientes con factores de riesgo.
- Epidemiología de la EPOC. Haciendo especial énfasis en la prevalencia, mortalidad y morbilidad.
- Patogenia. Datos sobre la patogenia de la enfermedad, donde se discutirán los principales tipos celulares implicados en su génesis.
- Importancia de la inflamación sistémica. Evaluación de la importancia de la inflamación sistémica dentro del nuevo marco conceptual de la EPOC como enfermedad sistémica.
- Reactantes de fase aguda mayores. Importancia de los reactantes de fase aguda como parte de la inflamación sistémica y base de nuestro estudio.

Concepto.

A pesar de que hoy en día parece que tenemos una noción clara de enfermedad, el concepto de Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) no ha estado exento de controversia a lo largo de su historia. Inicialmente denominado con un número de conceptos diversos, entre los que figuraban el de bronquitis crónica y enfisema, el concepto de la enfermedad ha ido evolucionando hasta que a final de los años 70 comenzara a usarse el término de EPOC [1]. Sin embargo, incluso actualmente, aunque parece que nos hemos puesto de acuerdo en cómo definir y denominar la enfermedad, aún existen aspectos no exentos de debate.

A mediados del siglo pasado era frecuente encontrar en la literatura conceptos como los de bronquitis crónica, enfisema, bronquiectasias e incluso asma [2] para hacer referencia a pacientes con síntomas respiratorios crónicos con diversas características clínicas, radiológicas o funcionales acompañantes, no siempre superponibles. Desde entonces los neumólogos hemos venido realizando un esfuerzo por intentar delimitar cada una de estas patologías y transmitir el término de EPOC para referirnos a una situación patológica que consiste en síntomas respiratorios crónicos y obstrucción bronquial no reversible asociado al consumo de tabaco. Reflejo de esta situación es la definición de la enfermedad de las primeras normativas SEPAR en las que se hacía un esfuerzo para incorporar los conceptos de bronquitis crónica y enfisema bajo el término de EPOC, recomendándose el empleo de este último [3,4]. En la normativa SEPAR-ALAT 2007 [5] este debate se ha dado por cerrado empleando únicamente el término de EPOC, a excepción del apartado de información a enfermos y familiares en los que bronquitis crónica y enfisema se presentan como términos que también pueden encontrarse en la literatura.

Actualmente sabemos que la EPOC es una enfermedad crónica e inflamatoria del aparato respiratorio que se caracteriza por la aparición de una obstrucción crónica al flujo aéreo (OCFA) como consecuencia de la inhalación repetida de sustancias tóxicas, que en nuestro medio suele ser el humo del tabaco. Aunque esta descripción de la enfermedad se corresponde con el concepto actual, es preciso establecer algunas matizaciones.

En primer lugar, el concepto de OCFA implica que para definir la enfermedad es necesario objetivar una OCFA mediante la realización de una espirometría en todos los casos. Sin embargo, tener una OCFA no equivale a tener una EPOC, ya que existen otras enfermedades que también pueden cursar con una obstrucción en la espirometría (como el asma bronquial, las bronquiectasias, las bronquiolitis o lesiones residuales por tuberculosis, entre otras). Por otro lado, el concepto de OCFA ha sufrido un ligero matiz al definirse inicialmente como descenso de los flujos que no cambian notablemente durante varios meses de seguimiento [4] hasta el concepto actual de obstrucción no completamente reversible. Este pequeño cambio denota que en la EPOC admite que algunos pacientes pueden tener cierto grado de reversibilidad bronquial en la prueba broncodilatadora o tras un tiempo de tratamiento. El punto de corte para establecer una prueba broncodilatadora significativa también ha variado discretamente y se ha situado en 12% y 200 mL [6]. Inicialmente, se consideró que una prueba broncodilatadora positiva sería un indicador de una buena respuesta a tratamiento. Sin embargo, esto no se ha demostrado y actualmente no se recomienda el porcentaje de cambio de volumen espirado durante el primer segundo (FEV_1) ni para el diagnóstico de la enfermedad, ni para el diagnóstico diferencial con asma, ni para predecir la respuesta al tratamiento [6].

En segundo lugar, la extensión de la enfermedad ha ido variando considerablemente. Inicialmente se estableció como una enfermedad en la que se incluían tres procesos: la bronquitis crónica, la enfermedad de las pequeñas vías aéreas y el enfisema pulmonar [4]. Es decir, se definía un modelo tricompartmental en el que la vía aérea principal, la vía aérea fina y el parénquima pulmonar constituían los tres compartimentos afectados. Posteriormente, se pasó a un modelo con cuatro compartimentos, añadiéndole la vasculatura pulmonar [7] y su manifestación más temida, la hipertensión pulmonar. Hoy en día, este modelo se ha visto sustituido por un modelo multicompartmental en el que se ha añadido la diversa afectación sistémica de la enfermedad, constituyéndose en una enfermedad multicompartmental o multicomponente en la que conceptos clásicos como los de bronquitis crónica o enfisema y otros más novedosos como inflamación sistémica, agudizaciones o afectación vascular son algunas de las posibles manifestaciones de la enfermedad que dan lugar a los distintos fenotipos de la misma.

En tercer lugar, en las últimas normativas se le ha dado un giro más optimista a la enfermedad. Hasta ahora, la EPOC se consideraba una enfermedad auto-provocada para la que disponíamos de escasas medidas terapéuticas que produjeran un cambio en la evolución de la enfermedad, limitándose el tratamiento al alivio sintomático. Sin embargo, esta visión nihilista ha cambiado. El tratamiento de la EPOC se ha ampliado considerablemente ofertando a los pacientes mejorías más allá del alivio sintomático. Por lo que la información que se debe transmitir a los pacientes es de una actitud positiva y activa frente a una enfermedad sobre la que podemos actuar y establecer notables mejorías.

Por todo lo anteriormente expuesto, la GOLD 2010 define la EPOC como “una enfermedad prevenible y tratable con algunos efectos extrapulmonares

significativos que pueden contribuir a su severidad en pacientes concretos. Su componente pulmonar se caracteriza por limitación al flujo aéreo que no es completamente reversible. Esta limitación al flujo aéreo es generalmente progresiva y está asociada a una respuesta inflamatoria anormal del pulmón ante partículas o gases nocivos” [6].

Estadíos de la enfermedad.

La enfermedad se define por criterios clínicos y funcionales. Como ya se ha explicado, se recomienda emplear el término EPOC en vez de los de bronquitis crónica o de enfisema porque define mejor la enfermedad obstructiva que se observa en los fumadores. La *bronquitis crónica* se define clínicamente por la presencia de tos y expectoración durante más de 3 meses al año y durante más de 2 años consecutivos, que no son debidas a otras causas conocidas. El *enfisema pulmonar* se define en términos anatomopatológicos por el agrandamiento permanente de los espacios aéreos distales a los bronquiolos terminales, con destrucción de la pared alveolar, sin fibrosis manifiesta [8].

La reducción del flujo aéreo es la alteración funcional dominante en la EPOC, por lo que las mediciones espirométricas constituyen la herramienta principal para establecer el diagnóstico de la enfermedad, evaluar la gravedad y seguir el curso evolutivo. El FEV₁, expresado como porcentaje del valor de referencia, es el mejor indicador de la gravedad de la obstrucción del flujo aéreo [9]. Dado que la EPOC cubre un amplio espectro de formas clínicas, se propone la siguiente graduación de la gravedad de la enfermedad sobre la base del valor del FEV₁ [6]:

- EPOC leve (estadio I de la GOLD): FEV₁ es mayor o igual al 80% del valor de referencia;

- EPOC moderada (estadio II de la GOLD): FEV₁ es menor del 80% pero mayor o igual al 50% del valor de referencia;
- EPOC grave (estadio III de la GOLD): FEV₁ es menor del 50% pero mayor o igual al 30% del valor de referencia.
- EPOC muy grave (estadio IV de la GOLD): FEV₁ es menor del 30% del valor de referencia o menor del 50% con insuficiencia respiratoria crónica asociada (presión parcial arterial de oxígeno (PaO₂) menor de 60 mmHg asociado o no a una presión parcial arterial de carbónico (PaCO₂) mayor de 50 mmHg).

Los límites aquí propuestos son arbitrarios y tienen un carácter empírico, dado que no existen evidencias que los apoyen, aunque se corresponden con los establecidos por otras sociedades [10]. La presente división tiene por objetivo facilitar las recomendaciones sobre las pautas de tratamiento y el empleo de los recursos sanitarios.

La valoración del paciente con EPOC basándonos exclusivamente en criterios espirométricos tiene importantes limitaciones, dado que actualmente sabemos que la reducción del flujo aéreo es una característica muy importante en estos pacientes, incluso definitiva de la enfermedad, pero que constituye un componente más dentro de las alteraciones que se producen en esta patología. Por este motivo, se considera de interés que en la caracterización de la enfermedad también se tomen en consideración las alteraciones del intercambio gaseoso, la percepción de los síntomas, la capacidad de ejercicio y la presencia de alteraciones nutricionales. Es posible que en el futuro se utilice una clasificación multidominio de la EPOC que tenga en cuenta estas distintas facetas [11].

Cuando se han intentado desarrollar marcadores pronósticos en la EPOC, habitualmente se han establecido con parámetros de función pulmonar [12]. En base a los valores del FEV₁ se establecieron los cuatro grados anteriormente mencionados con supervivencias bien diferenciadas [6]. También el cociente entre la capacidad inspiratoria y la capacidad pulmonar total (IC/TLC, en sus siglas en inglés) tiene un valor predictivo independiente de mortalidad. Otras variables, como la prueba de esfuerzo (valorada con el test de marcha de 6 minutos), la disnea, la pérdida de peso no intencionada, la suma de varias de ellas en un índice [13], o las exacerbaciones han sido capaces de predecir el riesgo de muerte en pacientes con EPOC. En la práctica, estas variables nos están identificando al paciente más grave, que tiene más probabilidades de morir por causas respiratorias [14].

Diagnóstico

El diagnóstico de la EPOC es clínico-funcional y está basado en dos criterios:

- Historia de inhalación crónica de una sustancia tóxica. En nuestro medio el más común es el humo del tabaco (especialmente > 10 paq-año), aunque también biomasa y otras sustancias pueden constituir un factor de riesgo.
- Espirometría con obstrucción al flujo aéreo (cociente FEV₁/FVC < 0,7). La espirometría se tiene que realizarse en reposo, en fase estable (con el paciente no exacerbado) y tras test broncodilatador.

Sin embargo, a pesar de la extensa aceptación de estos criterios, es preciso matizar algunos aspectos de controversia actual sobre la exposición de tóxicos

inhalados, la expresión de la limitación funcional o su asociación con otras enfermedades respiratorias.

Tabaco. En nuestro medio el tóxico más frecuente es el humo del tabaco. El tabaco es sin duda el factor de riesgo más importante para desarrollar una EPOC y puede aparecer con cualquier tipo de tabaco inhalado (cigarrillos, cigarros puros, tabaco en pipa etc.). Cuando son cigarrillos, el consumo de tabaco se mide en paquetes-año. No hay estudios que nos digan de manera inequívoca a partir de cuántos paquetes-año puede uno desarrollar la EPOC y probablemente este límite sea artificioso o carezca de interés. La relación del tabaco con la EPOC es dosis-dependiente, por lo que cuanto más tiempo de exposición tengamos, más probabilidades de desarrollar la enfermedad. Por consenso, algunos autores sitúan este consumo mínimo en 10 ó 20 paq-año, aunque están descritos casos de EPOC con consumos menores. Sin embargo, no todos los fumadores desarrollan una EPOC. Se estima que lo hacen entre el 15% y el 20% de los fumadores, por lo que seguramente existen otros condicionantes (genéticos, ambientales,...etc) que influyen en su aparición.

Tabaquismo pasivo. El tabaquismo pasivo también puede contribuir a la aparición de síntomas respiratorios y el desarrollo de una EPOC. La exposición prolongada durante la vida al humo de tabaco ambiental en casa y en el trabajo se ha asociado a un aumento del riesgo de desarrollar una EPOC [15].

Biomasa. El tabaco no es el único tóxico que puede producir EPOC. La inhalación de otras sustancias también ha sido descrita como causantes de EPOC. Entre ellas, la más descrita ha sido la biomasa. Biomasa es la abreviatura de masa biológica o cantidad de materia viva producida en un área determinada. El término de biomasa suele ser empleado en relación a la energía

de biomasa, es decir, al combustible energético que se obtiene directa o indirectamente de estos recursos biológicos. Esta energía de biomasa continúa siendo la fuente principal de energía en zonas en desarrollo, generalmente para cocinar y para calefacción, y suele proceder principalmente de la madera, residuos agrícolas y el estiércol. Cada día existen más trabajos que relacionan el uso de energía de biomasa en los hogares con el desarrollo de la EPOC [16]. Esta EPOC por biomasa es similar a la EPOC por tabaco tanto desde el punto de vista clínico, como en calidad de vida y pronóstico [17].

Exposición laboral. La exposición laboral es otra fuente de inhalación crónica de tóxicos. Hasta la presente existen menos trabajos que hayan analizado la importancia de estos tóxicos en el desarrollo de la EPOC, aunque cada día existen más datos en este sentido. De esta manera, hoy en día se considera que la inhalación de tóxicos en el lugar de trabajo puede ser causa de EPOC [18,19].

Polución ambiental. No está claro el papel de la polución ambiental en el desarrollo de la EPOC y, en todo caso, sería un riesgo considerablemente menor al compararlo con el humo del tabaco.

Espirometría. El criterio funcional es fundamental para establecer un diagnóstico de EPOC, de manera que hoy en día no se puede establecer este diagnóstico si no se dispone de una espirometría con obstrucción al flujo aéreo (cociente $FEV_1/FVC < 0,7$). La espirometría se tiene que hacer en reposo, en fase estable y tras la realización de un test broncodilatador, ya que es la obstrucción que persiste tras dar un broncodilatador la que define la enfermedad. Aunque este criterio parece claro, existen algunas áreas de incertidumbre que merece la pena comentar.

Test broncodilatador. La realización del test broncodilatador ha ido modificándose en las últimas décadas. Actualmente se recomienda que este test se haga con 400 µg de salbutamol o 1000 µg de terbutalina, repitiéndose la maniobra a los 15 minutos [20]. Existen igualmente diversas fórmulas para calcular la bronco-reversibilidad, siendo la más usada la que calcula el cambio con respecto al teórico y se considera positiva si aumenta el FVC o el FEV₁ un 12% siempre que este aumento conlleve una mejoría de 200 mL.

Límite inferior de la normalidad. El pulmón de las personas sanas, con el paso de los años, va experimentando una pérdida progresiva de función. De esta manera, en edades muy avanzadas se han descrito caídas del FVC y FEV₁ que podrían cumplir el criterio diagnóstico de EPOC sin que tuviera esta enfermedad. Por este motivo, algunos autores proponen que para diagnosticar la EPOC no se debería tener un límite fijo en FEV₁/FVC < 0,7, sino que debería ser el límite inferior del intervalo de normalidad para la población sana en cada rango de edad [21]. Este debate está aún de actualidad. Aunque los espirómetros podrían hacer este cálculo, aún no disponemos de información en población normal sobre la evolución a largo plazo del FEV₁ post-broncodilatador. Por lo que, aún se necesitan estudios de normalidad con seguimiento a largo plazo antes de poder poner esto en práctica.

EPOC y asma. EPOC y asma son dos enfermedades distintas y, por tanto, pueden coexistir en un mismo individuo. Desafortunadamente, hoy en día no disponemos de una herramienta diagnóstica que nos aclare con precisión si un individuo concreto tiene una EPOC con reversibilidad parcial, un asma con obstrucción crónica al flujo aéreo o si bien padece las dos enfermedades. Aunque la clínica típica de cada proceso es distinta, sobre todo por su presentación episódica en el asma, en la realidad se trata de un dato poco

específico y esto es igual para la reversibilidad de la espirometría. Hoy en día sabemos que un porcentaje no despreciable de los EPOC, bronco-revierten. Actualmente debemos echar mano de la historia clínica que nos permita poder establecer uno u otro diagnóstico. Lamentablemente siempre habrá casos en los que tengamos cierto grado de incertidumbre.

EPOC y lesiones residuales. La presencia de lesiones residuales en la radiología del tórax es de importancia a la hora de establecer el diagnóstico de EPOC y de clasificar su grado de severidad. Por un lado, las lesiones residuales pueden producir una obstrucción crónica al flujo aéreo que es indistinguible de la EPOC. Por otro lado, pueden también producir una restricción que ocasione una disminución del FEV₁ mayor, estableciendo un mayor grado de severidad.

Epidemiología.

El estudio de la epidemiología de la EPOC es una de las prioridades de la investigación en EPOC [22]. A pesar de que cada día tenemos más datos sobre los principales indicadores epidemiológicos, aún existen numerosas preguntas por responder, por lo que son necesarios estudios epidemiológicos que nos aporten nuevos datos sobre la EPOC. Un problema que ha tenido el estudio de la epidemiología de la EPOC deriva de la diversa nomenclatura empleada en el pasado para referirse a ella. Los principales datos sobre epidemiología de la EPOC son de prevalencia, mortalidad y morbilidad. Estas cifras varían entre países y, en general, están relacionadas de manera directa con la prevalencia del tabaquismo. En las próximas líneas revisaremos los principales datos epidemiológicos de la EPOC centrándonos en lo posible en estudios realizados en nuestro país.

Prevalencia.

Para interpretar correctamente los estudios de prevalencia, existen algunas consideraciones que deben ser tenidas en cuenta, principalmente, la variable resultado que empleemos para detectar un caso y la población diana a la que se refieren los resultados. En el caso de la EPOC, la población diana es de vital importancia, ya que se trata de una enfermedad asociada al consumo de tabaco y cuya prevalencia aumenta con la edad. Por esto a la hora de interpretar los resultados de prevalencia debemos referir la edad de la población que estamos estudiando y si los resultados se refieren a población general o población en riesgo (fumadora).

Sobre la variable resultado, es importante recordar que la definición de caso es trascendente a la hora de estudiar una prevalencia. Así, una posible estimación podría ser igualarla a la prevalencia de tabaquismo, como su principal factor de riesgo, ya que la prevalencia de tabaquismo está relacionada con la prevalencia de la enfermedad al igual que ocurre con el cáncer de pulmón. Sin embargo, sabemos que sólo un 20% de los fumadores desarrollan la enfermedad, por lo que constituye un estimador pobre. Para estimar la prevalencia, los principales estudios han utilizado tres posibles estrategias: la presencia de síntomas respiratorios crónicos, la presencia de OCFA o los diagnósticos recogidos en informes médicos.

En el primer caso, tiene la ventaja de poder recoger datos poblacionales de manera sencilla, ya que no precisan de ninguna prueba complementaria y por tanto es más económico. Sin embargo, los datos recogidos son poco específicos, ya que múltiples enfermedades respiratorias crónicas pueden presentar síntomas superponibles a la EPOC. El método más fiable es mediante la realización de espirometrías a la población, generalmente acompañada de

cuestionario de síntomas. Este método es más costoso y requiere una mayor infraestructura, pero obtiene cifras de prevalencia más reales. Un tercer método es la recogida de los diagnósticos recogidos en los informes realizados por un médico. Sin embargo, este método tiene el gran problema de que la EPOC es una enfermedad que está infra-diagnosticada por lo que los datos derivados de los informes médicos representan sólo a la población EPOC que ha solicitado o precisado asistencia sanitaria.

Las diferencias entre estos métodos de estudio de la prevalencia quedan reflejadas para nuestro país en los resultados del estudio IBERPOC. Este estudio fue un trabajo realizado a finales del siglo pasado cuyo objetivo era estimar la prevalencia de la EPOC en España. Según los resultados de este estudio, la prevalencia de síntomas respiratorios crónicos para la población general está en el 4,8% (intervalo de confianza al 95%: 4,1 – 5,4%) para la bronquitis crónica, 40% (IC95%: 38,7 – 41,7%) para la presencia de sibilantes y 13,5% (IC95%: 12,5 – 14,6%) para la tos crónica. De tal manera que el 48 % (IC95%: 46,4 – 49,5%) de la población española refería algún síntoma respiratorio. Al incluir la espirometría como diagnóstico, la prevalencia de la enfermedad se estimó en 9,1% (IC95%: 8,1 – 10,2%), que es la considerada como prevalencia de la EPOC en España [23]. Un dato interesante del estudio IBERPOC es que no había un diagnóstico previo de EPOC en el 78,2% de los pacientes incluidos y diagnosticados de EPOC [24], con lo que la prevalencia de la enfermedad se habría infra-estimado considerablemente si se hubiera empleado los informes médicos como método de estimación de la prevalencia.

Recientemente se han publicado los resultados de un nuevo estudio epidemiológico de base poblacional en España (estudio EPISCAN) que ha actualizado los datos de prevalencia en nuestro país. Según este trabajo, en

España hay una prevalencia de EPOC del 10,2% de las personas entre 40 y 80 años [25]. Sin embargo, aunque esto parece indicar un aumento de la prevalencia del 1,1% con respecto al estudio IBERPOC, parece que el distinto grupo poblacional estudiado y la actualización de los criterios diagnósticos hacen que ambos estudios no sean totalmente comparables de manera directa. Para poder compararlos es preciso ajustar IBERPOC a los criterios actuales seguidos por EPI-SCAN. Cuando se hace esta transformación se obtiene un descenso de la prevalencia de la enfermedad de 50,4% [26].

Existen otros estudios de prevalencia de la EPOC a nivel mundial. El estudio BOLD [27], uno de los principales estudios de prevalencia de EPOC a nivel mundial, obtuvo datos de prevalencia de 12 lugares del mundo de los 5 continentes y obtuvo una prevalencia global para el estadio GOLD II o superior de 10,1% (11,8% para los hombres y 8,5% para las mujeres). En este estudio, la prevalencia de la EPOC estaba relacionada con la edad y el consumo de tabaco en paquetes-año con aumentos significativos de prevalencia al aumentar alguna de estas dos variables, pero con mayor variación para las mujeres, según el área geográfica. Curiosamente, la prevalencia de los no fumadores fue similar a la de los fumadores con un consumo < 10 paq-año.

Finalmente, es importante conocer dos estudios latinoamericanos: el estudio PLATINO [28] realizado en 5 ciudades latinoamericanas y el estudio PREPOCOL realizado en Colombia [29]. Estos estudios nos aportan una prevalencia en latinoamerica entre 7,8% y 19%, con una media de 14,5%, cifras superiores a las previas, probablemente relacionadas con mayores prevalencias de consumo de tabaco.

Mortalidad.

En términos generales, la EPOC es una enfermedad con una alta mortalidad que está también aumentando [30], siendo la cuarta causa de mortalidad a nivel mundial, la quinta causa de muerte entre los varones con una tasa anual de 60 fallecimientos por 100.000 habitantes, y la séptima para las mujeres en nuestro país con una tasa anual de 17 muertes por 100.000 habitantes.

Sin embargo, el estudio de la mortalidad por EPOC en nuestro país tiene dos limitaciones que deben ser tenidas en cuenta antes de interpretar sus resultados. En primer lugar, debido a la variada terminología empleada en tiempo pasado, la codificación de esta enfermedad en las clasificaciones internacionales de enfermedades y por tanto en las bases de datos de mortalidad ha sido desigual. En los años 60 la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE) versión 8 se recogía exclusivamente los términos de bronquitis crónica y enfisema. Posteriormente, durante la década de los 70, el término EPOC comenzó a difundirse y sustituir progresivamente los conceptos antiguos aunque no en todos los países por igual. Esta situación se igualó en las versiones 9 y 10 de la CIE que recogían el término de EPOC. Sin embargo, la falta de criterios diagnósticos claros para algunas de las diversas entidades que se codifican bajo el epígrafe de EPOC continúa constituyendo un problema.

En segundo lugar, los estudios de mortalidad se suelen basar en la información recogida de datos oficiales que están basados en certificados de defunción. Al contrario de lo que ocurre con el cáncer, en nuestro país no tenemos datos de la veracidad de los certificados de defunción para detectar la EPOC. El único estudio de que disponemos sobre la calidad de la certificación se realizó en Valencia [31] y los autores encontraron que la veracidad de los certificados era

aceptable para las enfermedades neoplásicas y cardiovasculares, pero la tasa de detecciones para enfermedades respiratorias era del 55,3%.

A pesar de estas limitaciones, parece claro que la EPOC es una de las principales causas de mortalidad. Las cifras de mortalidad han ido aumentando de manera constante en los últimos años en todo el mundo. Esta tendencia es especialmente llamativa si la comparamos con otras enfermedades de alta mortalidad como las cardiovasculares cuya mortalidad está disminuyendo. En este sentido, el Global Burden of Disease Study pronosticó que la EPOC pasaría de ser la sexta causa de mortalidad en 1990 a ser la tercera en el año 2020 [30].

La mortalidad por EPOC está relacionada con la prevalencia de tabaquismo y la edad de la población. Por lo que es de esperar que cambios en el hábito tabáquico y en la estructura de la población tengan una repercusión en la misma. En este sentido, diversos estudios han mostrado un aumento de la mortalidad por EPOC en mujeres llegando a superar a los hombres en EE.UU. [32]. Lamentablemente, se espera que esta situación se dé en otros países conforme aumente la prevalencia de tabaquismo entre las mujeres. Actualmente, existen ya tres países con mayor prevalencia de tabaquismo entre las mujeres: Noruega, Suecia y Nueva Zelanda [33].

Las causas de mortalidad de los pacientes con EPOC han sido evaluadas en diversos estudios observacionales y ensayos clínicos. El análisis de mortalidad realizado durante el estudio TORCH [34] reveló que, de manera global, la mayoría de los pacientes (35%) fallecieron por causa respiratoria, seguidos por las causas cardiovasculares (26%) y el cáncer (21%). Esto significa que, de manera global, sumando todas las causas, es más frecuente morir con EPOC que morir de EPOC. Por otro lado, las causas de mortalidad varían según el

grado de severidad de la EPOC. En los pacientes con EPOC leve o moderada la principal causa de mortalidad es el cáncer y las enfermedades cardiovasculares, mientras que los EPOC con $FEV_1 < 60\%$ el fallo respiratorio es la causa más importante [35]. Por estos motivos, el estudio y tratamiento de las comorbilidades en los pacientes con EPOC está tomando una especial relevancia en los últimos años.

Morbilidad.

La evaluación de la morbilidad incluye el número de visitas al médico, los ingresos por agudizaciones y las visitas a urgencias. Los datos de morbilidad presentan también problemas metodológicos, ya que están sujetos a factores externos como la disponibilidad de camas o la accesibilidad a una atención sanitaria de cada área geográfica. Sin embargo, es importante registrar la utilización de los servicios sanitarios con objeto de hacer políticas sanitarias acordes a las necesidades de cada área.

Siendo la EPOC una enfermedad crónica y progresiva es esperable encontrar una alta morbilidad como consecuencia del alto número de visitas al médico y las agudizaciones. En un estudio sobre morbilidad observaron que en los pacientes EPOC cerca del 25% habían acudido a un médico una vez al año durante el último año, más del 60% ha acudido a un médico en los últimos seis meses y menos del 20% no ha acudido a ningún médico durante el último año [36]. De esta manera, la EPOC tiene consecuencias en la vida de los pacientes con un impacto considerable en su calidad de vida [37]. Además, este alto consumo de recursos conlleva un gasto para el sistema sanitario considerable.

Impacto económico.

