



**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**COMPARACIÓN DE LA PRODUCCIÓN LOCAL Y SISTÉMICA DE  
MEDIADORES INFLAMATORIOS EN DISTINTOS GRUPOS  
CELULARES DE PACIENTES CON ENFERMEDAD PULMONAR  
OBSTRUCTIVA CRÓNICA**

Trabajo que presenta la licenciada Cecilia López Ramírez  
para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Sevilla, 2019

D. JOSE LUIS LÓPEZ-CAMPOS BODINEAU, profesor asociado del departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla.

CERTIFICA: Que Dña. Cecilia López Ramírez, Licenciada en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo titulado **“Comparación de la producción local y sistémica de mediadores inflamatorios en distintos grupos celulares de pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica”**. Revisado el presente trabajo por creer que reúne las condiciones necesarias, estimamos que puede ser presentado como Tesis Doctoral.

En Sevilla, 2019

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



Doctoranda, Cecilia López Ramírez.



CECILIA LÓPEZ RAMÍREZ.  
Licenciado en Medicina y Cirugía  
Universidad de Sevilla

Especialista en Neumología  
Hospital Virgen del Rocío. Universidad de Sevilla.

Director de Tesis:  
JOSÉ LUIS LÓPEZ –CAMPOS BODINEAU

Profesor Titular- Departamento de Medicina, Universidad de Sevilla.  
Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS).  
CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES). Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España.

© 2019 Ceclopram

# Agradecimientos

---

Quiero dar las gracias a Elena Arellano Orden por darme la oportunidad de llevar a cabo este trabajo en el grupo de investigación del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS).

Gracias a José Luis López-Campos Bodineau, director y tutor de la presente tesis doctoral, de una manera especial por todo lo que me ha enseñado y por el tiempo que ha dedicado a guiarme y a ayudarme a que este trabajo tomase forma.

Gracias a todos mis compañeros de la Unidad médico-quirúrgica de enfermedades respiratorias del Hospital Virgen del Rocío, colaboradores en la toma y procesado de las muestras, sin los cuales no hubiera sido posible la realización de esta tesis.

Gracias a mi familia, a mis padres y hermanos, por entenderme y hacer que cada día merezca la pena. Y en especial a Juan Antonio, por estar siempre a mi lado.

# Tabla de contenido

---

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1. PRESENTACIÓN .....	2
2. ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA .....	4
2.1. <i>Concepto</i> .....	4
2.2. <i>Epidemiología</i> .....	7
2.2.1. Prevalencia.....	7
2.2.2 Morbilidad y Mortalidad .....	9
2.2.3 Impacto económico y social.....	11
2.3 <i>Factores de riesgo. Etiología</i> .....	12
Tabaquismo.....	12
Biomasa .....	13
Contaminación atmosférica .....	14
Exposición laboral.....	14
Factores genéticos.....	14
Otros factores .....	15
2.4 <i>Diagnóstico</i> .....	16
2.5 <i>Estadios de la enfermedad</i> .....	18
2.6 <i>Fisiopatología</i> .....	20
2.7 <i>Patogenia</i> .....	22

2.7.1 Inflamación local.....	23
2.7.2 Disbalance oxidativo.....	24
2.7.3 Disbalance proteasas/antiproteasas .....	24
2.7.4 Apoptosis .....	25
<b>3. INFLAMACIÓN PULMONAR Y SISTÉMICA EN LA EPOC.....</b>	<b>26</b>
<i>3.1 Consecuencias de la inflamación local.....</i>	<i>26</i>
<i>3.2 Inflamación sistémica y sus consecuencias.....</i>	<i>29</i>
3.2.1 Enfermedad cardiovascular.....	31
3.2.2 Diabetes .....	32
3.2.3 Depresión y ansiedad .....	32
3.2.4 Desnutrición y miopatía .....	32
3.2.5 Cáncer de pulmón. Otras.....	33
<b>4. REACTANTES DE FASE AGUDA EN LA INFLAMACIÓN SISTÉMICA. ....</b>	<b>34</b>
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>38</b>
1. HIPÓTESIS .....	39
2. OBJETIVOS.....	40
<b>MÉTODO.....</b>	<b>41</b>
1. OBJETIVO 1: EXPRESIÓN GÉNICA TISULAR .....	42
<i>1.1. Población de estudio.....</i>	<i>42</i>
<i>1.2 Extracción de muestra quirúrgica y sanguínea.....</i>	<i>44</i>
<i>1.3 Métodos de medición. ....</i>	<i>45</i>
<i>1.4 Determinaciones de laboratorio.....</i>	<i>46</i>
1.4.1 Expresión génica de RFA en tejidos y sangre.....	46
1.4.2 Medición de marcadores inflamatorios en el plasma.....	48

2.OBJETIVO 2: ESTUDIO EN MODELOS CELULARES .....	49
2.1 <i>Estudios in vitro con células procedentes de líneas comerciales</i> .....	49
2.1.1 Cultivo <i>in vitro</i> de células humanas.....	49
2.1.2 Experimentos de estimulación de las células con IL-1 .....	49
2.1.3 Estudios de expresión génica.....	50
2.1.4 Cuantificación proteica.....	51
3. ASPECTOS ÉTICOS. ....	52
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO. ....	53
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>54</b>
1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA .....	55
2. OBJETIVO 1: EXPRESIÓN GÉNICA TISULAR DE BIOMARCADORES Y CORRELACIÓN CON EXPRESIÓN PROTEICA EN SUERO .....	59
2.1. <i>Expresión de RFA en parénquima pulmonar</i> .....	59
2.2. <i>Expresión de RFA en arteria pulmonar</i> .....	63
2.3. <i>Expresión de RFA en leucocitos de sangre periférica</i> .....	66
2.4. <i>Comparación en la expresión de RFA entre los diferentes tipos de muestras</i> .....	69
2.5. <i>Asociaciones entre la expresión de los RFA en los diferentes tipos de muestras.</i> .....	72
2.6. <i>Asociaciones entre la expresión génica de RFA y sus concentraciones plasmáticas.</i> .....	72
3. OBJETIVO 2. RFA EN CÉLULAS RESPIRATORIAS Y COMPARACIÓN CON HEPATOCITOS .	78
3.1. <i>Evaluación de la expresión génica y concentraciones proteicas entre tipos celulares.</i> .....	78

3.2. <i>Evaluación de la expresión génica y concentraciones proteicas entre pulmón e hígado</i> .....	95
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>105</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>118</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>120</b>
I. CONSENTIMIENTO INFORMADO .....	121
II. CUADERNOS DE RECOGIDA DE DATOS (CRD).....	125
III. ÍNDICE CHARLSON-EDAD .....	128
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>132</b>



# Índice de tablas

---

Tabla 1. Secuencia genotipada, sentido y antisentido, en cada uno de los genes estudiados.....	48
Tabla 2. Características generales de la población de estudio.....	57
Tabla 3. Descripción del tipo de cirugía e histología de los tumores.....	58
Tabla 4. Expresión génica de AAS y PCR de células epiteliales, fibroblastos y hepatocitos frente a controles.....	79

# Índice de Figuras

---

Figura 1. Combinaciones fenotípicas según GesEPOC.....	18
Figura 2. Esquema de evaluación clínica del paciente con EPOC, propuesto por la estrategia GOLD 2017.....	20
Figura 3. . Esquema del proceso de inflamación que tiene lugar durante el desarrollo de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).....	29
Figura 4. Niveles de expresión génica de los RFA de los fumadores sanos (controles) y de los pacientes con EPOC en parénquima pulmonar.....	60
Figura 5. Perfil de expresión PCR (A) y subtipos de AAS (B,C,D) en el parénquima pulmonar de acuerdo al grado de la EPOC. ....	61
Figura 6. Niveles de expresión génica de los RFA de los fumadores sanos (controles) y de los pacientes con EPOC en arteria pulmonar.....	63
Figura 7. Perfil de expresión PCR (A) y subtipos de AAS (B,C,D) en arteria pulmonar de acuerdo al grado de la EPOC.....	64
Figura 8. Niveles de expresión génica de los RFA de los fumadores sanos (controles) y de los pacientes con EPOC en leucocitos de sangre periférica.....	66
Figura 9. Perfil de expresión PCR (A) y subtipos de AAS (B,C,D) en las células sanguíneas de acuerdo al grado de la EPOC.....	67
Figura 10. Comparación de los niveles de expresión génica de distintos RFA en diferentes tejidos (células de la sangre, arteria pulmonar y parénquima pulmonar) de los pacientes con EPOC.....	70

Figura 11. Concentraciones plasmáticas de PCR y AAS en los fumadores sanos (controles, CNT) y los pacientes EPOC.....	73
Figura 12. Concentraciones plasmáticas de AAS en los fumadores sanos (controles, CNT) y los pacientes con diferentes estadios de la EPOC.....	75
Figura 13. Correlación entre niveles plasmáticos de PCR y AAS.....	77
Figura 14. Expresión génica de PCR (A) y subtipos de AAS (B,C,D) en células epiteliales bronquiales estimuladas frente a controles.....	80
Figura 15. Expresión génica de PCR y subtipos de AAS en células epiteliales bronquiales estimuladas.....	82
Figura 16. Concentración proteica de PCR y AAS en células epiteliales bronquiales estimuladas frente a controles.....	83
Figura 17. Expresión génica de PCR (A) y subtipos de AAS (B,C,D) en fibroblastos pulmonares estimulados frente a controles.....	84
Figura 18. Expresión génica de PCR y subtipos de AAS en fibroblastos pulmonares estimulados.....	86
Figura 19. Concentración proteica de PCR y AAS en fibroblastos pulmonares estimulados frente a controles.....	87
Figura 20. Expresión génica de PCR (A) y subtipos de AAS (B,C,D) en hepatocitos CRL2706 estimulados (sanos) frente a controles.....	88
Figura 21. Expresión génica de PCR y subtipos de AAS en hepatocitos CRL2706 estimulados (sanos).....	90
Figura 22. Expresión génica de PCR (A) y subtipos de AAS (B,C,D) en hepatocitos HEP3B estimulados (hepatocarcinoma) frente a controles.....	91
Figura 23. Expresión génica de PCR y subtipos de AAS en hepatocitos HEP3B estimulados (hepatocarcinoma).....	93

Figura 24. Concentración proteica de PCR y AAS en hepatocitos HEP3B estimulados (hepatocarcinoma) frente a controles.....	93
Figura 25. Expresión génica de AAS1 tras incubación con IL-1 a las 24 y las 48 horas.....	96
Figura 26. Expresión génica de AAS2 tras incubación con IL-1 a las 24 y las 48 horas.....	97
Figura 27. Expresión génica de AAS4 tras incubación con IL-1 a las 24 y las 48 horas.....	98
Figura 28. Expresión génica de PCR tras incubación con IL-1 a las 24 y las 48 horas.....	99
Figura 29. Concentraciones proteicas de PCR y AAS en los diferentes grupos celulares.....	101

# Abreviaturas

---

<b>AAS</b>	Amiloide A sérico
<b>ATS</b>	American Thoracic Society
<b>AVAD</b>	Años de Vida Ajustados por Discapacidad
<b>BC</b>	Bronquitis crónica
<b>BQ</b>	Bronquiectasias
<b>CAT</b>	COPD Assessment Test
<b>COPD-PS</b>	Chronic Obstructive Pulmonary Disease-Population Screener
<b>CP</b>	Cáncer de pulmón
<b>ECV</b>	Enfermedades cardiovasculares
<b>EPOC</b>	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
<b>ERS</b>	European Respiratory Society
<b>FEV<sub>1</sub></b>	Volumen espiratorio forzado en el primer segundo
<b>FVC</b>	Capacidad vital forzada
<b>GBD</b>	Global Burden of Disease
<b>GesEPOC</b>	Guía Española de la EPOC (GesEPOC)
<b>GOLD</b>	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
<b>HAP</b>	Hipertensión arterial pulmonar
<b>IFN <math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>IL</b>	Interleucina
<b>LLN</b>	Límite inferior del intervalo de normalidad
<b>MHC</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad
<b>MMP</b>	Metaloproteasas de matriz extracelular
<b>mMRC</b>	Medical Research Council modificada
<b>NF-kB</b>	Nuclear factor kappa-B
<b>NO<sub>2</sub></b>	Dióxido de nitrógeno
<b>OCFA</b>	Obstrucción crónica al flujo aéreo
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud

<b>PaCO<sub>2</sub></b>	Presión parcial arterial de carbónico
<b>PaO<sub>2</sub></b>	Presión parcial arterial de oxígeno
<b>PCR</b>	Proteína C reactiva
<b>PEF</b>	Pico de flujo
<b>PM</b>	Partículas en suspensión.
<b>RFA</b>	Reactantes de fase aguda
<b>STAT-4</b>	Signal transducer and activator of transcription-4
<b>TLR</b>	Toll-like receptors
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento del endotelio vascular

# Introducción

---

# 1. Presentación

La presente Tesis Doctoral se enmarca en el estudio de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) como enfermedad con repercusión sistémica. Durante la presente introducción abordaremos de manera ordenada el estado del tema de estudio hasta el momento de comenzar nuestras experiencias en el laboratorio. En concreto abordaremos:

- Una breve descripción del concepto actual de enfermedad, incidiendo en la importancia de la determinación funcional para el diagnóstico y su categorización.
- Una breve descripción de su epidemiología, centrándonos en su prevalencia, mortalidad y morbilidad.
- Conceptos básicos sobre su diagnóstico y detección en pacientes con factores de riesgo.
- Describir la patogenia de la enfermedad, discutiendo sobre los principales tipos celulares implicados en su génesis.
- Evaluar la importancia de la inflamación sistémica dentro del nuevo marco conceptual de la EPOC como enfermedad con repercusión sistémica.



- Describir los principales reactantes de fase aguda mayores como parte de la inflamación sistémica y base de nuestro estudio.
- Evaluar que mediadores inflamatorios en células pulmonares forman parte de la inflamación sistémica, estudiando la importancia de la activación de dicha respuesta a nivel pulmonar mediante su comparación con la síntesis fisiológica a nivel hepático.

## **2. Enfermedad pulmonar obstructiva crónica**

### **2.1. Concepto**

La EPOC es una enfermedad multidimensional, inflamatoria y progresiva que afecta no sólo a las vías respiratorias y los pulmones, sino también a la circulación pulmonar, a la musculatura respiratoria y a diversos órganos extrapulmonares. En 2004, la European Respiratory Society (ERS) y la American Thoracic Society (ATS) publicaron un documento de consenso en el que se define la EPOC como “un proceso prevenible y tratable, caracterizado por una limitación al flujo aéreo no completamente reversible, generalmente progresiva y asociada a una respuesta inflamatoria anormal de los pulmones a partículas o gases nocivos, fundamentalmente producidos por el hábito tabáquico”<sup>1</sup>.

Por otra parte, la Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) publicó en 2017 una definición similar: “la EPOC es una enfermedad común, prevenible y tratable, que se caracteriza por la presencia de síntomas respiratorios persistentes y una limitación al flujo aéreo que se debe a anomalías en las vías aéreas y/o en los alveolos, generalmente causado por una exposición significativa a partículas nocivas o gases”<sup>2</sup>. Sin embargo, actualmente, aunque parece haber un consenso en

cómo definir y denominar la enfermedad, aún existen aspectos no exentos de debate en relación a la definición e identificación de esta enfermedad.

En primer lugar, el concepto de EPOC lleva implícito una serie de definiciones cuyo significado es necesario entender en el marco de la enfermedad. Es destacable el establecer que se trata de una entidad «prevenible y tratable». Con ello se pretenden destacar dos aspectos clave de la EPOC: por un lado, su posible prevención mediante la evitación de su principal factor de riesgo, el consumo de tabaco y, por otro, su definición sobre la base de una alteración funcional (obstrucción crónica y poco reversible). La limitación u obstrucción crónica al flujo aéreo (OCFA) característica de la EPOC es consecuencia de la enfermedad de la vía aérea pequeña (bronquiolitis obstructiva) y la destrucción parenquimatosa (enfisema). La bronquitis crónica (BC) constituye la manifestación clínica fundamental de la afectación del árbol traqueo-bronquial en la EPOC. Por consenso internacional, se acepta que un paciente padece BC si presenta tos y expectoración durante más de tres meses al año, dos años consecutivos, en ausencia de otras causas que puedan explicarla como bronquiectasias (BQ) <sup>1</sup>. La bronquiolitis, es decir, la inflamación de la pequeña vía aérea periférica de calibre inferior a 2 mm también está presente en la EPOC. De hecho, es su presencia la que contribuye de forma más notable a la limitación del flujo aéreo que caracteriza la enfermedad <sup>3</sup>. El enfisema pulmonar se define en términos anatomopatológicos como la destrucción permanente de los espacios aéreos más allá del bronquiolo terminal <sup>4</sup>. La desaparición de las paredes alveolo-capilares supone la coalescencia de alveolos vecinos, causa la aparición de auténticas cavidades en el seno del parénquima pulmonar (bullas), dificulta el tránsito de la sangre a través de la circulación pulmonar, lo que es motivo de hipertensión arterial pulmonar (HAP) y cor pulmonale, y altera de forma notable el intercambio pulmonar de gases, especialmente durante el ejercicio. Actualmente sabemos que el concepto de OCFA empleado para definir la enfermedad no se justifica por parámetros clínicos o anatomopatológicos, sino que implica objetivar una OCFA mediante la realización de una espirometría en todos los casos. Sin embargo, padecer una OCFA no equivale a tener una EPOC, ya que existen otras enfermedades que también pueden cursar con una obstrucción en la espirometría (como el asma bronquial, las BQ, las bronquiolitis o lesiones residuales por tuberculosis, entre otras). Por otro lado, el concepto de OCFA ha sufrido un ligero matiz al definirse inicialmente como descenso de los flujos que no cambian notablemente durante varios meses de

seguimiento <sup>5</sup> hasta el concepto actual de obstrucción no completamente reversible. Este pequeño cambio denota que la EPOC admite que algunos pacientes pueden tener cierto grado de reversibilidad bronquial en la prueba broncodilatadora o tras un tiempo de tratamiento. El punto de corte para establecer una prueba broncodilatadora significativa también ha variado discretamente y se ha situado en 12% y 200 mL <sup>6</sup>. Inicialmente, se consideró que una prueba broncodilatadora positiva sería un indicador de una buena respuesta a tratamiento. Sin embargo, esto no se ha demostrado y actualmente no se recomienda el porcentaje de cambio de volumen espirado durante el primer segundo (FEV<sub>1</sub>) ni para el diagnóstico de la enfermedad, ni para el diagnóstico diferencial con asma, ni para predecir la respuesta al tratamiento <sup>6</sup>.

En segundo lugar, la afectación extrapulmonar resulta un aspecto esencial para evaluar el impacto global de la enfermedad en el individuo. Se reconoce el papel de uno de sus mecanismos patogénicos más importantes: la respuesta inflamatoria. Es evidente que, en su concepción actual, el término EPOC no sólo se circunscribe exclusivamente al pulmón, sino que también tiene consecuencias sistémicas significativas, siendo por ello una enfermedad multicompartimental en la que conceptos clásicos como los de BC o enfisema y otros más novedosos como inflamación sistémica, agudizaciones o afectación vascular, son algunas de las posibles manifestaciones de la enfermedad que dan lugar a los distintos fenotipos de la misma. Los denominados efectos sistémicos de la EPOC son de descripción relativamente reciente. Aunque en la actualidad es imposible determinar si se trata de una mera asociación de circunstancias o si la EPOC es per se la responsable de la afectación sistémica de muchos pacientes, lo bien cierto es que las guías de actuación clínica no se limitan exclusivamente al aspecto pulmonar de la EPOC <sup>2,7</sup>. Aspectos tales como la inflamación sistémica, la HAP, la comorbilidad cardiovascular, la malnutrición, la disfunción muscular esquelética, las alteraciones endocrino-metabólicas, la anemia, la ansiedad o la comorbilidad infecciosa, deben ser tenidos en cuenta en el manejo de la EPOC <sup>8</sup>.

## 2.2. Epidemiología

El estudio de la epidemiología de la EPOC es una de las prioridades de la investigación de la enfermedad. Los principales datos sobre epidemiología de la EPOC son de prevalencia, mortalidad y morbilidad. La estimación de estas cifras varía entre países, y, en general, están relacionadas de manera directa con la prevalencia del tabaquismo. Factores como la composición y edad de la muestra escogida en la población general, los criterios diagnósticos utilizados, la exposición de la población al tabaquismo y, probablemente, a otros factores ambientales, unido al problema que se deriva de la diversa nomenclatura empleada en el pasado para referirse a la EPOC, explica las diferencias importantes que se pueden encontrar <sup>9</sup>.

### 2.2.1. Prevalencia

La EPOC es la enfermedad respiratoria más frecuente en adultos y cuya prevalencia aumenta con la edad <sup>10</sup>. El estudio de la prevalencia de la EPOC muestra grandes variaciones dependiendo de la región geográfica estudiada y los criterios diagnósticos empleados para identificar casos. En términos generales, cualquiera que sea la enfermedad, la prevalencia estimada depende de la definición que se use para el diagnóstico. En el caso de la EPOC, se han utilizado diferentes métodos, incluyendo el diagnóstico médico <sup>11</sup>, el diagnóstico basado en la presencia de síntomas respiratorios o el diagnóstico basado en la presencia de limitación crónica al flujo aéreo (con o sin una prueba broncodilatadora). Como es de esperar, cada uno de estos métodos aporta resultados muy diversos <sup>12</sup>. Desde que se publicaron los documentos GOLD, se aceptó el requisito de la espirometría posbroncodilatadora para establecer el diagnóstico de EPOC, lo que sigue considerándose actualmente como el método de referencia. A pesar de que la espirometría se ha considerado como un método más costoso y requiere una mayor infraestructura que otras formas simplificadas de evaluación de la función pulmonar, es conocido que obtiene cifras de prevalencia más reales. Por este motivo la espirometría es el método recomendando por la guía española de la EPOC (GesEPOC) <sup>13</sup>. De manera complementaria, se han publicado algunos cuestionarios que podrían ser utilizados como herramienta de cribado para la detección de casos como el COPD-PS (Chronic Obstructive Pulmonary Disease-Population Screener) <sup>14</sup>.

En los últimos años se han realizado estudios epidemiológicos fiables y reproducibles independientemente de la región geográfica y de los recursos económicos disponibles. Estos estudios se han llevado a cabo según el consenso de la ATS con la ERS y del documento GOLD de 2010<sup>6,15</sup>.

En España, se han realizado diversos estudios epidemiológicos de base poblacional, el más importante de los cuales es el estudio IBERPOC, realizado a finales del siglo pasado y diseñado para medir la prevalencia y la variación de la distribución de la EPOC en España. Según los resultados de este estudio, la prevalencia de síntomas respiratorios crónicos para la población general está situada en el 4,8% (intervalo de confianza al 95%: 4,1 – 5,4%) para la BC, 40% (IC95%: 38,7 – 41,7%) para la presencia de sibilantes y 13,5% (IC95%: 12,5 – 14,6%) para la tos crónica. De tal manera que el 48% (IC95%: 46,4 – 49,5%) de la población española refería algún síntoma respiratorio. Al incluir la espirometría como diagnóstico, la prevalencia de la enfermedad se estimó en 9,1% (IC95%: 8,1 – 10,2%), que ha sido considerada como prevalencia de la EPOC en España<sup>16</sup>. Un dato interesante del estudio IBERPOC es que no había un diagnóstico previo de EPOC en el 78,2% de los pacientes incluidos y diagnosticados de EPOC<sup>17</sup>, con lo que la prevalencia de la enfermedad se habría infraestimado considerablemente si se hubiera empleado los informes médicos como método de estimación de la prevalencia.

Otro estudio epidemiológico de base poblacional en España es el estudio EPI-SCAN que actualiza en 2007 los datos de prevalencia en nuestro país<sup>18</sup>. Según el estudio EPI-SCAN se estima que, entre los 21,4 millones de españoles con una edad entre 40 y 80 años hay 2.185.764 que presentan EPOC. Por sexos, las cifras corresponden a 1.571.868 varones y 628.102 mujeres. Y ya que el 73% aún no está diagnosticado, puede decirse que más de 1.595.000 españoles aún no lo sabe y, por tanto, no recibe ningún tratamiento para su EPOC<sup>19</sup>.

Sin embargo, según recientes estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de la Carga Mundial de Enfermedades (Global Burden of Disease Study —GBD—) 2015,<sup>20</sup> el número de casos de EPOC en España ha aumentado de los 2,1 millones estimados según EPISCAN en 2007 a 2,9 millones en 2015. En cambio, la prevalencia mundial tiende a la baja, puesto que la estimación de casos de EPOC en el mundo ya no es de 240 millones anuales sino de 174 millones.

Finalmente, es importante conocer otros estudios de prevalencia de la EPOC a nivel mundial. El estudio BOLD (proyecto Burden of Lung Disease)<sup>21</sup>, obtuvo datos de prevalencia de 12 lugares del mundo de los 5 continentes y determinó una prevalencia global para el estadio GOLD II o superior de 10,1% (11,8% para los hombres y 8,5% para las mujeres). En este estudio, la prevalencia de la EPOC estaba relacionada con la edad y el consumo de tabaco en paquetes-año con aumentos significativos de prevalencia al aumentar alguna de estas dos variables, pero con mayor variación para las mujeres, según el área geográfica. Curiosamente, la prevalencia de los no fumadores fue similar a la de los fumadores con un consumo < 10 paq-año. Además, recientemente, siguiendo la propuesta de un estudio anterior de la iniciativa PLATINO<sup>22</sup> (Proyecto Latinoamericano de Investigación en Obstrucción pulmonar), BOLD amplía la opción de utilizar el pico de flujo (PEF) para el cribado de la EPOC. Así, en un sofisticado análisis, BOLD propone 2,2 l/m<sup>2</sup>/s como el umbral de pico de flujo pre-broncodilatación expresado en unidades de litros por segundo por la altura en metros al cuadrado para identificar EPOC moderada a grave<sup>23</sup>. Este umbral de 2,2 l/m<sup>2</sup>/s ha sido propuesto porque tiene la mejor sensibilidad frente al valor predictivo positivo y la mejor relación coste-beneficio entre los diferentes escenarios de la combinación del PEF, cuestionarios y espirometría. En definitiva, BOLD concluye que la medición del PEF en todo el mundo, sin broncodilatación, y dentro del contexto de cualquier sistema de salud, es un paso hacia adelante rápido, barato y cómodo para mejorar la detección de casos de EPOC.

### **2.2.2 Morbilidad y Mortalidad**

La EPOC es una causa elevada de morbilidad, mortalidad y discapacidad en España. Los datos de morbilidad en EPOC presentan problemas metodológicos, ya que están sujetos a registros sobre la accesibilidad de la atención sanitaria y la utilización de los servicios sanitarios (número de visitas al médico, los ingresos por agudizaciones y las visitas a urgencias) de cada área geográfica. Siendo la EPOC una enfermedad crónica y progresiva es esperable encontrar una alta carga de enfermedad y morbilidad.

Los estudios de carga de enfermedad tienen como objetivo medir y comparar la pérdida de salud de la población por distintas causas, considerando las consecuencias mortales y no mortales de las enfermedades<sup>24</sup> a través del indicador sintético “Años de

Vida Ajustados por Discapacidad” (AVAD). Los AVAD resultan de la combinación de los Años de Vida Perdidos (AVP) o mortalidad prematura y los Años Vividos con Discapacidad (AVD) o mala salud.

Según la Encuesta de Morbilidad Hospitalaria de 2005 las altas por EPOC supusieron el 6,5% del total. En España las enfermedades respiratorias suponen la 4ª causa de carga de enfermedad (7,5% del total de AVAD) con un componente importante de discapacidad. En hombres, la EPOC se encuentra entre las enfermedades con un mayor número de AVAD (4,1% sobre el total de AVAD), siendo en mujeres la carga de enfermedad algo inferior (1,3% sobre el total de AVAD) <sup>25</sup>. En 2015 la EPOC causó el 2,6% de AVAD.

Las estimaciones globales de mortalidad realizadas por la OMS recientemente actualizadas, reiteran que la EPOC ha pasado de ser la quinta causa de muerte en 1990 a la cuarta desde el año 2000, sólo por detrás de la enfermedad coronaria isquémica dentro de las enfermedades cardiovasculares (ECV), la cerebrovascular y el Alzheimer, y por delante del cáncer de pulmón (CP), y se espera que sea la tercera en 2020 <sup>26,20</sup>. Según estos datos, en 2015, la EPOC provocó el fallecimiento de 3,2 millones de personas, lo que supuso un aumento de la mortalidad por esta causa del 11,6% respecto a 1990, y que dado su relación con el tabaquismo la convierten en una de las mayores causas de muerte evitable.

Conocer el motivo por el que un paciente con EPOC fallece es importante porque puede identificar dianas terapéuticas. Múltiples estudios coinciden en señalar la dificultad que supone especificar la causa última de la muerte <sup>27</sup>, más aún en los pacientes con EPOC, ya que con frecuencia padecen enfermedades graves cuya presentación final es muy similar a la EPOC <sup>28</sup>. La mortalidad global a los 4-7 años en los pacientes diagnosticados con EPOC, con una media de 65-70 años, oscila entre el 30-48% <sup>29</sup>, con tasas de mortalidad del 3,6% anual <sup>30</sup>, y de 12,7 fallecimientos por cada 100 personas-año de seguimiento <sup>31</sup>, dependiendo, sobre todo, de la severidad de la obstrucción aérea en el momento del diagnóstico <sup>29,32,33</sup>. Los pacientes con EPOC grave fallecen al menos 3 años antes que aquellos con enfermedad moderada, y estos, 4 años antes que los pacientes control a igualdad de edad y sexo <sup>34</sup>. La insuficiencia respiratoria es la principal causa de mortalidad en los pacientes con EPOC que fallecen en el hospital <sup>35,36</sup>, pero aun así constituyen menos del 50% de los muertos de ese grupo,



correspondiendo el resto a ECV, infecciones respiratorias, embolismos pulmonares, CP y otros tumores <sup>37,38</sup>. El análisis de mortalidad realizado durante el estudio TORCH (Toward a Revolution in COPD Health) <sup>39</sup> reveló que, de manera global, la mayoría de los pacientes (35%) fallecieron por causa respiratoria, seguidos de las causas cardiovasculares (26%) y del cáncer (21%).

Por otro lado, las causas de mortalidad varían según el grado de gravedad de la EPOC. En los pacientes con EPOC leve o moderada la principal causa de mortalidad es el cáncer y las ECV, mientras que en los EPOC con FEV<sub>1</sub> < 60% el fallo respiratorio es la causa más importante <sup>40</sup>. De cualquier modo, parece que los pacientes con EPOC fallecen más como consecuencia de una enfermedad concomitante que por la misma EPOC.

### **2.2.3 Impacto económico y social**

En España, el impacto que la EPOC genera sobre los costes económicos es considerable. El coste anual por paciente con EPOC es alto en comparación con otras patologías respiratorias crónicas, como el asma <sup>41</sup>. Existen unos costes hospitalarios notablemente mayores, explicados en parte por la mayor edad media de los pacientes y por el progresivo e irreversible deterioro de la función respiratoria <sup>42,43</sup>. La EPOC ocasiona el 10% de las consultas de neumología, el 7% de todos los ingresos hospitalarios y el 35% de las incapacidades laborales permanentes, por lo que el impacto sanitario, social y económico es elevado. Varios estudios realizados en España, resto de Europa y América han tratado de estimar el coste global de la enfermedad. Los resultados son dispares, y entre las razones que pueden explicar esto, se encuentran las diferencias en el coste sanitario entre países y el método empleado.

En España los datos del estudio IBERPOC permitieron estimar que el coste de la EPOC fue de 238,82 millones de euros, derivados únicamente de costes sanitarios directos. Se hizo multiplicando el coste por paciente diagnosticado de EPOC en el estudio, por el número de pacientes extrapolados de la prevalencia de la enfermedad encontrada en el propio estudio IBERPOC <sup>44</sup>. La mayor carga era por hospitalizaciones (41%) seguido del gasto en tratamiento farmacológico (37%). Del coste total del tratamiento farmacológico de la EPOC, los fármacos administrados para el tratamiento

de base suponen el 58,8%, y el tratamiento de las agudizaciones, el 32,1%; el resto se debe a la oxigenoterapia. En 2005, el coste de la EPOC grave por sujetos diagnosticados era de 1352,76 €/año. Esto supone 1,6 veces el coste de la EPOC moderada (824,60 €) y más del doble del coste de la EPOC leve (665,75 €). Si consideramos el gasto farmacológico en su conjunto (habitual más agudización), éste último predomina en los tres niveles de gravedad.

Los diversos factores que aumentarán los costes sanitarios de la EPOC en los próximos años, podríamos relacionarlos con el envejecimiento, la introducción de nuevos tratamientos o la financiación de otros como la rehabilitación, la deshabituación tabáquica o el incremento de la supervivencia de los pacientes con insuficiencia respiratoria crónica. Por este motivo, se deduce que la atención a pacientes con enfermedades crónicas complejas como la EPOC debe abordarse desde una perspectiva distinta de la del tratamiento de las enfermedades agudas, siendo necesarias actuaciones que optimicen los recursos empleados en el seguimiento y en el tratamiento de la enfermedad, prestando especial atención a su diagnóstico temprano.

## 2.3 Factores de riesgo. Etiología

En nuestro país como en la mayoría del mundo industrializado, actualmente disponemos de suficiente evidencia científica para afirmar que el tabaco es el principal factor de riesgo para desarrollar una EPOC <sup>1,45</sup>. Sin embargo, el hecho de que no todos los fumadores desarrollen la enfermedad, hace que el tabaco se considere un factor patogénico necesario, pero no suficiente, para el desarrollo de la misma, postulándose la necesidad de que coexistan otros factores relacionados. Entre ellos cabe destacar factores de tipo individual y de tipo ambiental como describimos a continuación.

### **Tabaquismo**

Sabemos que los fumadores tienen mayor prevalencia de síntomas respiratorios, de alteraciones funcionales y de un mayor declive del FEV<sub>1</sub> que los no fumadores. Por otro lado, al dejar de fumar, este declive del FEV<sub>1</sub> disminuye y se produce una mejoría

de la función pulmonar y una disminución de los síntomas respiratorios y de la hiperreactividad bronquial <sup>46</sup>, con un impacto en la mortalidad <sup>47</sup>. Por lo tanto, la abstención del hábito tabáquico se ha convertido en uno de los pilares del tratamiento de la EPOC. Una proporción de casos de EPOC ocurre en personas que no han fumado nunca, pero que han estado expuestas al llamado humo ambiental del tabaco o tabaquismo pasivo. Diversos estudios observacionales han demostrado que el tabaquismo pasivo se asocia a un mayor riesgo de EPOC <sup>48,49</sup>. Uno de estos estudios, realizado en Cantón, China, con más de 6.000 participantes no fumadores, la mayoría mujeres (89,6%) y edad media de 61 años, en el cual más de la mitad de los participantes afirmó ser fumador pasivo, observó que la duración del tabaquismo pasivo estaba directamente relacionada con el riesgo de padecer EPOC <sup>49</sup>.

En nuestro medio se ha evaluado la repercusión que la exposición pasiva al tabaco tiene sobre la función pulmonar de niños y adolescentes, concluyendo que los parámetros espirométricos fueron significativamente inferiores entre los niños con algún progenitor fumador, siendo mayor el efecto negativo del tabaquismo pasivo sobre los parámetros relacionados con la vía aérea distal <sup>50</sup>.

## **Biomasa**

A nivel mundial, aproximadamente el 50% de todas las casas y el 90% de casas rurales usan combustible de biomasa (madera, carbón vegetal, otras materias vegetales y estiércol) y el carbón como su fuente principal de energía doméstica <sup>51</sup>. Según un informe de la OMS, una encuesta realizada entre 2002 y 2003 mostró que una cuarta parte de las EPOC en mujeres que nunca habían fumado se relacionaba con el uso de biomasa como combustible doméstico <sup>52</sup>. Algunas investigaciones hallaron una relación directa entre el riesgo de estas mujeres de desarrollar EPOC y el número de horas que permanecían en la cocina. Este riesgo fue independiente del tabaquismo, por lo que antecedentes de exposición a humo de leña o carbón deben interrogarse, en particular en personas no fumadoras o con escasa exposición al tabaco.

## **Contaminación atmosférica**

La contaminación ambiental es un factor de riesgo para el desarrollo de EPOC. Los contaminantes específicos estudiados en su relación con EPOC son el ozono, las partículas en suspensión (PM), monóxido de carbono, dióxido de sulfuro, dióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>), y otros gases <sup>51</sup>. Varios estudios han mostrado la relación entre el grado de contaminación y la presencia de síntomas y enfermedad respiratoria. En el estudio SAPALDIA (Swiss Cohort Study on Air Pollution and Lung Diseases in Adults), los investigadores encontraron relación entre los valores de PM10 (partículas en suspensión con un diámetro menor de 10 µm) y NO<sub>2</sub> exterior y una capacidad vital forzada (FVC) disminuida. Además, se constató que la exposición de larga duración a la contaminación ambiental, incluso con bajos valores, se asociaba con una mayor prevalencia de síntomas respiratorios <sup>53</sup>.

