

IMPORTANCIA DE LA PRODUCCIÓN LOCAL DE REACTANTES
DE FASE AGUDA MAYORES EN LA PATOGENIA DE LA
ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA





Dr. Jose Luis López Campos Bodineau. Profesor asociado del departamento de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla. Adjunto facultativo de la Unidad Médico Quirúrgica de Enfermedades Respiratorias de los HHUU Virgen del Rocío.

Certifica: Que Dña. Belén Rojano Broz, Licenciada en Medicina y Cirugía, especialista en Neumología ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo titulado ***“Importancia de la Producción Local de Reactantes de Fase Aguda Mayores en la Patogenia de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica”***.

Título.

- Importancia de la Producción Local de Reactantes de Fase Aguda Mayores en la Patogenia de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica.

Doctoranda

- Belén Rojano Broz. Alumna del Departamento de Medicina de la Universidad de Sevilla. Licenciada en Medicina y Cirugía por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria y Especialista en Neumología.

- Director de Tesis: Dr. Jose Luis López Campos Bodineau



Agradecimientos

El presente trabajo no podría haberse llevado a cabo sin la estrecha colaboración entre el Servicio de Neumología, el Servicio de Cirugía Torácica y los Biólogos del laboratorio de Enfermedades Respiratorias del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS). Por eso y antes de empezar con la exposición del mismo, me gustaría agradecer especialmente a Cecilia López-Ramírez, Carmen Calero, Daniela Tobar, César Gutiérrez, Alicia Cortés y Marta López Porras por su ayuda en la selección de los pacientes, la recogida de datos y la inclusión en la base de datos.

Una mención especial a todo el personal del laboratorio de Enfermedades Respiratorias del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), ya que todos han contribuido con su trabajo diario en este proyecto a lo largo de estos años. Merece por mi parte un agradecimiento personal, Elena Arellano por participar en este proyecto desde el principio, permitiendo con su trabajo y su ayuda la realización de este proyecto de tesis doctoral. Además agradecer también de forma personalizada su ayuda a Javier Sáez Coronilla y Verónica Sánchez.

No me puedo olvidar dar las gracias también al Servicio de Cirugía de Tórax del HUVR por la ayuda a la hora de la selección de pacientes y por el trabajo llevado a cabo en quirófano para obtener las muestras. El presente proyecto no habría sido posible sin su constante colaboración con nosotros. Agradecer de forma especial a Nicolás Moreno Mata, como jefe de Servicio y por su participación de forma directa a José Luis López Villalobos, Ana Blanco, Rafael Barroso, Javier Blanco así como al resto del servicio por su colaboración.

He dejado para el final, por ser el más importante, el agradecimiento a Jose Luis López-Campos Bodineau director y tutor del presente trabajo de tesis doctoral. Agradecerle no sólo desde el punto de vista profesional el haberme dado la oportunidad de llevar a cabo el presente trabajo y haber confiado en mí, sino también de forma personal que su labor haya sido mucho más que la un tutor, este trabajo no podría haberlo realizado sin su ayuda. Su apoyo y disponibilidad han sido siempre constantes a lo largo de los años, desde el inicio del proyecto hasta hoy. De todo corazón gracias.

Y no me gustaría terminar sin hacer un agradecimiento personal a toda mi familia, en especial a mis padres, a Roxana y a Marcelo. Gracias de todo corazón por haber creído en mí, por animarme a creer que era posible y ayudarme a no abandonar. En definitiva, gracias por estar ahí y por ayudarme a conseguir el objetivo.

A mis dos ángeles de la guarda, Patri y mi Abuelo,

a mis padres Victoria y Juan,

a mis hermanos Borja y Javier,

y cómo no, a Marcelo

INDICE

I.	Introducción.....	1
	1. Enfermedad pulmonar obstructiva crónica: concepto.....	1
	2. Etiología.....	6
	3. Patogenia de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica.....	8
	a) Factores Genéticos.....	9
	b) Equilibrio proteasas-antiproteasas.....	11
	c) Estrés oxidativo.....	14
	d) Apoptosis.....	17
	e) Inflamación.....	18
	4. Diagnóstico.....	21
	6. Repercusiones.....	34
	a) Disnea.....	34
	b) Fatiga.....	35
	c) Exacerbaciones.....	38
	d) Calidad de vida.....	40
	7. Afectación sistémica.....	43
	8. Inflamación sistémica en la EPOC.....	48
	9. Reactantes de Fase Aguda en la inflamación sistémica.....	49
	a) La proteína C reactiva.....	51
	b) El amiloide A sérico.....	53
	10. Origen de la inflamación sistémica.....	55
II.	Objetivos.....	59
III.	Material y Método.....	61
	Protocolo.....	62
	Extracción de muestra quirúrgica.....	64
	Aspectos éticos.....	65
	Métodos de Medición.....	66
	Determinaciones de laboratorio.....	68
IV.	Resultados.....	75
	Descripción de la muestra.....	75
	Expresión de tisular de RFA mayores.....	79
	Relación entre bronquio y parénquima.....	87

Relación entre la expresión génica y la proteica	91
Expresión de tisular de RFA mayores. Comparación entre pacientes con EPOC y sujetos sanos.	95
V. Discusión	100
VI. CONCLUSIONES	115
VII. ANEXOS.....	116
Anexo I: Cuestionario St George's	117
Anexo II: Cuaderno Recogida de Datos.....	125
Anexo III: Consentimiento InformadoConsentimiento informado	130
Anexo IV: Índice Charlson-edad	133
VIII. Bibliografía	138

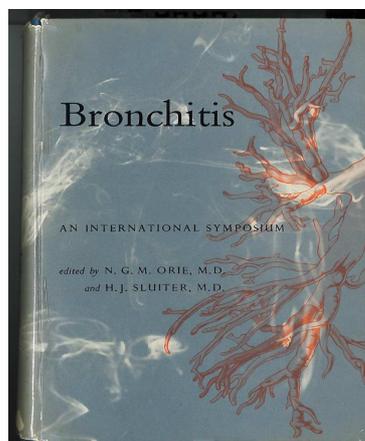
Introducción

I. Introducción

1. Enfermedad pulmonar obstructiva crónica: concepto.

Desde las primeras descripciones de las consecuencias de inhalar humo de tabaco hasta nuestros días, el concepto de Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) ha sufrido notables variaciones a lo largo de la historia. El término EPOC es relativamente reciente y deriva de la convergencia de dos perspectivas históricas: la primera de ellas predominante en el Reino Unido y que consideraba la bronquitis crónica como una enfermedad progresiva que producía una obstrucción irreversible de las vías aéreas (1, 2). Por otro lado, existe en Estados Unidos otra línea de pensamiento que consideraba el enfisema como la alteración fundamental que daba origen a la obstrucción persistente e irreversible de las vías aéreas.

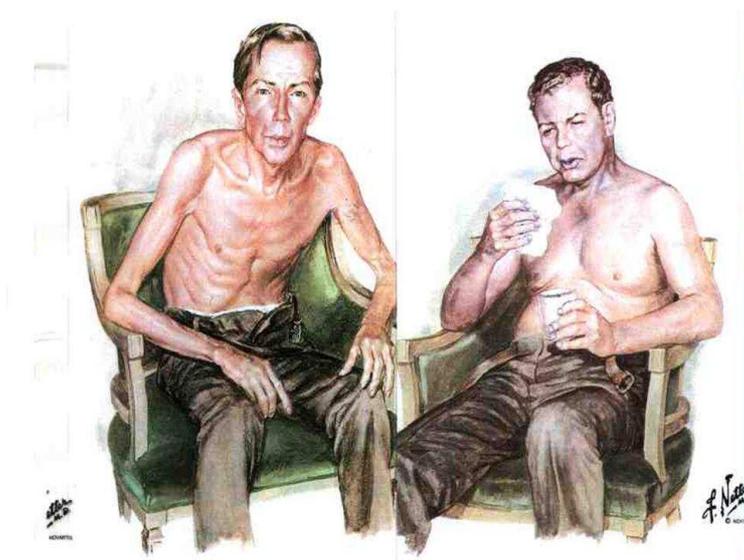
Como corriente complementaria, en los años sesenta surge una tercera línea de pensamiento conocida como “Hipótesis Holandesa” que propone la EPOC y el asma como los dos extremos de una misma afección (3,4).



A mediados de la década de los 70, se estableció el concepto de EPOC como un trastorno funcional que consistía en una disminución al flujo aéreo, por lo general progresiva, y no totalmente reversible, que estaba relacionado con alteraciones en la vía respiratoria y el parénquima pulmonar (5, 6). De esta manera, tradicionalmente la EPOC ha sido considerada como una patología exclusivamente pulmonar, caracterizada en esencia por una limitación crónica, progresiva y poco reversible al flujo aéreo inducida

por la exposición al humo del tabaco. Bajo este prisma, la historia natural de la enfermedad ha sido entendida durante muchos años como una pérdida acelerada de la función pulmonar expresada como un descenso en el volumen máximo espirado en el primer segundo (FEV_1) detectado mediante la realización de una la espirometría. De esta forma, todo aquello que empeorase el FEV_1 era relevante y todo aquello que no lo modificase quedaba en un segundo plano. Este concepto generó un modelo bicompartimental en el que se definían dos componentes principales (7):

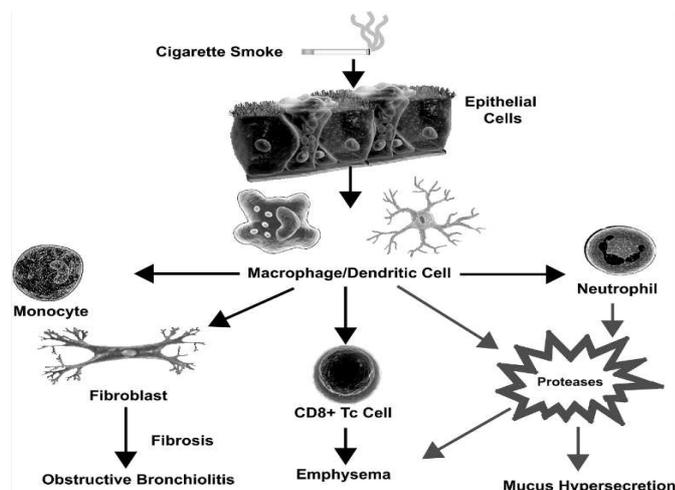
1. La afectación parenquimatosa en forma de enfisema pulmonar en el que se produce una destrucción del tejido pulmonar con agrandamiento de los espacios alveolares como lesión morfológica. Clínicamente se manifestaba por disnea progresiva y pérdida de masa muscular periférica.
2. La afectación de la vía aérea con engrosamiento de las paredes de los bronquios e hipersecreción mucosa como principal hallazgo morfológico. Clínicamente se presentaba con tos y expectoración, generalmente mucosa, a lo que se conoce con el término de bronquitis crónica.



Sin embargo, con el avance de los estudios relacionados con la enfermedad se observó que este modelo era insuficiente para explicar todos los hallazgos clínicos. Por este motivo, se pasó a un modelo de cuatro compartimentos en el que a las manifestaciones pulmonares de la enfermedad se añadían dos compartimentos más:

3. La afectación de la vía aérea fina. Expresada como afectación bronquiolar con la presencia de engrosamiento y fibrosis de su pared e incluso destrucción en algunos casos con pequeñas bronquiolectasias.
4. La afectación del compartimento vascular en forma de hipertensión pulmonar más o menos relevante.

Estos cuatro compartimentos están condicionados por la existencia de un proceso inflamatorio crónico que afecta a las vías aéreas (bronquitis crónica y bronquiolitis), el parénquima pulmonar (enfisema) y las arterias pulmonares (hipertensión pulmonar). Como se verá más adelante, el infiltrado inflamatorio característico de la EPOC está constituido principalmente por macrófagos, neutrófilos y linfocitos T citotóxicos (CD8+) y se acompaña de cambios estructurales que producen los cambios morfológicos descritos (8,9,10).



Por otro lado, recientemente la EPOC se ha asociado a la presencia de otras manifestaciones clínicas con diana en otros órganos diferentes del pulmón. Entre éstos figuran la inflamación sistémica, la pérdida de peso, la miopatía, la patología cardiovascular, la osteoporosis, la diabetes y la depresión, entre otros (11). Con el avance del conocimiento sobre esta afectación sistémica, se han descrito los diversos compartimentos sistémicos como parte de la enfermedad, estableciéndose la EPOC como una enfermedad multicompartimental o multicomponente en la que se existen alteraciones no sólo respiratorias, sino también en diversos órganos y sistemas.

Teniendo todo esto en cuenta, la GOLD (Global Initiative for the Diagnosis, Management and Prevention of Obstructive Lung Disease) define la EPOC como una enfermedad prevenible y tratable con importantes manifestaciones sistémicas que pueden contribuir a la gravedad de cada paciente. La afectación pulmonar de la enfermedad se caracteriza por una obstrucción crónica y no reversible al flujo aéreo. Dicha limitación es generalmente progresiva y se asocia con una respuesta inflamatoria anormal de los pulmones a partículas nocivas o gases, generalmente el humo del tabaco (12).

En los últimos años ha tomado cada vez más relieve la denominación de fenotipo para referirse a formas clínicas de los pacientes con EPOC. Esto ha sido motivado por el auge de los estudios que pretenden identificar determinantes genéticos de desarrollo de la enfermedad en sus diferentes manifestaciones. Un grupo de expertos internacional ha definido fenotipo de la EPOC como «aquellos atributos de la enfermedad que solos o combinados describen las diferencias entre individuos con EPOC en relación a parámetros que tienen significado clínico (síntomas, agudizaciones, respuesta al tratamiento, velocidad de progresión de la enfermedad, o muerte)» (13). Por tanto, el fenotipo debería ser capaz de clasificar a los pacientes en subgrupos con valor

pronóstico y que permitan determinar la terapia más adecuada para lograr mejores resultados clínicos.

2. Etiología.

Siguiendo el concepto de EPOC de la GOLD, la enfermedad se produce como consecuencia de una respuesta inflamatoria anormal de los pulmones a partículas nocivas o gases. Estas partículas o gases pueden ser de naturaleza diversa, sin embargo, en nuestro medio el tóxico más relacionado con la enfermedad es el humo del tabaco. El tabaco constituye hoy en día el factor de riesgo más importante para desarrollar una EPOC. Esta asociación se ha establecido con todas las formas de presentación de tabaco inhalado (14).

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. La medición de la exposición al tabaco en cigarrillos se mide en paquetes-año, siendo estos el múltiplo de los paquetes al día por el número de años fumando esa cantidad. 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. Por consenso, algunos autores sitúan este consumo mínimo en 10 ó 20 paq-año, aunque están descritos casos de EPOC con consumos menores (12).

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). Sin embargo, debido a su dificultad de cuantificación, sus estudios han sido más escasos.

A pesar de la evidencia que existe relacionando el tabaco con la EPOC, es también cierto que el tabaco no es el único tóxico que puede producir la enfermedad. La inhalación de otras sustancias también ha sido descrita como factor de riesgo relevante.

Entre las distintas sustancias estudiadas, la más reseñada ha sido la biomasa. El término biomasa procede de la abreviatura de masa biológica o cantidad de materia viva producida en un área determinada. Dicho término 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 del 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 producida por el tabaco, tanto desde el punto de vista clínico, como en calidad de vida y pronóstico (17).

La exposición laboral es otra fuente de inhalación crónica de tóxicos. Hasta la presente, existen escasos 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).

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

3. Patogenia de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica.

Aunque la EPOC es una enfermedad que aparece como consecuencia de la inhalación crónica de una sustancia tóxica, es bien conocido que no todos los pacientes expuestos la desarrollan. En este sentido, se ha descrito que sólo el 33% de los hombres y el 24,2% de las mujeres que fuman evolucionan hacia la alteración morfológica y funcional características de la EPOC (20), sin que tengamos claro los factores que determinan su aparición.

Este escenario constituye un marco singular para el estudio de la inflamación en la patogenia de la EPOC, ya que permite el estudio de diversos marcadores inflamatorios entre pacientes expuestos que desarrollan la enfermedad frente a expuestos que no la desarrollan. Durante las últimas décadas diversos grupos han abordado la patogenia de la EPOC siguiendo este esquema metodológico y describiendo el tipo, lugar y grado de inflamación en el pulmón de la EPOC, así como su relación con la severidad de la enfermedad (10).

De estos estudios se pueden desprender al menos 3 ideas relevantes: a) que la inflamación está presente desde momentos iniciales de la enfermedad (10), b) que una vez establecida es independiente del consumo de tabaco (21) y c) que dicha inflamación aumenta durante los periodos de exacerbación de la enfermedad (22).

De manera resumida, la inflamación pulmonar en los pacientes con EPOC parece ser una respuesta ampliada de la respuesta inflamatoria normal del pulmón. Hasta la fecha se han identificado varios mecanismos que intervienen en el desarrollo y evolución de la enfermedad, entre los que figuran factores genéticos, el equilibrio proteasas-antiproteasas, el estrés oxidativo, alteraciones en la apoptosis celular y la participación de diversas vías inflamatorias.

a) Factores Genéticos.

Desde el punto de vista genético, la EPOC se considera una enfermedad poligénica en la que la predisposición genética individual juega un papel clave en su patogenia, constituyendo un ejemplo clásico de la interacción entre el medio ambiente y el genotipo.

El déficit de α 1-antitripsina es el ejemplo mejor conocido. Se trata de una enfermedad autosómica recesiva, más frecuente en los países nórdicos, en la que una disminución de los niveles de un inhibidor de esta serin-proteasa da lugar a una afectación pulmonar enfisematosa de distribución panlobar, con independencia del hábito tabáquico, aunque más acelerada en los pacientes fumadores. Ya en el año 1977 se documentó el efecto aditivo que ejerce el hábito tabáquico en individuos heterocigotos para el fenotipo de deficiencia de AAT, produciéndose cambios que incluyen pérdida de la retracción elástica, volúmenes residuales aumentados y disnea secundaria al ejercicio, pero sin daño obstructivo en la vía aérea (23). Además, ya entonces demostraron que sujetos fumadores heterocigotos tienen una reducción significativa en su expectativa de vida comparada con aquellos heterocigotos no fumadores (24).

A partir del estudio del genoma humano se han identificado diversos genes en el cromosoma 2q relacionados con el descenso de la relación entre el FEV₁ y la capacidad vital forzada (FVC). Un ejemplo de esta relación lo constituye el gen *serpina-2* que codifica un inhibidor del plasminógeno tisular que se expresa en el epitelio de la vía aérea (25,26). Análisis posteriores del genoma han concluido que la susceptibilidad para la obstrucción al flujo aéreo parece estar ligada a loci en los cromosomas 2q y 8p y que las medidas en la espirometría post-broncodilatación podrían ser fenotipos adecuados

para los estudios de genética en la EPOC (27,28). Al menos algunas de estas variaciones alélicas hacen que los genes correspondientes actúen como factores modificadores de respuesta frente a la inflamación, el estrés oxidativo y la actividad proteolítica tisular. Como vía final común, pero altamente variable en sus formas fenotípicas, se producen alteraciones estructurales ("remodelación") que prestan sustrato fisiopatológico al deterioro de la función pulmonar que ocurre en los sujetos que desarrollan EPOC. Todo ello confiere al desarrollo de la EPOC un trasfondo poligénico complejo (29).

Del mismo modo, se han identificado algunos factores de transcripción, cuya sobreproducción se relaciona con un mayor riesgo de desarrollo de EPOC. Se ha demostrado la presencia de valores elevados de TNF- α en sangre periférica de pacientes con EPOC (30,31,32,33), sobre todo en aquellos con pérdida ponderal. Por otra parte, se ha sugerido que el TNF- α podría estar implicado en la debilidad muscular periférica que se observa con frecuencia en esta entidad, al condicionar una pérdida proteica y disminución en la contractilidad muscular (34). Es interesante mencionar que tanto la actividad inflamatoria como la propia nicotina son capaces de estimular la producción de TNF- α (35,36).

El aumento de producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), está asociado al desarrollo de polimorfismos en el promotor de la región del gen que codifica esta proteína, supone un riesgo hasta 10 veces superior de desarrollar la enfermedad. Este efecto parece estar mediado por la alteración de factores de transcripción como son el factor nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) y del activador de la proteína 1 (AP-1). El NF- $\kappa\beta$ es el regulador transcripcional más estudiado de varios genes como el de la ciclooxigenasa-2, la óxido nítrico sintetasa, la interleucina 8 (IL-8) y las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1, todos ellos responsables del reclutamiento de células inflamatorias. El NF- $\kappa\beta$

es un factor de transcripción presente de forma inactiva en el citoplasma celular que se activa mediante la oxidación. Juega un papel importante en la inflamación crónica, ya que los oxidantes, como los aniones superóxido, producidos por las células inflamatorias, o los oxidantes ambientales, como el ozono, amplifican y perpetúan la respuesta inflamatoria. El humo del tabaco puede inducir la activación del NF- κ B y así activar la transcripción de mediadores de la inflamación, como el TNF- α y la IL-8 (37). Estudios recientes han demostrado en fumadores y pacientes con EPOC una mayor expresión en el epitelio bronquial de la fracción p65 del NF- κ B, que se correlaciona con la gravedad de la obstrucción al flujo aéreo (38).

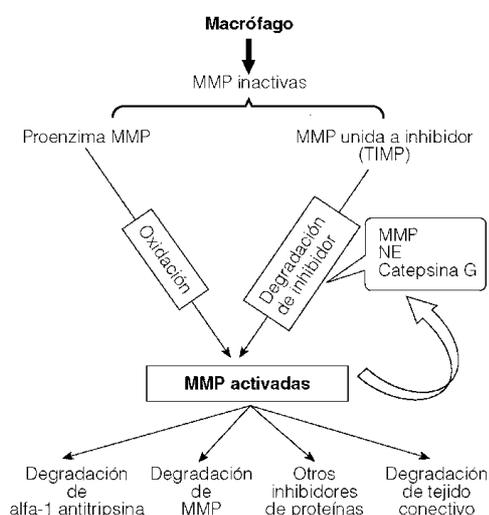
Los descubrimientos derivados de las nuevas técnicas genéticas permitirán, en un futuro cercano, no sólo identificar a los pacientes con riesgo de padecer la enfermedad, sino también profundizar en el estudio de sus fenotipos y desarrollar tratamiento de perfil genético.

b) Equilibrio proteasas-antiproteasas.

El equilibrio entre proteasas y antiproteasas es otro de los mecanismos implicados en la patogenia de la EPOC, en especial en la afectación parenquimatosa en forma de enfisema. La matriz extracelular del parénquima pulmonar está compuesta por fibras elásticas formadas principalmente por colágeno tipo IV, proteoglucanos y elastina. El enfisema surge de la degradación de esta matriz extracelular, principalmente por la degradación de la elastina. Las proteasas son una extensa familia de enzimas con capacidad para degradar esta matriz extracelular con acciones fisiológicas en la reparación de los tejidos. Fisiológicamente, la función de las proteasas está contrarrestada por antiproteasas. De esta manera, proteasas y antiproteasas constituyen un delicado equilibrio cuya alteración puede tener consecuencias para la homeostasis de

los órganos. Entre las proteasas más estudiadas en la patología del enfisema figuran la elastasa y las metaloproteasas de la matriz (MMP).

La elastasa es una serín-proteasa que se libera de los gránulos de los neutrófilos junto con otras proteasas como la proteasa-3 y las catepsinas. Diversos trabajos han mostrado su capacidad para producir enfisema en modelos animales. Además, se ha asociado con una disminución de su anti-elastasa, la alfa-1-antitripsina, lo cual explica el desarrollo de enfisema en los pacientes con deficiencia de esta enzima.



El inhibidor de la proteasa secretora de leucocitos (SLPI) es otra antiproteasa presente en las vía aérea que también tendría un papel en este equilibrio proteasa-antiproteasas. El SLPI es un eficaz inhibidor de la elastasa de los neutrófilos y otras proteinasas séricas (39,40) que se encuentra en concentraciones elevadas en las respiratorias (41). *In vitro* presenta propiedades antifúngicas (42) y antibacterianas (43,44,45) mostrando además ser capaz de prevenir la infección viral (46, 47). Tiene además propiedades antiinflamatorias que son potencialmente importantes en los mecanismos de defensa del huésped y en la autoinmunidad del mismo (48,49,50,51,52). Estas propiedades sugieren que el SLPI puede ser importante en enfermedades tales

como la EPOC y las bronquiectasias, caracterizadas por la inflamación neutrofílica y la infección. El SLPI debería tener un efecto protector en estas condiciones, de hecho los pacientes con bronquitis crónica tienen una mayor concentración de SLPI en las secreciones que los pulmones de pacientes sanos (53), probablemente esto sea debido a una hipertrofia de las glándulas secretoras submucosas y un incremento de la secreción celular. Sin embargo, esta concentración de SLPI en los pacientes con bronquiectasias o bronquitis crónica disminuye durante las exacerbaciones de la enfermedad aumentando nuevamente los niveles una vez que el paciente se estabiliza (54,55,56). Además en pacientes que presentan exacerbaciones frecuentes la concentración basal de SLPI es menor que en el resto de sujetos (57), sugiriendo que los niveles bajos de SLPI aumentan el riesgo de desarrollar exacerbaciones. Por otro lado, se ha demostrado también que los niveles de esta antiproteasa son menores en pacientes que presentan mayor inflamación neutrofílica en fase estable (58) y en pacientes con colonización crónica frente a los que no están colonizados (56,59)

Las metaloproteasas de la matriz (MMP) son una familia de más de 20 enzimas degradantes de la matriz extracelular derivadas de macrófagos y neutrófilos que son importantes para el desarrollo normal y la reparación del pulmón (60). La relación entre MMP y enfisema ha sido avalada por diversos trabajos. Por un lado, los pacientes con enfisema presentan una mayor concentración en el lavado broncoalveolar y una mayor expresión en macrófagos alveolares de MMP-1 (colagenasa), MMP-9 (gelatinasa B), MMP-2 y MMP-14 (61, 62) que tienen capacidad para la degradación de gran parte de los componentes de la matriz extracelular, pudiendo estar implicadas en la inflamación de la vía aérea y en la patogenia del enfisema (29,63,64, 65,66,67,68,69). Además, algunos autores han demostrado recientemente que la inflamación producida por el humo del tabaco está mediada por la MMP-12, que actuaría induciendo la liberación de

TNF- α de los macrófagos, sugiriéndose que esta liberación de TNF- α sería la responsable de la inflamación pulmonar en la EPOC, por su efecto fisiológico sobre la activación endotelial, atracción de neutrófilos al pulmón y digestión de la matriz intersticial por las proteasas derivadas de los neutrófilos (70). Las antiproteasas que contrarrestan la función de las MMP son los llamados inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMP) de los que conocemos tres subtipos TIMP-1, TIMP-2 y TIMP-3 (71,72).

La relación entre el humo del tabaco y el desarrollo de enfisema por alteración del equilibrio proteasa-antiproteasas constituye una hipótesis prometedora, pero que aún tiene algunos puntos pendientes de aclaración. Parece que el tabaco puede inducir un aumento de la liberación de proteasas, que en sujetos sanos, en condiciones normales, quedarían contrarrestadas por un incremento de antiproteasas en cantidad suficiente para evitar el daño en el pulmón. Sin embargo, en los fumadores que desarrollan EPOC la producción de antiproteasas podría ser inadecuada para neutralizar los efectos de las múltiples proteasas, probablemente debido a polimorfismos genéticos que alteran la función o la cantidad de estas enzimas.

c) Estrés oxidativo.

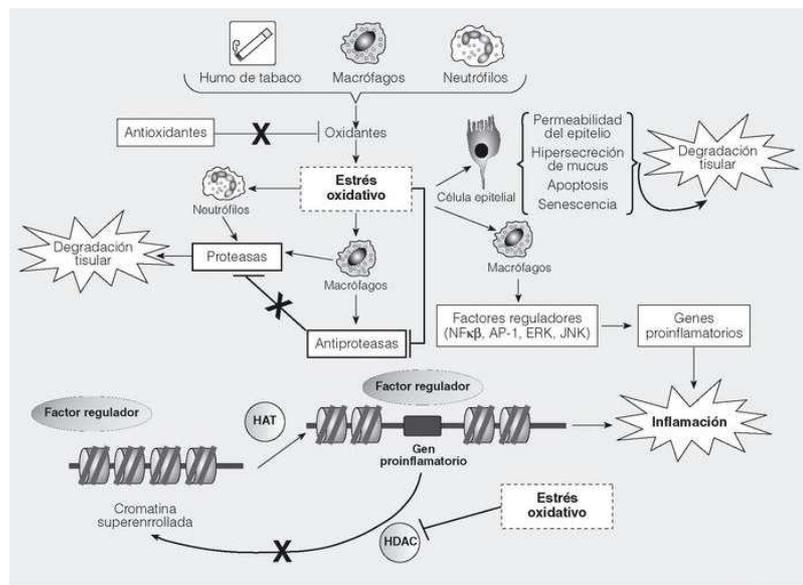
Los denominados radicales libres son átomos o grupos de átomos generalmente liberados del metabolismo del oxígeno o el nitrógeno, que presentan electrones no apareados, lo que los hace ser átomos inestables que reaccionan fácilmente con diversas moléculas. Dependiendo de su origen se denominan sustancias o especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS) y sustancias o especies reactivas derivadas del nitrógeno (RNS) (73). La formación de estas sustancias oxidativas es parte de diversas vías metabólicas y participan en diversas funciones fisiológicas como la producción de

energía, al regulación del crecimiento celular, la fagocitosis, las señales intracelulares o la síntesis de diversas sustancias como hormonas y enzimas (74). Con objeto de controlar esta capacidad oxidativa y evitar el daño celular, el organismo posee moléculas con capacidad antioxidante. Si se produce un desbalance entre ambos sistemas, aparece el denominado estrés oxidativo o nitrosativo, dependiendo de si los radicales libres se producen por el metabolismo del oxígeno o del nitrógeno (75).

La producción de reactantes oxidativos puede ser de naturaleza endógena por reacciones de transferencia de electrones o exógeno, como el producido por el consumo de tabaco. El humo del tabaco es una fuente de radicales libres, calculándose una cantidad de 1017 moléculas oxidantes por cada inhalación de un cigarrillo. La importancia del estrés oxidativo en la patogenia de la EPOC radica en que, además de producir un daño directo en el aparato respiratorio, el estrés oxidativo potencia la intensidad de los otros mecanismos patogénicos descritos en este apartado (76).

Recientemente se han publicado trabajos que aportan datos sobre la participación del desbalance entre oxidación y antioxidación en la patogenia de la EPOC (77). Por ejemplo, se ha demostrado un aumento de peróxido de hidrógeno en el condensado respiratorio de pacientes con EPOC, especialmente durante las exacerbaciones de la enfermedad (78), así como un aumento de 8-isoprostanos, un marcador de oxidación lipídica, en condensado respiratorio y orina de pacientes con EPOC. Por otro lado, este exceso de carga oxidante no sólo proviene del tabaco, sino que además los macrófagos alveolares y los neutrófilos de los fumadores liberan más radicales de oxígeno que los de los no fumadores (79). Además, las frecuentes exacerbaciones que experimentan estos pacientes, en gran parte secundarias a infecciones, pueden contribuir al reclutamiento y la activación de células fagocíticas al pulmón y aumentando la carga oxidante que aportan los neutrófilos (80,81).

Los mecanismos por los que los oxidantes pueden lesionar el pulmón son variados y se han descrito lesiones directas sobre el aparato respiratorio mediante la hipersecreción mucosa, edema alveolar y broncoconstricción o indirectas participando en otros mecanismos patogénéticos. En este sentido, el estrés oxidativo puede alterar la actividad enzimática antielastolítica de los mecanismos contrarreguladores de la degradación del pulmón, como la alfa-1-antitripsina, cuya actividad está disminuida en fumadores; así como de otras antiproteasas, como el SLPI, también están reducidas en pulmones de fumadores y pacientes con EPOC. Además, el humo del tabaco puede inducir la activación del NF- κ B y así activar la transcripción de mediadores de la inflamación, como el TNF- α y la IL-8 (37) con las implicaciones que se describen más adelante.