Finalmente, la EPOC supone un importante impacto económico en el sistema sanitario, tanto por el diagnóstico y tratamiento en fase estable como derivado de los costes por hospitalización [38]. Los pacientes con EPOC suelen tener una edad avanzada y con frecuencia presentan comorbilidades importantes que también requieren atención médica, aumentando significativamente los costes sanitarios [39]. No hay duda de que las comorbilidades aumentan el riesgo de hospitalización y la mortalidad, especialmente en aquellos pacientes con vías respiratorias donde la obstrucción se hace más grave [40]. En España los datos del estudio IBERPOC permitieron estimar que el coste de la EPOC fue de 238,82 millones de euros [41], de los que la mayor carga era por hospitalizaciones (41%) seguido del gasto en tratamiento farmacológico (37%). Este gasto por hospitalizaciones se ha constatado también en Andalucía donde se ha estimado que los ingresos por EPOC costaron un mínimo de 27 millones de euros durante el año 2002 [38].

Patogenia

Desde el punto de vista de su patogenia, la EPOC es una enfermedad crónica inflamatoria del aparato respiratorio producida como consecuencia de una respuesta inflamatoria anómala ante la inhalación repetida de sustancias tóxicas. En nuestro país como en la mayoría el mundo industrializado, esta sustancia es el tabaco. El tabaco es responsable de un número creciente muertes prematuras en el mundo [42]. Actualmente disponemos de suficiente evidencia científica para afirmar que el tabaco es el principal factor de riesgo para desarrollar una EPOC. Sabemos que los fumadores tienen mayor prevalencia de síntomas respiratorios, de alteraciones funcionales y de un mayor declive del FEV₁ que los no fumadores. Por otro lado, al dejar de fumar, este declive del FEV₁ disminuye y

se produce una mejoría de la función pulmonar y una disminución de los síntomas respiratorios y de la hiperreactividad bronquial [43], con un impacto en la mortalidad [44]. Por lo tanto, la abstención del hábito tabáquico se ha convertido en uno de los pilares del tratamiento de la EPOC.

Este efecto del tabaquismo como principal factor de riesgo para la EPOC se ha demostrado también en el tabaquismo pasivo. Como hemos mencionado anteriormente la exposición ambiental al humo del tabaco se ha asociado con la presencia de EPOC y de síntomas respiratorios [45]. Además, los niveles elevados de contaminantes ambientales presentes en las casas de los pacientes con EPOC se ha asociado con un peor estado de salud de estos pacientes [46], lo que refuerza la necesidad de evitar el contacto con el humo del tabaco por completo.

A pesar de ser una enfermedad con un agente causal conocido, aún existen numerosos aspectos desconocidos de la patogénica de la EPOC. El principal motivo de controversia es dilucidar por qué algunos sujetos fumadores desarrollan la enfermedad mientras otros no. Sabemos que sólo el 15-20% de los fumadores desarrollan la enfermedad, por lo que el tabaco es una causa necesaria pero no suficiente. En la mayoría de los fumadores esta inflamación local inducida por el humo del tabaco es autolimitada y la enfermedad no se desarrolla. En este contexto los cambios que acontecen parecen estar limitados exclusivamente a una función fisiológica reparadora tras una agresión. Sin embargo, en una subpoblación elevada de fumadores (15-20%) esta respuesta autolimitada en un momento determinado cambia a un proceso inflamatorio irreversible e independiente de la continuación del hábito tabáquico [47]. Por esto, para comprender adecuadamente la patogenia, probablemente el principal foco de atención deberíamos centrarlo en el momento en que un estímulo nocivo

como el humo del tabaco, pasa de ser un proceso agudo reversible y autolimitado al cesar el mismo a un proceso crónico irreversible independiente de la abstención del hábito tabáquico. Hasta el momento no se conocen los factores relacionados con este cambio y mientras no los conozcamos seguiremos sin conocer uno de los datos fundamentales en la patogenia de la enfermedad.

Desde el punto de vista patogenético parece que puede estar implicados al menos 4 mecanismos: inflamación local, desbalance oxidativo, apoptosis y desbalance proteasas/antiproteasas.

Inflamación local.

Con el término de inflamación local nos referimos a los mecanismos inflamatorios relacionados directamente con la enfermedad que ocurren en el aparato respiratorio. Para analizar la relevancia de esta inflamación local en la EPOC es importante que recordemos, al menos, tres trabajos recientes. El primero es el trabajo de Hogg y cols [48] en el que los autores estudiaron la vía aérea de pulmones resecados por diversos motivos de pacientes con EPOC de diverso grado y en los que analizaron por inmunohistoquímica los cambios histológicos y la distribución celular presente. Los autores encontraron que existían cambios inflamatorios incluso en el antiguo estadio 0 de la GOLD (aquel con clínica, pero sin obstrucción detectable por espirometría), por lo que incluso en estadios muy iniciales, antes de que aparezca la obstrucción, ya existe un proceso inflamatorio subyacente.

El segundo estudio que debemos comentar es el publicado por Lappere y cols. [49] en el que empleando un diseño observacional transversal estudiaron a un grupo de 114 pacientes con EPOC. En estos pacientes estudiaron la inflamación

presente en biopsias bronquiales y compararon 3 grupos: fumadores activos, exfumadores de menos de 3,5 años sin fumar y exfumadores de más de 3,5 años sin fumar. Los autores observaron que el infiltrado celular persistía de manera similar en los 3 grupos, a pesar de llevar un tiempo sin fumar, por lo que la inflamación restante persiste a pesar de haber dejado de fumar.

El tercer estudio que debemos recordar es el de Aaron y cols. [50] en el que los autores estudian los cambios en los marcadores inflamatorios durante las exacerbaciones, observando un aumento de diversos marcadores inflamatorios durante la misma. Este aumento era incluso más llamativo cuando la causa de la exacerbación era no infecciosa.

Por tanto, estos tres estudios nos permiten definir tres importantes características de la inflamación local en la EPOC: que está presente desde los estadios más precoces de la enfermedad, que persiste incluso al dejar de fumar y que aumenta con las exacerbaciones.

Esta afectación ocurre en las vías aéreas centrales, periféricas y el parénquima pulmonar [51]. Aunque su mecanismo no está bien definido, se cree que puede estar condicionado genéticamente. El carácter inflamatorio de este compartimento pulmonar ha sido ampliamente estudiado. Trabajos recientes han avanzado en el estudio del componente inflamatorio, describiendo el tipo, lugar y grado de inflamación en el pulmón de la EPOC, así como su relación con la severidad de la enfermedad. En este sentido, algunos autores han demostrado que la progresión de la EPOC está asociada con un mayor volumen de tejido en las paredes bronquiales y un acumulo de exudados inflamatorios en la luz de las pequeñas vías aéreas con predominio de linfocitos (en particular CD8+) y gran presencia de neutrófilos a dicho nivel [48]. De esta manera, los principales

elementos celulares implicados en esta respuesta inflamatoria son las células epiteliales bronquiales, los fibroblastos, las células dendríticas, los macrófagos, neutrófilos y linfocitos CD8. De estos estudios se pueden desprender al menos 3 ideas relevantes: a) que la inflamación está presente desde momentos iniciales de la enfermedad [48], b) que una vez establecida es independiente del consumo de tabaco [49] y c) que dicha inflamación aumenta durante los periodos de exacerbación de la enfermedad [50].

Estrés oxidativo.

El estrés oxidativo o, mejor dicho, el desbalance oxidantes/antioxidantes es otro componente de relevancia en la patogenia de la EPOC. Ya sea por la acción directa de los agentes oxidantes presentes en el tabaco o bien por la formación de sustancias derivadas de la peroxidación de los lípidos de la membrana celular, el estrés oxidativo parece tener un papel relevante en la patogenia de la EPOC. Este papel podría ejercerlo de diversas maneras. Por un lado, por acción directa de los radicales libres que produjeran cambios conformacionales en las proteínas alterando su estructura y función. Por otro lado, el estrés oxidativo tiene un papel en la activación de las proteasas, facilitando su acción y estimulando de esta manera esa otra vía patogénica. Finalmente, el desbalance oxidativo es capaz de activar factores de transcripción sensibles al mismo como el factor nuclear kB o la proteína activadora-1. Esto produce un aumento de la síntesis de mediadores inflamatorios implicados en la patogenia de la EPOC aumentando la respuesta inflamatoria.

Proteasas.

El desbalance entre proteasas y antiproteasas se ha descrito como mecanismo de importancia en el enfisema. Hoy en día disponemos de bastante bibliografía que muestra el papel de un desbalance proteasa/antiproteasa a favor del primero

que llevaría a una destrucción de diversos componentes del tejido conectivo, especialmente la elastina, como principal mecanismo patogénico del enfisema. Diversos trabajos han demostrado el papel tanto de serín y cisteinproteasas como de las metaloproteasas [52].

Las serín-proteasas, principalmente elastasa, la catepsina G y la proteinasa 3, están relacionadas con la degradación de la elastina, ya sea por aumento de su actividad como por disminución de sus antiproteasas, la más conocida, la alfa1-antitripsina. Entre las cistein-proteasas, las catepsinas han sido las más estudiadas, especialmente las catepsinas C y L que se han encontrado elevadas en los pacientes con EPOC [53].

Finalmente, recientemente se ha centrado el interés en las metaloproteasas de la matriz extracelular (MMP). Aunque inicialmente se describieron como proteasas que degradan proteínas presentes en la matriz extracelular, como colágeno, elastina o proteoglicanos, diversos estudios in vivo han demostrado su papel como enzimas en diversos sustratos extracelulares como la activación de formas latentes de proteínas efectoras con efecto antimicrobiano o bien para alterar la función de una proteína, con lo que tienen un papel en la homeostasis del medio extracelular [54]. Existen al menos 17 MMP descritas, de las que varias han obtenido relación con la EPOC, principalmente la MMP-1 (colagenasa), MMP-9 (gelatinasa B) y MMP-12 (metaloelastasa). Están controladas por los inhibidores tisulares de las MMP y su papel ha sido estudiados en EPOC observando una relación con el grado de obstrucción [55].

Apoptosis.

Por último, un aumento de la apoptosis también se ha descrito como un mecanismo en la patogenia del enfisema y se ha incorporado recientemente a

las teorías de la EPOC [56]. Diversos trabajos apuntan incluso hacia un papel colaborador entre la apoptosis y el desbalance oxidativo en la patogenia del enfisema [57] o con el desbalance de las proteasas [58], lo que va conformando un cuadro global de la patogenia de la EPOC.

Consecuencias de la inflamación local.

Los mecanismos propuestos que conducen a la EPOC y los fenómenos que llevan a la progresión de la enfermedad, son consecuencia de la inflamación mediada por células T. Estas células son activadas por los antígenos liberados tras la lesión pulmonar que produce el humo del tabaco. Podemos dividir este mecanismo inflamatorio en tres pasos sucesivos.

En primer lugar, la respuesta inicial al humo del cigarrillo. La inmunidad innata y la inmunidad adquirida o específica son los componentes de un sistema integrado en el cual las células y las moléculas actúan de forma cooperativa. La inmunidad innata se basa en el reconocimiento de moléculas específicas, a diferencia de la inmunidad adquirida, cuya respuesta se desencadena ante la unión de un antígeno a su receptor específico. La inmunidad innata es una respuesta rápida que sirve para estimular y actuar mientras se constituye la inmunidad adquirida [59]. El mecanismo por el cual los irritantes del humo del tabaco activan la respuesta inmune innata, es desconocido. Matzinger [60], propone una explicación lógica. Este autor señala que no es la presencia de un microorganismo la que activa la respuesta inmunológica, sino que esta respuesta se desencadena tras estrés celular o daño tisular, como resultado de la infección. Los receptores tipo Toll (TLR), de los que existen 15 tipos diferentes, actúan como sensores del sistema inmune innato que reconocen patrones moleculares que aparecen ante la presencia de patógenos.

Cada inhalación de un cigarrillo contiene más de 2000 compuestos xenobióticos y 10^{14} radicales libres, que dañan las células epiteliales pulmonares en un grado directamente proporcional a su concentración [61,62]. Los productos derivados de esta lesión epitelial, pueden actuar como ligandos de TLR4 y TLR2. Cuando cualquiera de estos receptores se unen con su ligando se activa el factor nuclear κ B (NF-KB) [63,64], e induce a las células epiteliales a producir mediadores inflamatorios. Estos mediadores activan a su vez a los neutrófilos y macrófagos alveolares [65] que a su vez liberan enzimas proteolíticas, que junto a radicales libres dañan aún más el tejido pulmonar [66]. La exposición ambiental o a agentes infecciosos, el traumatismo de los tejidos, el estrés oxidativo, o la muerte celular [67] podrían liberar autoantígenos secuestrados [68], modificar proteínas, producir daño mitocondrial y finalmente producir liberación de ADN celular por apoptosis [69]. La adaptación del sistema inmune puede reconocer estos productos como antígenos extraños y desencadenar una reacción inmune [61]. Estos y otros mecanismos similares han sido descritos ya en enfermedades crónicas, como la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple o el lupus eritematoso sistémico [62]. En los fumadores estos antígenos podrían ser liberados como resultado de la necrosis y apoptosis de células epiteliales y endoteliales ante el daño de la matriz extracelular. [70]. Los autoantígenos no son por sí mismo capaces de desencadenar una respuesta inmune, son los TLR los que potenciarán a estos antígenos, realizando la unión entre las respuesta inmune y la adaptativa [71]. El resultado final es que los macrófagos y las células dendríticas liberan citoquinas y quimiocinas que crean las condiciones necesarias para que se active el sistema inmune adaptativo [72].

Este paso inicial, nos llevaría a pensar que en la mayoría de los fumadores, la enfermedad pulmonar no avanzaría si la inflamación pulmonar se reduce al

mínimo y no se permite que esta inflamación progrese. Esta etapa podría corresponder con aquellos fumadores que tienen aún una función pulmonar normal.

La segunda fase corresponde con la activación y proliferación de las células T. Las células dendríticas son las que alertan al sistema inmune adaptativo ante la presencia de patógenos o daño del tejido pulmonar [73]. Las células dendríticas maduras expresan altos niveles del complejo de histocompatibilidad clase II de las proteínas y moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86, que le conducirán a los ganglios linfáticos locales donde se le presentaran los antígenos a las células T [74]. La expresión de la IL-12 por las células dendríticas activa el transductor de la señal y activa la transcripción, lo que induce a las células T a diferenciarse en el tipo 1 (Th1) y a su vez producir Interferón γ .

En los EPOC fumadores existe un aumento marcado de células dendríticas maduras en la vía aérea periférica [75]. También existe un aumento de linfocitos T CD4+ que expresan STAT4 en los pulmones. De esta forma la expresión de STAT4 e interferón γ se correlaciona con el grado de obstrucción al flujo aéreo de los pacientes EPOC [76].

Lo más probable es que el material producido por el daño pulmonar en los fumadores, por estrés celular y necrosis debido a la apoptosis celular [77], es absorbido y presentado por células dendríticas clase I a los linfocitos T CD8+. Siendo estas células T muy abundantes en los pulmones de los EPOC [78]. Es curioso que las células T en reposo, no puedan pasar al parénquima pulmonar, fuera de los vasos sanguíneos, pero una vez activadas por las células dendríticas portadoras de antígenos, pueden penetrar en el pulmón por medio de receptores tisulares específicos [79].

En los pulmones de los pacientes EPOC fumadores, las células T CD4+ y CD8+ expresan en su superficie quimiocinas específicas, receptores CXCR3, CCR5 y CXCR6 [80], pero no expresan CCR3 o CCR4, ambos expresados por células Th2 CD4+ en el asma [81]. Los ligandos para CXCR3-CXCL10 (proteína inducible por interferón 10 o IP-10) y CXCL9 (monocina inducida por el Interferón γ o MIG) son expresadas por las células estructurales de las vías respiratorias y arterias pulmonares de pacientes con EPOC, pero no se expresan en las de los fumadores sin EPOC o en los no fumadores. La expresión de estos receptores y sus ligandos se correlaciona con la gravedad de la enfermedad [74].

En esta segunda fase, la progresión de la enfermedad está determinada por la capacidad de las células dendríticas de estimular las células T.

La tercera etapa se produce con la constitución de la respuesta inmune adaptativa. Los linfocitos T CD8+ son las células predominantes en las vías aéreas centrales [82], en las vías aéreas periféricas y en el parénquima pulmonar [83] de los pacientes con EPOC. El número de CD8+ existentes en el pulmón se correlaciona con el grado de obstrucción al flujo aéreo y enfisema, lo que sugiere que estas células producen daño en el tejido pulmonar de los EPOC [84]. Cualquier molécula que muestre las moléculas MHC de clase I, pueden ser un objetivo para los linfocitos T CD8+ citotóxicos. Después de un ataque citolítico, las células diana mueren por apoptosis o necrosis, producida por enzimas proteolíticas liberadas por estos linfocitos [85] en los pulmones de los pacientes con EPOC [86].

En los pulmones de los fumadores con EPOC, las células epiteliales y endoteliales sufren apoptosis y el grado de esta apoptosis aumenta a medida

que se prolonga el hábito tabáquico, correlacionándose a su vez con el número de linfocitos T CD8+ que existe en ese pulmón [87].

Otra señal de apoptosis podría ser la pérdida de contacto con las células de la matriz extracelular, inducida por fallo en las proteasas [88]. La apoptosis y la necrosis de las células epiteliales y endoteliales inducidas por los linfocitos T CD8+ y posiblemente por la alteración en las proteasas, hace que la proliferación celular no compense a esta destrucción, lo que conlleva al daño en el tejido pulmonar de pacientes EPOC [89]. A esto se asocia una deficiente fagocitosis de células de apoptosis por los macrófagos alveolares de pacientes con EPOC [90], por una alteración que aumentaría el material antigénico, ya descrito en diversas enfermedades autoinmunes [91].

Las células CD4+ también se encuentran en gran número en las vías respiratorias y el parénquima pulmonar de los EPOC [48]. Estas células se activan apareciendo en los pulmones pero no en la sangre, lo que sugiere que su acumulación es el resultado de la estimulación por los antígenos distribuidos por todo el pulmón [92]. Los CD4+ en los pulmones expresan STAT4 e interferón γ , lo que sugiere estimulación antigénica. De este modo, el número de CD4+ que expresan Interferón γ se correlaciona con el grado de obstrucción al flujo aéreo [76], apoyando la hipótesis de que éstas células junto con los linfocitos CD8+ desempeñan un papel fundamental en la patogenia de la EPOC.

Ha sido demostrada la presencia de células B en los folículos linfoides de las vías respiratorias y del parénquima pulmonar de los pacientes con EPOC y en ratones expuestos al humo del cigarrillo [93]. La ausencia de productos bacterianos y virales en los folículos, sugiere que las células B oligoclonales surgen en respuesta a antígenos pulmonares [89]. Sin embargo las infecciones

bacterianas y virales podrían ser importantes en la perpetuación del proceso inflamatorio y son consideradas como la principal causa de las exacerbaciones en la EPOC [94]. Estas infecciones podrían ser el desencadenante de la respuesta inmune que culmina con el daño pulmonar [95].

Por último, la EPOC grave, en la que la inflamación pulmonar incluye la activación de un gran número de células T Th1, células B y células T CD8+, que persiste durante años después de dejar de fumar [96]. Este proceso de auto-perpetuación, sugiere cierto grado de autoinmunidad en la EPOC, como una respuesta a antígenos propios [97].

Fisiopatología

Los mecanismos patogénicos descritos con anterioridad producirán cambios fisiopatológicos a distintos niveles.

En la vía aérea, la hipertrofia glandular genera una sobreproducción de moco así como una metaplasia escamosa del epitelio, con pérdida de cilios e incremento de células de músculo liso y tejido conectivo. A medida que la enfermedad progresa, aparece fibrosis e incremento en el depósito de fibras de colágeno. El remodelado de la vía aérea que se produce como consecuencia de estos fenómenos se traduce por cambios espirométricos, que permiten realizar el diagnóstico y establecer la gravedad de la enfermedad [98]. Inicialmente se detecta únicamente una disminución de los mesoflujos espiratorios. Posteriormente se demuestra, de forma paulatina, el aumento del volumen residual (VR), la concavidad en la rama espiratoria de la curva flujo-volumen y el alargamiento de la misma en la curva volumen-tiempo.

A nivel del parénquima pulmonar, la destrucción del tejido y la disminución de las fibras elásticas dan lugar a la aparición del enfisema [99]. Se produce entonces

un aumento de la distensibilidad pulmonar y un incremento de la capacidad residual funcional (CRF).

Los cambios que se producen en los volúmenes pulmonares estáticos, de forma resumida, consisten en un aumento del VR y de la CRF y una disminución de la capacidad inspiratoria (CI), la capacidad vital (CV) y la capacidad pulmonar total (CPT). Al aumento anormal del volumen pulmonar tras una espiración espontánea se le denomina hiperinsuflación. Esta alteración es responsable de los cambios estructurales que se producen en el tórax para poder alojar el aumento de volumen.

Además, sus mecanismos de compensación provocan la clínica de disnea y de limitación al ejercicio en aquellas situaciones en las que se produce un aumento de la demanda ventilatoria.

Los cambios anatómicos que se han descrito conllevan una distribución anormal de la relación ventilación-perfusión lo que, en estadios avanzados de la enfermedad, da lugar a hipoxemia, con o sin hipercapnia. La alteración en la difusión se correlaciona con la gravedad del enfisema.

A nivel del lecho vascular pulmonar se produce un engrosamiento de las paredes de los vasos y disfunción endotelial. Posteriormente se produce un aumento del músculo liso vascular e infiltración de la pared del mismo por células inflamatorias y depósitos de colágeno [100]. Estos cambios estructurales, mantenidos y perpetuados por la hipoxemia, desembocan en hipertensión pulmonar y disfunción del ventrículo derecho.

Los cambios que ocurren en la estructura de las vías aéreas de pacientes con EPOC se han denominado, en conjunto, procesos de remodelado bronquial [101]. Desde un punto de vista estructural, estos cambios se asocian con el aumento tanto del número de miofibroblastos que expresan α -actina como del contenido de colágeno (tipos I, III y V) [102]. Las implicaciones clínicas del

remodelado de las vías aéreas en la EPOC parecen ser relevantes. Hasta ahora no se ha definido si los procesos de remodelado del músculo liso y la expresión de mediadores proinflamatorios y de crecimiento celular guardan alguna relación con la clínica y la evolución de la enfermedad o la respuesta a tratamientos específicos, como broncodilatadores o antiinflamatorios [103].

Uno de los problemas implícitos en el análisis de estas relaciones es la evidencia de que los procesos de inflamación epitelial y remodelado se observan incluso en casos leves de EPOC, y persisten a pesar del tratamiento con glucocorticoides [104].

Inflamación sistémica

Existe una evidencia convincente de que la EPOC se asocia con niveles aumentados de citocinas proinflamatorias circulantes como por ejemplo el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y sus receptores solubles (sTNF-R55 y sTNF-R75), interleucina (IL) 6 y 8, reactantes de fase aguda como la proteína-C-reactiva (PCR), estrés oxidativo y activación de varias células inflamatorias (neutrófilos, monocitos y linfocitos) [105]. Todos estos estudios han sido reanalizados en un reciente metaanálisis cuyos resultados son concluyentes: la EPOC se asocia a inflamación sistémica [106]. Sin embargo, varios aspectos quedan sin resolver.

En primer lugar no sabemos si todos los pacientes con EPOC o sólo un subgrupo de ellos van a presentar inflamación sistémica, de la misma manera que no todos los pacientes con obstrucción crónica al flujo aéreo desarrollan enfisema evidente en la TAC, lo que puede conferiría a este subgrupo de pacientes una característica “fenotípica” diferente.

Por otro lado, se desconocen las variaciones longitudinales tanto cualitativas como cuantitativas de dichos parámetros de inflamación sistémica, ya que todos los estudios desarrollados hasta la fecha son transversales. Lo que sí es conocido es que la inflamación sistémica se acentúa durante los episodios de exacerbación de la enfermedad, volviendo a los niveles basales tras su resolución [107,108].

El origen de la inflamación sistémica no está aclarado y se plantean varios mecanismos posibles. En primer lugar puede ser consecuencia directa del humo del tabaco, principal factor de riesgo para desarrollar EPOC y que puede, por sí mismo, desarrollar inflamación sistémica (aun en ausencia de EPOC) [109]. De hecho, se cree que la inflamación sistémica contribuye de forma significativa a la arterioesclerosis observada en los fumadores [110]; aunque, por otro lado, no parece que el hecho de ser fumador activo o exfumador tenga influencia significativa sobre el grado de inflamación sistémica [63]. Por tanto, es poco probable que el tabaco sea el único mecanismo que explique la inflamación sistémica en la EPOC.

Una explicación alternativa es que el proceso inflamatorio que caracteriza a los pulmones de estos pacientes “rebose” al compartimento sistémico, a través de la circulación y contribuya a activar diferentes células inflamatorias en su tránsito hacia la circulación pulmonar. Para explorar esta hipótesis Vernooij et al. compararon el nivel de diferentes marcadores inflamatorios en esputo inducido (inflamación local) y en plasma (inflamación sistémica) de pacientes con EPOC moderado y fumadores con función pulmonar normal y no encontraron ninguna correlación significativa, concluyendo que la inflamación sistémica en estos enfermos no es consecuencia del paso de estos mediadores inflamatorios desde el pulmón al compartimento sistémico y que el proceso inflamatorio se regula de forma diferente en estos dos compartimentos [111].

Otro mecanismo potencial que puede contribuir de forma potencial a la inflamación sistémica en la EPOC es la hipoxia tisular. Takabatake et al. estudiaron la relación entre la hipoxemia arterial y los niveles circulantes de TNF- α y sus receptores solubles (sTNF-R55 y sTNF-R75) en 27 pacientes con EPOC y 15 controles sanos, encontrando niveles aumentados de todos los marcadores inflamatorios en los pacientes con EPOC que se correlacionaban con la severidad de la hipoxemia [112]. De confirmarse estos hallazgos en estudios diseñados a tal efecto, sería factible pensar que la oxigenoterapia pudiera reducir la carga inflamatoria en estos pacientes, contribuyendo así a la mejoría en la supervivencia que se observa en estos pacientes.

El músculo esquelético puede ser otra fuente potencial de inflamación en pacientes con EPOC, particularmente durante el ejercicio, aunque también puede ser, como veremos más adelante, un órgano diana de la inflamación sistémica. Rabinovich et al. demostraron que el ejercicio moderado incrementa los niveles plasmáticos de TNF- α en pacientes con EPOC grave y no en los controles [113]. Otros estudios también han apoyado el papel del músculo como generador de inflamación sistémica en la EPOC [114].

La médula ósea también puede ser una fuente de producción de inflamación sistémica. Es bien conocido que el tabaquismo crónico causa leucocitosis en humanos e induce un número de cambios fenotípicos en leucocitos polimorfonucleares circulantes que son característicos de la estimulación crónica de la médula ósea, como un incremento en el número de cayados con alto contenido en mieloperoxidasa y mayor expresión de L-selectina en superficie [66]. También ha sido demostrado que el humo del tabaco causa el secuestro de leucocitos polimorfonucleares liberados en la médula ósea en la microvasculatura pulmonar [115], por lo que es posible que estos leucocitos polimorfonucleares inmaduros liberados por la médula ósea en respuesta al

tabaco contribuyan a la inflamación pulmonar crónica en los fumadores susceptibles de desarrollar EPOC.

Consecuencias de la Inflamación sistémica.

Recientemente se ha demostrado que la EPOC, lejos de ser una enfermedad con una repercusión exclusivamente pulmonar, tiene una serie de importantes repercusiones sistémicas. Aunque la patogenia de las manifestaciones sistémicas de la enfermedad está aún poco clara, se ha sugerido que el aumento de la concentración en suero de diversas moléculas inflamatorias podrían tener un papel relevante al contribuir a un estado de inflamación sistémica permanente que podría ser responsable de algunos de estos efectos sistémicos [116], considerándose un factor patogénico clave en la afectación multidimensional y heterogeneidad fenotípica de la enfermedad. De esta manera, una de las hipótesis actualmente vigente en este sentido defiende que un cierto grado de inflamación sistémica sería el responsable de la conexión entre estos fenómenos [117].