## **Exposición laboral**

La identificación epidemiológica de EPOC ocupacional se basa en constatar una prevalencia elevada de EPOC entre los trabajadores expuestos a determinadas sustancias. En este sentido, existen numerosos estudios poblacionales que indican que una proporción de los casos de EPOC en la sociedad se deben a la exposición en el lugar de trabajo a polvos, humos, vapores y gases nocivos. Según la ATS, el riesgo atribuible poblacional (proporción de casos de una enfermedad debidos a una determinada exposición) de la EPOC debida a la exposición ocupacional se estima en alrededor del 15%. Los trabajadores de industrias textiles, plásticos, gomas, madera, papel, así como los agricultores, mineros y trabajadores de la construcción tienen un riesgo aumentado de presentar EPOC por la exposición en el trabajo a sustancias, como grano, isocianatos, cadmio, carbón y otros polvos minerales, metales pesados y humo <sup>54</sup>. Estos hallazgos justifican la investigación de la exposición profesional en todos los pacientes y adquirir medidas preventivas en el lugar de trabajo siempre que sea posible.

## **Factores genéticos**

El déficit de alfa-1-antitripsina es el principal ejemplo de un factor genético. Se trata de una enfermedad hereditaria producida por una mutación en el brazo largo del

cromosoma 14, que se manifiesta clínicamente por enfisema pulmonar, cirrosis hepática y, con menor frecuencia, paniculitis o vasculitis ANCA positivas. La alfa-1-antitripsina es una glicoproteína sintetizada predominantemente en el hígado, cuya función principal es inhibir la elastasa del neutrófilo y otras proteasas <sup>55</sup>, habiéndose descrito en los últimos años propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas e inmunomoduladoras. Se estima que en España pueden existir alrededor de 12.000 individuos con el déficit grave homocigoto, siendo a pesar de ello una enfermedad infradiagnosticada y cuando se llega al diagnóstico suele ser en fases avanzadas de la enfermedad pulmonar. La prevalencia del déficit de alfa-1-antitripsina en paciente con EPOC se estima entre el 1 y el 3%. Es por ello que, según recomendaciones de la OMS y de las sociedades científicas ATS/ERS <sup>56</sup>, se indica realizar la cuantificación sérica de alfa-1-antitripsina a todos los pacientes con EPOC dentro del esquema diagnóstico habitual de esta enfermedad, y en aquellos con concentraciones bajas completar el diagnóstico con la determinación del fenotipo o genotipo.

### **Otros factores**

Otros factores de riesgo que se han descrito son la edad, el sexo, las infecciones respiratorias repetidas en la infancia o adultos a edades tempranas y factores socioeconómicos <sup>57</sup>. La mayoría de estos factores asociados con el desarrollo de EPOC no pueden ser modificados. La prevalencia de la EPOC aumenta con la edad y es más frecuente en hombres, pero este hecho parece estar más relacionado con el efecto acumulativo de otros factores de riesgo a los que se ha expuesto el individuo a lo largo de la vida que con la edad o el sexo. De esta manera, numerosos estudios han indicado que las mujeres tienen un riesgo mayor de presentar EPOC. Prescott et al. <sup>58</sup> observaron que la pérdida de función pulmonar asociada al tabaco era mayor en las mujeres, cuyo mecanismo podría estar en relación con el hecho de que la hiperreactividad bronquial es más frecuente entre las mujeres. Finalmente, en las clases sociales más desfavorecidas existe un mayor número de factores que se asocian al desarrollo de la enfermedad: mayor consumo de alcohol y tabaco, peores condiciones de las viviendas, infecciones frecuentes en la infancia y menos recursos sanitarios <sup>57</sup>.

## 2.4 Diagnóstico

El diagnóstico de la EPOC es clínico-funcional. El diagnóstico clínico de EPOC debe ser considerado en todo paciente que presente síntomas como tos, expectoración crónica o disnea, junto con el antecedente o historia de exposición a factores de riesgo para la enfermedad. Como ya hemos citado, en nuestro medio esa sustancia es el tabaco (especialmente > 10 paq-año), aunque también la biomasa y otras sustancias pueden constituir un factor de riesgo.

El diagnóstico, siempre requiere la realización de una espirometría, criterio funcional fundamental, que confirme la presencia de una obstrucción al flujo aéreo no totalmente reversible (cociente  $FEV_1/FVC < 0,7$ ). En edades muy avanzadas se han descrito caídas del FVC y  $FEV_1$  que podrían cumplir el criterio diagnóstico de EPOC sin que presentarán realmente la enfermedad. Por este motivo, este límite fijo en  $FEV_1/FVC < 0,7$ , es tema de debate en la actualidad, ya que algunos autores proponen que para diagnosticar la EPOC no se debería tener un límite fijo, sino que debería ser el límite inferior del intervalo de normalidad (LLN) para la población sana en cada rango de edad <sup>59</sup>, evitando así el sobrediagnóstico en ancianos y el infradiagnóstico en los jóvenes. Sin embargo, existen indicios de que los ancianos con un cociente menor de 0,7 pero superior al LLN tienen más mortalidad y sufren más ingresos hospitalarios que aquellos en los que el cociente es mayor de 0,7 <sup>59</sup>. Por lo tanto, en el momento actual, se requiere más información sobre el valor clínico y el pronóstico de ambos criterios.

La espirometría tiene que realizarse en reposo, en fase estable (con el paciente no exacerbado) y tras un test broncodilatador, ya que es la obstrucción que persiste tras dar un broncodilatador la que define la enfermedad <sup>60</sup>. La prueba de broncodilatación consiste en la realización de una segunda espirometría 15 minutos después de la inhalación de un broncodilatador. Esta prueba ha ido modificándose en las últimas décadas. Actualmente se recomienda que este test se haga con 400 µg de salbutamol o 1000 µg de terbutalina <sup>61</sup>. Existen igualmente diversas fórmulas para calcular la bronco-reversibilidad, siendo la más usada la que calcula el cambio con respecto al teórico y se considera positiva si aumenta el FVC o el  $FEV_1$  un 12% siempre que este aumento conlleve una mejoría de 200 ml <sup>6</sup>.

Lo habitual en la clínica es encontrar a pacientes que, con la misma historia de tabaquismo y con valores similares de FEV<sub>1</sub>, pueden ser valorados de forma totalmente diferente una vez diagnosticados de la enfermedad. Esto es debido a que el impacto de la EPOC en un paciente determinado no depende sólo del grado de obstrucción al flujo aéreo, sino que está muy influenciado por la gravedad de los síntomas, especialmente la disnea, y la disminución de la tolerancia al ejercicio. Por este motivo, el principal reto en el manejo de la EPOC en los últimos años ha sido la identificación de diferentes fenotipos de la enfermedad <sup>62</sup>, que nos permitan avanzar en la valoración clínica y en el manejo terapéutico individualizados así como un mejor conocimiento de las vías patogénicas.

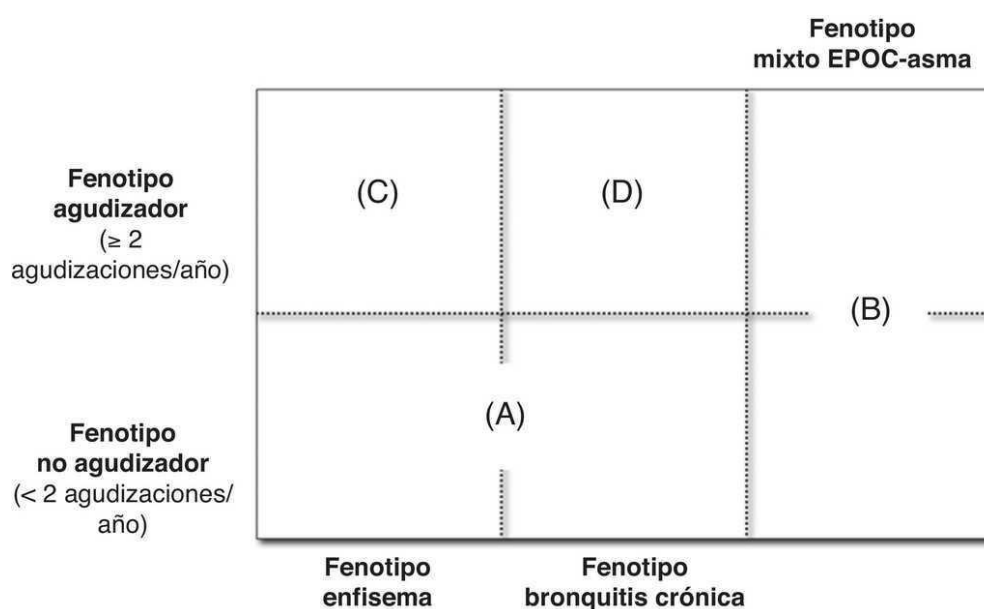
Diversos estudios recientes apoyan la identificación de los 4 fenotipos propuestos en la guía GesEPOC:

- **Fenotipo no agudizador:** se caracteriza por presentar como máximo un episodio de agudización al año y ninguna hospitalización. Dentro de este fenotipo se distinguen dos subtipos, el asociado a enfisema y el asociado a BC.
- **Fenotipo mixto EPOC-asma:** se define por la presencia de una obstrucción no completamente reversible al flujo aéreo acompañada de síntomas o signos de una reversibilidad aumentada de la obstrucción <sup>63</sup>. Dentro del espectro de la OCFA se encuentran individuos asmáticos fumadores que desarrollan obstrucción no completamente reversible al flujo aéreo <sup>64,65</sup> y fumadores sin antecedentes conocidos de asma cuyo patrón inflamatorio bronquial tiene un predominio de eosinófilos y se manifiesta clínicamente por un aumento de la reversibilidad al flujo aéreo. En otras normativas se los conoce como “pacientes con EPOC con componente asmático prominente” <sup>66</sup> o como “asma que complica la EPOC” <sup>67</sup>. Entre los antecedentes de estos pacientes se encuentran historia de rinitis alérgica, hiperreactividad bronquial inespecífica, presencia de sibilantes, y son mayores las concentraciones plasmáticas de IgE.
- **Fenotipo agudizador con bronquitis crónica:** engloba a aquellos pacientes con historia de tos productiva o expectoración durante más de 3 meses al año y durante más de 2 años consecutivos <sup>68</sup>. La hipersecreción bronquial en la EPOC se ha asociado a una mayor inflamación en la vía aérea y a un mayor riesgo de infección respiratoria <sup>69</sup>, lo que puede explicar que los pacientes con BC tengan

una mayor frecuencia de agudizaciones que los pacientes sin expectoración crónica <sup>70,71,72</sup>.

- **Fenotipo agudizador con enfisema:** El fenotipo enfisema incluye a los pacientes con EPOC con diagnóstico clínico/radiológico/funcional de enfisema, que presentan disnea e intolerancia al ejercicio como síntomas predominantes. Los pacientes con fenotipo enfisema presentan una tendencia a un índice de masa corporal reducido. No debe confundirse el diagnóstico de fenotipo enfisema con la presencia de enfisema pulmonar. Los signos de enfisema pueden encontrarse en cualquiera de los fenotipos, e incluso en fumadores sin criterios de EPOC.

Figura 1. Combinaciones fenotípicas según GesEPOC.



## 2.5 Estadios de la enfermedad

La reducción del flujo aéreo es la alteración funcional dominante en la EPOC, por lo que las mediciones espirométricas constituyen la herramienta principal para establecer el diagnóstico de la enfermedad, evaluar la gravedad y seguir el curso evolutivo. El FEV<sub>1</sub>, expresado como porcentaje del valor de referencia, es el mejor indicador de la gravedad de la obstrucción del flujo aéreo <sup>73</sup>. Dado que la EPOC cubre



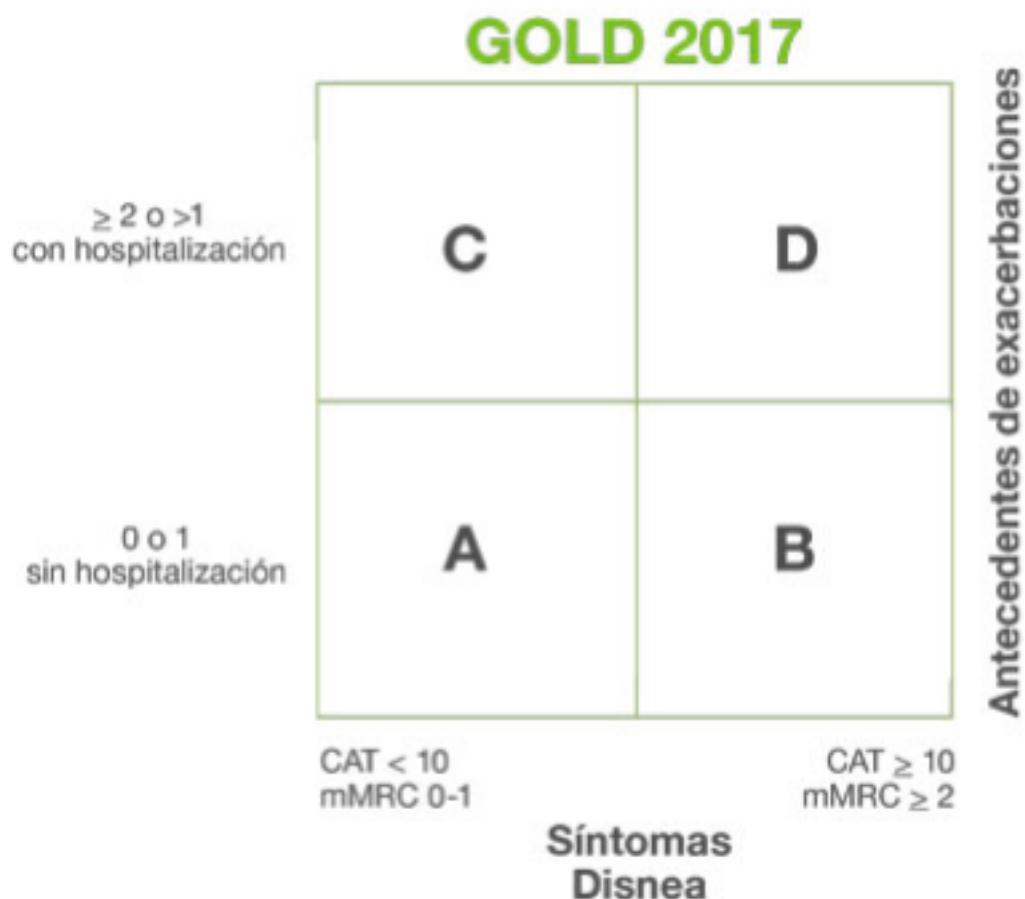
un amplio espectro de formas clínicas, se propone la siguiente clasificación en cuatro grados de severidad sobre la base del valor del FEV<sub>1</sub><sup>6</sup>:

- EPOC leve (estadio I de la GOLD): FEV<sub>1</sub> es mayor o igual al 80% del valor de referencia;
- EPOC moderada (estadio II de la GOLD): FEV<sub>1</sub> es menor del 80% pero mayor o igual al 50% del valor de referencia;
- EPOC grave (estadio III de la GOLD): FEV<sub>1</sub> es menor del 50% pero mayor o igual al 30% del valor de referencia.
- EPOC muy grave (estadio IV de la GOLD): FEV<sub>1</sub> es menor del 30% del valor de referencia.

Los límites que se establecen son de carácter empírico y corresponden con los establecidos por las distintas sociedades<sup>74</sup>, con el objetivo de facilitar las recomendaciones sobre las pautas de tratamiento y el empleo de los recursos sanitarios.

La GOLD 2017 clasifica a los pacientes con EPOC en una cuadrícula con 4 categorías identificada con las letras A, B, C y D, según la evaluación de los síntomas (grado de disnea según la escala modificada de la Medical Research Council (mMRC) o puntuación en el cuestionario CAT (COPD Assessment Test)) y el número de exacerbaciones, representados en el eje horizontal y vertical de la cuadrícula, respectivamente. De esta manera, los grupos A y C corresponden a los pacientes menos sintomáticos (disnea < 2 de la mMRC o puntuación CAT <10) mientras que los grupos B y D representan una mayor carga sintomática (disnea ≥ 2 de la mMRC o puntuación CAT ≥10). En función del número de exacerbaciones se definen los grupos A y B con ≤1 exacerbaciones anuales ambulatorias, mientras que los pacientes de los grupos C y D tienen exacerbaciones más frecuentes (≥2) o ≥1 con hospitalizaciones.

Figura 2. Esquema de evaluación clínica del paciente con EPOC, propuesto por la estrategia GOLD 2017.



## 2.6 Fisiopatología

Los cambios fisiopatológicos característicos de la EPOC incluyen la hipersecreción mucosa, la disfunción ciliar, la limitación al flujo aéreo, la hiperinsuflación pulmonar, las alteraciones en el intercambio de gases, la hipertensión pulmonar, el cor pulmonale y las manifestaciones sistémicas.

**Hipersecreción mucosa y disfunción ciliar:** La inflamación pulmonar en la EPOC se asocia con un incremento de células caliciformes e hiperplasia de glándulas mucosas, responsables directas de la hiperproducción de moco característica de algunos pacientes con la enfermedad. Asimismo, el tabaco modifica la respuesta de las células epiteliales ciliadas con alteraciones en el barrido mucociliar, permitiendo la colonización por microorganismos y favoreciendo la infección. Estos cambios pueden estar presentes incluso varios años antes de que aparezcan otras alteraciones fisiológicas observadas en la EPOC <sup>75</sup>.

**Limitación al flujo aéreo e hiperinsuflación pulmonar:** La principal característica fisiopatológica de la EPOC es la limitación espiratoria al flujo aéreo como consecuencia del estrechamiento de la vía aérea periférica y, en menor medida, de la pérdida de elasticidad y destrucción del parénquima pulmonar, como resultado del enfisema, y de la oclusión de la luz por secreciones mucosas <sup>76</sup>. A medida que progresa la obstrucción, el vaciado pulmonar es más lento y el intervalo entre los esfuerzos inspiratorios no permiten la espiración completa, lo que produce una hiperinsuflación por atrapamiento aéreo. Como consecuencia de ello, la musculatura inspiratoria se acorta y se hace menos efectiva para generar la tensión deseada. La hiperinsuflación puede cambiar el radio de curvatura del diafragma, colocándolo en desventaja mecánica, lo que supone una sobrecarga adicional para los músculos inspiratorios. Todo ello lleva a un incremento de la sensación de esfuerzo muscular y la consiguiente disnea. Este efecto deletéreo de la hiperinsuflación se ve aumentado durante el ejercicio.

**Alteraciones en el intercambio de gases:** En estadios avanzados de la enfermedad, la obstrucción en la vía aérea periférica, la destrucción del parénquima y las alteraciones vasculares pulmonares reducen la capacidad pulmonar para el intercambio de gases, lo que produce hipoxemia y, en una fase posterior, hipercapnia. El desequilibrio en la relación ventilación/perfusión es el principal mecanismo implicado en la hipoxemia. La hipercapnia crónica generalmente refleja disfunción de la musculatura inspiratoria e hipoventilación alveolar.

**Hipertensión arterial pulmonar y cor pulmonale:** La HAP en el paciente con EPOC suele aparecer de forma tardía, generalmente después del desarrollo de hipoxemia grave ( $\text{PaO}_2 < 60$  mmHg) y suele ser leve o moderada. Sin embargo, la hipoxemia puede empeorar transitoriamente durante las agudizaciones, el ejercicio e

incluso el sueño. Los factores implicados actualmente en el desarrollo de la HAP son la vasoconstricción, el remodelado de las arterias pulmonares <sup>77</sup> (engrosamiento de la íntima de las arterias musculares y muscularización de las arteriolas) y la destrucción del lecho capilar pulmonar producido por el enfisema. En las fases avanzadas de la enfermedad, la hipoxia juega un papel principal en el desarrollo de la HAP, y produce vasoconstricción de las arterias pulmonares y remodelado de las paredes vasculares. La HAP se asocia al desarrollo posterior de cor pulmonale, definido éste como una “hipertrofia del ventrículo derecho debida a enfermedades que afectan a la función y/o estructura pulmonar, excepto cuando estas alteraciones pulmonares sean el resultado de enfermedades primarias del lado izquierdo del corazón, como las cardiopatías congénitas”.

## 2.7 Patogenia

Desde el punto de vista de la patogenia de la EPOC, a pesar de ser una enfermedad con un agente causal conocido, aún existen numerosos aspectos desconocidos sobre los mecanismos biológicos que llevan a la aparición de la enfermedad. El principal motivo de controversia es dilucidar por qué algunos sujetos fumadores desarrollan la enfermedad mientras otros no. Sabemos que sólo el 15-20% de los fumadores desarrollan la enfermedad, por lo que el tabaco es una causa necesaria pero no suficiente. En la mayoría de los fumadores esta inflamación local inducida por el humo del tabaco es autolimitada y la enfermedad no se desarrolla. En este contexto, los cambios que acontecen parecen estar limitados exclusivamente a una función fisiológica reparadora tras una agresión. Sin embargo, en una subpoblación elevada de fumadores (15-20%) esta respuesta autolimitada en un momento determinado cambia a un proceso inflamatorio irreversible e independiente de la continuación del hábito tabáquico <sup>78</sup>. Hasta el momento no se conocen los factores relacionados con este cambio y mientras no los conozcamos seguiremos sin conocer uno de los datos fundamentales en la patogenia de la enfermedad.

La inflamación del aparato respiratorio en la EPOC ha sido extensamente estudiada durante las últimas décadas. De su estudio se desprende que se trate de una

enfermedad predominantemente neutrofílica en la que los linfocitos CD8 juegan un papel importante. Desde el punto de vista patogénico parece que puede estar implicados al menos 4 mecanismos: inflamación local, desbalance oxidativo, apoptosis y desbalance proteasas/antiproteasas.

### **2.7.1 Inflamación local**

Con respecto a la inflamación local nos referimos a los mecanismos inflamatorios relacionados directamente con la enfermedad que ocurren en el aparato respiratorio. Esta afectación puede ocurrir en las vías aéreas centrales, periféricas y el parénquima pulmonar <sup>7</sup>. En pacientes EPOC se observa una respuesta anómala del organismo ante el estímulo del humo del tabaco. Aun así, el tabaquismo crónico produce una reacción inflamatoria en todos los fumadores, pero sólo una parte de estos fumadores serán “susceptibles” al desarrollo de la enfermedad. Es en estos pacientes donde se objetiva una inflamación excesiva.

Es importante por ello comentar en este punto el estudio publicado por Lappere y cols <sup>79</sup>, en el que empleando un diseño observacional transversal estudiaron a un grupo de 114 pacientes con EPOC. Se estudió la inflamación presente en biopsias bronquiales y compararon 3 grupos de pacientes: fumadores activos, exfumadores de menos de 3,5 años de abandono del hábito tabáquico y exfumadores de más de 3,5 años sin hábito tabáquico. Los autores observaron que el infiltrado celular persistía de manera similar en los 3 grupos, a pesar de llevar un tiempo sin fumar, por lo que la inflamación perpetúa en el tiempo a pesar de haber dejado de fumar. Por tanto, ante el estímulo inflamatorio provocado por el humo de tabaco (o por productos gaseosos procedentes de la combustión de biomasa) se desencadena una reacción inflamatoria persistente. De este estudio se desprende que una vez establecida la inflamación, ésta parece ser independiente del consumo de tabaco.

Por otro lado, las agudizaciones se asocian a un aumento de la reacción inflamatoria local con un aumento de diversos marcadores inflamatorios durante la misma, lo cual parece ser independiente al estadio de la enfermedad y a la etiología de la agudización <sup>80</sup>. Aunque los pacientes con EPOC estable tienen ya una inflamación bronquial, caracterizada por macrófagos y linfocitos CD8, este patrón cambia durante

las exacerbaciones, con un incremento de neutrófilos e, incluso, en los más leves, eosinófilos. Aun así, la posible relación entre la inflamación y la causa, la frecuencia y la gravedad de una agudización no está clara. Trabajos recientes en el estudio del componente inflamatorio, describen que los principales elementos celulares implicados en esta respuesta inflamatoria son las células epiteliales bronquiales, los fibroblastos, las células dendríticas, los macrófagos, neutrófilos y linfocitos CD8 <sup>81</sup>.

### **2.7.2 Disbalance oxidativo.**

El estrés oxidativo o, mejor dicho, el disbalance oxidantes/antioxidantes parece tener un papel relevante en la patogenia de la EPOC. El desequilibrio entre oxidantes exógenos y antioxidantes endógenos produce la lesión de los componentes de la matriz extracelular y del epitelio de la vía aérea, así como inflamación mediada por citocinas. El humo del tabaco contribuye al estrés oxidativo, ya que es una gran fuente de oxidantes, principalmente radicales libres y óxido nítrico, y favorece la acumulación de leucocitos en el pulmón, que también liberan radicales libres y producen cambios conformacionales en las proteínas alterando su estructura y función <sup>82</sup>. Además, es de suponer que cualquier alteración genética en las enzimas antioxidantes presentes en el pulmón, como la glutatión-S-transferasa (GST) <sup>83</sup>, la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa, entre otras, produzca un aumento del estrés oxidativo y, por tanto, del daño pulmonar producido por el tabaco. Por otro lado, el estrés oxidativo tiene un papel en la activación de las proteasas, facilitando su acción y estimulando de esta manera esa otra vía patogénica.

### **2.7.3 Disbalance proteasas/antiproteasas.**

El disbalance entre proteasas y antiproteasas fue descrito como mecanismo de importancia en el enfisema ante el hallazgo de la deficiencia genética de alfa1 antitripsina, principal inhibidor de la elastasa de neutrófilos en el tracto respiratorio. Las células inflamatorias liberan varias proteasas que exceden la protección de inhibición de las antiproteasas en los pulmones. Entre otros, los neutrófilos tienen la capacidad de secretar proteasas, incluidas la elastasa de los neutrófilos, catepsina G, proteinasa 3, así como metaloproteasas de matriz (MMP), <sup>84</sup> como MMP-8 y MMP-9. Estas proteasas pueden contribuir a la destrucción alveolar y son potentes estimulantes de la secreción

de moco. Existen al menos 17 MMP descritas, de las que varias han obtenido relación con la EPOC, principalmente la MMP-1 (colagenasa), MMP-9 (gelatinasa B) y MMP-12 (metaloelastasa). Están controladas por los inhibidores tisulares de las MMP y su papel ha sido estudiados en EPOC observando una relación con el grado de obstrucción

85

#### **2.7.4 Apoptosis**

La apoptosis o muerte celular programada se ha asociado con el enfisema gracias a la instilación de un agente proapoptótico como la caspasa 3 y la interrupción de la señal del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). La inyección intratraqueal de la caspasa 3 en ratones causa la apoptosis de las células de la pared alveolar (principalmente células epiteliales), lo que lleva a la destrucción de la pared alveolar y al aumento de los espacios aéreos. El VEGF es un factor de supervivencia de las células endoteliales y su retirada da lugar a la apoptosis de éstas. En pacientes con enfisema se han observado una reducción del VEGF y un aumento de la apoptosis de las células endoteliales. Además, diversos trabajos llegan a establecer un círculo vicioso entre la apoptosis y estrés oxidativo. Estos datos permiten plantear la posibilidad de que varios factores, como la proteólisis excesiva, la apoptosis y el estrés oxidativo, interactúan para destruir el parénquima y provocar enfisema, conformando así un cuadro global de la patogenia de la EPOC <sup>86,87</sup>.

## **3. Inflamación pulmonar y sistémica en la EPOC**

### **3.1 Consecuencias de la inflamación local**

El humo del tabaco contiene un conjunto de más de 4.700 compuestos químicos que incluyen altas concentraciones de oxidantes y de radicales libres <sup>88</sup>. La lesión que produce la inhalación del humo del tabaco desarrolla una respuesta inflamatoria que inicialmente se desencadena de manera innata, como sucede en cualquier tipo de agresión <sup>89</sup>. La inmunidad innata es una respuesta rápida e inespecífica, donde las células del sistema inmune reconocen y responden a agentes patógenos de forma genérica y, a diferencia del sistema inmune adaptativo, no confieren inmunidad ni protección a largo plazo. Esta respuesta inmune inicial, desencadenada por el humo del tabaco, desestabiliza la matriz extracelular del parénquima pulmonar y los productos de su ruptura, como el ácido hialurónico y los  $\beta$ -glucanos, que actúan como ligandos de los TLR (toll-like receptors), sensores de las células del sistema inmune innato que reconocen los patrones moleculares expuestos por los agentes patógenos en la superficie de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), e inician la respuesta inmune frente al tejido lesionado <sup>90,91</sup>. Tras su unión, activan la vía de transcripción del NF-kB (nuclear factor kappa-B) <sup>91</sup>, induciendo a las células epiteliales a producir



mediadores de inflamación. El resultado final es una respuesta inflamatoria en la que los macrófagos y las células dendríticas descargarán una batería de mediadores inflamatorios, estableciéndose así las condiciones necesarias para activar el sistema inmune adaptativo <sup>92</sup>.

Estos mediadores inflamatorios se dividen en citocinas (TNF $\alpha$  (factor de necrosis tumoral- $\alpha$ ), INF- $\gamma$  interleucinas como IL-1, , IL-6, entre otras), quimiocinas (IL-8, MCP-1, etc) factores de crecimiento (CS-CSF, TGF-  $\beta$ , EGF) y proteasas (serinaproteasas como la elastasa, catepsina-G y proteinasa-3, cisteinaproteasas y MMP). La acción proteolítica de estas últimas, tanto de las MMP como de la elastasa, genera fragmentos de matriz extracelular que pueden ser reconocidos como autoantígenos por parte del sistema inmune, colaborando así en la progresión de la enfermedad <sup>93</sup>.

Es entonces cuando se activa el proceso de inmunidad adquirida. El daño tisular producido en el pulmón provoca la liberación de nuevos productos, como fragmentos celulares o de la matriz extracelular, siendo las células dendríticas inmaduras las encargadas de alertar al sistema inmune adaptativo de la presencia de estos productos de lesión tisular <sup>90</sup>. A continuación, estas células maduran cuando los TLR se unen a sus ligandos, expresando altos valores de proteínas del MHC de clase II y moléculas coestimuladoras CD80 y CD86, que le conducirán a los ganglios linfáticos locales donde le presentaran los antígenos a las células T <sup>94</sup>. La expresión de IL-12 por las células dendríticas activa el transductor de la señal y activa la transcripción STAT-4, (signal transducer and activator of transcription-4), lo que induce a las células T a diferenciarse en el tipo 1 (Th1) y a su vez producir interferón gamma (IFN  $\gamma$ ).

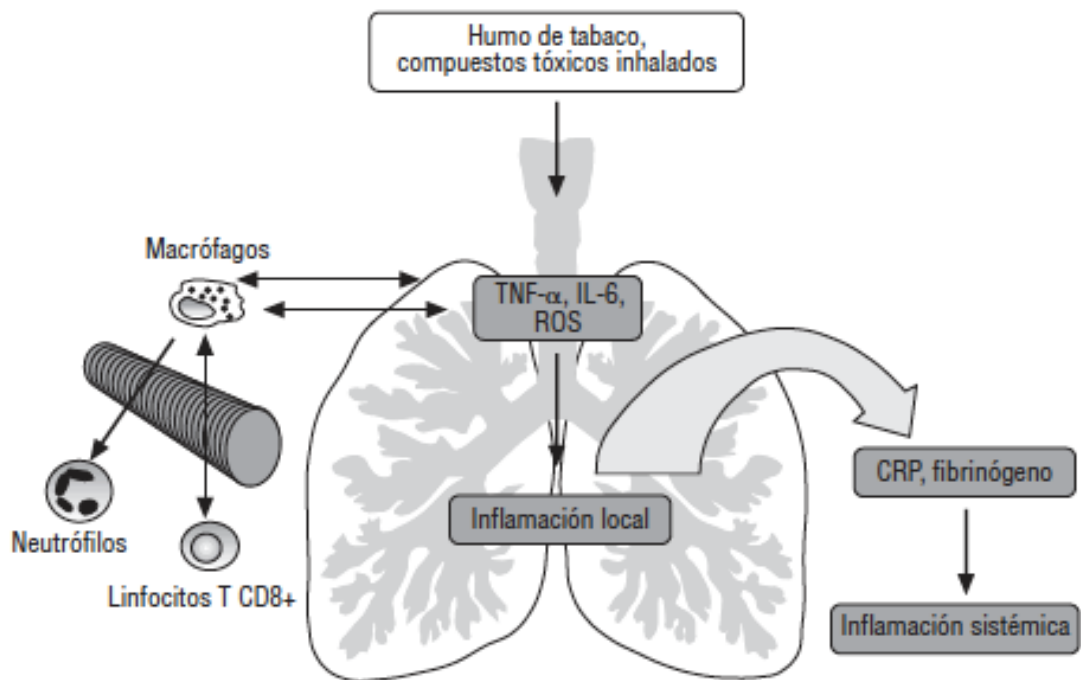
En fumadores con EPOC hay un marcado aumento de las células dendríticas maduras en las vías respiratorias periféricas, que probablemente está relacionado con la alta expresión en los pulmones de CCL20, como quimioatrayentes de células dendríticas. Hay también un aumento de los linfocitos T cooperadores CD4+ que expresan STAT-4 en los pulmones. Es probable que las células lesionadas, necróticas y apoptóticas de los pulmones de los fumadores sean absorbidas por las células dendríticas y presentadas por éstas a las moléculas del MHC de clase I y a los linfocitos T citotóxicos CD8+.

Los linfocitos T citotóxicos CD8+ son las células predominantes de la EPOC, presentes en las vías respiratorias grandes y pequeñas, en las arterias pulmonares y en el parénquima pulmonar <sup>95</sup>. El número de linfocitos T CD8+ en el pulmón se correlaciona con el grado de obstrucción al flujo aéreo y enfisema. Los linfocitos T CD4+ también aparecen en la EPOC centrando su acción sobre todo en amplificar la señal inflamatoria, ya que expresan STAT-4 e IFN- $\gamma$ , sugiriendo mayor estimulación antigénica. El número de linfocitos T CD4+ que expresan IFN-  $\gamma$  se correlaciona con el grado de obstrucción al flujo aéreo <sup>96</sup>, apoyando la hipótesis de que estas células, junto con los linfocitos T CD8+, desempeñan un papel importante en la patogenia de la EPOC. Los linfocitos T inactivos no pueden entrar en el parénquima pulmonar fuera de los vasos sanguíneos, pero una vez activados por las células dendríticas presentadoras de antígeno pueden situarse en el pulmón por medio de sus receptores de quimiocinas específicos de tejido. En este punto, la progresión y gravedad de la enfermedad están determinadas por la capacidad de las células dendríticas de estimular a los linfocitos T.

También ha sido demostrada la presencia de células B en los folículos linfoides de las vías respiratorias y del parénquima pulmonar de los pacientes con EPOC y en ratones expuestos al humo del cigarrillo. La ausencia de productos bacterianos y virales en los folículos, sugiere que las células B oligoclonales surgen en respuesta a antígenos pulmonares <sup>97</sup>. Sin embargo, las infecciones bacterianas y virales podrían ser importantes en la perpetuación del proceso inflamatorio y son consideradas como la principal causa de las exacerbaciones en la EPOC. Estas infecciones podrían ser el desencadenante de la respuesta inmune que culmina con el daño pulmonar.

Por último, la EPOC grave, en la que la inflamación pulmonar incluye la activación de un gran número de células T Th1, células B y células T CD8+, que persiste durante años después de dejar de fumar <sup>98</sup>. Este proceso de auto-perpetuación, sugiere cierto grado de autoinmunidad en la EPOC, como una respuesta a antígenos propios.

Figura 3. Esquema del proceso de inflamación que tiene lugar durante el desarrollo de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).



### 3.2 Inflamación sistémica y sus consecuencias

La EPOC se considera una enfermedad inflamatoria que lejos de ser exclusiva de la vía aérea, coexiste con cierta inflamación sistémica de bajo grado, la cual se define por un aumento significativo de los niveles plasmáticos de diversos marcadores inflamatorios, en pacientes con EPOC frente a sujetos sin la enfermedad <sup>99</sup>. El estudio de la inflamación sistémica en la EPOC ha generado gran interés en los últimos años. Existe evidencia suficiente de que la EPOC se asocia con niveles aumentados de citoquinas proinflamatorias circulantes como por ejemplo el TNF- $\alpha$ , IL6 e IL8, reactantes de fase aguda (RFA) como la proteína-C-reactiva (PCR), estrés oxidativo y activación de varias células inflamatorias (neutrófilos, monocitos y linfocitos) <sup>100,101</sup>. Además, esta inflamación sistémica se acentúa durante los episodios de exacerbación de la enfermedad, volviendo a los niveles basales tras su resolución <sup>102,103</sup>.

Sin embargo, se desconoce si todos los pacientes con EPOC o sólo un subgrupo de ellos van a presentar inflamación sistémica, confiriéndoles una característica fenotípica diferente <sup>104</sup>, así como se desconocen las variaciones longitudinales tanto cualitativas como cuantitativas de dichos parámetros de inflamación sistémica, ya que la mayoría de estudios desarrollados hasta la fecha son transversales. Varios biomarcadores de inflamación se caracterizan por una distribución asimétrica y muestran una considerable variabilidad analítica <sup>105,106</sup>. Además, la presencia de una determinada carga inflamatoria sistémica debe interpretarse con cautela debido a su gran variabilidad interindividual entre pacientes. Esto es importante a tener en consideración, ya que determina una marcada heterogeneidad en la respuesta inflamatoria sistémica de pacientes con EPOC.