Las nuevas técnicas de biología molecular han facilitado la identificación de nuevos mecanismos de acción inflamatoria del estrés oxidativo, mediante la inactivación de enzimas con función antiinflamatoria, como las enzimas histona desacetilasa, que podría ser responsables de una respuesta inflamatoria amplificada y una disminución de la sensibilidad a glucocorticoides (82, 28), cuyo papel está aún por definir.

d) Apoptosis.

La apoptosis es un mecanismo altamente regulado que resulta fundamental para el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos mediante la muerte programada de las células constituyendo la base del equilibrio de la proliferación y diferenciación de los tejidos. En los últimos años se ha publicado varios trabajos que avalan la importancia de este fenómeno en la patogenia de la EPOC (83).

Por el momento se han descrito tres vías moleculares implicadas en la apoptosis. Una de ellas se activa en respuesta a señales extracelulares y está mediada por miembros de la familia del TNF- α , unidos a receptores de superficie (death receptors), que dan lugar a activación de caspasas (proteínas pertenecientes al grupo de las cisteín-proteasas) y liberación de desoxirribonucleasa (84,85). La segunda vía es intrínseca en respuesta a estrés químico o mecánico y da lugar a la liberación de citocromo C por la mitocondria, que a su vez activa las caspasas. La otra vía se activa en respuesta a estímulos citolíticos externos, como la formación de poros en la membrana por las perforinas y granzimas B liberadas por los linfocitos T.

Varios trabajos han descrito un aumento de células apoptóticas en tejido pulmonar enfisematoso junto a una mayor proliferación celular (86), lo que iría a favor de un intercambio o turnover celular alterado (87). En los casos en que se describe apoptosis de células endoteliales, ésta se ha asociado a una expresión reducida de factores de crecimiento del endotelio vascular, lo que ha dado lugar a la hipótesis vascular del enfisema, por la que la reducción de los factores de mantenimiento vascular produce la muerte de las células del endotelio alveolar y genera la destrucción alveolar que se observa en el enfisema (83). Recientemente se ha postulado la existencia de un programa de mantenimiento del pulmón con un equilibrio entre la capacidad reparadora

en respuesta al daño ambiental y la destrucción alveolar por apoptosis y estrés oxidativo.

Otro tipo de respuesta celular al estrés es la senescencia replicativa, fenómeno que aparece con la edad y que puede acelerarse por el estrés oxidativo, lo que podría alterar la reparación de tejido bloqueando la regeneración celular, disminuyendo las células progenitoras y alterando la estructura del órgano mediante la destrucción de la matriz extracelular. En pacientes con enfisema pulmonar se han demostrado mayores índices de senescencia en las células epiteliales y endoteliales alveolares (88) lo que podría explicar una reparación deficiente.

Las implicaciones finales de estos mecanismos patogénicos está aún por completarse, pero juntos van conformando un marco de interrelaciones patogénicas de enorme complejidad que podría ser responsable de los distintos hallazgos patológicos de la enfermedad.

e) Inflamación.

Como ya se ha comentado previamente, el hecho de que no todos los fumadores desarrollen una EPOC, constituye un marco singular para el estudio de la inflamación en la patogenia de la EPOC, ya que permite el estudio de diversos marcadores inflamatorios entre pacientes expuestos que desarrollan la enfermedad frente a expuestos que no la desarrollan. En términos de inflamación, se ha observado que aquellos fumadores que desarrollan la enfermedad presentan una inflamación bronquial similar a los fumadores sanos en el tipo de inflamación, pero superior en la intensidad de la misma (37). Estudios recientes comienzan a caracterizar el tipo, lugar y grado de inflamación en el pulmón de los pacientes con EPOC, así como su relación con la intensidad de la enfermedad (10). Estos trabajos describen que, al menos, tres grupos

celulares están presentes en la inflamación de los pacientes con EPOC: linfocitos CD8, neutrófilos y macrófagos.

Los estudios realizados con biopsias bronquiales de pacientes con EPOC leve o moderada muestran un predominio de linfocitos T, principalmente CD8+, y macrófagos (CD68+) en la mucosa bronquial de estos pacientes. De esta manera, se ha señalado que la presencia de linfocitos T podría diferenciar entre los fumadores que desarrollan EPOC y los que no la desarrollan, debido a que se ha hallado una relación entre el número de células T, la cantidad de destrucción alveolar y la importancia de la obstrucción al flujo aéreo (89). El mecanismo por el cual las células T CD8+ se acumulan en el pulmón de los pacientes con EPOC no se conoce del todo. Existen diversas hipótesis entre las que figuran la participación de diversas quimiocinas como CXCL3, la colonización crónica por patógenos bacterianos o víricos sea responsable de la respuesta inflamatoria amplificada de la EPOC (90) o el propio humo del tabaco. El papel de estos linfocitos en la patogenia de la EPOC es igualmente desconocido. Parece que podrían activar diversas vías apoptóticas a través de la liberación del TNF- α , perforinas y granzimas e incluso se ha llegado a postular la posibilidad de que la EPOC sea una enfermedad autoinmunitaria (91,92).

Los neutrófilos constituyen otro grupo celular cuyo aumento se ha constatado en los pacientes con EPOC (93). En este sentido, sabemos que el humo del tabaco puede ser responsable del aumento de la cantidad de neutrófilos circulantes y de la modificación de su deformabilidad para secuestrarlos en los capilares del pulmón (94), así como tener un efecto directo sobre la producción de granulocitos en la médula ósea a través de la liberación del factor estimulante de colonias granulocíticas y microcíticas producido por los macrófagos. Más allá de la descripción de su mecanismo patogénico, su presencia parece tener una relevancia pronóstica, ya que el número de

neutrófilos encontrados en biopsias bronquiales y esputo inducido se ha relacionado con la gravedad de la EPOC (95), así como con la rapidez de la pérdida de función pulmonar.

Los macrófagos tienen una especial importancia en la patogenia de la EPOC, ya que constituyen una de los primeros mecanismos de defensa del pulmón y son productores de numerosas citoquinas de acción pro-inflamatoria que están relacionadas con el resto de mecanismos patogénicos descritos. Así, por ejemplo, el humo del tabaco activa los macrófagos, y éstos liberan mediadores inflamatorios como el TNF- α , la IL-8, la proteína quimiotáctica de los monocitos-1 (MCP-1), el leucotrieno B4 o especies reactivas de oxígeno, así como proteasas tales como MMP-2, MMP-9, MMP-12, y catepsinas K, L y S. Por este motivo, los macrófagos de los pacientes con EPOC no sólo están aumentados, sino que también están más activados (36).

Otros grupos celulares implicados en la patogenia de la EPOC son las células dendríticas y las epiteliales. Está descrito que hay un número mayor de células dendríticas en el pulmón de pacientes con EPOC, sobre todo en las paredes alveolares y vías aéreas. Todavía no se conoce su función, aunque podrían tener un papel relevante en la respuesta inmunitaria innata y adaptativa (96). Las células epiteliales también tienen un papel muy importante en este proceso inflamatorio, ya que son activadas directamente por el humo del tabaco y liberan mediadores (factor estimulante de colonias granulocíticas y microcíticas, IL-8, IL-1 β , TNF- α) que inician la cascada inflamatoria.

4. Diagnóstico.

El diagnóstico de la EPOC es fundamentalmente clínico-funcional y se exige la presencia de 2 criterios diagnósticos:

1. Existencia de una historia de inhalación crónica de una sustancia tóxica. En los países desarrollados, el principal agente nocivo en relación con la enfermedad es el humo del tabaco. Aunque no existen estudios que nos digan de forma inequívoca el consumo mínimo a partir del cual se desarrolla la enfermedad, actualmente se considera que un consumo acumulado de 10-20 paquetes-año constituye un factor de riesgo relevante. Como ya se ha comentado es importante tener en cuenta que existen otros agentes que han sido descritos como posibles agentes causantes de EPOC como el uso de la energía de biomasa (es el combustible energético que se obtiene de forma directa o indirecta de recursos biológicos) que es más común en países en desarrollo.

2. Presencia de una obstrucción en la espirometría forzada. Según las guías de práctica clínica se recomienda la realización de una espirometría forzada a los pacientes fumadores mayores de 40 años que presentan sintomatología respiratoria crónica como tos, expectoración o disnea de esfuerzo (97). La exploración de la función pulmonar en la EPOC permite establecer el diagnóstico de la enfermedad, cuantificar su gravedad, estimar el pronóstico, monitorizar la evolución de la función pulmonar y la respuesta al tratamiento y valorar la gravedad de los episodios de exacerbación, así como la respuesta al tratamiento.

La espirometría forzada es una prueba en la que tras una inspiración máxima, se le pide al paciente que realice una espiración de todo el aire, en el menor tiempo posible. Es una prueba sencilla de realizar y muy segura. Los valores de flujos y volúmenes que más nos interesan son:

- FVC. Es el volumen total que expulsa el paciente desde la inspiración máxima hasta la espiración máxima.
- FEV₁. Es el volumen que se expulsa en el primer segundo de una espiración forzada.
- Relación FEV₁/FVC: Indica el porcentaje del volumen total espirado en el primer segundo con respecto a la FVC.
- Flujo espiratorio máximo entre el 25 y el 75% del volumen espirado (FEF₂₅₋₇₅): Expresa la afectación de la vía aérea fina.

Se considera obstrucción al flujo aéreo a la presencia de FEV₁/FVC inferior a 0,7 tras broncodilatación. El valor del FEV₁ es el mejor indicador de la gravedad de la obstrucción del flujo aéreo (12,98) y se utiliza como primer parámetro para clasificar la enfermedad. En la clasificación de la EPOC según la GOLD se distinguen 4 grados de afectación funcional según el valor del FEV₁ con respecto al valor teórico del individuo (12):

- Grado I: EPOC leve. Limitación leve del flujo aéreo (FEV₁/FVC < 0,70, FEV₁ ≥ 80% del valor de referencia).
- Grado II: EPOC moderada. Mayor deterioro de la limitación del flujo aéreo (FEV₁/FVC < 0,70, 50% ≤ FEV₁ < 80% del valor de referencia).
- Grado III: EPOC grave. Limitación importante del flujo aéreo (FEV₁/FVC < 0,70, 30% ≤ FEV₁ < 50% del valor de referencia).
- Estadio IV: EPOC muy severo. Obstrucción muy grave al flujo aéreo con FEV₁ < 30%.

Los puntos de corte expuestos anteriormente son arbitrarios y tienen un carácter empírico, aunque son los límites que se corresponden con los propuestos por las Sociedades.

En los últimos años el gran desarrollo de diferentes opciones en el tratamiento farmacológico y no farmacológico de la EPOC, ha comportado la demostración de que la respuesta clínica puede ser diferente según las características de la enfermedad. Aparece así en la última década el concepto de fenotipo aplicado a la EPOC que ha comportado la definición de diversos tipos de pacientes con significado pronóstico y terapéutico diferente (13,99). De esta manera podemos acercarnos a un tratamiento más personalizado de acuerdo no solo con la gravedad de la obstrucción del flujo aéreo, sino también condicionado por el fenotipo clínico (100).

Un grupo de expertos internacionales ha definido fenotipo de la EPOC como «aquellos atributos de la enfermedad que solos o combinados describen las diferencias entre individuos con EPOC en relación a parámetros que tienen significado clínico (síntomas, agudizaciones, respuesta al tratamiento, velocidad de progresión de la enfermedad, o muerte)» (13). Por tanto, el fenotipo debería ser capaz de clasificar a los pacientes en subgrupos con valor pronóstico y que permitan determinar la terapia más adecuada para lograr mejores resultados clínicos (13,101).

La valoración del paciente con EPOC basándonos exclusivamente en criterios espirométricos ha quedado relegada ya que tiene importantes limitaciones, dado que actualmente sabemos que la reducción del flujo aéreo es una característica muy importante en estos pacientes, incluso definitoria de la enfermedad, pero que constituye un componente más dentro de las alteraciones que se producen en esta patología. Siendo la medición del FEV₁ imprescindible para el diagnóstico de EPOC, este parámetro se

relaciona débilmente con otras consecuencias esenciales de la enfermedad como es la disnea y la percepción del estado de salud (102,103). Cuando se ha querido utilizar el FEV₁ como variable “respuesta” al efecto terapéutico de una determinada intervención médica, este parámetro no capta toda la mejoría que se puede esperar que paralelamente también mejoraban otras variables como disnea, calidad de vida o utilización de recursos sanitarios (104,105).

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 multidimensional de la EPOC que tenga en cuenta estas distintas facetas (106). Y por todo lo expuesto anteriormente, actualmente se recomienda el uso de escalas multidimensionales en la valoración de los pacientes con EPOC, así como la clasificación de los pacientes en función de los fenotipos de la enfermedad.

En este sentido la publicación de la guía española de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (GesEPOC) (107) ha supuesto un cambio en el enfoque diagnóstico y el tratamiento de esta enfermedad. El reconocimiento de los fenotipos clínicos y la clasificación de gravedad basada en las escalas multidimensionales BODE/BODEx precisan una mayor implicación de los clínicos en el día a día del cuidado de los pacientes con EPOC, pero a cambio ayudan a personalizar el tratamiento de acuerdo a las características de cada paciente en particular (108). La identificación de fenotipos clínicos no solo nos puede ayudar a determinar un tratamiento diferenciado, sino a identificar grupos de pacientes con diferente mortalidad a medio y largo plazo.

En sintonía con la opinión mayoritaria, la denominación fenotipo de la EPOC se reservará a las distintas formas clínicas con repercusión terapéutica identificadas en los pacientes con EPOC. En los últimos años, diversos investigadores han intentado cuantificar las diversas «caras» o fenotipos de la EPOC. Esto ha puesto de manifiesto la gran confusión que existe entre las diversas formas etiopatogénicas, clínicas y morfológicas de ese síndrome que llamamos EPOC. Lo que se está tratando es llegar a un punto intermedio entre la simplicidad de englobar a todos los pacientes con obstrucción no completamente reversible al flujo aéreo dentro del término EPOC, y la complejidad que supondría el considerar a cada paciente de modo individual como una enfermedad huérfana. Este punto intermedio pasa por la identificación y descripción de algunos fenotipos que tengan interés no solo biológico o epidemiológico, sino también pronóstico y sobre todo terapéutico.

Existen una serie de estudios llevados a cabo en los últimos años en los que se han identificado los diversos fenotipos de la enfermedad. Estos estudios parten de poblaciones heterogéneas, utilizan metodologías diversas para analizar variables diferentes, pero todos ellos alcanzan conclusiones similares, pudiendo definirse diferentes patrones de expresión clínica de la EPOC, los llamados fenotipos. En su mayoría distinguen entre 3 y 5 fenotipos.

Los 4 fenotipos propuestos por la GesEPOC son *a)* fenotipo no agudizador; *b)* fenotipo mixto EPOC-asma; *c)* fenotipo agudizador con enfisema, y *d)* fenotipo agudizador con bronquitis crónica.



Se define como fenotipo agudizador a todo paciente con EPOC que presente dos o más agudizaciones moderadas o graves al año (109). Estas exacerbaciones deben estar separadas al menos 4 semanas desde la finalización del tratamiento de la agudización previa o 6 semanas desde el inicio de la misma en los casos que no han recibido tratamiento, para diferenciar el nuevo evento de un fracaso terapéutico previo (110). La identificación del fenotipo agudizador se basa en la historia clínica y se ha demostrado que el diagnóstico basado en la declaración del paciente sobre su historial de agudizaciones es fiable (111). El fenotipo agudizador subraya la importancia de preguntar por la historia de agudizaciones en la entrevista clínica e identifica a pacientes que pueden tener indicación de tratamiento antiinflamatorio añadido a los broncodilatadores. Es importante señalar que hay diferentes tipos de agudizaciones, relacionados con su etiología, y que el tipo de agudización que presenta un paciente (bacteriana, viral o eosinofílica) suele mantenerse constante en episodios sucesivos (112).

5. Importancia.

El impacto sanitario, social y económico de esta enfermedad es elevado. Sin embargo, su morbilidad y la discapacidad asociada a ella es muchas veces subestimada por pacientes y sus cuidadores. Esto conlleva además un infra-diagnóstico importante de la enfermedad lo que hace que nos encontremos todavía ante la punta del iceberg.

Los estudios epidemiológicos sobre la EPOC han ido cobrando importancia en las últimas décadas, en particular desde que la European Respiratory Society en la década de los 90 insistiera en la necesidad de realizar estudios epidemiológicos para conocer el impacto de la enfermedad (113). Desde entonces, se han publicado numerosos estudios en el que se pone de manifiesto que la EPOC es una importante causa de morbi-mortalidad en los países desarrollados con una alta prevalencia a nivel mundial.

Según las estimaciones de la OMS en el año 2007 existían unos 210 millones de personas sufrían EPOC. De ellas, 80 millones padecían una forma moderada o grave de la enfermedad. En 2005, 3 millones de personas fallecieron por esta causa, lo cual representa el 5% de las muertes habidas ese año. Además el problema adquiere mayor importancia al ver que las previsiones estiman que en el 2020 la EPOC se habrá convertido en la cuarta causa de muerte en todo el mundo.

La reciente publicación del estudio de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de la Carga Mundial de Enfermedades (*Global Burden of Disease Study — GBD—*) 2010 (114), actualiza las estimaciones mundiales anteriores en EPOC y otras enfermedades respiratorias y, también, da algunas nuevas estimaciones sobre el asma, los trastornos relacionados con el sueño, las infecciones de las vías respiratorias inferiores, el cáncer de pulmón y la tuberculosis.

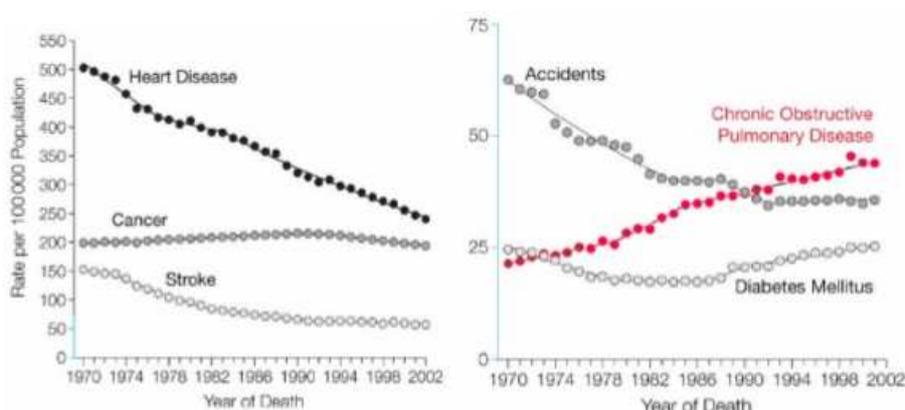
En cuanto a la EPOC la nueva información de mortalidad y prevalencia de EPOC en el mundo es cuanto menos preocupante, en el *ranking* mundial de causas de muerte, las enfermedades respiratorias representan 4 ó 5 puestos dentro de los 10 primeros. La EPOC subió del cuarto puesto en 1990 al tercero en 2010, justo por detrás de la cardiopatía isquémica y el accidente cerebrovascular, mientras que las traqueobronquitis son ahora ya la cuarta causa de muerte, el cáncer de pulmón la quinta y la tuberculosis la décima. También podríamos incluir una proporción significativa (hasta 1 de cada 3) de las muertes en accidente de tráfico (octava en esta clasificación) asociadas con la apnea del sueño (115).

La actualización del GBD 2010 indica un incremento del número de personas con EPOC desde la anterior cifra en 1990 de 210 millones de personas con EPOC en todo el mundo, a la actual de 328.615.000 con EPOC (168 millones en varones y 160 millones en mujeres).

En España, hay varios estudios epidemiológicos de ámbito nacional realizados recientemente en nuestro país que estiman la prevalencia de la EPOC entre un 6,4 y un 11,4% de la población general dependiendo de las zonas geográficas. En el estudio IBERPOC (116) llevado a cabo en 1998, se obtuvieron cifras de prevalencia de la EPOC del 9,1% en la población española de 40 a 69 años (14,3% en varones y 3,9% en mujeres), con importantes diferencias según áreas geográficas, desde el 4,9% en Cáceres hasta el 18% en Barcelona. Este estudio estimó que más de 1.200.000 españoles tenían obstrucción no reversible del flujo aéreo compatible con EPOC. Según el hábito tabáquico, la prevalencia de la EPOC fue del 15% en fumadores, del 12,8% en ex fumadores y del 4,1% en no fumadores. Una conclusión muy significativa que se deriva de este estudio es que de los pacientes que se identificaron como afectados por la enfermedad solamente un 22% estaban diagnosticados, lo que supone una alta tasa de

infradiagnóstico, dado que el 78,2% de los casos confirmados por espirometría no había sido diagnosticado previamente.

Estos datos epidemiológicos han sido recientemente actualizados por otro estudio de diseño similar, el estudio EPISCAN. Este estudio confirma la alta prevalencia de la enfermedad y su alta tasa de infradiagnóstico en nuestro país. Según estos datos, la prevalencia actual de la EPOC en la población general de entre 40 y 79 años en el 10,2%, aumentando su prevalencia con la edad (117).



Jemal A, et al. *JAMA*. 2005 Sept. 14; 294(10):1255-9.

Figura 1. Aumento de la carga de la EPOC. Tendencia en las tasas de mortalidad en las 6 principales causas de mortalidad en Estados Unidos

En cuanto a la mortalidad, a nivel mundial se estima que la EPOC constituye la quinta causa de muerte y de acuerdo con las previsiones será la tercera causa de muerte en el mundo y la quinta en cuanto a años de vida perdidos y años de vida vividos en incapacidad en las próximas décadas (OMS 2007). La OMS pronostica que en el 2030 la EPOC será la causante del 7,8% de todas las muertes y del 27% de las muertes relacionadas con el tabaco, solo superada por el cáncer (33%) y por las enfermedades cardiovasculares (29%) (118). En este contexto además, es de destacar que el riesgo de cáncer de pulmón, que es el más frecuente entre todas las neoplasias y el de la

enfermedad cardiovascular, aumenta significativamente en quienes padecen EPOC. En nuestro país constituye la quinta causa de muerte entre los varones y la séptima para las mujeres que continúa en aumento (119). Sin embargo, estudios recientes parecen indicar que hay luz al final del túnel, describiéndose recientemente el inicio de una tendencia decreciente de la mortalidad (120).

Debido a su elevada prevalencia, a la morbimortalidad asociada y el coste económico y social derivado de la enfermedad, la EPOC constituye hoy día un problema socio-sanitario de primera magnitud. La enfermedad ha adquirido especial importancia por el gran impacto económico que supone en el sistema sanitario, tanto por el diagnóstico y tratamiento en fase estable, como por el derivado de los costes por hospitalización en las exacerbaciones (121).

En España, el impacto que la EPOC genera sobre el Sistema Nacional de Salud es considerable. Datos de la Encuesta de Morbilidad Hospitalaria de 2005 indican que la EPOC supone de forma global, el 9,3 % del total de altas hospitalarias por enfermedades del aparato respiratorio en mujeres y el 28,2% en varones, siendo en estos últimos la principal causa de alta hospitalaria por enfermedad del aparato respiratorio en el grupo entre 55 y 89 años, alcanzando el 6,5% de todas las altas hospitalarias y el 42,5% de todas las altas relacionadas con enfermedades del aparato respiratorio (122).

Globalmente, los gastos totales asociados a la EPOC equivalen al 0,2% del Producto Interior Bruto español (97). Además, se estima que más del 70% de los individuos con EPOC permanece sin diagnosticar (117), lo que es un indicador que nos dice que el problema podría ser mayor del objetivado debido a un efecto “iceberg”.

En España, las enfermedades respiratorias tienen un importante componente de discapacidad y suponen la cuarta causa de carga de enfermedad, suponiendo el 7,5% del

total de los años de vida perdidos o con discapacidad (AVAD). Según datos del año 2000, del total de los 365.114 AVAD de dicho año, la EPOC fue responsable de 138.491 AVAD perdidos (2,9% sobre el total de AVAD). De cada 100 AVAD perdidos por EPOC, un 49,9% lo son por mortalidad prematura y un 50,1% lo son por discapacidad o mala salud. En hombres, la EPOC se encuentra entre las enfermedades con un mayor número de AVAD (4,1% sobre el total de AVAD) por detrás del abuso del alcohol (6,1%), la cardiopatía isquémica (6,1%), la depresión unipolar (5,5%), los accidentes de circulación (5,5%) y los tumores malignos de tráquea, bronquios y pulmón (5,2%) mientras que en mujeres la carga de enfermedad es algo inferior (1,3% sobre el total de AVAD) (123).

Además de suponer una gran carga de enfermedad en términos de mortalidad prematura y discapacidad, la EPOC tiene un importante impacto en términos de costes económicos. Existen numerosos estudios realizados que evalúan los costes derivados de la EPOC y, en la mayor parte de ellos, se pone de manifiesto que la mayor carga económica derivada de la enfermedad proviene de los gastos que suponen las hospitalizaciones. Esto lo confirma una encuesta transversal realizada en ocho países entre los que participó España (124) en la que se incluyeron 403 pacientes con EPOC y en la que se observó que el 84% del total de costes directos era en gran medida debido al tratamiento de las agudizaciones.

Existe un importante estudio llevado a cabo en nuestro país en el que se incluyeron un total de 363 pacientes con EPOC, calculándose que el coste anual de la enfermedad en España para el año 1997 era de 238,82 millones de euros, asumiendo una prevalencia en la población del 9% y considerando únicamente costes sanitarios directos (125). En este caso, la asistencia hospitalaria supuso el coste más elevado (41,0% sobre el total), seguido del coste del tratamiento farmacológico (36,6% considerando el

tratamiento de las exacerbaciones) y el de las consultas ambulatorias (18,8%). Del mismo modo, el coste medio por paciente y año fue de 198,17 euros, y debido a que el 22% de las personas enfermas estaban previamente diagnosticados y consumían recursos sanitarios, el coste por paciente previamente diagnosticado de EPOC fue de 910,57 euros anuales. Atendiendo a la gravedad de la enfermedad, el coste medio por paciente con EPOC grave fue tres veces superior al coste por paciente con EPOC moderada y más de siete veces el coste de la EPOC leve.

Otro trabajo desarrollado en 192 pacientes con EPOC (126) estimó que, teniendo en cuenta que sólo el 22% de las personas enfermas entre 40-70 años están diagnosticados de EPOC en España, los costes directos sanitarios de la EPOC tras un año de seguimiento en Atención Primaria serían de 463 millones de euros. A diferencia del estudio anterior, los recursos sanitarios empleados que originaron mayor gasto fueron el tratamiento farmacológico (incluyéndose la oxigenoterapia) para la EPOC (52,3% del total), las agudizaciones de la enfermedad (15,5%), el tratamiento de enfermedades concurrentes (14%) y las consultas asistenciales (12,8%).

En el año 2000 se estimó en otro estudio de ámbito nacional (127) que el tratamiento farmacológico supone un gran impacto en cuanto a los costes directos sanitarios de la EPOC, representando un 38% de los costes totales, considerando para ello una prevalencia del 9,1 % según los estudios epidemiológicos llevados a cabo en aquella época (116).

En otro trabajo de 2002 (128) con un total de 1.510 pacientes (de los cuales 766 fueron diagnosticados con EPOC) se estableció que el coste de la EPOC en España, representado la adquisición de fármacos el 42,5% de los costes totales de la EPOC, seguido de las hospitalizaciones (41,6%) y las consultas extra hospitalarias (15,9%).

Los desafíos actuales en términos de morbi-mortalidad de la EPOC han generado un creciente interés en explorar distintas iniciativas que permitan conocer mejor los mecanismos etiopatogénicos íntimos de la enfermedad y todos aquellos aspectos que afectan a la historia natural de la misma.

6. Repercusiones

a) Disnea

La disnea es el principal síntoma de los pacientes con EPOC y la primera causa de consulta al médico. La Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica recomienda la valoración de la disnea mediante la escala propuesta por el Medical Research Council (97,129). Este instrumento tiene la ventaja de su sencillez y de reflejar en gran parte la disnea provocada por actividades de la vida diaria del sujeto.

La disnea es percibida de forma desigual por pacientes con similar grado de limitación funcional (130). Aunque la disnea aumenta conforme empeora la limitación al flujo aéreo, ésta no está relacionada de forma tan directa con el valor del FEV₁ como cabría esperar, siendo la asociación entre ambos parámetros débil (131). En este sentido, las pruebas de esfuerzo se han planteado como una alternativa más objetiva para la evaluación sintomática de estos pacientes. Sin embargo, la prueba de esfuerzo cardiopulmonar es relativamente compleja y no está fácilmente disponible. Como alternativa existen exploraciones más accesibles y menos complejas, como la prueba de marcha durante 6 minutos (6MWT) que es un test de esfuerzo submáximo (132). Estas dos pruebas de esfuerzo, siendo muy diferentes por la respuesta fisiológica que implican, tienen en común que son capaces de inducir disnea. Por tanto, son útiles al médico para reproducir este síntoma en un medio controlado y conocer el grado de limitación sintomática del paciente.

Otro componente a tener en cuenta en la valoración de la disnea es la presencia de hiperinsuflación. Debido a las alteraciones morfológicas de la vía aérea, los pacientes con EPOC tienen una alteración funcional que afecta principalmente a la rama

espiratoria. Esta alteración condiciona un aumento del tiempo espiratorio que culmina produciendo un atrapamiento aéreo y por tanto una situación de hiperinsuflación (133). Esta hiperinsuflación se acentúa durante el ejercicio produciéndose una situación de hiperinsuflación dinámica con un mayor aumento transitorio de los volúmenes pulmonares durante el ejercicio que tiene importantes repercusiones mecánicas. Como consecuencia, la hiperinsuflación incrementa la sensación de disnea y limita la capacidad de ejercicio.

Finalmente, existen otros componentes que determinan la aparición de disnea como incremento de la demanda ventilatoria necesario para compensar el aumento del espacio muerto, el mayor esfuerzo inspiratorio necesario para vencer el incremento de la resistencia de la vía aérea y la debilidad de los músculos inspiratorios junto con la disminución en la capacidad de generar fuerza por parte del diafragma debido a su aplanamiento y acortamiento, secundarios a la hiperinsuflación pulmonar (132).

b) Fatiga.

Existe una confusión sobre la definición y uso del término, ya que fatiga es una palabra empleada en lenguaje coloquial para definir una serie de síntomas muy diversos que incluyen disnea, astenia o incluso la náusea. Sin embargo, desde el punto de vista médico, la fatiga es un síntoma que se ha definido como una sensación general de astenia de diverso grado y que crea un estado general tal que interfiere con la capacidad habitual de funcionar del paciente. Se trata pues de un concepto complejo multidimensional cuya manifestación afecta a dimensiones tan diversas como la física, emocional, cognitiva y comportamental (134).

La prevalencia de la fatiga en los pacientes con EPOC se estima en torno al 58%, mientras que en la población general la prevalencia oscila entre el 11 y el 20%

(135). Los pacientes con EPOC describen la fatiga como un síntoma problemático, persistente y difícil de controlar (136). Esta fatiga relacionada con la EPOC se ha descrito característicamente que empeora por las tardes y con el ejercicio físico y mejora con el descanso y temperaturas ambientales frías.

A pesar de la prevalencia de este síntoma, su intensidad y su impacto en la enfermedad están escasamente estudiados. Hasta el momento dos estudios han evaluado prospectivamente el impacto de la fatiga en la salud de los pacientes con EPOC frente a controles (137,138). Los resultados de estos dos estudios aportan datos interesantes. Casi la mitad de los pacientes con EPOC declaran tener fatiga que suele ser moderada o grave en intensidad y casi la mitad de los pacientes refieren que la fatiga es su síntoma principal. Además, los pacientes con EPOC presentan una mayor frecuencia, mayor duración y mayor severidad de la fatiga comparado con individuos de la población general. Igualmente, los pacientes con EPOC que presentan fatiga de mayor intensidad tienen más limitaciones funcionales y peor salud comparado con los que presentan una fatiga más moderada (137,138).