Enfermedad cardiovascular.

Dentro de las manifestaciones sistémicas de la enfermedad, hay que destacar la presencia de compromiso cardiovascular concomitante. La enfermedad cardiovascular es una de las comorbilidades más comúnmente asociada con la EPOC y la insuficiencia cardíaca crónica puede estar infra-diagnosticada en estos pacientes, ya que la disnea de suele justificar por su enfermedad respiratoria [118].

La enfermedad cardiovascular es más frecuente a medida que aumenta la gravedad de la EPOC, con una mayor incidencia de arritmias, alteraciones isquémicas, angina de pecho e insuficiencia cardiaca congestiva. Estos

pacientes con estadios avanzados de la EPOC tienen casi el doble de probabilidades de morir por enfermedades cardiovasculares que aquellos que se encuentran en las fases iniciales de la enfermedad [119]. La hipertensión pulmonar puede estar presente en las últimas etapas de la EPOC y puede progresar a hipertrofia del ventrículo derecho y cor pulmonale [120].

La EPOC es también un factor de riesgo importante para arterioesclerosis. Sin et al [121] estudiando la base de datos del National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), propusieron que la inflamación sistémica de bajo grado existente en los pacientes con EPOC, representada en dicho estudio por valores plasmáticos aumentados de PCR, podrían constituir un factor de riesgo cardiovascular agregado para estos pacientes.

Uno de los fenómenos causantes de los eventos cardiovasculares agudos es la inflamación del endotelio con rotura de la placa de ateroma. La PCR estimula la respuesta inflamatoria, activa el complemento, promueve la captación de moléculas de LDL por los macrófagos y estimula la adhesión de leucocitos al endotelio, promoviendo la rotura de la placa [122].

Desnutrición y miopatía.

Otra de las manifestaciones sistémicas frecuentes de la EPOC es la desnutrición, que afecta principalmente a la pérdida y la disfunción de los músculos esqueléticos. Valores aumentados de marcadores plasmáticos de inflamación, como la PCR, la IL-1b, la IL-6, los receptores de TNF- α , la grelina y la leptina, se han asociado con la pérdida de peso y/o masa muscular en pacientes con EPOC [123].

La debilidad del músculo esquelético es uno de los principales efectos sistémicos de la EPOC y con frecuencia se acompaña de pérdida de masa magra [124]. En

enfermedades crónicas como la EPOC, la pérdida de masa muscular se produce a un ritmo lento. Se produce una pérdida muy lenta pero sustancial de la masa muscular. Varios estudios han demostrado que tanto la función como la estructura del músculo esquelético se alteran en estos pacientes. Se produce atrofia de los músculos esqueléticos y es específico de los músculos de fibra de tipo IIA / IIX [125]. Además, estas anomalías están relacionadas con la función de las vías respiratorias, la intolerancia al ejercicio, el estado de salud, la mortalidad y el consumo de recursos sanitarios [126].

La atrofia muscular se asocia con la pérdida de fuerza muscular, que a su vez es un importante determinante de la capacidad de ejercicio en pacientes con EPOC independiente de la severidad de la enfermedad. En la EPOC grave, el músculo perdido también tiene profundos efectos sobre la morbilidad, incluyendo un mayor riesgo de reingreso hospitalario después de la exacerbación, así como una mayor necesidad de ventilación mecánica. Además, la pérdida de masa muscular se ha identificado como un importante determinante de la mortalidad en la EPOC, que es independiente de la función pulmonar, el tabaquismo y el IMC [127]. Las citocinas proinflamatorias sistémicas se han asociado a ésta disfunción de los músculos esqueléticos. No obstante, estos cambios inflamatorios no han podido ser confirmados en muestras de biopsias musculares [128].

Osteoporosis

Varios estudios han demostrado una prevalencia muy alta de osteoporosis y baja densidad mineral ósea (DMO) en pacientes con EPOC, incluso en las fases más leves de la enfermedad [129]. Entre los mecanismos propuestos está el sedentarismo, la utilización de corticoides, la presencia de alteraciones nutricionales y la inflamación sistémica.

Más de la mitad de los pacientes con EPOC recogidos para un estudio de más de 6000 pacientes tenían osteoporosis u osteopenia [130]. Curiosamente, la prevalencia es alta para los hombres e incluso mayor para las mujeres. Siendo la incidencia de las fracturas traumáticas y no traumáticas similar para ambos sexos. No existe relación entre la osteoporosis y la limitación funcional. Sin embargo las fracturas vertebrales de compresión son relativamente comunes entre los pacientes con EPOC y el aumento de la cifosis resultante puede reducir aún más la función pulmonar [131]. Estudios del grupo de Bolton et al demostraron que la presencia de pérdida de masa ósea y osteoporosis se asocia con valores aumentados de MMP-9, IL-6, TNF- α y sus receptores, posiblemente en relación con el aumento de la actividad osteoclástica asociado a estos mediadores inflamatorios [132].

Diabetes.

La inflamación sistémica de bajo grado también podría justificar la presencia de resistencia a la insulina y la mayor prevalencia (15-20 %) de diabetes mellitus en los pacientes con EPOC con respecto a la población normal [133]. Los mediadores inflamatorios implicados podrían estar en relación con una disfunción del sistema adipocítico, que produce un descenso de los valores de adiponectina, que se traduce en un aumento de la producción de IL-6, TNF- α y de la respuesta inflamatoria mediada por la inmunidad inmediata y la tardía [36].

Depresión y ansiedad.

En la EPOC estable, la depresión clínica y la ansiedad tienen una prevalencia del 10-42% y 10-19% respectivamente, aumentando este porcentaje en los estadios más graves de la enfermedad [134]. Los pacientes con EPOC son un grupo de riesgo de padecer depresión, este hecho está relacionado con su

notable y progresivo deterioro funcional, los efectos sistémicos del consumo de tabaco, y posiblemente la inflamación sistémica asociada [135].

Anemia.

La anemia se presenta entre el 13-17 % de los pacientes con EPOC [136]. Existe un estudio que ha demostrado que los pacientes con EPOC que presentan anemia tienen valores plasmáticos de eritropoyetina relativamente disminuidos, asociados a valores plasmáticos aumentados de IL-6 o de PCR [137]. Estos hallazgos sugieren que la inflamación sistémica de bajo grado existente en la EPOC actuaría sobre la médula ósea impidiendo una adecuada respuesta fisiológica a la hipoxia, sobretodo en los pacientes graves.

Cáncer de pulmón.

Por último, es importante destacar que la presencia de limitación del flujo aéreo aumenta en gran medida la probabilidad de que los pacientes puedan desarrollar cáncer de pulmón con el tiempo [116]. Una de las teorías propuestas para intentar explicar esta asociación es la presencia de una inflamación crónica de bajo grado. Existen una serie de moléculas que han sido identificadas como llaves en el proceso patogénico inflamación-carcinogénesis: integrinas, factor transformador de crecimiento beta, factor de transcripción kappa beta (NF-kB), STAT-3, TNF- α , ciclooxigenasa-2 [138].

Por tanto, queda patente, que la presencia de valores aumentados de marcadores inflamatorios plasmáticos se ha asociado a la presencia de muchos de los procesos extrapulmonares relacionados con la EPOC. Se desconoce con exactitud la relación causa-efecto entre estos fenómenos y si su modificación puede alterar el curso clínico de la enfermedad.

Reactantes de Fase Aguda:

Dentro de los distintos marcadores inflamatorios sistémicos estudiados, los llamados reactantes de fase aguda (RFA) parecen tener una especial relevancia, debido a su importante papel como nexo fisiológico entre la respuesta inflamatoria local y la sistémica [139]. Estos RFA constituyen un grupo heterogéneo de proteínas que se sintetizan en el hígado y cuya cantidad en la circulación aumenta rápidamente en presencia de inflamación y de necrosis tisular. Esta liberación de RFA se produce en respuesta a la mediación de citocinas inflamatorias, entre las que cobran especial importancia la IL-1, la IL-6 y el TNF- α [140]. Dentro de estos reactantes y en función de la capacidad de estimulación distinguimos los RFA mayores, cuya concentración en suero aumenta hasta mil veces ante un estímulo y los RFA menores cuya concentración aumenta en menor medida.

Es conocido que los RFA mayores, la PCR y el amiloide A sérico (AAS), tienen un papel relevante en la reacción aguda del ser humano ante diversas agresiones externas. Durante una agresión aguda los RFA intervienen en la respuesta sistémica realizando funciones como la inducción de enzimas que degradan la matriz extracelular como las metaloproteinasas, acción quimiotáctica de células inflamatorias, participación en el metabolismo lipídico o su transporte y efectos pro-inflamatorios y antiinflamatorios de regulación, entre los que destaca aumentar la quimiotaxis y opsonización, activar células inflamatorias o modular respuestas inmunes [141]. Por tanto, el papel de estos RFA mayores en la respuesta aguda puede resumirse en: acción inmunomoduladora [142], efectos sobre el genoma [143] y efectos sobre el metabolismo lipídico [144].

La PCR forma parte de la inmunidad innata y su síntesis es inducida como respuesta al daño tisular por infecciones, inflamación o neoplasias. Es

sintetizada por hepatocitos y células del endotelio vascular y su expresión está regulada por citocinas, particularmente por la IL-6 y, en menor grado, la IL-1 y el TNF- α [145].

La PCR pertenece a una familia de proteínas pentaméricas dependientes de calcio llamadas pentraxinas. Aunque la PCR se produce como monómero, la molécula funcional está compuesta por cinco subunidades polipeptídicas de 23 kDa idénticas asociadas de manera no covalente en una configuración anular con simetría cíclica.

La PCR se une con gran afinidad a una amplia variedad de ligandos tanto autólogos (lipoproteínas plasmáticas nativas y modificadas, membranas celulares dañadas, residuos de fosfatidilcolina, histonas, cromatina, ribonucleoproteínas pequeñas y células apoptóticas), como extrínsecos (glucanos, fosfolípidos y otros componentes somáticos y capsulares de bacterias, hongos y parásitos). Cuando la PCR está unida a ligandos macromoleculares es reconocida por C1q y activa la vía clásica del complemento; adicionalmente, provee sitios de unión para el factor H, regulando la amplificación de la vía alterna y a las convertasas de C5. Por otro lado, inhibe el ensamblaje de los componentes terminales del complemento (C5 – C9), atenuando la formación del complejo de ataque a la membrana y limitando la lisis celular por esta vía [146].

La capacidad de la PCR para activar el complemento y opsonizar partículas parece ser importante en la respuesta de la inmunidad innata frente a los patógenos.

La PCR tiene la capacidad tanto de opsonizar células apoptóticas, como de desacoplar las proteínas del complejo de ataque a la membrana dependiente del

complemento. Esto permite una mayor permanencia de las células apoptóticas antes de ser eliminadas, aunque facilitando su captación por fagocitos. Así, la PCR juega un papel preponderante en limitar la activación de respuestas de inmunidad adaptativa.

Después de un evento isquémico cardíaco, los niveles séricos de la PCR se elevan rápidamente, reflejando la extensión de la necrosis. Los niveles máximos del evento agudo son útiles como factor pronóstico de la evolución de estos pacientes [147].

Aunque esta elevada producción de PCR pudiera corresponder sólo a una respuesta de fase aguda típica a la muerte celular y a la infiltración inflamatoria subsiguientes, se ha demostrado que la PCR se deposita conjuntamente con fracciones activadas del complemento dentro de las zonas de infarto agudo [148], contribuyendo ambas a la gravedad de la lesión isquémica [149].

Diversos estudios epidemiológicos han mostrado que los niveles séricos de PCR tienen valor predictivo. La relación existente entre los niveles basales de PCR y el riesgo de desarrollar eventos cardiovasculares ha sido consistente entre estudios. En muchos de ellos, mostrando independencia de la edad y de los factores de riesgo tradicionales como tabaquismo, niveles de colesterol, presión arterial y diabetes.

El incremento en el riesgo cardiovascular adscrito a la PCR es consistente entre estudios. Sin embargo, después de ajustar los resultados con los factores de riesgo tradicionales, éste pareciera tener un valor más bajo al informado inicialmente [150].

Se conoce poco acerca de la fisiología de la PCR y los posibles mecanismos subyacentes a su asociación cardiovascular. En este sentido, el papel principal

de la PCR se ha señalado como la interacción entre agregados de PCR y de plasma de lipoproteína de baja densidad (LDL), que puede jugar un papel importante en la función normal de la PCR y también pueden tener un papel en el metabolismo de las lipoproteínas, su liquidación, y su deposición [49].

Sin embargo, la PCR es inespecífica y comparte funciones secretoras en común con el amiloide sérico A (SAA), el otro RFA mayor en los seres humanos [141]. El SAA es conocido por actuar como una apoproteína. Una vez liberado en la circulación como una proteína libre, se asocia rápidamente a las lipoproteínas de alta densidad (HDL) de [151], desplazando a la apo A-I y apo A-II, y provocando un cambio conformacional en el HDL al ampliar su tamaño, este hecho da lugar a aumento del catabolismo de las HDL [152].

Además de su función durante una agresión aguda, los RFA también han demostrado tener un papel en enfermedades crónicas como consecuencia de una estimulación constante de su expresión [153,154]. No obstante, la implicación final de los RFA en la patogenia de las manifestaciones sistémicas de la EPOC no ha sido completamente dilucidado, planteándose cuestiones no resueltas sobre su secreción, perpetuación en el tiempo e influencia final en un determinado efecto de la enfermedad en órganos diana distintos del pulmón. En este sentido, aunque la hipótesis más aceptada es que los RFA son producidos exclusivamente en el hígado como respuesta a un patrón de citoquinas determinado [141], hemos podido constatar en los trabajos previos de nuestro grupo, como el parénquima pulmonar y el tejido bronquial sintetizan estos RFA de manera análoga a como ocurre en otras enfermedades crónicas como la artritis reumatoide [155] o en la placa de ateroma [151], y que el patrón de síntesis se modifica en los pacientes con la enfermedad. El siguiente paso que planteamos en el presente proyecto es el estudio de diversos grupos celulares

con objeto de evaluar qué células están implicadas en esta síntesis pulmonar de RFA.

Tras la afirmación de que en la EPOC existe la participación de un componente inflamatorio, tanto a nivel local como sistémico, teniendo este último importantes consecuencias a nivel extratorácico, sería muy útil definir el origen de ésta inflamación sistémica. Nuestro grupo ha iniciado una línea de investigación en este sentido, con objeto de aclarar si el pulmón puede ser el origen, al menos en parte, de esta producción constante de RFA. De los trabajos previos hemos podido constatar como el parénquima pulmonar y el tejido bronquial sintetizan estos RFA y que el patrón de síntesis se modifica en los pacientes con la enfermedad [156]. Estos hallazgos abren una nueva vertiente en el estudio de la patogénesis de la inflamación sistémica de la enfermedad.

El siguiente paso que planteamos en el presente proyecto es el estudio de diversos grupos celulares con objeto de evaluar qué células están implicadas en esta síntesis pulmonar de RFA. Los hallazgos del presente proyecto contribuirán a un mayor conocimiento de la patogenia de la enfermedad y sus repercusiones sistémicas que podrían culminar en la detección de nuevas dianas terapéuticas en un futuro.

Hipótesis

Existe producción de RFA por el tejido pulmonar siendo ésta diferente según el territorio y el tipo celular analizado y variando entre pacientes con EPOC frente a fumadores sanos, de manera que su síntesis se encuentra relacionada con la presencia de la enfermedad.

Objetivos

OBJETIVOS PRINCIPALES

1. Explorar la existencia de una expresión génica de RFA en sujetos sanos y compararla con los pacientes con EPOC.
2. Comparar la expresión génica de PCR y AAS en el tejido bronquial y en parénquima de pulmón humano.
3. Determinar la expresión de PCR y AAS en células epiteliales, macrófagos y fibroblastos pulmonares humanos.
4. Comparar la expresión génica de RFA en dichos grupos celulares entre pacientes con EPOC frente a fumadores sanos.

Método.

La presente Tesis Doctoral se ha diseñado como un estudio analítico observacional de caso-control, en el que se compararon los niveles de distintos RFA en muestras quirúrgicas de tejido pulmonar de pacientes fumadores o exfumadores con EPOC en fase estable frente a pacientes sin EPOC. El estudio cuenta con la aprobación del Comité Ético del H.U. Virgen del Rocío, observándose las normas de la Declaración de Helsinki para estudios con seres humanos y con consentimiento informado por escrito de cada participante previo a su inclusión en el estudio.

Todos los sujetos incluidos en el estudio son pacientes que se encontraban en lista de espera para cirugía de resección pulmonar (lobectomía o neumonectomía) por sospecha de neoplasia pulmonar primaria que ingresan de forma programada en la planta de la Unidad Médico Quirúrgica de Enfermedades Respiratorias del Hospital Universitario Virgen del Rocío para la realización de la técnica quirúrgica prevista.

El diagnóstico de EPOC se realizó en función de la normativa internacional GOLD 2010 y la normativa nacional SEPAR/ALAT 2009, exigiéndose una exposición prolongada a inhalantes de riesgo (consumo acumulado de tabaco > 10 paq-año) y tener una espirometría con una obstrucción crónica al flujo aéreo con un cociente entre el volumen expiratorio máximo en el primer segundo (FEV_1) y la capacidad vital forzada (FVC) menor de 0,7, realizada en fase estable y que no sea completamente reversible tras un test broncodilatador.

Para su inclusión en el estudio los sujetos debían cumplir una serie de requisitos:

- Aceptación a participar en el estudio

- Ser mayores de 40 años
- Estabilidad clínica en los 2 meses previos a la intervención.
- Capacidad para completar los cuestionarios y estudios complementarios.
- No contraindicaciones para los estudios.
- En lista de espera para cirugía de resección pulmonar.
- Tiempo desde la apertura de plano cutáneo y la toma de la muestra quirúrgica menor de 2 h.

Aquellos pacientes que padezcan alguna enfermedad concomitante crónica o inflamatoria que pueda estar asociada en la elevación de los RFA, como son la inmunosupresión, aparición de algún evento isquémico agudo de cualquier naturaleza en los seis meses previos, disponer de ventilación mecánica domiciliaria, insuficiencia cardíaca congestiva, insuficiencia renal terminal, cirrosis hepática o artritis reumatoide entre otras, son excluidos. Además, se excluyen aquellos pacientes que hayan recibido quimioterapia o radioterapia sobre el tórax y aquellos casos en los que la extracción de la pieza quirúrgica sea superior a dos horas.

En caso de cumplir dichos criterios de inclusión, en una primera visita se informa al paciente de la naturaleza del estudio y se solicita el consentimiento informado para su inclusión en el estudio. Además en esta visita se realiza una evaluación clínica, recogiendo de cada sujeto edad, sexo, evaluación del estado nutricional, hábito tabáquico recogido en paquetes/año, estabilidad clínica en los meses previos, disnea usando la escala de la mMRC, patología concomitante y tratamiento médico habitual recogido en principio activo y dosis habitual,

expresándose la dosis de corticoides inhalados en μg / día de fluticasona o equivalente.

Se realiza una evaluación funcional respiratoria incluyendo espirometría, saturación de oxígeno y si ésta era menor del 92% gasometría arterial y test de la marcha de 6 minutos. Todos estos datos son recogidos en un cuaderno de recogida de datos individual para cada sujeto y archivado posteriormente por el investigador principal.

Extracción de la muestra quirúrgica.

Durante la intervención quirúrgica, se mide el tiempo de intervención desde el inicio de la misma (apertura de plano cutáneo) hasta la obtención de la pieza quirúrgica. Se selecciona una porción de parénquima pulmonar, macroscópicamente normal y que esté alejada de la lesión que ha motivado la intervención, de aproximadamente 1 cm^2 de superficie y 0,5 cm de espesor. Esta separación se realiza en el quirófano, en una mesita auxiliar y sobre un campo quirúrgico estéril en hielo para preservar la biopsia lo mejor posible. El resto de la pieza anatómica sigue el tratamiento habitual según protocolo del hospital acorde al caso clínico del paciente.

Instrumentos de medida.

Escalas y cuestionarios.

Tabaquismo. El consumo de tabaco se recoge empleando el índice acumulado en paquetes-año. Este índice se obtiene de multiplicar el número de paquetes al día que el paciente fuma por el número de años que ha fumado esta cantidad. Se considera que un índice por encima de 10 paq-año es un factor de riesgo elevado para padecer una EPOC.

Disnea. La disnea fue medida por la escala modificada del Medical Research Council (mMRC) [157]. Esta escala es un sencillo índice hetero-administrado en el que se puede graduar el grado de disnea mediante la valoración del tipo de ejercicio necesario para desencadenar el síntoma. La escala va de 0 a 4, donde mayores valores indican un mayor grado de disnea y no tiene puntos de corte. Los grados son los siguientes:

- Grado 0. Ausencia de disnea excepto al realizar ejercicio intenso.
- Grado 1. Disnea al andar deprisa en llano, o al andar subiendo una pendiente poco pronunciada.
- Grado 2. La disnea le produce una incapacidad de mantener el paso de otras personas de la misma edad caminando en llano o tener que parar a descansar al andar en llano al propio paso.
- Grado 3. La disnea hace que tenga que parar a descansar al andar unos 100 metros o después de pocos minutos de andar en llano.
- Grado 4. La disnea impide al paciente salir de casa o aparece con actividades como vestirse o desvestirse.

Estado nutricional. La composición corporal se evalúa mediante el cálculo del índice de masa corporal expresado en Kg/m^2 . Un índice por debajo de 21 Kg/m^2 se considera bajo peso y un factor de mal pronóstico en pacientes con EPOC [12].

Valoración clínica. La evaluación de la presencia de una agudización se define por criterios clínicos, preguntando al paciente por su situación comparada con la situación basal en términos de grado de disnea, cantidad y coloración del esputo y auscultación cardiorrespiratoria.

Valoración funcional respiratoria.

Espirometría. La espirometría se realizó siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR) [158]. Para ello se informó al paciente del objetivo de la prueba y se recogieron datos relacionados con la prueba para el cálculo de sus valores teóricos como la raza, el peso, la talla, la edad y el sexo. Antes de la realización de la prueba se exigía que el paciente no estuviera bajo los efectos de un broncodilatador. Para ello se buscaron los siguientes tiempos de espera:

- β_2 agonistas de acción corta: 6 horas
- β_2 agonistas de acción prolongada : 24 horas
- Anticolinérgicos de acción corta: 6 horas
- Anticolinérgicos de acción prolongada: 36 horas
- Metilxantinas orales: 24 horas

Una vez cumplidos todos los requisitos se le indicaba al paciente que respirara tranquilamente a través de la boquilla del espirómetro. A la señal del técnico el paciente realizaba una inspiración relajada pero máxima seguida de una espiración brusca, enérgica y completa hasta completar la espiración. Como criterios de calidad se observó que la espiración durara al menos 6 segundos y que la morfología de las curvas flujo-volumen y volumen-tiempo fuera adecuada. Con objeto de ver la reproducibilidad de la técnica se realizaron un mínimo de 3 y un máximo de 9 maniobras. Como criterio de aceptación las dos mejores espiraciones de tres curvas aceptables pueden variar entre sí hasta un $\pm 5\%$ ó ± 100 mL de la capacidad vital, sin sobrepasar ninguno de estos dos criterios, para considerarse reproducible. Para el test broncodilatador se emplearon 500 μ gr de Terbutalina administrada en dispositivo Turbuhaler, repitiéndose la espirometría

con la misma técnica a los 15 minutos de la inhalación. Se consideró un test broncodilatador positivo si aumentaba un 12% y 200 mL en la segunda espirometría.

La gasometría arterial se efectúa con muestras de sangre procedente de arteria radial o humeral y la medida de pH, PaO₂ y PaCO₂ se llevaron a cabo en un gasómetro siguiendo las recomendaciones de la SEPAR [159].

Trabajo de laboratorio

Se recogieron muestras de parénquima pulmonar de cada uno de los pacientes (casos y controles) según lo descrito anteriormente. A dichas muestras se les realizaron dos procesos de laboratorio diferentes para alcanzar los objetivos propuestos:

Expresión génica de RFA en tejido pulmonar:

La extracción de ARN del tejido. se llevó a cabo en un fragmento de muestra de aproximadamente 50-100 mg de tejido mediante la técnica relativa de RT-qPCR que incluye 3 fases consecutivas: extracción del RNA, retrotranscripción a cDNA y amplificación del gen. La extracción del RNA se realizó en fresco empleando el método trizol-cloroformo (Promega). La retrotranscripción a cDNA se realizó con el kit iScript (BioRad), según las instrucciones del fabricante. Finalmente, la amplificación del gen se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. Se determinó la expresión de PCR y los 3 subtipos de AAS (AAS1, AAS2 y AAS4).

El ARN obtenido lo retrotranscribimos a ADNc mediante una enzima retrotranscriptasa (iScript BioRad, CA, USA). Finalmente, analizamos el número de copias de los genes propuestos mediante una reacción en cadena de la

polimerasa (PCR) de forma semicuantitativa con Sybr Green (BioRad, CA, USA) en un termociclador de tiempo real (Stratagene Mx3005, CA, USA).

Según esta metodología, la expresión de cada gen se cuantifica según el número de ciclos que se precisan para su expresión, denominado Ct. Estos estudios de expresión génica se contrastan con la expresión genes constitutivos (en nuestro caso, ARN 18S) como control interno de la reacción. De esta manera se obtiene la diferencia entre ambas expresiones genéticas (ΔCt). Finalmente, el valor a analizar se obtiene por el método denominado $2^{-\Delta Ct}$ (160), donde mayor valor numérico traduce una mayor expresión y que permite ser analizada con las técnicas estadísticas habituales.

Expresión génica de RFA en distintos tipos celulares:

Al fragmento restante de la muestra, se le realizó una disgregación celular para obtener los fibroblastos, las células epiteliales y los macrófagos. La disgregación consta de una parte mecánica, mediante bisturí, para lograr fragmentos del menor tamaño posible y una enzimática que se realizó en un medio de digestión: RPMI, 5% de suero fetal bovino (SFB), 1% de estreptomycin/penicilina, 1% de L-glutamina (todos de PAA Laboratories, Gmb, Alemania), 0,1 mM de 2-beta-mercaptoethanol (Sigma, GmbH, Alemania), 1 mg/mL de colagenasa I (Sigma, GmbH, Alemania) y 0,02 mg/mL de DNasa I, la muestra se mantuvo en este medio a 37°C durante 25 minutos; posteriormente se neutralizó la colagenasa y la DNasa con RPMI al 5% de FBS, 1% de estreptomycin/penicilina y 1% de L-glutamina. Una vez neutralizadas las enzimas, centrifugamos a 1000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente se retiró el sobrenadante y se lavó el pellet con una solución de PBS a 10 mM de EDTA. A continuación pasamos la muestra por un filtro de 40 μ m (Becton Dickinson, NJ, USA) y volvimos a centrifugar a 1000 rpm durante 5 minutos a 4 °C; retirando posteriormente el

sobrenadante. Realizamos una lisis de eritrocitos al pellet (Erythrocyte lysis buffer, QIAGEN, Gmb, Alemania). Comenzamos la separación de los distintos tipos celulares, usando bolitas magnéticas (MACS microbeads, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Gemany) según las indicaciones del fabricante: CD326 (para células epiteliales), CD14 (para macrófagos) y anti-fibroblastos (para los fibroblastos). Posteriormente, pasamos por una columna de separación magnética (MS MACS column, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Gemany). Una vez que hayan pasado todas las células, recogimos las que quedaron en la columna (CD326⁺, CD14⁺ o fibroblastos) y les realizamos la extracción de ARN mediante el método trizol-cloroformo (Promega) descrito el apartado anterior.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico Statistical Package for Social Sciences (SPSS) versión 19.0 (IBM Corporation, Somers, Nueva York, EE.UU.). Para describir las variables se emplean las frecuencias absolutas y relativas en el caso de variables cualitativas. Las variables cuantitativas se describen mediante la media y la desviación estándar. Los estudios inferenciales se realizan con tests paramétricos, salvo que alguna de las variables incluidas en el análisis demuestre no seguir una distribución normal.