Una observación importante es que los biomarcadores de inflamación generalmente no aumentan de forma aislada, sino que se asocian entre sí dentro de redes biológicas complejas y específicas de múltiples tipos de células y mediadores inflamatorios <sup>107,108</sup>. Estudios recientes como el ECLIPSE (Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate Endpoints) utilizaron este enfoque para cuantificar seis biomarcadores inflamatorios en sangre periférica (leucocitos, PCR, fibrinógeno y niveles de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8) en tres grupos distintos de pacientes, 1755 pacientes con EPOC, 297 fumadores con resultados normales de espirometría y 202 controles no fumadores <sup>104</sup>. En pacientes EPOC se obtuvieron redes consistentes en aumento de los niveles de leucocitos, PCR, IL-6 y fibrinógeno y disminución de IL-8 e TNF- $\alpha$ , que, en comparación con los pacientes fumadores con función pulmonar normal, parecen describir una red inflamatoria sistémica diferente y asociada a la EPOC. Este estudio también identifica a un subgrupo de pacientes EPOC con un aumento persistente de dichos biomarcadores, asociándose con una mayor incidencia de exacerbaciones y peor supervivencia a pesar de un deterioro pulmonar similar, lo que puede sugerir la descripción de un nuevo fenotipo EPOC <sup>62</sup>.

El origen de la inflamación sistémica no está aclarado y se plantean varios mecanismos posibles. Una de las hipótesis actuales sostiene que sería la inflamación generada en el pulmón la que produciría un rebosamiento de mediadores inflamatorios al torrente sanguíneo, siendo el pulmón el origen de esta inflamación <sup>109,110</sup>. Esto provocaría un aumento de la concentración en suero de diversas moléculas inflamatorias

que podrían tener un papel relevante al contribuir a un estado de inflamación sistémica permanente que podría ser responsable de algunos de estos efectos sistémicos considerándose un factor patogénico clave en la afectación multidimensional y heterogeneidad fenotípica de la enfermedad. En este sentido cierto grado de inflamación sistémica sería el responsable de la conexión entre estos fenómenos <sup>105</sup>. Sin embargo, resultados más recientes cuestionan esta hipótesis, porque no se han identificado asociaciones significativas entre las vías respiratorias y las concentraciones sistémicas de citoquinas proinflamatorias <sup>111</sup>, del mismo modo que las cargas inflamatorias de esputo y de plasma inducida no se correlacionaron entre sí. Aunque una dinámica de las células inflamatorias diferente en el compartimento pulmonar y sistémico podría explicar esta falta de relación, se han propuesto otros posibles mecanismos de inflamación sistémica, entre los que se incluyen el tabaquismo por sí mismo <sup>112</sup> y la hiperinsuflación pulmonar <sup>113</sup>. Tampoco puede descartarse un origen extrapulmonar de la inflamación sistémica en la EPOC, que podría incluir una respuesta muscular respiratoria <sup>114</sup> y esquelética anormal <sup>115</sup>, la hipoxia tisular <sup>116</sup> y la médula ósea <sup>117</sup>. Finalmente, una respuesta autoinmunitaria anómala también podría contribuir a perpetuar esta situación <sup>94, 118</sup>.

Se han asociado diversas comorbilidades con una respuesta inflamatoria sistémica en la EPOC <sup>8</sup>, como pérdida de peso, disfunción del músculo esquelético y osteoporosis, pero más recientemente también en la progresión de aterosclerosis y enfermedad arteriocoronaria, ansiedad, depresión y alta prevalencia de CP. Es por ello que los mecanismos fundamentales de la inflamación sistémica en EPOC son de gran interés ya que contribuyen a empeorar la situación clínica y el pronóstico de la enfermedad, y representan una gran parte de la mortalidad y morbilidad de los pacientes con EPOC.

### **3.2.1 Enfermedad cardiovascular**

La asociación más importante entre EPOC y una manifestación extrapulmonar se establece con las ECV. Esta asociación es notablemente recíproca y no debe ser únicamente atribuye al hecho de que son enfermedades altamente prevalentes que comparten factores de riesgo comunes <sup>119</sup>. El incremento en los niveles de PCR representa un factor de riesgo de ECV y en pacientes con EPOC se ha demostrado un

aumento de dichos niveles. Además, la inflamación sistémica ha demostrado que acelera la aterosclerosis y en consecuencia aumentar el riesgo de eventos cardiovasculares adversos <sup>120</sup>. Otro eslabón importante entre la EPOC y las ECV es el efecto nocivo de la hipoxemia <sup>121</sup>. Un segundo mecanismo es la presencia de la hiperinflación pulmonar y su impacto en la función cardiovascular <sup>122</sup>.

### **3.2.2 Diabetes**

Los pacientes con EPOC presentan una asociación mayor de la esperada de diabetes y síndrome metabólico. El estudio ECCO (EPOC Con Comorbilidad) recoge el antecedente de diabetes en un 30% de los pacientes <sup>123</sup> y se describe una prevalencia de síndrome metabólico próximo al 15% en los EPOC europeos. Probablemente el nexo patogénico de estas entidades resida en la respuesta inflamatoria local y sistémica que está íntimamente ligada al desarrollo de resistencia insulínica e hiperglucemia.

### **3.2.3 Depresión y ansiedad**

La limitación progresiva al flujo aéreo de la EPOC se traduce en disnea que afecta de forma paulatina la actividad física de los pacientes con afectación secundaria de su estado psicológico y social, lo que influye desfavorablemente en su entorno personal, profesional y laboral, con lo que aumenta de forma considerable la probabilidad de dependencia y aislamiento social. En este contexto, no es raro que hasta el 50% de los pacientes presenten trastornos psicológicos, estimándose una prevalencia del 15% para la ansiedad generalizada y del 25% para la depresión. Van Manen et al. concluyen que el riesgo de depresión en el paciente con EPOC es 2,5 veces superior al de la población general, después de ajustar por variables demográficas y comorbilidad <sup>124</sup>. Además, la depresión y la ansiedad en la EPOC se asocia a peor pronóstico siendo predictora de mortalidad y de mayor estancia hospitalaria.

### **3.2.4 Desnutrición y miopatía**

Otra de las manifestaciones sistémicas frecuentes de la EPOC es la desnutrición, que afecta principalmente a la pérdida y la disfunción de los músculos esqueléticos. Valores aumentados de marcadores plasmáticos de inflamación, como la PCR, la IL-1b,

la IL-6, los receptores de TNF- $\alpha$ , la grelina y la leptina, se han asociado con la pérdida de peso y/o masa muscular en pacientes con EPOC <sup>125</sup>. Además, estas anomalías están relacionadas con la función de las vías respiratorias, la intolerancia al ejercicio, el estado de salud, la mortalidad y el consumo de recursos sanitarios.

### **3.2.5 Cáncer de pulmón. Otras**

Por último, es importante destacar que la presencia de limitación del flujo aéreo aumenta en gran medida la probabilidad de que los pacientes puedan desarrollar CP con el tiempo. Existen una serie de moléculas que han sido identificadas como claves en el proceso patogénico inflamación-carcinogénesis: integrinas, factor de crecimiento transformante beta, NF-kB, STAT-3, TNF- $\alpha$ , ciclooxigenasa-2 <sup>126</sup>.

## **4. Reactantes de fase aguda en la inflamación sistémica.**

La inflamación sistémica en la EPOC se define como un aumento de los niveles de marcadores inflamatorios de diferentes vías biológicas.<sup>106</sup> Dentro de estos biomarcadores inflamatorios sistémicos, destacan los RFA por ser unos de los más estudiados debido a su papel como nexo de fisiológico entre la respuesta inflamatoria local y sistémica <sup>127</sup>.

Los RFA constituyen un grupo heterogéneo de proteínas sintetizadas en el hígado y cuya cantidad en la circulación aumenta rápidamente en presencia de inflamación y necrosis tisular <sup>128</sup>. Los RFA tienen una función biológica muy variada y se han descrito diversas clasificaciones según distintos aspectos. El incremento o disminución de la síntesis de estos RFA es debido principalmente a citocinas liberadas desde el foco inflamatorio entre las que destacan principalmente la IL-1, la IL-6 y el TNF- $\alpha$ .

Dentro de estos reactantes y en función de la capacidad de estimulación distinguimos los RFA mayores, también llamados proteínas con cinética de evolución rápida, cuya concentración en suero aumenta hasta mil veces ante un estímulo y cuya elevación es medible a las 4-6 horas de la agresión tisular; y los RFA menores cuya concentración aumenta en menor medida.



Entre los RFA mayores se encuentran la PCR y el amiloide A sérico (AAS). Ambos reactantes tienen un papel relevante en la reacción aguda del ser humano ante diversas agresiones externas. Durante un daño agudo los RFA intervienen en la respuesta sistémica realizando funciones como la inducción de enzimas que degradan la matriz extracelular como las metaloproteinasas, acción quimiotáctica de células inflamatorias, participación en el metabolismo lipídico o su transporte y efectos pro-inflamatorios y antiinflamatorios de regulación, entre los que destaca aumentar la quimiotaxis y opsonización, activar células inflamatorias o modular respuestas inmunes<sup>129</sup>. Por tanto, el papel de estos RFA mayores en la respuesta aguda puede resumirse en; acción inmunomoduladora<sup>130</sup>, efectos sobre el genoma<sup>131</sup> y efectos sobre el metabolismo lipídico<sup>132</sup>.

La PCR 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. 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, ECV, etc.

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. La capacidad de la PCR para activar el complemento y opsonizar partículas parece ser importante en la respuesta de la inmunidad innata frente a los patógenos. La PCR tiene la capacidad tanto de opsonizar células apoptóticas, como de desacoplar las proteínas del complejo de ataque a la membrana dependiente del complemento. Esto permite una mayor permanencia de las células apoptóticas antes de ser eliminadas, aunque facilitando su captación por fagocitos. Así, la PCR juega un papel preponderante en limitar la activación de respuestas de inmunidad adaptativa.

La PCR ha sido estudiada de manera amplia en los pacientes con EPOC observándose su participación como marcador de la repercusión sistémica de la

enfermedad, como marcador pronóstico sobre la mortalidad, como marcador para distinguir una exacerbación infecciosa del resto, relacionándose con una disminución acelerada de la función pulmonar y muchos otros resultados clínicamente relevantes 99,133.

El AAS, otro importante reactante de fase aguda en los seres humanos, es una proteína que pertenece a la familia de la apolipoproteínas y forma parte de la estructura de las HDL. 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 sintetizada 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 <sup>134</sup>. 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 <sup>135</sup>. 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 <sup>136</sup>.

Curiosamente, PCR y AAS comparten estímulos secretores, con un patrón de aumento similar en el suero <sup>137</sup>. Debido a esta conexión entre ambos biomarcadores, se hace necesario su estudio conjunto para verificar que los efectos atribuidos a una molécula no son consecuencia de la actuación de la otra.

No obstante, la implicación final de los RFA en la patogenia de las manifestaciones sistémicas de la EPOC no ha sido completamente dilucidado,

planteándose cuestiones no resueltas sobre su secreción, perpetuación en el tiempo e influencia final en un determinado efecto de la enfermedad en órganos diana distintos del pulmón. Tras la afirmación de que en la EPOC existe la participación de un componente inflamatorio, tanto a nivel local como sistémico, teniendo este último importantes consecuencias a nivel extratorácico, sería muy útil definir el origen de ésta inflamación sistémica. A pesar de que el hígado se ha considerado tradicionalmente como su principal fuente, se ha descrito que el propio pulmón es capaz de sintetizar moléculas proinflamatorias<sup>109</sup>. Por este motivo, se ha planteado la hipótesis de que tales moléculas podrían ser liberadas desde el tejido pulmonar a la circulación sistémica, planteando un origen alternativo a la producción de estos biomarcadores inflamatorios en la EPOC. Sin embargo, esta hipótesis se contradice con la falta de correlación entre la expresión local y sistémica de los biomarcadores inflamatorios en la EPOC.

Nuestro grupo ha demostrado anteriormente que los bronquios y el parénquima pulmonar son capaces de sintetizar PCR y AAS en pacientes con EPOC en comparación con fumadores que no desarrollaron la enfermedad<sup>109</sup>. En particular, se observó que la expresión de marcadores de inflamación es diferente en los fibroblastos, células epiteliales, y macrófagos<sup>110</sup>. Sin embargo, el papel de las arterias pulmonares y leucocitos de sangre periférica como una fuente potencial de marcadores de inflamación sistémica en la EPOC aún no ha sido evaluado. La posible participación de la pared arterial o leucocitos de sangre periférica en la inflamación EPOC también explicaría la conocida asociación de esta enfermedad con eventos adversos cardiovasculares<sup>138</sup>.

En la presente Tesis Doctoral hemos tratado de comparar la expresión génica de RFA tanto a nivel local, en el parénquima pulmonar y tejido vascular de arteria pulmonar, como a nivel sistémico, en células sanguíneas y plasma, de pacientes con EPOC y fumadores sin la enfermedad. Posteriormente comparamos la síntesis de estos mediadores inflamatorios en células pulmonares con respecto a nivel hepático, principal síntesis en humanos, con objeto de determinar la contribución de cada uno a la inflamación sistémica. Dado que la inflamación juega un papel crítico en el desarrollo, curso y la gravedad de la EPOC, los hallazgos del presente trabajo contribuirán a un mayor conocimiento de la patogenia de la enfermedad y sus repercusiones sistémicas que podrían culminar en mejorar los enfoques actuales de diagnóstico, pronóstico y detección de nuevas dianas terapéuticas en un futuro.

## Hipótesis y objetivos

---

## **1. Hipótesis**

Existe producción local de RFA en el tejido pulmonar y sistémica en sangre periférica de pacientes con EPOC frente a fumadores sanos, que indica una síntesis más elevada a nivel pulmonar, incluso comparándola con la síntesis fisiológica a nivel hepático.

## **2. Objetivos**

1. Comparar la expresión génica de PCR y AAS en el parénquima pulmonar, en tejido vascular de arteria pulmonar y sangre periférica de pacientes con EPOC frente a fumadores sanos. Estudiar la relación entre la expresión tisular y la concentración sérica de las proteínas.

2. Evaluar la producción de RFA en células epiteliales bronquiales, fibroblastos pulmonares y hepatocitos humanos, comparando la producción pulmonar frente a la hepática.

## Método

---

# **1. OBJETIVO 1: expresión génica tisular**

## **1.1. Población de estudio.**

Se diseñó un estudio analítico observacional de caso-control, en el que se compararon los niveles de expresión génica de PCR y AAS en muestras quirúrgicas de parénquima pulmonar, tejido vascular de arteria pulmonar y sangre periférica de pacientes con EPOC en fase estable frente a fumadores sin la enfermedad.

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 sospecha de neoplasia pulmonar primaria e ingresaron de forma programada en la planta de la Unidad Médico-Quirúrgica de Enfermedades Respiratorias del Hospital Universitario Virgen del Rocío para la realización de la técnica quirúrgica prevista.

El diagnóstico de EPOC se realizó en función de la normativa internacional GOLD 2016<sup>6</sup> y la normativa nacional SEPAR GesEPOC<sup>13</sup>, 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 FEV<sub>1</sub>/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, visita no programada al médico u hospitalización por descompensación respiratoria, según refiriera el paciente o constara en su historia clínica.
- Capacidad para completar los cuestionarios y estudios complementarios.
- No contraindicaciones para los estudios.
- Estar 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 con:

- Historia de infecciones respiratorias agudas en los dos meses anteriores
- Una neoplasia diagnosticada previamente
- Haber recibido tratamiento con radioterapia y / o quimioterapia
- Presencia de enfermedades crónicas enfermedades inflamatorias, 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.

La cantidad de tiempo transcurrido entre la abertura de la capa cutánea y la extracción de la muestra anatómica se midió en todos los participantes, excluyendo los casos con un tiempo de >2h debido al potencial incremento en los marcadores inflamatorios relacionada con la cirugía.

En caso de cumplir dichos criterios de inclusión, en una entrevista llevada a cabo el día del ingreso para la cirugía se informó al paciente de la naturaleza del estudio y se solicitó el consentimiento informado para su inclusión en el mismo (Anexo I). Además, en esta visita se realizó una evaluación clínica, recogiendo de cada sujeto edad, sexo, hábito tabáquico recogido en paquetes-año, estabilidad clínica actual y en los meses previos, el grado de disnea usando la escala de la mMRC, comorbilidades y el

tratamiento médico habitual recogido en principio activo y dosis habitual, expresándose la dosis de corticoides inhalados en  $\mu\text{g}$  / día de fluticasona o equivalente. La estadificación TNM de la lesión primaria y el abordaje quirúrgico también se registraron.

Una vez realizada la evaluación clínica, se realizó una evaluación funcional respiratoria incluyendo espirometría, saturación de oxígeno y si ésta era menor del 92%, gasometría arterial. Todos estos datos fueron recogidos en un cuaderno de recogida de datos individual para cada sujeto y archivado posteriormente por el investigador principal (Anexo II).

## 1.2 Extracción de muestra quirúrgica y sanguínea.

El día de la intervención quirúrgica y previamente a ésta, se realizó una analítica para la determinación de RFA mayores en sangre periférica. Esta analítica se llevó a nuestro laboratorio donde era pre-procesada y almacenada a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento final.

Durante la intervención quirúrgica, se midió el tiempo de intervención desde el inicio de la misma (apertura de plano cutáneo) hasta la obtención de la pieza quirúrgica. Se seleccionó una porción de parénquima pulmonar, macroscópicamente normal y que estuviera lo más alejada posible de la lesión que había motivado la intervención, de aproximadamente  $1\text{ cm}^2$  de superficie y 0,5 cm de espesor, así como de la arteria pulmonar reseca. La separación de ambas muestras de la pieza quirúrgica se realizó en el mismo quirófano en una mesita auxiliar y estéril. El resto de la pieza anatómica siguió el tratamiento habitual según protocolo del hospital para diagnóstico anatomopatológico del paciente.

La muestra quirúrgica de parénquima pulmonar fue sometida a un examen microbiológico antes de la resección quirúrgica para evaluar la colonización microbiana. También se examinaron muestras microbiológicas obtenidas mediante broncoscopia. En el laboratorio, el tejido era inmediatamente congelado en nitrógeno líquido y guardado a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior determinación.

## 1.3 Métodos de medición.

**Tabaquismo.** 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. Un índice por encima de 10 paq-año es un factor de riesgo elevado para padecer una EPOC.

**Disnea.** El grado de disnea se evalúa mediante la escala de la 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. Los grados son los siguientes:

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

**Nivel de gravedad de la EPOC.** Se clasificaron los pacientes en función de la gravedad siguiendo los estadios de la guía GOLD:

- EPOC leve (estadio I de la GOLD): FEV1 es mayor o igual al 80% del valor de referencia;
- EPOC moderada (estadio II de la GOLD): FEV1 es menor del 80% pero mayor o igual al 50% del valor de referencia;
- EPOC grave (estadio III de la GOLD): FEV1 es menor del 50% pero mayor o igual al 30% del valor de referencia.
- EPOC muy grave (estadio IV de la GOLD): FEV1 es menor del 30% del valor de

referencia o menor del 50% con insuficiencia respiratoria crónica asociada (presión parcial arterial de oxígeno (PaO<sub>2</sub>) menor de 60 mmHg asociado o no a una presión parcial arterial de carbónico (PaCO<sub>2</sub>) mayor de 50 mmHg).

**Pruebas de función respiratoria.** Todos los pacientes incluidos en el estudio realizaron una espirometría forzada basal y con test de broncodilatación, empleando 500 µgr de Terbutalina administrada en dispositivo Turbuhaler, a los 15 minutos de la inhalación. Se consideró un test broncodilatador positivo si aumentaba un 12% y 200 ml en la segunda espirometría. Se siguieron las recomendaciones de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR) usando un espirómetro de tipo neumotacógrafo Masterlab (Erich Jaeger GHBH, Würzburg, Alemania).

**Índice de comorbilidad de Charlson.** La comorbilidad asociada del sujeto se valoró empleando el índice de comorbilidad de Charlson. 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 (Anexo III).

## 1.4 Determinaciones de laboratorio.

Las muestras de tejido y de sangre periférica fueron procesadas mediante las siguientes técnicas de laboratorio para alcanzar los objetivos propuestos:

### 1.4.1 Expresión génica de RFA en tejidos y sangre.

La expresión de los marcadores inflamatorios en los tejidos y leucocitos de sangre periférica se analizó mediante reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa cuantitativa (RT-qPCR), un método que consta de tres pasos: la extracción de ARN, transcripción inversa a ADN complementario (ADNc) y amplificación génica del fragmento de ADNc.

La obtención de los leucocitos 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 células mononucleares en un solo paso, mediante centrifugación de los tubos a 1620 g durante 20 minutos a 20°C. La concentración celular se determinó por tinción de Trypan Blue en una cámara de recuento (Neubauer). Las células fueron recuperadas por centrifugación (1620 g durante 20 minutos a 4°C) y separados los linfocitos por técnicas inmunomagnéticas (Dynabeads, Dynal, Byotech ASA, Oslo, Noruega). Por otro lado, se aisló ARN de tejidos frescos empleando el método trizol-cloroformo con un kit TriSure (Bioline, Londres, Reino Unido).

Posteriormente ambas muestras fueron sometidas a tratamiento con DNasa (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania) según las instrucciones del fabricante y ADNc fue sintetizado utilizando un kit de síntesis de ADNc iScript™ (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.). Cada mezcla de reacción de amplificación de 25 µl comprendía 5 µl de ADNc (10 ng / µl), 12,5 µl SYBR Green PCR Master Mix (Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU.) y 7,5 µL de pareja de cebadores / H<sub>2</sub>O. RT-PCR cuantitativa se realizó en un sistema Applied Biosystems® 7900 Real-Time PCR (Life Technologies, Grand Island, NY, EE.UU.) bajo los siguientes ciclos y condiciones: 95°C durante 15 s, 60°C durante 30 s, y 72°C durante 40 s, completando un total de 40 ciclos.

Se determinó la expresión de PCR y los 3 subtipos de AAS humanos (AAS1, AAS2 y AAS4). Su síntesis se activa por citocinas proinflamatorias liberadas tras la activación de los monocitos / macrófagos. La expresión de un gen constitutivo 18S RNA ribosomal (rRNA) se utilizó como un control interno para la normalización de la expresión del gen diana. La lista de los cebadores utilizados para amplificar los genes de interés se muestra en la Tabla 1.

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

Genes	Sentido	Antisentido
18S	5'-TGAAATATCCAGAACATCTTA-3'	5'-GCAAAATTTATTGTCCCATCAT-3'
CRP	5'-GTGTTTCCCAAAGAGTCGGATA-3'	5'-CCACGGGTCGAGGACAGTT-3'
AAS1	5'-ATCAGCGATGCCAGAGAGAAT-3'	5'-GTGATTGGGGTCTTTGCCA-3'
AAS2	5'-AGCCAATTACATCGGCTCAG-3'	5'-ATTTATTGGCAGCCTGATCG-3'
AAS4	5'-GTCCAACGAGAAAGCTGAGG-3'	5'-AGTGACCCTGTGTCCCTGTC-3'

Abreviaturas: PCR, proteína C reactiva; AAS, amiloide sérico A.

### 1.4.2 Medición de marcadores inflamatorios en el plasma

Las muestras de sangre (5 ml) se recogieron, mediante punción venosa de una vena superficial del antebrazo, en tubos de ácido K3-etilendiaminotetraacético (EDTA) (Vacuette, Bio-One GmbH, Greiner, Austria). Las muestras se centrifugaron inmediatamente a 1.620 g durante 15 minutos a 4°C y las alícuotas de plasma se almacenaron a -80°C hasta el momento inmediatamente previo al análisis. Las determinaciones de PCR en plasma (I+D System, Minneapolis, MN, EE.UU.) y AAS (Anogen, Mississauga, Ontario, Canadá) se realizaron mediante ELISA 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 o TNF $\alpha$  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 de las muestras se extrapola a una curva de concentración estándar mediante una regresión lineal.

## **2.OBJETIVO 2: estudio en modelos celulares**

### **2.1 Estudios in vitro con células procedentes de líneas comerciales**

#### **2.1.1 Cultivo *in vitro* de células humanas**

Para los estudios realizados “*in vitro*” se han empleado células epiteliales bronquiales (Nuli-1) y fibroblastos pulmonares humanos (MRC-5) procedentes de una línea comercial obtenidos de pacientes con EPOC (Lonza, Walkerville, MD) y hepatocitos humanos (CCRL 2706 y HEP3B) procedentes de líneas comerciales de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). Las células se cultivaron en placas de 10 cm<sup>2</sup> de diámetro (Nunc, Dinamarca) manteniéndose a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y saturación de humedad.

#### **2.1.2 Experimentos de estimulación de las células con IL-1**

En todos los experimentos de simulación, cada cultivo celular será sembrado en placas de 6 pocillos (Nunc, Rochester NY) y mantenidas en el medio de crecimiento adecuado durante un máximo de 48 horas para las condiciones a estudiar. Tras un

estudio de dosis respuesta, se eligió la dosis de 10ng/ml IL-1 (R&D System, Minneapolis MN) como estímulo pro-inflamatorio. Las células se cultivaron durante 24 y 48 horas a esa concentración de IL-1. Cada experimento se repitió cuatro veces. En paralelo se recogieron muestras controles de cultivo sin tratar pero con el mismo tipo de medio de cultivo y durante el mismo periodo de incubación. En cada uno de los puntos, se midió la viabilidad con trypan-blue celular por el método de exclusión por Trypan-blue 0.4% (Sigma, GmbH, Alemania) y se contaron en una cámara hemocitómetro. Posteriormente, las células se centrifugaron a 1.000 rpm durante 5 minutos, alicuotamos el sobrenadante y se guardó a -80°C para determinar posteriormente proteínas mediante ELISA. El pellet se congeló en nitrógeno líquido y después se guardó a -80°C para posteriores determinaciones.

### **2.1.3 Estudios de expresión génica.**

**Extracción de ARN.** A las 24 horas de incubación de las células con IL-1, se les extrajo el ARN mediante un 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. 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 100 ng 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).** Para la determinación de la expresión génica, se realizaron por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa a tiempo real en el termociclador Applied Biosystems® 7900 Real-Time PCR System (Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Usamos el ARN ribosómico 18s como control interno y para la normalización de los genes en estudio. El análisis de la expresión génica relativa se llevó a cabo mediante el método  $2^{-\Delta Ct}$  <sup>7</sup>. que compara la expresión



bFGF,  $\alpha$ -SMA o AQ1 en los cultivos tratados con los no tratados (controles) 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.

#### **2.1.4 Cuantificación proteica.**

En los sobrenadantes de los cultivos celulares se midieron los niveles de ambas proteínas, PCR y AAS. Las determinaciones se realizaron mediante ELISA (Quantikine R&D Systems Minneapolis, MN) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **3. Aspectos éticos.**

El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Revisión Institucional del Hospital Virgen del Rocío, Sevilla, España (CEI código 2013/023), 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. Los registros clínicos se anonimizaron en la base de datos asignando un código numérico a través de un algoritmo. No se ingresó información personal que pudiera usarse directa o indirectamente para identificar a una persona. Debido a la naturaleza retrospectiva del estudio, la anonimización de los datos y la falta de intervenciones de investigación activas, se dejó de aplicar el consentimiento informado. El comité de ética fue consciente de estas circunstancias claramente explicadas en el protocolo y aprobó este procedimiento.

## 4. Análisis estadístico.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, IBM Corporation, Somers, NY, EE.UU) versión 24.0. Los estadísticos descriptivos usados para las variables continuas fueron la media y la desviación estándar y frecuencias y porcentajes para las variables categóricas. Los estudios inferenciales se realizan con tests paramétricos, salvo que alguna de las variables incluidas en el análisis demuestre no seguir una distribución normal. En el estudio de la expresión de RFA, tanto a nivel de tejido como a nivel celular, entre pacientes EPOC y fumadores sanos se utilizó la prueba t de Student para datos independientes (test de Mann-Whitney en caso de no paramétrico), previa verificación de la igualdad de las varianzas con el test de Levene. Los datos categóricos se compararon con la prueba de  $\chi^2$ .

Los valores de expresión génica relativa se evaluaron con el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . En la estadística comparativa se aplicó el test de Wilcoxon para comparar los valores de expresión génica de acuerdo a la ubicación anatómica. Los datos categóricos se compararon con la prueba de  $\chi^2$ . Las asociaciones entre la expresión génica del tejido y los niveles plasmáticos de biomarcadores inflamatorios se analizaron con el coeficiente de correlación de Spearman. Se acepta un error alfa de 0,05.

## Resultados

---

## 1. Descripción de la muestra

La muestra estaba compuesta de 102 sujetos, de los cuales 40 (39,2%) pacientes cumplían los criterios diagnósticos de EPOC y 62 eran fumadores sin la enfermedad. Las principales características de los participantes del estudio se resumen en la Tabla 2. La mayoría de los pacientes fueron varones, tanto en el grupo de casos (37 varones; 92,5%) como en el grupo control (48 varones; 77,4%).

Predominaban los pacientes exfumadores en ambos grupos, a excepción de 17 fumadores activos en el grupo control (27,4%) y 13 fumadores activos en el grupo de pacientes EPOC (32,5%). Ningún paciente fumó el día previo a la intervención. Hubo diferencia estadísticamente significativa entre el consumo acumulado en paquetes-año entre ambos grupos, siendo 69,7 en los casos frente a 43,5 en los controles. En cuanto a las comorbilidades los pacientes con EPOC demostraron tener un índice de Charlson mayor, pero sin alcanzar esta diferencia la significación estadística.

La distribución de pacientes por estadios GOLD era: 11 (27,5%) pacientes en estadio GOLD I, 24 (60%) en estadio GOLD II, 5 (12,5%) en estadio GOLD III y ningún paciente en estadio GOLD IV. Con respecto al número de agudizaciones, 24 pacientes (60%) no habían tenido ninguna agudización en el año previo y 16 (40%) referían haber tenido una o dos agudizaciones (8; 20% y 8; 20% respectivamente) por lo teníamos algún caso que correspondía al fenotipo agudizador frecuente. En relación con el tratamiento, 14 (35%) pacientes con EPOC estaban recibiendo tratamiento con corticoides inhalados, de los cuales todos estaban en tratamiento combinado, 3 (7,5%)

pacientes estaban en tratamiento en monoterapia con un  $\beta$ 2-agonistas de acción prolongada y 18 (45%) pacientes con tiotropio.

En la tabla 3 se resumen el tipo de cirugía practicada y las distintas histologías de los tumores. Los procedimientos quirúrgicos consistieron en neumectomías (17,6%), lobectomías (78,4%) y resecciones atípicas (4%). Las operaciones se llevaron a cabo en el hemitórax derecho e izquierdo en el 54,9% y el 45,1% de los pacientes, respectivamente. Los tipos histológicos más comunes fueron el carcinoma de células escamosas (epidermoide) (42,2%) y adenocarcinomas (31,4%). Los resultados del examen patológico no revelaron tumores malignos en el 7,8% de los pacientes del estudio.

*Tabla 2. Características generales de la población de estudio.*

	Controles (n=62)	Pacientes con EPOC (n=40)	Valor p*
Hombres (n)	48 (77,4%)	37 (92,5%)	0,046
Edad (años)	64,4 ± 13,5	67,4 ± 8,01	NS
Tabaquismo activo	17 (27,4%)	13 (32,5%)	NS
Consumo acumulado (paq-año)	43,5 ± 34,7	69,7 ± 33,1	0,001
Índice Charlson-edad	4,9 ± 2,2	5,7 ± 1,7	NS
FVC (%)	98,7 ± 20,45	91,6 ± 19	NS
FEV <sub>1</sub> (%)	94,0 ± 19,89	69,0 ± 18,4	< 0,001
FEV <sub>1</sub> /FVC (%)	77,1 ± 6,9	59,0 ± 9,7	< 0,001

*Los datos se expresan como medias y desviaciones estándar para las variables continuas y frecuencias y porcentajes para las variables categóricas.*

*\* Los valores p se calcularon con la prueba t de Student (variables continuas) o la prueba de  $\chi^2$  (variables categóricas).*

*Abreviaturas: FVC: capacidad vital forzada; FEV<sub>1</sub>: volumen espiratorio forzado en el primer segundo; NS: no significativo.*

Tabla 3. Descripción del tipo de cirugía e histología de los tumores.

	Controles (n=62)	Pacientes con EPOC (n=40)	Valor p*
<b>Tipo de resección</b>			
• Neumonectomía	7 (11,3%)	11 (27,5%)	0,036
• Lobectomía	53 (85,5%)	27 (67,5%)	0,031
• Atípica	2 (3,2%)	2 (5%)	NS
<b>Hemitórax:</b>			
• Derecho	36 (58%)	20 (50%)	NS
• Izquierdo	26 (42%)	20 (50%)	NS
<b>Histología</b>			
• Adenocarcinoma	21 (33,9%)	11 (27,5%)	NS
• Epidermoide	23 (37,1%)	20 (50%)	NS
• Otros	12 (19,4%)	7 (17,5%)	NS
• Tumor benigno	3 (4,8%)	2 (5%)	NS
• No neoplasia	3 (4,8%)	0	NS

\* Calculado para la diferencia entre grupos mediante el test de la Chi-cuadrado o el test de Mann-Whitney, según la naturaleza de la variable.

Abreviaturas: NS: no significativo.



## **2. Objetivo 1: expresión génica tisular de biomarcadores y correlación con expresión proteica en suero**

Al analizar la expresión génica de PCR y AAS en el parénquima pulmonar, tejido vascular de arteria pulmonar y leucocitos de sangre periférica, observamos que los tres tipos de muestras expresaban ambos biomarcadores.

### **2.1. Expresión de RFA en parénquima pulmonar**

La expresión génica en el parénquima pulmonar de PCR y AAS fue mayor en los pacientes con EPOC frente a fumadores sanos. Sin embargo, la expresión de AAS no difirió significativamente entre los dos grupos (Figura 4).

En el parénquima pulmonar, hemos encontrado correlaciones positivas significativas entre la expresión de AAS1 y PCR ( $r = 0,208$ ,  $p = 0,037$ ), AAS1 y AAS2 ( $r = 0,515$ ,  $p < 0,001$ ), y AAS1 y AAS4 ( $r = 0,789$ ,  $p < 0,001$ ).

Se observaron diferencias significativas en términos de expresión de AAS 4 entre fumadores sanos y pacientes EPOC grado III de la GOLD ( $p = 0,034$ ), así como entre EPOC grado II y III GOLD entre sí ( $p = 0,044$ ). La expresión AAS4 en el parénquima pulmonar aumentó en paralelo con la gravedad de la enfermedad (Figura 5, D). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los demás RFA y los diferentes estadios de enfermedad.

*Figura 4. Niveles de expresión génica de los RFA de los fumadores sanos (controles) y de los pacientes con EPOC en parénquima pulmonar.*

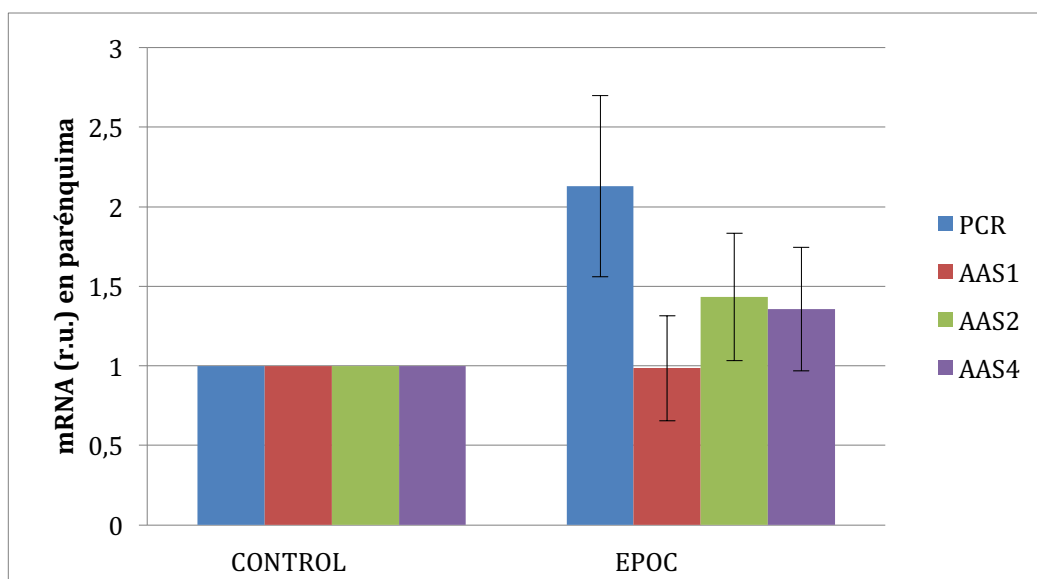
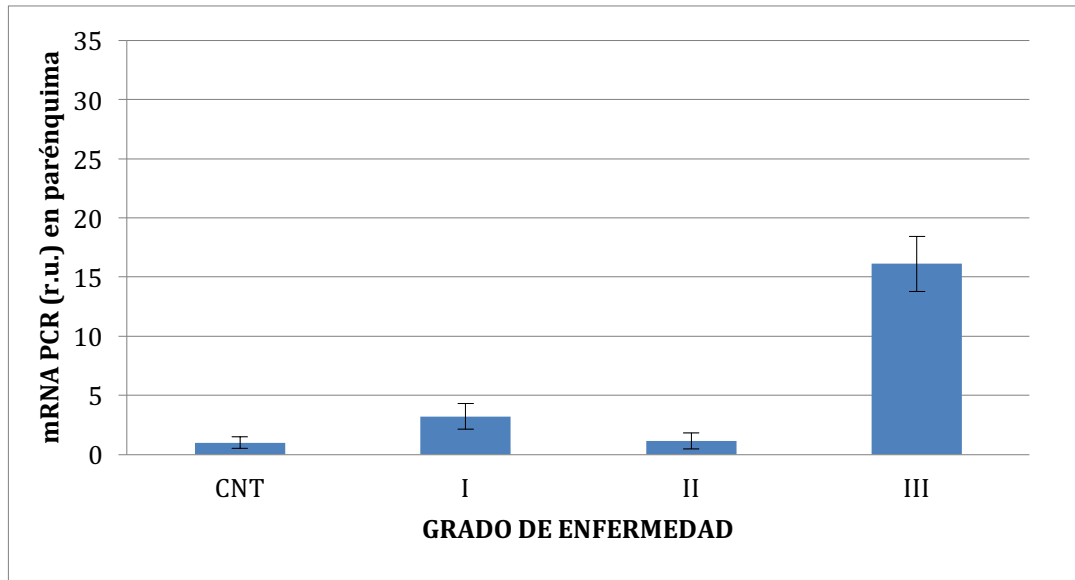
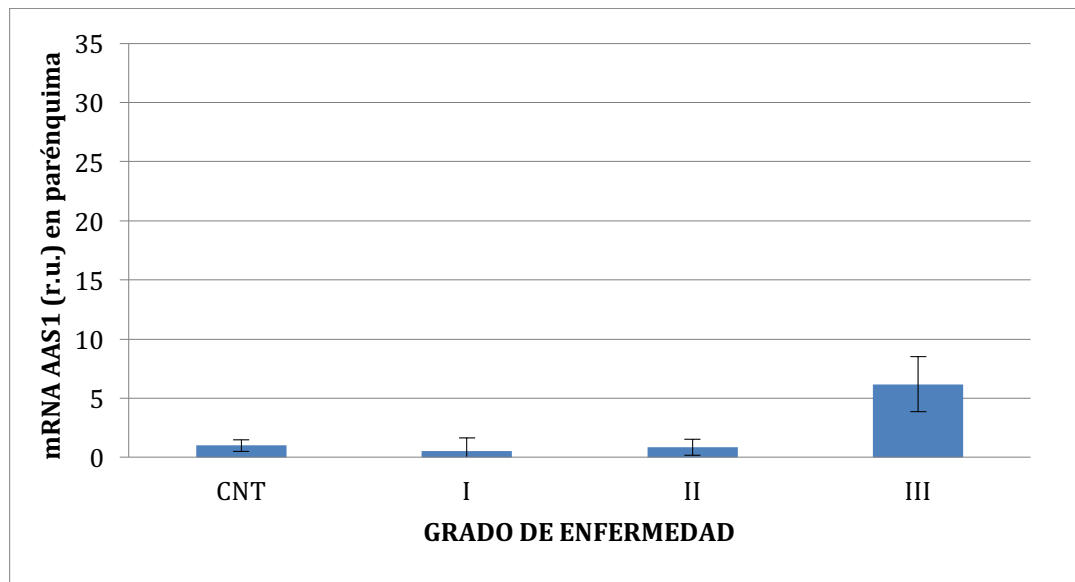


Figura 5. Perfil de expresión de PCR (A) y subtipos de AAS (B, C, D) en el parénquima pulmonar de acuerdo al grado de la EPOC.