Un aspecto que es importante destacar se refiere a la relación de la fatiga con otras manifestaciones clínicas de la EPOC; en concreto con la capacidad de ejercicio, los estados de ánimo o las alteraciones del sueño. Se ha descrito que la fatiga empeora con el ejercicio físico diario (139). Esta relación es importante ya que sabemos que la actividad física regular proporciona un mejor estado funcional del paciente con EPOC con mejoría en la capacidad de ejercicio e incluso en parámetros de inflamación sistémica (140,141). Por otro lado, la relación entre fatiga y alteración del estado de ánimo también se ha puesto de manifiesto, en especial con la presencia de síntomas depresivos. Esta relación es igualmente importante de manera que actualmente se considera la fatiga como un criterio diagnóstico de depresión (142). Finalmente, se ha

establecido la relación entre la fatiga y la calidad del sueño. Kapella y cols. demostraron que la disnea, un estado de ánimo depresivo y la calidad del sueño explican el 42% de la variabilidad de la fatiga (143). Por tanto, la fatiga no sólo es un síntoma prevalente en los pacientes con EPOC, sino que está relacionado con otras alteraciones asociadas con la enfermedad por lo que requiere una evaluación y abordaje terapéutico adecuado.

La aproximación terapéutica de este síntoma merece una especial consideración. Según un estudio realizado en pacientes con cáncer, la mayoría (77%) de los pacientes con fatiga o bien no se trata este síntoma o bien se trata con reposo (144). Sin embargo, aunque la fatiga está relacionada con el ejercicio físico y el descanso la mejora, un metaanálisis sobre 23 ensayos clínicos concluyó que la rehabilitación respiratoria es efectiva para reducir la fatiga en pacientes con EPOC (145). A pesar de esto, recientemente se ha publicado un pequeño estudio para evaluar la eficacia de la rehabilitación respiratoria en la fatiga y el estado de salud en un grupo de pacientes con EPOC con resultados algo desalentadores (146). Se necesitan pues ensayos que evalúen la eficacia de la rehabilitación respiratoria sobre la fatiga en pacientes con EPOC a largo plazo.

Por otra parte, en los pacientes con EPOC existe con frecuencia una debilidad de la musculatura esquelética de las extremidades, debida al decondicionamiento y posiblemente también a efectos sistémicos de la enfermedad relacionados con fenómenos inflamatorios (147), lo que contribuye, junto con la disnea, a limitar su capacidad para realizar esfuerzos.

c) Exacerbaciones.

Actualmente, se considera una exacerbación de la EPOC como un evento en el curso natural de la enfermedad caracterizado por un cambio en la disnea, tos y/o esputo basal del paciente, que va más allá de las variaciones diarias, que es aguda en su inicio y puede requerir un cambio en la medicación regular (148). Fisiopatológicamente, la exacerbación se caracteriza esencialmente por un incremento de la inflamación previa que conduce a una limitación al flujo aéreo e hiperinsuflación dinámica (78,149).

La importancia de las exacerbaciones en el estudio y manejo de la EPOC radica en la alta frecuencia de las mismas y en el impacto pronóstico que suponen, influyendo en la evolución de la enfermedad. Las exacerbaciones constituyen una causa frecuente de consulta, tanto en servicios hospitalarios como en atención primaria, representando el 2% de las urgencias asistidas (150), con amplias variaciones estacionales. Hasta el 40% de los pacientes atendidos por esta causa en urgencias precisan ingreso hospitalario (151). Un 4% de la población general europea consulta a su médico al menos una vez al año por agudización respiratoria, y un 20% de estas consultas corresponde a pacientes con EPOC (152). Aunque existe cierta controversia sobre el efecto de las agudizaciones sobre el curso de la EPOC, se ha constatado un descenso acelerado de la función pulmonar en los pacientes que sufren repetidas exacerbaciones, sugiriéndose por ello una posible influencia sobre progresión de la enfermedad (153). Por este motivo, las guías de práctica clínica enfatizan la importancia de la adecuada prevención y correcto tratamiento de las exacerbaciones en la EPOC.

La etiología de las exacerbaciones es muy variada y en muchos casos no está completamente aclarada y establecida. Las de causa infecciosa constituyen hasta el 1,5% de las urgencias atendidas en el hospital y el 13,7% de las infecciones. Además

según algunos estudios la infección constituye la causa de hasta el 75% de las exacerbaciones en pacientes con EPOC (154). En nuestro entorno, las bacterias son responsables de la mitad de las agudizaciones de causa infecciosa, principalmente causadas por *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* y *Chlamydia pneumoniae* (155).

La clasificación de las agudizaciones es un tema de actual controversia. Aunque las normativas aportan datos sobre los criterios de gravedad, no se ha conseguido establecer una clasificación unánime que agrupe estas variables en un esquema sencillo. Actualmente, algunos autores emplean una clasificación de la gravedad de la exacerbación en base a la utilización de recursos sanitarios, según ésta se puede distinguir:

- Exacerbación leve: se presenta empeoramiento de la situación basal que requiere aumento de la medicación habitual, pero que puede ser manejado de forma domiciliaria.
- Exacerbación moderada: el paciente precisa aumento de la medicación habitual y atención médica adecuada.
- Exacerbación grave: empeoramiento muy importante o rápidamente progresivo que requiere la hospitalización del paciente. Deberán ser valorados en el hospital todos los EPOC estadio IV que estén agudizados o EPOC en otros estadios de la GOLD que presenten: comorbilidad asociada grave, taquipnea (> 30 respiraciones/min), uso de músculos accesorios, cor pulmonale descompensado, cianosis, signos clínicos de encefalopatía hipercápnica, imposibilidad de controlar la enfermedad en el domicilio, necesidad de descartar otras

enfermedades, mala evolución en una visita de seguimiento de la agudización

d) Calidad de vida.

Se conoce con el término calidad de vida relacionada con la salud a la percepción que tienen los pacientes sobre la medida en que su estado de salud impacta en su vida habitual y es el resultado de la interacción de múltiples factores, fisiológicos, psicológicos y sociales que interfieren en la vida diaria del individuo. Existen por tanto diversos aspectos que pueden influir en esta calidad de vida, entre los que figuran los síntomas, los trastornos emocionales, la limitación de la actividad física y la afectación de la esfera social de la vida del paciente (156).

Desde el punto de vista fisiopatológico, uno de los principales síntomas que influye en la calidad de vida percibida por el paciente es la disnea, siendo además el síntoma cardinal de la enfermedad y el que afecta a la gran mayoría de los pacientes, interfiriendo en su actividad diaria. La disnea limita las actividades que requieren esfuerzo físico, y cuando es intensa produce incapacidad.

Como ya hemos explicado, la disnea, la fatiga y la disminución de la capacidad de ejercicio son los síntomas principales de los pacientes con EPOC. Sin embargo, el modo en que la disnea y las limitaciones físicas, y por consiguiente de relación, afectan al paciente influyen también factores de orden psicológico como la personalidad, el estado emocional, la experiencia y las expectativas e incluso la presencia de ansiedad o depresión (157). En este sentido, es bien conocido que el paciente con EPOC puede mitigar el impacto negativo de la enfermedad si es capaz de afrontar los síntomas

habituales mediante estrategias adaptativas de tipo psicológico que le permitan ejercer un control o un dominio sobre los mismos (158).

Es importante, por tanto, conocer que en la EPOC, como en otras enfermedades crónicas limitantes, no basta con realizar pruebas de medición de variables fisiológicas, ya que éstas no proporcionan toda la información necesaria para conocer la situación real del paciente y su repercusión en su vida cotidiana y en su estado de salud. Por este motivo, en la valoración del paciente es necesario utilizar instrumentos apropiados y diseñados para este fin, como los cuestionarios de calidad de vida relacionada con la salud (156).

Existen cuestionarios de calidad de vida relacionada con la salud específicos para pacientes con enfermedades crónicas respiratorias, entre ellos los más conocidos y ampliamente utilizados en la práctica clínica habitual y en la investigación son el St. George's Respiratory Questionnaire (SGRQ) (159, 160) y Chronic Respiratory Disease Questionnaire (161). Mediante el uso de estos cuestionarios algunos estudios han demostrado que la disnea, la tos, las sibilancias, la ansiedad y la distancia recorrida en el 6MWT explicaban un 72% de la variancia de la puntuación total del cuestionario, mientras que el FEV₁ no se asoció de forma significativa (160). Los estudios en pacientes con EPOC han demostrado, en efecto, que su calidad de vida se correlaciona de forma débil o moderada con las pruebas de función pulmonar y, como cabría esperar por todo lo anteriormente mencionado, más consistentemente con la disnea y la limitación al esfuerzo (131,156).

El SGRQ es un cuestionario diseñado por Jones et al en 1992 para ser utilizado en enfermedades obstructivas de las vías aéreas, EPOC y asma (160) que está descrito en el anexo I. Su formato es autoadministrado y está constituido por 76 ítems, en 3

subescalas: síntomas, actividad (actividades que causan o están limitadas por disnea) e impactos (funcionamiento social y trastornos psicológicos causados por la enfermedad respiratoria). El paciente necesita 10-15 min para completarlo. La puntuación total, obtenida con la ayuda de un programa informático, varía entre un mínimo de 0 y un máximo de 100, de forma que las puntuaciones más altas indican peor calidad de vida. Dentro del proyecto IBERPOC (116) se han obtenido valores de referencia para este cuestionario en la población general española, lo que contribuirá, sin duda, a una mejor interpretación de los resultados de los estudios (162).

7. Afectación 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 que son consideradas como parte de la misma (12). Las principales manifestaciones sistémicas descritas hasta ahora son: afectación cardiovascular, síndrome anémico, osteoporosis, desnutrición, ansiedad, depresión y miopatía con disminución de la capacidad de realización de ejercicio (11).

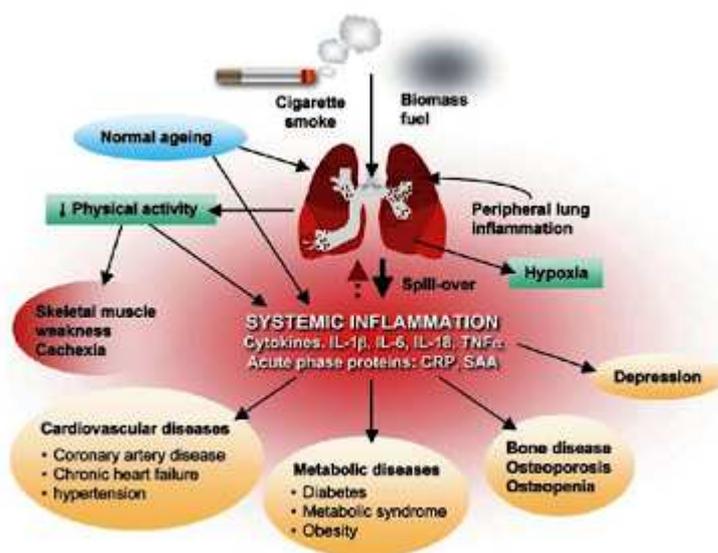


Figura 2. COPD; Lung inflammation leading to systemic inflammation. Boschetto *et al.* *Respirology* 2012.

La inflamación sistémica en la EPOC y las comorbilidades que presentan los pacientes es uno de los campos en el que se siguen originando abundantes estudios. En este aspecto se ha realizado recientemente un trabajo en nuestro país llevado a cabo en un área de Madrid (163) con una población de casi 200.000 personas atendidas por 129 médicos de familia se observó una prevalencia de EPOC diagnosticada de un 3,2% entre la población mayor de 40 años, con un 90% de los pacientes con comorbilidades asociadas a la EPOC y con una media de 4 enfermedades crónicas por paciente. Tras ajustar por edad y sexo, se observó una prevalencia mayor de la esperada de 10

enfermedades crónicas: insuficiencia cardíaca, enfermedad hepática crónica, asma, arteriosclerosis, osteoporosis, cardiopatía isquémica, ansiedad/depresión, arritmias y obesidad.

Afectación cardiovascular. Numerosos estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto que, en población no seleccionada por criterios de gravedad, una de las principales causas de morbi-mortalidad en la EPOC está constituida por las enfermedades cardiovasculares, sobretodo la cardiopatía isquémica, seguida del cáncer de pulmón y la neumonía (164, 165). Una de las hipótesis actualmente aceptadas es que la arterioesclerosis, que constituye el origen de las enfermedades cardiovasculares, es una enfermedad inflamatoria al igual que la EPOC. Sobre la base de que ambos procesos comparten un sustrato inflamatorio, se ha sugerido que la EPOC es un factor de riesgo importante para el desarrollo de la enfermedad cardiovascular (166,167). Esta teoría se ve apoyada por los resultados de estudios observacionales, en los que se ha visto que, independientemente de otros factores de riesgo, incluso leves reducciones del flujo aéreo se asocian con un mayor riesgo de cardiopatía isquémica, de accidentes cerebrovasculares y de muertes súbitas cardíacas. De hecho, se ha descrito que la presencia de una pobre función pulmonar es un factor predictivo de mortalidad general y de mortalidad por cardiopatía mejor que otros factores de riesgo más populares como el colesterol sérico. Además se ha demostrado que la asociación está presente para todo el espectro de enfermedades cardiovasculares, incluyendo enfermedad cerebrovascular, insuficiencia cardíaca congestiva y arritmias y están presentes incluso en los estadios tempranos de la enfermedad (168).

Síndrome anémico. La frecuencia de la anemia parece ser más elevada de lo esperado en los pacientes que padecen una EPOC. En algunos estudios se han detectado prevalencias que alcanzan un 33%, lo que contrasta con la idea habitual que relaciona la

EPOC con la poliglobulia secundaria (169,170). Entre los factores de riesgo que se asocian con el desarrollo de una anemia en estos pacientes se encuentran la edad avanzada, la gravedad de la obstrucción al flujo aéreo y la disminución del índice de masa corporal. La anemia es además de un trastorno frecuente en la EPOC, un índice de mal pronóstico y determina una morbimortalidad mayor en esta enfermedad (171).

Se ha descrito que la vías patogenéticas descritas para la EPOC podrían incidir igualmente en la aparición de una anemia al interferir en la eritropoyesis medular normal destacar la alteración en el metabolismo del hierro, la modificación del eje renina-angiotensina-aldosterona y la aparición de resistencias a la acción de la eritropoyetina sobre los eritroblastos medulares (172).

Alteraciones nutricionales. La pérdida de peso es un fenómeno sistémico muy frecuente que se ha descrito aproximadamente en un 50% de pacientes con EPOC grave e insuficiencia respiratoria crónica (173) y en el 10-15% de pacientes con EPOC ligera-moderada. Dentro de los diversos compartimentos de la anatomía, parece que la pérdida de masa muscular esquelética sería la causa principal de pérdida de peso en la EPOC (173), habiéndose relacionado con fenómenos de apoptosis (174) y proteólisis aumentada (175) en el músculo esquelético.

Las causas de una pérdida de peso pueden ser muy diversas, pero se pueden resumir en estas cuatro: disminución en la ingesta calórica, disminución en la tasa metabólica basal, alteración en el metabolismo intermedio y cambios en la composición corporal (176). El descenso en la ingesta calórica no parece ser muy importante, excepto durante los episodios de exacerbación de la EPOC. Por el contrario, la mayoría de pacientes con EPOC exhiben una tasa metabólica basal aumentada y, debido a que este

requisito metabólico aumentado no es corregido por un incremento paralelo en ingesta calórica, aparece pérdida de peso.

Son varios los mecanismos que podrían contribuir al aumento del metabolismo en la EPOC: 1) Los fármacos comúnmente usados en el tratamiento de la EPOC como los β_2 -agonistas. 2) La inflamación sistémica también podría jugar un papel significativo, como se muestra por la relación entre la alteración del metabolismo y el aumento de los mediadores de la inflamación en la EPOC. 3) La hipoxia tisular también puede contribuir (177), ya que en otras enfermedades caracterizadas por hipoxia tisular, como la insuficiencia cardiaca, también se muestra un índice metabólico elevado.

La pérdida de peso es un factor pronóstico importante en pacientes con EPOC, y su valor es independiente de otros factores pronóstico en la misma enfermedad. Incluso existen estudios que demuestran que el pronóstico de la EPOC mejora si el peso corporal se recupera con el tratamiento apropiado, a pesar (178) de la ausencia de cambios en la función pulmonar.

Afectación músculo esquelético. A pesar de que la disfunción del músculo esquelético es probablemente uno de los efectos sistémicos de la EPOC más estudiados, sus mecanismos son todavía poco comprendidos. Es importante señalar que la disfunción del músculo esquelético en la EPOC produce dos fenómenos distintos pero relacionados: 1) pérdida de masa muscular; y 2) disfunción o funcionamiento defectuoso de la musculatura esquelética. El funcionamiento defectuoso del músculo puede ser secundario a alteraciones intrínsecas (anormalidades mitocondriales y pérdida de proteínas contráctiles) del músculo o a alteraciones extrínsecas (hipoxia, hipercapnia y acidosis), en relación a las alteraciones del intercambio pulmonar de gases que caracteriza la EPOC.

Osteoporosis. La prevalencia de la osteoporosis está incrementada en pacientes con EPOC y puede ser debida a múltiples causas. Puede ser secundaria a las alteraciones nutricionales que presentan los sujetos, sedentarismo, tabaco, tratamiento con esteroides e inflamación sistémica, ya que, la mayor parte de ellos son considerados factores patogénicos potenciales de disfunción del músculo esquelético en la EPOC, de forma que podrían contribuir a la osteoporosis (179). Es interesante observar que el enfisema y la osteoporosis se caracterizan por pérdida de masa tisular, por lo que quizá las dos condiciones compartan mecanismos comunes para explicar la pérdida de masa tisular o la reparación defectuosa.

Depresión y ansiedad. Otro efecto sistémico potencial de la EPOC es la depresión. Es posible que sea simplemente una situación asociada a que la EPOC es una enfermedad debilitante aunque es igualmente plausible que forme parte de un efecto sistémico relacionado con la participación de marcadores inflamatorios, como el TNF- α y otras moléculas, como el óxido nítrico en la patogenia de la depresión.

Otras comorbilidades. Sin ánimo de ser exhaustivos en la descripción, otras comorbilidades relevantes en la EPOC la constituyen la diabetes y la asociación con el síndrome de apneas-hipopneas durante el sueño que merecen un estudio aparte por su complejidad.

8. Inflamación sistémica en la EPOC

Los pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica presentan con frecuencia otras enfermedades crónicas (comorbilidad) que contribuyen a empeorar su situación clínica y su pronóstico (12,180,181). Los mecanismos que subyacen esta observación son poco conocidos y, posiblemente, múltiples (11). Entre ellos se incluyen el sedentarismo, el tabaquismo, la hipoxia tisular y la inflamación sistémica, entre otros (11); esta última se considera uno de los más importantes.

Aunque la patogenia de las manifestaciones sistémicas de la enfermedad está aún poco clara, se ha demostrado que 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 extrapulmonares (182). 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 (183), sirviendo dicha inflamación mantenida como nexo de unión entre los efectos locales y sistémicos de la enfermedad.

En los últimos años han tomado mayor interés la determinación de marcadores séricos de la inflamación en un intento de conocer mejor la patogenia de la EPOC. 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 (184).

9. Reactantes de Fase Aguda en la inflamación sistémica

Los RFA constituyen un grupo heterogéneo de proteínas que se sintetizan en el hígado y cuya cantidad en la circulación aumenta rápidamente en respuesta a una infección, daño tisular, crecimiento neoplásico o desordenes inmunológicos (185). La función de estas moléculas está enmarcada dentro de la respuesta inflamatoria innata ejerciendo una serie de cambios neuroendocrinos (fiebre, anorexia, disminución de tiroxina, aumento de cortisol, etc), hematopoyéticos (anemia, leucocitosis, etc) y metabólicos (perdida de masa muscular, aumento de la lipólisis, etc) que dan lugar a la respuesta de fase aguda.

Estos RFA tienen una función biológica muy variada y se han descrito diversas clasificaciones según distintos aspectos. El incremento o disminución de las síntesis de estos RFA son fenómenos inducidos principalmente por citocinas liberadas desde el foco inflamatorio (186) entre las que destacan la interleucina-1, la interleucina-6 y el TNF- α principalmente (187). Toda esta respuesta inflamatoria no específica se desarrolla con la participación del hígado. La respuesta hepática de fase aguda se caracteriza por una alteración radical en el patrón biosintético de los hepatocitos. Durante una respuesta aguda los hepatocitos incrementan enormemente la síntesis de una serie de proteínas cuya concentración plasmática se eleva consecuentemente. Estas moléculas son los llamados reactantes positivos de fase aguda y entre ellos figuran la proteína C reactiva (PCR), el amiloide A sérico (AAS), la haptoglobina, el fibrinógeno, los factores del complemento, la ceruloplasmina, la glicoproteína ácida 1, la alfa-1-antitripsina y la alfa-1-antiquimiotripsina.

Al destinar el aparato biosintético a la producción de estos reactantes positivos, disminuye la síntesis de otras moléculas por parte de los hepatocitos, éstos constituyen

el grupo de los reactantes negativos de fase aguda, como son la albúmina, la prealbúmina, la transferrina, la apoproteína-A1 y la fibronectina (188).

Los RFA se pueden clasificar también en función de la magnitud del incremento de la concentración de la molécula en suero y de la velocidad de ascenso de las proteínas en respuesta al estímulo nocivo. Así vamos a poder encontrarnos 3 grandes grupos de RFA:

- RFA mayores también llamados proteínas con cinética de evolución rápida cuya concentración en suero aumenta de 100 a 1000 veces sobre el nivel basal y cuya elevación es medible a las 4-6 horas de la agresión tisular. Estos RFA tienen una vida media biológica breve (8-12 h) y, en ausencia de complicación, se produce un retorno a los valores basales en 3-4 días. Las dos moléculas de esta categoría son la PCR y el AAS.
- Proteínas cuya concentración aumenta 2-4 veces sobre el nivel basal y que pueden a su vez dividirse en función del patrón temporal de su elevación en plasma en:
 - a) Reactantes con cinética de evolución media (alfa 1-antitripsina y la alfa 1-antiquimiotripsina) cuya concentración aumenta a las 10 horas de la agresión y cuya vida media es de 2 días. Los valores de estas proteínas vuelven al nivel basal en 8-10 días.
 - b) Reactantes con cinética de evolución lenta (glicoproteína ácida alfa 1, fibrinógeno y haptoglobina) que alcanzan su máxima concentración sérica a los 3-4 días y retornan a

niveles basales en unos 10-15 días. Las proteínas de este grupo tienen una vida media de unos 3-6 días.

- Proteínas cuya concentración aumenta hasta un 50% sobre el nivel basal y que tienen cinética de evolución lenta. En este grupo se encuentra la ceruloplasmina y el factor del complemento C3.

Según la actividad biológica de las moléculas se pueden distinguir tres grupos (189):

- o Proteínas que intervienen en la defensa y adaptación del hospedador, entre las que figuran: la PCR, el AAS, factores del complemento y fibrinógeno.
- o Proteínas inhibitoras de las serinproteasas. Inhiben la acción de las enzimas liberadas por las células fagocíticas protegiendo la integridad de los tejidos del hospedador. Las principales son α 1-antitripsina y α 1-antiquimotripsina.
- o Proteínas transportadoras con actividad antioxidante, como la ceruloplasmina, la haptoglobina y la hemopexina.

a) La proteína C reactiva.

La PCR, identificada por primera vez en 1930, es una proteína muy estable constituida por 5 moléculas idénticas de subunidades de 23 kDa no glicosiladas organizadas como discos pentagonales simples por lo que se denomina pentraxina. Es una proteína no glicosilada de simetría cíclica cuyo nombre es debido a que es capaz de precipitar el polisacárido C de la cápsula del *Streptococcus pneumoniae*.

La concentración normal de la PCR en nuestro organismo es de 1 mg/ml y forma parte del grupo de los llamados RFA mayores. Podemos encontrar niveles elevados de

PCR en suero o plasma como respuesta no específica a infecciones (elevación más importante en las infecciones bacterianas), inflamación aguda no infecciosa como en la pancreatitis o la artritis reumatoide, en tumores sólidos, traumatismos, enfermedad cardiovascular, etc (190).

Una vez sintetizada, la PCR se une a las inmunoglobulinas G, las membranas de las células apoptóticas, a la cascada del complemento, a los marcadores de superficie CD64 y los CD16 y a las células endoteliales. Entre las funciones conocidas de la PCR en la respuesta inflamatoria aguda tenemos las siguientes:

- Se une a la cromatina liberada del tejido necrótico durante la inflamación, y promueve su depuración, probablemente para prevenir reacciones autoinmunes contra antígenos nucleares.
- Actúa como una opsonina para las bacterias, parásitos y complejos inmunes. Además la PCR se une al factor del complemento C1q y activa la vía clásica de dicho sistema, favoreciendo de este modo la fagocitosis y destrucción de microorganismos por parte de los macrófagos y los neutrófilos.
- Potencia la actividad de las células natural killer, favoreciendo de esta manera la inmunidad humoral. Las células natural killer son activadas por la IL-2, adquiriendo de este modo propiedades citotóxicas inespecíficas. Estos linfocitos, que constituyen aproximadamente el 15% de los linfocitos sanguíneos, una vez activados reconocen y destruyen determinadas células tumorales y células infectadas por virus. Además los NK activados liberan interferón gamma y otras citocinas como la IL-1 y el GM-CSF, que pueden tener especial

importancia en la regulación de la hematopoyesis y las respuestas inmunitarias.

- Tiene actividad como moduladora de la actividad plaquetaria.

b) El amiloide A sérico.

El AAS es una proteína que pertenece a la familia de la apolipoproteínas y forma parte de la estructura de las HDL (191). Aunque se ha descrito una síntesis extrahepática en células epiteliales y epitelios de órganos en contacto con el medio exterior como glándulas mamarias, tracto digestivo y vía aérea, generalmente es sintetizadas en su mayor parte por los hepatocitos. Sus valores basales en individuos sanos son muy bajos y pueden aumentar rápidamente a valores muy elevados en respuesta a la infección e inflamación comportándose como un RFA mayor. El aclaramiento plasmático del AAS es muy rápido, y por lo tanto, los niveles disminuyen rápidamente en cuanto el estímulo nocivo desaparece.

Estas características hacen que el AAS sea especialmente adecuado para la supervisión en tiempo real de la actividad inflamatoria, dando una buena indicación del estado actual de la enfermedad del individuo. En este sentido se le han atribuido algunas aplicaciones clínicas. Por ejemplo, las recaídas o exacerbación de la enfermedad inflamatoria así como tratamientos ineficientes irán acompañados de nuevos aumentos en los niveles séricos de AAS y por lo tanto mediciones repetidas ayudan a la supervisión del tratamiento y la recuperación del paciente (192). Otra característica importante del AAS es que sus niveles reflejan la intensidad de la inflamación y, por tanto, podrían dar una indicación del pronóstico del paciente (193). El AAS puede ayudar a diferenciar entre enfermedades infecciosas y no infecciosas ayudando a la

detección temprana de las primeras, permitiendo de este modo un inicio precoz del tratamiento y una mejoría el resultado final (194).

10. Origen de la inflamación sistémica.

El papel de los RFA mayores en la respuesta aguda está parcialmente estudiado y entre sus principales efectos figuran: acción inmunomoduladora (195), efectos sobre el genoma (196) y efectos sobre el metabolismo lipídico (197). Sin embargo su papel en la respuesta inflamatoria crónica está comenzando a estudiarse. En los últimos años se ha empezado a describir una relación entre la estimulación mantenida de estos RFA y diversas enfermedades crónicas.

En la EPOC el papel de la PCR se ha estudiado en una triple vertiente. Por un lado se relaciona con la repercusión sistémica de la enfermedad (198). En segundo lugar, parece aportar información como marcador pronóstico de la misma (184). Finalmente, podría ser de utilidad como marcador para distinguir una exacerbación infecciosa del resto (199). Por otro lado, el AAS también ha sido estudiado en relación con las agudizaciones de la EPOC y su situación en fase estable (194). No obstante, debido a su función fisiológica como componente de las lipoproteínas, tendría sentido pensar que pudiera jugar un papel importante como nexo de unión entre la EPOC y algunas de sus manifestaciones sistémicas, especialmente en relación a los eventos cardiovasculares.

Sin embargo, 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 (183). 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 (187), es posible que estos reactantes sean producidos localmente en el

aparato respiratorio, de manera análoga a como ocurre en otras enfermedades crónicas como la artritis reumatoide (200) o en la placa de ateroma (201, 202).

En lo que se refiere a la PCR y la formación de la placa de ateroma, se ha propuesto que la inflamación sistémica que se observa en pacientes con EPOC podría estar relacionada con la arterioesclerosis, base de las enfermedades vasculares (203,204). En este sentido la PCR no es un mero marcador inespecífico de inflamación, sino que representa un auténtico factor de riesgo cardiovascular directamente implicado en la inestabilización coronaria aterosclerótica, lo que se traduce en el desarrollo de eventos cardiovasculares agudos y en la presencia de una enfermedad coronaria rápidamente progresiva (205, 206,). De hecho, la PCR es un predictor de riesgo cardiovascular más importante que los valores de colesterol unido a proteínas de baja densidad (LDL-colesterol) y añade valor pronóstico al de la escala de Framingham (207,208,209). Además, per se, ejerce un efecto proinflamatorio y proaterogénico sobre las células endoteliales, aumentando la expresión de moléculas de adhesión y de moléculas quimiotácticas. También induce la secreción endotelial de IL-6 (210), y de endotelina (ET)-1, disminuye la expresión y biodisponibilidad de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y estimula la liberación de citocinas proinflamatorias como la IL-1b y el factor de necrosis tumoral (TNF)- α por los monocitos, lo que favorece la opsonización del colesterol-LDL por los macrófagos.

Los efectos proaterogénicos de la PCR no quedan limitados a la afectación endotelial, ya que también aumenta la proliferación y migración de las células musculares lisas a través del aumento de expresión del receptor de la angiotensina tipo 1, aumenta la producción de radicales libres de oxígeno y potencia la activación endotelial y monocítica en respuesta al lipopolisacárido de la pared de bacterias gram negativas (211).

Estas acciones de la PCR, que han generado gran interés en el ámbito de la cardiología, podrían ser relevantes en pacientes con EPOC, ya que estos pacientes, a diferencia de lo que sucede en fumadores sin obstrucción al flujo aéreo, presentan cifras elevadas en sangre, con valores por encima de 3 mg/L (182,212,213) niveles que se consideran de alto riesgo para desarrollar enfermedad cardiovascular (214). Algunos estudios además han descrito que en pacientes con EPOC, incluso en aquellos con obstrucción leve, el riesgo de lesión cardíaca se duplica cuando, adicionalmente, existe un incremento de PCR (215). Además existe un análisis longitudinal del Lung Health Study (216), en el que se demostró que los niveles séricos de PCR permitieron predecir, en pacientes con EPOC leve-moderada, el riesgo de muerte por cualquier causa, de eventos cardiovasculares y de muertes por cáncer, aportando información complementaria a la que proporciona la historia de tabaquismo, el FEV₁ y otros factores de riesgo tradicionales

Es por este motivo que el estudio del origen de la inflamación sistémica en la EPOC es un área de investigación que ha tomado mayor relevancia actualmente. Como parte de nuestra línea de investigación, en la presente Tesis Doctoral hemos querido estudiar la síntesis de RFA mayores en el tejido pulmonar de pacientes con EPOC (217).

Objetivos

II. Objetivos.

HIPOTESIS.

El tejido pulmonar es capaz de sintetizar reactantes de fase aguda en sujetos fumadores sanos y en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, con una síntesis más intensa en los segundos.

OBJETIVO PRINCIPAL

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la síntesis de moléculas reactantes de fase aguda mayores en el tejido bronquial y el parénquima pulmonar de pacientes con EPOC y compararlo con sujetos fumadores sin EPOC.