El estudio de la expresión de RFA, tanto a nivel de tejido como a nivel celular, entre pacientes EPOC y fumadores sanos se realiza mediante el estudio de sus medias mediante el test de la t de Student para datos independientes (test de Mann-Whitney en caso de no paramétrico), previa verificación de la igualdad de las varianzas con el test de Levene. Los estudios de correlación entre la expresión de RFA en tejido y en suero se realizan mediante correlaciones bivariadas simples calculando el coeficiente de correlación de Pearson (Spearman en caso de no paramétrico), calculando el coeficiente de

determinación. Igualmente, ambos tests (t de Student y Pearson) son empleados para evaluar la relación entre la expresión de los RFA y las diversas características clínicas y funcionales recogidas. Se acepta un error alfa de 0,05.

Resultados.

Descripción de la muestra

La muestra estaba compuesta por 74 sujetos, divididos en 39 casos y 35 controles. La distribución de pacientes por estadios GOLD 2011 era: 14 (35,9%) en estadio GOLD I, 22 (56,4%) en estadio GOLD II, 2 (5,1%) en estadio GOLD III y 1 (2,6%) en estadio GOLD IV. Los pacientes incluidos eran del subtipo poco agudizador. La gran mayoría de los casos incluidos (34; 87,2%) no habían tenido ninguna agudización en el año previo y 5 casos (12,8%) referían haber tenido una agudización. No hubo ningún caso que refiriera haber tenido dos o más agudizaciones, por lo que ningún caso correspondía al fenotipo agudizador frecuente [161].

Los pacientes con EPOC estaban tratados en un 13,2% con corticoides inhalados, de los que todos estaban en tratamiento combinado, con broncodilatador de acción larga (LABA) de forma aislada había 4 pacientes (5,4%). Un 26,3% estaban en tratamiento con tiotropio. El resto de los tratamientos están resumidos en la Tabla 1. La dosis media de corticoides inhalados en los pacientes con EPOC era de 437,5 (426,9) µg/d.

En la tabla 2 se resumen el tipo de cirugía practicada, los estadios clínicos prequirúrgicos de la enfermedad, así como la histología de los tumores. Las principales neoplasias fueron adenocarcinomas y epidermoides. Dentro del grupo de otras neoplasias figuraban el carcinoma de células grandes, tumor carcinoide o tumor neuroendocrino entre otros. Aunque todos los casos se intervinieron por sospecha de neoplasia, un 8,2% de los pacientes tenían o bien una tumoración de histología benigna o bien una patología no neoplásica.

Tabla 1. Características basales de los casos y controles participantes en el estudio.

	Muestra completa (n=74)	Casos (n=39)	Controles (n=35)	Valor p*
Tabaquismo activo	19 (25,7%)	11 (28,2%)	8 (22,9%)	0,013
Consumo acumulado (paq-año)	50,65 (68,5)	52,08 (27,9)	48,8 (99,5)	NS
Hombres	63 (85,1%)	36 (92,3%)	27 (77,1%)	NS
Edad	64,39 (9,3)	66 (7,6)	62,4 (10,7)	NS
Índice de masa corporal (Kg/m ²)	26 (6,01)	27,21 (4,9)	26,33 (4,4)	NS
Charlson-edad	5,32 (2,02)	6,02 (1,7)	4,54 (2,09)	0,001
AINE	13 (16,7%)	9 (23,1%)	4 (10,3%)	NS
Hipolipemiente	18 (24,7%)	11 (28,2%)	6 (15,4%)	NS
Anticoagulante	8 (10,4%)	4 (10,3%)	4 (10,5%)	NS
FVC (%)	92,14 (17,5)	151,1 (365,1)	91,1 (15,3)	NS
FEV1 (%)	78,79 (17,85)	70,6 (14,3)	84,1 (15,1)	< 0,001
FEV1/FVC (%)	67,86 (10,62)	60,2 (8,4)	74,3 (6,1)	< 0,001

Datos expresados como media (desviación estándar) o con las frecuencias absolutas (relativas) según el caso.

*Datos analizados con el test de la t de Student para datos independientes o el test χ^2 según la naturaleza de los datos.

FVC: capacidad vital forzada. FEV₁: volumen espirado forzado en el primer segundo. NS: diferencias no significativas.

Tabla 2. Descripción de las neoplasias de los casos y controles.

a) estadificación

	Muestra completa (n=74)	Casos (n=39)	Controles (n=35)	Valor p*
Estadificación TNM				NS
* IA	13 (17,6%)	6 (15,3%)	7 (20%)	
* IB	18 (24,3%)	11 (28,2%)	7 (20%)	
*IIA	4 (5,4%)	3 (7,6%)	1 (2,8%)	
*IIB	12 (16,2%)	7 (17,9%)	5 (14,2%)	
*IIIA	19 (25,7%)	10 (25,6%)	9 (25,7%)	
*IIIB	1 (1,4%)	0	1 (2,8%)	
IV	1 (1,4%)	0	1 (2,8%)	
No maligno	6 (8,1%)	2 (5,1%)	4 (11,4%)	

NS: diferencias no significativas

b) tipo de resección quirúrgica

	Muestra completa (n=74)	Casos (n=39)	Controles (n=35)	Valor p*
Tipo de resección				NS
*Lobectomía	63 (85,1%)	32 (50,7%)	31(49,2%)	
*Neumectomía	9 (12,2%)	6 (66,6%)	3 (33,3%)	
*Resección Atípica	2 (2,7%)	1 (50%)	1 (50%)	

NS: diferencias no significativas

c) histología tumoral

	Muestra completa (n=74)	Casos (n=39)	Controles (n=35)	Valor p*
Histología tumoral				NS
* Adenocarcinoma	31 (41,9%)	13 (41,9%)	18 (58,1%)	
* Epidermoide	27 (36,5%)	19 (70,3%)	8 (29,7%)	
* Otros	9 (13,6%)			
* Tumor benigno	3 (4,1%)	1 (33,3%)	2 (66,6%)	
* No neoplasia	3 (4,1%)	1 (33,3%)	2 (66,6%)	

NS: diferencias no significativas

Objetivo 1. Explorar la existencia de una expresión génica de RFA en sujetos sanos y compararla con los pacientes con EPOC.

Al analizar la expresión génica en ambos tejidos pulmonares, observamos que efectivamente tanto el parénquima pulmonar como el tejido bronquial expresan ambos biomarcadores. En los sujetos control sin la enfermedad observamos una sobre-producción de estos biomarcadores que era consistentemente más significativa en el bronquio que en el parénquima pulmonar (figuras 1-4).

Al comparar casos con controles, observamos una sobre-producción de mediadores inflamatorios en los pacientes con EPOC con unas diferencias significativas para la PCR y el AAS1 (figura 5-8). La diferente expresión en PCR (figura 5) fue más llamativa en el bronquio con una diferencia significativa con un valor de p de 0,007. El AAS1 también presentó diferencias de mayor relevancia en el bronquio frente al parénquima pulmonar ($p = 0,076$). De igual forma, el AAS4 mostró una mayor sobre-producción en el tejido bronquial entre casos y controles ($p = 0,039$). Sin embargo, el AAS2 no presentó diferencias entre ambos grupos de estudio en ninguna de las localizaciones.

Figura 1. Expresión de proteína C reactiva (PCR) en casos (arriba) y controles (abajo) según la localización anatómica.

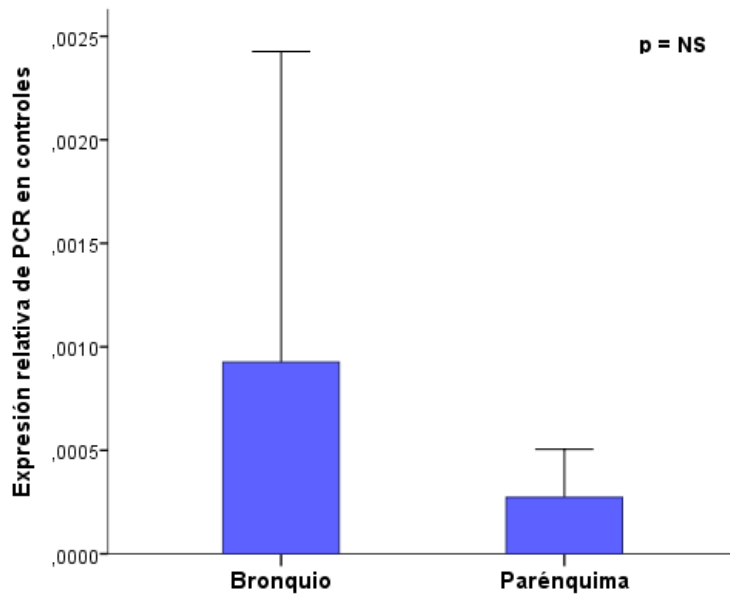
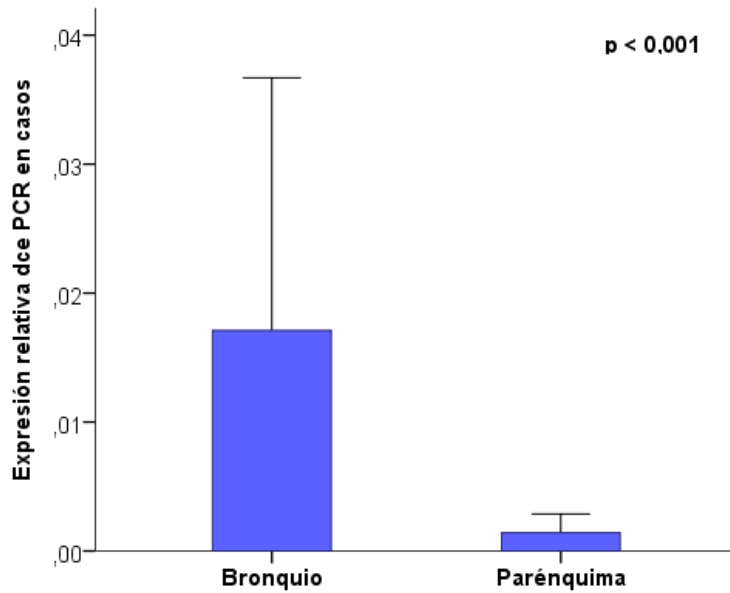


Figura 2. Expresión de amiloide A sérico 1 (AAS1) en casos (arriba) y controles (abajo) según la localización anatómica.

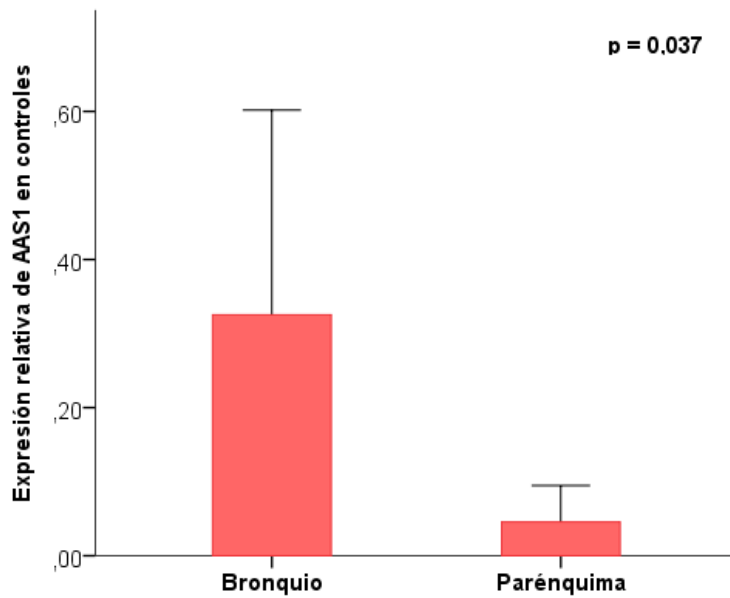
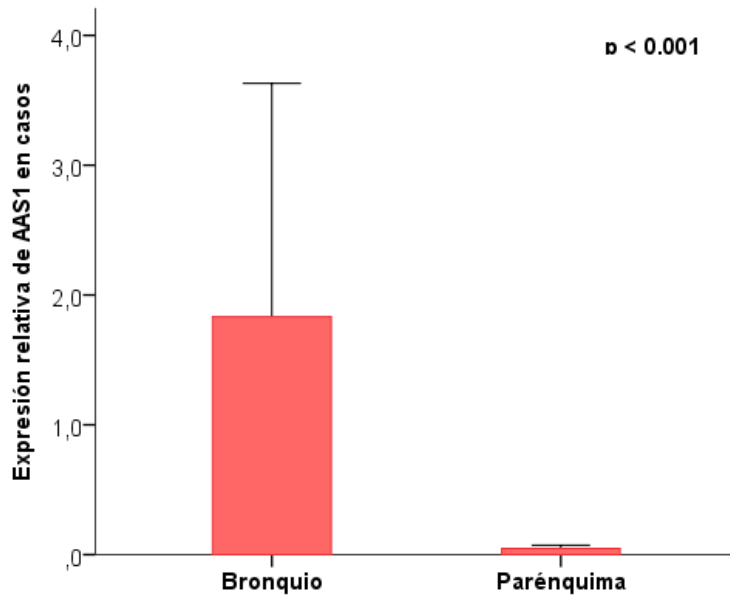


Figura 3. Expresión de amiloide A sérico 2 (AAS2) en casos (arriba) y en controles (abajo) según la localización anatómica.

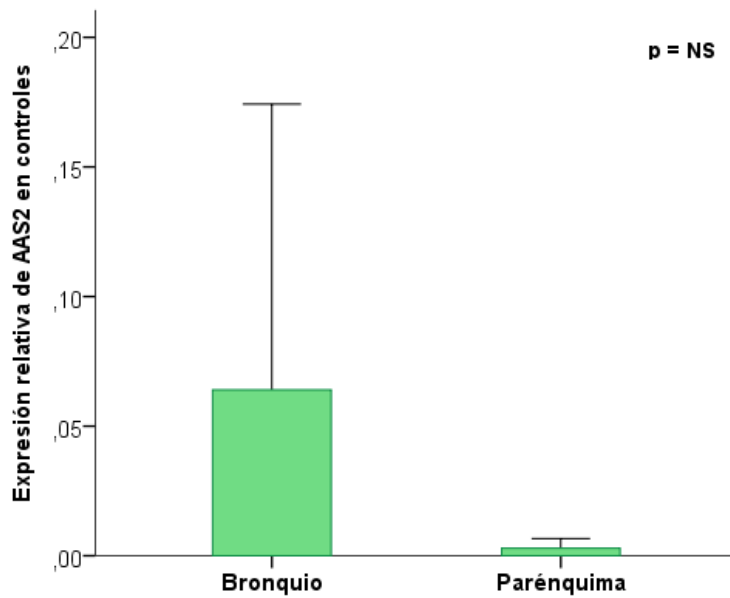
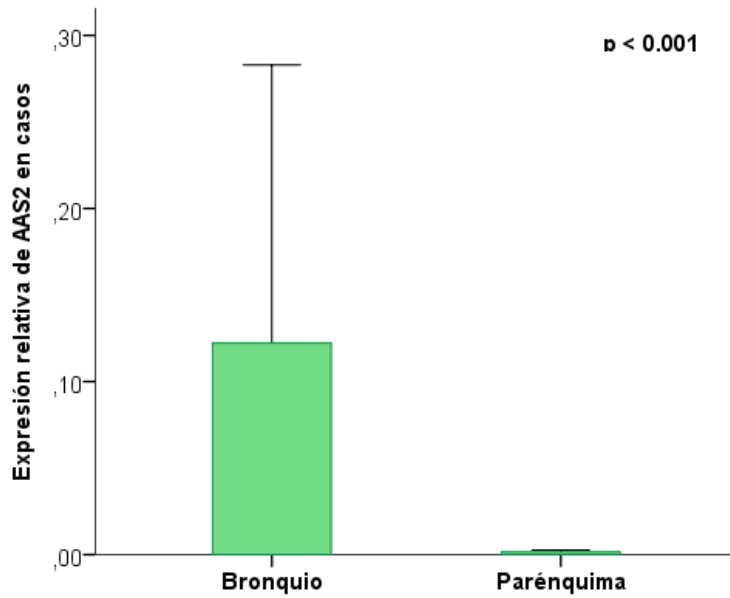


Figura 4. Expresión de amiloide A sérico 4 (AAS4) en casos (arriba) y en sujetos sanos (abajo) y según la localización anatómica.

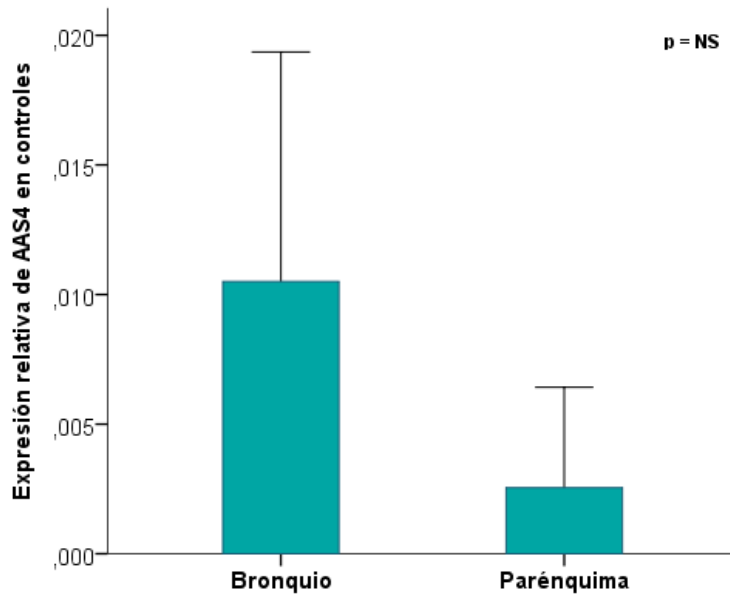
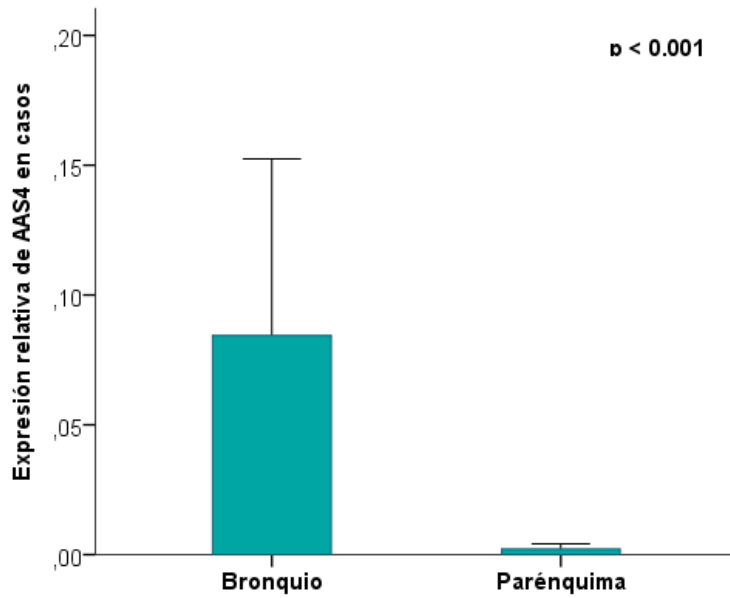


Figura 5. Comparación de la expresión de PCR entre casos y controles en bronquio (arriba) y parénquima (abajo).

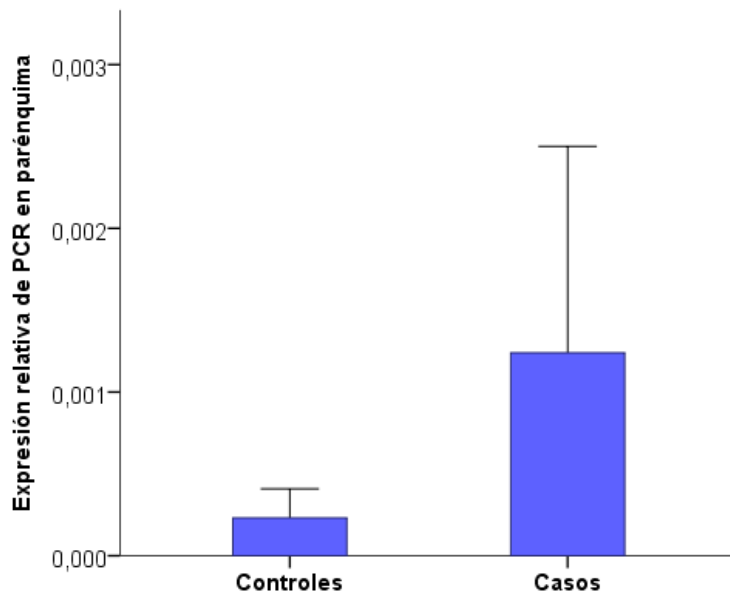
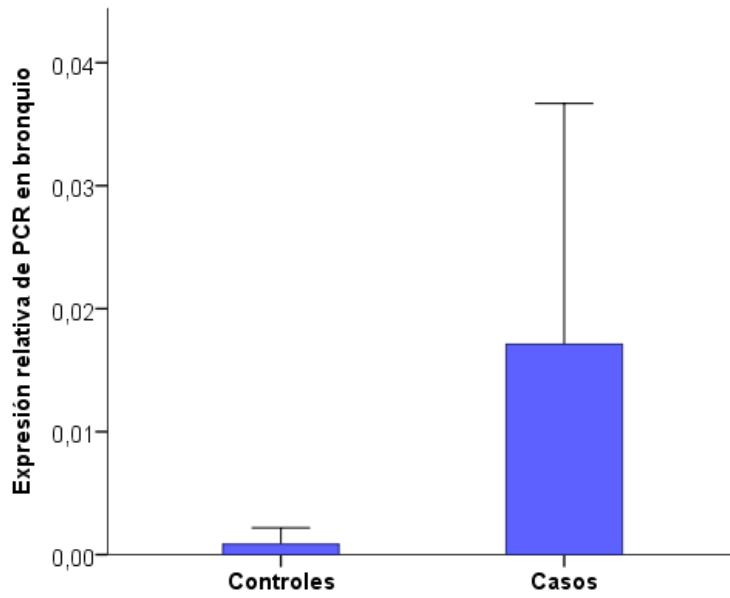


Figura 6. Comparación de la expresión de AAS1 entre casos y controles en bronquio (arriba) y parénquima (abajo).

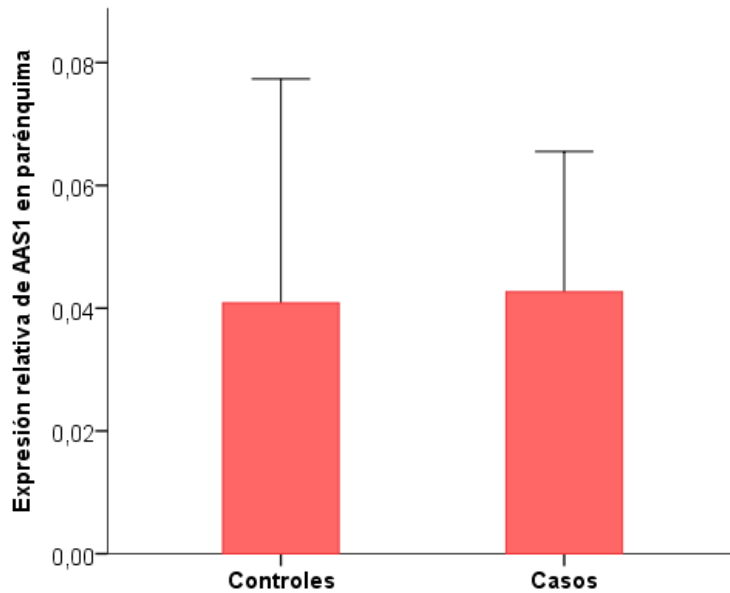
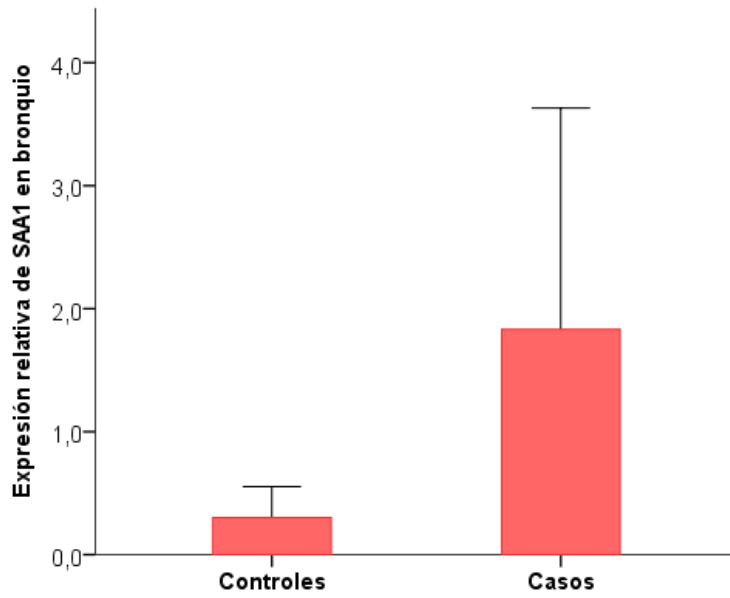


Figura 7. Comparación de la expresión de AAS2 entre casos y controles en bronquio (arriba) y parénquima (abajo).