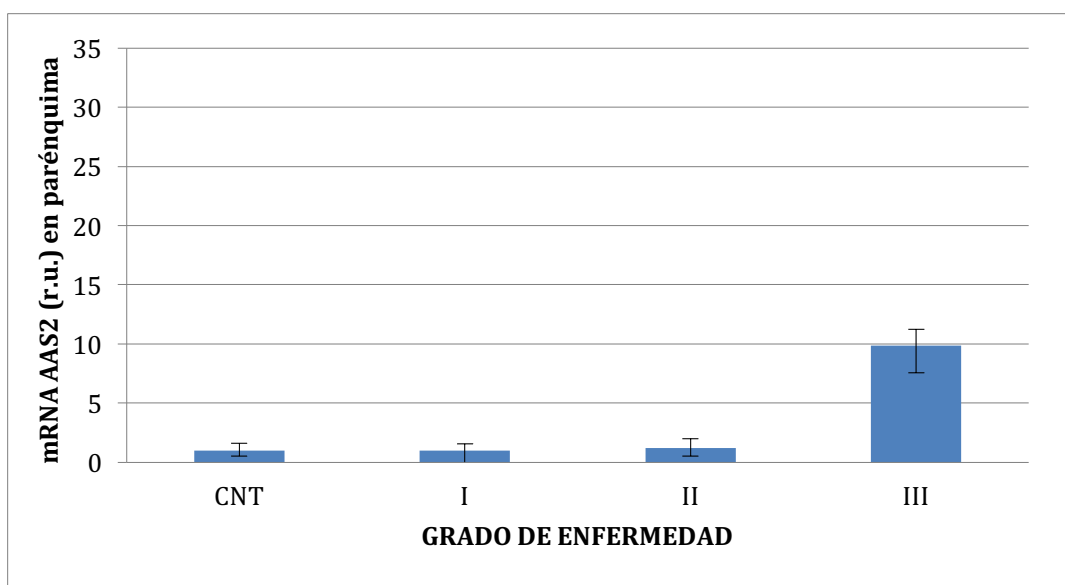
A)



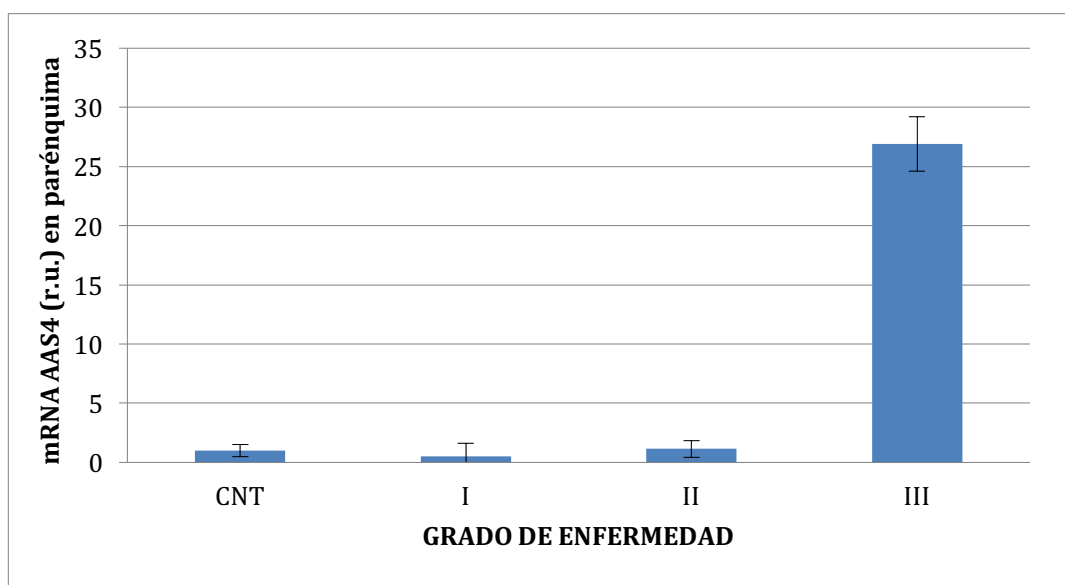
B)



C)



D)



*Abreviaturas: CNT, fumadores sanos (controles); I, EPOC GOLD I; II, EPOC GOLD II; III, EPOC GOLD III.*

## 2.2. Expresión de RFA en arteria pulmonar

La expresión de PCR en la arteria pulmonar fue significativamente mayor en los pacientes con EPOC que en los fumadores sanos. Por otra parte, la expresión AAS2 fue mayor del 100% en los pacientes con EPOC que en los controles ( $p = 0,028$ ; Figura 6).

En la arteria pulmonar, hemos encontrado correlaciones positivas significativas entre la expresión de la PCR y AAS1 ( $r = 0,403$ ,  $p < 0,001$ ), así como entre AAS1 y AAS4 ( $r = 0,494$ ,  $p < 0,001$ ).

Se observaron diferencias significativas en cuanto a la expresión de AAS2 entre los fumadores sanos y los pacientes con EPOC grado I de la GOLD ( $p = 0,010$ ), así como entre los EPOC grado I y II de la GOLD entre sí ( $p = 0,012$ ; Figura 7, C). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los demás RFA y los diferentes estadios de enfermedad. La expresión AAS4 en el parénquima pulmonar aumentó en paralelo con la gravedad de la enfermedad (Figura 7, D).

Figura 6. Niveles de expresión génica de los RFA de los fumadores sanos (controles) y de los pacientes con EPOC en arteria pulmonar.

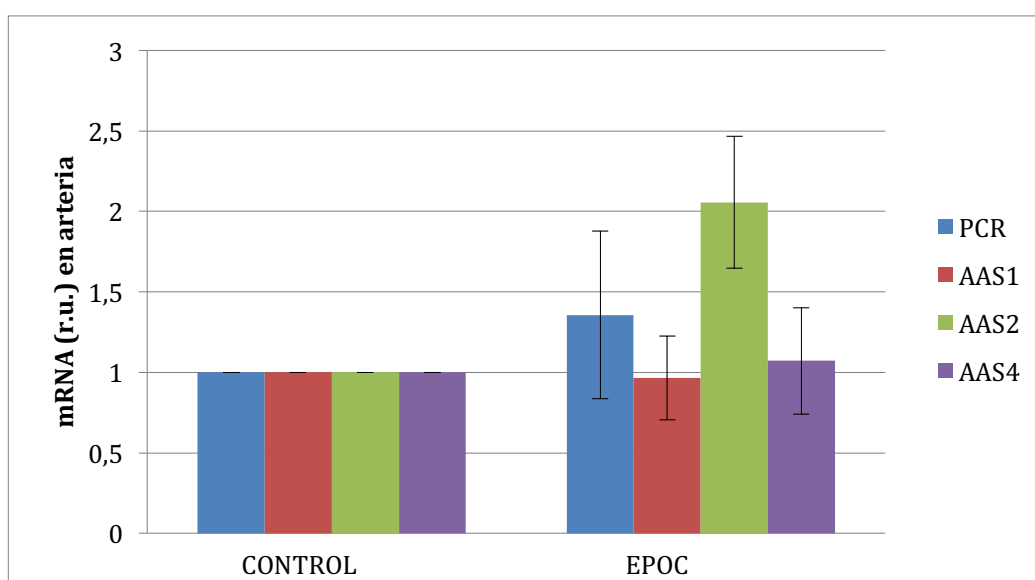
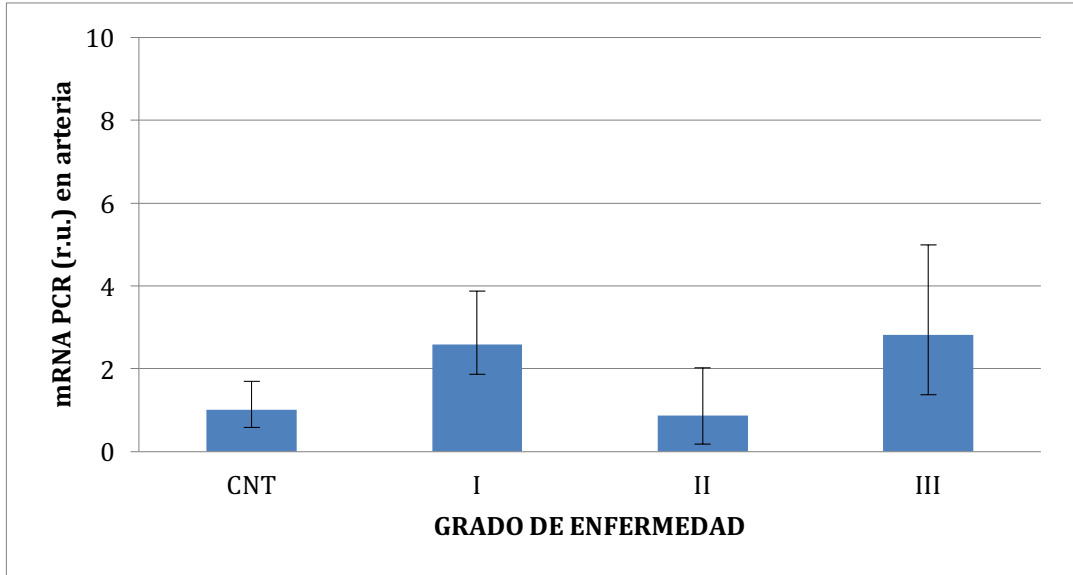
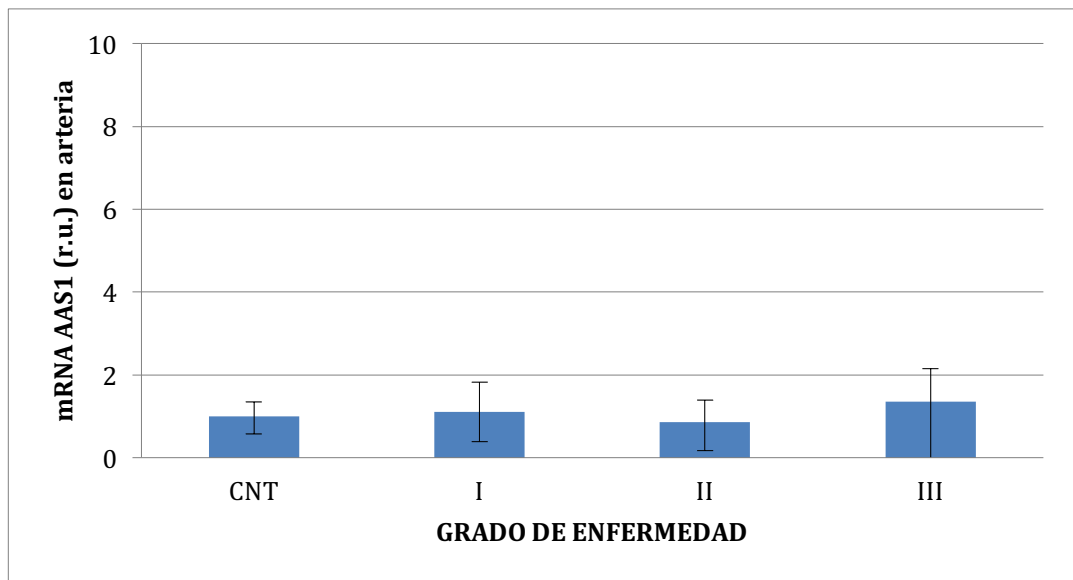


Figura 7. Perfil de expresión de PCR (A) y subtipos de AAS (B, C, D) en arteria pulmonar de acuerdo al grado de la EPOC.

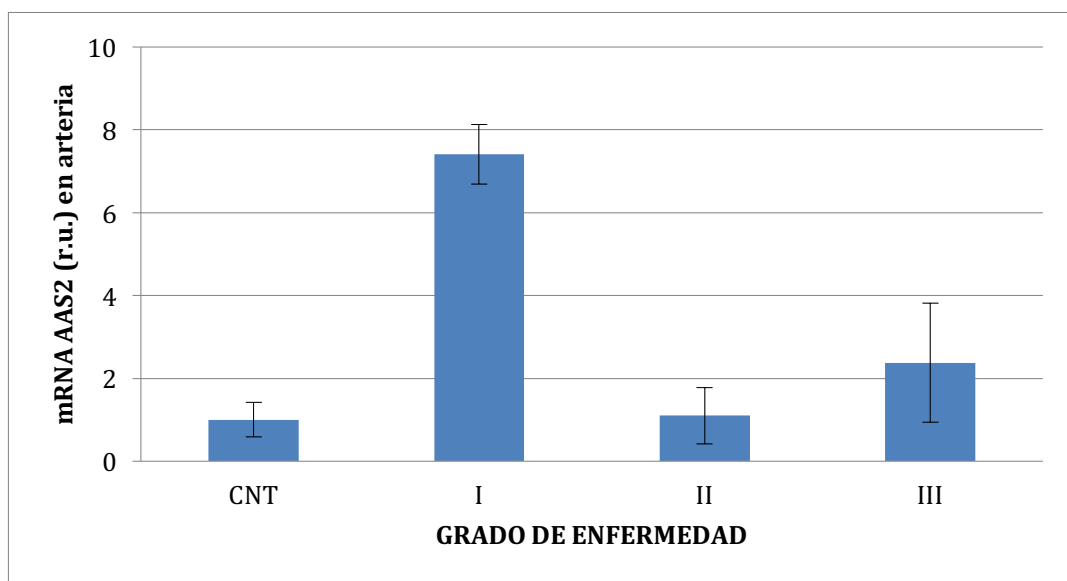
A)



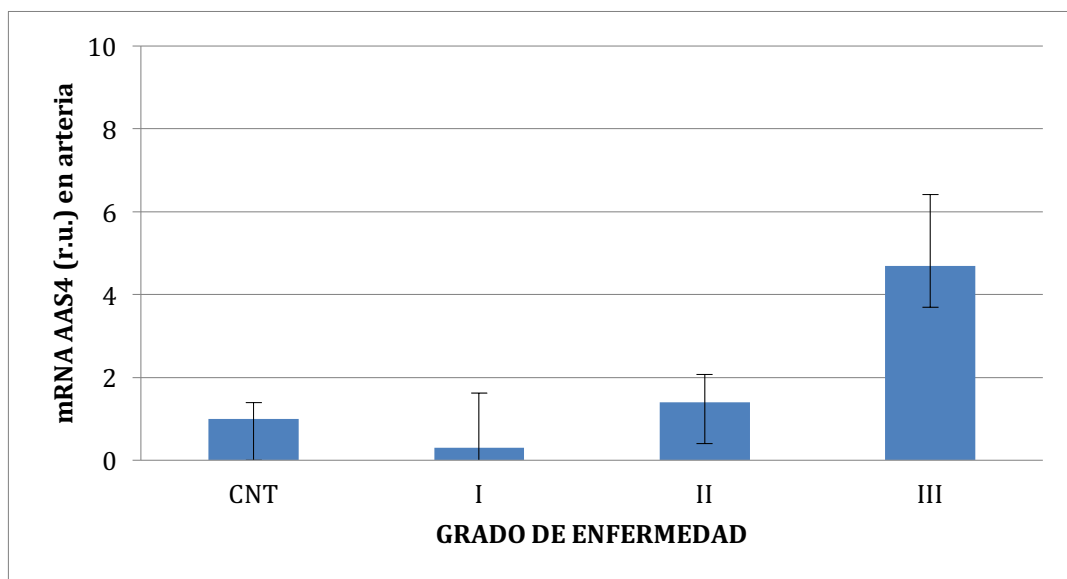
B)



C)



D)



*Abreviaturas: CNT, fumadores sanos (controles); I, EPOC GOLD I; II, EPOC GOLD II; III, EPOC GOLD III.*

### 2.3. Expresión de RFA en leucocitos de sangre periférica

Se encontró que la expresión génica de PCR, AAS1, y AAS4 en leucocitos de sangre periférica difiere significativamente entre los pacientes con EPOC y los fumadores sanos. En línea con los resultados obtenidos en la arteria pulmonar, la expresión AAS2 fue mayor del 100% en los pacientes con EPOC que en los controles (Figura 8).

Hubo una correlación positiva entre la expresión de AAS1 y AAS4 ( $r = 0,985$ ,  $p < 0,001$ ). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupo EPOC grado I de la GOLD y fumadores sanos en niveles de expresión de AAS1 ( $p = 0,037$ ) y AAS4 ( $p = 0,018$ ). Además, se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión AAS4 entre pacientes EPOC grado I y II de la GOLD ( $p = 0,030$ ; Figura 9B y figura 9D respectivamente). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los demás RFA y los diferentes estadios de enfermedad.

*Figura 8. Niveles de expresión génica de los RFA de los fumadores sanos (controles) y de los pacientes con EPOC en leucocitos de sangre periférica.*

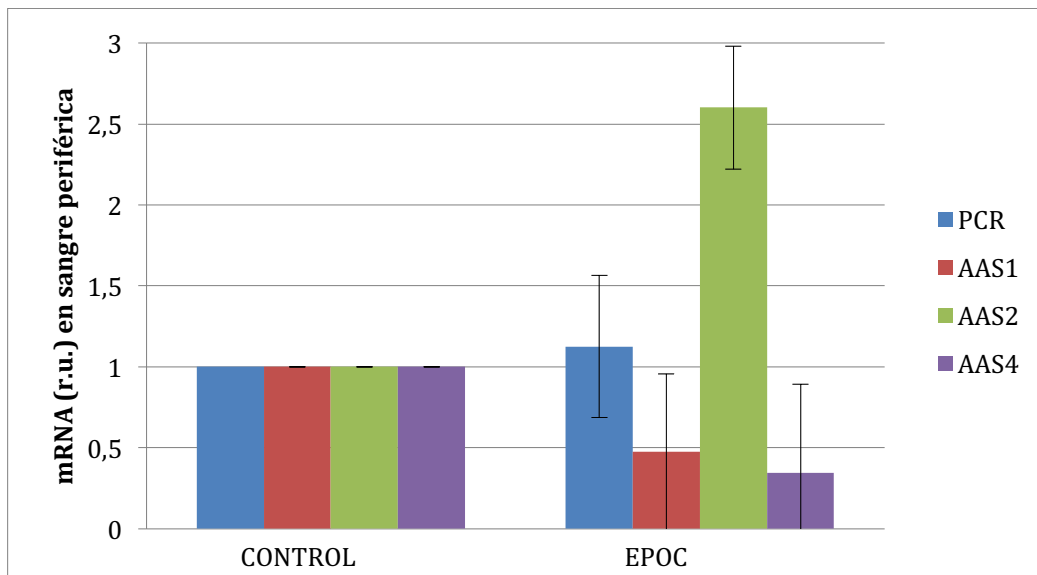
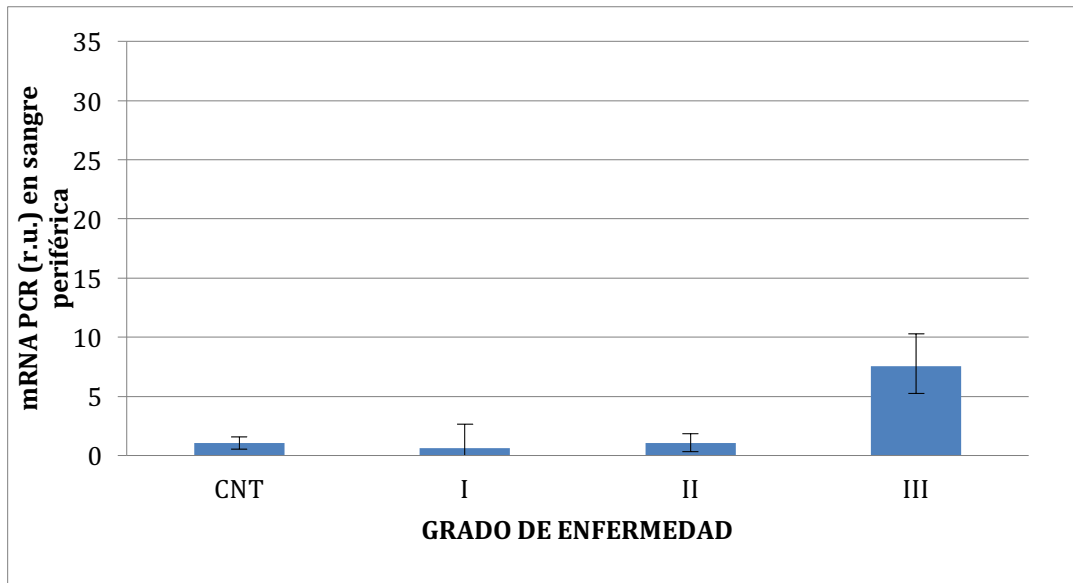


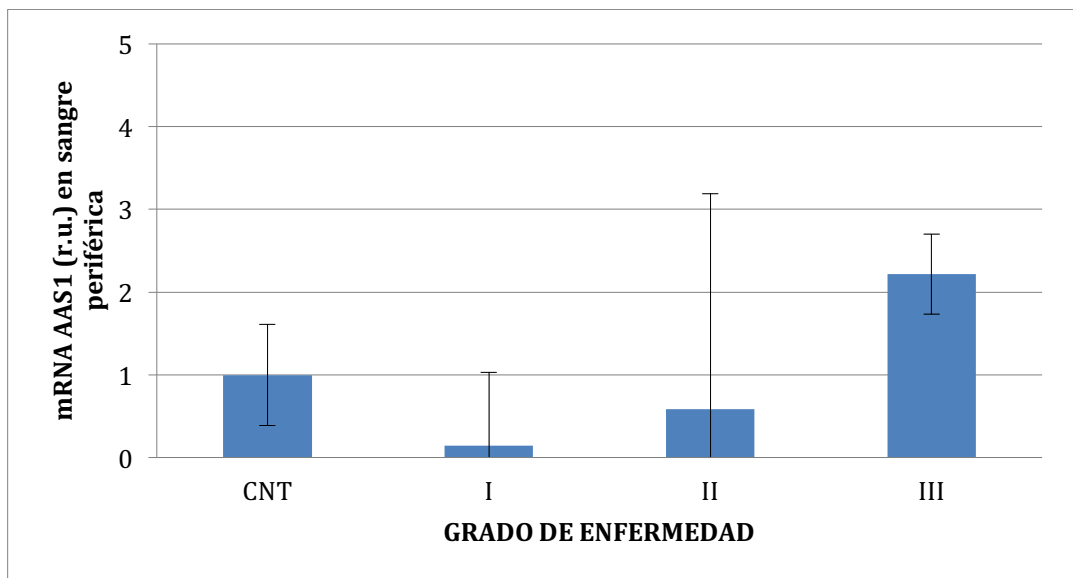


Figura 9. Perfil de expresión de PCR (A) y subtipos de AAS (B,C,D) en las células sanguíneas de acuerdo al grado de la EPOC.

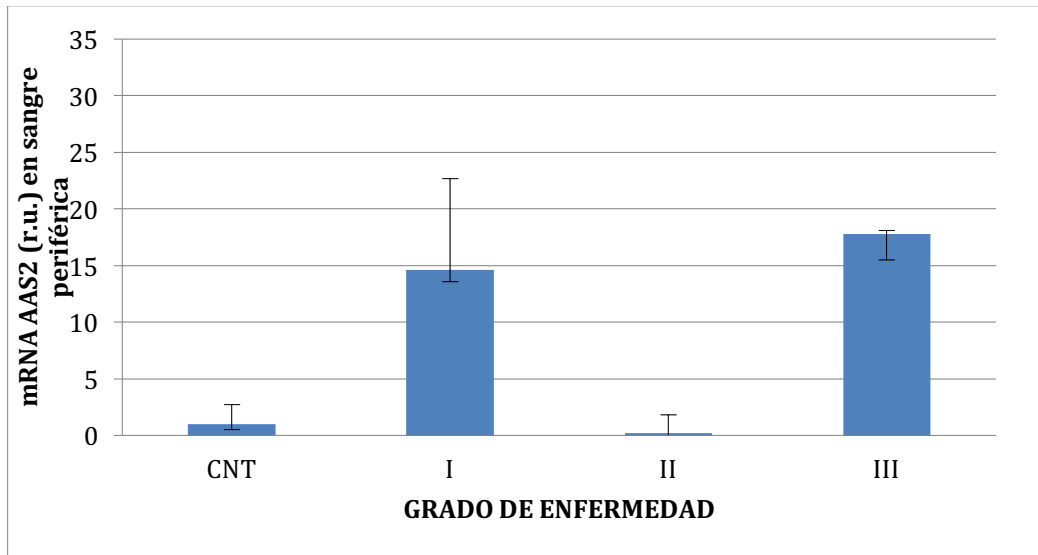
A)



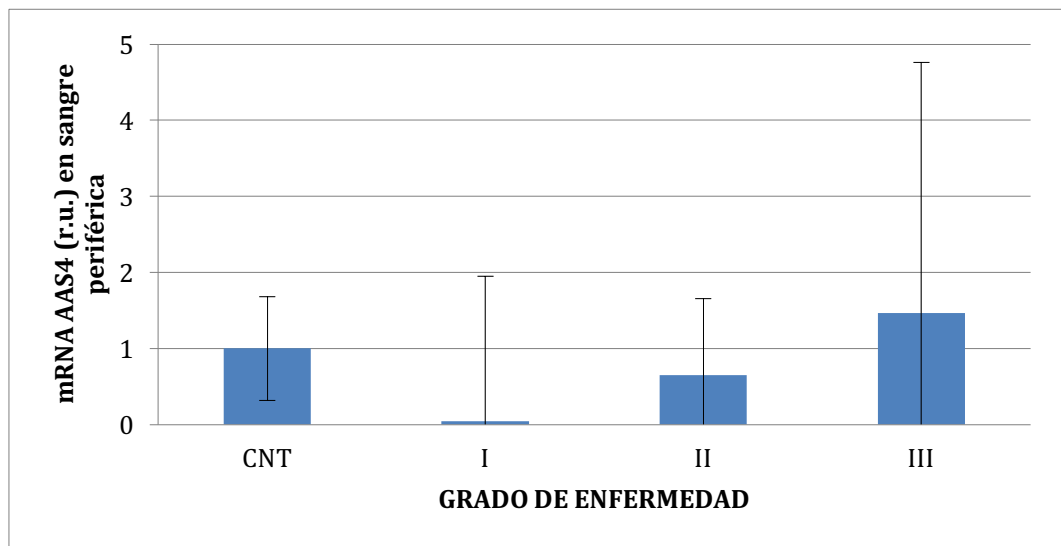
B)



C)



D)



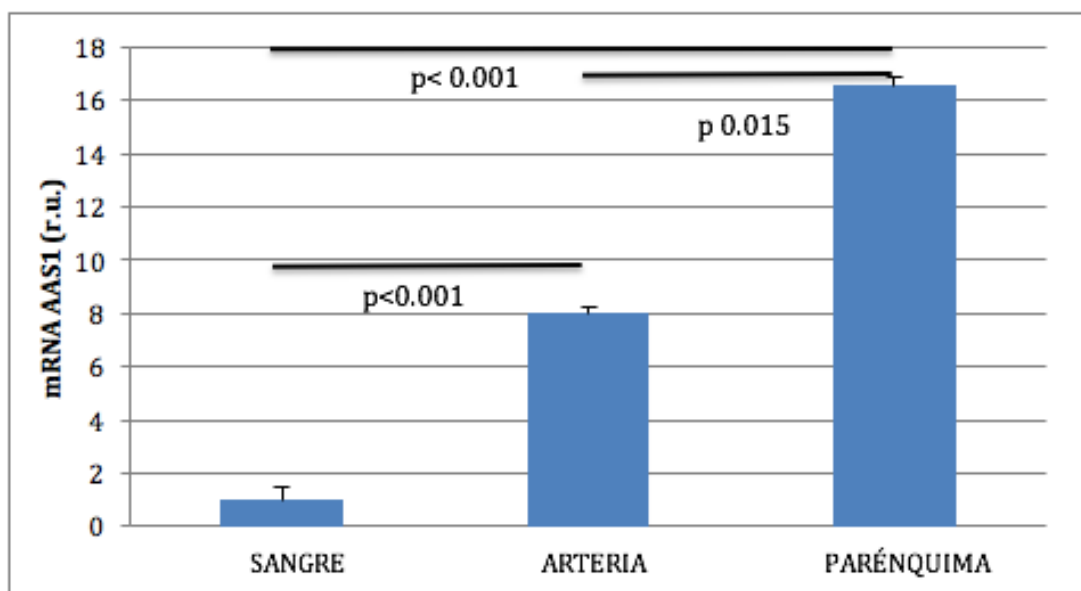
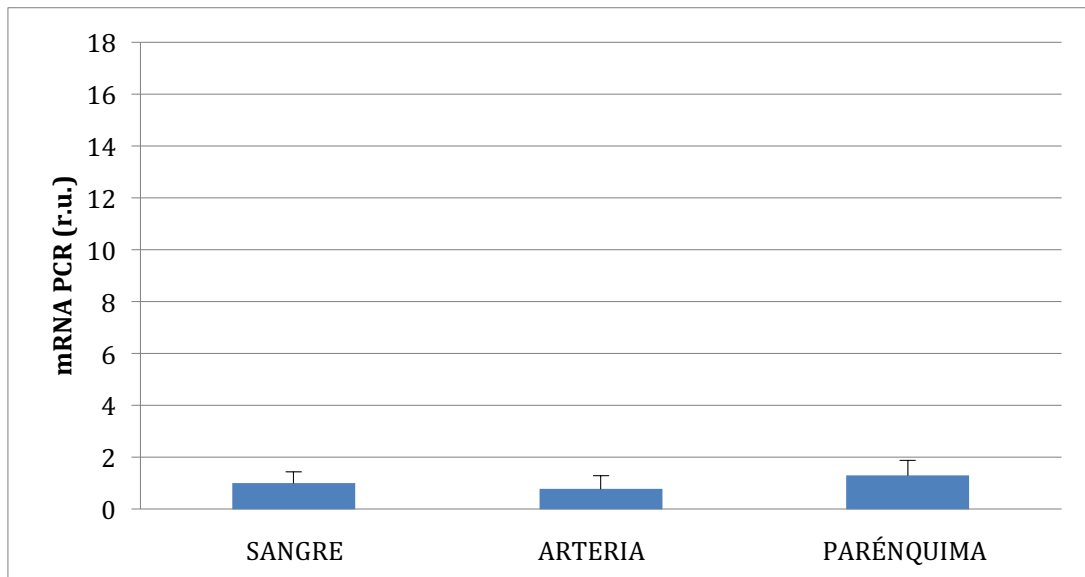
Abreviaturas: CNT, fumadores sanos (controles); I, EPOC GOLD I; II, EPOC GOLD II; III, EPOC GOLD III.

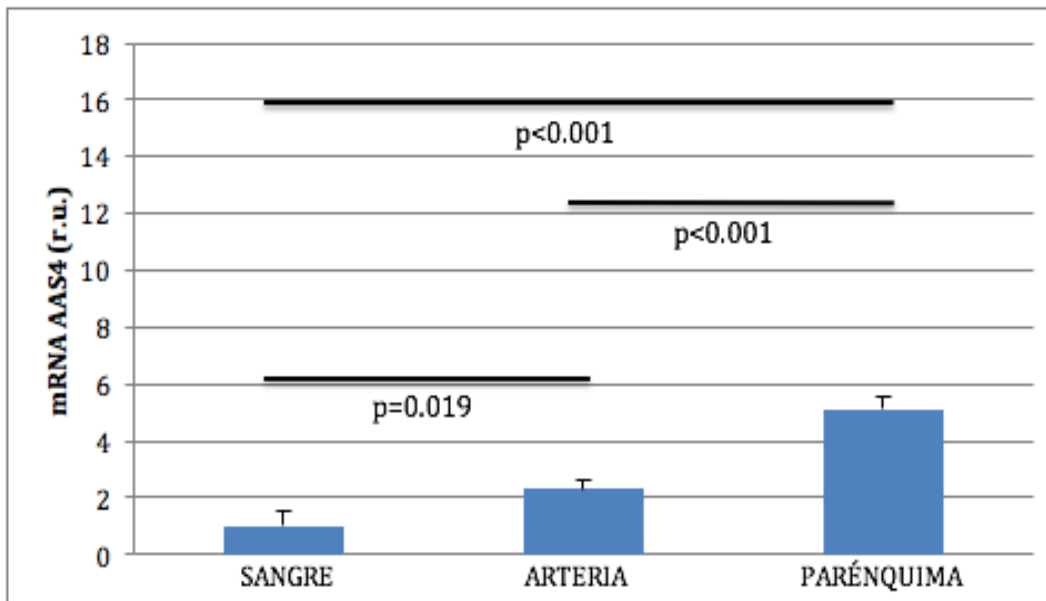
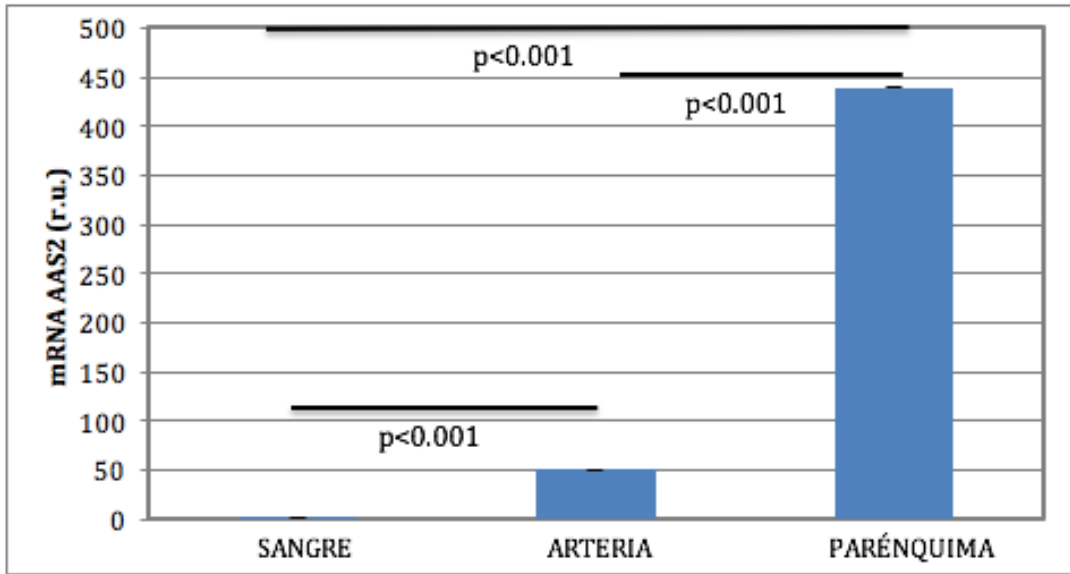
## 2.4. Comparación en la expresión de RFA entre los diferentes tipos de muestras

A continuación, procedemos a comparar la expresión de los distintos RFA (PCR y AAS) en los tres tipos de muestras, parénquima pulmonar, arteria pulmonar y leucocitos de sangre periférica (Figura 10).