OBJETIVOS CONCRETOS

1. Estudiar la expresión tisular de ARN mensajero de RFA mayores en parénquima pulmonar en comparación con la producción del tejido bronquial en pacientes con y sin EPOC
2. Determinación de RFA en monocitos de sangre periférica. Comparación de dicha expresión entre pacientes con EPOC y controles.
3. Determinar la concentración de RFA en sangre periférica de pacientes con EPOC en comparación con controles sin la enfermedad.
4. Estudiar la relación entre la expresión tisular y la concentración sérica de las proteínas

Maerial y Método

III. Material y Método.

Se llevó a cabo un estudio observacional analítico de caso-control, en el que se comparó la expresión de PCR y AAS en muestras quirúrgicas de tejido pulmonar y bronquial de pacientes fumadores con EPOC en fase estable frente a pacientes fumadores sin EPOC.

Todos los sujetos incluidos en el estudio eran pacientes que se encontraban en lista de espera para cirugía de resección pulmonar (lobectomía o neumonectomía) por una neoplasia e ingresaron de forma programada en la planta de hospitalización para la realización de la técnica quirúrgica prevista desde el 12 de Febrero de 2008 hasta el 23 de Abril de 2014.

El diagnóstico de EPOC se realizó en función de la normativa internacional GOLD 2009 y la normativa nacional SEPAR 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 FEV₁/FVC menor de 0,7, realizada en fase estable y que no fuera completamente reversible tras el test broncodilatador.

Para su inclusión en el estudio los sujetos debían cumplir los siguientes criterios:

- Aceptación a participar en el estudio
- Ser mayores de 40 años
- Estabilidad clínica en los 2 meses previos a la intervención, valorando para ello la asistencia a servicios de urgencia por causa respiratoria.
- 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.

Se excluyeron aquellos pacientes que padecieran alguna enfermedad concomitante crónica o inflamatoria que pudiera estar asociada a una alteración de la expresión de RFA, como son la inmunosupresión, la aparición de algún evento isquémico agudo de cualquier naturaleza en los seis meses previos, disponer de ventilación mecánica domiciliaria, insuficiencia cardíaca congestiva, padecer insuficiencia renal terminal, cirrosis hepática o artritis reumatoide entre otras.

Protocolo

La obtención de los datos clínicos y las muestras biológicas se realizó en una entrevista llevada a cabo el día del ingreso para la cirugía. En esta visita se informó al paciente de la naturaleza del estudio y se solicitó el consentimiento informado para su inclusión en el mismo.

Posteriormente, se realizó una evaluación clínica del sujeto, recogiendo de cada uno de ellos edad, sexo, hábito tabáquico recogido en paquetes-año, estabilidad clínica actual y en los meses previos, el grado disnea, las comorbilidades, el tratamiento médico habitual recogido en principio activo y dosis habitual. La dosis de corticoides inhalados se expresó en $\mu\text{g}/\text{día}$ de fluticasona o equivalente.

Además se procedió a la estadificación según el sistema vigente TNM (218) que se muestra en la tabla a continuación.

<http://www.nc>

Descriptor T (tumor primario)

TX No se puede valorar el tumor primario, o hay tumor demostrado por la presencia de células malignas en el esputo o especímenes bronquiales, pero no visible en las técnicas de imagen o broncoscopia

T0 Sin evidencia de tumor primario

Tis Carcinoma *in situ*

T1 Tumor de ≤ 3 cm de diámetro mayor, rodeado de pulmón o pleura visceral y sin evidencia broncoscópica de invasión más proximal que el bronquio lobar. T1a ≤ 2 cm; T1b > 2 cm

T2 Tumor con cualquiera de los siguientes datos en relación al tamaño o a la extensión:

- Más de 3 cm de diámetro mayor
- Afecta el bronquio principal a 2 cm o más de la carina principal
- Invade la pleura visceral
- Asociado con atelectasia o neumonitis obstructiva que se extiende a la región hilar, pero no afecta a un pulmón entero
- T2a > 3 cm y < 5 cm; T2b > 5 cm y < 7 cm; T2c > 7 cm, reasignado como T3

T3 Tumor de cualquier tamaño, que invade directamente cualquiera de las siguientes estructuras: pared torácica (incluye tumores del vértice pulmonar), diafragma, pleura mediastínica o pericardio parietal; o tumor en el bronquio principal a menos de 2 cm de la carina principal, pero sin afectación de la misma; o atelectasia o neumonitis obstructiva asociada del pulmón entero

T4 Tumor de cualquier tamaño, que invade cualquiera de las siguientes estructuras: mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, esófago, cuerpo vertebral, carina; nódulo/s tumoral/es satélites del original, en el mismo lóbulo (reasignado como T3); tumor con derrame pleural maligno

Descriptor N (ganglios linfáticos regionales)

NX No se pueden valorar los ganglios regionales

N0 Sin metástasis ganglionares regionales

N1 Metástasis en los ganglios peribronquiales y/o hilares ipsilaterales, incluyendo la extensión directa

N2 Metástasis en los ganglios mediastínicos ipsilaterales y/o subcarinales

N3 Metástasis en los ganglios mediastínicos contralaterales, hilares contralaterales, escalénicos o supradaviculares (ipsi- o contralaterales)

Descriptor M (metástasis a distancia)

MX No se puede valorar la presencia de metástasis a distancia

M0 Sin evidencia de metástasis a distancia

M1 Metástasis a distancia que incluye nódulo/s tumoral/es en otro lóbulo, ipsilateral (reasignado como T4) o contralateral; afectación pleural. M2 metástasis a distancia

Clasificación por estadios

	T	N	M
Oculto	Tx	N0	M0
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio IA	T1	N0	M0
Estadio IB	T2	N0	M0
Estadio IIA	T1	N1	M0
Estadio IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Estadio IIIA	T1-3	N2	M0
	T3	N1	M0
Estadio IIIB	T4	N0-3	M0
	T1-3	N3	M0
Estadio IV	T1-4	N0-3	M1

Figura 3. Clasificación TNM7 cáncer de pulmón.

Una vez realizada la evaluación clínica se recogieron los resultados de las pruebas de función pulmonar correspondientes al estudio preoperatorio, saturación y, en caso de que ésta fuera menor del 92% respirando aire ambiente se les extrajo GSA.

Del estudio preoperatorio además se recogieron datos del cultivo de la muestra de aspirado bronquial obtenido en la broncoscopia diagnóstica, además se procedió a recoger una muestra para cultivo de la zona a resear obtenida durante el procedimiento quirúrgico.

Finalmente, de todos los sujetos y previamente a la intervención quirúrgica, se realizó analítica para la determinación de RFA mayores en suero. Además se procedió a la extracción de un tubo Vacutainer® CPT™ que fue recogido en fresco por los técnicos para el estudio de la expresión de RFA en monocitos de sangre periférica en el laboratorio.

Extracción de muestra quirúrgica

El día de la intervención se recogió la medicación previa y el consumo de tabaco si se produjera. Durante la intervención, se recogió el tiempo transcurrido desde el inicio de la misma (apertura de plano cutáneo) hasta la obtención de la pieza quirúrgica.

Una vez extraída la pieza quirúrgica, se procedió a seleccionar una porción de parénquima pulmonar macroscópicamente normal de aproximadamente 0,5 cm² de superficie y 0,5 cm de espesor y que estuviera lo más alejada posible de la lesión que había motivado la intervención.

Posteriormente se extrajo una sección de bronquio subsegmentario de 0,5 cm de grosor, en este caso también lo más alejada posible de la lesión y lo más separada del plano de resección quirúrgica.

La separación de ambas muestras de la pieza quirúrgica se realizó en el mismo quirófano en una mesita auxiliar y estéril. Tras obtener las muestras el resto de la pieza anatómica siguió el tratamiento habitual según protocolo del hospital acorde al caso clínico del paciente.

Aspectos éticos.

El estudio contó 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 se obtuvo consentimiento informado por escrito de cada participante previo a la inclusión en el estudio.

Todos los datos fueron recogidos en un cuaderno de recogida de datos (CRD) individual para cada sujeto y archivado posteriormente por el investigador principal (ver anexo II). En los CRD no se recogía ningún dato que pudiera identificar a los sujetos de estudio, cumpliendo con la ley de protección de datos de la Ley Orgánica 15/1999, de protección de datos de carácter personal. Las muestras biológicas eran codificadas y este código constituía su relación con su CRD.

Métodos de Medición.

Cuestionarios:

El grado de disnea se evaluó mediante la escala modificada de la Medical Research Council (mMRC). En dicha escala se evalúa el grado de disnea asignándole un valor numérico en función de la intensidad de la actividad que la desencadena. La puntuación varía según una escala de entre 0 y 4, donde 4 representa el máximo grado de disnea (219):

0	Ausencia de disnea excepto al realizar ejercicio intenso.
1	Disnea al andar deprisa o al subir una cuesta poco pronunciada
2	Incapacidad de mantener el paso de otras personas de la misma edad, caminando en llano, debido a la dificultad respiratoria, o tener que parar a descansar al andar en llano al propio paso
3	Tener que parar a descansar al andar unos 100 m o a los pocos minutos de andar en llano.
4	Impide al paciente salir de casa o aparece con actividades como vestirse o desvestirse

El cálculo del consumo acumulado en paq-año se obtuvo calculando el cociente entre el número de cigarrillos al día entre 20 y multiplicando el resultado por el número de años fumando esa cantidad.

La comorbilidad asociada del sujeto se valoró empleando el índice de comorbilidad de Charlson (220). Se trata de un índice sencillo y fácil de aplicar que recoge una serie de factores de comorbilidad, permitiendo calcular la probabilidad de supervivencia a los 10 años según una combinación entre edad y dichos factores. Es un cuestionario validado empleado en trabajos previos con pacientes con EPOC (221) (ver anexo III).

Valoración de la gravedad de la EPOC.

Se realizó la clasificación de los pacientes en función de la gravedad siguiendo los estadios de la guía GOLD (12).

Estadios de la EPOC	Valor del FEV1 (FEV1/FVC <70%)
GOLD 1: leve	VEF1 de al menos el 80% del valor predicho Puede tener síntomas
GOLD 2: moderado	VEF1 50%-80% del valor predicho Puede tener síntomas crónicos
GOLD 3: grave	VEF1 30% - 50% del valor predicho Puede tener síntomas crónicos
GOLD 4: muy grave	VEF1 < 30% del valor predicho VEF1 < 50% del valor predicho con OCD o insuficiencia respiratoria.

Pruebas de función respiratoria. Todos los sujetos incluidos en el estudio tenían espirometría forzada basal y con test de broncodilatación a los 15 minutos. Para el test broncodilatador se emplearon 500 µgr 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 técnica se realizó según las recomendaciones de la Sociedad Española de Neumología (SEPAR; 222) usando un espirómetro de tipo neumotacógrafo Masterlab (Erich Jaeger GHBH, Würzburg, Alemania).

Determinaciones de laboratorio.

Recogida de plasma.

A los pacientes incluidos en el estudio se les extraía sangre periférica obtenida por punción de vena superficial del antebrazo en un tubo de EDTA (Vacutainer, BD). Las muestras eran procesadas inmediatamente tras su obtención en el laboratorio de Enfermedades Respiratorias del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS). La sangre se centrifugó a 1.620g durante 15 minutos a 4°C; se hicieron alícuotas de plasma que fueron guardadas en el -80°C hasta su posterior estudio.

Determinación de la concentración de RFA en suero

La determinación de los RFA se realizó en sangre periférica obtenida por punción de una vena superficial del antebrazo. La muestra se procesaba inmediatamente tras su extracción, extrayendo el sobrenadante mediante centrifugación y procesándolo en el laboratorio de nuestro centro según las instrucciones del fabricante de cada kit. Los RFA evaluados fueron PCR ultrasensible y el SAA midiendo los distintos subtipos del mismo. Los RFA se midieron mediante técnica ultrasensible de nefelometría (Dade Behring, Mabrug, Alemania).

Recogida de tejido.

Las muestras de tejido fueron extraídas en el quirófano de Cirujía Torácica del Hospital Universitario Virgen del Rocío y fueron procesadas en el laboratorio de Enfermedades Respiratorias del IBIS. A cada paciente se le extrajo una porción de parénquima pulmonar y bronquio subsegmentario macroscópicamente normal y que estuvieran lo más alejados de la lesión que había motivado la intervención.

En el laboratorio, el tejido era inmediatamente congelado en nitrógeno líquido y guardado a -80°C hasta su posterior determinación.

Determinación de reactantes de fase aguda en plasma.

Los marcadores de reactantes de fase aguda que hemos analizado son: PCR y AAS. Las determinaciones se realizaron mediante ELISA (Quantikine R&D Systems Minneapolis, MN para PCR y ANOGEN, Ontario, Canada para SAA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El test de ELISA es una técnica de inmunoensayo en la cual las muestras se añaden a una placa de 96 pocillos tapizados con anticuerpos monoclonales específicos (IL-8 ó TNF- α en este caso), después se eliminan las proteínas no unidas mediante un lavado y se les añade un anticuerpo policlonal que se une al primario. Las placas se vuelven a lavar y se les añade una solución sustrato que es la que les da color. Los niveles de PCR y SAA se determinan por absorbancia de las muestras usando un espectrofotómetro (Tecan Spectra). La absorbancia obtenida en cada una de las muestras se extrapola a una curva de concentración estándar mediante una regresión lineal.

Aislamiento de células mononucleares (CMN) de sangre periférica y separación de monocitos.

La obtención de los monocitos de los pacientes y controles para la determinación de RFA se realizó a partir de la sangre extraída en tubos Vacutainer® CPT™, con heparina de sodio como anticoagulante. Los tubos incluyen un gradiente de Ficoll-Hypaque y un gel separador para el aislamiento de las CMN en un solo paso, mediante centrifugación de los tubos a 1.620 g durante 20 minutos a 20°C . La fase que contenía la fracción de las células mononucleares fue recogida y diluída en PBS hasta un volumen final de 50 ml. La concentración celular se determinó por tinción de Trypan Blue en una

cámara de recuento (Neuabuer). Las células fueron recuperadas por centrifugación (1.620 g durante 20 minutos a 4°C).

La separación de los monocitos (CD14⁺) se realizó mediante técnicas inmunomagnéticas (Dynabeads, Dynal, Biotech ASA, Oslo, Noruega). Para ello se utilizaron anticuerpos monoclonales específicos frente a antígenos de superficie unidos a esferas magnéticas, CD14. A las células mononucleares procedentes del paciente se les añadió esferas magnéticas marcadas con anticuerpos monoclonales frente a antígenos específicos CD14⁺, tras incubación durante 20 minutos bajo un suave y constante movimiento a 4°C, las células se transfieren a un imán. De esta manera, se obtuvo por un lado las células CD14⁺. Las células CD14⁺ se congelaron en RNA later (QIAgen) a -80°C hasta su posterior determinación.

Extracción de ARN.

De los monocitos aislados mediante técnica inmunomagnética se obtuvo ARN total mediante el kit comercial High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Alemania) siguiendo el protocolo del fabricante. Las muestras obtenidas se guardaron a -80°C hasta su utilización.

A las muestras de tejido se les extrajo el ARN mediante el método de Trizol-Cloroformo (Bioline, Reino Unido). Posteriormente se les hizo un tratamiento con DNAsa (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) según las instrucciones del fabricante.

La concentración de ARN de cada muestra se determinó midiendo la densidad óptica mediante un espectofotómetro (nanodrop, ND-100 Wilmington, DE, USA) y la calidad de las mismas se comprobó mediante la razón entre las densidades ópticas a 260 y 280nm, siendo ésta de 2.0.

Obtención de ADN complementario (ADNc).

El ADNc fue sintetizado a partir de 1µg de ARN total mediante la retrotranscriptasa iScript cDNA synthesis (BioRad, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción se mantuvo a 25°C durante 5 minutos, seguido por 42°C durante 30 minutos y 85°C durante 5 minutos para inactivar a la enzima.

PCR a tiempo real (RT-PCR).

Todas las reacciones de PCR se hicieron en el termociclador MX3500 Stratagene. Cada reacción contenía 1x PCR buffer (Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix, Stratagene Cedar Creek, TX, USA), 12.5 ng de ADNc y 10µM de cada pareja de cebadores (SAA1, SAA2, SAA4, PCR y ARN 18s, éste último se usó como gen constitutivo (Tabla 1)

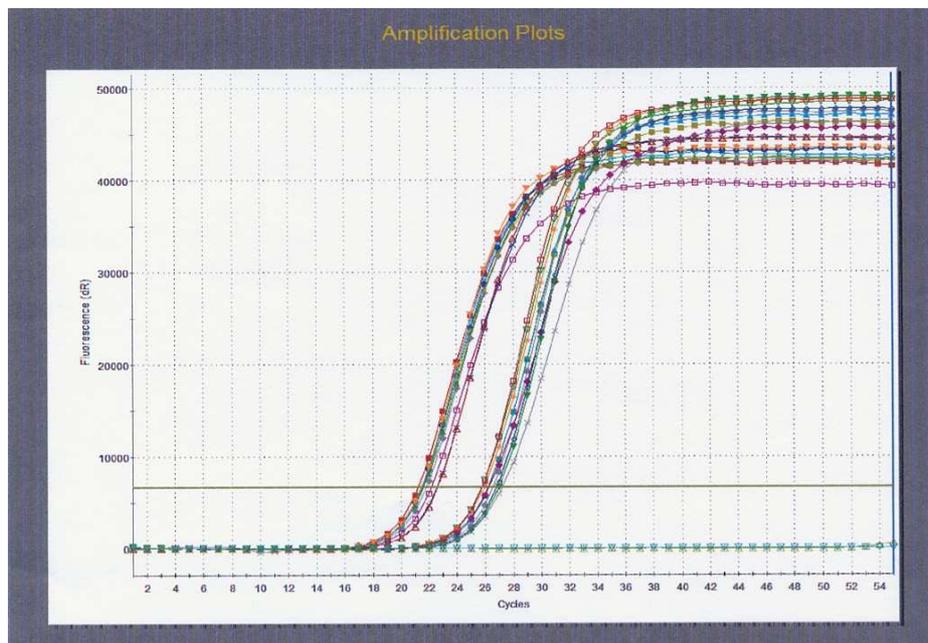
El principio de la PCR a tiempo real consiste en que la sonda SYBR Green se intercala en los fragmentos de ADN de cadena doble, una vez que se ha unido esta sonda al ácido nucleico, ésta emite una señal fluorescente que se detecta a tiempo real en cada ciclo las fases de amplificación de la PCR. La cantidad de ADN amplificado es directamente proporcional a la cantidad de fluorescencia emitida.

La PCR se inicia con una desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 94°C durante 30 segundos para desnaturalizar el ADNc, 60°C durante 30 segundos para la unión de los cebadores al ADNc, 72°C durante 30 segundos para la extensión. Los resultados se analizan mediante el método de $2^{-\Delta Ct}$, que compara la expresión IL-8 tras la aplicación del agente sinfisante con su control (228) y normaliza con la expresión del gen constitutivo (ARN 18S). Definimos Ct como el número de ciclos requerido para que la señal fluorescente alcance el umbral de detección.

Tabla 1. Secuencia genotipada, sentido y antisentido, en cada uno de los genes estudiados.

	Sentido	Antisentido
18s	TGAAATATCCAGAACATCTTA	GCAAAATTTATTGTCCCATCAT
CRP	GTGTTTCCCAAAGAGTCGGATA	CCACGGGTCGAGGACAGTT
SAA1	ATCAGCGATGCCAGAGAGAAT	GTGATTGGGGTCTTTGCCA
SAA2	AGCCAATTACATCGGCTCAG	ATTTATTGGCAGCCTGATCG
SAA4	GTCCAACGAGAAAGCTGAGG	AGTGACCCTGTGTCCCTGTC

Figura 4. Ejemplo de amplificación por técnica cuantitativa de PCR. Muestra de AAS-1



Analisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico Statistical Package for Social Sciences (SPSS) versión 18.0 (IBM Corporation, Armonk, Nueva York, EE.UU.). Para describir las variables cualitativas se emplearon las frecuencias absolutas y relativas. Las variables cuantitativas se describieron mediante la media y la desviación estándar.

Los estudios inferenciales se realizaron con test no paramétricos. Para el estudio de las variables cualitativas se empleó el test de la χ^2 o el test exacto de Fisher según procediera. El estudio de las variables cuantitativas como la expresión de RNA se realizó con el test de Mann-Whitney en caso de las comparaciones entre EPOC y no EPOC.

Las comparaciones entre la expresión de bronquio y parénquima se realizó con el test de Wilcoxon. Igualmente se realizó con el test de Wilcoxon las comparaciones entre la expresión de producción tisular de reactantes de fase aguda entre pacientes con y sin EPOC. Los estudios de correlación se realizaron calculando el coeficiente de correlación de Spearman. El nivel de significación se estableció en 0,05.

Resultados

IV. Resultados

Descripción de la muestra

La muestra se compuso de 315 sujetos, de los cuales 144 (45,7%) cumplían los criterios diagnósticos de EPOC. Las características de los pacientes incluidos están resumidas en la Tabla 2. La mayoría de los pacientes incluidos en el estudio fueron varones, tanto en el grupo de casos (135 varones 93.7%) como en el grupo control (126 varones 74.7%).

La mayoría de los pacientes en ambos grupos eran exfumadores, a excepción de 46 fumadores activos en los controles (26.9%) y 37 fumadores activos en el grupo de los casos (25.7%). Ningún paciente fumó durante el ingreso para la intervención. Además se incluyeron 27 sujetos que nunca habían fumado regularmente. Hubo una diferencia estadísticamente significativa entre el consumo acumulado en paquetes-año de los casos comparado con los controles, siendo 64.5 en los casos frente a 42.9 en los controles.

En cuanto a las comorbilidades los pacientes con EPOC demostraron tener un índice de Charlson mayor, alcanzando además la diferencia la significación estadística.

La muestra de pacientes con EPOC estaba compuesta por 40 (27,8%) pacientes en estadio GOLD I, 87 (60,4%) en estadio GOLD II y 16 (11,1%) pacientes en estadio GOLD III y 1 (0,7%) en estadio GOLD IV. La mayoría de los pacientes (87,9%) presentaban un grado de disnea basal entre 0 y 1. En relación con el tratamiento 32 (22,2%) pacientes estaban recibiendo tratamiento con corticoides inhalados, 38 (26,4%) pacientes estaban en tratamiento con β_2 -agonistas de acción prolongada y 51 (35,4%) pacientes con tiotropio.

La cirugía de resección pulmonar se realizó en 295 pacientes (93,6%) por neoplasia de pulmón y en el resto por entidades benignas (20 pacientes, 16 en los controles y 4 de los casos). Las intervenciones fueron 39 (12.38 %) neumectomías, 253 (80.32 %) lobectomías y 23 (7.30 %) resecciones atípicas. En 191 (60.63 %) casos la intervención se realizó en el lado derecho, mientras que 124 (39.36 %) casos la cirugía fue de lado izquierdo.

Los datos en relación con los distintos tipos de cirugía así como la estirpe de la neoplasia están recogidas en la Tabla 3, donde podemos comprobar que la mayoría de las neoplasias eran primarias de pulmón no células pequeñas, siendo ligeramente más frecuente en nuestra cohorte el adenocarcinoma.

Obtuvimos el cultivo previo en la mayoría de los pacientes (76%), siendo dicho cultivo positivo en una parte muy poco relevante de la muestra (9 controles y 6 casos). Los aislamientos en los cultivos que aparecen en más de un caso fueron principalmente *Streptococcus pneumoniae* (3 casos), *Staphylococcus aureus* (3 casos), *Pseudomonas aeruginosa* (2 casos), *Haemophilus influenzae* (2 casos), *Enterobacter cloacae* (2 casos).

Tabla 2. Descripción de la muestra de pacientes casos y controles estudiados.

	Controles n=171	Casos n=144	Valor p*
Sexo femenino (n)	45 (26,3)	9 (6,3)	< 0,001
Edad (años)	62,6 (12,9)	67,1 (8,1)	< 0,001
Fumador activo (n)	46 (26,9)	37 (25,7)	NS
Historia tabaco (paq-año)	42,9 (53,0)	64,5 (35,2)	< 0,001
Comorbilidades (Charlson)	2,8 (1,8)	3,6 (1,1)	< 0,001
Cardiovasculares (n)	31 (18,1)	28 (19,4)	NS
Índice de masa corporal (kg/m ²)	27,8 (4,5)	27,5 (5,1)	NS

Datos expresados en media (desviación estándar) o en frecuencias absolutas (relativas), según la naturaleza de las variables. NS: no significativo.

* Calculado mediante test de la t de Student para datos independientes o mediante test de la Chi-cuadrado según la naturaleza de la variable

Tabla 3. Descripción de la cirugía practicada a los sujetos incluidos.

	Controles n=171	Casos n=144	Valor p*
Tipo de cirugía:			
Neumectomía	17 (9,9)	22 (15,3)	NS
Lobectomía	141 (82,5)	112 (77,8)	NS
Atípica	13 (7,6)	10 (6,9)	NS
Lado			
Derecha	101 (59,1)	90 (62,5)	NS
Izquierda	70 (40,9)	54 (37,5)	NS
Histología:			
No neoplasias	16 (9,4)	4 (2,8)	0,017
Epidermoide	51 (29,8)	60 (41,7)	0,028
Adenocarcinoma	62 (63,3)	58 (40,3)	NS
Células grandes	3 (1,8)	7 (4,9)	NS
Células pequeñas	1 (0,6)	1 (0,7)	NS
Tumores benignos	13 (7,6)	3 (2,1)	0,026
Metástasis	13 (7,6)	4 (2,8)	NS
Otras neoplasias	12 (7,0)	7 (4,9)	NS
Cultivo disponible (n)	127 (74,3)	121 (84,0)	0,035
Cultivo positivo (n)	9 (5,3)	6 (4,2)	NS

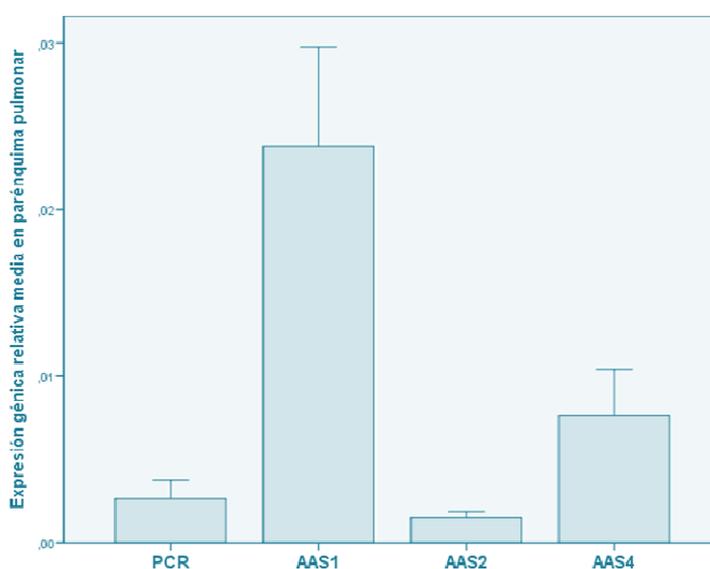
Expresión de tisular de RFA mayores.

Al analizar la expresión de RNA mensajero de PCR y SAA en tejido bronquial y parénquima pulmonar, observamos que ambos tejidos sintetizan dichas moléculas.

Expresión de RFA en parénquima

La expresión en el parénquima se obtuvo en 283 casos (152 entre los controles y 131 entre los pacientes con EPOC, $p= 0.542$). La expresión génica de la cohorte se representa en la tabla 1. El AAS1 era el gen que más ARN expresaba.

Figura 1. Expresión génica de los genes en estudio en toda la cohorte a nivel de parénquima pulmonar.



Al comparar los casos EPOC con los controles (figuras 2-4), los pacientes con EPOC presentaban mayor expresión tisular que los controles. Estas diferencias eran especialmente patentes para el AAS1 y AAS2 que alcanzaron la significación estadística.

Figura 2. Expresión relativa de PCR en parénquima pulmonar entre EPOC y controles.

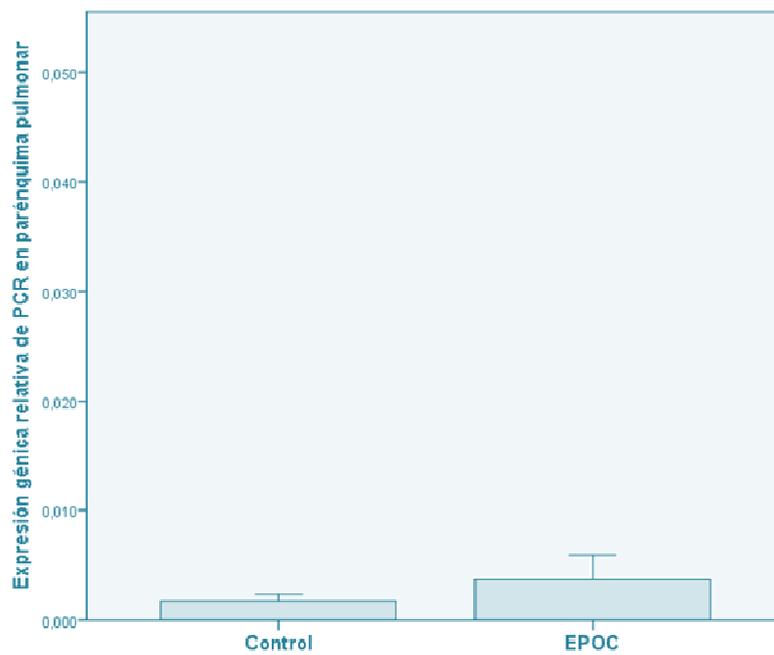


Figura 3. Expresión relativa de AAS1 en parénquima pulmonar entre EPOC y controles.

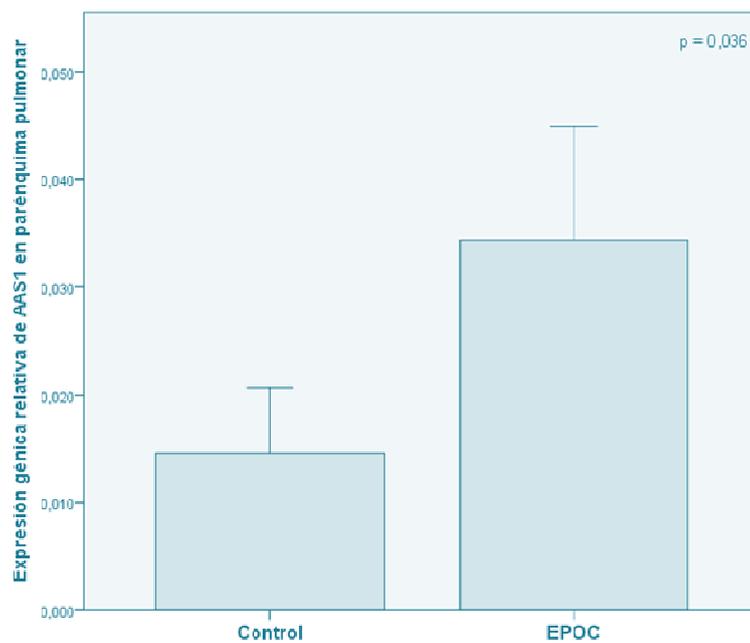
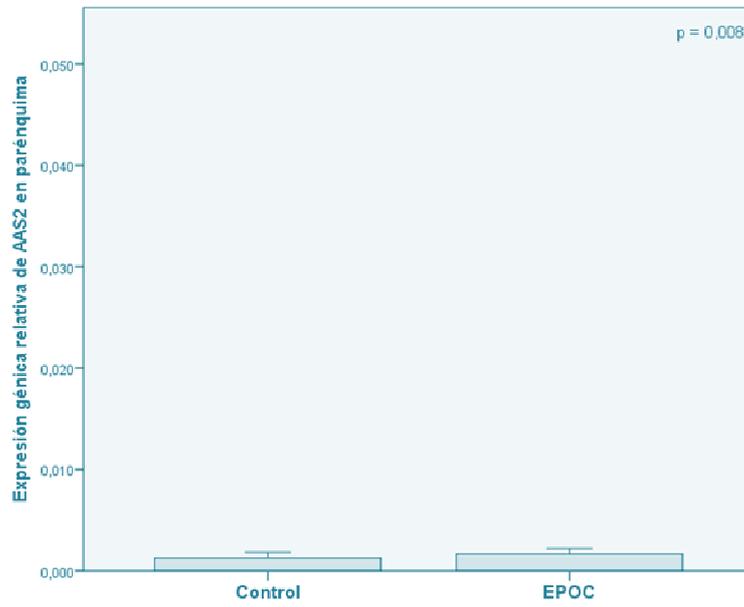


Figura 4. Expresión relativa de AAS2 en parénquima pulmonar entre EPOC y controles.