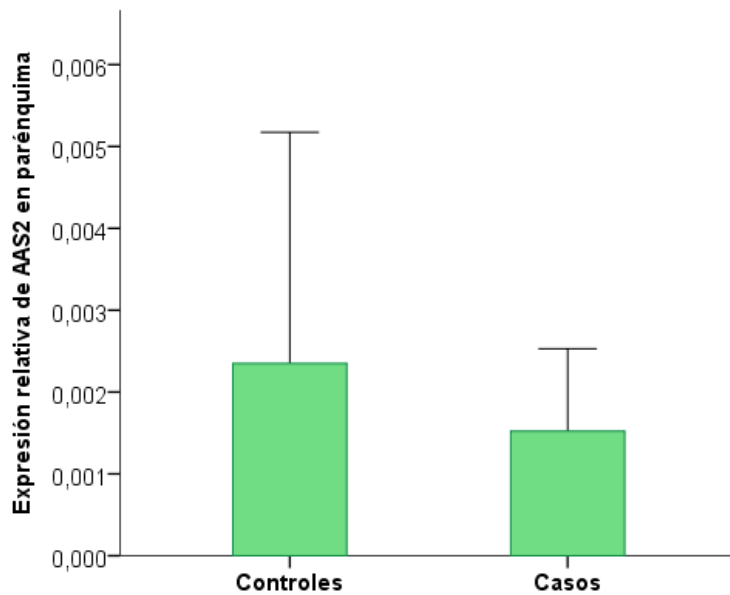
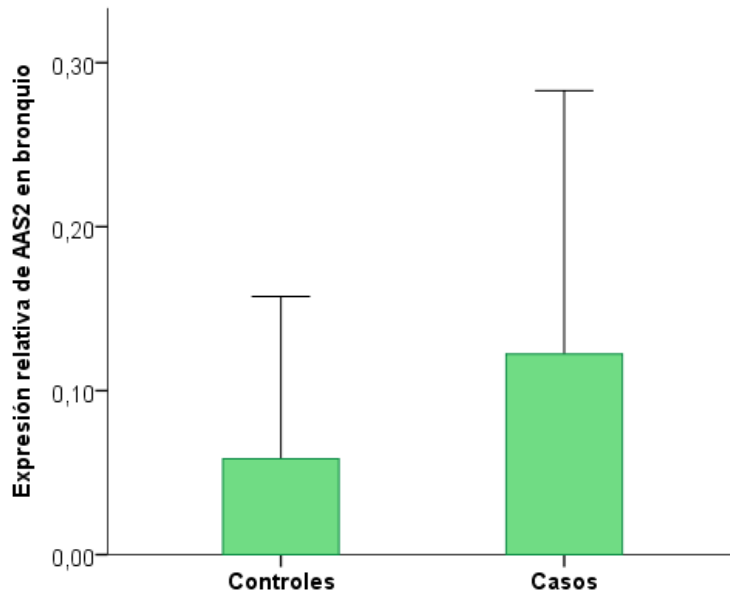
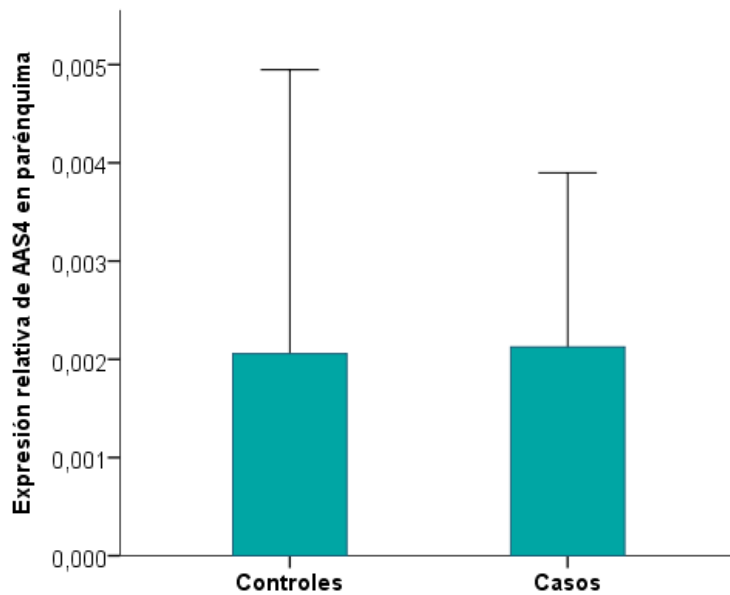
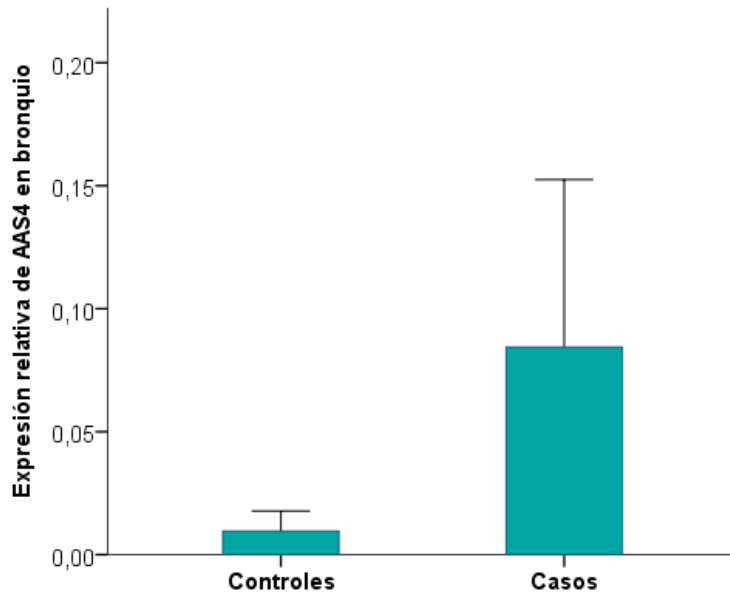


Figura 8. Comparación de la expresión de AAS4 entre casos y controles en bronquio (arriba) y parénquima (abajo).



Objetivo 2. Comparar la expresión génica de PCR y AAS en el tejido bronquial y en parénquima de pulmón humano.

Como ya se ha comentado, la expresión en tejido bronquial era superior a la expresión a la mostrada en parénquima pulmonar (figuras 1-4), tanto para los casos con EPOC como para el grupo control.

Hemos representado la magnitud de esta mayor producción comparando ambas localizaciones pulmonares para cada una de las moléculas estudiadas. Como se observa en la Figura 9, era significativamente superior en los casos. Esta misma asociación pudimos ponerla de manifiesto para el AAS1 que también presentaba este aumento de producción en el bronquio de los casos. Sin embargo, el AAS2, a pesar de que la producción de AAS2 también estaba aumentada en el bronquio, las diferencias entre casos y controles eran menos llamativas. Curiosamente, la AAS4 de expresión constitutiva también presentaba este patrón.

Estos hallazgos sugieren un mayor papel del bronquio en la producción de estos biomarcadores que el parénquima en nuestra cohorte de casos.

Figura 9. Expresión relativa de PCR en bronquio con respecto al parénquima (p=0,012).

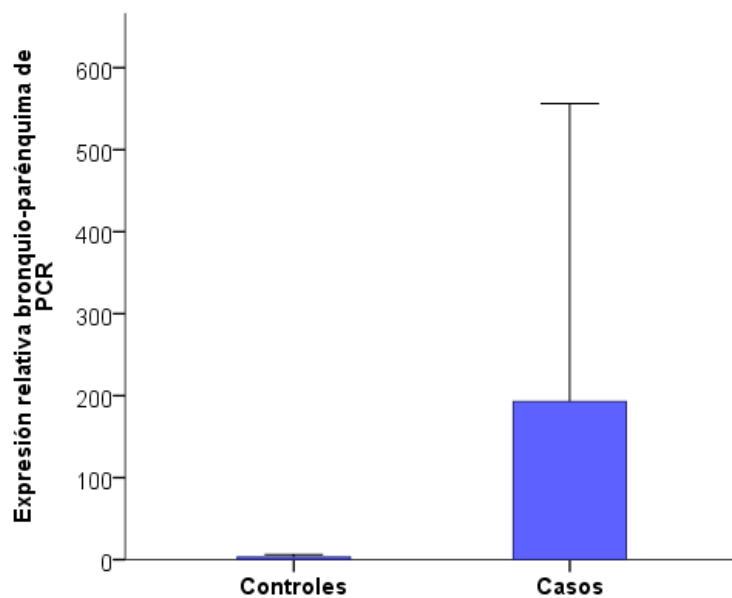


Figura 10. Expresión relativa de AAS1 en bronquio con respecto al parénquima bronquio.

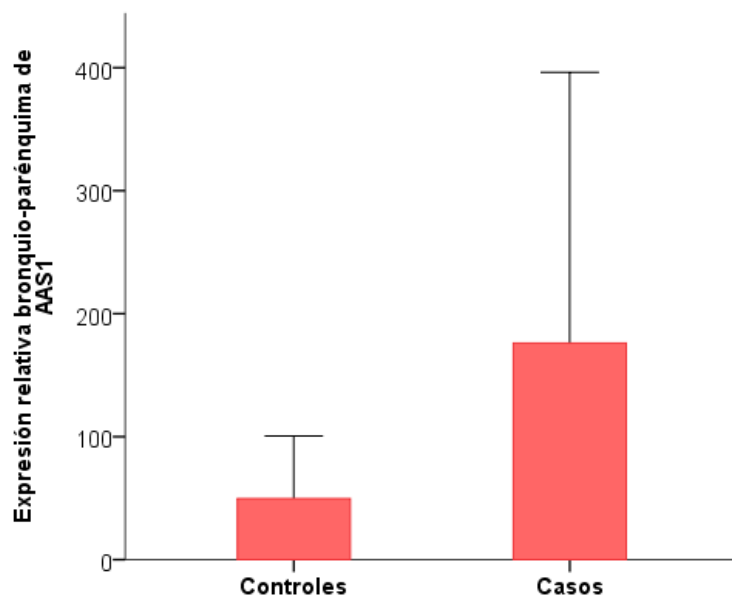


Figura 11. Expresión relativa de AAS2 en bronquio con respecto al parénquima.

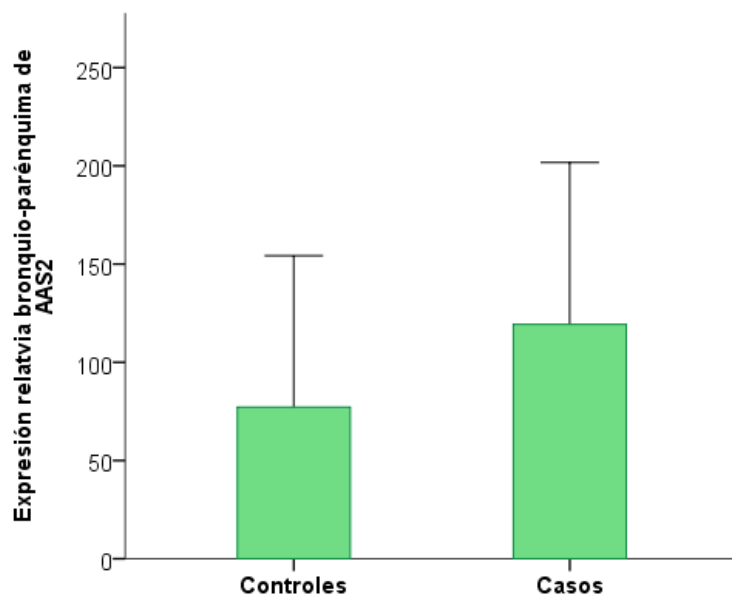
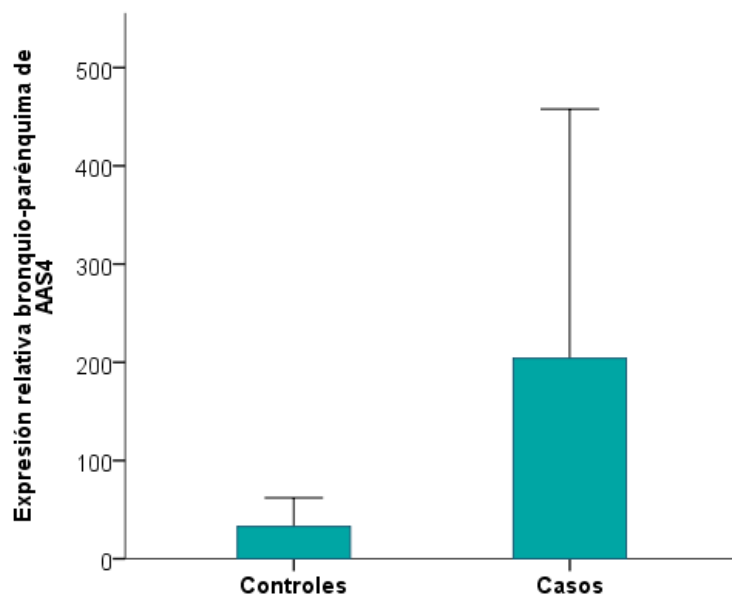


Figura 12. Expresión relativa de AAS4 en bronquio con respecto al parénquima.



Objetivo 3. Determinar la expresión de PCR y AAS en células epiteliales, macrófagos y fibroblastos pulmonares humanos.

La expresión génica de reactantes de fase aguda en los tres tipos celulares estudiados están reflejadas en las figuras 13-16. Como puede apreciarse, tanto en fibroblastos, epiteliales y macrófagos pulmonares sintetizan estos reactantes de fase aguda. A pesar de que las diferencias no son llamativas, parece que la producción de PCR estaría más elevada en células epiteliales de sujetos sin EPOC, mientras que los diversos genes de AAS estarían elevados en epiteliales y macrófagos. En concreto AAS4 parece estar constitutivamente más expresado en macrófagos que el resto.

Al estudiar las correlaciones entre los distintos tipos celulares en sujetos sin EPOC, observamos algunas relaciones interesantes (Tabla 3). Para la PCR los datos nos muestran una correlación que sólo es relevante para el binomio macrófago-epitelial. Sin embargo, esta relación única entre macrófagos y células epiteliales se expande a todos los tipos celulares al evaluar los genes del AAS. En concreto AAS1 y AAS4 tiene una amplia correlación entre todos los tipos celulares. Curiosamente, AAS2 tan solo mantiene esta correlación de nuevo para macrófagos-epiteliales

Figura 13. Expresión relativa de PCR en los grupos celulares estudiados de sujetos control.

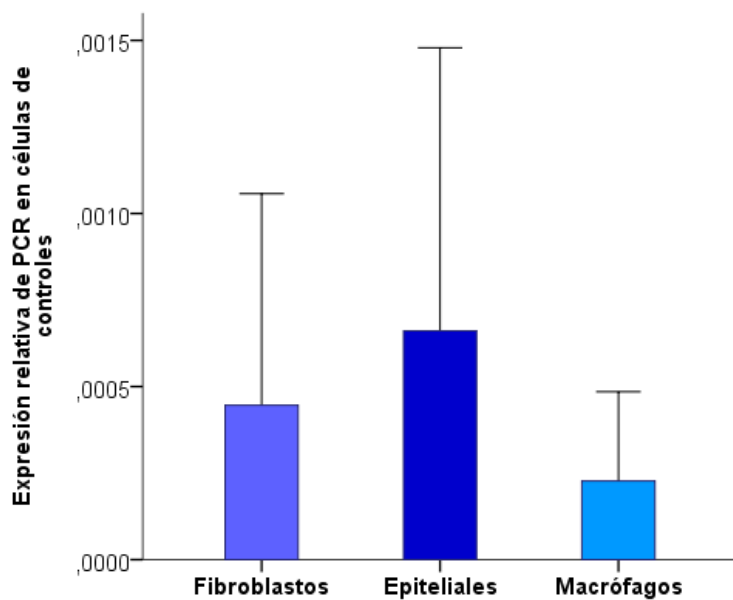


Figura 14. Expresión relativa de AAS1 en los grupos celulares estudiados de sujetos control.

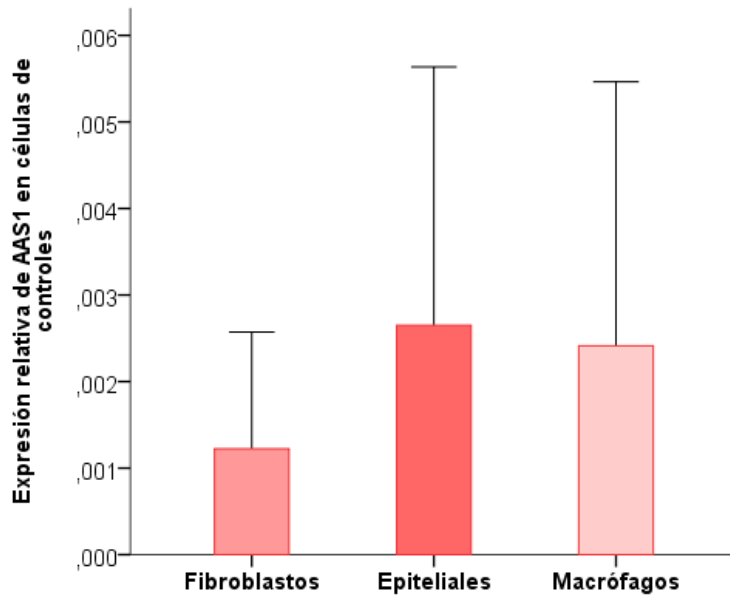


Figura 15. Expresión relativa de AAS2 en los grupos celulares estudiados de sujetos control.

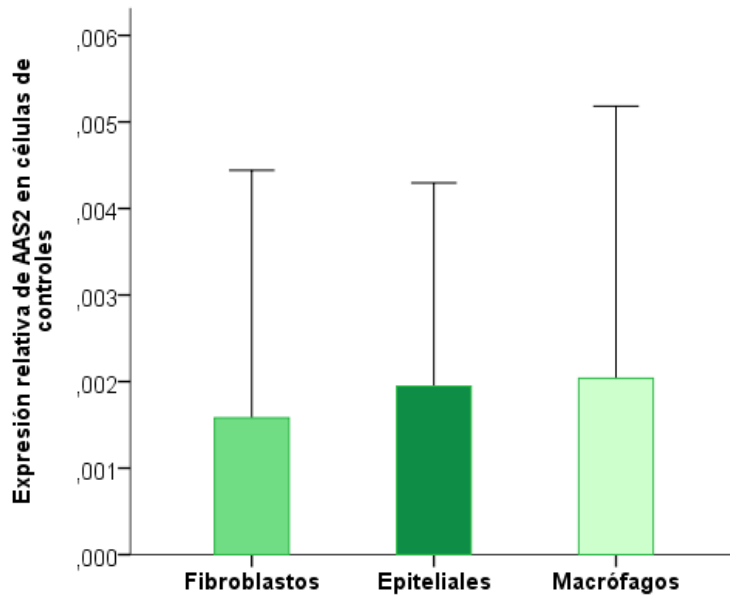


Figura 16. Expresión relativa de AAS4 en los grupos celulares estudiados de sujetos control.

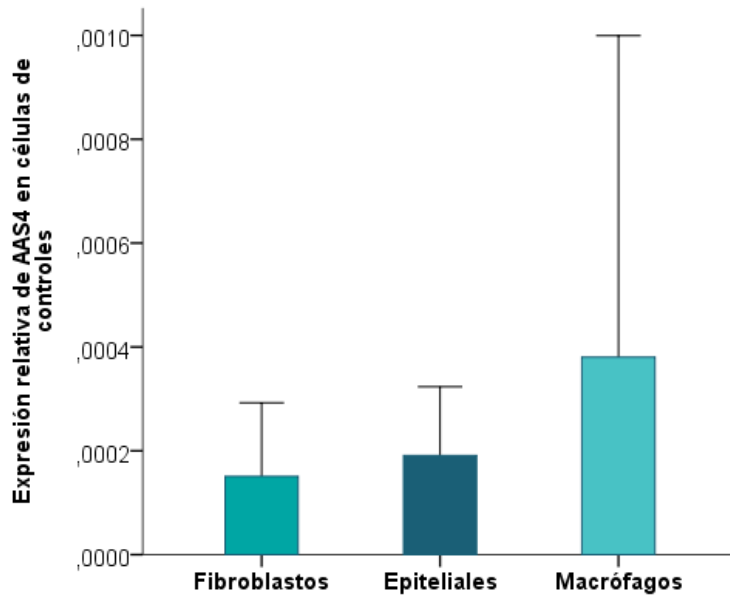


Tabla 3. Matriz de correlaciones en expresión de PCR entre grupos celulares en sujetos sin EPOC.

		Fibroblastos	Epiteliales	Macrófagos
PCR	Fibroblastos	1	r=0,303 p=0,077	r=0,265 p=0,124
	Epiteliales	r=0,303 p=0,077	1	r=0,527 p=0,001
	Macrófagos	r=0,265 p=0,124	r=0,527 p=0,001	1
AAS1	Fibroblastos	1	r=0,667 p<0,001	r=0,619 p<0,001
	Epiteliales	r=0,667 p<0,001	1	r=0,572 p<0,001
	Macrófagos	r=0,619 p<0,001	r=0,572 p<0,001	1
AAS2	Fibroblastos	1	r=0,439 p=0,008	r=0,051 p=0,771
	Epiteliales	r=0,439 p=0,008	1	r=0,036 p=0,838
	Macrófagos	r=0,051 p=0,771	r=0,036 p=0,838	1
AAS4	Fibroblastos	1	r=0,549 p=0,001	r=0,647 p<0,001
	Epiteliales	r=0,549 p=0,001	1	r=0,499 p=0,002
	Macrófagos	r=0,647 p<0,001	r=0,499 p=0,002	1

Datos analizados mediante el test de correlación lineal simple. R: coeficiente de correlación.

PCR: proteína C reactiva; AAS1: amiloide A sérico 1; AAS2: amiloide A sérico 2; AAS3: amiloide A sérico 3; AAS4: amiloide A sérico 4.

Objetivo 4. Comparar la expresión génica de RFA en dichos grupos celulares entre pacientes con EPOC frente a fumadores sanos.

Al analizar la expresión génica de cada marcador en el grupo de casos, observamos dos fenómenos relevantes. El primero es que el protagonismo de secreción de algunos tipos celulares se modifica. En cuanto a la PCR, mientras que en los controles observábamos una síntesis más o menos similar en todos los grupos con un ligero descenso en los macrófagos (Figura 13), en los pacientes con EPOC adquiere un mayor papel las células epiteliales (Figura 17). De manera similar, el AAS1 presentaba una síntesis similar en todos los tipos celulares con una ligera disminución de los fibroblastos (Figura 14). Sin embargo, en el caso de los pacientes con EPOC, aparece una síntesis aumentada en las células epiteliales nuevamente (Figura 18).

Por otro lado, la importancia de los tipos celulares en los dos marcadores restantes, también es cualitativamente diferente. AAS2 que en los controles tenía una expresión similar para todos los tipos celulares (Figura 15), en el caso de los pacientes con EPOC prevalece la expresión en fibroblastos (Figura 19). Análogamente AAS4 que expresaba constitutivamente de manera más importante en macrófagos (Figura 16), cambia su expresión para mostrar mayor síntesis en fibroblastos (Figura 20). Curiosamente, la matriz de correlaciones entre tipos celulares (Tabla 4) era muy parecida a la de los controles (Tabla 3).

Finalmente, en las figuras 21-24 se presentan las comparaciones entre casos y controles en cada tipo celular. Los hallazgos son complementarios a lo referido en párrafos anteriores.

Figura 17. Expresión relativa de PCR en los grupos celulares estudiados de sujetos con EPOC.

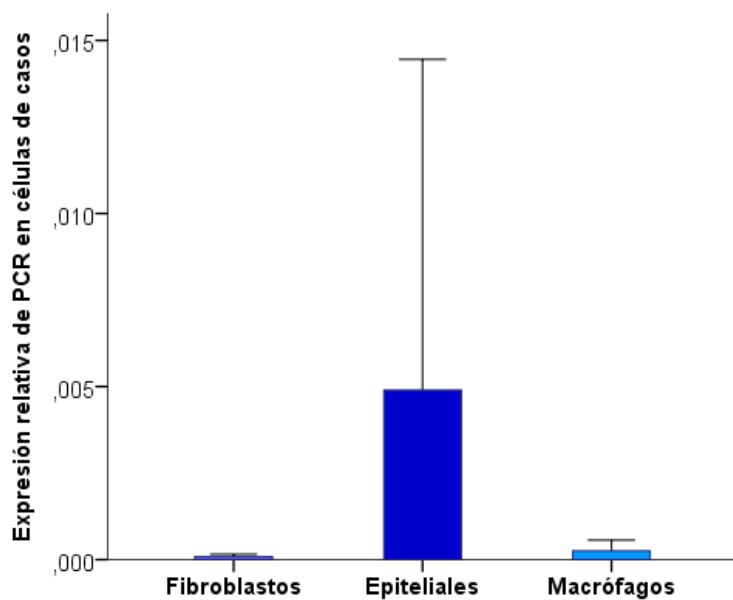


Figura 18. Expresión relativa de AAS1 en los grupos celulares estudiados de sujetos con EPOC.

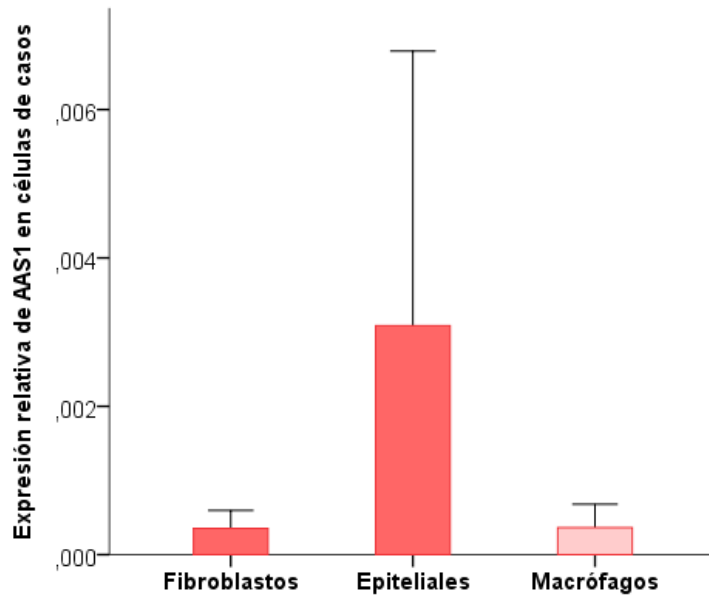


Figura 19. Expresión relativa de AAS2 en los grupos celulares estudiados de sujetos con EPOC.

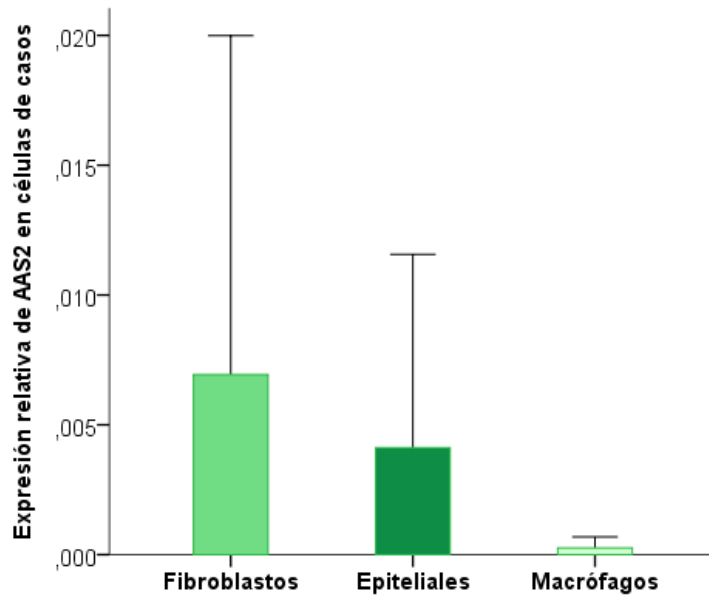


Figura 20. Expresión relativa de AAS4 en los grupos celulares estudiados de sujetos con EPOC.

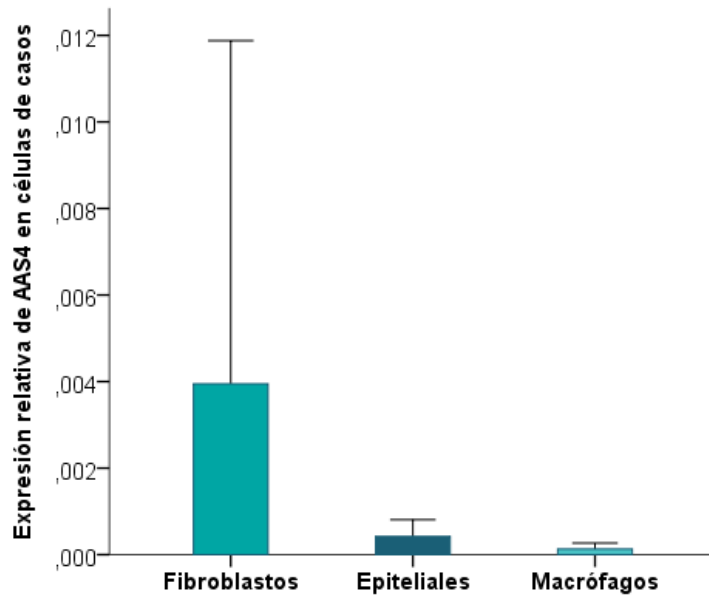


Tabla 4. Matriz de correlaciones en expresión de PCR entre grupos celulares en sujetos con EPOC.