La expresión de AAS fue significativamente mayor en el parénquima pulmonar que en la arteria pulmonar (100% más alto para AAS1 y AAS4,  $p = 0,015$  y  $p < 0,001$ , respectivamente; 8 veces mayor para AAS2,  $p < 0,001$ ) y leucocitos de sangre periférica (16 veces más altos para AAS1, 439 veces mayor para AAS2, y 5 veces mayor para AAS4;  $p < 0,001$ ). En comparación con los leucocitos de sangre periférica, la expresión de AAS fue significativamente mayor en la arteria pulmonar (8 veces mayor para AAS1,  $p < 0,001$ ; 50 veces más altos para AAS2,  $p < 0,001$ ; y 2,3 veces más alta para AAS4,  $p = 0,019$ ). Sin embargo, no se observaron diferencias en la expresión de la PCR entre el parénquima pulmonar, la arteria pulmonar y leucocitos de sangre periférica.

Figura 10. Comparación de los niveles de expresión génica de distintos RFA en diferentes tejidos (células de la sangre, arteria pulmonar y parénquima pulmonar) de los pacientes con EPOC.





## 2.5. Asociaciones entre la expresión de los RFA en los diferentes tipos de muestras.

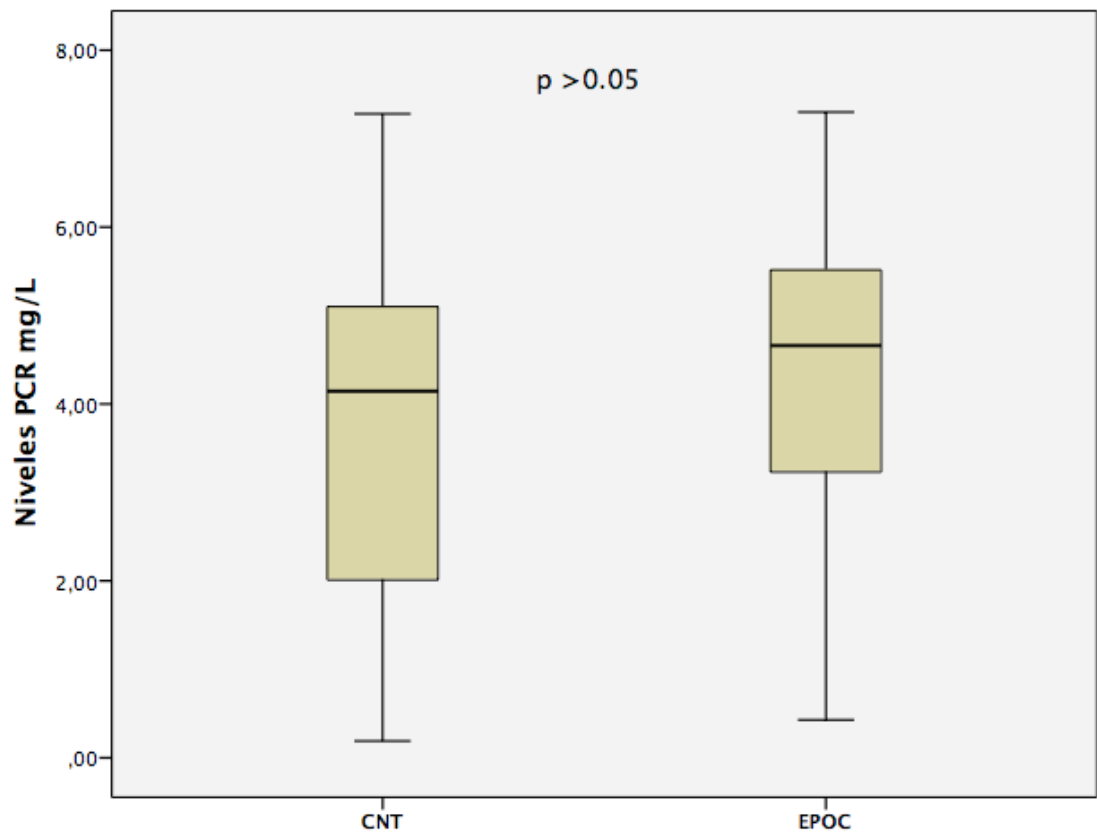
A continuación, se investigó la asociación entre la expresión de RFA en el parénquima pulmonar, arteria pulmonar, y leucocitos de sangre periférica. Se identificaron correlaciones positivas significativas entre los niveles de expresión génica de PCR en la arteria pulmonar y leucocitos de sangre periférica ( $r = 0,195$ ,  $p = 0,04$ ), AAS1 en el parénquima pulmonar y leucocitos de sangre periférica ( $r = 0,743$ ,  $p < 0,001$ ), y AAS4 en el parénquima pulmonar y leucocitos de sangre periférica ( $r = 0,980$ ,  $p < 0,001$ ). Además, hubo una asociación significativa entre la expresión AAS1 en el parénquima pulmonar y AAS4 en leucocitos de sangre periférica ( $r = 0,758$ ,  $p < 0,001$ ), así como AAS4 en el parénquima pulmonar y AAS1 en leucocitos de sangre periférica ( $r = 0,966$ ,  $p < 0,001$ ). Se identificaron las diferencias más marcadas en la expresión para AAS2.

## 2.6. Asociaciones entre la expresión génica de RFA y sus concentraciones plasmáticas

Los niveles plasmáticos de PCR mostraron una tendencia hacia niveles más altos en los pacientes con EPOC ( $4,4 \pm 1,73$  mg / ml) frente a fumadores sanos ( $3,8 \pm 2,04$  mg/ml,  $p > 0,05$ ). Las concentraciones de AAS en plasma fueron significativamente mayores en los pacientes con EPOC ( $5,6 \pm 1,3$  mg / ml) que en los controles ( $4,6 \pm 2,1$  mg / ml,  $p = 0,031$ ) (Figura 11). Los niveles de AAS aumentaron en paralelo con la gravedad de la EPOC (Figura 12). Se identificó una asociación positiva significativa entre los niveles de PCR en plasma y los niveles de AAS ( $r = 0,617$ ,  $p < 0,001$ ) (Figura 13). Sin embargo, no hubo correlación significativa entre los niveles plasmáticos de PCR y su expresión génica en el parénquima pulmonar ( $r = -0,127$ ,  $p < 0,4$ ), la arteria pulmonar ( $r = -0,049$ ,  $p < 0,7$ ) y leucocitos de sangre periférica ( $r = -0,271$ ,  $p < 0,09$ ). Tampoco hubo correlación significativa entre los niveles plasmáticos de AAS y su

expresión génica en el parénquima pulmonar ( $r = -0,207$ ,  $p < 0,56$ ), arteria pulmonar ( $r = -0,037$ ,  $p < 0,054$ ) y leucocitos en sangre periférica ( $r = -0,117$ ,  $p < 0,29$ )

Figura 11. Concentraciones plasmáticas de PCR y AAS en los fumadores sanos (controles, CNT) y los pacientes EPOC.



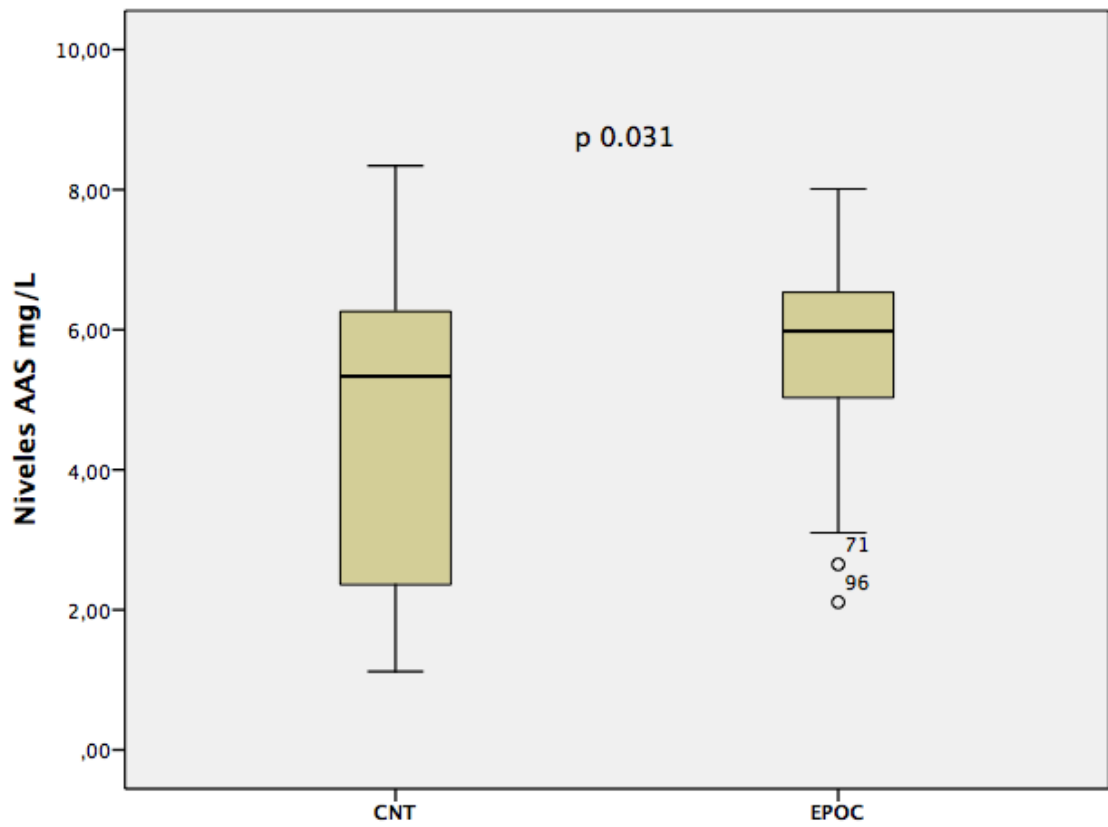
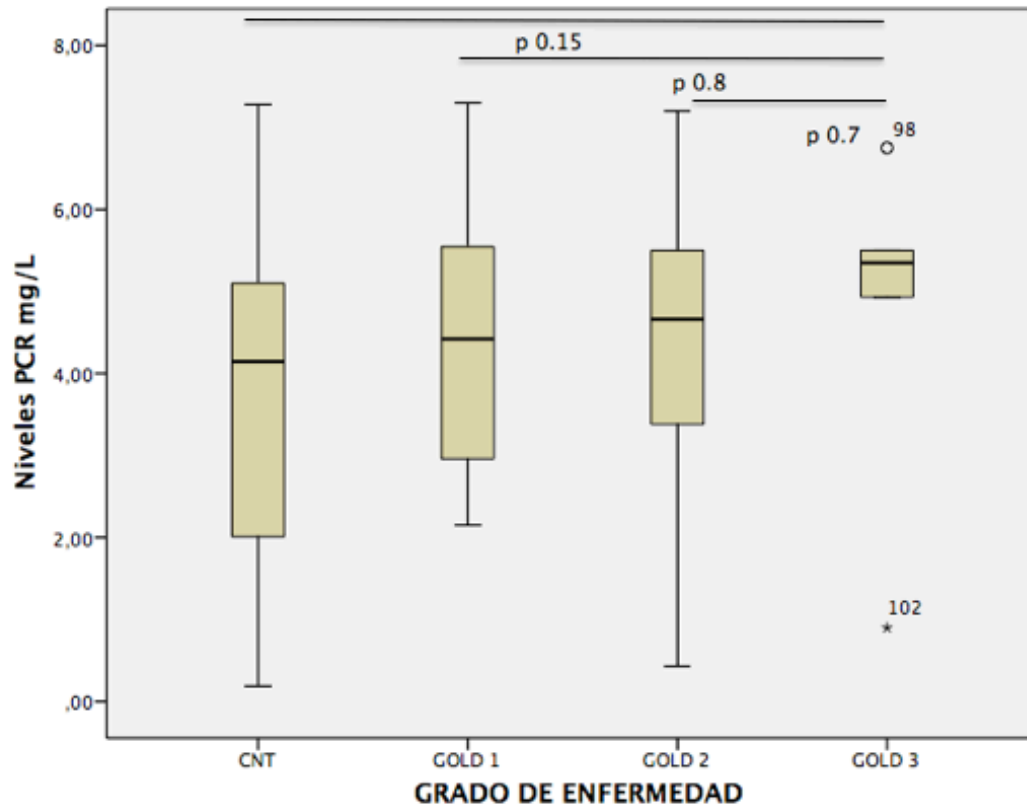




Figura 12. Concentraciones plasmáticas de PCR y AAS en los fumadores sanos (controles, CNT) y los pacientes con diferentes estadios de la EPOC.



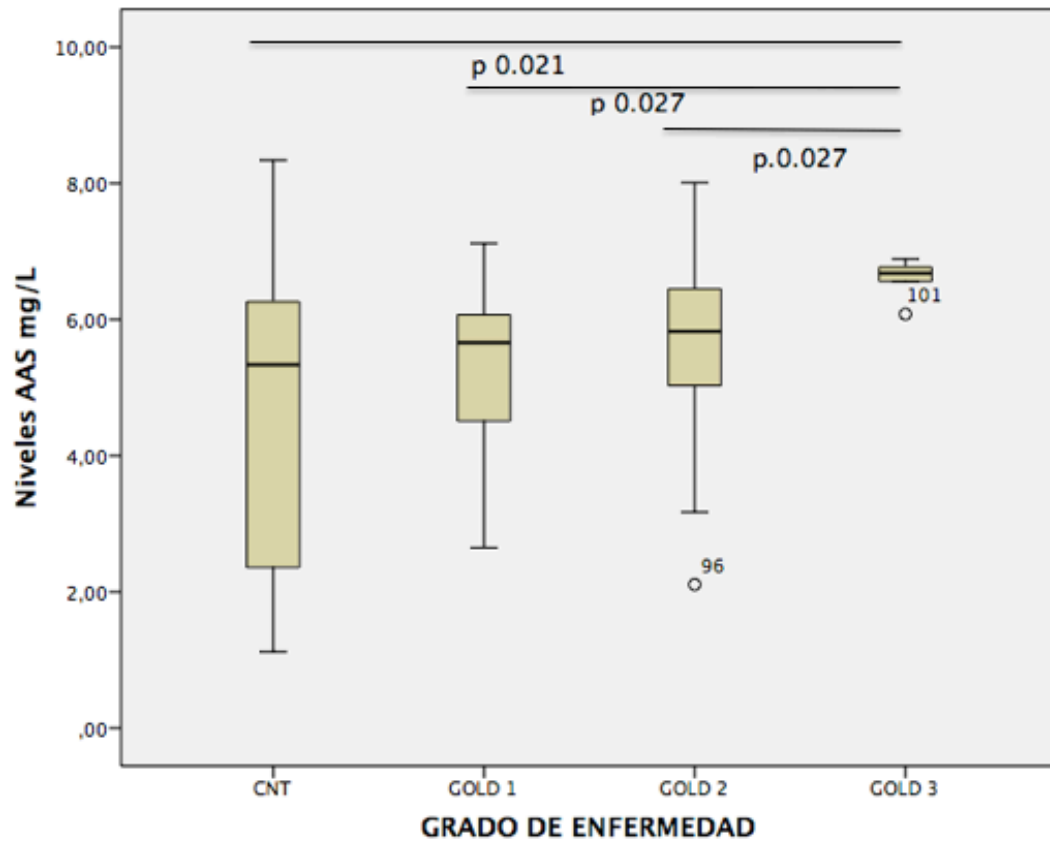
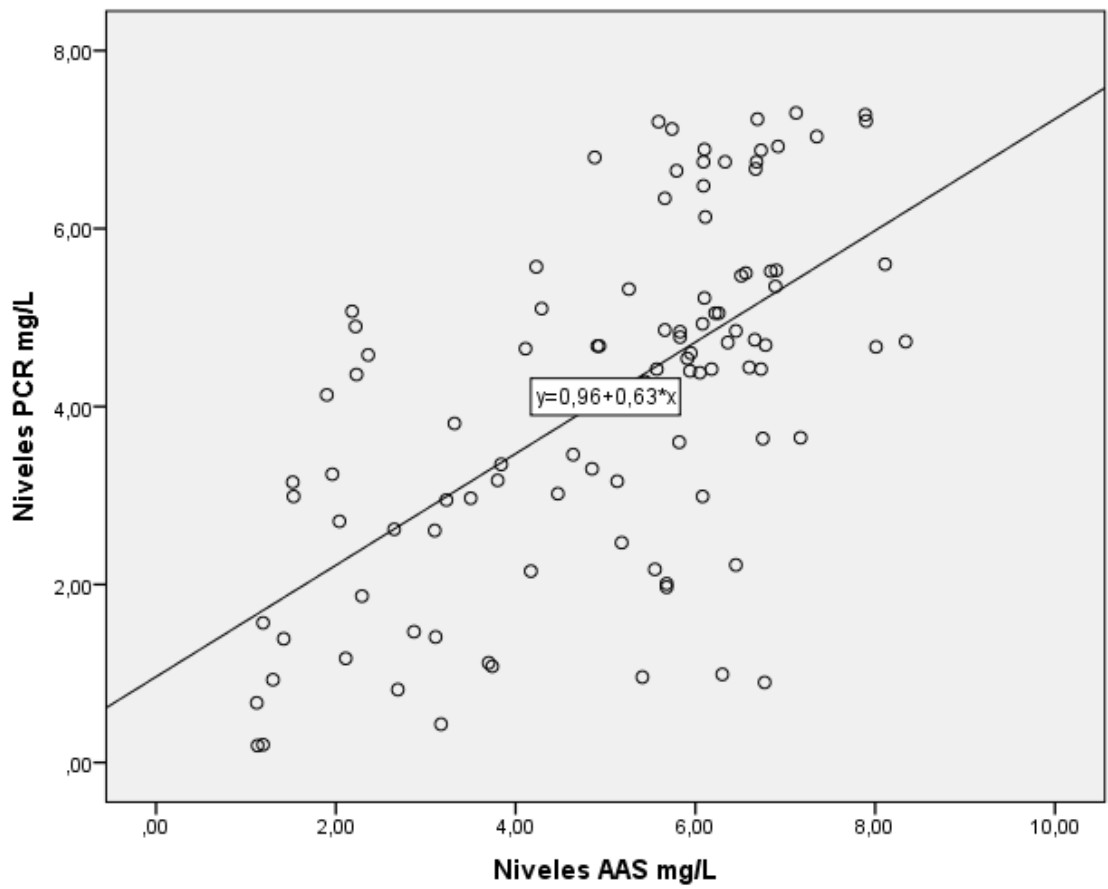


Figura 13. Correlación entre niveles plasmáticos de PCR y AAS.



### **3. Objetivo 2. RFA en células respiratorias y comparación con hepatocitos**

#### **3.1. Evaluación de la expresión génica y concentraciones proteicas entre tipos celulares**

Tras 24 y 48 horas de incubación en medio de cultivo con IL-1 podemos observar como las células epiteliales, fibroblastos pulmonares y hepatocitos humanos responden al estímulo de esta citoquina proinflamatoria. Los resultados de la expresión están reflejados en la Tabla 4. Los tres tipos celulares son capaces de sintetizar ambos RFA implicados en la inflamación sistémica de la EPOC (AAS y PCR).

Tabla 4. Expresión génica de AAS y PCR de células epiteliales, fibroblastos y hepatocitos frente a controles.

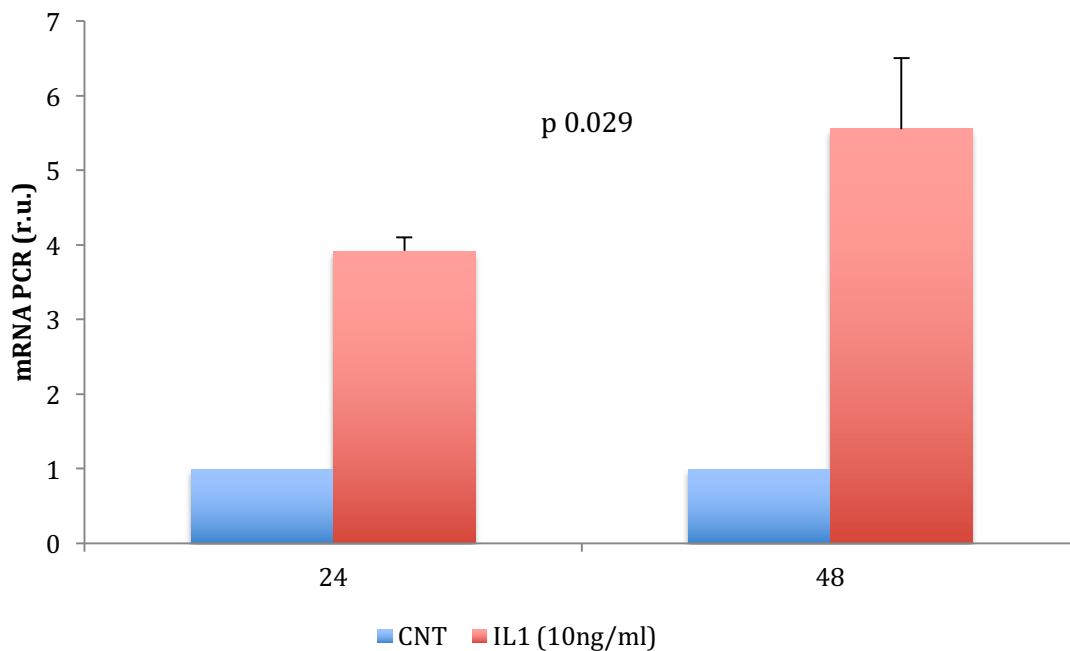
		Hepatocitos (CRL2706)		Hepatocitos (HEP3B)		Epiteliales (Nuli-1)		Fibroblastos (MRC-5)	
		24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
PCR	Control	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)
	IL-1	0,61 (0,67)	5,6 (2,43)	1,42 (0,70)	6,87 (5,43)	3,91 (0,18)	5,55 (0,95)	32,02 (44,58)	1 (0,56)
AAS1	Control	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)
	IL-1	1,54 (0,1)	2,12 (1,1)	1438,94 (612,7)	1578,19 (1004,8)	2,87 (0,75)	4,67 (0,43)	83,61 (33,9)	45,91 (9,2)
AAS2	Control	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)
	IL-1	0,94 (1,1)	0,83 (0,5)	1366,25 (366,0)	1986,69 (1235,4)	6,52 (6,9)	14,8 (8,2)	199,73 (42,4)	305,36 (183,1)
AAS4	Control	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)
	IL-1	1,58 (0,5)	4,82 (1,1)	2,35 (1,8)	3,08 (1,5)	1,84 (1,2)	8,02 (4,4)	163,25 (0,5)	4,23 (1,9)

Datos expresados en media y desviación típica.

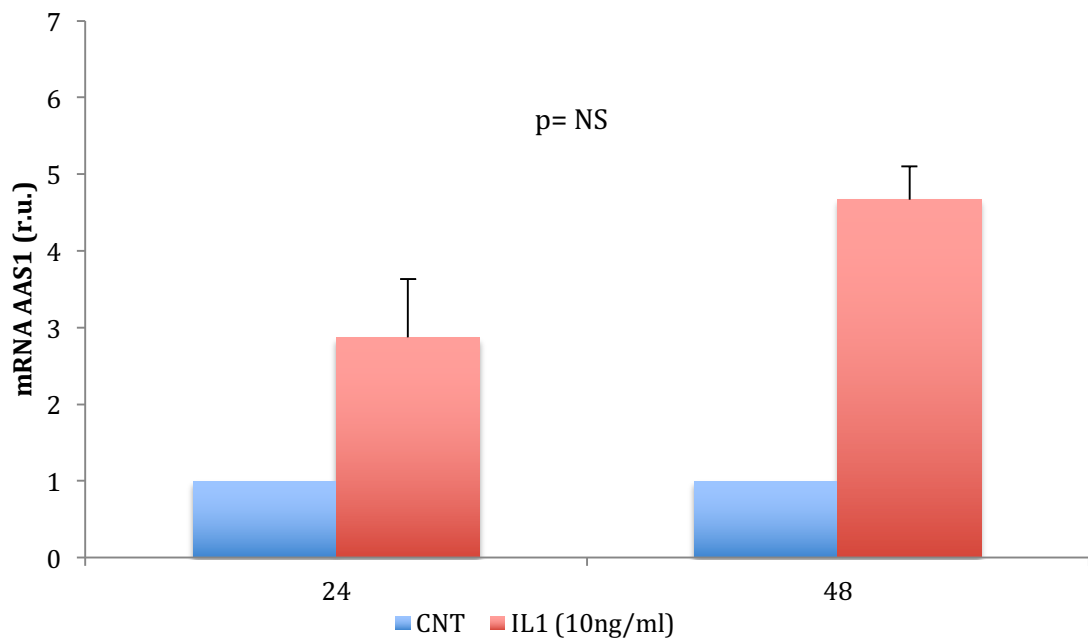
Al analizar la expresión génica de cada marcador por tipo celular, vemos que a nivel de las células epiteliales aumentan la expresión y niveles de proteínas para PCR y AAS cuando se les trata con IL-1 con respecto al control (células no tratadas) (Figura 14-15). De todos ellos fue significativamente mayor la expresión de PCR ( $p = 0,029$ ). Sin embargo, este aumento no es significativo a nivel de proteínas. Con respecto al AAS, observamos un aumento no significativo, aunque mayor que para el resto de subtipos a nivel de AAS2 y un aumento significativo en la concentración proteica ( $p = 0,029$ ) (Figura 16)

Figura 14. Expresión génica de PCR (A) y subtipos de AAS (B, C, D) en células epiteliales bronquiales estimuladas frente a controles.

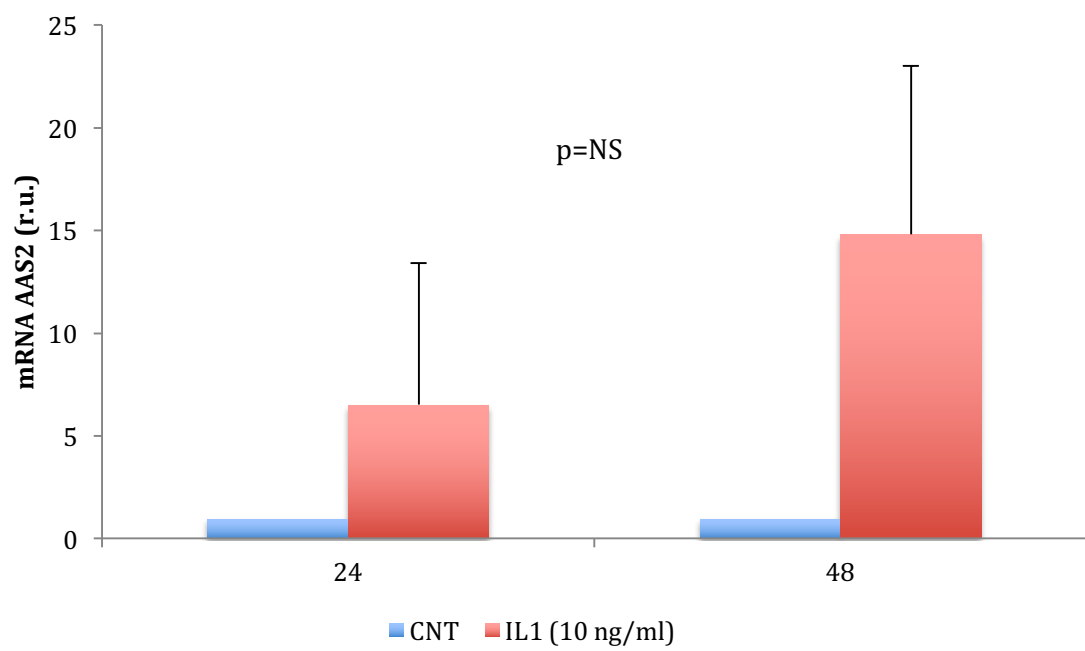
A)



B)



C)



D)

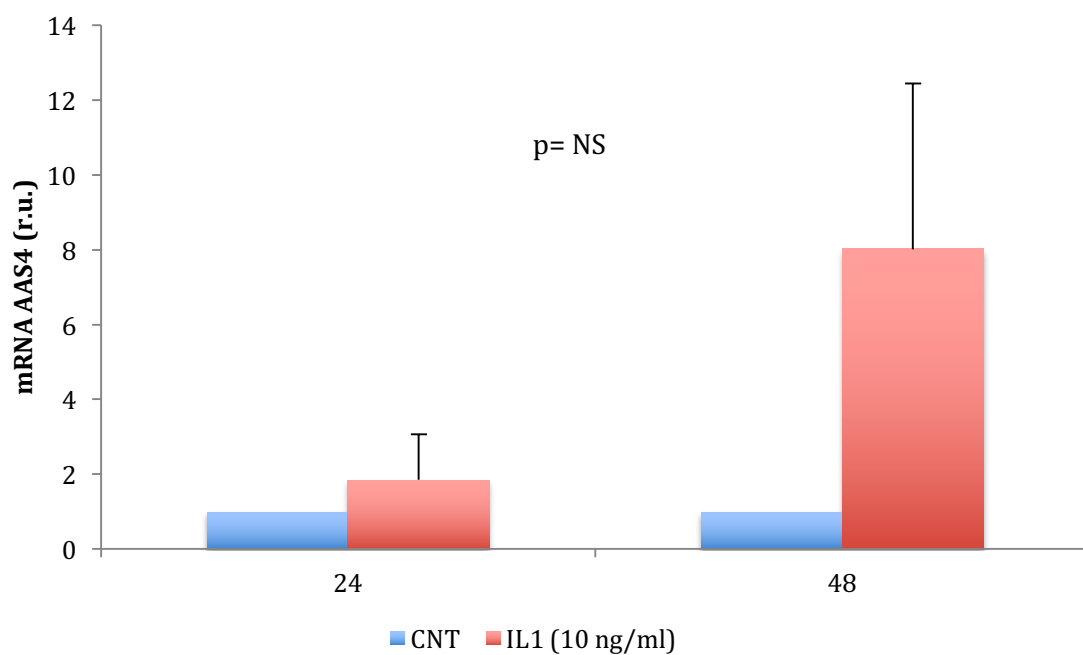


Figura 15. Expresión génica de PCR y subtipos de AAS en células epiteliales bronquiales estimuladas.

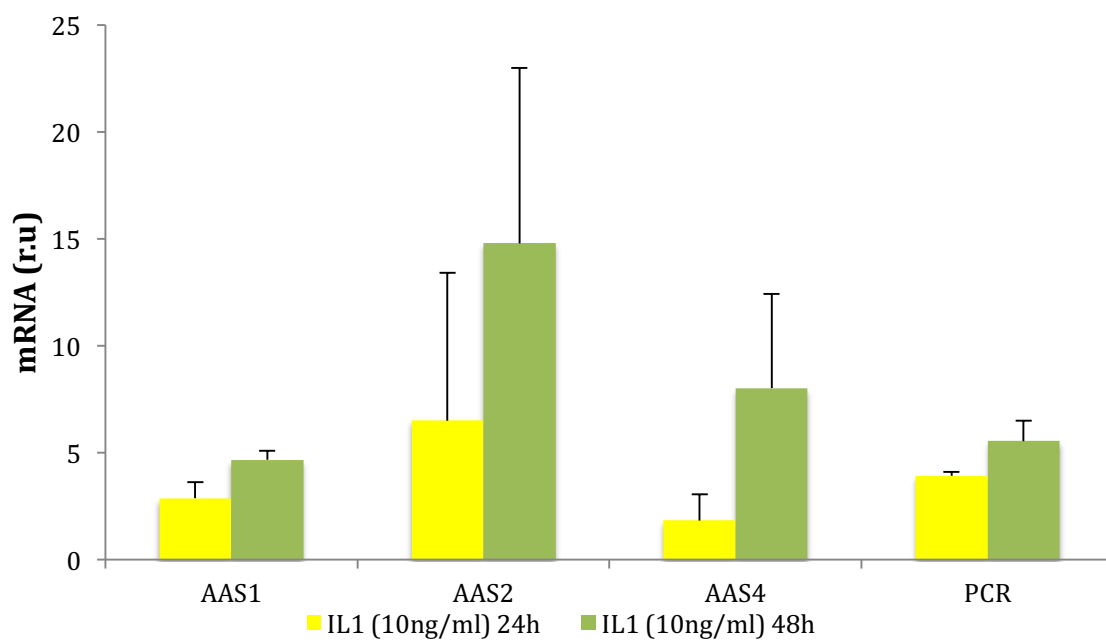
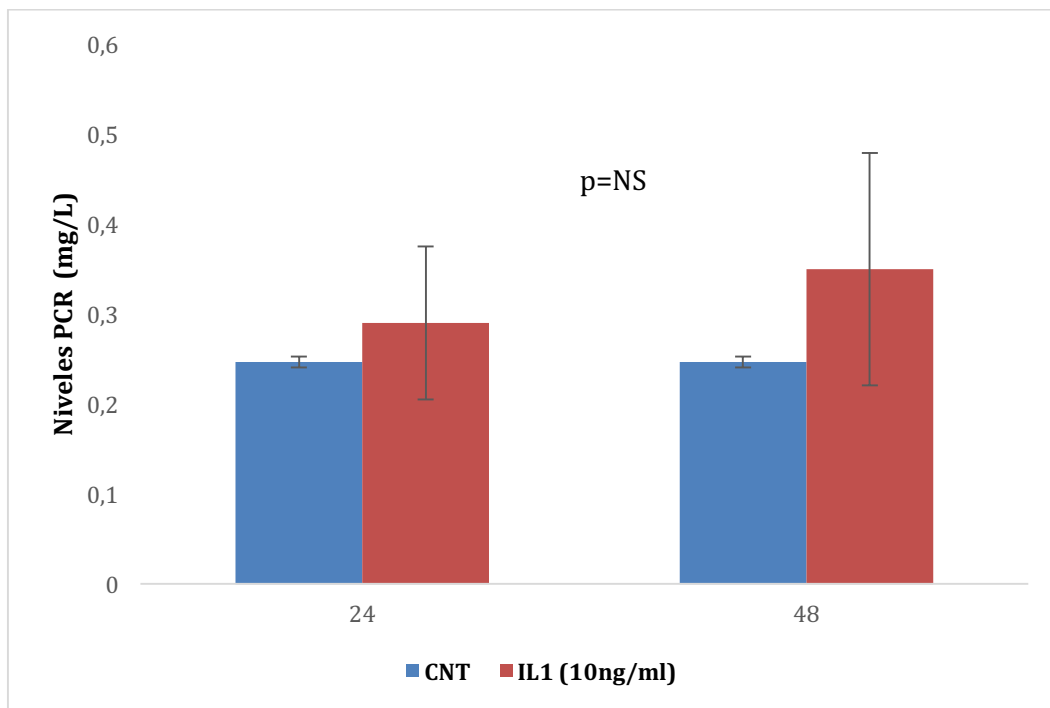
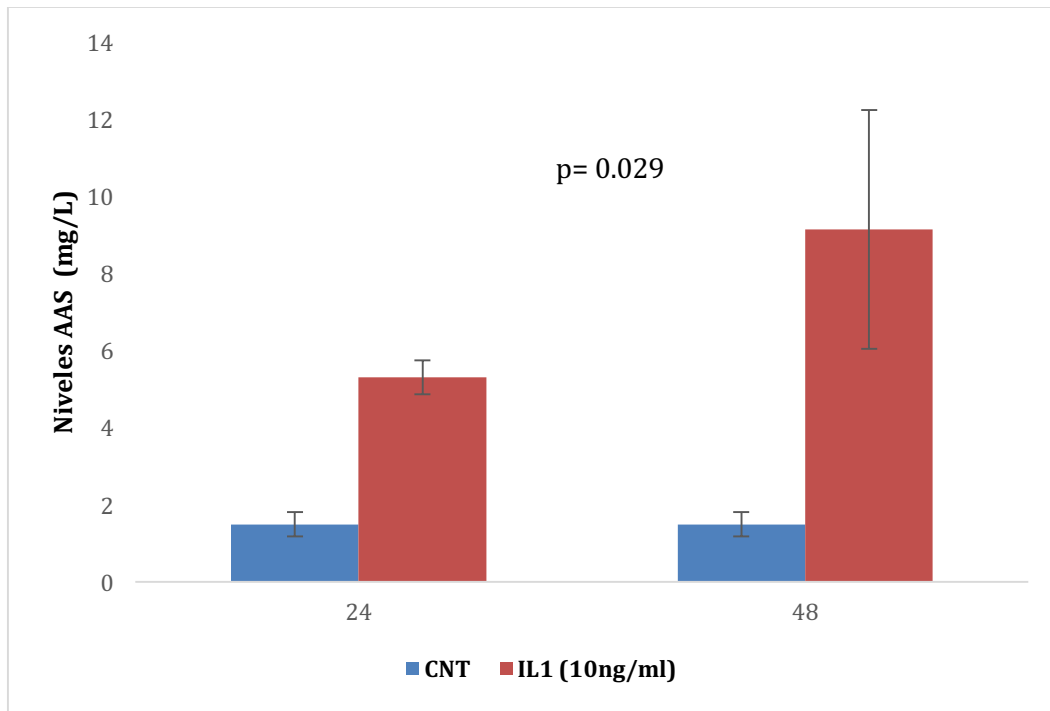




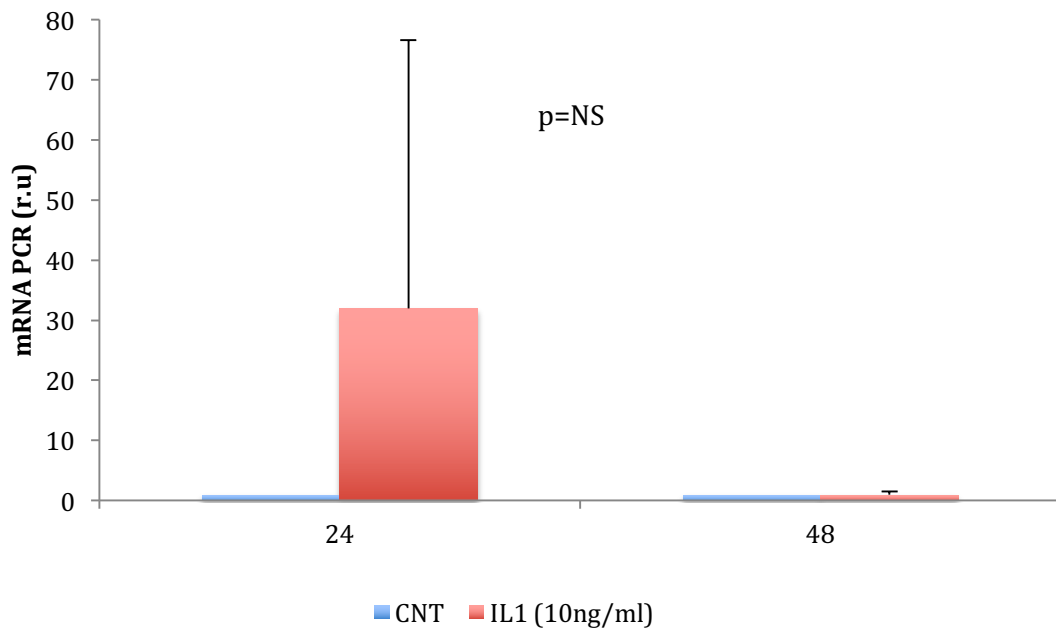
Figura 16. Concentración proteica de PCR y AAS en células epiteliales bronquiales estimuladas frente a controles.