Expresión de RFA en sección bronquial

La expresión de bronquio se obtuvo en 107 sujetos (52 entre los controles y 55 entre los pacientes con EPOC, $p = 0,146$). La expresión génica de la cohorte está representada en a la figura 6. El AAS1 era el gen que más RNAm expresaba. Al comparar los casos EPOC con los controles (figuras 7 – 10) los pacientes con EPOC presentaban una mayor expresión tisular que los controles. Estas diferencias eran especialmente patentes para AAS1 y AAS2 que alcanzaron la significación estadística.

Figura 5. Expresión génica de los genes en estudio en toda la cohorte a nivel de tejido bronquial.

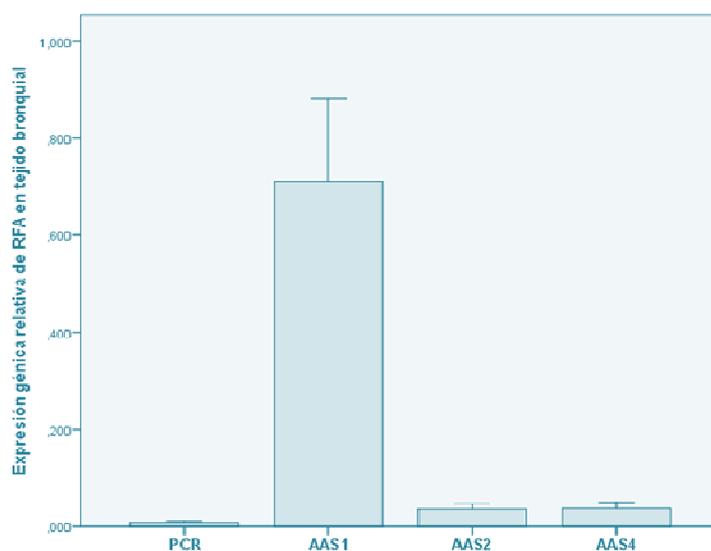


Figura 6. Expresión relativa de PCR en tejido bronquial entre EPOC y controles.

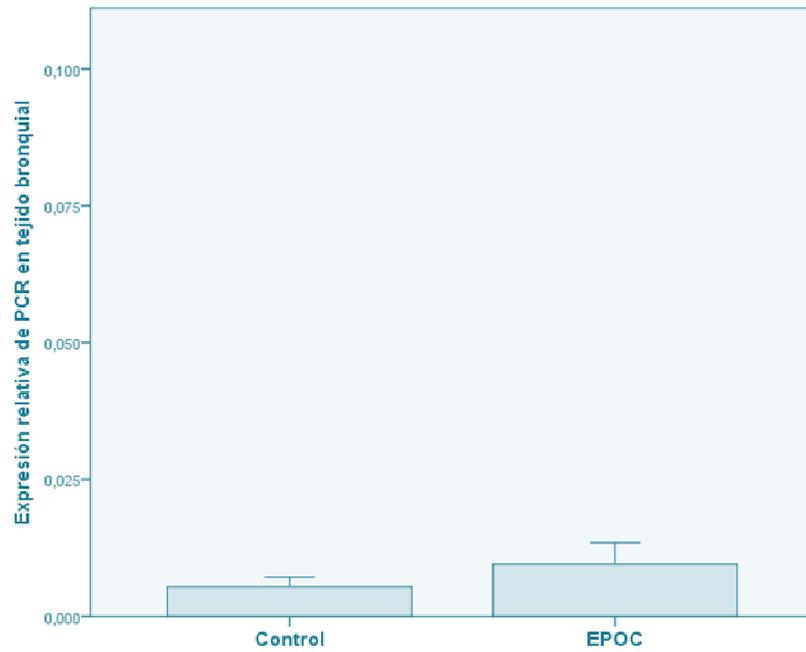


Figura 7. Expresión relativa de AAS1 en tejido bronquial entre EPOC y controles.

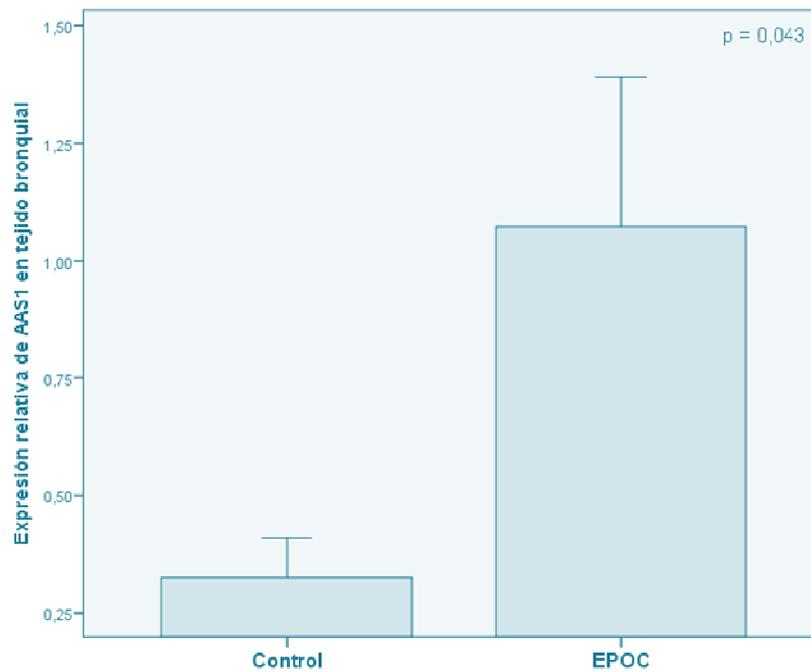


Figura 8. Expresión relativa de AAS2 en tejido bronquial entre EPOC y controles.

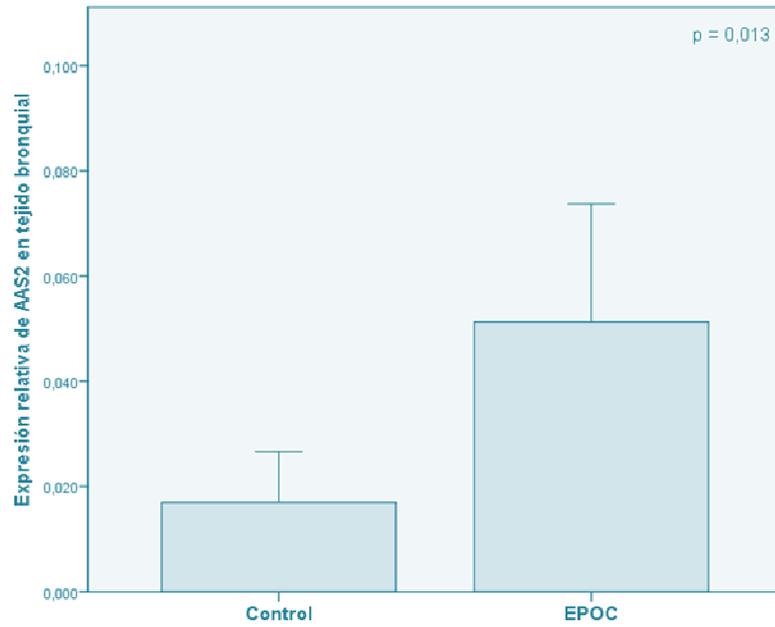
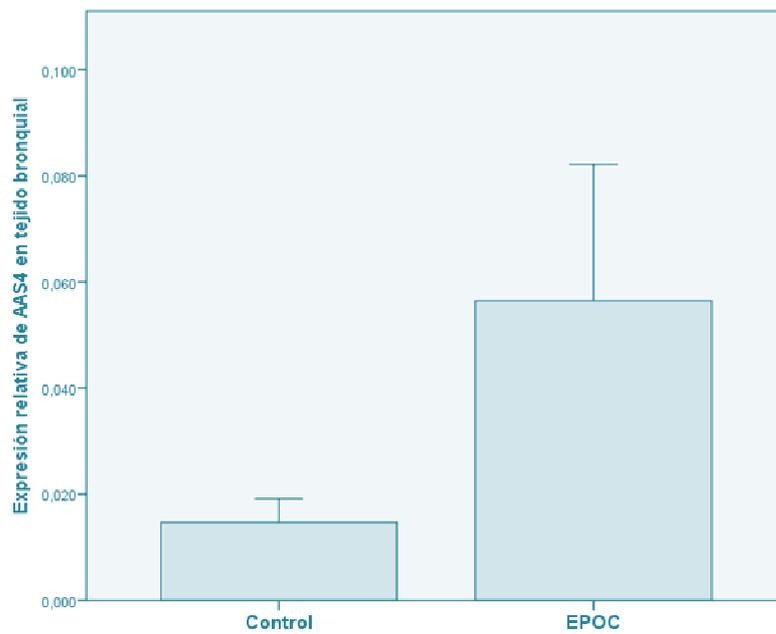


Figura 9. Expresión relativa de AAS4 en tejido bronquial entre EPOC y controles.



Expresión de RFA en monocitos de sangre

La expresión en monocitos de sangre periférica se obtuvo en 53 casos (29 entre los controles y 24 entre los pacientes con EPOC; $p = 0,945$). La expresión génica de la cohorte está representada en a la figura 11. El AAS1 y PCR eran los genes que más RNAm expresaba. En este caso los monocitos no expresaban AAS2 en ningún caso. Aunque los pacientes con EPOC expresaban más RNAm (figuras 12 – 14) en ningún caso alcanzó la diferencia estadística.

Figura 10. Expresión génica de los genes en estudio en toda la cohorte a nivel de monocitos

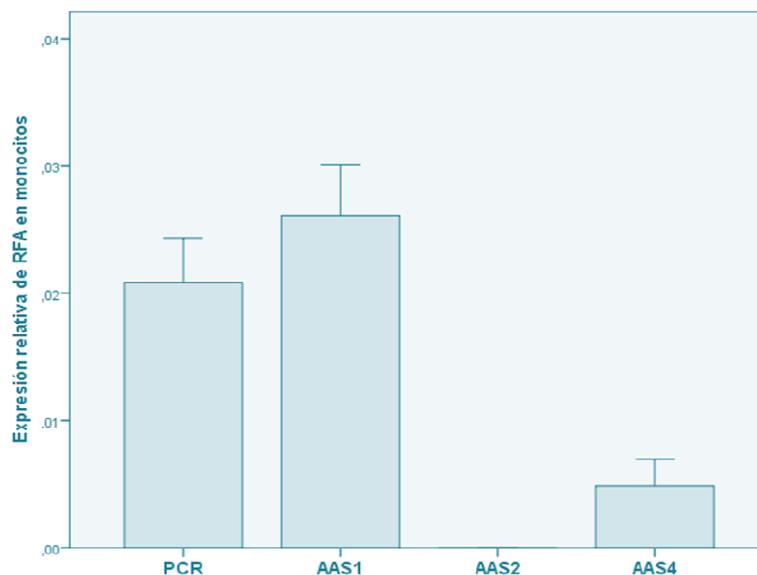


Figura 11. Expresión relativa de PCR en monocitos entre EPOC y controles.

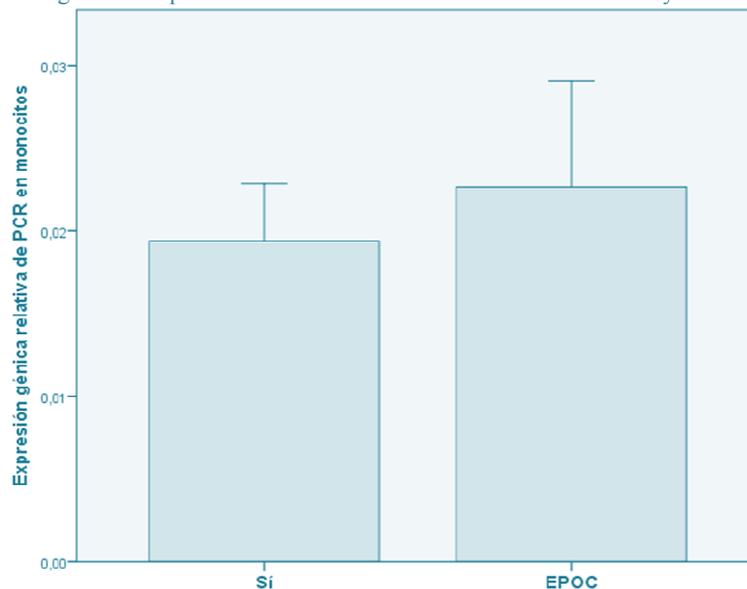


Figura 12. Expresión relativa de AAS1 en monocitos entre EPOC y controles.

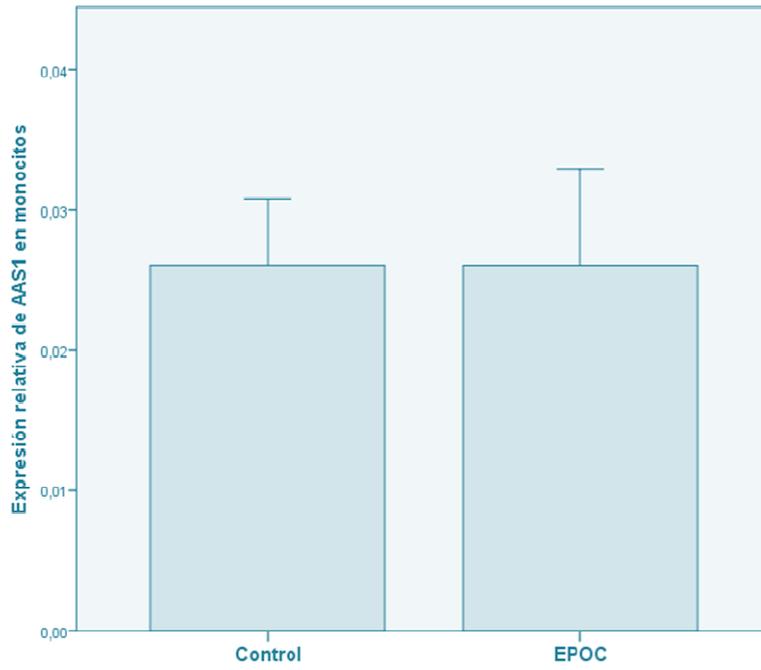
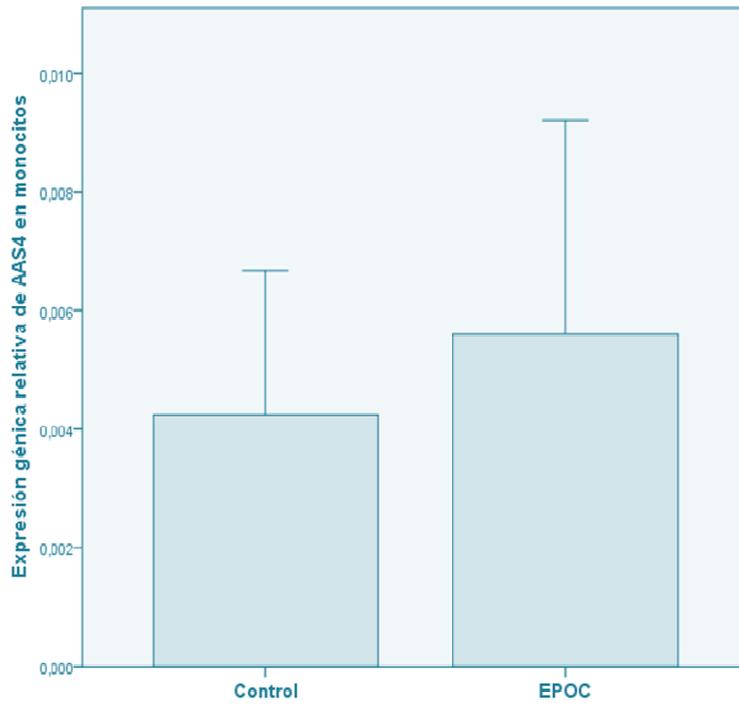


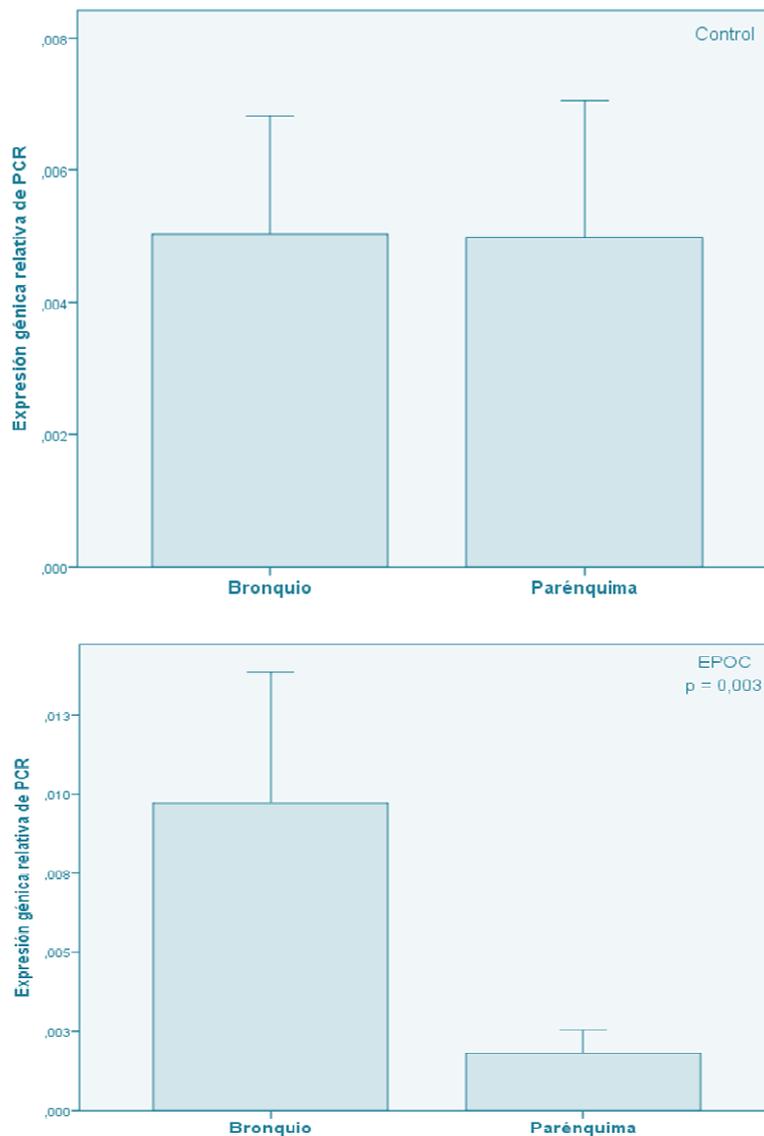
Figura 13. Expresión relativa de AAS4 en monocito entre EPOC y controles.



Relación entre bronquio y parénquima

La relación entre el bronquio y el parénquima se pudo estudiar en 96 casos (44 entre los controles y 52 entre los pacientes con EPOC, $p = 0,061$). Los resultados muestran que la expresión de la PCR en controles es similar en bronquio y parénquima, siendo mayor la expresión génica de PCR en el bronquio de los pacientes con EPOC con respecto a los controles, alcanzando además significación estadística ($p = 0,003$) (figuras 15-16).

Figura 14. Expresión génica diferencial de PCR entre bronquio y parénquima pulmonar en controles (arriba) y casos con EPOC (abajo).



A diferencia de lo que ocurre con la PCR, al comparar la expresión del AAS entre bronquio y parénquima se produce una mayor expresión del AAS en el bronquio independientemente de que sea en el grupo de los casos que de los controles (la PCR se expresaba por igual en bronquio y parénquima de los controles). En todos los subtipos analizados se expresa más ARN en el bronquio, alcanzando además la significación estadística en todos los casos como se puede ver en las figuras 16-18.

Figura 15. Expresión génica diferencial de AAS1 entre bronquio y parénquima pulmonar en controles (arriba) y casos con EPOC (abajo).

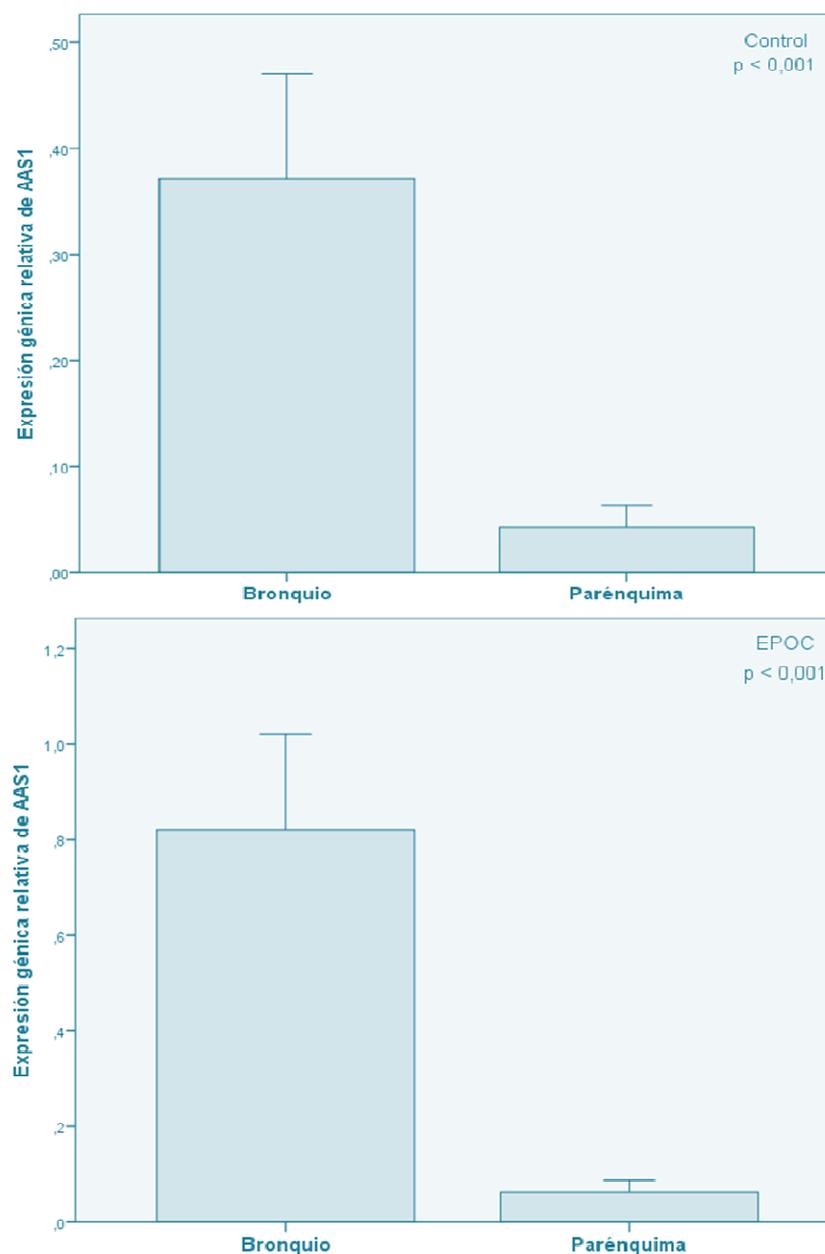


Figura 16. Expresión génica diferencial de AAS2 entre bronquio y parénquima pulmonar en controles (arriba) y casos con EPOC (abajo).

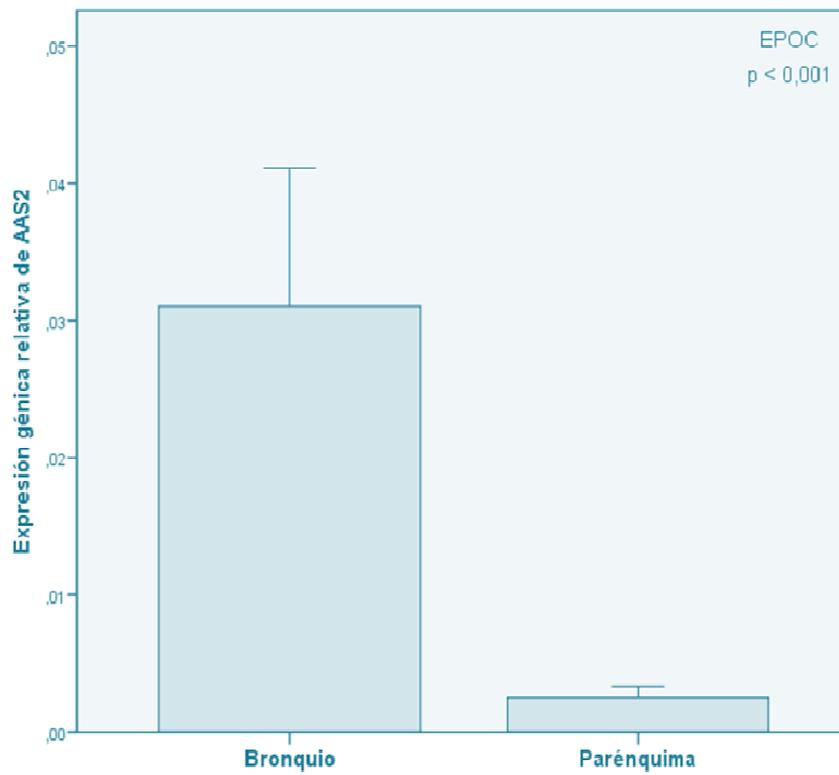
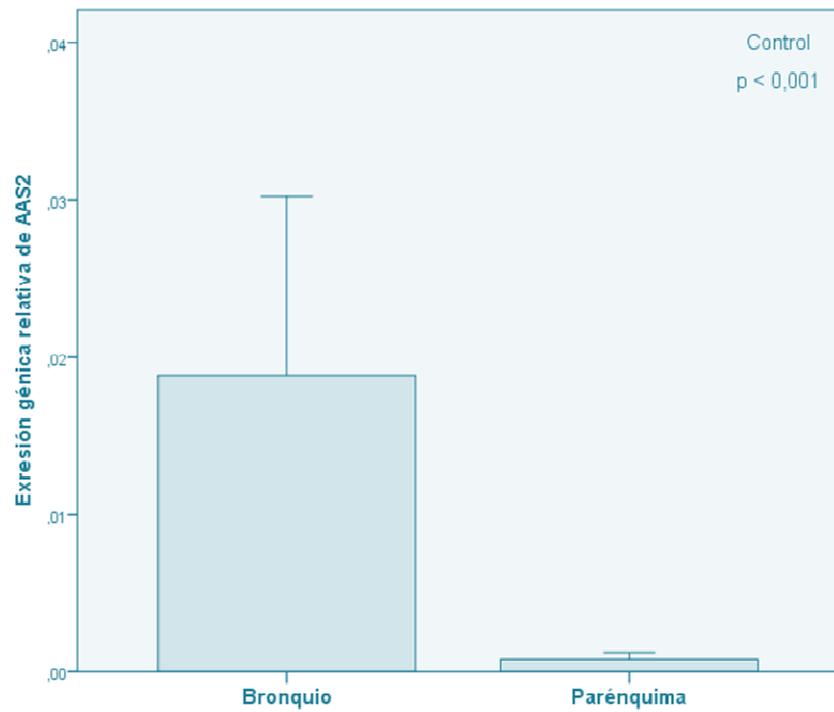
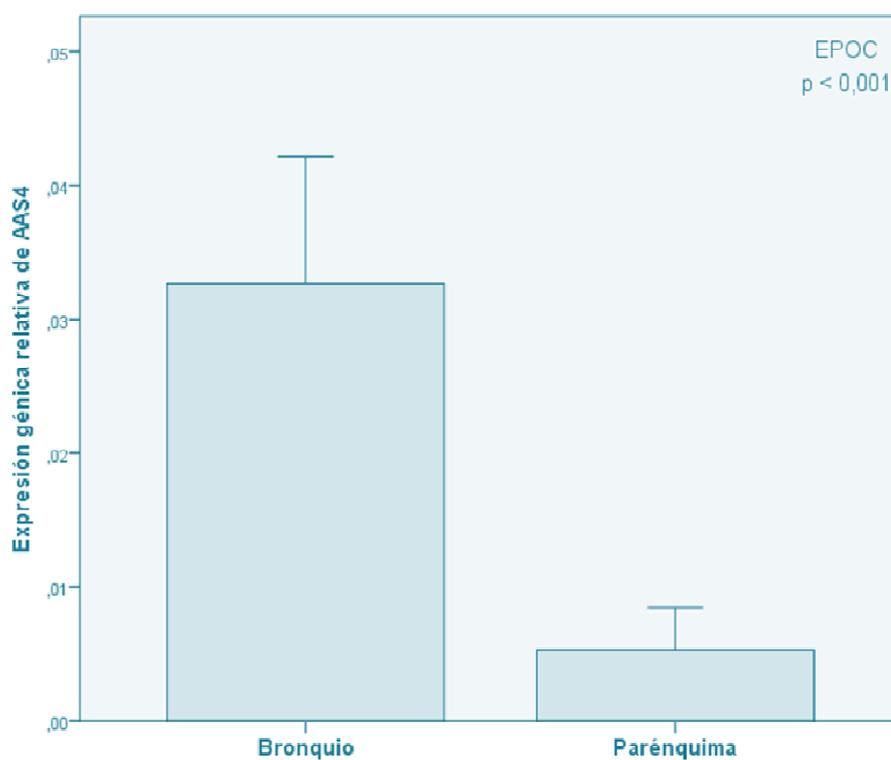
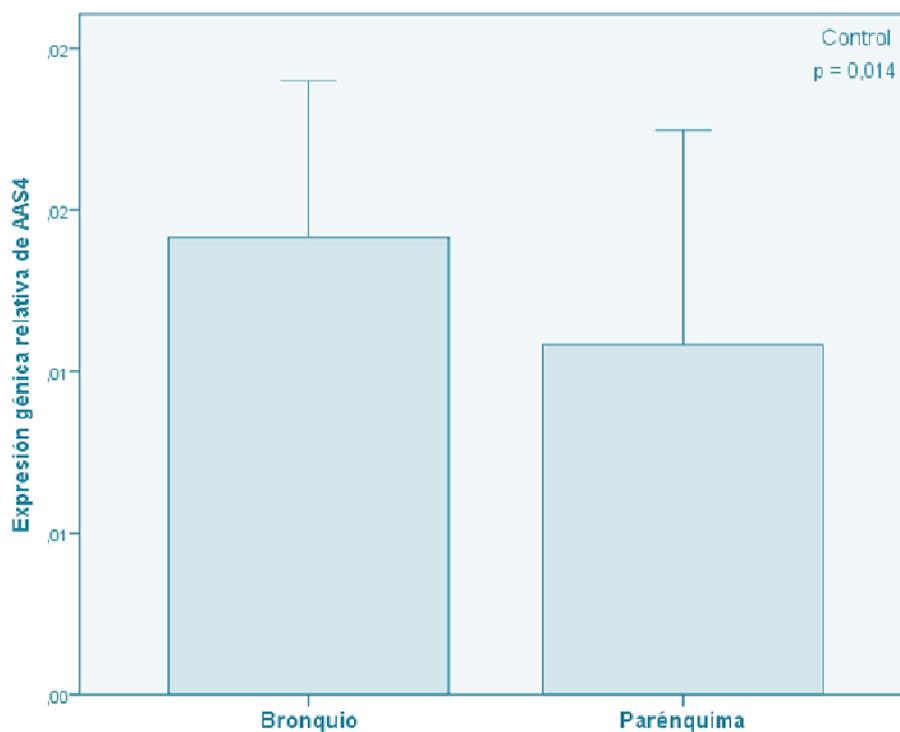


Figura 17. Expresión génica diferencial de AAS4 entre bronquio y parénquima pulmonar en controles (arriba) y casos con EPOC (abajo).