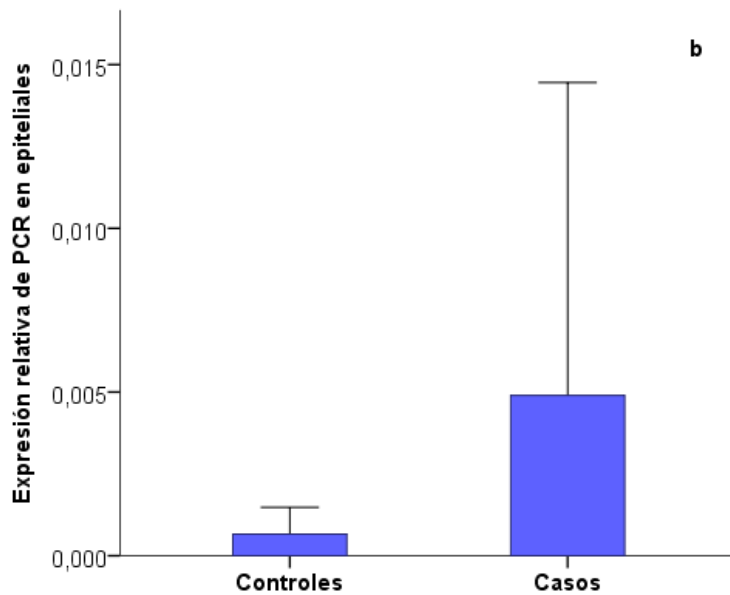
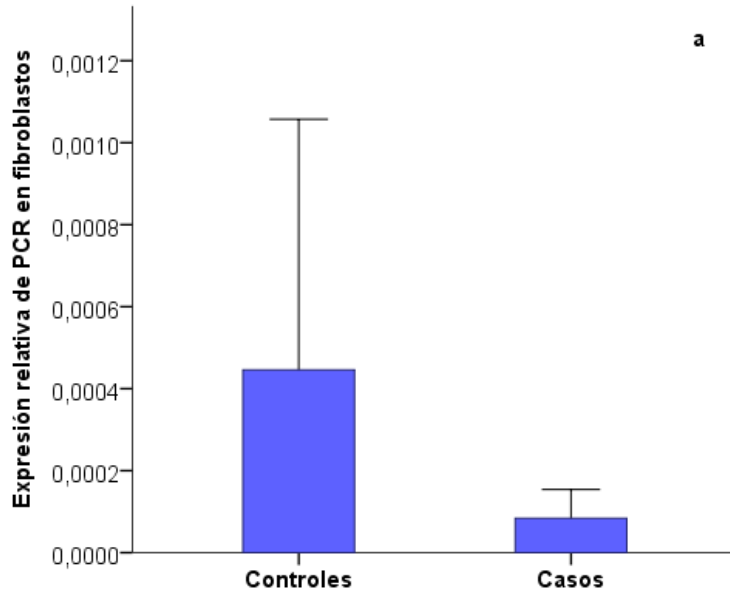
		Fibroblastos	Epiteliales	Macrófagos
PCR	Fibroblastos	1	r=0,263 p=0,106	r=0,285 p=0,079
	Epiteliales	r=0,263 p=0,106	1	r=0,668 p<0,001
	Macrófagos	r=0,285 p=0,079	r=0,668 p<0,001	1
AAS1	Fibroblastos	1	r=0,648 p<0,001	r=0,515 p=0,001
	Epiteliales	r=0,648 p<0,001	1	r=0,496 p=0,001
	Macrófagos	r=0,515 p=0,001	r=0,496 p=0,001	1
AAS2	Fibroblastos	1	r=0,485 p=0,002	r=0,297 p=0,066
	Epiteliales	r=0,485 p=0,002	1	r=0,264 p=0,105
	Macrófagos	r=0,297 p=0,066	r=0,264 p=0,105	1
AAS4	Fibroblastos	1	r=0,547 p<0,001	r=0,665 p<0,001
	Epiteliales	r=0,547 p<0,001	1	r=0,594 p<0,001
	Macrófagos	r=0,665 p<0,001	r=0,594 p<0,001	1

Datos analizados mediante el test de correlación lineal simple. R: coeficiente de correlación.

PCR: proteína C reactiva; AAS1: amiloide A sérico 1; AAS2: amiloide A sérico 2; AAS3: amiloide A sérico 3; AAS4: amiloide A sérico 4.

Figura 21. Comparación de la expresión relativa de PCR entre casos y controles.

a) fibroblastos, b) epiteliales, c) macrófagos.



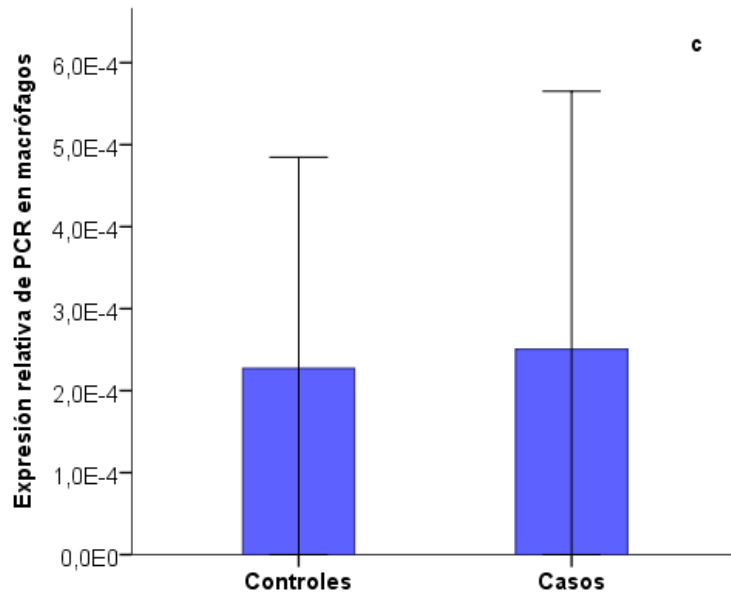
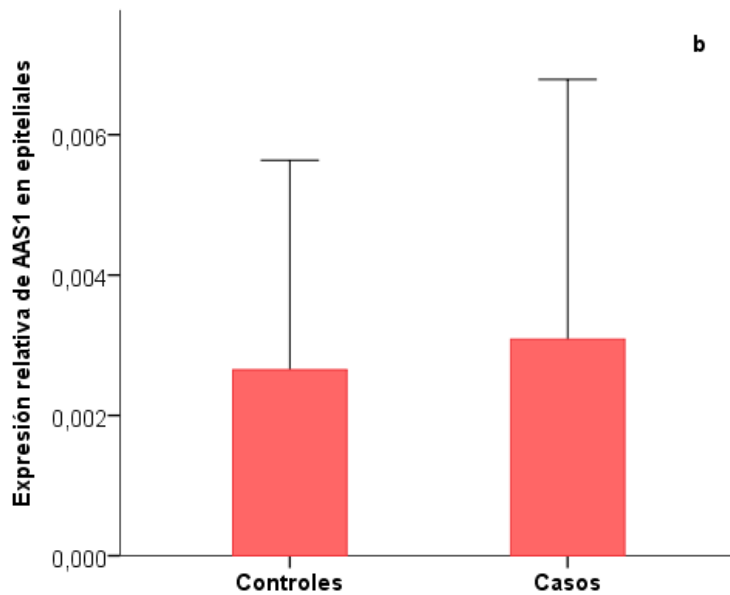
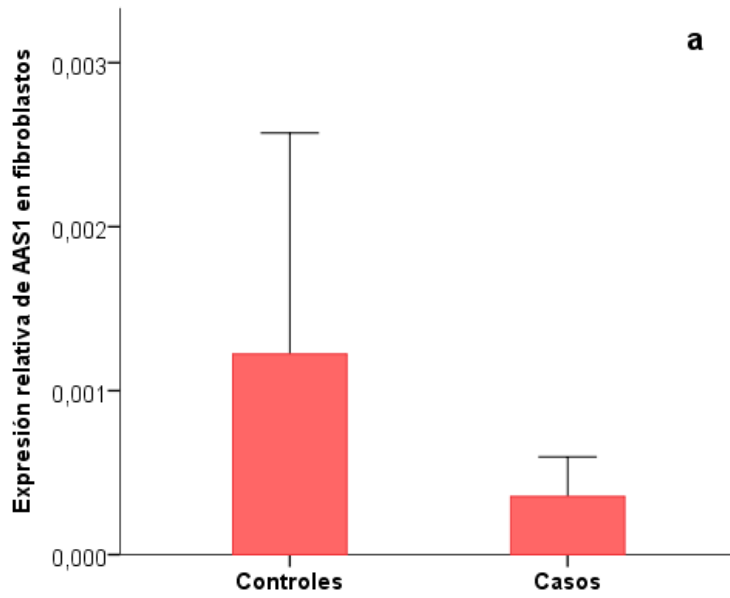


Figura 22. Comparación de la expresión relativa de AAS1 entre casos y controles. a) fibroblastos, b) epiteliales, c) macrófagos.



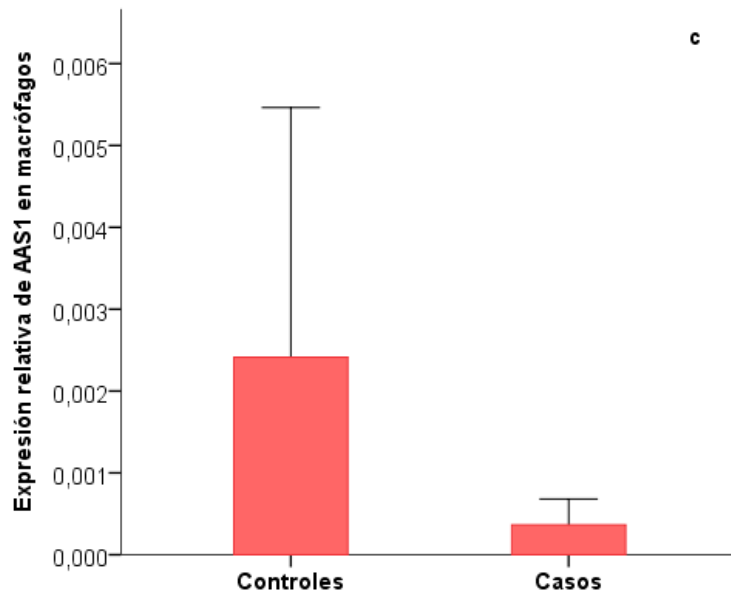
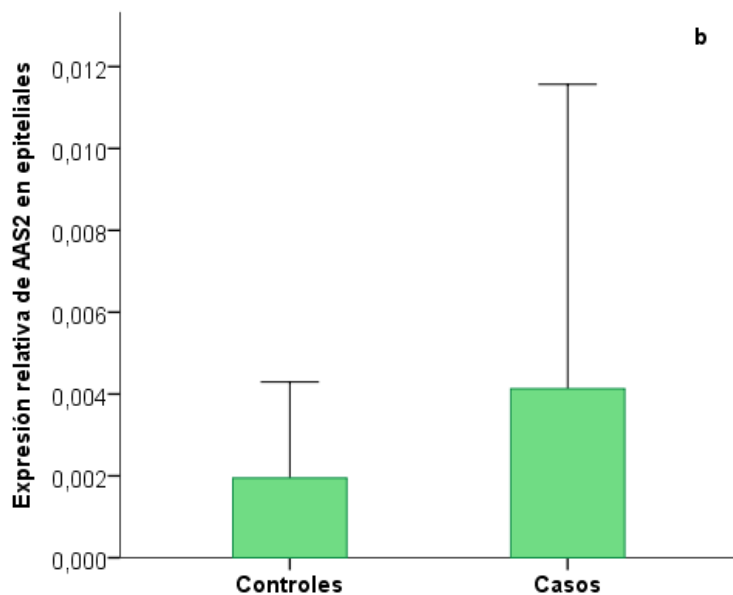
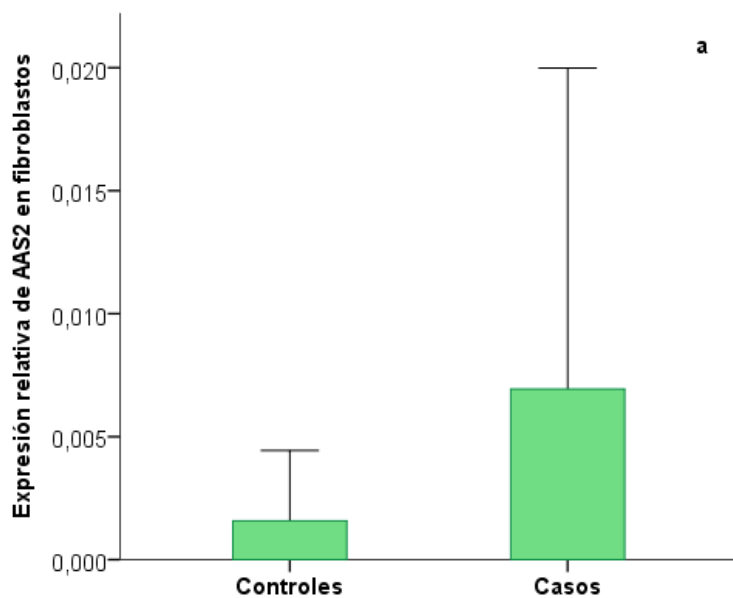


Figura 23. Comparación de la expresión relativa de AAS2 entre casos y controles. a) fibroblastos, b) epiteliales, c) macrófagos.



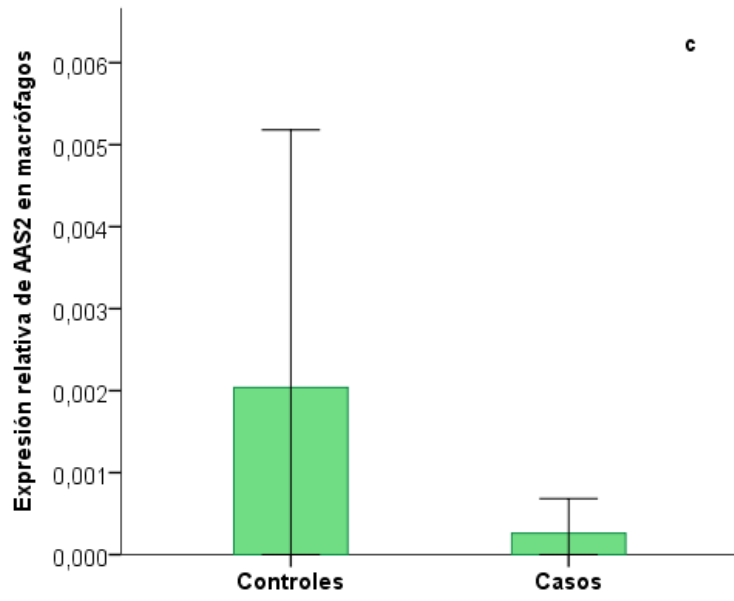
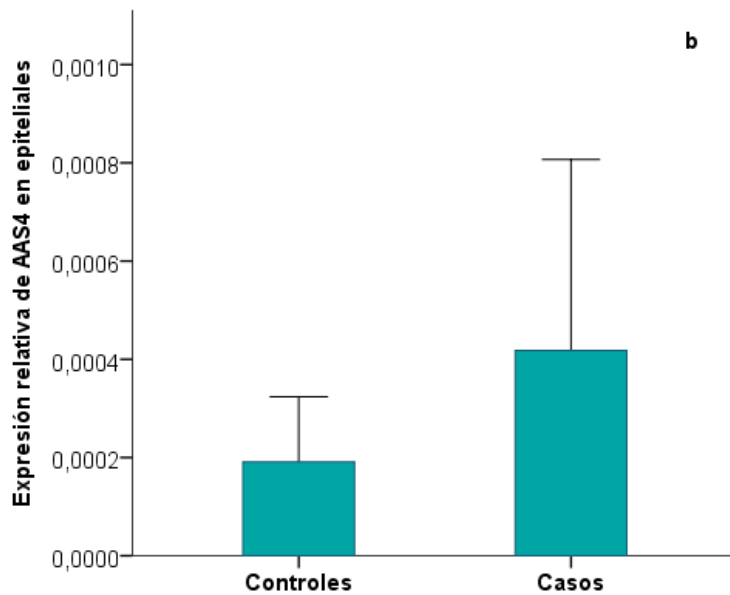
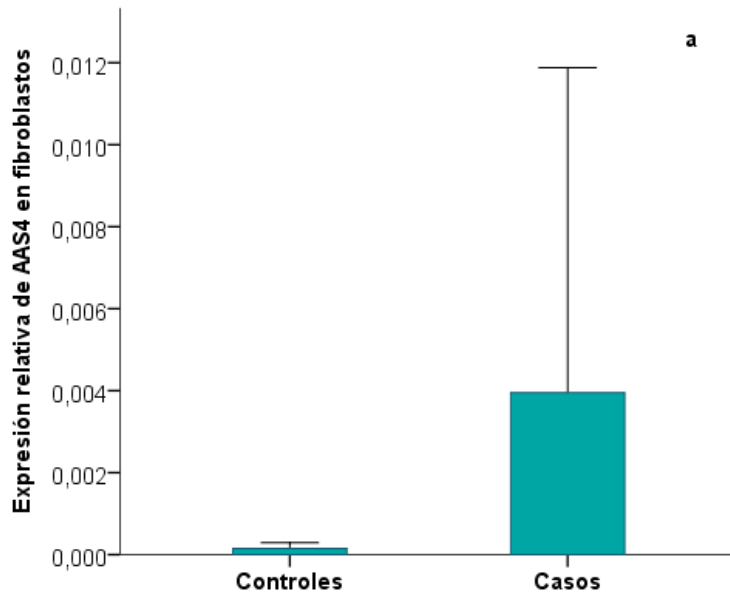
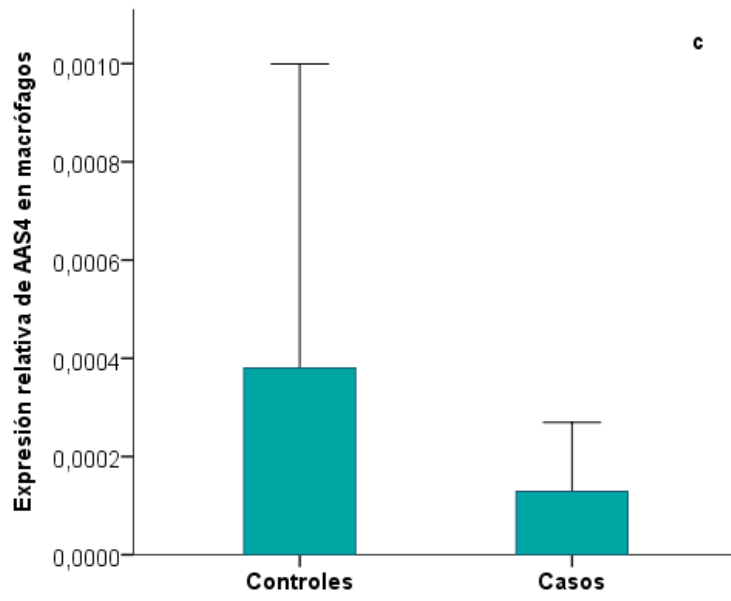


Figura 24. Comparación de la expresión relativa de AAS4 entre casos y controles. a) fibroblastos, b) epiteliales, c) macrófagos.





Discusión.

El presente estudio proporciona información sobre la síntesis de PCR y SAA en el parénquima pulmonar y el tejido bronquial, siendo ésta producción diferente entre pacientes con EPOC y fumadores sin la enfermedad. Junto a esto, analiza qué tipos celulares pulmonares son los principales responsables de esta secreción, mostrando diferencias en su producción según el tipo celular y la presencia o no de enfermedad.

Con el fin de interpretar correctamente los resultados existen varias cuestiones que deben ser tomadas en consideración. En primer lugar, debido a que todos los sujetos incluidos en el estudio son pacientes que ingresan de forma programada para cirugía de resección pulmonar (lobectomía o neumonectomía) por sospecha de neoplasia pulmonar primaria, y que por lo tanto cumplían los criterios establecidos para la realización de la cirugía, la mayoría de los pacientes EPOC, un 92,3%, tenía una alteración de la función pulmonar de grado leve o moderado (estadio I y II de la GOLD). Si bien, esto puede dar una falta de homogeneidad en la representatividad de la muestra, debido a los criterios de selección de candidatos a cirugía de resección pulmonar, no podemos obtener muestras quirúrgicas de pacientes con EPOC en estadios avanzados. Por otro lado, un 7,7% de los pacientes pertenecían a los estadios más severos de la enfermedad. Estos casos fueron adecuadamente valorados por Anestesiología y se consideraron candidatos para la cirugía de resección pulmonar por tener un bajo estadio tumoral y buenas condiciones generales del paciente que hacían posible la resección quirúrgica del tumor.

Dentro de los pacientes con EPOC, existe un grupo que parece ser más susceptible a tener exacerbaciones. Llamamos fenotipo agudizador frecuente al que presentan los pacientes que sufren dos o más exacerbaciones al año. Se han descrito diversos factores predisponentes a tener una exacerbación. Y el aumento de las exacerbaciones se ha relacionado con la severidad de la enfermedad. Diversos estudios afirman que los pacientes en estadio IV de la GOLD tienen el doble de exacerbaciones que los que se encuentran en el estadio II [162], esto determina la calidad de vida de estos pacientes e influye en su mortalidad. Sin embargo la diferencia en la severidad de estas exacerbaciones parece no tener consecuencias en la evolución de la enfermedad. En nuestra población no existía ningún paciente que correspondiera con este fenotipo, ya que consideramos que el aumento de medicación en cada agudización y la inestabilidad clínica del enfermo podría interferir en nuestros resultados. Si bien, es verdad que las agudizaciones que consideramos en el presente trabajo eran las referidas por el paciente. Esto puede producir un sesgo, ya que aunque las agudizaciones no mencionadas por el paciente están asociadas a menor intensidad y gravedad de los síntomas, que aquellas agudizaciones que si recuerda el paciente, se ha demostrado que estas agudizaciones no referidas tienen un impacto considerable en la calidad de vida de los pacientes EPOC [163], por lo que existen diversas estrategias para identificarlas y prevenirlas.

En cuanto a las variables clínicas y demográficas existían algunas diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. El grado de tabaquismo en el momento de la recogida de datos era mayor en los EPOC, que en los controles (Tabla1). Esto puede ser lógico ya que la relación del tabaco con la EPOC es dosis-dependiente, por lo que cuanto más tiempo de exposición exista,

mayor repercusión habrá en la caída de la función pulmonar y por tanto habrá más probabilidad de desarrollar la enfermedad.

Por otro lado, la presencia de comorbilidades también fue distinta. Escogimos el índice de Charlson-edad en lugar del Charlson original, por haberse demostrado una mejor correlación con la supervivencia de los pacientes EPOC estudiados [164]. El índice de Charlson-edad presentaba diferencias relevantes a pesar de tener una edad similar en ambos grupos (Tabla 1). Esta diferencia en parte es atribuible a la edad, con una p de 0,06 y en algunos casos puede hacer que estas diferencias hagan un sumatorio con el Charlson relevante. Las diferencias en las comorbilidades es un rasgo característico de la EPOC. Diversos estudios [165] señalan como además de que la EPOC es una enfermedad con importantes consecuencias sistémicas, no todos los pacientes tienen el mismo número de comorbilidades y no a todos los pacientes les afectan con la misma intensidad.

Una consideración metodológica importante es la presencia de una neoplasia en los sujetos a estudio. Este hecho tiene dos puntos a analizar. En primer lugar, aunque las muestras tomadas corresponden a tejido pulmonar macroscópicamente sano, no se conocen los cambios en la expresión de RFA que una neoplasia de pulmón produce en el parénquima sano circundante aunque sea distalmente. En este sentido, tampoco se conoce si estas alteraciones podrían estar presentes según el tipo histológico de tumor. Por este motivo, los tipos histológicos estaban repartidos adecuadamente con un número proporcional entre cada tipo de neoplasia

En segundo lugar, a pesar de que macroscópicamente el tejido analizado no estaba afectado por el tumor, siempre podría quedar la duda de si habría algún

tipo de afectación microscópica. No obstante con la información de las técnicas diagnósticas y de imagen actuales de alta resolución parece que esto sería muy improbable. En cualquier caso, los resultados de nuestro proyecto deben aplicarse estrictamente a pacientes con EPOC y una neoplasia de pulmón localizada.

Por otro lado, a pesar de todos los casos fueron operados por sospecha de malignidad, el 8,2%% no tenía una enfermedad maligna. De hecho, los pacientes con EPOC son más propensos a tener un tumor maligno. Aunque este no era el propósito del estudio, este hallazgo no es sorprendente. Varios estudios han abordado la relación entre estas dos enfermedades que se enlazan entre sí más allá de tener un factor de riesgo común, que es el humo del tabaco. A este respecto, se han encontrado varios marcadores genéticos y de epigenética en común entre ambos procesos [166,167].Curiosamente, existe un estudio reciente de 2.507 pacientes con EPOC seguidos durante 60 meses [168].Estos autores identificaron los estadios I y II de la GOLD 2011, una mayor edad, un menor índice de masa corporal, y una capacidad de difusión pulmonar de monóxido de carbono menor del 80%, con el diagnóstico de cáncer de pulmón. Sin embargo, al analizar la inflamación local, dicho estudio no encontró una asociación entre tener un cáncer de pulmón y los resultados de la expresión génica de estos biomarcadores.

En tercer lugar, ya que la cirugía en sí puede ser un estímulo potencial de los biomarcadores estudiados, se decidió excluir los casos con un tiempo entre la apertura del plano cutáneo y la extracción de la pieza quirúrgica mayor de 3 horas. Está descrito que el aumento se produce el mismo día varias horas después de la lesión aguda y que se mantiene elevado durante varios días

[140].Por lo tanto, se considera el plazo de tres horas como un tiempo razonable para este tipo de procedimientos quirúrgicos sin complicaciones.

Al analizar la expresión génica en ambos tejidos pulmonares, observamos cómo tanto el parénquima pulmonar como el tejido bronquial expresan ambos RFA. Nuestros resultados sugieren que existe un patrón de secreción distinto en función de la localización anatómica. La síntesis local de PCR es mayor en el bronquio de la misma manera a lo que ocurre para el AAS que es sintetizado en mayor medida por el mismo compartimento anatómico, alcanzando además en este caso la significación estadísticas para el AAS-1 y el AAS-4. Al realizar el análisis separando la población en pacientes con EPOC y fumadores sin la enfermedad, comprobamos que estas diferencias se mantenían a favor de la presencia de enfermedad, a excepción del AAS2 en parénquima, cuya secreción era mayor en los controles que en los sujetos con la enfermedad. Este diferente patrón de secreción es muy interesante y podría ser útil para intentar dilucidar la aportación de cada compartimento anatómico a la enfermedad. En este sentido, el distinto fenotipo (bronquial o enfisematoso) podría estar influyendo en nuestros resultados. La mayor producción de RFA en el bronquio puede ser debido a que exista gran componente enfisematoso en el parénquima pulmonar estudiado, por lo tanto gran destrucción tisular y menor capacidad de reacción inflamatoria. En el presente trabajo no hemos valorado la importancia de este componente de enfisema, lo que podría ser útil realizar en futuros trabajos para poder realizar una adecuada interpretación de estos resultados.