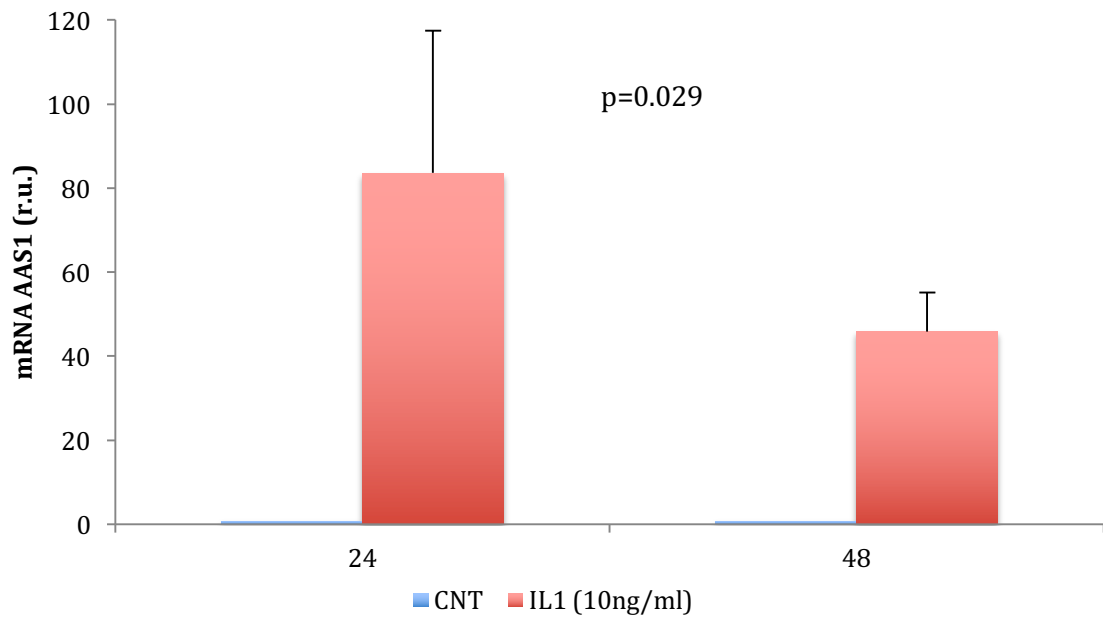
A nivel de fibroblastos, destaca la mayor expresión de AAS2 y de forma significativa frente al resto de marcadores ( $p=0,029$ ). Esta diferencia es significativa para los tres tipos de AAS ( $p = 0,029$  para AAS1;  $p = 0,029$  para AAS4) (Figura 17-18). Sin embargo, éste aumento no es significativo a nivel de proteínas (Figura 19). También aumenta la expresión y niveles de proteínas cuando se les trata con IL-1 con respecto al control (células no tratadas) a nivel de PCR a las 24 horas ( $p=NS$ )

Figura 17. Expresión génica de PCR (A) y subtipos de AAS (B, C, D) en fibroblastos pulmonares estimulados frente a controles.

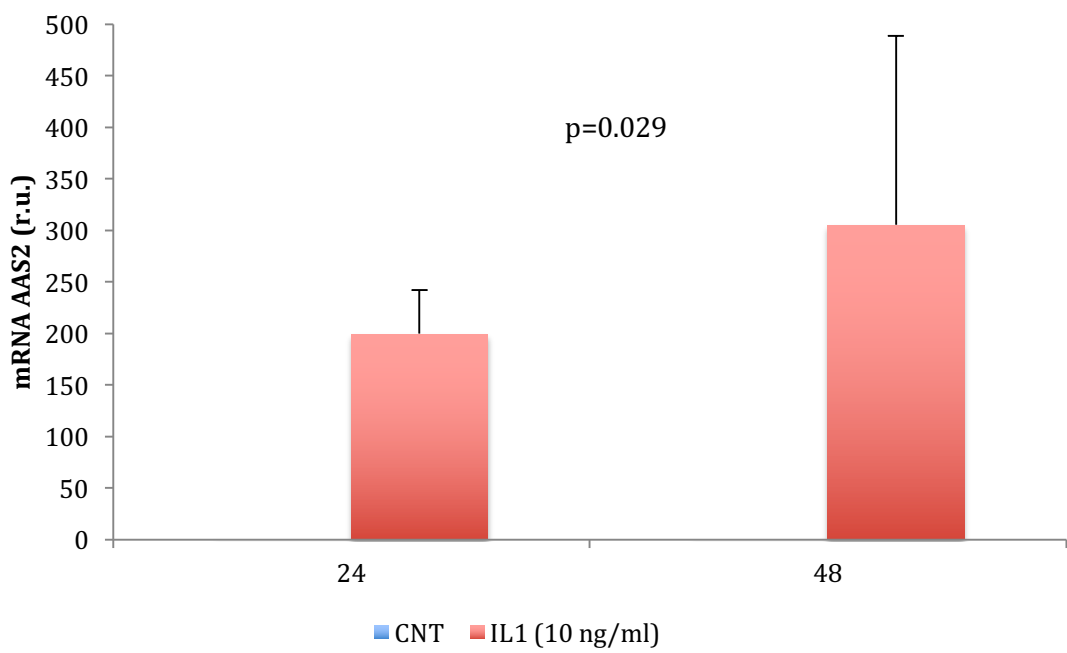
A)



B)



C)



D)

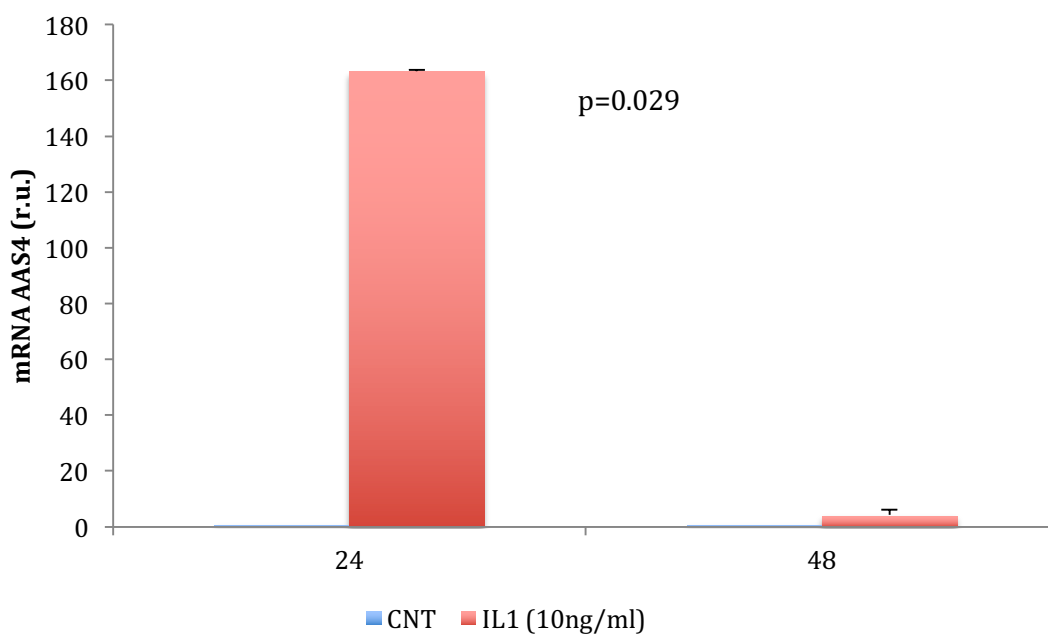


Figura 18. Expresión génica de PCR y subtipos de AAS en fibroblastos pulmonares estimulados.

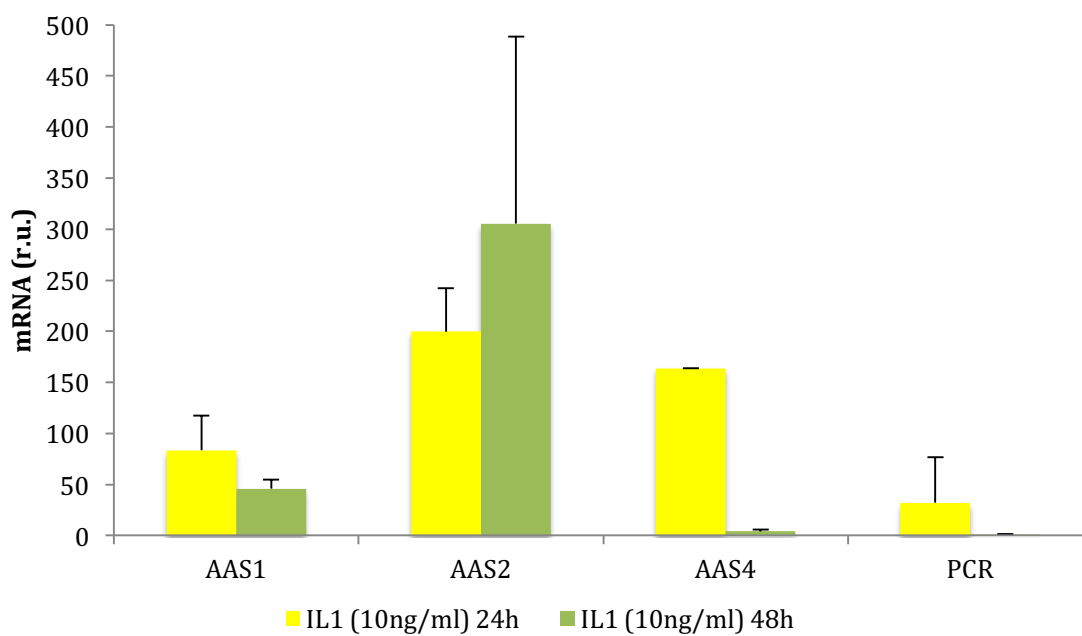
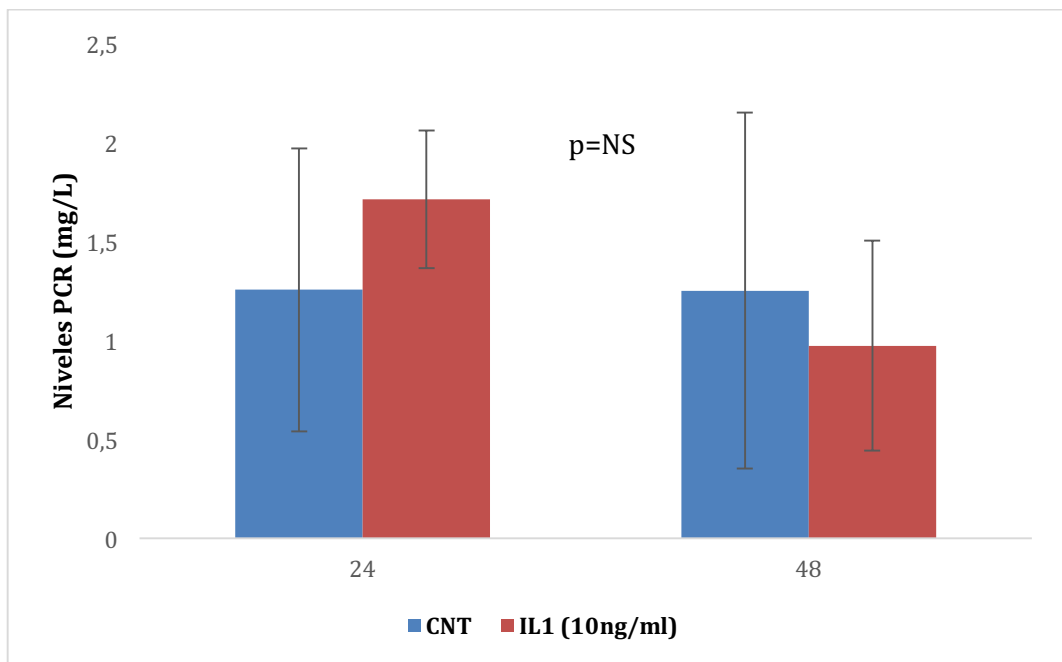
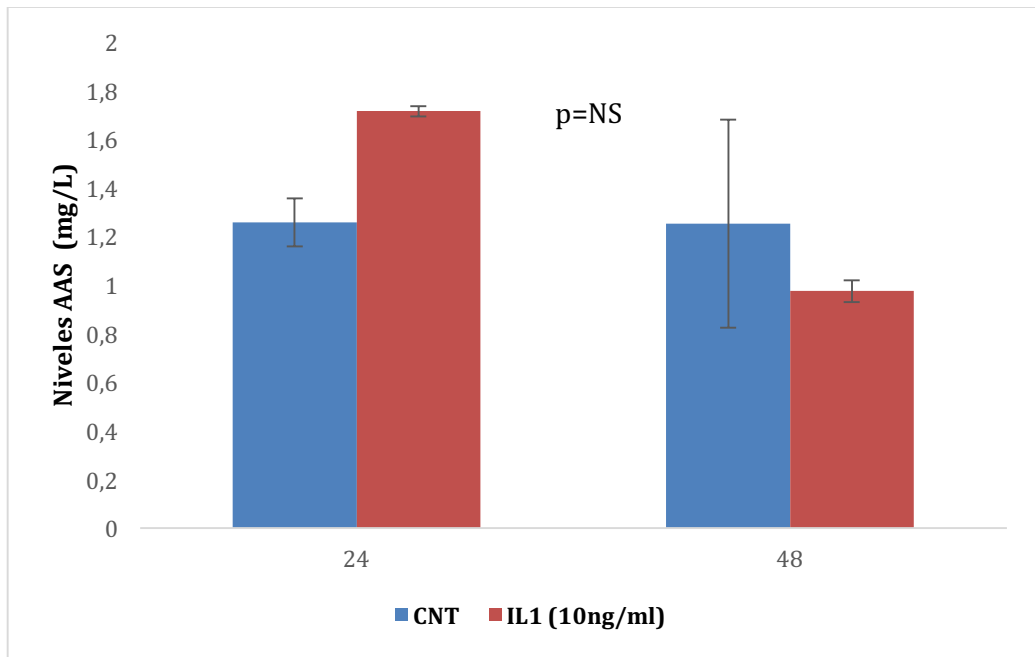


Figura 19. Concentración proteica de PCR y AAS en fibroblastos pulmonares estimulados frente a controles.

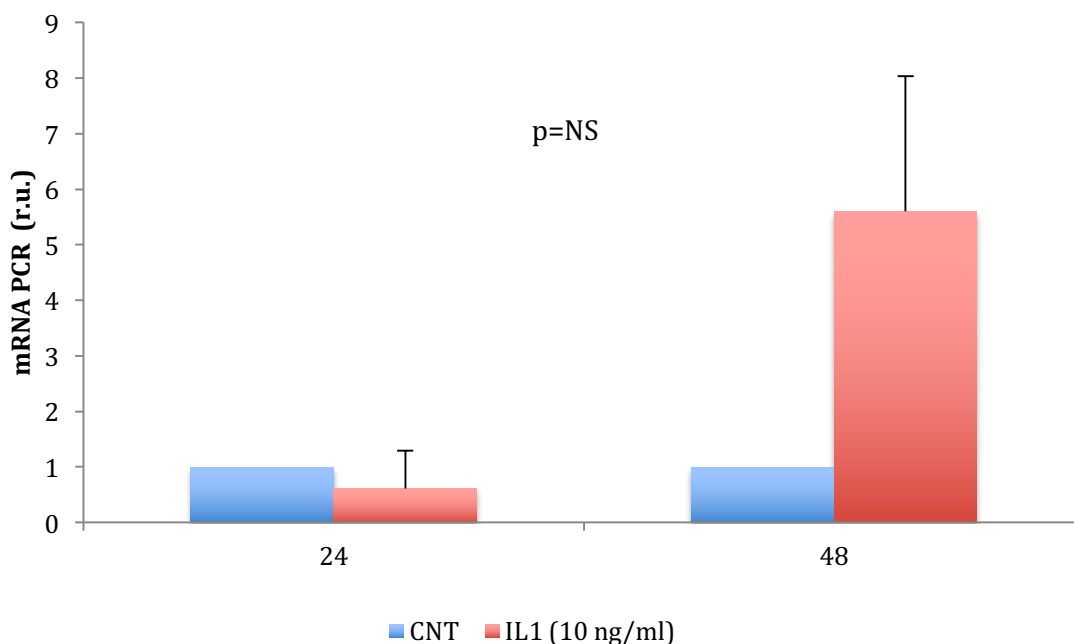


Con respecto a los hepatocitos estimulados con IL-1, encontramos una expresión con tendencia a la significación y mayores niveles de AAS 1 y AAS2 que los controles ( $p= 0,057$ ) para hepatocitos de hepatocarcinoma (HEP3B); no así para hepatocitos sanos (CRL2706) donde destaca mayor expresión para AAS4, de forma no significativa ( $p= 0,6$ ) (Figura 20-23). A nivel de PCR hay un aumento no significativo en la expresión génica para las células tratadas con IL-1 versus el control para ambos tipos de hepatocitos y un aumento no significativo a nivel de proteínas (datos mostrados para hepatocitos de hepatocarcinoma (HEP3B)) (Figura 24).

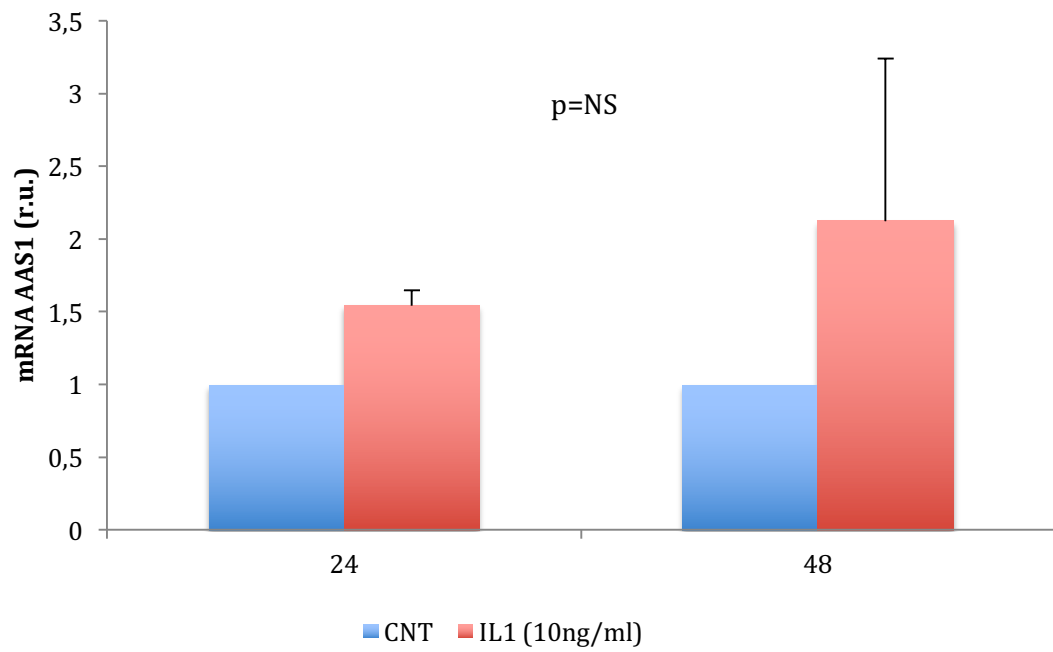
Se obtuvieron dificultades por lento crecimiento sobre todo con la línea de hepatocitos sanos (CRL2706) por lo que de los RFA solo presentamos su expresión génica y no la determinación de proteínas.

*Figura 20. Expresión génica de PCR (A) y subtipos de AAS (B, C, D) en hepatocitos CRL2706 estimulados (sanos) frente a controles.*

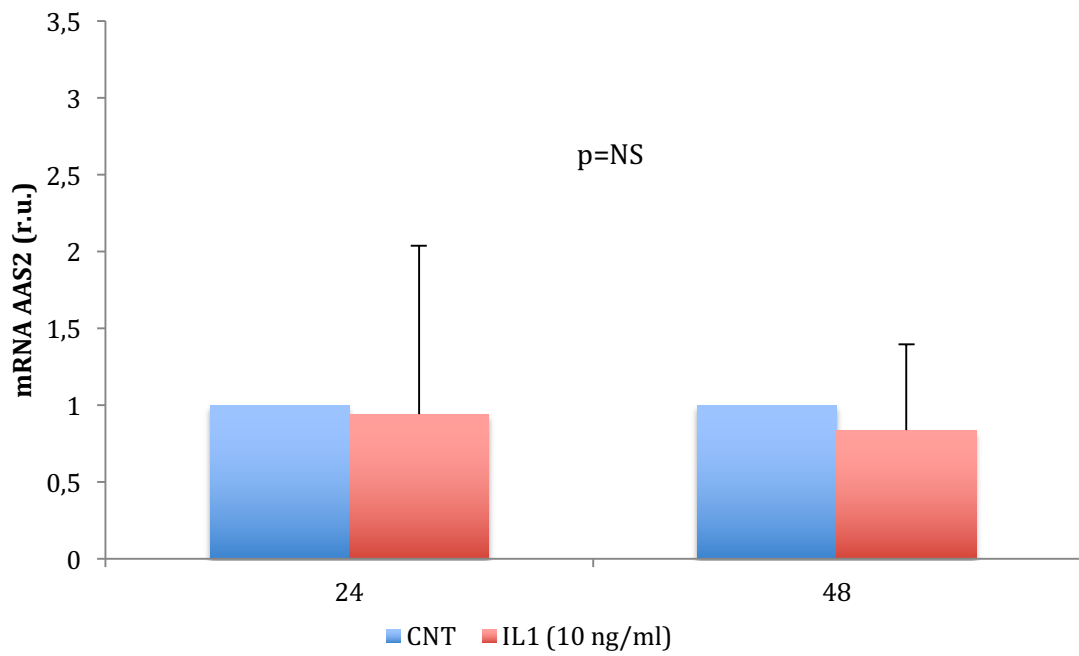
A)



B)



C)



D)

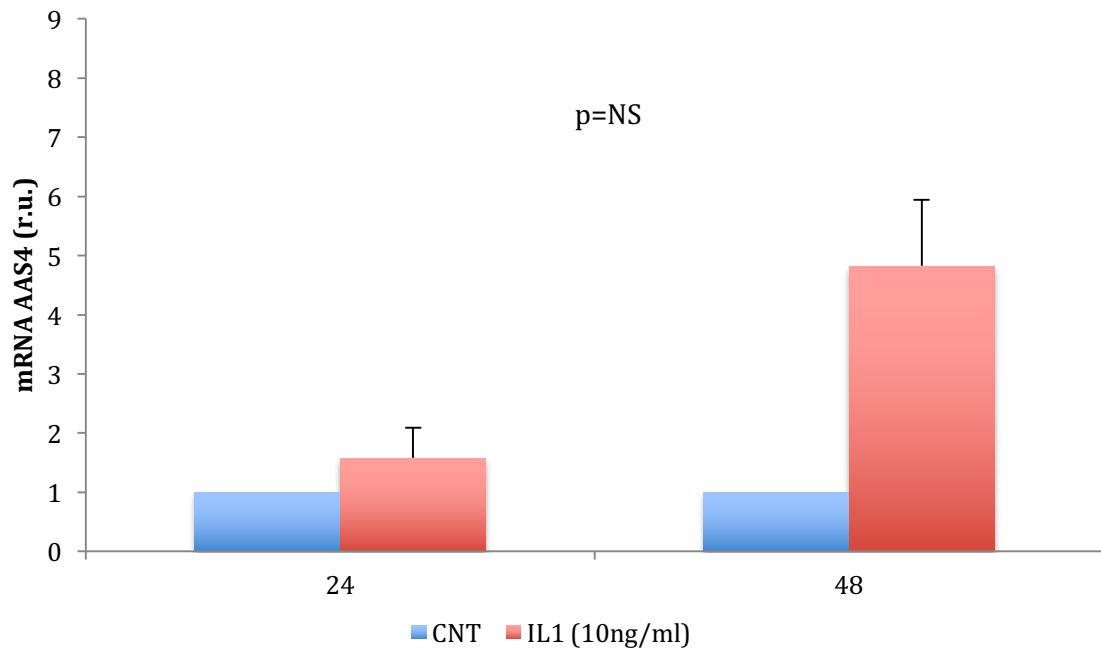


Figura 21. Expresión génica de PCR y subtipos de AAS en hepatocitos CRL2706 estimulados (sanos).

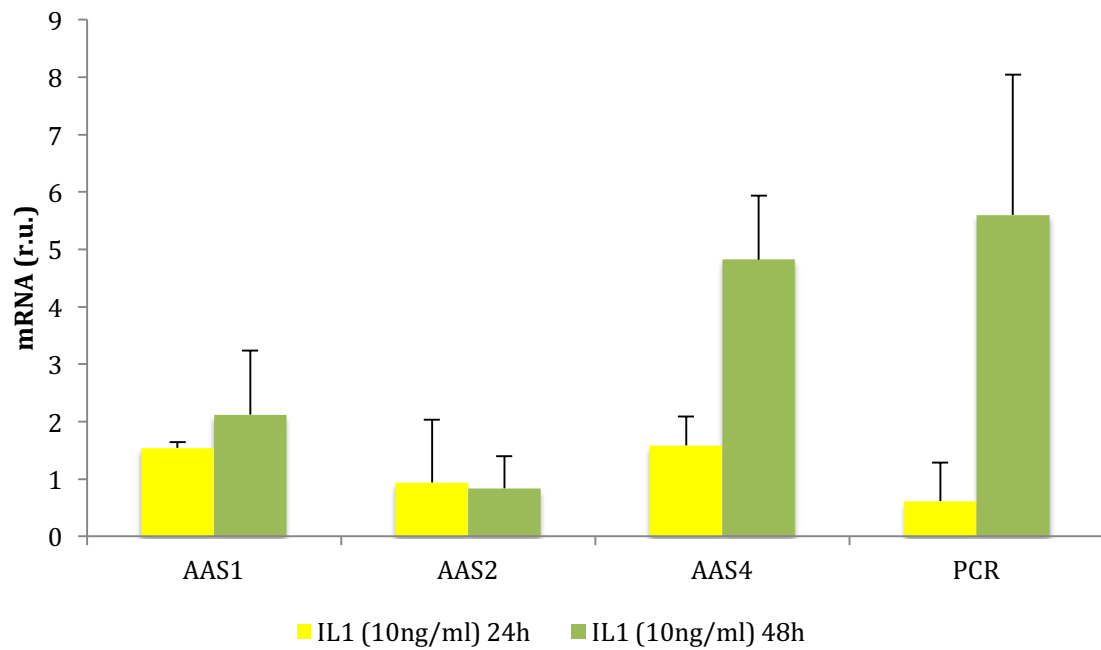
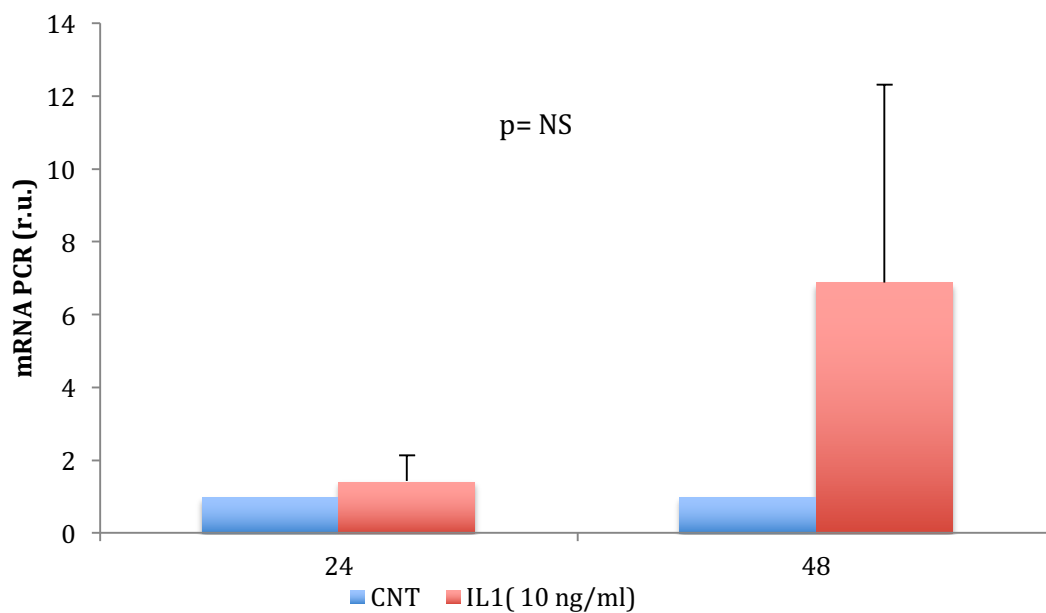


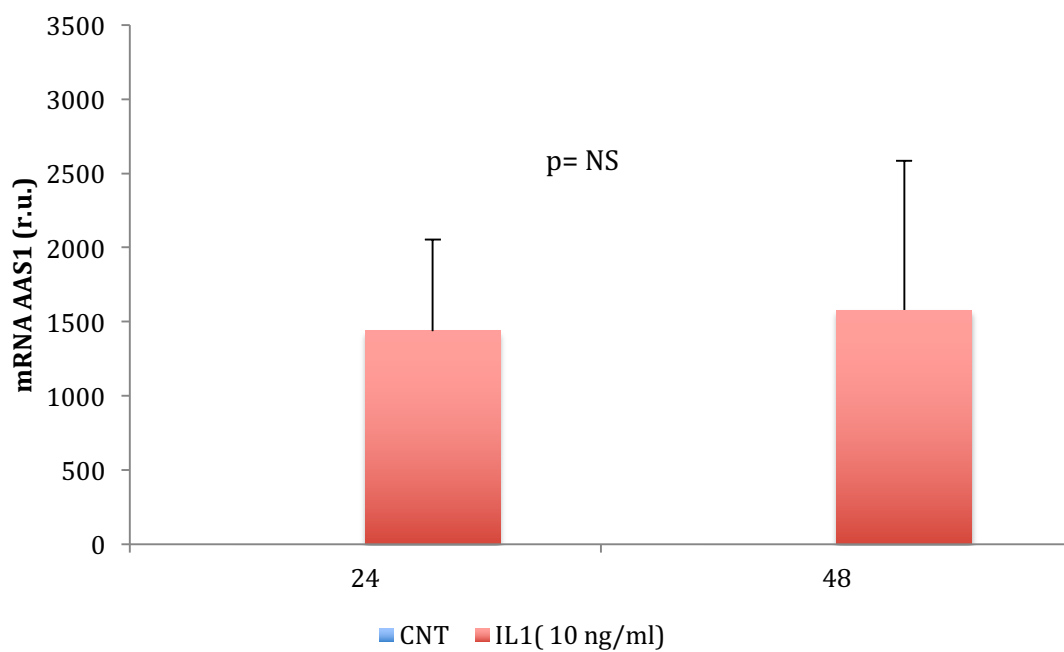


Figura 22. Expresión génica de PCR (A) y subtipos de AAS (B, C, D) en hepatocitos HEP3B estimulados (hepatocarcinoma) frente a controles.

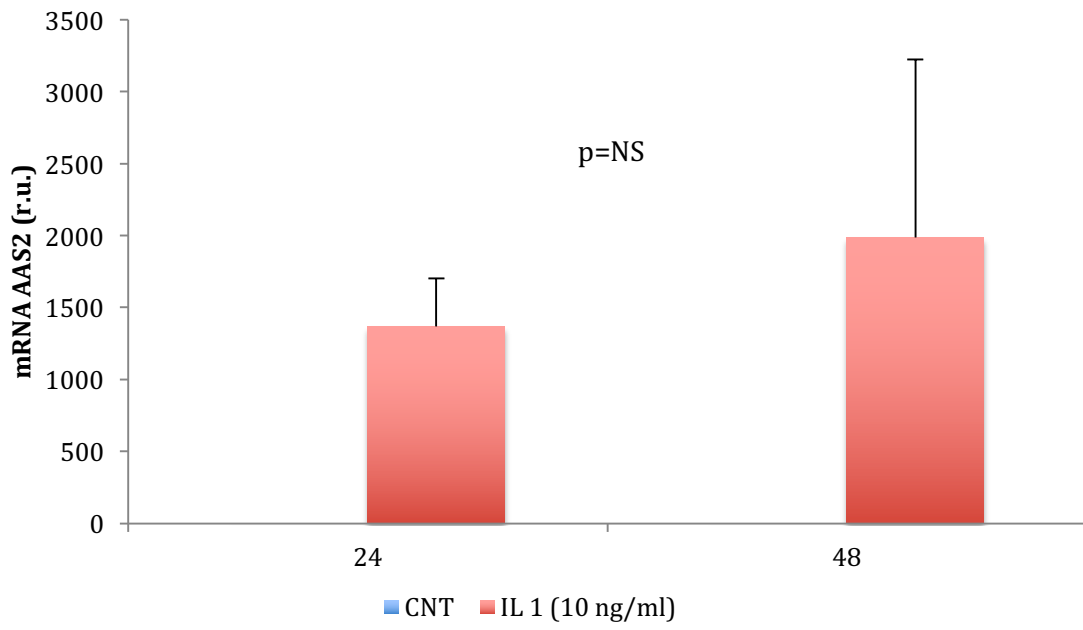
A)



B)



C)



D)

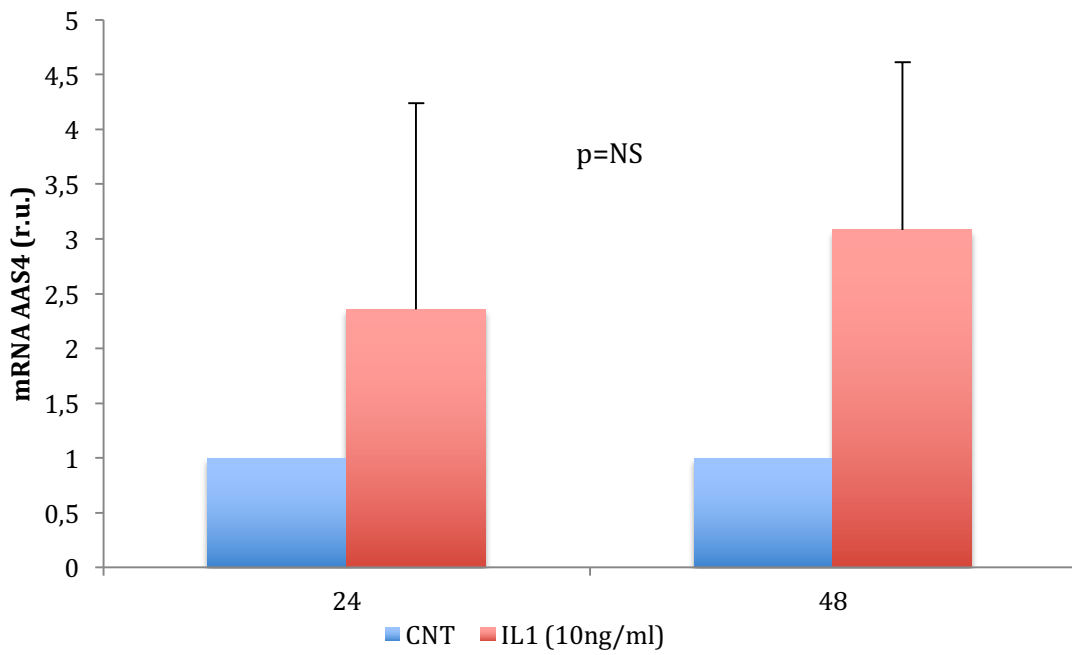


Figura 23. Expresión génica de PCR y subtipos de AAS en hepatocitos HEP3B estimulados (hepatocarcinoma).