Relación entre la expresión génica y la proteica

La relación entre la expresión génica tisular y la concentración plasmática de PCR se pudo estudiar en 74 casos (36 entre los controles y 38 entre los pacientes con EPOC, $p = 0,266$). La relación entre la expresión génica tisular y la concentración plasmática de AAS se pudo estudiar en 62 casos (30 entre los controles y 32 entre los pacientes con EPOC, $p = 0,298$).

La PCR estaba elevada en pacientes con EPOC frente a controles (figura 19). Las concentraciones medias fueron de 8,06 (13,2) para los controles y 21,08 (34,6) para pacientes con EPOC ($p = 0,014$).

El AAS estaba elevado en pacientes con EPOC frente a controles (figura 20). Las concentraciones medias fueron de 6,62 (8,2) para los controles y 83,45 (224,1) para pacientes con EPOC ($p = 0,004$).

Los estudios de correlación lineal simple entre la expresión proteica sérica y la génica tisular están resumidos en la tabla 1. Ninguna de las correlaciones exploradas mostró una correlación significativa entre la expresión local y la concentración sistémica.

Figura 19. Concentración de PCR en suero entre casos y controles

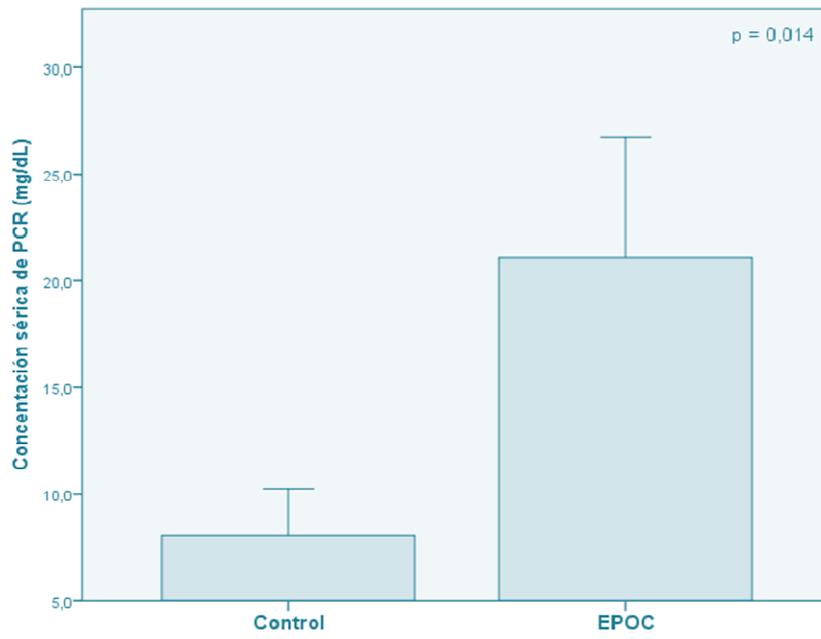


Figura 20. Concentración de AAS en suero entre casos y controles.

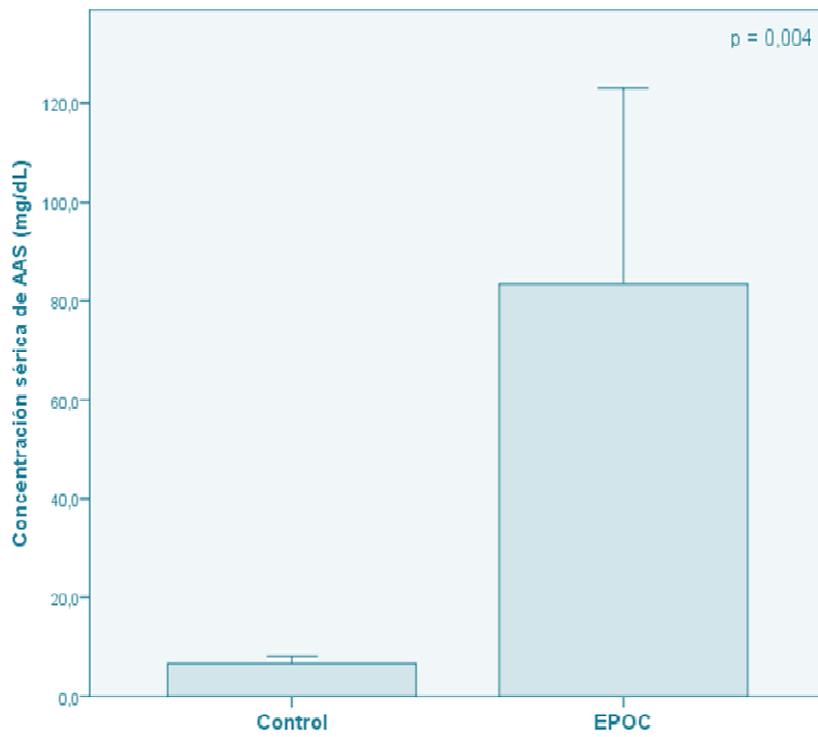


Tabla 4. Coeficientes de correlación lineal simple entre las concentraciones plasmáticas de PCR y AAS y su respectiva expresión génica en tejido bronquial y parénquima.

Suero	Total		Control		EPOC	
	PCR	AAS	PCR	AAS	PCR	AAS
Bronquio						
PCR	0,027	–	0,101	–	0,072	–
AAS1	–	0,026	–	0,253	–	– 0,088
AAS2	–	– 0,024	–	– 0,078	–	– 0,091
AAS4	–	0,224	–	0,422	–	– 0,035

Tabla 5. Coeficientes de correlación lineal simple entre las concentraciones plasmáticas de PCR y AAS y su respectiva expresión génica en tejido bronquial y parénquima.

Suero	Total		Control		EPOC	
	PCR	AAS	PCR	AAS	PCR	AAS
Parénquima						
PCR	0,141	–	0,329	–	– 0,118	–
AAS1	–	– 0,145	–	0,288	–	– 0,602*
AAS2	–	– 0,058	–	0,138	–	– 0,448*
AAS4	–	– 0,093	–	0,359	–	– 0,375

* $p < 0,05$

Tabla 6. Coeficientes de correlación lineal simple entre las concentraciones plasmáticas de PCR y AAS y su respectiva expresión génica en tejido bronquial y parénquima.

Suero	Total		Control		EPOC	
	PCR	AAS	PCR	AAS	PCR	AAS
Monocitos						
PCR	- 0,025	-	0,317	-	- 0,358	-
AAS1	-	- 0,048	-	0,449*	-	- 0,430
AAS2	-	-	-	-	-	-
AAS4	-	0,049	-	0,025	-	- 0,029

* $p < 0,05$

Expresión de tisular de RFA mayores. Comparación entre pacientes con EPOC y sujetos sanos.

Los estudios de correlación entre ambas localizaciones anatómicas están resumidas en la tabla 7. Como se puede apreciar, existía una correlación moderada entre el tejido bronquial y el parénquima pulmonar. Esta correlación era ligeramente superior en los pacientes con EPOC en comparación con los sujetos sin la enfermedad.

Las diferencias en expresión entre bronquio y parénquima están resumidas en la Tabla 8. Los pacientes con la enfermedad tenían claramente una síntesis de RFA mayores superior en el bronquio frente al parénquima. Esta sobreproducción era más llamativa en EPOC especialmente para PCR y AAS-1.

Las diferencias en expresión entre EPOC y controles están resumidas en la Tabla 9. Los pacientes con EPOC sintetizaban de manera más importante los RFA en estudio. Esta mayor producción era más llamativa en la expresión bronquial que en la parenquimatosas.

No había una diferente expresión entre los RFA y la situación de tabaquismo activo, la toma de corticoides inhalados, la dosis del corticoide, la edad o el sexo.

Tabla 7. Correlaciones entre bronquio y parénquima en paciente con y sin EPOC

Grupo	Reactante	Coefficiente correlación (r)	Valor p
EPOC	PCR	0,333	0,016
	AAS-1	0,427	0,002
	AAS-2	0,252	0,072
	AAS-4	0,513	< 0,001
No EPOC	PCR	0,230	NS
	AAS-1	0,382	0,011
	AAS-2	0,179	NS
	AAS-4	0,431	0,004

Tabla 8. Expresión de producción tisular de reactantes de fase aguda mayores entre pacientes con y sin EPOC

Grupo	Reactante	PCR	AAS-1	AAS-2	AAS-4
EPOC	Bronquio	0,009 (0,029)	0,821 (1,446)	0,031 (0,072)	0,032 (0,067)
	Parénquima	0,001 (0,005)	0,063 (0,170)	0,002 (0,005)	0,005 (0,022)
	Relación B/P	9,0	13,03	15,5	6,4
	Valor p*	0,003	< 0,001	< 0,001	< 0,001
No EPOC	Bronquio	0,005 (0,011)	0,371 (0,652)	0,018 (0,075)	0,141 (0,032)
	Parénquima	0,004 (0,013)	0,042 (0,136)	0,0008 (0,002)	0,010 (0,043)
	Relación B/P	1,25	8,8	22,5	14,1
	Valor p*	0,066	< 0,001	< 0,001	0,014

*Con prueba de Wilcoxon.

Tabla 9. Expresión de producción tisular de reactantes de fase aguda mayores entre pacientes con y sin EPOC.

	EPOC	No EPOC	Relación EPOC/No EPOC	Valor p
PCR bronquio	0,009 (0,029)	0,005 (0,012)	1,8	NS
AAS-1 bronquio	1,073 (2,358)	0,325 (0,609)	3,3	0,043
AAS-2 bronquio	0,051 (0,166)	0,016 (0,069)	3,1	0,013
AAS-4 bronquio	0,056 (0,190)	0,014 (0,032)	4,0	0,084
PCR parénquima	0,003 (0,025)	0,001 (0,007)	3,0	0,052
AAS-1 parénquima	0,034 (0,121)	0,014 (0,075)	2,4	0,036
AAS-2 parénquima	0,0016 (0,005)	0,0012 (0,006)	1,3	0,008
AAS-4 parénquima	0,009 (0,054)	0,006 (0,038)	1,5	0,075

Comprobar p en no paramétricos

Discución

V. Discusión

El presente trabajo aporta nueva y relevante información sobre la procedencia de la inflamación sistémica en la EPOC, de forma que nuestros resultados podrían ser de utilidad en el conocimiento de la patogénesis de la enfermedad y sus repercusiones sistémicas. La especial importancia de los resultados obtenidos se debe a que, no sólo demuestran la expresión de RFA en pacientes en fase estable de la enfermedad de acuerdo con los resultados de estudios previos (182), sino que se ha analizado este aspecto de forma local en tejido humano (bronquial y parenquimatoso) obtenido de muestras quirúrgicas, permitiendo además hacer una comparación entre pacientes fumadores con y sin EPOC, pudiendo estudiar si existen diferencias entre ambos grupos.

Según nuestro conocimiento, nuestro grupo ha estudiado por primera vez la producción local de RFA en tejido pulmonar y bronquial. Existen algunos estudios previos que habría que señalar. Hay un estudio publicado en 2004 que analiza la inflamación de la pequeña vía aérea de forma local en muestras de resección quirúrgica de pacientes EPOC comparados con fumadores sanos (10), pero no se había estudiado nunca previamente la producción local de RFA en el pulmón. Existe otro trabajo publicado también en 2004 en el que se estudia muestras de pacientes obtenidas de candidatos a una cirugía de resección por enfisema grave o resección nodular. Aunque se estudia tejido pulmonar como en nuestro trabajo, el objetivo del estudio no era analizar RFA sino expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo, síntesis de la matriz extracelular y la inflamación, viendo que dicha expresión se veía aumentada en pacientes con enfisema severo (223). Otro estudio más reciente aún publicado en 2015, hace una determinación genética en muestras de pacientes que fueron sometidos a una cirugía de resección por neoplasia pulmonar. Aunque la metodología es similar al

incluir muestras de pacientes candidatos a una cirugía, el objetivo principal de ambos estudios difiere del nuestro por lo que, salvo para algunas características demográficas y algunas limitaciones, nuestros resultados no son comparables (224).

La obtención de muestras bronquiales o de tejido pulmonar en pacientes fumadores sanos y con EPOC ha comenzado a tomar relevancia como pieza clave en el entendimiento de la fisiopatología de la enfermedad. La respuesta inflamatoria en la EPOC se caracteriza por una hiperplasia mucosa, infiltración de células T (predominantemente Th1) y un aumento de la presencia del número de neutrófilos y macrófagos. Además la fibrosis progresiva que se pone de manifiesto en la pequeña vía aérea de los pacientes con EPOC parece ser la responsable de la obstrucción irreversible de la vía aérea en pacientes con EPOC (10). Existen algunos trabajos recientes de revisión que han documentado la existencia de biomarcadores en pacientes con EPOC, pero han criticado la falta de información en relación con la variabilidad en las mediciones y la ausencia de correlación con el estadio clínico (225,226). Por ejemplo en un reciente meta-análisis que incluye 150.000 pacientes se describe que solo la neutrofilia en esputo, la IL-8, el TNF α en suero y la Proteína C reactiva se correlaciona con los estadios de la EPOC (sólo una tendencia) (227).

A medida que ha ido avanzando el conocimiento sobre la fisiopatología de la enfermedad y de la importancia de la inflamación en el curso y manejo terapéutico de la EPOC, se ha puesto de manifiesto la necesidad de ampliar el conocimiento de dicha inflamación, haciendo hincapié en la determinación y la búsqueda de biomarcadores consistentes y reproducibles que nos ayuden aún más en el conocimiento no sólo de la EPOC, sino en la comprensión de las enfermedades respiratorias complejas y su fisiopatología (225).

La falta de estudios en este sentido se debe fundamentalmente a dos razones principales, la dificultad en sí misma que implica la toma de muestras en estos pacientes y posteriormente la dificultad técnica que implica la obtención de ARN a partir de dichas muestras.

Hasta hoy las técnicas invasivas que permiten obtener muestras directamente de la vía aérea pueden tener ventajas sobre las técnicas indirectas, como el esputo. Pero las técnicas usadas actualmente como el lavado broncoalveolar han demostrado importantes limitaciones, como por ejemplo la falta de sensibilidad y especificidad (228). Además, los métodos de muestreo deberían permitirnos la comparación de los datos proteómicos, de transcripción e histología de un mismo sitio de las vías respiratorias. Estos datos permitirían una correlación que ayudaría a entender la gravedad de la enfermedad, la existencia de los diferentes fenotipos y la respuesta al tratamiento farmacológico (229).

Las técnicas existentes para el estudio de las enfermedades respiratorias incluyen el análisis de BAL, biopsias de pulmón y algunas muestras menos invasivas como el esputo inducido o la sangre periférica. Sin embargo, aunque las muestras pueden ser recogidas con relativa facilidad, hay varios problemas asociados (230). Las muestras no son reproducibles y el efecto de dilución de las muestras recogidas reduce considerablemente la precisión en la medida de los marcadores inflamatorios. Los estudios que comparan los biomarcadores pulmonares de diferentes tipos de muestras tales como esputo, BAL y las biopsias del mismo individuo han demostrado que hay una gran variabilidad en la proporción de células inflamatorias en función de las distintas muestras (231).

Hasta hoy dos de las técnicas que han sido utilizadas en la práctica clínica y en la investigación para obtener muestras del pulmón han sido el lavado broncoalveolar

(BAL) y la biopsia transbronquial. Ambas técnicas han sido usadas hasta ahora en los estudios disponibles en relación con la evaluación de las terapias antiinflamatorias, tanto en EPOC como en asma. El grupo de trabajo de la Sociedad Europea (ERS) ha publicado guías para la medición del componente acelular y la estandarización del BAL (232,233) y una guía similar ha sido publicada también por la American Thoracic Society (ATS) con la intención de estandarizar las medidas del componente celular del BAL en las enfermedades intersticiales.

Ya en 1999 se publicaron datos sobre la reproducibilidad de las mediciones repetidas de la inflamación en la vía aérea de los pacientes con asma estable (234). Recientemente se ha publicado un estudio piloto que describe una nueva técnica de muestreo consistente en usar una membrana de poliéster que es capaz de absorber las células evitando el efecto de dilución de otras técnicas como el lavado broncoalveolar (235). Se puede realizar mediante una broncoscopia rutinaria y abre las puertas a nuevas líneas de investigación al abrir nuevas vías en lo que se refiere a la toma de muestras en pacientes con EPOC.

Como hemos dicho anteriormente no sólo la obtención de la muestra en sí implica dificultad técnica, sino que una vez obtenida una muestra adecuada, la obtención de una secuencia completa de ARN de buena calidad en el laboratorio es a menudo una tarea desalentadora debido a que es una molécula que se degrada con mucha facilidad durante su análisis. Esta degradación se debe fundamentalmente a dos razones:

- En primer lugar el ARN por su propia estructura es inherentemente más débil que la molécula de ADN. Esto es debido a que está formado por unidades de ribosa que tienen un grupo hidroxilo altamente reactivo en

C2 que participa en las reacciones enzimáticas RNA mediadas. Esto hace que el ARN sea químicamente más lábil que el ADN y que además sea más sensible al calor.

- Por otro lado, las ribonucleasas encargadas de la degradación del ARN son enzimas ubicuas y además muy resistentes, de forma que eliminar dichas enzimas resulta a veces extremadamente complejo.

Lo anteriormente expuesto explica el por qué existen pocos estudios llevados a cabo con esta metodología y enfatiza la importancia de los resultados obtenidos en nuestro trabajo.

Con el fin de interpretar correctamente los resultados expuestos en este trabajo de tesis doctoral, existen una serie de cuestiones que deben tomarse en consideración, ya que algunas de ellas pueden interpretarse como limitaciones del presente estudio.

1. *Tamaño muestral.* Al inicio de esta discusión se ha explicado ampliamente la dificultad que implica la obtención de muestras en pacientes EPOC para la realización de estudios de investigación, por lo complicado del proceso de obtención en sí de las muestras y por la dificultad técnica que implica posteriormente obtener una muestra de ARN de dichos tejidos. Teniendo en cuenta todo ello, nuestra cohorte con 315 sujetos es lo bastante amplia como para obtener algunos resultados prometedores con información relevante y en muchos casos alcanzando la significación estadística.
2. *Neoplasia como indicación de la cirugía.* La mayoría de los sujetos incluidos en ambos grupos (93.6%) eran portadores de una neoplasia pulmonar como indicación de la cirugía de resección. En relación con el AAS, aunque algún estudio previo ha analizado el valor del mismo como marcador tumoral en

pacientes con cáncer de pulmón (236), el papel de este RFA en la EPOC no ha sido estudiado en profundidad. Aún así, la mayoría de 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 queda explicada por la existencia de la enfermedad neoplásica de base y habría que buscar una respuesta a este patrón de síntesis del AAS.

En este punto sería interesante además aclarar que, con intención de minimizar la repercusión en los resultados de que los pacientes fueran en su mayor parte portadores de una neoplasia, se procedió a tomar la muestra de una parte macroscópicamente normal, eligiendo además las secciones más alejadas de la zona afectada por la tumoración.

Debido a que no existen estudios similares previos, desconocemos si el tipo histológico de la neoplasia puede jugar un papel importante en la diferente expresión de RFA. Por este motivo, sería importante en próximos estudios conseguir una distribución homogénea de la muestra en este sentido. En este sentido, en nuestra cohorte la mayoría de las neoplasias tanto en casos como en controles fueron adenocarcinoma y epidermoide.

3. *Elevación de RFA como respuesta a la propia cirugía.* Como se ha descrito previamente los RFA constituyen un grupo heterogéneo de proteínas cuya cantidad en la circulación aumenta rápidamente en respuesta a una infección, daño tisular, crecimiento neoplásico o desordenes inmunológicos (185). Con la intención de intentar evitar este problema, para poder incluir la muestra del paciente en el estudio, el tiempo entre la apertura de planos y la recogida

de la muestra tenía que ser inferior a las dos horas, siendo este uno de los criterios de inclusión recogidos en el método del estudio.

4. *Elevación de RFA como respuesta a una infección/colonización de la vía aérea.* Igualmente la presencia de colonización bronquial crónica o aguda podría hacer que la expresión de marcadores inflamatorios se elevara en la vía aérea en estudio. Por este motivo, se obtuvo en la mayoría de los pacientes un cultivo del aspirado de la broncoscopia previa a la cirugía y de la muestra tomada en quirófano, para descartar esta presencia bacteriana. En nuestro estudio tan sólo fue positivo en 15 pacientes y sin relación con la expresión tisular de RFA.
5. *Mayor número de sujetos en el grupo de controles que de casos.* El presente estudio tiene un diseño observacional. Por este motivo, no se realizó randomización alguna de los casos. Esta decisión tiene la ventaja de no descartar sujetos potencialmente analizables. Por el contrario, puede dar lugar a que los grupos sean distintos en algunas variables resultando grupos no homogéneos como consecuencia de los criterios de inclusión y exclusión tenidos en cuenta.

El hecho de que haya más controles que casos, podría parecer a priori algo contradictorio, tratándose de un estudio en el que la mayoría de los sujetos son pacientes portadores de una neoplasia pulmonar lo esperado sería encontrar más pacientes con EPOC que fumadores sin la enfermedad. Si tenemos en cuenta que el riesgo de tener un cáncer de pulmón aumenta en los fumadores importantes (237), se refuerza la idea de pensar que sería más lógico encontrar más EPOC que no controles. Esto se puede justificar por la

imposibilidad de incluir a los pacientes que padecen un estadio más avanzado de la enfermedad, lo que limita mucho la inclusión de casos en el estudio.

6. *La mayoría de los casos son pacientes en estadios precoces de la enfermedad.* Además, debido a que por el propio diseño del estudio todos los sujetos incluidos en el mismo eran pacientes candidatos a una cirugía de resección pulmonar, en su mayoría por enfermedad neoplásica, siendo obligatorio que la mayor parte los pacientes en estadio IV no pueden ser sometidos a una cirugía de esta índole, bien por la poca reserva funcional o por la comorbilidad asociada, por lo que sea imposible incluirlos en un estudio con este diseño.

Según estudios previos existe una correlación entre los niveles séricos de PCR y la rápida progresión de la de la enfermedad. Según estos trabajos habría 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 (238). 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 (88.1%), 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 tuviera un patrón de secreción distinto y pudieran

obtenerse mayores diferencias en los estudios inferenciales, sobre todo en la comparación entre la expresión entre casos y controles.

7. *Todos los pacientes incluidos son pacientes en fase estable de la enfermedad.* De hecho uno de los criterios de inclusión en el presente estudio es que los pacientes no hubieran tenido una exacerbación en los dos meses previos a la inclusión en el mismo, ya que consideramos que el aumento de medicación en cada agudización y la inestabilidad clínica del enfermo podría interferir en nuestros resultados. Es verdad que las agudizaciones recogidas en la entrevista clínica inicial, son las referidas por el propio paciente, pudiendo considerarse 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 incluso estas agudizaciones no referidas tienen un impacto considerable en la calidad de vida de los pacientes EPOC (239).

El AAS ha sido estudiado como marcador de inflamación en las exacerbaciones de pacientes con EPOC (194); sin embargo, no hay estudios 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 su fase estable.

En el presente estudio y a pesar de las posibles consideraciones metodológicas descritas anteriormente se obtienen una serie de resultados que consideramos relevantes. Si analizamos los resultados en cuanto a variables clínicas y demográficas existían

algunas diferencias entre los casos y controles que además alcanzaban la significación estadística. El grado de tabaquismo en el momento de la recogida de datos era mayor en los EPOC, que en los controles. Sabemos 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 (12). En nuestra muestra, al igual que la población general había más hombres que mujeres en ambos grupos, lo que se debe primero a que las neoplasias pulmonares son más prevalentes en hombres que en mujeres, y además la EPOC es hoy en día más frecuente en nuestro país en hombres que en mujeres (CITA).

Existían también diferencias significativas entre las morbilidades presentes en ambos grupos (Índice de Charlson). Sabemos por los trabajos publicados al respecto que los pacientes con EPOC tienen mayor riesgo de sufrir comorbilidades que los sujetos fumadores sanos (240). Es precisamente por este motivo que en las últimas décadas se ha comenzado a considerar a la EPOC como una enfermedad sistémica con un comportamiento multicompartimental. Además sabemos que las comorbilidades son mayores a medida que se produce una progresión de la enfermedad (CITA).

En cuando a la comorbilidad inicialmente podría llamar la atención que aún siendo significativamente mayor en el grupo de los casos, el grado de comorbilidad en la cohorte en general era menor de lo que se podría esperar para un estudio con pacientes que padecen EPOC, pero si tenemos en cuenta que el 81% de los pacientes se encontraban en estadios iniciales de la enfermedad, estos resultados toman más sentido. Además las propias comorbilidades (como una cardiopatía grave) podrían suponer por si solas un criterio de exclusión para una cirugía de resección. Probablemente si se pudiera aumentar el tamaño muestral incluyendo pacientes con peor estado funcional,

con más pacientes en estadios grave/muy grave de la enfermedad, aumentaría de forma considerable las comorbilidades encontradas en los casos.

Analizando nuestros resultados hay un dato muy interesante que se pone de manifiesto al analizar la relación entre la expresión de los RFA y la dosis de corticoides inhalados. Existe una falta de relación entre la expresión de los RFA y la dosis de corticoides inhalados en nuestra cohorte. 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 (241), 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 (242). 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.

Existe un trabajo previo de un grupo australiano que determina la expresión de AAS extra hepático en muestras de lavado broncoalveolar de pacientes con EPOC (243). Además hacen un estudio de la lipoxina A4 como receptor importante en la inflamación presente en los pacientes con EPOC. Tras una serie de análisis concluyen que el AAS está elevado de forma importante durante las agudizaciones y que además se eleva en pacientes con EPOC estable con respecto a fumadores que no tienen la enfermedad. Establecen además una línea de investigación muy interesante en la que el AAS junto con la lipoxina A4 serían mediadores de una inflamación refractaria a los

corticoides, lo que iría de acuerdo con la nueva tendencia en limitar el uso del tratamiento con corticoides en pacientes con EPOC a un grupo muy seleccionado de pacientes. En este sentido en nuestra muestra hemos determinado una expresión elevada del AAS tanto en suero como en monocitos de sangre periférica en pacientes estables con los resultados descritos, lo que puede ayudar a tener una visión más global entre la expresión de los RFA y la EPOC.

Es interesante ver cómo según nuestros resultados existe un patrón de secreción distinto en función de la localización anatómica. Mientras que la expresión de PCR es similar en ambas localizaciones (bronquio/parénquima) en los controles, en los casos se produce una secreción mayor en el bronquio con respecto al parénquima. Este diferente patrón de secreción de la PCR es interesante y podría ser útil para intentar dilucidar la aportación de la afectación de cada compartimento anatómico en la enfermedad. Igualmente, el distinto fenotipo de la enfermedad (bronquial o enfisematoso) podría estar influyendo nuestros resultados. Por tanto, en futuros trabajos será necesario hacer una valoración del componente de enfisema para poder realizar una adecuada interpretación de los resultados. En el presente estudio no hemos valorado la importancia de este componente de enfisema, lo que habrá que plantear en un posterior estudio con una muestra más amplia.

En cuanto a la diferencia en la expresión del AAS entre bronquio y parénquima, en este caso, a diferencia de lo que ocurre con la PCR, tanto para los casos como los controles se produce una expresión significativamente más elevada en el bronquio que en el parénquima en ambos grupos. Según nuestro conocimiento no existen estudios previos en la literatura que hayan estudiado la expresión del AAS lo que hace imposible comparar nuestros resultados con datos previos, pero sí que permite ver como ambos RFA (PCR y AAS) se expresan en ambas localizaciones aunque con un patrón de

secreción distinto en función de la localización. Sería interesante remarcar una vez más que probablemente el hecho de no poder incluir pacientes en los estadios más avanzados de la enfermedad en los que existe una mayor inflamación sistémica (244) pueda estar condicionando estos resultados.

En cuanto a la expresión a nivel de monocitos de sangre periférica una vez más se comprueba una mayor expresión en los monocitos de los casos que los controles sin EPOC, aunque es verdad que la diferencia no alcanza la significación estadística sí que sigue una tendencia que va de acuerdo con la línea de los estudios disponibles hasta el momento, en el que se ha comprobado un aumento de la expresión.

Si nos centramos en los resultados de expresión de RFA, se produjo una expresión aumentada de ambos RAF mayores en suero de pacientes tanto sanos como control, pero siendo la expresión significativamente más elevada en los casos que los controles. Esto concuerda con los resultados de estudios previos de expresión de dichos marcadores en suero (245). Esta falta de relación entre la expresión tisular, bien génica, bien proteica, y la concentración sérica es una constante en los estudios de expresión de mediadores inflamatorios en la EPOC. A pesar de lo que cabría esperarse, esta relación no existe. En este punto es importante recordar que desde que se produce la transcripción de un gen en un tejido hasta que esta proteína alcanza la circulación sistémica, existe un elevadísimo número de mecanismos de control en diversos puntos de la cadena. Algunos ejemplos pueden ser el control epigenético, el control por microRNA, alteraciones en el transporte de las proteínas, la secreción paracrina de dicha proteína, mecanismos de control de secreción sistémica e incluso la vida media de las proteínas.

A la luz de los resultados del presente estudio, 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 (182). 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 (244). 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.

En conclusión, el presente trabajo aporta información novedosa y relevante que indica que el tejido pulmonar es capaz de sintetizar RFA cuya secreción puede estar relacionada con variables relacionadas con la EPOC. Es probable que este origen local de un marcador sistémico tenga repercusiones clínicas que deberán ser dilucidadas en futuros trabajos.

Conclusiones

VI. CONCLUSIONES

PRIMERA. Mediante el análisis de la expresión génica de reactantes de fase aguda mayores en tejido pulmonar, hemos demostrado que dicho tejido puede sintetizar RFA asociados a la enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

SEGUNDA. Esta síntesis de reactantes de fase aguda mayores está más marcada en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica que en aquellos que no la padecen.

TERCERA. Los monocitos de sangre periférica tienen a su vez la capacidad de sintetizar estos reactantes de fase aguda mayores, obteniéndose diferencias entre pacientes con y sin enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

CUARTA. Hemos demostrado que existe una síntesis de reactantes de fase aguda que es compartimentalizada dentro del pulmón, obteniendo una expresión diferente según se analice el tejido bronquial o el parénquima pulmonar.

QUINTA. Al comparar la expresión génica de reactantes de fase aguda mayores en los diversos tejidos analizados, nuestros resultados apoyan el papel del bronquio como principal fuente de síntesis de reactantes de fase aguda mayores de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

SEXTA. Ninguno de los tejidos estudiados tiene relación con la concentración sérica de estas proteínas, por lo que probablemente o bien intervengan diversos mecanismos de control o haya que estudiar otros órganos de producción de reactantes de fase aguda mayores como es el tejido hepático.

VII. ANEXOS

Anexo I: Cuestionario St George's

INSTRUCCIONES:

Este cuestionario está hecho para ayudarnos a saber mucho más sobre sus problemas respiratorios y como le afectan en su vida. Usamos el cuestionario, no tanto para conocer los problemas que los médicos y las enfermeras piensan que usted tiene, sino para saber que, aspectos de su enfermedad son los que le causan más problemas.

POR FAVOR LEA ATENTAMENTE LAS INSTRUCCIONES Y PREGUNTE LO QUE NO ENTIENDA. NO UTILICE DEMASIADO TIEMPO PARA DECIDIR LAS RESPUESTAS. LEA TODAS LAS RESPUESTAS DE UN MISMO ITEM, ANTES DE DECIDIR SU RESPUESTA.

PARTE 1

PREGUNTAS PARA SABER CUANTOS PROBLEMAS RESPIRATORIOS HA TENIDO

DURANTE EL ULTIMO AÑO.

Por favor, marque una sola opción en cada pregunta.