El AAS ha sido descrito como marcador de inflamación en las exacerbaciones de pacientes con EPOC [169]; sin embargo, no hay trabajos sobre la expresión de dicho RFA en pacientes estables, por lo que estos hallazgos podrían abrir una nueva vertiente en el estudio de la patogénesis de la inflamación sistémica de la

enfermedad. En relación con el AAS, aunque algún estudio previo ha analizado el valor del mismo como marcador tumoral en pacientes con cáncer de pulmón [170], el papel de este RFA en la EPOC no ha sido estudiado en profundidad. Aún así, todos los sujetos incluidos en este trabajo estaban afectados de cáncer, de modo que las diferencias en la expresión de AAS en función de la localización anatómica no quedan explicadas por la existencia de la enfermedad neoplásica de base y habría que buscar una respuesta a este patrón de síntesis del AAS.

Según estudios previos existe una correlación entre los niveles séricos de PCR y la rápida progresión de la de la enfermedad. En estos trabajos se describe una relación entre la concentración sérica de PCR con la disminución del FEV₁ en pacientes con EPOC, de forma que a mayor concentración de PCR más rápido será el empeoramiento del FEV₁ [171]. En este sentido, hubiera sido interesante incluir en el estudio a pacientes en fases avanzadas de la enfermedad para poder analizar la expresión local de los RFA y comparar la diferencia según los distintos estadios de la GOLD. Como se describe en nuestros resultados, los pacientes eran EPOC leve-moderados en su mayoría. Como se ha descrito anteriormente, esto fue debido a la imposibilidad para incluir pacientes en estadio IV de la enfermedad, ya que esta situación contraindicaba la cirugía, pudiendo considerarse este hecho como una de las limitaciones inherentes al diseño del presente trabajo. Este hecho también incide en nuestros resultados, ya que es probable que pacientes con una enfermedad más severa tuvieran un patrón de secreción distinto y pudieran obtenerse mayores diferencias en los estudios inferenciales.

La falta de relación entre la expresión de los RFA y la dosis de corticoides inhalados es interesante. La relación entre corticoides inhalados y expresión sistémica de PCR es un tema de actual controversia. Inicialmente un grupo

canadiense demostró que la toma de corticoides inhalados estaba relacionada con la concentración sérica de PCR [172], sugiriéndose que el depósito pulmonar de estos fármacos contribuiría a una menor secreción. Sin embargo, posteriormente, ese mismo grupo en un estudio más amplio y con un diseño más elaborado concluía que esto parecía no ser así, de manera que el depósito pulmonar de corticoides no influiría en la secreción de RFA [173]. Según los datos de nuestro trabajo, la dosis de corticoides no está relacionada con la secreción de estas moléculas inflamatorias, contribuyendo a corroborar los últimos datos publicados en este sentido. Estos resultados apuntan igualmente al menor efecto de los corticoides inhalados en la EPOC, en contraposición a lo que ocurre en otras broncopatías crónicas como el asma bronquial.

A la luz de los resultados de esta primera parte del presente trabajo, podrían establecerse dos nuevas líneas de trabajo para el futuro. Por un lado, sería necesario dilucidar si esta secreción pulmonar es de suficiente relevancia como para justificar la elevación de estas proteínas en sangre periférica ya conocida. En el presente trabajo no hemos podido encontrar esa relación, sugiriéndose que la mayor parte de la secreción se realizaría a nivel hepático. Por tanto, la importancia de la producción local de estos RFA tendría más una acción local que sistémica. Por otro lado, es posible que los polimorfismos de la PCR tengan relación con los resultados obtenidos. Actualmente existen numerosos polimorfismos de la PCR descritos, muchos de ellos con relevancia clínica. Por ejemplo, sabemos que el polimorfismo rs1205 está relacionado con la EPOC, ejerciendo un efecto protector sobre la función pulmonar con una relación inversa con el nivel de PCR en suero [174]. Aunque el estudio de los polimorfismos de la PCR está fuera de los objetivos del presente estudio, sería

interesante realizar un análisis de los principales polimorfismos con relevancia clínica en nuestra población.

Tras comprobar cómo el patrón inflamatorio de los pacientes con EPOC se modifica con respecto los fumadores sanos. La segunda parte del presente trabajo se centra en completar estos resultados mediante el estudio de diferentes grupos celulares con objeto de buscar cuales son las células implicadas en esta síntesis.

De los resultados obtenidos podemos obtener dos conclusiones relevantes. En primer lugar, comprobamos cómo tanto los fibroblastos, las células epiteliales y los macrófagos sintetizan PCR y AAS. El papel de estos grupos celulares en la patogenia de la EPOC se ha estudiado previamente en diversos trabajos. Estudios sobre biopsias bronquiales identifican a las células epiteliales como componentes del proceso inflamatorio [175], añadiendo que esta relación está asociada a la intensidad del tabaquismo [176]. Por otro lado, los fibroblastos intervienen en la patogenia de la EPOC especialmente en la afectación bronquiolar de la vía aérea fina, en la que se ha demostrado una proliferación peribronquiolar que resulta ser el factor más limitante en la génesis de la obstrucción crónica al flujo aéreo [177]. Además se ha demostrado que los macrófagos tienen un papel muy relevante en la patogenia de los pacientes con EPOC [178]. En este sentido, su papel como primera barrera de defensa innata en la vía aérea y el parénquima pulmonar ante estímulos nocivos crónicos como el humo del tabaco, les hace tener un papel central en la coordinación de la respuesta inmune frente a las partículas inhaladas disueltas en el humo.

El segundo hallazgo importante de nuestro trabajo, es que la síntesis de ambos marcadores es diferente según el grupo celular. La producción de PCR es mayor

en las células epiteliales de los sujetos sin la enfermedad (sujetos control), esto puede resultar contradictorio respecto a nuestros resultados anteriores dónde tomaba protagonismo la existencia de enfermedad en la síntesis de estos marcadores. Mientras que los diversos genes de AAS estarían más elevados en células epiteliales y macrófagos.

Sin embargo, para la correcta interpretación de estos resultados es importante tener en cuenta que en nuestro trabajo, la muestra obtenida fue de parénquima pulmonar, no de vía aérea. Esto implica que, los fibroblastos, macrófagos y las células epiteliales obtenidas son, en el mejor de los casos, de la vía aérea terminal y con toda seguridad del parénquima pulmonar. En este sentido, parece que el papel de estos grupos celulares podría ser más relevante en la vía aérea de mayor calibre [179]. Por el contrario, el efecto esperado en la afectación parenquimatosa de la EPOC sería la aparición de enfisema pulmonar como resultado del desequilibrio de diversos mecanismos patogénicos entre los que juegan un papel relevante, el equilibrio oxidación-antioxidación [180], proteasas-antiproteasas [181] y la potenciación de la apoptosis [182]. Consecuentemente, células epiteliales, macrófagos y fibroblastos tendrían un papel escaso al estar o ausentes o disminuidos en número.

En la comparación de la expresión génica de ambos RFA en dichos grupos celulares entre pacientes con EPOC y sujetos sin la enfermedad, podemos señalar dos aspectos interesantes. En primer lugar, la secreción celular se modifica ante la presencia de enfermedad. El predominio de la síntesis en células epiteliales en sujetos con la enfermedad podría ser consecuencia del remodelado producido en el tejido pulmonar de pacientes con EPOC. El envejecimiento acelerado de las células o senescencia, resulta en una serie de perturbaciones en la función y morfología celular que culminan en el fallo celular.

[183]. Parece haber suficiente evidencia para decir que las células estructurales residentes en el pulmón y los linfocitos en el sistema circulatorio en pacientes con EPOC muestran marcadores de senescencia y acelerado envejecimiento, los cuales van en potencial detrimento de la reparación pulmonar normal. Este daño epitelial, podría tener como consecuencia un aumento de la respuesta inflamatoria en estas células. En el borde de la lesión, las células no dañadas se diferenciarían y emigrarían para cubrir el área lesionada y se liberaría una serie de citoquinas pro-inflamatorias y factores de crecimiento para atraer proteínas y células necesarias para la reparación de la matriz extra celular, lo cual es crucial para la reparación del tejido dañado. El proceso de re-epitelización inicia la respuesta inflamatoria y con ello el inicio de la reparación [184].

Por otro lado, la variabilidad en la importancia de los tipos celulares en los dos marcadores restantes, es interesante. Tanto el AAS2 como el AAS4 en los pacientes EPOC tienen una mayor expresión en fibroblastos, lo que daría un mayor protagonismo al papel de éstas células en la respuesta inflamatoria. Los fibroblastos son las principales células responsables en la producción y mantenimiento de la matriz extracelular en el pulmón [48]. Por tanto, la alteración en la capacidad funcional de estos fibroblastos, puede desempeñar un papel relevante en la patogénesis del enfisema pulmonar, que se traduce en una desestructuración del tejido. Como ya hemos comentado, en el presente trabajo no hemos realizado determinación del grado de enfisema en nuestros casos, lo cual podría ser una medida interesante a realizar en futuros estudios. Esta alteración estructural mantenida en el tiempo puede ser la causante de diversas repercusiones clínicas de la enfermedad, y por tanto estar relacionada con el grado de inflamación y expresión de los marcadores mencionados en los fibroblastos.

Con estos datos, no podemos descartar que sean otros grupos celulares los que participen en esta síntesis de manera más importante. En este sentido, nuestro grupo está estudiando la expresión de estos marcadores en células dendríticas cuyos resultados esperamos tener próximamente. La relación con este tipo celular puede ser más plausible. Las células dendríticas parecen ser un agente clave en la modulación de la respuesta inmune y podrían tener un papel relevante en la patogenia de la enfermedad. Por el momento existen datos contradictorios en la literatura sobre la importancia en la patogenia de la EPOC [185, 186]. Por este motivo, nuestro grupo ha iniciado un nuevo proyecto de investigación financiado por FIS para tratar de dilucidar el papel de estas células en este contexto clínico.

Conclusiones.

PRIMERA. La metodología empleada en la presente Tesis Doctoral nos ha permitido avanzar en los conocimientos de la producción de mediadores inflamatorios por el aparato respiratorio del paciente con EPOC.

SEGUNDA. De acuerdo con la metodología empleada, hemos podido constatar que el tejido pulmonar es capaz de sintetizar reactantes de fase aguda de manera consustancial tanto en el tejido bronquial como en el parénquima pulmonar.

TERCERA. Nuestros resultados muestran que la producción de ambos biomarcadores es diferente según se trate de pacientes con EPOC o de fumadores que no han desarrollado la enfermedad.

CUARTA. La secreción de reactantes de fase aguda por el tejido pulmonar difiere según los diferentes compartimentos anatómicos pulmonares, de manera que la producción entre el parénquima y el tejido bronquial es diferente.

QUINTA. El estudio de los tipos celulares separados mediante bolitas magnéticas nos aporta poblaciones celulares aptas para el estudio de la síntesis de biomarcadores.

SEXTA. El análisis de la expresión de los biomarcadores analizados en los tres tipos celulares, nos muestran que células epiteliales, macrófagos y fibroblastos pulmonares humanos conservan esta capacidad de síntesis.

SEPTIMA.. El estudio comparativo entre distintos tipos celulares de patients con EPOC y fumadores sin la enfermedad nos muestra un patron de síntesis diferente con una mayor participación de las células epiteliales frente al resto de tipos celulares en estos pacientes.

OCTAVA. La repercusión local y sistémica de esta producción de biomarcadores debe ser evaluada en el contexto del resto de tipos celulares que conforman el tejido pulmonar, por lo que futuros trabajos deberán incluir otras células como células dendríticas o endovasculares.

NOVENA. Es probable que este origen local de un marcador sistémico tenga repercusiones clínicas que deberán ser dilucidadas en futuros trabajos, cuyos resultados dibujarán un cuadro global de actuación que aportará información relevante sobre el papel de estas moléculas en la patogenia de la EPOC y sus repercusiones sistémicas.

Anexo I. información al paciente y consentimiento informado.

Estimado paciente:

Próximamente, Ud. va a ser intervenido en el quirófano por un problema de salud relacionado con su aparato respiratorio. Durante la intervención se le quitará parte de un pulmón. Esta parte quitada irá al laboratorio del hospital donde se procederá a realizar cuantos análisis sean necesarios según la naturaleza del proceso que Ud. padezca.

Actualmente, estamos llevando a cabo un proyecto de investigación con objeto de determinar algunos mecanismos inflamatorios en pacientes con enfermedades pulmonares. Por este motivo, le pedimos su colaboración en este proyecto.

Este estudio ha obtenido la aprobación del Comité Ético del Hospital Universitario Virgen del Rocío y en él se respetarán las recomendaciones éticas internacionales para estudio con seres humanos (Declaración de Helsinki). El objetivo de este proyecto es estudiar algunas moléculas inflamatorias, llamadas reactantes de fase aguda. Estas moléculas son producidas por el aparato respiratorio y están implicadas en algunos de los efectos perjudiciales del tabaco en la salud. Nuestro objetivo es determinar qué célula es la responsable de su producción.

Durante su participación en el estudio será necesario realizarle una analítica de sangre adicional, una medición de la composición corporal y una prueba de marcha andando durante 6 minutos. Además, precisamos es su consentimiento para poder realizar alguna prueba más a la pieza anatómica que le sea extraída durante la intervención. Es importante que sepa que bajo ningún concepto se le

extraerá mayor cantidad de tejido de la que sea estrictamente necesaria por su intervención. En caso de que la muestra obtenida no sea satisfactoria para el objetivo de este trabajo, no lo incluiremos en el estudio, pero en ningún caso se tomarán muestras añadidas para este trabajo.

Los beneficios que se derivarán de este estudio serán un mayor conocimiento de los mecanismos que subyacen en la inflamación pulmonar y que son responsables de algunas enfermedades pulmonares y de sus repercusiones en el resto del organismo y que, en un futuro, podrían dar lugar a nuevas dianas terapéuticas.

Debe saber que Ud. no obtendrá beneficio alguno por su participación en este estudio y que su participación en el proyecto es altruista, por lo que no recibirá ninguna compensación económica ni de ningún otro tipo por su colaboración. Además, su colaboración es completamente voluntaria, lo que significa que podrá retirar su consentimiento y dejar de participar en el estudio en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con el equipo médico que le atiende ni se produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

Sus datos personales como participante del estudio se mantendrán bajo estricta confidencialidad (Ley Orgánica 15/1999, de protección de datos de carácter personal) y sólo el investigador principal del proyecto tendrá acceso a ellos. Las muestras biológicas relacionadas con su caso estarán numeradas con un código para garantizar la confidencialidad de la muestra. El investigador principal sólo utilizará sus datos personales únicamente para localizarle en caso de que surja alguna eventualidad relacionada con el proyecto.

Si tiene dudas sobre esta investigación puede contactar con el investigador principal del proyecto, Dr. López-Campos, en el teléfono 955013166.

Consentimiento informado.

Yo, _____

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con el Dr. _____.

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

-Cuando quiera.

-Sin tener que dar explicaciones.

-Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Sevilla, a _____ de _____ de _____

Firma del participante o su representante legal.

Anexo II. Cuestionario estandarizado de recogida de datos clínicos.

Fecha de recogida de los datos: _____.

NHC:_____. Iniciales: _____. Edad:_____. Sexo (H / M

Antecedentes.

EPOC: Si / No Fumador: Si / Nunca / Exfumador

Nº agudizaciones moderadas-severas en los últimos 12 meses: _____.

Tiempo desde el último cigarrillo:_____ (indicar unidad de medida días, meses o años).

Consumo acumulado: _____ paq-año. Consumo actual: _____ cig/día.

Índice de Charlson		
IAM.	0. No <input type="checkbox"/>	1. Sí <input type="checkbox"/>
Insuficiencia cardíaca congestiva.	0. No <input type="checkbox"/>	1. Sí <input type="checkbox"/>
Enfermedad vascular periférica.	0. No <input type="checkbox"/>	1. Sí <input type="checkbox"/>
Enfermedad cerebrovascular.	0. No <input type="checkbox"/>	1. Sí <input type="checkbox"/>
Demencia.	0. No <input type="checkbox"/>	1. Sí <input type="checkbox"/>
Enfermedad respiratoria crónica.	0. No <input type="checkbox"/>	1. Sí <input type="checkbox"/>
Enfermedad del tejido conectivo.	0. No <input type="checkbox"/>	1. Sí <input type="checkbox"/>
Enfermedad ulcerosa gastro-duodenal.	0. No <input type="checkbox"/>	1. Sí <input type="checkbox"/>
Hemiplejía	0. No <input type="checkbox"/>	2. Sí <input type="checkbox"/>
Leucemia	0. No <input type="checkbox"/>	2. Sí <input type="checkbox"/>
Linfoma maligno	0. No <input type="checkbox"/>	2. Sí <input type="checkbox"/>
Enfermedad hepática	0. No <input type="checkbox"/>	1. Leve <input type="checkbox"/>

Índice de Charlson		
Diabetes	0. No <input type="checkbox"/>	1. Sin afectación órganos Diana <input type="checkbox"/>
Enfermedad renal	0. No <input type="checkbox"/>	0. Leve <input type="checkbox"/>
SIDA	0. No <input type="checkbox"/>	6. Sí <input type="checkbox"/>
Tumor maligno sólido	0. No <input type="checkbox"/>	2. Sin metástasis <input type="checkbox"/>

Otros antecedentes: _____

Clínica.

Disnea en situación basal (escala modificada de la MRC):

0. Ausencia de disnea excepto al realizar ejercicio intenso.
1. Disnea al andar deprisa en llano, o al andar subiendo una pendiente poco pronunciada.
2. La disnea le produce una incapacidad de mantener el paso de otras personas de la misma edad caminando en llano o tener que parar a descansar al andar en llano al propio paso.
3. La disnea hace que tenga que parar a descansar al andar unos 90 metros o después de pocos minutos de andar en llano.
4. La disnea impide al paciente salir de casa o aparece con actividades como vestirse o desvestirse

Fármaco y dosis	Tomas	Nota

Bibliografía

- 1 Tomashefski JF. Definition, differentiation, and classification of COPD. *Postgrad Med* 1977; 62:88-97.
- 2 Heard BE, Khatchatourov V, Otto H, Putov NV, Sobin L. The morphology of emphysema, chronic bronchitis, and bronchiectasis: definition, nomenclature, and classification. *J Clin Pathol* 1979; 32: 882-892.
- 3 Montemayor T, Alfajeme I, Escudero C, Morera J, Sánchez Agudo L. Normativa sobre diagnóstico y tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Barcelona: Doyma, 1992.
- 4 Montemayor T, Alfajeme I, Escudero C, Morera J, Sánchez Agudo L. Normativa sobre diagnóstico y tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Grupo de Trabajo de la SEPAR. *Arch Bronconeumol* 1996; 32: 285-301.
- 5 Guía de práctica clínica de diagnóstico y tratamiento de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica. SEPAR-ALAT, 2007. Disponible en: <http://www.separ.es/>
- 6 Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for diagnosis, management, and prevention of COPD. Updated 2010. Disponible en: <http://www.goldcopd.org/>
- 7 Barbera JA, Peces-Barba G, Agustí AG, Izquierdo JL, Monsó E, Montemayor T, Viejo JL; Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR). Guía clínica para el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *Arch Bronconeumol* 2001; 37: 297-316.
- 8 Snider GL, Kleinreman J, Thurlbeck WM, Bengali ZH. The definition of emphysema: report of National Heart and Blood Institute, division of Lung Diseases, workshop. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132: 182-185.
- 9 American Thoracic Society. Lung function testing: selection of reference values and interpretative strategies. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 1202-1218.
- 10 British Thoracic Society. Guidelines for the management of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1997; 52: S1-S28.

-
- 11 Celli B, Cote C, Marín M, Montes de Oca M, Casanova C, Méndez R. The SCORE: a new COPD staging system combining 6MWD, MRC dyspnea, FEV1 and PaO2 as predictor of health care resources utilization (HCUR). *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: A749.
 - 12 Celli BR, Cote CG, Marin JM, Casanova C, Montes de Oca M, Mendez RA, et al. The body-mass index, airflow obstruction, dyspnea, and exercise capacity index in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2004; 350:1005-1012.
 - 13 Puhan MA, Garcia-Aymerich J, Frey M, TerRiet G, Antó JM, Agustí AG, et al. Expansion of the prognostic assessment of patients with chronic obstructive pulmonary disease: the updated BODE index and the ADO index. *Lancet*. 2009; 374:704-711.
 - 14 Jones RC, Donaldson GC, Chavannes NH, Kida K, Dickson-Spillmann M, Harding S, et al. Derivation and Validation of a Composite Index of Severity in Chronic Obstructive Pulmonary Disease - The DOSE Index. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009; 180: 1189-1195.
 - 15 Evans J, Chen Y. The association between home and vehicle environmental tobacco smoke (ETS) and chronic bronchitis in a Canadian population: the Canadian Community Health Survey, 2005. *Inhal Toxicol* 2009; 21: 244-249.
 - 16 Liu S, Zhou Y, Wang X, Wang D, Lu J, Zheng J, Zhong N, Ran P. Biomass fuels are the probable risk factor for chronic obstructive pulmonary disease in rural South China. *Thorax* 2007; 62: 889-897.
 - 17 Ramírez-Venegas A, Sansores RH, Pérez-Padilla R, Regalado J, Velázquez A, Sánchez C, Mayar ME. Survival of patients with chronic obstructive pulmonary disease due to biomass smoke and tobacco. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173: 393-397.
 - 18 Kuschner WG, Hegde S, Agrawal M. Occupational history quality in patients with newly documented, clinician-diagnosed chronic bronchitis. *Chest* 2009; 135: 378-383.

-
- 19 Blanc PD, Torén K. Occupation in chronic obstructive pulmonary disease and chronic bronchitis: an update. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007; 11: 251-257.
- 20 Sanchís Aldás J, Casan Clará P, Castillo Gómez J, Gómez Mangado N, Palenciano Ballesteros L, Roca Torrent J. *Espirometría*. Barcelona: SEPAR, 1985.
- 21 Mannino DM, Sonia Buist A, Vollmer WM. Chronic obstructive pulmonary disease in the older adult: what defines abnormal lung function? *Thorax* 2007; 62: 237-241.
- 22 Soriano JB, Brusasco V, Dinh-Xuan AT. The European Respiratory Journal makes COPD a priority. *Eur Respir J* 2011; 38:999-1001.
- 23 Sobradillo V, Miravittles M, Jiménez CA, Gabriel R, Viejo JL, Masa JF, Fernández-Fau L, Villasante C. Estudio IBERPOC en España: prevalencia de síntomas respiratorios habituales y de limitación crónica al flujo aéreo. *Arch Bronconeumol* 1999; 35: 159-166.
- 24 Peña VS, Miravittles M, Gabriel R, Jiménez-Ruiz CA, Villasante C, Masa JF, Viejo JL, Fernández-Fau L. Geographic variations in prevalence and underdiagnosis of COPD: results of the IBERPOC multicentre epidemiological study. *Chest* 2000; 118: 981-989.
- 25 Ancochea J, Badiola C, Duran-Tauleria E, Garcia Rio F, Miravittles M, Muñoz L, Sobradillo V, Soriano JB. Estudio EPI-SCAN: resumen del protocolo de un estudio para estimar la prevalencia de EPOC en personas de 40 a 80 años en España. *Arch Bronconeumol*. 2009; 45: 41-47.
- 26 Soriano JB, Ancochea J, Miravittles M, García-Río F, Duran-Tauleria E, Muñoz L, Jiménez-Ruiz CA, Masa JF, Viejo JL, Villasante C, Fernández-Fau L, Sánchez G, Sobradillo-Peña V. Recent trends in COPD prevalence in Spain: a repeated cross-sectional survey 1997-2007. *Eur Respir J* 2010; 36:758-765.
- 27 Buist AS, McBurnie MA, Vollmer WM, Gillespie S, Burney P, Mannino DM, Menezes AM, Sullivan SD, Lee TA, Weiss KB, Jensen RL, Marks GB, Gulsvik A, Nizankowska-Mogilnicka E; BOLD Collaborative Research Group. International variation in the prevalence of COPD (the BOLD Study): a population-based prevalence study. *Lancet* 2007; 370: 741-750.

-
- 28 Menezes AM, Perez-Padilla R, Jardim JR, Muiño A, Lopez MV, Valdivia G, Montes de Oca M, Talamo C, Hallal PC, Victora CG; PLATINO Team. Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities (the PLATINO study): a prevalence study. *Lancet* 2005; 366:1875-1881.
- 29 Caballero A, Torres-Duque CA, Jaramillo C, Bolívar F, Sanabria F, Osorio P, Orduz C, Guevara DP, Maldonado D. Prevalence of COPD in Five Colombian cities situated at low, medium, and high altitude (PREPOCOL study). *Chest* 2008; 133: 343-349.
- 30 Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997; 349: 1498-504.
- 31 Benavides FG, Bolumar F, Peris R. Quality of death certificates in Valencia, Spain. *Am J Public Health* 1989; 79: 1352–1354.
- 32 Mannino DM, Homa DM, Akinbami LJ, Ford ES, Redd SC. Chronic obstructive pulmonary disease surveillance--United States, 1971-2000. *MMWR Surveill Summ* 2002; 51:1-16.
- 33 Chapman KR, Mannino DM, Soriano JB, Vermeire PA, Buist AS, Thun MJ, Connell C, Jemal A, Lee TA, Miravittles M, Aldington S, Beasley R. Epidemiology and costs of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2006; 27:188-207.
- 34 McGarvey LP, John M, Anderson JA, Zvarich M, Wise RA; TORCH Clinical Endpoint Committee. Ascertainment of cause-specific mortality in COPD: operations of the TORCH Clinical Endpoint Committee. *Thorax* 2007; 62:411-415.
- 35 Sin DD, Anthonisen NR, Soriano JB, Agusti AG. Mortality in COPD: Role of comorbidities. *Eur Respir J* 2006; 28:1245-1257.
- 36 Rennard S, Decramer M, Calverley PM, Pride NB, Soriano JB, Vermeire PA, Vestbo J. Impact of COPD in North America and Europe in 2000: subjects perspective of Confronting COPD International Survey. *Eur Respir J* 2002; 20: 799-805.

-
- 37 Álvarez-Gutiérrez FJ, Miravittles M, Calle M, Gobartt E, López F, Martín A; Grupo de Estudio EIME. Impacto de la EPOC en la vida diaria de los pacientes. Resultados del estudio multicentrico EIME. *Arch Bronconeumol* 2007; 43: 64-72.
- 38 López-Campos Bodineau JL, Fernández Guerra J, Lara Blanquer A, Perea-Milla López E, Moreno L, Cebrián Gallardo JJ, García Jiménez JM. Análisis de los ingresos por enfermedad pulmonar obstructiva crónica en Andalucía, año 2000. *Arch Bronconeumol* 2002; 38: 473-478.
- 39 Foster TS, Miller JD, Marton JP, Caloyeras JP, Russell MW, Menzin J. Assessment of the economic burden of COPD in the US: a review and synthesis of the literature. *COPD* 2006; 3: 211–218.
- 40 Mannino DM, Thorn D, Swensen A, Holguin F. Prevalence and outcomes of diabetes, hypertension, and cardiovascular disease in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2008; 32: 962–269.
- 41 Masa JF, Sobradillo V, Villasante C, Jiménez-Ruiz CA, Fernández-Fau L, Viejo JL, Miravittles M. Costes de la EPOC en España. Estimación a partir de un estudio epidemiológico poblacional. *Arch Bronconeumol* 2004; 40: 72-79.
- 42 Jha P, Jacob B, Gajalakshmi V, Gupta PC, Dhingra N, Kumar R, Sinha DN, Dikshit RP, Parida DK, Kamadod R, Boreham J, Peto R; RGI-CGHR Investigators. A nationally representative case-control study of smoking and death in India. *N Engl J Med* 2008;358:1137-1147.
- 43 Willemse BW, Postma DS, Timens W, ten Hacken NH. The impact of smoking cessation on respiratory symptoms, lung function, airway hyperresponsiveness and inflammation. *Eur Respir J* 2004; 23:464-476.
- 44 Anthonisen NR, Skeans MA, Wise RA, Manfreda J, Kanner RE, Connett JE; Lung Health Study Research Group. The effects of a smoking cessation intervention on 14.5-year mortality: a randomized clinical trial. *Ann Intern Med* 2005; 142: 233-239.
- 45 Yin P, Jiang CQ, Cheng KK, Lam TH, Lam KH, Miller MR, Zhang WS, Thomas GN, Adab P. Passive smoking exposure and risk of COPD among adults in China: the Guangzhou Biobank Cohort Study. *Lancet* 2007; 370: 751-757.