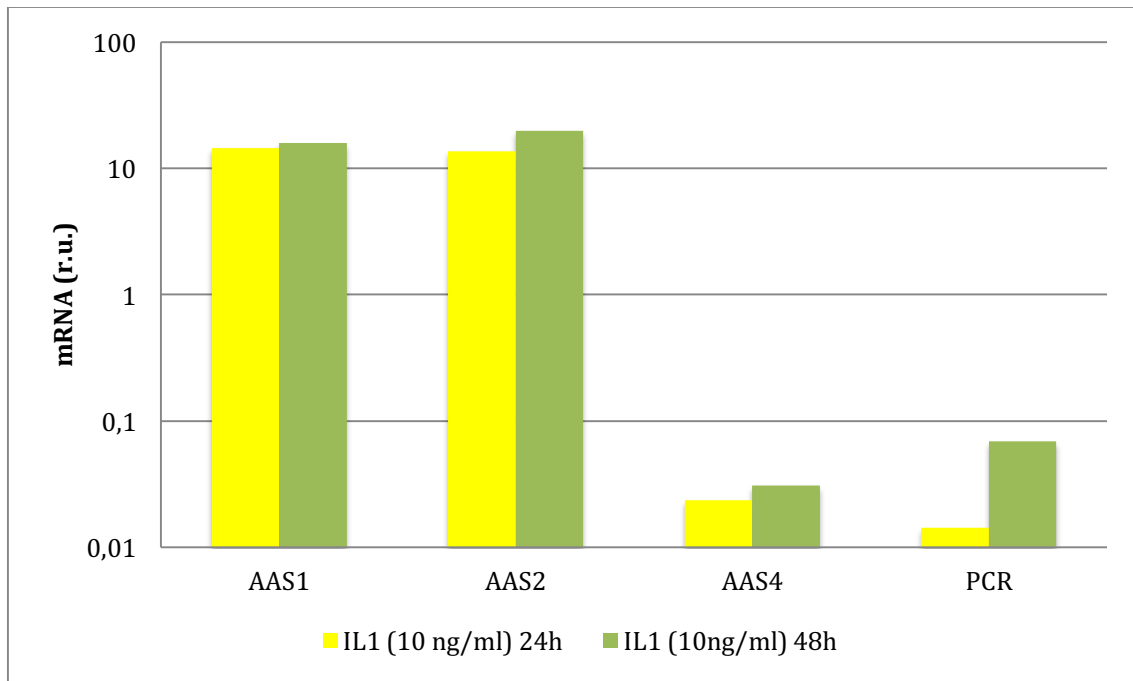
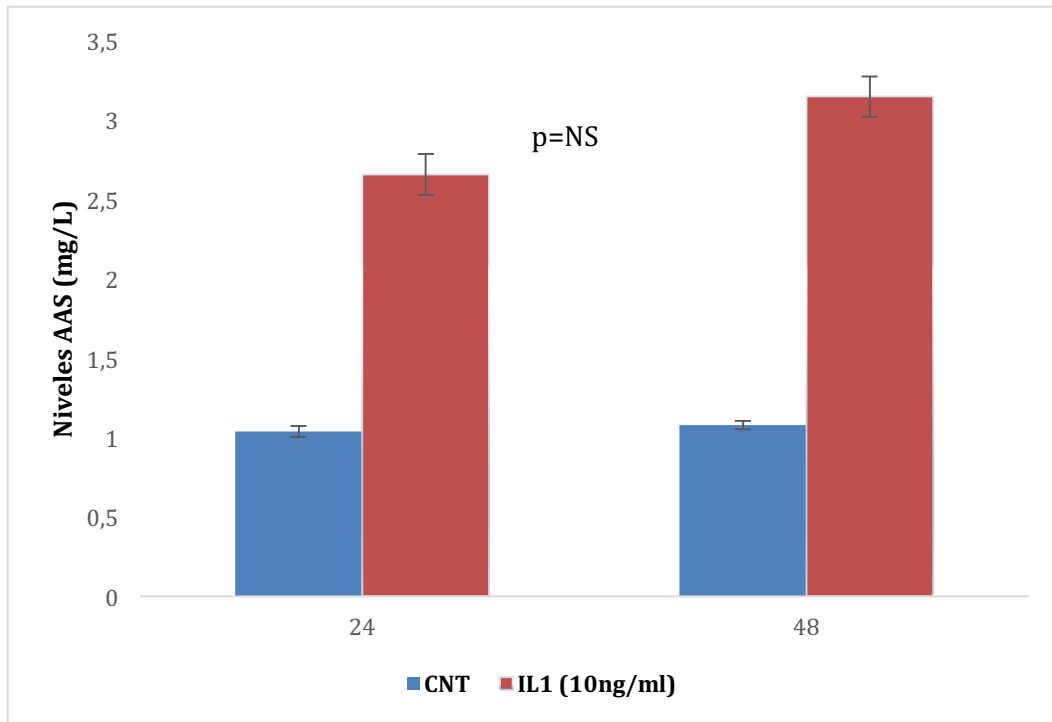
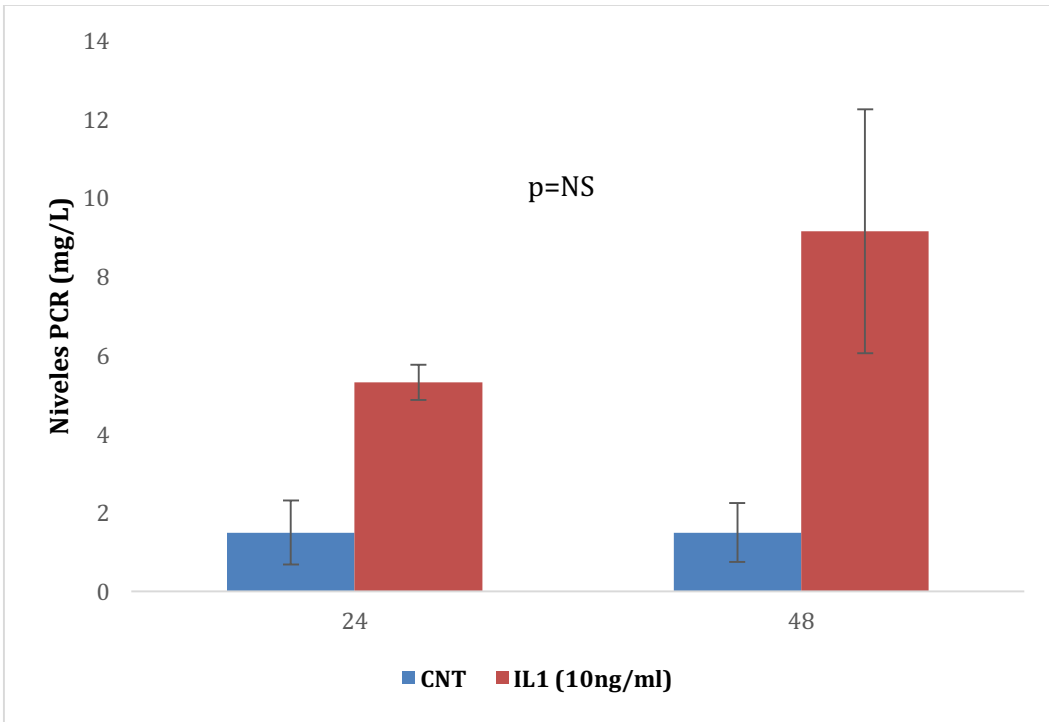


Figura 24. Concentración proteica de PCR y AAS en hepatocitos HEP3B estimulados (hepatocarcinoma) frente a controles.



## 3.2. Evaluación de la expresión génica y concentración proteica entre pulmón e hígado

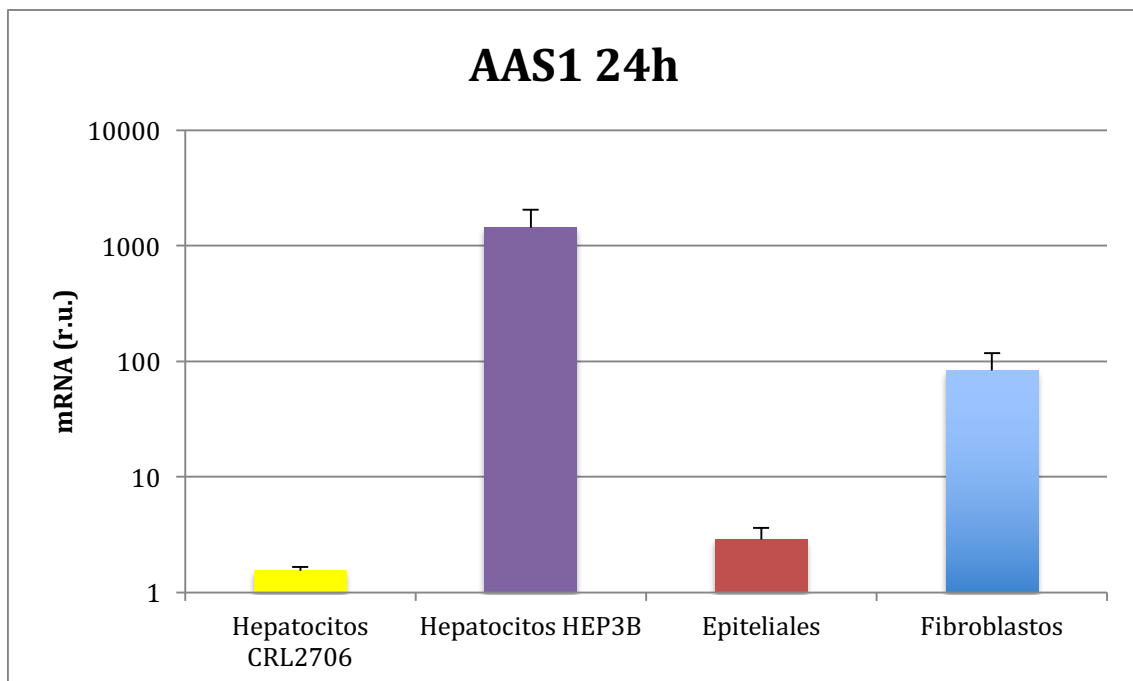
Si nos centramos a nivel pulmonar, al comparar la expresión génica de los diferentes subtipos de AAS, destaca a nivel de fibroblastos la mayor expresión de AAS2 frente a células epiteliales y de forma significativa frente al resto de marcadores ( $p=0,029$ ). Esta diferencia es a favor de fibroblastos para los tres tipos de AAS y su determinación a las 24 horas ( $p = 0,029$  para AAS1;  $p = 0,029$  para AAS4), lo cual podría dar un mayor protagonismo al papel de los fibroblastos en la respuesta inflamatoria. (Figura 25-27). Este aumento es también significativo a nivel de proteínas (a las 24 horas  $p < 0,001$ ; a las 48 horas  $p 0,003$ ). No hubo diferencias a nivel de expresión de PCR aunque si a nivel de concentración proteica para este biomarcador (a las 24 horas  $p = 0,002$ ; a las 48 horas  $p = 0,015$ ) (Figura 29).

A nivel hepático, destaca la mayor expresión génica para PCR y todos los subtipos de AAS en hepatocitos de hepatocarcinoma (HEP3B) frente a hepatocitos sanos (CRL2706), siendo significativo ( $p= 0,05$ ) en el caso de AAS1 y AAS2 (Figura 25-27).

Cuando comparamos la expresión génica a nivel pulmonar con la síntesis fisiológica a nivel hepático, vemos que la expresión génica a nivel pulmonar, en células epiteliales y fibroblastos, es significativamente mayor a nivel de todos los marcadores inflamatorios en comparación con los hepatocitos sanos (CRL2706). Encontramos diferencias significativas entre fibroblastos y hepatocitos sanos (CRL2706) a nivel de AAS2 ( $p=0,029$  a las 24 y 48 horas) y tendencia a la significación a nivel de AAS1 y AAS4 ( $p=0,057$ ), y entre células epiteliales y hepatocitos sanos (CRL2706) a nivel de PCR a las 24 horas ( $p=0,029$ ) (Figura 25-27). No pudieron compararse las concentraciones proteicas frente al grupo de hepatocitos sanos (CRL2706) al presentarse dificultades por lento crecimiento en esta línea celular.

Sin embargo en comparación con hepatocitos de hepatocarcinoma (HEP3B) es mayor la expresión génica de AAS1 y AAS2 a este nivel frente al resto de tipos celulares. Entre fibroblastos y hepatocitos de hepatocarcinoma (HEP3B) fue significativamente mayor la expresión de AAS1 a las 24 y 48 horas ( $p=0,05$ ); AAS2 a las 24 horas ( $p=0,05$ ) y la concentración proteica para AAS ( $p< 0,001$ ). Entre células epiteliales y hepatocitos de hepatocarcinoma (HEP3B), destaca la expresión significativa también para los mismos subtipos de AAS, AAS1 a las 24 y 48 horas ( $p=0,05$ ); AAS2 a las 24 horas ( $p=0,05$ ) y la concentración proteica para PCR a las 24 horas ( $p=0,035$ ).

Figura 25. Expresión génica de AAS1 tras incubación con IL-1 a las 24 y las 48 horas.



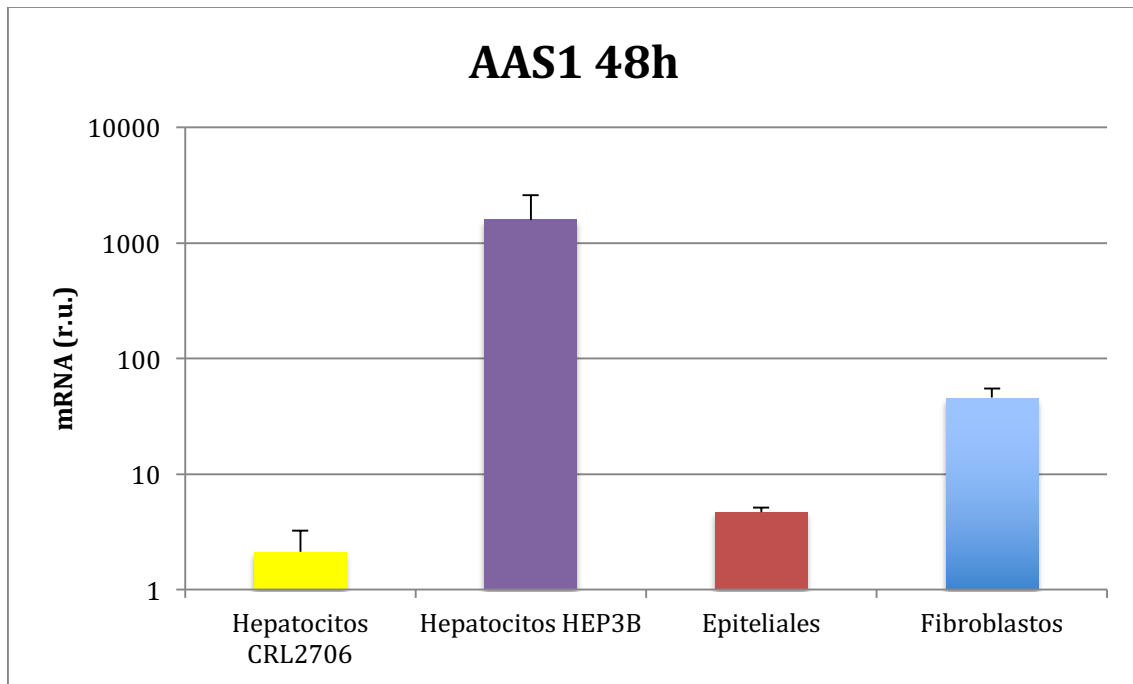
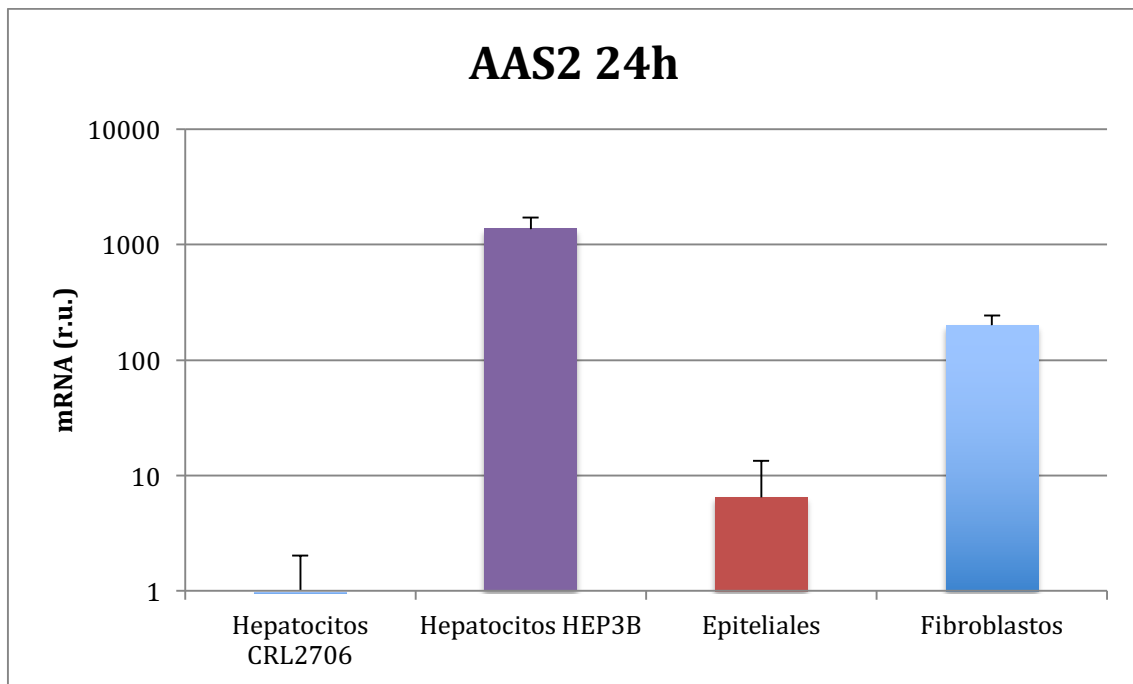


Figura 26. Expresión génica de AAS2 tras incubación con IL-1 a las 24 y las 48 horas



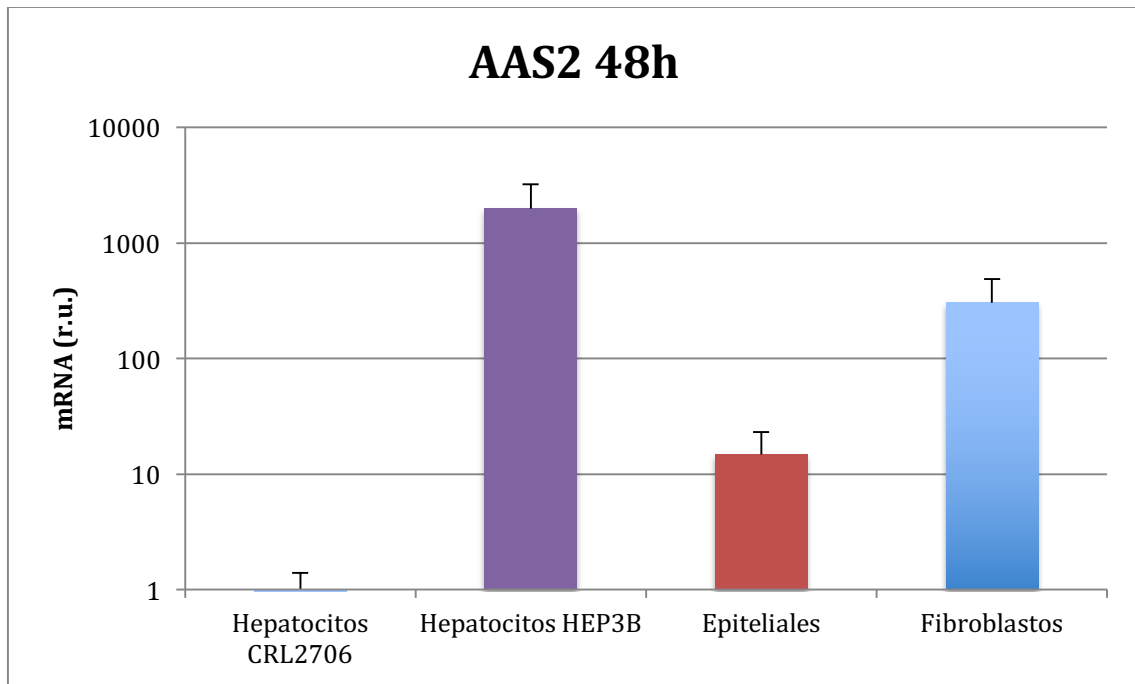
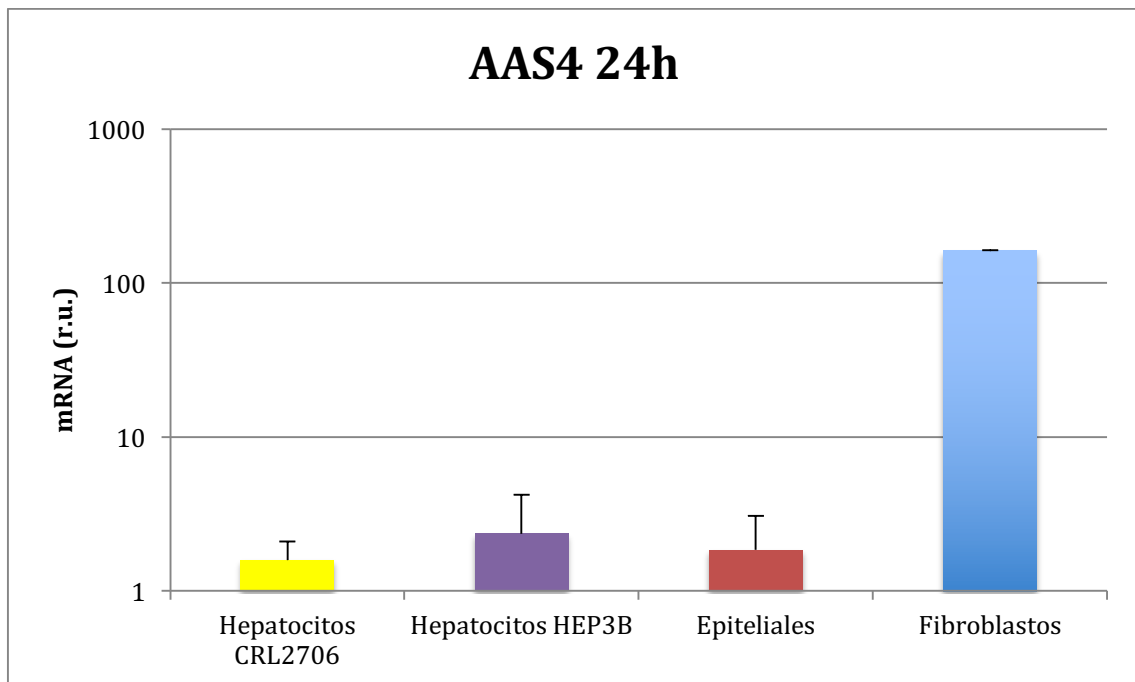


Figura 27. Expresión génica de AAS4 tras incubación con IL-1 a las 24 y las 48 horas





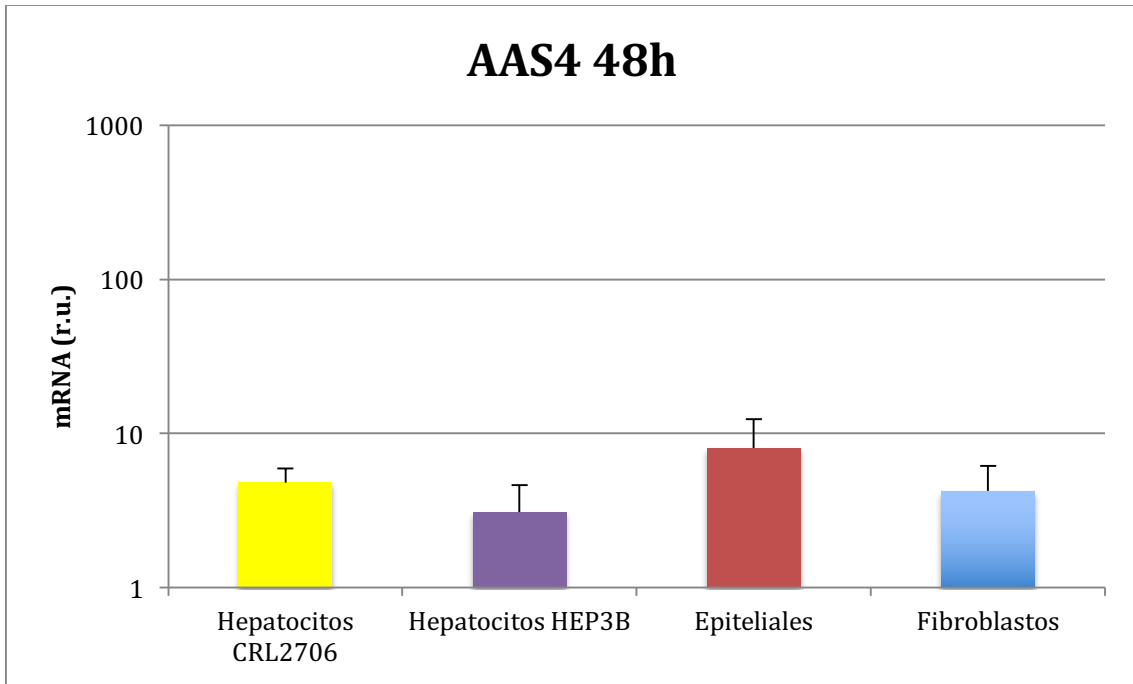
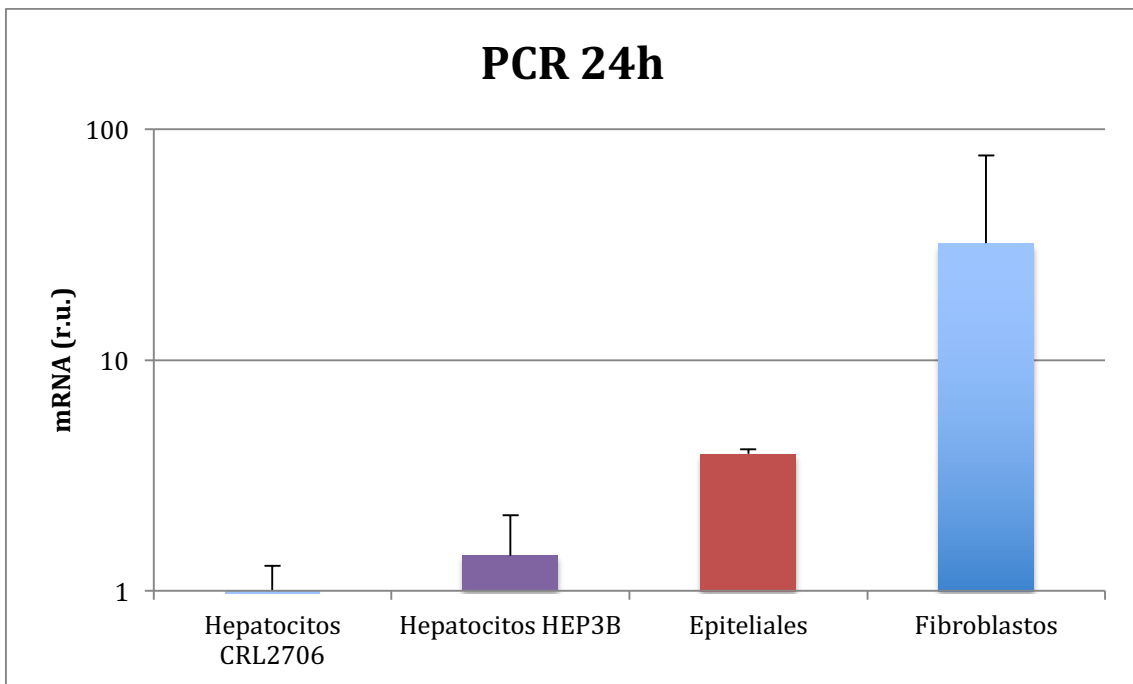


Figura 28. Expresión génica de PCR tras incubación con IL-1 a las 24 y las 48 horas



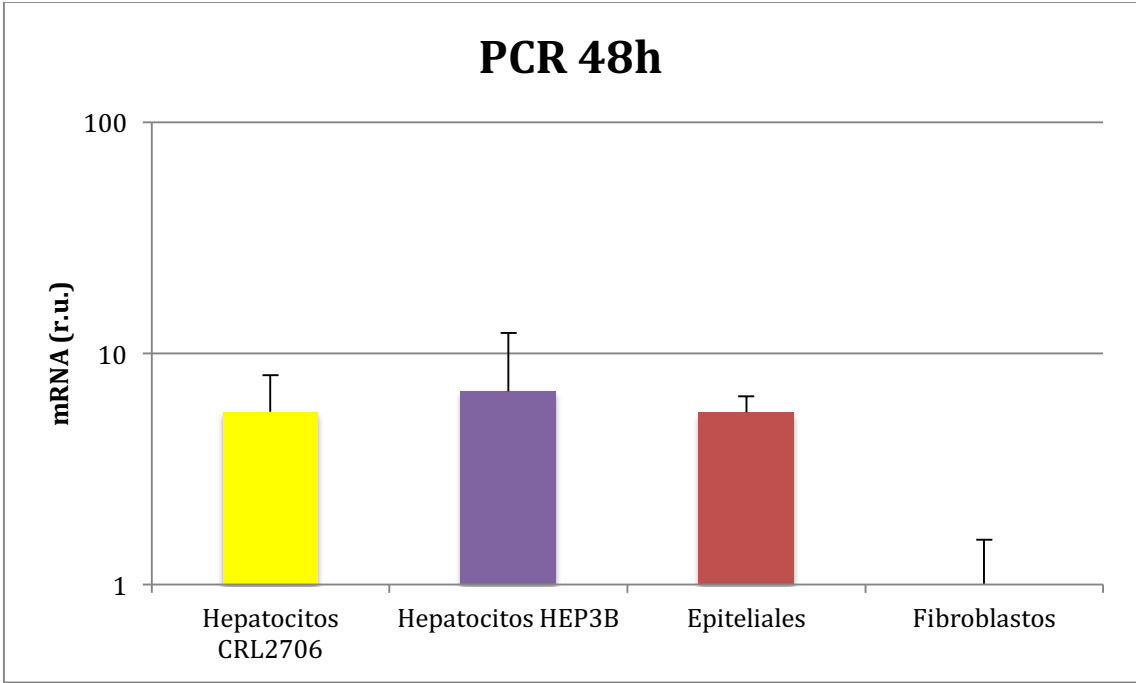
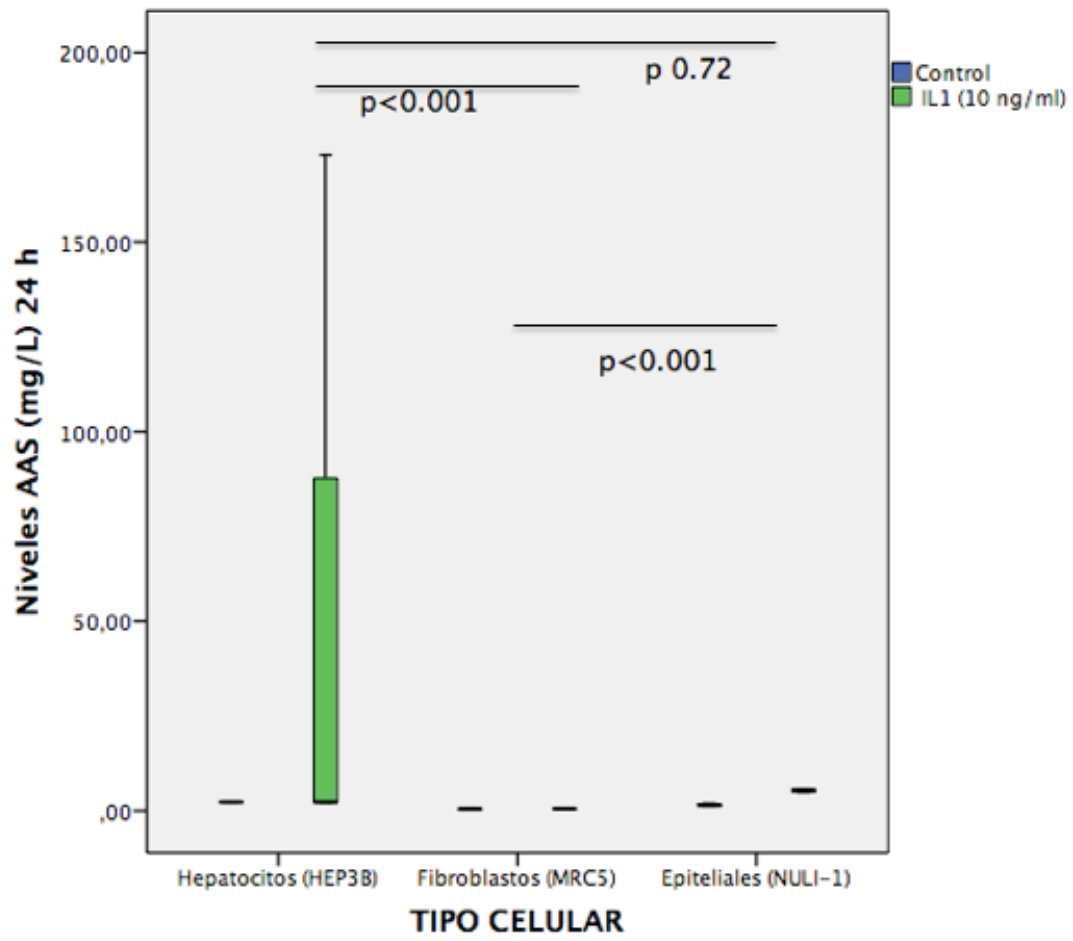
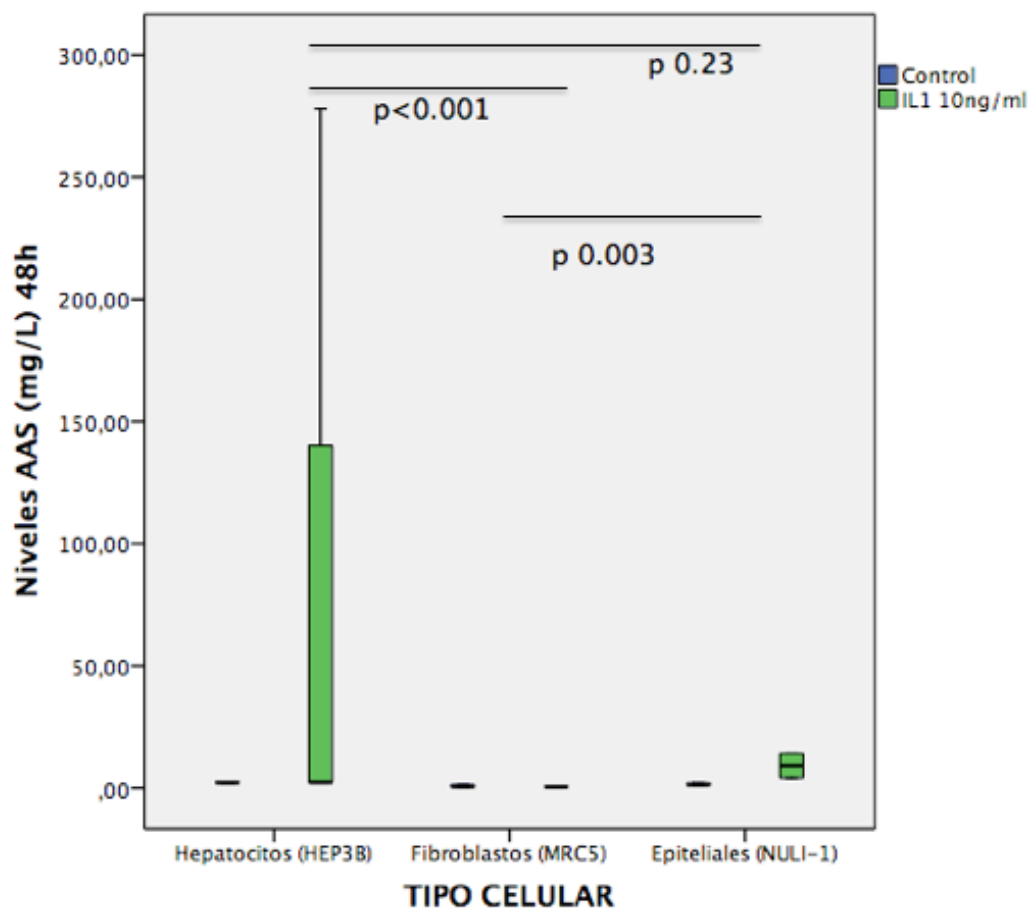
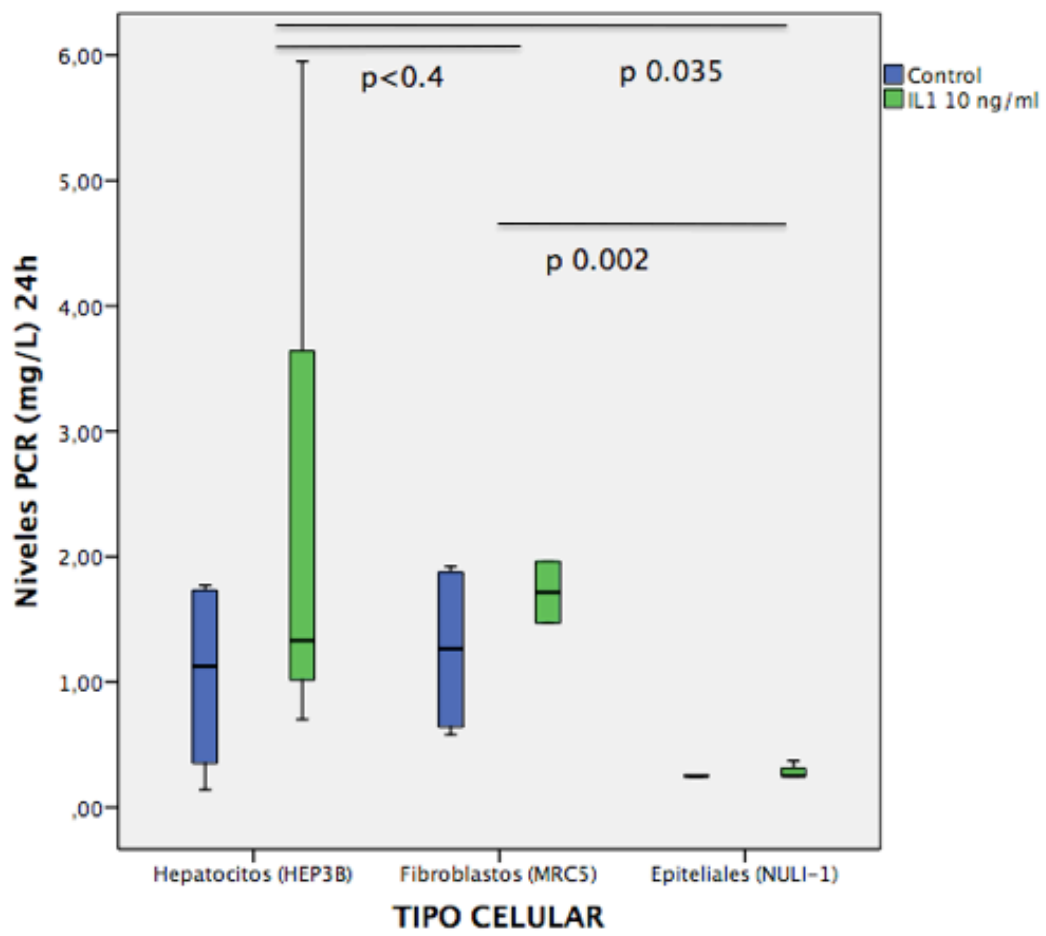
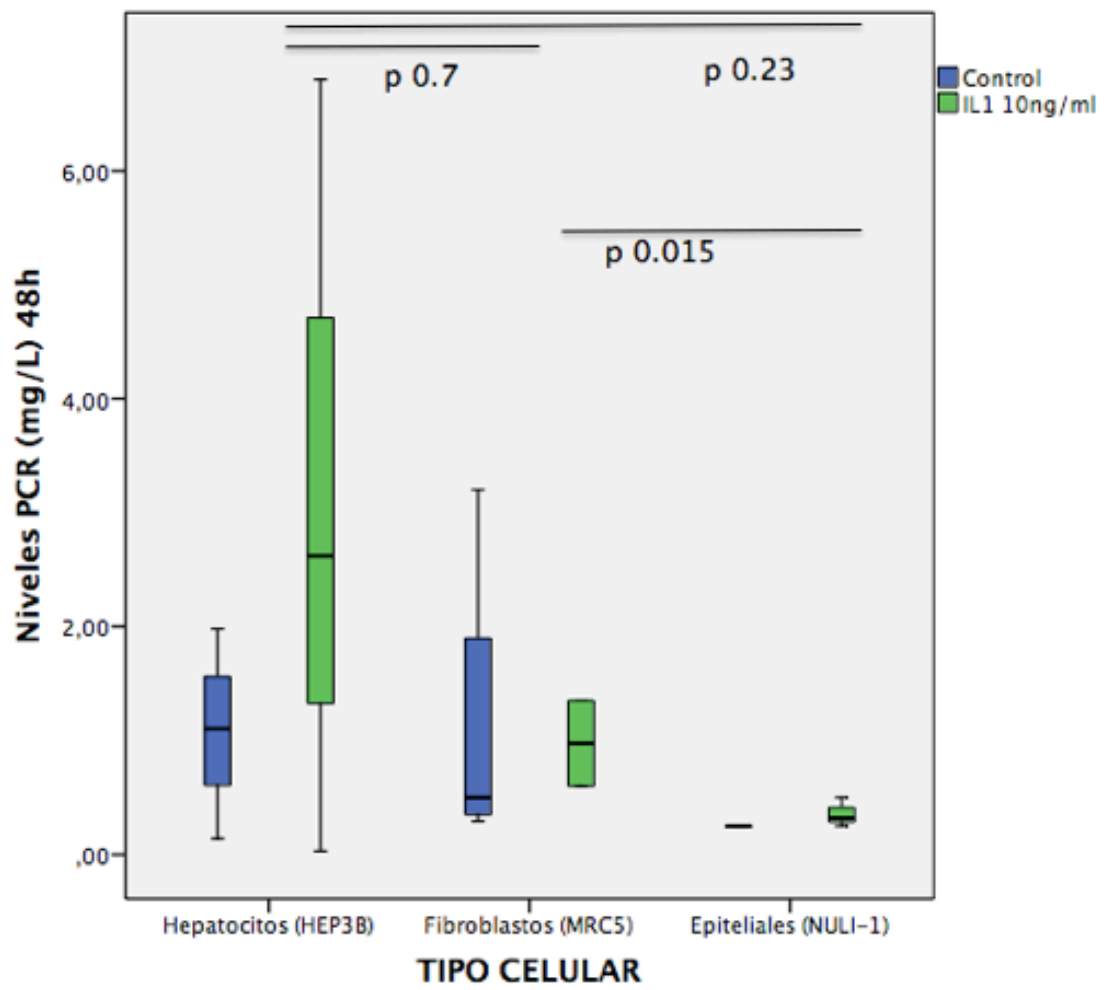