- 1 - **Durante el último año, he tenido tos.**
 - a) Casi todos los días de la semana.
 - b) Varios días a la semana.
 - c) Unos pocos días al mes.
 - d) Solo cuando tuve infección en los pulmones.
 - e) Nada en absoluto.

- 2 - **Durante el último año, he tenido expectoración (catarro o flemas).**
 - a) Casi todos los días de la semana.
 - b) Varios días a la semana.
 - c) Unos pocos días al mes.
 - d) Solo cuando tuve infección en los pulmones.
 - e) Nada en absoluto.

- 3 - **Durante el último año, he sentido falta de aire o fatiga.**
 - a) Casi todos los días de la semana.
 - b) Varios días a la semana.
 - c) Unos pocos días al mes.
 - d) Solo cuando tuve infección en los pulmones.

- e) Nada en absoluto.
- 4 - **Durante el último año, he tenido ataques de silbidos en los pulmones.**
- a) Casi todos los días de la semana.
- b) Varios días a la semana.
- c) Unos pocos días al mes.
- d) Solo cuando tuve infección en los pulmones.
- e) Nada en absoluto.
- 5 - **Durante el último año, cuántos ataques tuvo por problemas respiratorios que fueran graves o muy desagradables?.**
- a) Más de tres ataques.
- b) Tres ataques.
- c) Dos ataques.
- d) Un ataque.
- e) Ningún ataque.
- 6 - **Cuánto le duró el peor de los ataques que tuvo por problemas respiratorios ?. (vaya a la pregunta 7 si no tuvo ningún ataque serio).**
- a) Una semana o más.
- b) De tres a seis días.
- c) Uno o dos días.
- d) Menos de un día.
- e) Ninguno.
- 7 - **Durante el último año, cuántos días buenos (con pocos problemas respiratorios) tuvo en una semana habitual ?.**
- a) Ninguno.
- b) Uno o dos días.
- c) Tres o cuatro días.
- d) Casi todos los días.

e) Todos los días.

8 - **Si tiene silbidos en el pecho, son peor por la mañana ?.**

a) No

b) Si

PARTE 2
SECCION 1

1 - **Cómo diría usted que está de los pulmones ?Por favor, marque una sola de las siguientes frases:**

a) Es el problema más importante que tengo.

b) Me causa bastantes problemas.

c) Me causa algún problema.

d) No me causa ningún problema.

2 - **Si ha tenido algún trabajo remunerado, por favor marque una sola de las siguientes frases.**

a) Mis problemas respiratorios me obligaron a dejar de trabajar.

b) Mis problemas respiratorios me dificultan en mi trabajo o me obligaron a cambiar de trabajo.

c) Mis problemas respiratorios no me afectan (o no me afectaron), en ningún trabajo.

SECCION 2

PREGUNTAS SOBRE LAS ACTIVIDADES QUE NORMALMENTE LE PUEDEN HACER SENTIR QUE LE FALTA EL AIRE.

Por favor, marque todas las respuestas que correspondan a cómo está usted últimamente.

- | | | |
|---|----|----|
| 1 - Me falta el aire estando sentado o incluso acostado y quieto. | SI | NO |
| 2 - Me falta el aire cuando me lavo o cuando me visto. | SI | NO |
| 3 - Me falta el aire al caminar dentro de mi casa. | SI | NO |
| 4 - Me falta el aire al caminar fuera de mi casa, en terreno llano. | SI | NO |
| 5 - Me falta el aire al subir un piso por escalera. | SI | NO |
| 6 - Me falta el aire al subir una cuesta. | SI | NO |
| 7 - Me falta el aire al hacer algún deporte o jugar. | SI | NO |

SECCION 3

ALGUNAS PREGUNTAS MAS SOBRE LA TOS Y LA FALTA DE AIRE.

Por favor, marque todas las respuestas que correspondan a como está usted últimamente

- | | | |
|--|----|----|
| 1 - Tengo dolor cuando toso. | SI | NO |
| 2 - Toser me agota. | SI | NO |
| 3 - Me falta el aire cuando hablo. | SI | NO |
| 4 - Me falta el aire cuando me agacho. | SI | NO |
| 5 - La tos o la respiración me molestan cuando duermo. | SI | NO |
| 6 - Enseguida me agoto | SI | NO |

SECCION 4

PREGUNTAS SOBRE OTRAS CONSECUENCIAS QUE SUS PROBLEMAS RESPIRATORIOS LE PUEDEN CAUSAR.

Por favor, marque todas las respuestas que correspondan a como está usted últimamente:

- | | | |
|--|----|----|
| 1 - La tos o la respiración me dan vergüenza en público. | SI | NO |
| 2 - Mis problemas respiratorios son una molestia para mi familia, mis amigos o vecinos. | SI | NO |
| 3 - Me asusto o me alarmo cuando no puedo respirar. | SI | NO |
| 4 - Siento que no puedo controlar mis problemas respiratorios. | SI | NO |
| 5 - Creo que mis problemas respiratorios no van a mejorar. | SI | NO |
| 6 - Por culpa de mis problemas respiratorios me he convertido en una persona débil o inválida. | SI | NO |
| 7 - Hacer ejercicios es peligroso para mí. | SI | NO |
| 8 - Cualquier cosa me parece que es un esfuerzo excesivo. | SI | NO |

SECCION 5

PREGUNTAS SOBRE SU MEDICACION. Si no está tomando ninguna medicación, vaya directamente a la siguiente sección (la N° 6).

- | | | |
|---|----|----|
| 1 - Creo que la medicación me sirve poco. | SI | NO |
| 2 - Me da vergüenza tomar la medicación, nebulizar o hacer los puff en público. | SI | NO |
| 3 - La medicación me produce efectos desagradables. | SI | NO |
| 4 - La medicación me altera mucho la vida. | SI | NO |

SECCION 6

ESTAS PREGUNTAS SE REFIEREN A COMO SUS PROBLEMAS RESPIRATORIOS PUEDEN AFECTAR SUS ACTIVIDADES.

Por favor, marque todas las respuestas que usted crea adecuadas a causa de sus problemas respiratorios:

- | | | |
|---|----|----|
| 1 - Tardo mucho para lavarme o vestirme. | SI | NO |
| 2 - Me resulta imposible ducharme o bañarme, o tardo mucho tiempo. | SI | NO |
| 3 - Camino más despacio que los demás, o tengo que parar y descansar. | SI | NO |
| 4 - Tardo mucho para hacer trabajos como las tareas domésticas o tengo que parar y descansar. | SI | NO |
| 5 - Para subir un piso por escaleras, tengo que ir despacio o parar. | SI | NO |
| 6 - Si apuro el paso o camino rápido, tengo que parar o ir más despacio. | SI | NO |
| 7 - Mis problemas respiratorios me dificultan hacer cosas tales como subir una cuesta, llevar cosas por la escalera, caminar durante un tiempo prolongado, arreglar el jardín, bailar o jugar a las bochas. | SI | NO |
| 8 - Mis problemas respiratorios me dificultan hacer cosas tales como llevar cosas pesadas, caminar a paso rápido, trotar, nadar, jugar al tenis o trabajar con una pala. | SI | NO |
| 9 - Mis problemas respiratorios me dificultan hacer cosas tales como un trabajo manual muy pesado, correr, ir en bicicleta, nadar rápido o practicar deportes de competición. | SI | NO |

SECCION 7

NOS GUSTARIA SABER AHORA COMO SUS PROBLEMAS RESPIRATORIOS LE AFECTAN NORMALMENTE EN SU VIDA COTIDIANA.

Por favor, marque con una cruz las respuestas que crea usted adecuadas a causa de sus problemas respiratorios:

- 1 - No puedo hacer deportes o jugar.
- 2 - No puedo salir a divertirme o distraerme.
- 3 - No puedo salir de casa para ir a comprar.
- 4 - No puedo hacer el trabajo de la casa.
- 5 - No puedo alejarme mucho de la cama o de la silla.

A CONTINUACION HAY UNA LISTA DE OTRAS ACTIVIDADES QUE SUS PROBLEMAS RESPIRATORIOS PUEDEN IMPEDIRLE HACER. ESTE ATENTO A LA SIGUIENTE INDICACION:

N O T I E N E Q U E M A R C A R L A S, SOLO SON PARA RECORDARLE LA MANERA COMO SUS PROBLEMAS RESPIRATORIOS PUEDEN AFECTARLE.

- Ir a pasear o sacar a pasear el perro.
- Hacer cosas en la casa o en el jardín.
- Hacer el amor.
- Ir a la iglesia, al bar, al club o a su lugar de distracción.
- Salir cuando hace mal tiempo o estar en habitaciones llenas de humo.
- Visitar a la familia o a los amigos, o jugar con niños.

* POR FAVOR, ESCRIBA AQUI CUALQUIER OTRA ACTIVIDAD IMPORTANTE QUE SUS PROBLEMAS RESPIRATORIOS LE IMPIDAN HACER:

.....

A CONTINUACION, " PODRIA MARCAR, CON UNA CRUZ, LA FRASE (SOLO UNA) QUE USTED CREA QUE DESCRIBE MEJOR COMO LE AFECTAN SUS PROBLEMAS RESPIRATORIOS ?:

- No me impiden hacer nada de lo que quisiera hacer.
- Me impiden hacer una o dos cosas de las que quisiera hacer.
- Me impiden hacer la mayoría de cosas que quisiera hacer.
- Me impiden hacer todo lo que quisiera hacer.

MUCHAS GRACIAS POR COMPLETAR ESTE CUESTIONARIO.

Anexo II: Cuaderno Recogida de Datos

Grupo de estudio y criterios de inclusión / exclusión.

Grupo de estudio.

- Grupo EPOC fumador. Grupo EPOC exfumador.
 Grupo sano fumador. Grupo sano no fumador.

Criterios de inclusión.

Sí	No	Criterio
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Edad > 40 años.
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Estabilidad clínica durante los dos meses previos.
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Capacidad para completar los cuestionarios y estudios complementarios.
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	No contraindicaciones para los estudios.
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	En lista de espera para cirugía de resección pulmonar.

En caso de que alguno de los anteriores sea negativo, el paciente no podrá entrar en el estudio.

Criterios de exclusión.

Sí	No	Criterio
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Negativa del paciente a participar en el estudio.
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Asistencia en cualquier servicio de urgencias, visita no programada u hospitalización por causa respiratoria en los 2 meses previos.
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Inmunosupresión
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	< 40 años.
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Contraindicación para la cirugía.
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Tiempo desde el inicio de la intervención hasta la obtención de la pieza quirúrgica > 2 horas.

En caso de que alguno de los anteriores sea afirmativo, el paciente no podrá entrar en el estudio.

Protocolo.

Los días previos a la intervención:

- Firmar consentimiento informado.
- Aplicar criterios de inclusión y exclusión.
- Recoger datos clínicos
- Recoger espirometría.
- Recoger gasometría.
- Solicitar test de marcha de 6 minutos al gimnasio (tel: 312215).
- Solicitar bioimpedancia al gimnasio (tel: 312215).
- Solicitar analítica completa con bioquímica, hemograma, VSG y sello de RFA.

El día de la intervención:

- Avisar al laboratorio de investigación para que acuda el biólogo a recoger las muestras.
- Medir el tiempo de intervención.
- Tomar las medidas de las piezas que se extraigan para el laboratorio.
- Entregar CRD al investigador principal del proyecto.

Filiación.

Fecha de recogida de los datos: _____.

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

Antecedentes.

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

Nº agudizaciones moderadas-severas¹ 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"/>	Cual: _____
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"/>	Cual: _____
Enfermedad del tejido conectivo.	0. No <input type="checkbox"/>	1. Sí <input type="checkbox"/>	Cual: _____
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"/>	3. Moderada – Severa <input type="checkbox"/>
Diabetes	0. No <input type="checkbox"/>	1. Sin afectación órganos Diana <input type="checkbox"/>	2. Con afectación órganos Diana <input type="checkbox"/>
Enfermedad renal	0. No <input type="checkbox"/>	0. Leve <input type="checkbox"/>	2. Moderada – Severa <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"/>	6. Con metástasis <input type="checkbox"/>

¹ Se considera agudización moderada aquella que hace al enfermo acudir a una visita no programada de su médico de cabecera o un servicio de urgencias, pero no requiere hospitalización. Se considera agudización severa aquella que requiere hospitalización, ya sea en planta o en UCI.

Otros

antecedentes:

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

Tratamientos actuales que esté tomando.

Fármaco y dosis ²	Tomas ²	Nota ³

Pruebas funcionales.

CO espirado: _____

Datos de la espirometría post-broncodilatación:

Peso: _____ . Talla: _____ . IMC: _____ Kg/m²

FVC: _____ mL. FVC: _____ %.

FEV1: _____ mL. FEV1: _____ %.

FEV1/FVC: _____ %. Porcentaje de broncodilatación: _____ %.

Gasometría.

² Anotar la dosis y las tomas al día es especialmente importante en los corticoides inhalados o sistémicos y en cualquier fármaco antiinflamatorio (AINE o COX-2) para calcular la dosis total diaria.

³ Realizar cualquier anotación que el investigador considere apropiada.

Respirando aire ambiente: Sí No: Gafas nasales a _____ lpm.
 Ventimask al _____% a _____ lpm.
pH: _____. pCO2: _____. pO2: _____. CO3H: _____. SatO2: _____.

Intervención.

Fecha intervención: _____.

Estadaje TNM clínico: _____.

Tiempo intervención desde apertura de plano cutáneo hasta extracción de pieza anatómica en minutos: _____.

Medicación tomada por el paciente el día de la intervención: _____

Cigarrillos fumados el día de la intervención antes de la misma: _____.

Tipo de resección practicada: _____. Lóbulo quitado: _____.

Anexo III: Consentimiento Informado

Consentimiento informado

Hoja de información al paciente.

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 como la suya. 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 si algunas moléculas inflamatorias, llamadas reactantes de fase aguda, son producidas por el aparato respiratorio.

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.

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 IV: Índice Charlson-edad

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"/>	Cual: _____
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"/>	Cual: _____
Enfermedad del tejido conectivo.	0. No <input type="checkbox"/>	1. Sí <input type="checkbox"/>	Cual: _____
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"/>	3. Moderada – Severa <input type="checkbox"/>
Diabetes	0. No <input type="checkbox"/>	1. Sin afectación órganos Diana <input type="checkbox"/>	2. Con afectación órganos Diana <input type="checkbox"/>
Enfermedad renal	0. No <input type="checkbox"/>	0. Leve <input type="checkbox"/>	2. Moderada – Severa <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"/>	6. Con metástasis <input type="checkbox"/>
Otros			antecedentes:

Índice de Charlson. Definiciones.

Angina. Pacientes con angina crónica de ejercicio (angina estable), aquellos con by-pass aorto-coronario y los ingresados con angina inestable.

IAM. Pacientes con uno o varios episodios de IAM probables o demostrados (al menos dos criterios: ECG y enzimas).

Insuficiencia cardíaca congestiva. Pacientes con disnea con el esfuerzo o disnea paroxística nocturna que han respondido (sintómicamente o por exploración física) a tratamiento con diuréticos, digitálicos o agentes reductores de la postcarga. No se incluyen a pacientes que estén en tratamiento pero que no se hayan objetivado respuesta a los mismos.

Arritmia. Incluye:

- Pacientes con FA o flutter auricular crónicos,
- síndrome del seno enfermo

- arritmias ventriculares que requieran tratamiento crónico.

Cardiopatía valvular. Incluye:

- Pacientes con una estenosis o insuficiencia valvular aórtica o mitral hemodinámicamente significativa.
- Pacientes con prótesis valvulares aórtica o mitral,
- prolapso valvular mitral sintomático,
- hipertrofia septal asimétrica que requiera tratamiento
- insuficiencia tricuspídea.

Enfermedad vascular periférica. Incluye:

- Pacientes con claudicación intermitente.
- Pacientes con by-pass femoral por insuficiencia arterial.
- Pacientes con episodios de gangrena o insuficiencia arterial aguda.
- Aneurisma no tratado de aorta torácica o abdominal de 6 o más centímetros.

Hipertensión. Incluyen:

- Pacientes con TAD > 120 mmHg.
- Pacientes con TAD entre 100 – 120 mmHg.
- Pacientes con TAD < 100 e hipertensos bien controlados.

Enfermedad cerebrovascular. Incluye a pacientes con historia de accidentes cerebrovasculares con lesiones residuales mínimas o ausentes así como AIT.

Parálisis. Incluye pacientes con hemiplejía o paraplejía como resultado de un accidente cerebrovascular u otras enfermedades.

Demencia. Pacientes con déficit cognitivo crónico.

Otras enfermedades neurológicas. Incluye:

- Enfermedad de Parkinson.
- Epilepsia no controlada.
- Síncope de causa no filiada.

Enfermedad pulmonar. Incluye:

- **Leve.** Pacientes disneicos con actividad física moderada sin tratamiento o disneicos sólo durante las crisis (asma).
- **Moderada.** Pacientes disneicos con actividad física pequeña con o sin tratamiento y aquellos disneicos con actividad moderada a pesar de tratamiento.
- **Severa.** Pacientes con disnea de reposo a pesar de tratamiento, pacientes que requieran oxígeno de manera constante, pacientes con retención de carbónico y aquellos con PO₂ < 60 mmHg (50 Torr).

Diabetes. Incluye:

- **Severa.** Pacientes con afectación de órganos diana (retinopatía, nefropatía o neuropatía).
- **Moderada.** Pacientes con hospitalizaciones por cetoacidosis, coma hiperosmolar, que requieran hospitalizaciones para control de la diabetes y diabetes juveniles o brittle.
- **Leve.** Todo el resto de diabetes que se tratan con insulina y/o ADO, pero no sólo con dieta.

Otros trastornos endocrinos. Hipopituitarismo, insuficiencia adrenal y acidosis recurrente.

Enfermedad renal. Incluye:

- **Severa:** pacientes en diálisis o trasplantados o con uremia.
- **Moderada:** creatinina > 3 mgr/dL.
- **Leve:** creatinina 2 – 3 mgr/dL.

Enfermedad hepática. Incluye:

- **Severa:** cirrosis con hipertensión portal y antecedentes de sangrado por varices (con las tres).
- **Moderada:** cirrosis con hipertensión portal pero sin antecedentes de sangrado por varices.
- **Leve:** cirrosis sin hipertensión portal o hepatitis crónica.

Enfermedad inflamatoria intestinal. Pacientes con colitis ulcerosa o enteritis regional.

Enfermedad ulcerosa péptica. Pacientes que han precisado tratamiento para ulcera, incluyendo a los que han sangrado.

Sangrado gastrointestinal. Pacientes que han tenido un episodio de sangrado gastrointestinal con necesidad de transfusión por causas distintas a la enfermedad ulcerosa péptica.

SIDA. Pacientes con SIDA demostrado o probable.

Linfoma. Pacientes con Hodgkin, linfoma, macroglobulinemia de Waldenström, mieloma y otros linfomas.

Leucemias. Pacientes con leucemia aguda o crónica, mieloides o linfoide y policitemia vera.

Cáncer metastásico. Incluyendo mama, pulmón, colon y otros tumores sólidos.

Tumores. Pacientes con tumores sólidos sin evidencia de metástasis con inicio de tratamiento en los 5 años previos, incluyendo mama, pulmón, colon y otros tumores sólidos.

Enfermedad reumatológica. Pacientes con LES, polimiositis, EMTC, polimialgia reumática y artritis reumatoide moderada-severa.

Coagulopatías. Pacientes con anticoagulantes circulantes u otras coagulopatías.

a) Componente por enfermedades asociadas.

1 punto: Infarto miocárdico, Insuficiencia cardiaca, Enf. Vascular periférica, Enf. Vascular cerebral, Demencia, Enf. Pulmonar crónica, Enf. Tejido conectivo, Ulcera péptica, Hepatopatía leve, Diabetes Mellitus

2 puntos: Hemiplejía, Diabetes con afectación orgánica, Insuficiencia renal, moderada o grave. Cáncer, leucemia, linfoma.

3 puntos: Hepatopatía moderada-severa (ascitis y cirrosis)

6 puntos: Cáncer con metástasis. SIDA

b) Componentes de la edad.

Se añade un punto por cada década la partir de los 50 años : 50-59 años: 1 punto; 60-69: 2 puntos; 70-79: 3 puntos; 80-89: 4 puntos.

VIII. Bibliografia

- 1 Fletcher CM. Chronic bronchitis, its prevalence, nature and pathogenesis. *Am Rev Respir Dis.* 1959; 80: 483-494.
- 2 Smith O, Helms J. Genetic/environmental determinants of adult chronic obstructive pulmonary disease and possible links with childhood wheezing. *Ped Resp Rev.* 2001; 2: 178-183.
- 3 Postma DS, Boezen HM: Rationale for the Dutch hypothesis. Allergy and airway hyperresponsiveness as genetic factors and their interaction with environment in the development of asthma and COPD. *Chest* 2004; 126(2 Suppl): 96S-104S.
- 4 Bleecker ER: Similarities and differences in asthma and COPD. The Dutch hypothesis. *Chest* 2004; 126(2 Suppl): 93S-95S.
- 5 American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995; 152: 77S–121S.
- 6 Siafakas NM, Vermeire P, Pride NB, Paoletti P, Gibson J, Howard P, Yernault JC, Decramer M, Higenbottam T, Postma DS, Rees J. Optimal assessment and management of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Eur Respir J* 1995; 8: 1398–1420
- 7 Dornhorst AC. Respiratory insufficiency. *Lancet* 1955; 268: 1185–7.
- 8 Finkelstein R, Fraser RS, Ghezzi H, Cosio MG. Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995; 152(5 Pt1): 1666-1672.
- 9 Peinado VI, Barbera JA, Abate P, Ramirez J, Roca J, Santos S, Rodriguez-Roisin R. Inflammatory reaction in pulmonary muscular arteries of patients with mild chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 159(5 Pt1): 1605-1611.

-
- 10 Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Paré PD. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 2004; 350(26): 2645-53.
 - 11 Agusti AG, Noguera A, Sauleda J, Sala F, Pons J, Busquets X. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 2003; 21(2): 347-360.
 - 12 Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management and prevention of COPD. Disponible: www.goldcopd.com
 - 13 Han MK, Agusti A, Calverley PM, Celli BR, Criner G, Curtis JL, Fabbri LM, Goldin JG, Jones PW, Macnee W, Make BJ, Rabe KF, Rennard SI, Sciurba FC, Silverman EK, Vestbo J, Washko GR, Wouters EF, Martinez FJ. Chronic obstructive pulmonary disease phenotypes: the future of COPD. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;182(5):598-604.
 - 14 Rodriguez J, Jiang R, Johnson WC, Mackenzie BA, Smith LJ, Barr RG. The Association of Pipe and Cigar Use With Cotinine Levels, Lung Function, and Airflow Obstruction: A Cross-sectional Study. *Ann Intern Med.* 2010; 152(4): 201-10.
 - 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(3): 244-9.
 - 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(10): 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(4): 393-7.

-
- 18 Hegde S, Kuschner WG, Agrawal M. Occupational history quality in patients with newly documented, clinician-diagnosed chronic bronchitis. *Chest* 2009; 135(2): 378-83
 - 19 Blanc PD, Torén K. Occupation in chronic obstructive pulmonary disease and chronic bronchitis: an update. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2007; 11(3): 251-7.
 - 20 Kohansal R, Martinez-Cambor P, Agustí A, Buist AS, Mannino DM, Soriano JB. The natural history of chronic airflow obstruction revisited: an analysis of the Framingham offspring cohort. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009; 180(1): 3-10.
 - 21 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(2): 115-121.
 - 22 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(2): 349-355
 - 23 Larsson C, Eriksson S, Dirksen H. Smoking and intermediate alpha1-antitrypsin deficiency and lung function in middle-aged men. *Br Med J* 1977;2:922-925.
 - 24 Sveger T, Mazodier P. Alpha 1-antitrypsin screening of 18-year-old men. *Thorax* 1979;34:397-400.
 - 25 Demeo DL, Mariani TJ, Lange C, Srisuma S, Litonjua AA, Celedon JC, Lake SL, Reilly JJ, Chapman HA, Mecham BH, Haley KJ, Sylvia JS, Sparrow D, Spira AE, Beane J, Pinto-Plata V, Speizer FE, Shapiro SD, Weiss ST, Silverman EK. The SERPINE2 gene is associated with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Hum Genet.* 2006; 78: 253-64.
 - 26 Chappell S, Daly L, Morgan K, Baranes TG, Roca J, Rabinovich R, Millar A, Donnelly SC, Keatings V, MacNee W, Stolk J, Hiemstra PS, Miniati M, Monti S, O'Connor CM, Kalsheker N. Cryptic haplotypes of SERPINA1 confer

-
- susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease. *Hum Mutat.* 2006 Jan; 27: 103-109.
- 27 Silverman EK, Palmer LJ, Mosley JD, Barth M, Senter JM, Brown A, Drazen JM, Kwiatkowski DJ, Chapman HA, Campbell EJ, Province MA, Reilly JJ, Ginns LC, Speizerl FE, Weiss ST. Genome wide linkage analysis of quantitative spirometric phenotypes in severe early-onset chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Hum Genet.* 2002; 70: 1229-1239.
- 28 Palmer LJ, Celedon JC, Chapman HA, Speizer FE, Weiss ST, Silverman EK. Genome-wide linkage analysis of bronchodilator responsiveness and post-bronchodilator spirometric phenotypes in chronic obstructive pulmonary disease. *Hum Molec Genet* 2003; 12: 1199-1210.
- 29 Wood AM, Stockley RA. The genetics of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res.* 2006;7: 130
- 30 Di Francia M, Barbier D, Mege JL, Orehek J. Tumor necrosis factor-alpha levels and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:1453-5.
- 31 Nguyen LT, Bedu M, Caillaud D, Beaufriere B, Beaujon G, Vasson M, et al. Increased resting energy expenditure is related to plasma TNF-alpha concentration in stable COPD patients. *Clin Nutr* 1999;18:269-74.
- 32 Schols AM, Buurman WA, Staal van den Brekel AJ, Dentener MA, Wouters EF. Evidence for a relation between metabolic derangements and increased levels of inflammatory mediators in a subgroup of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1996;51:819-24.
- 33 Takabatake N, Nakamura H, Abe S, Hino T, Saito H, Yuki H, et al. Circulating leptin in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:1215-9.
- 34 Reid MB, Li YP. Cytokines and oxidative signalling in skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 2001;171:225-32.

-
- 35 De Rossi M, Bernasconi P, Baggi F, De Waal Malefyt R, Mantegazza R. Cytokines and chemokines are both expressed by human myoblasts: possible relevance for the immune pathogenesis of muscle inflammation. *Int Immunol* 2000;12:1329-35.
- 36 Lim S, Roche N, Oliver BG, Mattos W, Barnes PJ, Chung JF. Balance of matrix metalloprotease-9 and tissue inhibitor of metalloprotease-1 from alveolar macrophages in cigarette smokers: regulation by interleukin-10. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162: 1355-60.
- 37 Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2000;343:269-80.
- 38 Di Stefano A, Caramori G, Oates T, Capelli A, Lusuardi M, Gnemmi I, et al. Increased expression of nuclear factor-kappaB in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD. *Eur Respir J*. 2002;20:556-63.
- 39 Thompson RC, Ohlsson K: Isolation, properties, and complete amino acid sequence of human secretory leukocyte protease inhibitor, a potent inhibitor of leukocyte elastase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986, 83:6692-6696.
- 40 Smith CE, Johnson DA: Human bronchial leucocyte proteinase inhibitor. Rapid isolation and kinetic analysis with human leucocyte proteinases. *Biochem J* 1985, 225(2):463-472.
- 41 Ohlsson K, Tegner H, Akesson U: Isolation and partial characterization of a low molecular weight acid stable protease inhibitor from human bronchial secretion. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1977, 358(5):583-589.
- 42 Tomee JF, Hiemstra PS, Heinzl-Wieland R, Kauffman HF: Antileukoprotease: an endogenous protein in the innate mucosal defense against fungi. *J Infect Dis* 1997, 176(3):740-747.
- 43 Fahey JV, Wira CR: Effect of menstrual status on antibacterial activity and secretory leukocyte protease inhibitor production by human uterine epithelial cells in culture. *J Infect Dis* 2002, 185:1606-1613.

-
- 44 Hiemstra PS, Maassen RJ, Stolk J, Heinzl-Wieland R, Steffens GJ, Dijkman JH: Antibacterial activity of antileukoprotease. *Infect Immun* 1996, 64(11):4520-4524.
- 45 Singh PK, Tack BF, McCray PB Jr., Welsh MJ: Synergistic and additive killing by antimicrobial factors found in human airway surface liquid. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000, 279(5):L799-L805.
- 46 Hocini H, Becquart P, Bouhlal H, Adle-Biassette H, Kazatchkine MD, Belec L: Secretory leukocyte protease inhibitor inhibits infection of monocytes and lymphocytes with human immunodeficiency virus type 1 but does not interfere with transcytosis of cell-associated virus across tight epithelial barriers. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000, 7:515-518.
- 47 Beppu Y, Imamura Y, Tashiro M, Towatari T, Ariga H, Kido H: Human mucus protease inhibitor in airway fluids is a potential defensive compound against infection with influenza A and Sendai viruses. *J Biochem* 1997, 121(2):309-316.
- 48 Taggart CC, Greene CM, McElvaney MG, O'Neill S: Secretory leucoprotease inhibitor prevents LPS-induced I κ B α degradation without affecting phosphorylation or ubiquitination. *J Biol Chem* 2002, 277:33648-33653.
- 49 Ding A, Thieblemont N, Zhu J, Jin F, Zhang J, Wright S: Secretory leukocyte protease inhibitor interferes with uptake of lipopolysaccharide by macrophages. *Infect Immun* 1999, 67(9):4485-4489.
- 50 Taggart CC, Cryan SA, Weldon S, Gibbons A, Greene CM, Kelly E, Low TB, O'Neill SJ, McElvaney NG: Secretory leucoprotease inhibitor binds to NF- κ B binding sites in monocytes and inhibits p65 binding. *J Exp Med* 2005, 202:1659-1668.
- 51 Greene CM, McElvaney NG, O'Neill SJ, Taggart CC: Secretory leucoprotease inhibitor impairs toll-like receptor 2- and 4-mediated responses in monocytic cells. *Infect Immun* 2004, 72:3684-3687.
- 52 Song X, Zeng L, Jin W, Thompson J, Mizel DE, Lei K, Billingham RC, Poole AR, Wahl SM: Secretory leukocyte protease inhibitor suppresses the

-
- inflammation and joint damage of bacterial cell wall-induced arthritis. *J Exp Med* 1999, 190:535-542.
- 53 Stockley RA, Morrison HM: Elastase inhibitors of the respiratory tract. *Eur Respir J* 1990, 3 Suppl 9:9s-15s.
- 54 Hill AT, Campbell EJ, Bayley DL, Hill SL, Stockley RA: Evidence for excessive bronchial inflammation during an acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease in patients with alpha(1)-antitrypsin deficiency (PiZ). *Am J Respir Crit Care Med* 1999, 160(6):1968-1975.
- 55 Dijkman JH, Kramps JA, Franken C: Antileukoprotease in sputum during bronchial infections. *Chest* 1986, 89:731-736.
- 56 White AJ, Gompertz S, Bayley DL, Hill SL, O'Brien C, Unsal I, Stockley RA: Resolution of bronchial inflammation is related to bacterial eradication following treatment of exacerbations of chronic bronchitis. *Thorax* 2003, 58:680-685.
- 57 Gompertz S, Bayley DL, Hill SL, Stockley RA: Relationship between airway inflammation and the frequency of exacerbations in patients with smoking related COPD. *Thorax* 2001, 56:36-41.
- 58 Hill AT, Bayley D, Stockley RA: The interrelationship of sputum inflammatory markers in patients with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999, 160:893-898.
- 59 Hill AT, Campbell EJ, Hill SL, Bayley DL, Stockley RA: Association between airway bacterial load and markers of airway inflammation in patients with stable chronic bronchitis. *Am J Med* 2000, 109:288-295.
- 60 Shapiro SD, Senior RM. Matrix metalloproteinases. Matrix degradation and more. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999; 20: 1100-1102.
- 61 Finlay GA, Russell KJ, McMahon KJ, D'Arcy EM, Masterson JB, FitzGerald MX, O'Connor CM: Elevated levels of matrix metalloproteinases in bronchoalveolar lavage fluid of emphysematous patients. *Thorax* 1997, 52:502-506.