-
- 46 Osman LM, Douglas JG, Garden C, Reglitz K, Lyon J, Gordon S, Ayres JG. Indoor air quality in homes of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176: 465-472.
- 47 Oudijk EJ, Lammers JW, Koenderman L. Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J Suppl* 2003; 46:5s-13s.
- 48 Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Pare PD. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004; 350: 2645-2653.
- 49 Lapperre TS, Postma DS, Gosman MM, Snoeck-Stroband JB, ten Hacken NH, Hiemstra PS, Timens W, Sterk PJ, Mauad T. Relation between duration of smoking cessation and bronchial inflammation in COPD. *Thorax* 2006; 61: 115-121.
- 50 Aaron SD, Angel JB, Lunau M, Wright K, Fex C, Le Saux N, Dales RE. Granulocyte inflammatory markers and airway infection during acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 349-355.
- 51 Peces-Barba G, Barberá JA, Agustí A, Casanova C, Casas A, Izquierdo JL, et al. Guía de práctica clínica de diagnóstico y tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Normativa SEPAR-ALAT. *Arch Bronconeumol.* 2008; 44: 271-81.
- 52 Russell RE, Thorley A, Culpitt SV, Dodd S, Donnelly LE, Demattos C, Fitzgerald M, Barnes PJ. Alveolar macrophage-mediated elastolysis: roles of matrix metalloproteinases, cysteine, and serine proteases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;283: L867-L873.
- 53 Takeyabu K, Betsuyaku T, Nishimura M, Yoshioka A, Tanino M, Miyamoto K, Kawakami Y. Cysteine proteinases and cystatin C in bronchoalveolar lavage fluid from subjects with subclinical emphysema. *Eur Respir J* 1998; 12:1033-1039.
- 54 Ra HJ, Parks WC. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biol* 2007; 26: 587-596.

-
- 55 Avilés B, Belda J, Margarit G, Bellido-Casado J, Martínez-Brú C, Casan P. Marcadores de remodelado bronquial en el esputo inducido de fumadores sanos. *Arch Bronconeumol* 2006; 42: 235-240.
- 56 Aoshiba K, Yokohori N, Nagai A. Alveolar wall apoptosis causes lung destruction and emphysematous changes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 28:555-562.
- 57 Baglole CJ, Bushinsky SM, Garcia TM, Kode A, Rahman I, Sime PJ, Phipps RP. Differential induction of apoptosis by cigarette smoke extract in primary human lung fibroblast strains: implications for emphysema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 291: L19-L29.
- 58 Zheng T, Kang MJ, Crothers K, Zhu Z, Liu W, Lee CG, Rabach LA, Chapman HA, Homer RJ, Aldous D, De Sanctis GT, Underwood S, Graupe M, Flavell RA, Schmidt JA, Elias JA. Role of cathepsin S-dependent epithelial cell apoptosis in IFN-gamma-induced alveolar remodeling and pulmonary emphysema. *J Immunol* 2005; 174: 8106-8115.
- 59 Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Effector mechanisms of cell-mediated immunity. *Cellular and molecular immunology*. 4th ed. New York: W.B. Saunders, 2000:291-308.
- 60 Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002; 296:301-305.
- 61 Sun W, Wu R, Last JA. Effects of exposure to environmental tobacco smoke on a human tracheobronchial epithelial cell line. *Toxicology* 1995; 100: 163-174.
- 62 Wickenden JA, Clarke MC, Rossi AG, et al. Cigarette smoke prevents apoptosis through inhibition of caspase activation and induces necrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 29: 562-570.
- 63 Di Stefano A, Caramori G, Oates T, et al. Increased expression of nuclear factor-kappaB in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD. *Eur Respir J* 2002; 20:556-563.
- 64 Jiang D, Liang J, Li Y, Noble PW. The role of Toll-like receptors in non-infectious lung injury. *Cell Res* 2006;16: 693-701.

-
- 65 Mills PR, Davies RJ, Devalia JL. Airway epithelial cells, cytokines, and pollutants. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:S38-S43.
- 66 Barnes PJ, Cosio MG. Cells and mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir Monogr* 2006;38:130-58.
- 67 Rao T, Richardson B. Environmentally induced autoimmune disease: potential mechanisms. *Environ Health Perspect* 1999; 107: Suppl 5: 737-742.
- 68 Rose NR. The role of infection in the pathogenesis of autoimmune disease. *Semin Immunol* 1998; 10:5-13.
- 69 Krieg AM, Vollmer J. Toll-like receptors 7,8 and 9: linking innate immunity to autoimmunity. *Immunol Rev* 2007; 220: 251-269.
- 70 Steinman L. State of the art: four easypieces: interconnections between tissue injury, intermediary metabolism, autoimmunity, and chronic degeneration. *Proc Am Thorac Soc* 2006;3:484-486.
- 71 Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors and acquired immunity. *Semin Immunol* 2004;16:23-26.
- 72 Marshak-Rothstein A. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* 2006;6:823-835.
- 73 Parker LC, Prince LR, Sabroe I. Translational mini-review series on Toll-like receptors: networks regulated by Toll-like receptors mediate innate and adaptive immunity. *Clin Exp Immunol* 2007;147:199-207.
- 74 Lambrecht BN, Prins JB, Hoogsteden HC. Lung dendritic cells and host immunity to infection. *Eur Respir J* 2001;18:692-704.
- 75 Bratke K, Klug M, Bier A, et al. Function-associated surface molecules on airway dendritic cells in cigarette smokers. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008;38:655-660.
- 76 Di Stefano A, Caramori G, Capelli A, et al. STAT4 activation in smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2004;24:78-85.
- 77 Guermonprez P, Saveanu L, Kleijmeer M, Davoust J, Van Endert P, Amigorena S. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 2003; 425:397-402.

-
- 78 Cosio MG. T lymphocytes. In: BarnesPJ, ed. Chronic obstructive pulmonary disease:cellular and molecular mechanisms. Lung biology in health and disease series.Vol. 198.Boca Raton, FL: Taylor & Francis,2005:205-252.
- 79 Butcher EC, Picker LJ. Lymphocytehoming and homeostasis.Science 1996;272:60-66.
- 80 Freeman CM, Curtis JL, Chensue SW.CC chemokine receptor 5 and CXCchemokine receptor 6 expression by lungCD8+ cells correlates with chronic obstructivepulmonary disease severity. Am J Pathol 2007; 171:767-776.
- 81 Saetta M, Mariani M, Panina-BordignonP, et al. Increased expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligandCXCL10 in peripheral airways of smokerswith chronic obstructive pulmonary disease.Am J Respir Crit Care Med 2002;165:1404-1409.
- 82 O' Shaughnessy TC, Ansari TW, BarnesNC, Jeffery PK. Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+Tlymphocytes with FEV1. Am J RespirCrit Care Med 1997;155: 852-857.
- 83 Calabrese F, Giacometti C, Beghe B, et al. Marked alveolar apoptosis/proliferation imbalance in end-stage emphysema.Respir Res 2005; 6:14.
- 84 Shresta S, Pham CT, Thomas DA, Graubert TA, Ley TJ. How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? Curr Opin Immunol 1998; 10: 581-587.
- 85 Lieberman J. The ABCs of granule mediated cytotoxicity: new weapons in thearsenal. Nat Rev Immunol 2003;3:361-370.
- 86 Chrysofakis G, Tzanakis N, KyriakoyD, et al. Perforin expression and cytotoxicactivity of sputum CD8+ lymphocytes in patients with COPD. Chest 2004;125:71-76.
- 87 Majo J, Ghezze H, Cosio MG. Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. Eur Respir J 2001; 17:946-953.
- 88 Chapman HA Jr, Shi GP. Protease injury in the development of COPD: Thomas A. Neff Lecture. Chest 2000;117: Suppl1:295S-299S.

-
- 89 Tuder RM, Yoshida T, Arap W, Pasqualini R, Petrache I. State of the art: cellular and molecular mechanisms of alveolar destruction in emphysema: an evolutionary perspective. *Proc Am Thorac Soc* 2006;3:503-510.
- 90 Hodge S, Hodge G, Scicchitano R, Reynolds PN, Holmes M. Alveolar macrophages from subjects with chronic obstructive pulmonary disease are deficient in their ability to phagocytose apoptotic airway epithelial cells. *Immunol Cell Biol* 2003;81:499.
- 91 Vandivier RW, Henson PM, Douglas IS. Burying the dead: the impact of failed apoptotic cell removal (efferocytosis) on chronic inflammatory lung disease. *Chest* 2006; 129:1673-1682.
- 92 Sullivan AK, Simonian PL, Falta MT, et al. Oligoclonal CD4+ T cells in the lungs of patients with severe emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:590-6.
- 93 Van der Strate BW, Postma DS, Brandsma CA, et al. Cigarette smoke-induced emphysema: a role for the B cell? *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173:751-758.
- 94 Retamales I, Elliott WM, Meshi B, et al. Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:469-473.
- 95 Ermann J, Fathman CG. Autoimmunediseases: genes, bugs and failed regulation. *Nat Immunol* 2001; 2:759-761.
- 96 Shapiro SD. End-stage chronic obstructive pulmonary disease: the cigarette is burned out but inflammation rages on. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:339-340.
- 97 Rose NR, Bona C. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunol Today* 1993;14: 426-430.
- 98 Jeffery PK. Comparison of the structural and inflammatory features of COPD and asthma. *Chest* 2000;117:251s-260s.
- 99 Cosio M, Ghezzo H, Hogg JC, Corbin R, Loveland M, Dosman J, Macklem PT. The relations between structural changes in small airways and pulmonary-function tests. *N Engl J Med* 1977; 298:1277-1281.

-
- 100 Morishima Y, Nomura A, Uchida Y, Noguchi Y, Sakamoto T, Ishii Y, Goto Y, Masuyama K, Zhang MJ, Hirano K, Mochizuki M, Ohtsuka M, Sekizawa K. Triggering the induction of myofibroblast and fibrogenesis by airway epithelial shedding. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 24:1–11.
- 101 Mullen JB, Wright JL, Wiggs BR, Pare PD, Hogg JC. Reassessment of inflammation of airways in chronic bronchitis. *BMJ* 1985;291:1235-1239.
- 102 Halayko AJ, Salari H, Xuefei MA, Stephens NL. Markers of airway smooth muscle cell phenotype. *Am J Physiol* 1996;270:1040-1451.
- 103 Chung KF. Airway smooth muscle cells: contributing to and regulating airway mucosal inflammation? *Eur Respir J* 2000;15:961-968.
- 104 Bosken CH, Wiggs BR, Paré PD, Hogg JC. Small airway dimensions in smokers with obstruction to airflow. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142:563-570.
- 105 Agustí AG. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2:367-370.
- 106 Gan WQ, Man SF, Senthilselvan A, Sin DD. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax* 2004; 59: 574-580.
- 107 Drost EM, Skwarski KM, Sauleda J, Soler N, Roca J, Agustí A, MacNee W. Oxidative stress and airway inflammation in severe exacerbations of COPD. *Thorax* 2005; 60: 293-300.
- 108 Malo O, Sauleda J, Busquets X, Miralles C, Agustí AG, Noguera A. Systemic inflammation during exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Bronconeumol* 2002; 38:172-176.
- 109 Van Eeden SF, Hogg JC. The response of human bone marrow to chronic cigarette smoking. *Eur Respir J* 2000; 15: 915-921.
- 110 Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 1685-1695.
- 111 Vernooy JH, Kucukaycan M, Jacobs JA, Chavannes NH, Buurman WA, Dentener MA et al. Local and systemic inflammation in patients with chronic obstructive

-
- pulmonary disease: soluble tumor necrosis factor receptors are increased in sputum. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:1218-1224.
- 112 Takabatake N, Nakamura H, Abe S, Inoue S, Hino T, Saito H, et al. The relationship between chronic hypoxemia and activation of the tumor necrosis factor-alpha system in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1179-1184.
- 113 Rabinovich RA, Figueras M, Ardite E, Carbo N, Troosters T, Filella X, et al. Increased tumour necrosis factor-alpha plasma levels during moderate-intensity exercise in COPD patients. *Eur Respir J* 2003; 21: 789-794.
- 114 Koechlin C, Couillard A, Cristol JP, Chanez P, Hayot M, Le GD, et al. Does systemic inflammation trigger local exercise-induced oxidative stress in COPD? *Eur Respir J* 2004; 23: 538-544.
- 115 MacNee W, Wiggs B, Belzberg AS, Hogg JC. The effect of cigarette smoking on neutrophil kinetics in human lungs. *N Engl J Med* 1989; 321: 924-928.
- 116 Agusti AG, Noguera A, Sauleda J, Sala E, Pons J, Busquets X. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003; 21: 347-360.
- 117 Pinto-Plata VM, Mullerova H, Toso JF, Feudjo-Tepie M, Soriano JB, Vessey RS, Celli BR. C-reactive protein in patients with COPD, control smokers and non-smokers. *Thorax* 2006; 61: 23-28.
- 118 Le Jemtel TH, Padeletti M, Jelic S. Diagnostic and therapeutic challenges in patients with coexistent chronic obstructive pulmonary disease and chronic heart failure. *J Am CollCardiol* 2007;49:171-180.
- 119 Curkendall SM, Lanes S, de Luise C, Stang MR, Jones JK, She D, Goehring E Jr. Chronic obstructive pulmonary disease severity and cardiovascular outcomes. *Eur J Epidemiol* 2006; 21:803-813.
- 120 Peinado VI, Pizarro S, Barbera JA. Pulmonary vascular involvement in COPD. *Chest* 2008; 134:808-814.
- 121 Sin DD, Man SF. Why are patients with chronic obstructive pulmonary disease at increased risk of cardiovascular diseases? The potential role of systemic

-
- inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Circulation* 2003; 107:1514-1519.
- 122 Van Eeden SF, Sin DD. Chronic obstructive pulmonary disease: a chronic systemic inflammatory disease. *Respiration*. 2008;75:224-238.
- 123 Wagner PD. Possible mechanisms underlying the development of cachexia in COPD. *Eur Respir J*. 2008; 31:492-501.
- 124 Agusti A, Soriano JB. COPD as a systemic disease. *COPD* 2008; 5: 133–138.
- 125 Gosker HR, Kubat B, Schaart G, van der Vusse GJ, Wouters EF, ScholsAM. Myopathological features in skeletal muscle of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003; 22: 280–285.
- 126 Montes de Oca M, Torres SH, Gonzalez Y, et al. Peripheral muscle composition and health status in patients with COPD. *Respir Med* 2006; 100: 1800–1806.
- 127 Swallow EB, Reyes D, Hopkinson NS, Man WD, Porcher R, Cetti EJ, Moore AJ, Moxham J, Polkey MI Quadriceps strength predicts mortality in patients with moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2007; 62: 115–120.
- 128 Barreiro E, Schols AM, Polkey MI, Galdiz JB, Gosker HR, Swallow EB, et al; ENIGMA in COPD Project. Cytokine profile in quadriceps muscles of patients with severe COPD. *Thorax*.2008;63:100-107.
- 129 Jorgensen NR, Schwarz P. Osteoporosis in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Curr Opin Pulm Med* 2008; 14: 122–127.
- 130 Calverley PM, Anderson JA, Celli B, et al. Salmeterol and fluticasone propionate and survival in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2007; 356: 775–789.
- 131 Carter JD, Patel S, Sultan FL, Thompson ZJ, Margaux H, Sterrett A, Carney G, Murphy N, Huang Y, Valeriano J, Vasey FB. The recognition and treatment of vertebral fractures in males with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 2008; 102: 1165–1172.

-
- 132 Bolton CE, Stone MD, Edwards PH, Duckers JM, Evans WD, Shale DJ. Circulating matrix metalloproteinase-9 and osteoporosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Chron Respir Dis*. 2009; 6: 81-87.
- 133 Jimenez R, De Miguel J, Rejas J, Martín A, Gobartt E, Hernandez V, et al. Health, treatment and health care resources consumption profile among spanish adults with diabetes and chronic obstructive pulmonary disease. *Prim Care Diabetes*. 2009; 3:141-148.
- 134 Maurer J, Rebbapragada V, Borson S, Goldstein R, Kunik ME, Yohannes AM, Hanania NA. Anxiety and depression in COPD: current understanding, unanswered questions, and research needs. *Chest* 2008; 134:43S-56S.
- 135 Yawn BP, Kaplan A. Co-morbidities in people with COPD: a result of multiple diseases, or multiple manifestations of smoking and reactive inflammation? *Prim Care Resp J* 2008; 17:199-205.
- 136 Casanova C, De Torres JP, Montes de Oca M. Enfermedad pulmonar obstructiva crónica: aspectos sistémicos y factores pronósticos. *Arch Bronconeumol*. 2007; 43:25-34.
- 137 John M, Hoernig S, Doehner W, Okonko DD, Witt C, Anker SD. Anemia and inflammation in COPD. *Chest*. 2005; 127:825-829.
- 138 Gibbons MA, Sethi T. Chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer: inflammation the missing link. *Therapy*. 2009; 6:805-820.
- 139 Dahl M, Vestbo J, Lange P, Bojesen SE, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. C-reactive protein as a predictor of prognosis in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 250-255.
- 140 Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999; 340: 448-454.
- 141 Steel DM, Whitehead AS. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol Today* 1994; 15: 81-88.

-
- 142 Zouki C, Beauchamp M, Baron C, Filep JG. Prevention of in vitro neutrophil adhesion to endothelial cells through shedding of L-selectin by C-reactive protein and peptides derived from C-reactive protein. *J Clin Invest* 1997; 100: 522-529.
- 143 Robey FA, Jones KD, Tanaka T, Liu TY. Binding of C-reactive protein to chromatin and nucleosome core particles. A possible physiological role of C-reactive protein. *J Biol Chem* 1984; 259: 7311-7316.
- 144 Banka CL, Yuan T, de Beer MC, Kindy M, Curtiss LK, de Beer FC. Serum amyloid A (SAA): influence on HDL-mediated cellular cholesterol efflux. *J Lipid Res* 1995; 36: 1058-1065.
- 145 Pepys MB, Baltz ML: Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentraxins) and serum amyloid A protein. *Adv Immunol* 1983; 34: 141-212.
- 146 Gershov D, Kim S, Brot N, Elkon KB: C-reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an anti-inflammatory innate immune response: implication for systemic autoimmunity. *J Exp Med* 2000; 192: 1353-1363.
- 147 De Beer FC, Hind CR, Fox KM, Allan RM, Maseri A, Pepys MB: Measurement of serum C-reactive protein concentration in myocardial ischaemia and infarction. *Br Heart J* 1982; 47: 239-243.
- 148 Lagrand WK, Niessen HW, Wolbink GJ, Jaspars LH, Visser CA, Verheugt FW, Meijer CJ, Hack CE. C-reactive protein colocalizes with complement in human hearts during acute myocardial infarction. *Circulation* 1997; 95: 97-103.
- 149 Griselli M, Herbert J, Hutchinsin WL, Taylor KM, Sohail M, Krausz T, et al: C-reactive protein and complement are important mediators of tissue damage in acute myocardial infarction. *J Exp Med* 1999; 190: 1733-1740.
- 150 Ridker PM, Rifai N, Cook NR, Bradwin G, Buring JE: Non-HDL cholesterol, apolipoproteins A-I and B100, standard lipid measures, lipid ratios, and CRP as risk factors for cardiovascular disease in women. *JAMA* 2005; 294: 326-333.

-
- 151 Malle E, De Beer FC. Human serum amyloid A (SAA) protein: a prominent acute-phase reactant for clinical practice. *Eur J Clin Invest* 1996; 26:427-435.
- 152 Clifton PM, Mackinnon AM, Barter PJ. Effects of serum amyloid A protein (SAA) on composition, size, and density of high density lipoproteins in subjects with myocardial infarction. *J Lipid Res* 1985; 26:1389-1398.
- 153 O'Brien KD, McDonald TO, Kunjathoor V, Eng K, Knopp EA, Lewis K, Lopez R, Kirk EA, Chait A, Wight TN, deBeer FC, LeBoeuf RC. Serum amyloid A and lipoprotein retention in murine models of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 785-790.
- 154 Badolato R, Oppenheim JJ. Role of cytokines, acute-phase proteins, and chemokines in the progression of rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 1996; 26: 526-538.
- 155 Brinckerhoff CE, Mitchell TI, Karmilowicz MJ, Kluve-Beckerman B, Benson MD. Autocrine induction of collagenase by serum amyloid A-like and beta 2-microglobulin-like proteins. *Science* 1989; 243: 655-657.
- 156 Rojano B, Arellano E, López Porrás M, Calero C, Saenz J, Blanco A, Mora C, Tobar D, Cejudo P, Márquez—Martín E, Ortega F, López-Campos JL. Expresión local de Reactantes de Fase Aguda en la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica. *Rev Esp Patol Torac* 2010; 22: 252-258.
- 157 Fletcher CM, Elmes PC, Fairbairn AS, Wood CH. The significance of respiratory symptoms and the diagnosis of chronic bronchitis in a working population. *Br Med J* 1959; 5147: 257-266.
- 158 Manual SEPAR de procedimientos Vol. 3. Barcelona: Ed Doyma, 1987.
- 159 Grupo de Trabajo de la SEPAR para la práctica de la gasometría arterial. Gasometría arterial. *Arch Bronconeumol* 1998; 34: 142-153.
- 160 Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008; 3: 1101-1108.

-
- 161 Soler-Cataluña JJ, Rodriguez-Roisin R. Frequent chronic obstructive pulmonary disease exacerbators: how much real, how much fictitious? *COPD* 2010; 7:276-284.
- 162 Hurst JR, Vestbo J, Anzueto A, Locantore N, Müllerova H, Tal-Singer R, Miller B, Lomas DA, Agusti A, Macnee W, Calverley P, Rennard S, Wouters EF, Wedzicha JA; Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate Endpoints (ECLIPSE) Investigators. Susceptibility to exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2010; 363:1128-1138.
- 163 Xu W, Collet J-P, Shapiro S, Lin Y, Yang T, Wan C, Bourbeau J. Negative impacts of unreported COPD exacerbations on health-related quality of life at 1 year. *Eur Respir J* 2010; 35: 1022–1030.
- 164 Charlson M, Szatrowski TP, Peterson J, Gold J. Validation of a combined comorbidity index. *J Clin Epidemiol*. 1994 Nov; 47:1245-1251.
- 165 Schnell K, Weiss CO, Lee T, Krishnan JA, Leff B, Wolff JL, Boyd C. The prevalence of clinically-relevant comorbid conditions in patients with physician-diagnosed COPD: a cross-sectional study using data from NHANES 1999-2008. *BMC Pulm Med*. 2012 Jul 9;12:26.
- 166 Young RP, Hopkins RJ, Whittington CF, Hay BA, Epton MJ, Gamble GD. Individual and cumulative effects of GWAS susceptibility loci in lung cancer: associations after sub-phenotyping for COPD. *PLoS One*. 2011; 6:e16476.
- 167 Sundar IK, Mullapudi N, Yao H, Spivack SD, Rahman I. Lung cancer and its association with chronic obstructive pulmonary disease: update on nexus of epigenetics. *Curr Opin Pulm Med*. 2011 Jul;17: 279-285.
- 168 de Torres JP, Marín JM, Casanova C, Cote C, Carrizo S, Cordoba-Lanus E, Baz-Dávila R, Zulueta JJ, Aguirre-Jaime A, Saetta M, Cosio MG, Celli BR. Lung Cancer in patients with COPD: Incidence and predicting factors. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011; 184: 913-919.
- 169 Bozinovski S, Hutchinson A, Thompson M, Macgregor L, Black J, Giannakis E, Karlsson AS, Silvestrini R, Smallwood D, Vlahos R, Irving LB, Anderson GP.

-
- Serum amyloid a is a biomarker of acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 269-278.
- 170 Khan N, Cromer CJ, Campa M, Patz EF Jr. Clinical utility of serum amyloid A and macrophage migration inhibitory factor as serum biomarkers for the detection of nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2004; 101: 379-384.
- 171 Higashimoto Y, Iwata T, Okada M, Satoh H, Fukuda K, Tohda Y. Serum biomarkers as predictors of lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 2009; 103: 1231-1238.
- 172 Sin DD, Lacy P, York E, Man SF. Effects of fluticasone on systemic markers of inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 760-765.
- 173 Sin DD, Man SF, Marciniuk DD, Ford G, FitzGerald M, Wong E, York E, Mainra RR, Ramesh W, Melenka LS, Wilde E, Cowie RL, Williams D, Gan WQ, Rousseau R; ABC (Advair, Biomarkers in COPD) Investigators. The effects of fluticasone with or without salmeterol on systemic biomarkers of inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 1207-1214.
- 174 Sunyer J, Pistelli R, Plana E, Andreani M, Baldari F, Kolz M, Koenig W, Pekkanen J, Peters A, Forastiere F. Systemic inflammation, genetic susceptibility and lung function. *Eur Respir J* 2008; 32: 92-97.
- 175 Saetta M, Di Stefano A, Maestrelli P, et al: Activated T-lymphocytes and macrophages in bronchial mucosa of subjects with chronic bronchitis. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 301-306.
- 176 Auerbach O, Stout AP, Hammond EC, et al: Changes in bronchial epithelium in relation to cigarette smoking and in relation to lung cancer. *N Engl J Med* 1961; 265: 253-267.
- 177 Togo S, Holz O, Liu X, Sugiura H, Kamio K, Wang X, Kawasaki S, Ahn Y, Fredriksson K, Skold CM, Mueller KC, Branscheid D, Welker L, Watz H, Magnussen H, Rennard SI. Lung fibroblast repair functions in patients with chronic

-
- obstructive pulmonary disease are altered by multiple mechanisms. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178: 248-260.
- 178 Spurzem JR, Rennard SI. Pathogenesis of COPD. *Semin Respir Crit Care Med* 2005; 26: 142-153.
- 179 Górska K, Maskey-Warzechowska M, Krenke R. Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Pulm Med* 2010; 16: 89-96.
- 180 Rahman I, Adcock IM. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *Eur Respir J* 2006; 28: 219-242.
- 181 Elkington PT, Friedland JS. Matrix metalloproteinases in destructive pulmonary pathology. *Thorax* 2006; 61: 259-266.
- 182 Henson PM, Cosgrove GP, Vandivier RW. State of the art. Apoptosis and cell homeostasis in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3: 512-516.
- 183 Ito K, Barnes PJ. COPD as a disease of accelerated lung aging. *Chest*. 2009;135:173–180.
- 184 Karrasch S, Holz O, Jorres RA. Aging and induced senescence as factors in the pathogenesis of lung emphysema. *Respir Med*. 2008;102:1215–1230.
- 185 Demedts IK, Bracke KR, Van Pottelberge G, Testelmans D, Verleden GM, Vermassen FE, Joos GF, Brusselle GG. Accumulation of dendritic cells and increased CCL20 levels in the airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 998-1005.
- 186 Tsoumakidou M, Koutsopoulos AV, Tzanakis N, Dambaki K, Tzortzaki E, Zakynthinos S, Jeffery PK, Siafakas NM. Decreased small airway and alveolar CD83+ dendritic cells in COPD. *Chest* 2009; 136: 726-733.