-
- 62 Betsuyaku T, Nishimura M, Takeyabu K, Tanino M, Venge P, Xu S, Kawakami Y: Neutrophil granule proteins in bronchoalveolar lavage fluid from subjects with subclinical emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 1999, 159:1985-1991.
- 63 Ugenskienė R, Sanak M, Sakalauskas R, Szczeklik A. Genetic polymorphisms in chronic obstructive pulmonary disease. *Medicina (Kaunas)*. 2005;41:17-21.
- 64 Joos L, Paré PD, Sandford AJ. Genetic risk factors for chronic obstructive pulmonary disease. *Swiss Med Wkly*. 2002;132:27-37.
- 65 Hiemstra PS, Van Wetering S, Stolk J. Neutrophil serine proteinases and defensins in chronic obstructive pulmonary disease: effects on pulmonary epithelium. *Eur Respir J*. 1998;12:1200-8.
- 66 Finlay GA, O'Driscoll LR, Russell KJ, D'Arcy EM, Masterson JB, FitzGerald MX, et al. Matrix metalloproteinase expression and production by alveolar macrophages in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156:240-7.
- 67 Ohnishi K, Takagi M, Kurokawa Y, Satomi S, Kontinen YT. Matrix metalloproteinase-mediated extracellular matrix protein degradation in human pulmonary emphysema. *Lab Invest*. 1998;78:1077-87.
- 68 Segura-Valdez L, Pardo A, Gaxiola M, Uhal BD, Becerril C, Selman M. Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD. *Chest*. 2000;117:684-94.
- 69 Imai K, Dalal SS, Chen ES, Downey R, Schulman LL, Ginsburg M, et al. Human collagenase (matrix metalloproteinase-1) expression in the lungs of patients with emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163:786-91.
- 70 Churg A, Wang RD, Tai H, Wang X, Xie C, Dai J, Shapiro SD, Wright JL. Macrophage metalloelastase mediates acute cigarette smoke-induced inflammation via tumor necrosis factor-alpha release. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003; 167: 1083-9.
- 71 Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol*. 1997;74:111-122.

-
- 72 Brew K, Dinakarbandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1477:267–283.
- 73 Crapo JD. Oxidative stress as an initiator of cytokine release and cell damage. *Eur Respir J. (Suppl)* 2003; 44: 4S-6S.
- 74 Rajendrasozhan S, Yang SR, Edirisinghe I, Yao H, Adenuga D, Rahman I. Deacetylases and NF-kappaB in redox regulation of cigarette smoke-induced lung inflammation: epigenetics in pathogenesis of COPD. *Antioxid Redox Signal*. 2008; 10(4): 799-811.
- 75 Cavalcante AGM, de Bruin PFC. The role of oxidative stress in COPD: current concepts and perspectives. *J Bras Pneumol*. 2009; 35(12): 1227-37.
- 76 MacNee W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med*. 2007; 28(3): 479-513.
- 77 Repine JE, Bast A, Lankhorst I. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. Oxidative Stress Study Group. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997; 156: 341-57.
- 78 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.
- 79 Rahman I, MacNee W. Role of oxidants/antioxidants in smoking induced lung diseases. *Free Radic Biol Med*. 1996; 21: 669-81.
- 80 Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Involvement of superoxide and myeloperoxidase in oxygen-dependent killing of *Staphylococcus aureus* by neutrophils. *Infect Immun*. 1996; 64: 3512-7.
- 81 Winterbourn CC, Kettle AJ. Reactions of superoxide with myeloperoxidase and its products. *Jpn J Infect Dis*. 2004; 57: S31-3.
- 82 Ito K, Ito M, Elliott WM, Cosio B, et al. Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2005;352:1967-76.

-
- 83 Demedts IK, Demoor T, Bracke KR, Joos GF, Brusselle GG. Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. *Respir Res.* 2006;7:53.
- 84 Degterev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. *Oncogene.* 2003;22:8543–8567
- 85 Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS, Dixit VM. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem.* 1998;273.
- 86 Kasahara Y, Tuder RM, Taraseviciene-Stewart L, Le Cras TD, Abman S, Hirth PK, Waltenberger J, Voelkel NF. Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *J Clin Invest.* 2000;106:1311–1319.
- 87 Ingel K Demedts, Tine Demoor, Ken R Bracke, Guy F Joos, and Guy G Brusselle. *Respir Res.* 2006; 7(1): 53.
- 88 Tsuji T, Aoshiba K, Nagai A. Alveolar cell senescence in patients with pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 174:886-93.
- 89 Saetta M, Di Stefano A, Turato G, Facchini FM, Corbino L, Mapp CE, et al. CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157:822-6.
- 90 Retamales I, Elliott WM, Meshi B, Coxson HO, Pare PD, Sciruba FC, et al. Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164:469-73.
- 91 Agusti A, MacNee W, Donaldson K, Cosio M. Hypothesis: does COPD have an autoimmune component? *Thorax.* 2003;58:832-4.
- 92 Cosio BG, Agustí A. Autoinmunidad en la EPOC. *Arch Bronconeumol.* 2005;41:10-4.
- 93 Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;153:530-4.

-
- 94 MacNee W, Wiggs B, Belzberg AS, Hogg JC. The effect of cigarette smoking on neutrophil kinetics in human lungs. *N Engl J Med*. 1989;321:924-8.
- 95 Di Stefano A, Capelli A, Lusuardi M, et al. Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158:1277-85.
- 96 Soler P, Moreau A, Basset F, Hance AJ. Cigarette smoking-induced changes in the number and differentiated state of pulmonary dendritic cells/Langerhans cells. *Am Rev Respir Dis*. 1989;139: 1112-7.
- 97 Guía de práctica clínica de diagnóstico y tratamiento de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica. SEPAR-ALAT, 2009. www.separ.es
- 98 Celli BR, Macnee W. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *Eur Respir J* 2004; 23(6):932-946.
- 99 Calle Rubio M, Rodríguez-Hermosa JL, Ortega González A, Alvarez-Sala Walther JL. Fenotipos de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *Med Clin Monogr*. 2007; 8:22
- 100 Anderson D, MacNee W. Targeted treatment in COPD: A multi-system approach for a multi-system disease. *Int J Chron Obst Pulm Dis*. 2009; 4:321-35
- 101 Garcia-Aymerich J, Agustí A, Barberà JA, Belda J, Farrero E, Ferrer A, et al. La heterogeneidad fenotípica de la EPOC. *Arch Bronconeumol*. 2009; 45:129-38.
- 102 Mahler DA, Weinberg DH, Wells CK, et al. The measurement of dyspnea. Contents, interobserver agreement and physiologic correlates of two new clinical indexes. *Chest* 1984; 85: 751-8
- 103 Hajiro T, Nishimura K, Tsukino M, Ikeda A, Koyama H, Izumi T. Comparison of discriminative properties among disease specific questionnaires for measuring health-related quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 785-90

-
- 104 Burge PS, Calverly PM, Jones PW, Spencer S, Anderson J, Maslen TK. Randomised, double blind, placebo controlled study of fluticasone propionate in patients with moderate to severe COPD: the ISOLDE trial. *Br Med J* 2000; 320: 1297-303
- 105 The Lung Health Study Research Group. Effect of inhaled triancinolone on the decline in pulmonary function in COPD. *N Engl J Med* 2000; 343: 1902-9
- 106 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.
- 107 Marc Miravittles, Juan José Soler-Cataluña, Myriam Calle, Jesús Molina, Pere Almagro, José Antonio Quintana, Juan Antonio Riesco, Juan Antonio Trigueros, Pascual Piñera, Adolfo Simón, Juan Luis Rodríguez-Hermosa, Esther Marco, Daniel López, Ramon Coll, Roser Coll-Fernández, Miguel Ángel Lobo, Jesús Díez, Joan B. Soriano, Julio Ancochea. Guía española de la EPOC (GesEPOC). Actualización 2014. *Arch Bronconeumol.* 2014;50(Supl.1):1-16 - Vol. 50 Núm.Supl.1
- 108 Guía de Práctica Clínica para el Diagnóstico y Tratamiento de Pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) - Guía Española de la EPOC (GesEPOC). *Arch Bronconeumol.* 2012; 48 Supl 1:2-58.
- 109 Hurst JR, Vestbo J, Anzeto A, Locantore N, Mullerova H, Tal-Singer R, et al. Susceptibility to exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 2010;363:1128-38.
- 110 Soler Cataluña JJ, Martinez Garcia MA, Catalan Serra P. The frequent exacerbator. A new phenotype in COPD? *Hot Topics Respir Med.* 2011; 6: 7-12.
- 111 Quint JK, Donaldson GC, Hurst JR, Goldring JJP, Seemungal TR, Wedzicha JA. Predictive accuracy of patient-reported exacerbation frequency in COPD. *Eur Respir J.* 2011;37:501-7.

-
- 112 Bafadhel M, McKenna S, Terry S, Mistry V, Reid C, Haldar P, et al. Acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. Identification of biologic clusters and their biomarkers. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;184:662-71.
- 113 Siafakas NM, Vermeire P, Pride NB, Paoletti P, Gibson J, Howard P, et al. Optimal assessment and management of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). The European Respiratory Society Task Force. *Eur Respir J* 1995;8:1398-420.
- 114 Vos T, Flaxman AD, Naghavi M, Lozano R, Michaud C, Ezzati M, et al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet.* 2012;380:2163-96.
- 115 Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet.* 2012;380:2095-128.
- 116 Sobradillo-Peña V, Miravittles M, Jiménez CA, Gabriel R, Viejo JO, Masa JF, et al. Estudio epidemiológico de l 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(7): 574-580.a enfermedad pulmonar obstructiva crónica en España (IBERPOC): prevalencia de síntomas respiratorios crónicos y limitación del flujo aéreo. *Arch Bronconeumol.* 1999; 35: 159-66.
- 117 Miravittles M, Soriano JB, García-Río F, Muñoz L, Duran-Tauleria E, Sanchez G, Sobradillo V, Ancochea J. Prevalence of COPD in Spain: impact of undiagnosed COPD on quality of life and daily life activities. *Thorax* 2009; 64(10): 863-8.
- 118 Mathers CD, Roncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLOS Medicine.* 2006;3: 2011-30.
- 119 Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997; 349(9064): 1498-504.

-
- 120 López-Campos JL, Ruiz-Ramos M, Soriano JB. Mortality trends in chronic obstructive pulmonary disease in Europe, 1994-2010: a joinpoint regression analysis. *Lancet Respir Med*. 2014 Jan;2(1):54-62.
- 121 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(10): 473-8.
- 122 INE, Instituto Nacional de Estadística. Encuesta de Morbilidad Hospitalaria.2005 <http://www.ine.es/jaxi/menu.do?type=pcaxis&path=%2Ft15/p414&file=inebase&L=0>.
- 123 Génova-Maleras R, Álvarez-Martín E, Morant-Ginestar C. Carga de enfermedad y tendencias de morbilidad de la población española. En: Abellán-García A, Puyol-Antolín R. Envejecimiento y dependencia. Una mirada al panorama futuro de la población española. Madrid: Mondial Assistance. 2006; 107-124.
- 124 Izquierdo JL. The burden of COPD in Spain: results from the confronting COPD survey. *Respir Med*. 2003; 97 Suppl C:S61-9.
- 125 Masa JF, Sobradillo V, Villasante C, Jiménez-Ruiz CA, Fernández-Fau L, Viejo JL et al. Costs of Chronic Obstructive Pulmonary Disease in Spain: Estimation from a population-based study. *Arch Bronconeumol*. 2004; 40 (2) 72-9.
- 126 García-Ruiz AJ, Leiva-Fernández F, Martos-Crespo F, Montesinos AC, Prados Torres D et al. Utilización de recursos y costes directos sanitarios de la EPOC en Atención Primaria de Salud (Estudio EPOC-AP). *Rev Esp Econ Salud*. 2003; 2(3):176-181.
- 127 Izquierdo-Alonso JL, de Miguel-Díez J. Economic impact of pulmonary drugs on direct costs of stable chronic pulmonary disease. *COPD*. 2004; 1(2):215-23.
- 128 Miravittles M, Murio C, Guerrero T, Gisbert R on behalf of the DAFNE study group. Costs of chronic bronchitis and COPD. A one year follow-up study. *Chest*. 2003; 123: 784-791.

-
- 129 Malher DA, Rosiello RA, Harver A, Lentine T, McGovern JF, Daubenspeck JA. Comparison of clinical dyspnea ratings and psychophysiological measurements of respiratory sensation in obstructive airway disease. *Am Rev Respir Dis* 1987;165:1229-33.
- 130 Volkone N, Dajezman E, Colacone A, Kreisman H. The relationship between pulmonary function and dyspnea in obstructive lung disease. *Chest* 1989;96:1247-51.
- 131 Bestall JC, Paul EA, Garrod R, Garnham R, Jones PW, Wedzicha JA. Usefulness of the Medical Research Council (MRC) dyspnea scale as a measure of disability in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1999;54:581-6.
- 132 Marín JM, Carrizo SJ, Gascón M, Sánchez A, Gallego B, Celli BR. Inspiratory capacity, dynamic hyperinflation, breathlessness, and exercise performance during the 6-minute-walk test in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:1395-9.
- 133 O'Donnell DE. Hyperinflation, dyspnea, and exercise intolerance in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3(2): 180-4.
- 134 Ream E, Richardson A. Fatigue: a concept analysis. *Int J Nurs Stud* 1996; 33(5): 519-29.
- 135 Bültmann U, Kant I, Kasl SV, Beurskens AJ, van den Brandt PA. Fatigue and psychological distress in the working population: psychometrics, prevalence, and correlates. *J Psychosom Res* 2002; 52(6): 445-52.
- 136 Small S, Lamb M. Fatigue in chronic illness: the experience of individuals with chronic obstructive pulmonary disease and with asthma. *J Adv Nurs* 1999; 30(2): 469-78.
- 137 Theander K, Unosson M. Fatigue in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Adv Nurs* 2004; 45(2): 172-7.
- 138 Theander K, Jakobsson P, Torstensson O, Unosson M. Severity of fatigue is related to functional limitation and health in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Nurs Pract* 2008; 14(6): 455-62.

-
- 139 Breslin E, van der Schans C, Breukink S, Meek P, Mercer K, Volz W, Louie S. Perception of fatigue and quality of life in patients with COPD. *Chest* 1998; 114(4): 958-64.
- 140 Garcia-Aymerich J, Serra I, Gómez FP, Farrero E, Balcells E, Rodríguez DA, de Batlle J, Gimeno E, Donaire-Gonzalez D, Orozco-Levi M, Sauleda J, Gea J, Rodriguez-Roisin R, Roca J, Agustí AG, Antó JM. Physical Activity and Clinical and Functional Status in COPD. *Chest* 2009; (in press).
- 141 Garcia-Aymerich J, Lange P, Benet M, Schnohr P, Antó JM. Regular physical activity modifies smoking-related lung function decline and reduces risk of chronic obstructive pulmonary disease: a population-based cohort study. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175(5): 458-63.
- 142 American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 4th Edn. Text revision. Washington, American Psychiatric Association, 2000.
- 143 Kapella MC, Larson JL, Patel MK, Covey MK, Berry JK. Subjective fatigue, influencing variables, and consequences in chronic obstructive pulmonary disease. *Nurs Res* 2006; 55(1): 10-7.
- 144 Curt GA, Breitbart W, Cella D, Groopman JE, Horning SJ, Itri LM, Johnson DH, Miaskowski C, Scherr SL, Portenoy RK, Vogelzang NJ. Impact of cancer-related fatigue on the lives of patients: new findings from the Fatigue Coalition. *Oncologist* 2000; 5(5): 353-60.
- 145 Lacasse Y, Goldstein R, Lasserson TJ, Martin S. Pulmonary rehabilitation for chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2006; (4): CD003793.
- 146 Theander K, Jakobsson P, Jörgensen N, Unosson M. Effects of pulmonary rehabilitation on fatigue, functional status and health perceptions in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a randomized controlled trial. *Clin Rehabil* 2009; 23(2): 125-36.

-
- 147 Debigaré R, Côté CH, Maltais F. Peripheral muscle wasting in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Clinical relevance and mechanisms. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1712-7.
 - 148 Roberto Rodriguez-Roisin, MD. Toward a Consensus Definition for COPD Exacerbations. *CHEST* 2000; 117:398S–401S.
 - 149 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(4): 172-6.
 - 150 Ballester F, Pérez-Hoyos S, Rivera ML, Merelles T, Tenías JM, Soriano JB, et al. Patrones de frecuentación y factores asociados al ingreso en el hospital de las urgencias hospitalarias por asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *Arch Bronconeumol*. 1999;35:20-6.
 - 151 Grupo para el Estudio de la Infección en Urgencias. Estudio epidemiológico de las infecciones en el Área de Urgencias. *Emergencias*. 2000;12:80-9.
 - 152 MacFarlane JT, Colville A, Guion A, MacFarlane RM, Rose DH. Prospective study of aetiology and outcome of adult lower respiratory tract infections in the community. *Lancet*. 1993;341:511-4.
 - 153 Soler JJ. El papel de las exacerbaciones en la historia natural de la EPOC. *Arch Bronconeumol*. 2007; 43 (2):55-8.
 - 154 Papi A, Bellettato CM, Braccioni F, Romagnoli M, Casolari P, Caramori G, et al. Infections and airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease severe exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173:1114-21.
 - 155 Miravittles M. Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease exacerbations. *Clin Pulm Med*. 2002;9:191-7.
 - 156 Jones PW. Health status measurement in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2001;56:880-7.
 - 157 American Thoracic Society. Dyspnea: mechanisms, assessment and management: a consensus statement. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:321-40.

-
- 158 McCathie HCF, Spence SH, Tate RL. Adjustment to chronic obstructive pulmonary disease: the importance of psychological factors. *Eur Respir J* 2002;19:47-53.
- 159 Güell R, Casan P, Sengenís M, Morante F, Belda J, Guyatt GH. Quality of life in patients with chronic respiratory disease: the Spanish version of the Chronic Respiratory Questionnaire. *Eur Respir J* 1998;11:55-60.
- 160 Jones PW, Quirk FH, Baveystock CM, Littlejohns P. A self-complete measure of health status for chronic airflow limitation. The St. George's Respiratory Questionnaire. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145:1321-7.
- 161 Guyatt GH, Berman LB, Townsend M, Pugsley SO, Chambers LW. A measure of quality of life for clinical trials in chronic lung disease. *Thorax* 1987; 42: 773-778.
- 162 Ferrer M, Villasante C, Alonso J, Sobradillo V, Gabriel R, Vilagut G, et al. Interpretation of quality of life scores from the St. George's Respiratory Questionnaire. *Eur Respir J* 2002;19:405-13.
- 163 García-Olmos L, Alberquilla A, Ayala V, García-Sagredo P, Morales L, Carmona M, et al. Comorbidity in patients with chronic obstructive pulmonary disease in family practice: a cross sectional study. *BMC Fam Pract.* 2013;14:1.
- 164 Huiart L, Erns P, Suissa S. Cardiovascular morbidity and mortality in COPD. *Chest* 2005; 128: 2640-6.
- 165 Hansell AL, Walk JA, Soriano JB. What do chronic obstructive pulmonary disease patients die from? A multiple cause coding analysis. *Eur Respir J* 2003; 22: 809-14.
- 166 Schunemann HJ, Dorn J, Grant BJ, Winkelstein W Jr, Trevisan M. Pulmonary function is a long-term predictor of mortality in the general population: 29-year follow-up of the Buffalo Health Study. *Chest* 2000; 118: 656-64.
- 167 Bang KM, Gergen PJ, Kramer R, Cohen B. The effect of pulmonary impairment on all-cause mortality in a national cohort. *Chest* 1993; 103: 536-40.

-
- 168 Lindberg A, Larsson LG, Ronmark E, Lundback B. Co-morbidity in mild-to-moderate COPD: comparison to normal and restrictive lung function. *COPD*.2011; 8(6):421-428.
- 169 Shorr AF. Anemia in chronic obstructive pulmonary disease: epidemiology and economic implications. *Curr Med Res Opin*. 2008;24:1123-30.
- 170 Portillo K, Belda J, Anton P, Casan P. Alta frecuencia de anemia en pacientes de EPOC admitidos en un hospital terciario. *Rev Clin Esp*. 2007;207:383-7.
- 171 De Miguel J, Castuera A, Pérez C, Lucero S, Ferreira A, Fuentes M, et al. Anemia en la EPOC. Prevalencia y factores asociados. *Rev Patol Respir*. 2008;11(Suppl 1):50.
- 172 Weiss G, Goodnough LT. Anemia of chronic disease. *N Engl J Med*. 2005;352:1011-23.
- 173 Schols AM, Soeters PB, Dingemans AM, Mostert R, Frantzen PJ, Wouters EF. Prevalence and characteristics of nutritional depletion in patients with stable COPD eligible for pulmonary rehabilitation. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147(5): 1151-6.
- 174 Agustí AG, Sauleda J, Miralles C, Gómez C, Togores B, Sala E, et al. Skeletal muscle apoptosis and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166(4): 485-9.
- 175 Agustí A, Morla M, Sauleda J, Saus C, Busquets X. NF-kappa B activation and iNOS upregulation in skeletal muscle of patients with COPD and low body weight. *Thorax* 2004; 59(6): 483-7.
- 176 Schols AM. Nutrition in chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Pulm Med* 2000; 6(2): 110-5.
- 177 Sridhar MK. Why do patients with emphysema lose weight? *Lancet* 1995; 345: 1190-1.

-
- 178 Schols AM, Slangen J, Volovics L, Wouters EF. Weight loss is a reversible factor in the prognosis of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157(6 Pt 1): 1791-7.
- 179 Engelen MP, Schols AM, Lamers RJ, Wouters EF. Different patterns of chronic tissue wasting among patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Nutr* 1999; 18(5): 275-80.
- 180 Mannino DM, Thorn D, Swensen A, Holguin F. Prevalence and outcomes of diabetes, hypertension and cardiovascular disease in COPD. *Eur Respir J*.2008; 32(4):962-969.
- 181 Martinez CH, Miguel DJ, Mannino DM. Defining COPD-related comorbidities, 2004-2014. *J COPD F*. 2014; 1(1): 51-63.
- 182 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(1): 23-28.
- 183 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(3): 250-255.
- 184 Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999; 340(6): 448-454.
- 185 Kushner I, Gewurz H., Benson M.D. C-reactive protein and the acute phase response. *J. Lab. Clin. Med.* 1981. 97: 739-749.
- 186 Gauldi J, Richards C, Northemann W, Fey G, Baumann H. IFN β /BSF2/IL-6 is the monocyte-derived HSF that regulates receptor specific acute phase gene regulation in hepatocytes. *Ann N Acad Sci* 1989; 557: 46-59.
- 187 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(2): 81-8.

-
- 188 Heinrich P. C., Castell J. V., Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 1990; 265: 621- 636.
- 189 Kushner I, Mackiewicz A., Baumann H. Acute Phase Response: an overview. *Acute Phase Protein. Molecular biology, biochemistry and clinical applications* 1993; pp 3- 19 CRC Press London.
- 190 B. Clyne and J. S. Olshaker, "The C-reactive protein," *Journal of Emergency Medicine*, vol. 17, no. 6, pp. 1019–1025, 1999.
- 191 Marhaug G, Dowton SB. Serum amyloid A: an acute phase apolipoprotein and precursor of AA amyloid. *Baillieres Clin Rheumatol* 1994; 8: 553-573.
- 192 Koutsokera A, Kiropoulos TS, Nikoulis DJ, Daniil ZD, Tsolaki V, Tanou K, Papaioannou AI, Germenis A, Gourgoulialis KI, Kostikas K. Clinical, functional and biochemical changes during recovery from COPD exacerbations. *Respir Med*. 2009;103(6):919-26.
- 193 Smith DJ, Yerkovich ST, Towers MA, Carroll ML, Thomas R, Upham JW. Reduced soluble receptor for advanced glycation end-products in COPD. *Eur Respir J*. 2011;37(3):516-22.
- 194 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(3):269-78.
- 195 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.
- 196 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(11): 7311-6.
- 197 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: 1058-65.

-
- 198 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(7): 574-580.
- 199 Weis N, Almdal T. C-reactive protein--can it be used as a marker of infection in patients with exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease? *Eur J Intern Med* 2006; 17(2): 88-91
- 200 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(4891): 655-657.
- 201 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(6): 427-435.
- 202 King VL, Thompson J, Tannock LR. Serum amyloid A in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2011 Aug;22(4):302-7.
- 203 Engstrom G, Lind P, Hedblad B, et al. Lung function and cardiovascular risk: relationship with inflammation-sensitive plasma proteins. *Circulation* 2002; 106(20): 2555-60.
- 204 Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-26
- 205 Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, et al. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1997; 336: 973-9.
- 206 Arroyo-Espliguero R, Avanzas P, Cosín-Sales J, et al. C-reactive protein elevation and disease activity in patients with coronary heart disease. *Eur Heart J* 2004; 25: 401-8.
- 207 Arroyo-Espliguero R, Avanzas P, Kaski JC. Atherosclerotic coronary artery disease: usefulness of C-reactive protein for the identification of the vulnerable plaque and the vulnerable patient. *Rev Esp Cardiol* 2004; 57: 375-8.

-
- 208 Zouridakis E, Avanzas P, Arroyo-Espliguero R, et al. Markers of inflammation and rapid coronary artery disease progression in patients with stable angina pectoris. *Circulation* 2004; 110: 1747-53.
- 209 Koenig W, Lowel H, Baumert J, et al. C-reactive protein modulates risk prediction based on the Framingham Score: implications for future risk assessment: results from a large cohort study in southern Germany. *Circulation* 2004; 109: 1349-53.
- 210 Verma S, Li S, Badiwala M, et al. Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein. *Circulation* 2002; 105: 1890-6.
- 211 Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1135-43.
- 212 De Torres JP, Córdoba-Lanus E, López-Aguilar C, Muros de Fuentes M, Montejo de Garcini A, Aguirre-Jaime A, et al. C-reactive protein levels and clinically important predictive outcomes in stable COPD patients. *Eur Respir J* 2006; 27: 902-7.
- 213 Izquierdo JL, Almonacid C, Parra T, Pérez J. Inflamación y estrés oxidativo en dos fenotipos de EPOC. *Arch Bronconeumol* 2006; 42: 332-7.
- 214 AHA/CDC Statement. *Circulation* 2003; 107: 499-511.
- 215 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: 1514-9.
- 216 Man SFP, Connett JE, Anthonisen NR, Wise RA, Tashkin DP, Sin DD. C-reactive protein and mortality in mild to moderate chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2006; 61: 849-53.
- 217 Said SI. The lung as a metabolic organ. *N Engl J Med* 1968; 279(24): 1330-1334.

-
- 218 Groome PA, Bolejack V, Crowley JJ, Kennedy C, KrasnikM, Sobin LH, Goldstraw P; IASLC International Staging Committee; Cancer Research and Biostatistics; Observers to the Committee; Participating Institutions. The IASLC Lung Cancer Staging Project: validation of the proposals for revision of the T, N, and M descriptors and consequent stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol* 2007; 2: 694-705.
- 219 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; 2(5147): 257-266.
- 220 Charlson M, Szatrowski TP, Peterson J, Gold J. Validation of a combined comorbidity index. *J Clin Epidemiol* 1994; 47(11): 1245-1251.
- 221 de Torres JP, Pinto-Plata V, Casanova C, Mullerova H, Córdoba-Lanús E, Muros de Fuentes M, Aguirre-Jaime A, Celli BR. C-reactive protein levels and survival in patients with moderate to very severe COPD. *Chest* 2008; 133(6): 1336-43.
- 222 Manual SEPAR de procedimientos Vol. 3. Barcelona: Ed Doyma, 1987
- 223 Spira A, Beane J, Pinto-Plata V, Kadar A, Liu G, Shah V, Celli B, Brody J. Gene Expression Profiling of Human Lung Tissue from Smokers with Severe Emphysema *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 31: 601-610.
- 224 Woo Jin Kim, Jae Hyun Lim, Jae Seung Lee, Sang-Do Lee, Ju Han Kim, and Yeon-Mok Oh, Comprehensive Analysis of Transcriptome Sequencing Data in the Lung Tissues of COPD Subjects, *International Journal of Genomics*, vol. 2015, Article ID 206937, 9 pages, 2015.
- 225 Barnes PJ, Chowdhury B, Kharitonov SA, Magnussen H, Page CP, Postma D, Saetta M Pulmonary biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Jul 1; 174(1):6-14.
- 226 Barnes PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol*. 2008 Mar; 8(3):183-92.

-
- 227 Franciosi LG, Page CP, Celli BR, Cazzola M, Walker MJ, Danhof M, Rabe KF, Della Pasqua OE. Markers of disease severity in chronic obstructive pulmonary disease. *Pulm Pharmacol Ther.* 2006;19:189–199.
- 228 Kostikas K, Bakakos P, Papiris S, Stolz D, Celli BR. Systemic biomarkers in the evaluation and management of COPD patients: are we getting closer to clinical application? *Curr Drug Targets.* 2013;14:177–191.
- 229 Baines KJ, Pavord ID, Gibson PG. The role of biomarkers in the management of airways disease. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2014;18:1264–1268.
- 230 Cazzola M, MacNee W, Martinez FJ, Rabe KF, Franciosi LG, Barnes PJ, Brusasco V, Burge PS, Calverley PM, Celli BR, et al. Outcomes for COPD pharmacological trials: from lung function to biomarkers. *Eur Respir J.* 2008;31:416–469.
- 231 Maestrelli P, Saetta M, Di Stefano A, Calcagni PG, Turato G, Ruggieri MP, Roggeri A, Mapp CE, Fabbri LM. Comparison of leukocyte counts in sputum, bronchial biopsies, and bronchoalveolar lavage. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;152:1926–1931.
- 232 Haslam PL, Baughman RP. Report of ERS Task Force: guidelines for measurement of acellular components and standardization of BAL. *Eur Respir J.* 1999;14:245–248.
- 233 Meyer KC, Raghu G, Baughman RP, Brown KK, Costabel U, du Bois RM, Drent M, Haslam PL, Kim DS, Nagai S, et al. An official American Thoracic Society clinical practice guideline: the clinical utility of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;185:1004–1014.
- 234 Faul JL, Demers EA, Burke CM, Poulter LW. The reproducibility of repeat measures of airway inflammation in stable atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160:1457–1461.

-
- 235 BR Leaker, GC Nicholson, FY Ali, N Daudi, BJ O'Connor and PJ Barnes. Bronchoabsorption; a novel bronchoscopic technique to improve biomarker sampling of the airway. *Leaker et al. Respiratory Research* (2015) 16:102.
- 236 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(2): 379-84.
- 237 Jerome S. Brody and Avrum Spira. State of the Art: Chronic Obstructive Pulmonary Disease, Inflammation, and Lung Cancer. *Am Thorac Soc Vol 3*. pp 535–538, 2006
- 238 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(8): 1231-8.
- 239 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.
- 240 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;12:26.
- 241 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(7): 760-5.
- 242 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(11): 1207-14.

-
- 243 Bozinovski S, Uddin M, Vlahos R, Thompson M, Mc Qualter JL, Merritt AS, Wark PA, Hutchinson A, Irving LB, Levy BD, Anderson GP. Serum amyloid A opposes lipoxin A₄ to mediate glucocorticoid refractory lung inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jan 17;109(3):935-40.
- 244 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 Jul;32(1):92-7.
- 245 Pinto-Plata V, Toso J, Lee K, Park D, Bilello J, Mullerova H, De Souza MM, Vessey R, Celli B. Profiling serum biomarkers in patients with COPD: associations with clinical parameters. *Thorax*. 2007 Jul;62(7):595-601.