Figura 29. Concentraciones proteicas de PCR y AAS en los diferentes grupos celulares.









## Discusión

---

El presente trabajo estudia la vía patogénica de la inflamación sistémica en la EPOC. Nuestros resultados muestran información relevante acerca de la producción de RFA aguda en el parénquima pulmonar con objeto de analizar qué tipos celulares son los principales responsables de esta secreción, y la compara con la síntesis a otros niveles, incluyendo el tejido vascular, la sangre periférica y la síntesis fisiológica a nivel hepático, permitiéndonos avanzar en el conocimiento de la patogénesis de la enfermedad y sus repercusiones sistémicas.

Estudios anteriores han demostrado consistentemente que la inflamación en la EPOC no se limita a las vías respiratorias y los pulmones, si no que se asocia a un cierto grado de inflamación sistémica<sup>99</sup>. Aunque el aumento de los niveles de PCR, IL-6, IL-8 y TNF $\alpha$  han sido reportados en pacientes con EPOC,<sup>104,139</sup> el origen de la producción de moléculas proinflamatorias en esta entidad clínica sigue sin estar claro. Hasta el momento, una de las teorías más aceptadas sigue siendo el fenómeno de “derramamiento” (spill over) de mediadores inflamatorios al torrente sanguíneo, siendo el pulmón el origen de esta inflamación<sup>140</sup>. Sin embargo, resultados más recientes cuestionan esta hipótesis, porque no se han identificado asociaciones significativas entre las vías respiratorias y las concentraciones sistémicas de citoquinas proinflamatorias<sup>111</sup>. Del mismo modo, las cargas inflamatorias de esputo y de plasma inducida no se correlacionaron entre sí, poniendo esta teoría del origen de la inflamación sistémica en tela de juicio.<sup>140</sup> Es por ello que la posibilidad de una causa inversa no pueda descartarse, en la que la propia inflamación sistémica, sea la responsable de generar lesión a nivel de vía respiratoria, parénquima y vasculatura pulmonar<sup>141</sup>. Tampoco puede descartarse posibles factores genéticos y constitucionales que puedan predisponer a los pacientes con EPOC a cierto grado de inflamación, tanto pulmonar como sistémica<sup>142</sup>.

La importancia clínica del aumento de marcadores de inflamación sistémica en pacientes con EPOC reside no sólo en sus manifestaciones extra-pulmonares (incluyendo el aumento del riesgo de trastornos cardiovasculares)<sup>143,144</sup>, sino en su asociación con el deterioro de la calidad de vida, riesgo de exacerbaciones<sup>145,146</sup> y posiblemente con el pronóstico de la enfermedad<sup>147,148</sup>. Ciertas características de los pacientes EPOC en estadio avanzado, como son la debilidad del músculo esquelético y el consiguiente decondicionamiento físico entre otros, están poco relacionadas con el



grado de limitación al flujo aéreo, y sin embargo parecen vincularse a una respuesta inflamatoria sistémica <sup>149</sup>.

En un primer momento del estudio, se realizó una comparación de la expresión de RFA en el parénquima pulmonar, arteria pulmonar, y leucocitos de sangre periférica de pacientes con EPOC. También se midió los niveles de PCR en plasma y las concentraciones de AAS con el objetivo de establecer si existen asociaciones significativas con su expresión génica en el tejido. Para poder interpretar de forma correcta los resultados, se deben tener en cuenta ciertas consideraciones de nuestro estudio. En primer lugar, los pacientes incluidos presentaban en su mayoría función pulmonar leve o moderada (estadio I y II de la GOLD), y solo 5 pacientes se encontraban en estadios avanzados de la enfermedad (estadio III de la GOLD). Al ser pacientes sometidos de forma programada a cirugía de resección pulmonar, aumenta la dificultad para obtener muestras quirúrgicas de pacientes EPOC en estadios avanzados graves. Por ello, se debe tener en cuenta cierta falta de homogeneidad en la representación de la muestra.

Según estudios previos y lo revisado en un metanálisis y revisión sistemática por Gan y cols.<sup>99</sup> se han descrito aumento de mediadores inflamatorios sistémicos como el TNF- $\alpha$ , algunas ILs, proteínas de fase aguda (PCR, fibrinógeno, proteína de unión a lipopolisacáridos (LBP)) y recuento de neutrófilos en pacientes EPOC en fases estables de la enfermedad. Sin embargo, aunque no se conocen bien los mecanismos responsables de esta inflamación sistémica, se ha planteado que está sería mayor mientras más avanzada es la enfermedad <sup>150</sup>. Uno de los marcadores de inflamación sistémica que se ha demostrado que aumenta ligeramente en pacientes con EPOC en comparación con controles sanos es la PCR <sup>105</sup>. La prevalencia del aumento de la PCR en la EPOC se examinó en la Tercera Encuesta Nacional de Examen de Salud y Nutrición (NHANES III) <sup>151</sup> donde se observa que la PCR parece aumentar con el grado de severidad de la EPOC; 41% de los pacientes con EPOC moderada ( $FEV_1 \geq 50-80\%$  previsto) tenían un nivel de PCR  $> 3$  mg / l y 6% tenían un nivel  $> 10$  mg / l, mientras que el 52% de los pacientes con EPOC grave ( $FEV_1 < 50\%$  previsto) tenía un nivel de PCR  $> 3$  mg / l y el 23% tenía un nivel  $> 10$  mg / l.

En segundo lugar, se incluyeron pacientes con dos agudizaciones al año, por lo teníamos casos que correspondían al fenotipo agudizador frecuente (pacientes que

sufren dos o más exacerbaciones anuales). Estudios previos demuestran como diferentes biomarcadores de inflamación sistémica (PCR, fibrinógeno, TNF- $\alpha$ , IL 6) que están discretamente elevados en pacientes con EPOC estable, se incrementan significativamente durante las exacerbaciones, volviendo a niveles basales tras la resolución de las mismas<sup>152</sup>. Hurst y cols<sup>146,153</sup> examinaron 36 biomarcadores séricos durante los episodios de exacerbación de 90 pacientes con EPOC, encontrando que la elevación de la PCR sería el biomarcador sistémico más selectivo (AUC: área bajo la curva, 0,73; 95% IC, 0,66–0,80), aunque inespecífico, presente durante una exacerbación. Sin embargo, la diferencia en la severidad de estas exacerbaciones no se pudo establecer por la magnitud de la elevación de ninguno de los biomarcadores. Es por ello, que, en nuestro estudio, debe tenerse en cuenta el riesgo de que los pacientes en estadios más avanzados, tengan mayor número de exacerbaciones que los pacientes en estadios precoces y que 8 (20%), de los pacientes con EPOC, al presentar dos agudizaciones anuales, presentaran mayor inestabilidad clínica que pudiera interferir en nuestros resultados. Aun así, hasta el momento, el hecho de que estos marcadores no diferencien entre EPOC estable y exacerbación, ni tengan valor pronóstico, ya que no son capaces de determinar la gravedad de la exacerbación, podría sugerir que las exacerbaciones no siempre cursan con un aumento significativo de la inflamación.

Debemos tener en cuenta otra serie de consideraciones metodológicas. Existe una diferencia entre el número de pacientes EPOC frente a controles sin la enfermedad. La metodología de nuestro estudio consiste en un diseño observacional, sin randomización de los casos, lo cual puede dar lugar a una distribución heterogénea en algunas de las variables. En el grupo de pacientes con EPOC, un menor número de pacientes puede estar justificado, como ya hemos comentado, por la dificultad de incluir pacientes en estadios graves que puedan someterse a intervención quirúrgica, lo cual limita el número de casos. Entre ambos grupos observamos además una diferencia significativa en el consumo de tabaco (paquetes-año), lo cual puede justificarse porque la relación entre el grado de tabaquismo y la EPOC es dosis dependiente. De esta manera, a mayor hábito tabáquico, mayor repercusión sobre la caída de función pulmonar y mayor probabilidad de desarrollar la enfermedad.

Por último, comentar el motivo de intervención quirúrgica, que era la presencia de una neoplasia pulmonar. Se obtuvieron muestras tumorales y no tumorales,

procedentes estas últimas de tejido pulmonar macroscópicamente sano. Además, se realizó la tinción con hematoxilina-eosina en todas las muestras de pulmón no tumorales para confirmar aún más la ausencia de células cancerosas. Por razones éticas, este fue el único enfoque aprobado para estudiar con biopsias quirúrgicas los pulmones no tumorales en pacientes con EPOC y sin EPOC en nuestra institución. Hasta el momento, las técnicas más empleadas en la práctica clínica y en investigación para obtener muestras de pulmón en pacientes con patología respiratoria han sido el lavado broncoalveolar y la biopsia transbronquial <sup>154</sup>. Ambas, permiten obtener muestras directamente de la vía aérea con ventajas sobre técnicas indirectas, como el esputo, pero con importantes limitaciones como son la falta de sensibilidad y especificidad <sup>155</sup>. Como se ha descrito previamente los RFA constituyen un grupo heterogéneo de proteínas cuya cantidad en la circulación sistémica puede verse aumentada ante situaciones como daño tisular, infecciones, neoplasias o alteraciones inmunológicas<sup>131</sup>. Es por ello que la cantidad de tiempo transcurrido entre el inicio de la intervención quirúrgica y la extracción de la muestra anatómica se midió en todos los participantes, excluyendo los casos con un tiempo >2h, debido al potencial incremento en los marcadores inflamatorios relacionada con la cirugía. Sin embargo no conocemos, en este sentido, si los cambios en la expresión de RFA de una neoplasia de pulmón, altera al tejido sano circundante aunque sea distalmente y si el tipo histológico del tumor influye.

En el presente estudio y a pesar de las limitaciones metodológicas previamente descritas, se obtienen una serie de resultados relevantes. Nuestros resultados indican que la expresión de RFA es mayor en el pulmón en comparación con la sangre periférica. En particular, también se observó que tanto la expresión de AAS y PCR es más pronunciada en el parénquima pulmonar que en la arteria pulmonar. Sin embargo, no se encontró asociación entre la expresión de moléculas inflamatorias en el pulmón y sus niveles plasmáticos circulantes. Nuestro grupo ha demostrado anteriormente la capacidad del parénquima pulmonar y el tejido bronquial de sintetizar RFA en pacientes con EPOC en comparación con fumadores que no desarrollaron la enfermedad. Además, observamos un patrón de secreción diferente según la localización anatómica y cuya secreción parece estar relacionada con variables clínicas de la enfermedad<sup>109,110</sup>. En particular, se observó que la expresión de marcadores de inflamación es diferente en los fibroblastos, células epiteliales, y macrófagos <sup>109</sup>.

La expresión génica de PCR y AAS es un factor clave que debe tenerse en cuenta en el análisis de biomarcadores de inflamación en la EPOC. Aunque la enfermedad se caracteriza por una marcada inflamación de las vías aéreas, el parénquima pulmonar, y la vasculatura pulmonar <sup>156</sup>, la implicación anatómica puede mostrar una variabilidad interindividual significativa que en última instancia se traduce en una enfermedad con diferentes fenotipos clínicos <sup>157,158</sup>. La PCR es un biomarcador conocido en estudios sobre obstrucción crónica al flujo aéreo e inflamación sistémica, <sup>159,160</sup> pero respecto a AAS como biomarcador inflamatorio en la EPOC, existen menos estudios disponibles. Las células endoteliales aórticas también secretan PCR <sup>161</sup> y AAS, lo cual se ha demostrado que se expresa en el endotelio <sup>162</sup>. Sin embargo, hasta la fecha, ningún estudio se ha centrado en el papel potencial de la pared vascular pulmonar como una fuente de inflamación sistémica en la EPOC.

En este estudio, hemos ampliado nuestras observaciones anteriores mediante la evaluación de sus niveles de expresión génica tanto en los pulmones como en la arteria y sangre periférica, observando que los tres tipos de muestras expresaban ambos biomarcadores. Nuestros resultados actuales indican generalmente una reacción inflamatoria más marcada a nivel local y no a nivel sistémico. Destacar una mayor expresión de PCR a nivel local, en parénquima pulmonar, en comparación con la obtenida en arteria pulmonar y sangre periférica, pero a su vez, siendo ésta significativamente mayor en los pacientes con EPOC frente a fumadores sanos para los tres grupos de muestras. Dentro de los subtipos de AAS, destaca la mayor expresión de AAS2 para los tres grupos, especialmente los obtenidos en la arteria pulmonar y sangre periférica donde, la expresión de AAS2 fue mayor del 100% en los pacientes con EPOC frente a los controles. Podemos observar también en la expresión de AAS4, un aumento en paralelo con la gravedad de la enfermedad tanto en parénquima pulmonar como en arteria y sangre periférica. Sin embargo, la expresión de AAS1 no difirió significativamente entre el grupo de pacientes EPOC y el grupo control en ninguno de los tres tipos de muestra.

El AAS se ha descrito como un marcador cuyo valor aumenta en los episodios de exacerbación <sup>136</sup>. Es incluso más sensible que la PCR, sola o en combinación con la disnea <sup>163</sup>. Su papel también ha sido estudiado en pacientes con CP <sup>164</sup>, sin embargo el papel de este RFA en la EPOC, no ha sido estudiado en profundidad. Por lo tanto, no

existen estudios previos que marquen un patrón de síntesis de AAS con el que poder comparar el comportamiento de los diferentes subtipos de nuestro estudio.

Existen estudios previos que muestran una correlación entre los niveles séricos de PCR y la progresión de la enfermedad. Estos trabajos describen una relación entre la concentración sérica de PCR y una disminución del FEV<sub>1</sub> en los pacientes con EPOC, de forma que a mayor concentración de PCR más rápido es el empeoramiento del FEV<sub>1</sub><sup>165</sup>. Nuestro trabajo, a pesar del número limitado de pacientes con EPOC en estadios avanzados de la enfermedad (5 pacientes en estadio III de la GOLD y ninguno en estadio IV), muestra como el grado de inflamación sistémica (medido por los niveles plasmáticos de ambos marcadores inflamatorios), aumentó en paralelo con la gravedad de la EPOC. Además, hubo asociación positiva significativa entre los niveles de PCR en plasma y los niveles de AAS. Es posible, por tanto, que al incluir mayor número de pacientes con enfermedad más severa hubiéramos podido obtener mayores diferencias en los estudios inferenciales.

Centrándonos en el compartimento periférico, hemos medido la expresión de los RFA en los leucocitos de sangre periférica. Los pacientes con EPOC tenían una carga inflamatoria periférica más alta en comparación con los fumadores sanos. Sin embargo, la expresión génica de RFA en el pulmón (tanto en el parénquima como en la vasculatura pulmonar) no se correlacionaba con su expresión en leucocitos de sangre periférica ni con sus niveles plasmáticos. Ji et al.<sup>166</sup> han estudiado previamente la actividad inflamatoria en diferentes compartimentos (por ejemplo, saliva, esputo, lavado broncoalveolar y suero / sangre) de pacientes con EPOC estratificados de acuerdo a su consumo de tabaco. Los autores identificaron varias asociaciones entre diferentes marcadores inflamatorios, tanto a nivel local como a nivel sistémico. Aunque se esperaría que las correlaciones de nuestro estudio fueran significativas entre el plasma y la expresión tisular de RFA, si la hipótesis del derramamiento a la circulación sistémica fuera cierta, nuestros resultados deben ser interpretados con precaución.

En primer lugar, la detección de la presencia de un ARNm no proporciona información sobre si ese ARNm se traducirá en una proteína o, de hecho, si será una proteína funcional. Esta falta de concordancia entre los datos de concentración de mRNA y los niveles de proteína es una constante en los estudios de expresión de mediadores inflamatorios en la EPOC. Esto es así porque los diferentes métodos de

cuantificación de proteínas no siempre son capaces de corroborar los datos cuantitativos de ARNm celular, datos cuantitativos de ARN que no son absolutos, sino relativos. Gran parte de la varianza en los valores de expresión generados en los experimentos RT-qPCR no se debe simplemente a la variación en los protocolos experimentales, sino que está causada por correcciones aplicadas por varios algoritmos de procesamiento de datos, cada uno de los cuales hace sus propias suposiciones acerca de los mismos. En consecuencia, aunque la qPCR se ha proclamado como el estándar de oro, en la práctica este "estándar" es variable, y el informe de los resultados requiere una complejidad considerable de análisis e interpretación. Además, desde que se produce la transcripción de un gen hasta que la proteína alcanza la circulación sistémica, existe un elevado número de mecanismos de control en diversos puntos de la cadena. Por ejemplo el control epigenético, alteraciones en el transporte de las proteínas, la secreción paracrina de las mismas, mecanismos de control de secreción sistémica e incluso la vida media de las proteínas. Es por todo lo expuesto el por qué existen pocos estudios llevados a cabo con esta metodología y enfatiza la importancia de los resultados obtenidos de nuestro trabajo <sup>167</sup>.

En segundo lugar, continúan por dilucidarse en nuevas líneas de trabajo futuras, el papel de los polimorfismos en los genes que codifican para marcadores inflamatorios. 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, el polimorfismo rs1205 está relacionado con la EPOC, ejerciendo un efecto protector sobre la función pulmonar y mostrando una relación inversa con el nivel de PCR en suero <sup>168</sup>. Aunque el estudio de los polimorfismos de la PCR está fuera de los objetivos de este trabajo, sería interesante realizar un análisis de los principales polimorfismos con relevancia clínica en nuestra población. Recientemente se ha demostrado que polimorfismos del gen para PCR no predicen el desarrollo subsecuente de la EPOC <sup>169</sup>. Así, la elevación de la PCR sérica podría ser influenciada por la enfermedad en sí misma <sup>169,170</sup> o por factores relacionados con ella, como su gravedad o la presencia de comorbilidades.

Por último, numerosos RFA (incluyendo PCR y AAS) pueden ser sintetizados en el hígado, otra fuente potencial de inflamación sistémica en la EPOC que investigamos en un segundo tiempo en este trabajo.

Por todo ello, una primera conclusión de nuestro estudio indica que la carga inflamatoria de la EPOC parece ser mayor en el pulmón en comparación con la circulación periférica. En particular, no se observaron asociaciones entre la expresión de RFA pulmonares y sus niveles plasmáticos circulantes, por lo que la fuga de proteínas inflamatorias de los pulmones a la corriente sanguínea parece poco probable.

En un segundo tiempo, hemos estudiado la vía patogénica de la inflamación sistémica en la EPOC en dos tipos celulares claves en la patogenia de la enfermedad como son las células epiteliales y los fibroblastos pulmonares, comparándola con la síntesis fisiológica a nivel hepático.

El hígado se ha considerado tradicionalmente la principal síntesis de PCR y AAS en humanos bajo el estímulo de citoquinas (particularmente IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ ), como respuesta ante un daño externo. Tanto PCR como la AAS están presentes, pero en niveles bastante bajos, en la sangre de individuos sanos. Sin embargo, sus niveles pueden aumentar hasta 1000 veces en 24 horas como respuesta de fase aguda, reflejando en gran medida la síntesis de novo en el hígado. De los resultados obtenidos, podemos afirmar que el hígado no es el único responsable en la síntesis de RFA, sino que el pulmón es también capaz de realizar esta síntesis. Sin embargo no disponemos de ningún estudio que realice una comparación de la producción pulmonar con la producción hepática, con objeto de determinar la contribución de cada uno a la inflamación sistémica.

Las células pulmonares empleadas procedían de líneas comerciales de sujetos con EPOC, comparándola con la síntesis a nivel hepático. A nivel hepático, en primer lugar, empleamos hepatocitos procedentes de pacientes con hepatocarcinomas, factor limitante que puede relacionarse con el mayor nivel de inflamación obtenido a nivel de hepatocitos con enfermedad y en segundo lugar hepatocitos sanos, eliminando ese factor limitante en este segundo grupo celular.

Centrándonos en la expresión a nivel pulmonar, nuestros resultados muestran una gran variabilidad en la expresión de PCR y AAS entre los distintos tipos celulares, destacando la mayor expresión para los tres tipos de AAS por parte de los fibroblastos frente a las células epiteliales, lo que daría un mayor protagonismo al papel de estas células en la respuesta inflamatoria. El estudio de estos grupos celulares en la patogenia

de la EPOC se ha estudiado previamente en diversos trabajos. Estudios sobre biopsias bronquiales identifican a las células epiteliales como componentes del proceso inflamatorio <sup>171</sup>, añadiendo que esta relación está asociada a la intensidad del tabaquismo <sup>172</sup>. Por otro lado, los fibroblastos intervienen en la patogenia de la EPOC, especialmente en la afectación bronquiolar de la vía aérea fina, en la que se ha demostrado una proliferación peribronquiolar, que resulta ser el factor más limitante en la génesis de la obstrucción crónica al flujo aéreo <sup>173</sup>. Los fibroblastos son las principales células responsables en la producción y mantenimiento de la matriz extracelular en el pulmón. Por tanto, la alteración en la capacidad funcional de estos fibroblastos puede desempeñar un papel relevante en la patogénesis del enfisema pulmonar, que se traduce en una desestructuración del tejido. Recientemente se ha sugerido una comunicación disfuncional del epitelio-fibroblasto a través de la liberación de mediadores que juegan un papel clave en la inflamación crónica y los procesos de remodelación en la EPOC <sup>174</sup>. Este último estudio demuestra a través de la producción de IL-1 $\alpha$  derivada de las células epiteliales pulmonares estimuladas en co-cultivo con fibroblastos pulmonares, la inducción de un fenotipo de fibroblasto pulmonar proinflamatorio que se ve reforzado aún más con la exposición al humo del tabaco en la EPOC.

Centrándonos en la expresión de RFA en el hígado, en un primer momento empleamos hepatocitos procedentes de líneas celulares de pacientes con hepatocarcinoma (HEP3B). El vínculo entre diversos RFA y el mayor riesgo de desarrollar varios cánceres humanos se ha ilustrado claramente en muchos estudios epidemiológicos <sup>175</sup>. Estudios recientes no solo confirman una mayor expresión de AAS en el suero de pacientes con hepatocarcinoma en comparación con pacientes con lesiones benignas o sin enfermedad, si no que observan una asociación significativa entre las concentraciones elevadas de este biomarcador y la reducción de la supervivencia global, lo que determinaría su utilidad como marcador pronóstico <sup>176</sup>.

Varios estudios han subrayado el papel del AAS en la carcinogénesis, aparentemente debido a su capacidad para interactuar con la matriz extracelular, que tiene una gran influencia en la iniciación y el desarrollo del tumor. Los niveles séricos de AAS aumentaron en pacientes con CP <sup>164,177,178</sup>, cáncer de próstata <sup>179</sup>, carcinoma colorrectal <sup>180</sup> y carcinoma de células renales <sup>181</sup>. Además, estudios previos propusieron



una correlación directa entre las concentraciones de AAS y la etapa del tumor en la que se encontró un mayor porcentaje de niveles elevados de AAS en pacientes con enfermedad más avanzada <sup>182</sup>. Además, estudios epidemiológicos recientes, incluso sugieren que los niveles elevados de AAS circulantes pueden estar relacionados con un mayor riesgo de cáncer futuro en individuos aparentemente sanos <sup>183,184</sup>.

La PCR también desempeña un papel clave en una amplia gama de procesos inflamatorios y desarrollo de tumores. A nivel hepático, diversos estudios demuestran también que el nivel elevado de PCR preoperatoria es indicador predictivo independiente y significativo de mal pronóstico y recurrencia temprana en pacientes con hepatocarcinoma <sup>185,186</sup>.

En nuestro trabajo encontramos, una mayor expresión génica para PCR y todos los subtipos de AAS en el grupo de hepatocitos con hepatocarcinoma (HEP3B) frente a hepatocitos sanos (CRL2706), destacando una mayor expresión de AAS1 y AAS2 de forma significativa en este grupo de hepatocitos frente al resto de tipos celulares estudiados. Sin embargo, existe un factor limitante importante al utilizar este grupo celular, que puede relacionarse con el mayor nivel de inflamación obtenido a nivel de hepatocitos con enfermedad, no mostrando así la verdadera síntesis fisiológica a nivel hepático presente en nuestros pacientes con EPOC.

Por ello en un segundo tiempo empleamos hepatocitos sanos, eliminando ese factor limitante en este segundo grupo celular. Cuando comparamos la expresión génica a nivel pulmonar con la síntesis fisiológica a nivel hepático, vemos que la expresión génica a nivel pulmonar, en células epiteliales y fibroblastos, es significativamente mayor a nivel de todos los marcadores inflamatorios en comparación con los hepatocitos sanos (CRL2706). Sin embargo, a este nivel no pudieron compararse las concentraciones plasmáticas frente al grupo de hepatocitos sanos, al presentarse dificultades por lento crecimiento en esta línea celular.

Se deben tener en cuenta algunas limitaciones para los estudios realizados a nivel de cultivos celulares como el nuestro, a la hora de evaluar la relación potencial y reflejar completamente la situación in vivo. Nuestro equipo cuenta con una amplia experiencia en el cultivo celular, tanto en líneas comerciales como de cultivo primario procedentes de muestras humanas. Sin embargo, las limitaciones que surgen ante este

tipo de estudios in vitro son especialmente debidas los problemas de mantenimiento de las líneas celulares. Además, la mayoría de los estudios disponibles son pequeños en tamaño y alcance y, como tales, pueden haber carecido por sí mismos de suficiente poder estadístico para abordar este problema de manera adecuada. Esto es importante a tener en consideración, ya que se observa una marcada heterogeneidad de la respuesta inflamatoria sistémica, tanto a nivel de pacientes como de las proteínas. Varios biomarcadores de inflamación se caracterizan por una distribución asimétrica y muestran una considerable variabilidad analítica.<sup>105</sup> Además la presencia de una determinada carga inflamatoria sistémica debe interpretarse con cautela debido a su gran variabilidad interindividual entre pacientes.

Por otro lado, no podemos descartar el papel que juegan otros tipos de células pulmonares menos estudiados en la síntesis de inflamación en la EPOC. En este sentido, nuestro grupo estudia el papel de las células dendríticas en la patogenia de la EPOC <sup>187</sup>, tema actual de debate, ya que las investigaciones en humanos, animales e in vitro arrojan resultados contradictorios <sup>188,189</sup>. Las células dendríticas parecen ser una agente clave en la modulación de la respuesta inmune y podrían tener un papel relevante en la patogenia de la enfermedad. Nuestros resultados confirman los resultados anteriores del trabajo de Stoll et al <sup>190</sup>. al mostrar que el humo del tabaco es el principal determinante en la falta de maduración de las células dendríticas en el pulmón.

Nuestros últimos resultados a nivel hepático provienen de modelos celulares de sujetos sanos, con idea de explorar el comportamiento fisiológico. Sin embargo, debemos reproducir este estudio en pacientes con EPOC, para determinar si el comportamiento del tejido hepático de estos pacientes se comporta de manera similar, y si esta expresión de biomarcadores a nivel pulmonar es independiente o no de la síntesis fisiológica hepática, contribuyendo a aclarar el origen de esta inflamación sistémica en la EPOC. Por este motivo, nuestro grupo ha iniciado un nuevo proyecto de investigación para tratar de dilucidar el papel de las células hepáticas en este contexto clínico. La población a estudio serán pacientes EPOC y fumadores o exfumadores con un consumo acumulado de >10 paquetes-año sin la enfermedad, sometidos a biopsia hepática para estudio de cirrosis hepática y aquellos sometidos a biopsia hepática por transaminasemia elevada. Este segundo grupo nos servirá como control de las posibles alteraciones que puedan tener los pacientes cirróticos.

En definitiva, los conocimientos actuales de los distintos mecanismos que subyacen a la inflamación de la EPOC están aumentando significativamente en los últimos años, pero sigue lejos de ser completa. Se necesitan más estudios para identificar las posibles fuentes sistémicas de moléculas proinflamatorias en pacientes con EPOC. El interés por identificar nuevos biomarcadores pronósticos inflamatorios de la EPOC tiene como objetivo final, dilucidar el nexo de unión entre la EPOC y la afectación sistémica de la misma y ofrecer y mejorar nuevos enfoques terapéuticos a medida <sup>191</sup>.

## Conclusiones

---

PRIMERA. Mediante el análisis de expresión génica de RFA mayores hemos demostrado que esta síntesis es más marcada en pacientes con EPOC que en fumadores sin la enfermedad.

SEGUNDA. De acuerdo con la metodología empleada se constata que el parénquima pulmonar es la principal fuente de RFA en pacientes con EPOC en comparación con arteria pulmonar y la circulación periférica.

TERCERA. No se observan asociaciones entre la expresión de RFA pulmonares y sus niveles en plasma circulante, por lo que la fuga de proteínas inflamatorias de los pulmones a la corriente sanguínea es poco probable.

CUARTA. El hígado no es el único responsable en la síntesis de PCR y AAS, sino que el pulmón es también capaz de realizar esta síntesis.

QUINTA. Destaca la expresión a nivel pulmonar por parte de fibroblastos, lo que daría un mayor protagonismo al papel de estas células en la respuesta inflamatoria.

SEXTA. El estudio de cultivos celulares aporta poblaciones celulares aptas para el estudio de la síntesis de biomarcadores, con las limitaciones comentadas.

SÉPTIMA. El estudio comparativo entre las células pulmonares y los hepatocitos muestra una mayor expresión para determinados RFA por parte del pulmón en comparación con la síntesis fisiológica a nivel hepático.

OCTAVA. Son necesarios futuros estudios que corroboren los resultados encontrados a nivel de cultivos celulares, permitiéndonos determinar si el comportamiento del tejido hepático en los pacientes con EPOC se comporta de manera similar.

## Anexos

---

## **I. Consentimiento informado**

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 I. 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.

## **II. Cuadernos de recogida de datos (CRD)**

Grupo EPOC fumador.       Grupo EPOC exfumador.

Grupo sano fumador.       Grupo sano no fumador.

Código muestra bronquio (iniciales/fecha\_intervención-B): \_\_\_\_\_.

Código muestra parénquima (iniciales/fecha\_intervención-P): \_\_\_\_\_.

Nombre: _____.
NHC: _____.

Pegatina

Metido en base de datos. Fecha: \_\_\_\_\_.

## 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.

### **III. 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"/>

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.
- Síncopa 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 PO<sub>2</sub> < 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, linfosarcoma, macroglobulinemias 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.

## Bibliografía

---

1. 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; 23:932-46.
2. World Health Organization. GOLD executive committee. Global initiative for Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Disponible en: [www.goldcopd.com](http://www.goldcopd.com).
3. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 2004; 350:2645-53.
4. Snider GL, Kleinerman J, Thurlbeck WM, et al. The definition of emphysema: report of National Heart and Blood Institute, division of Lung Diseases, workshop. *Am Rev Respir Dis.* 1985; 132: 182-85.
5. Montemayor T, Alfajeme I, Escudero C, et al. Normativa sobre diagnóstico y tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Grupo de Trabajo de la SEPAR. *Arch Bronconeumol.* 1996; 32: 285-301.
6. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for diagnosis, management, and prevention of COPD. Updated 2016. Disponible en: <http://www.goldcopd.org/>
7. Peces-Barba Romero G, Barberá JA, Agustí A, et al. Guía clínica SEPAR-ALAT de diagnóstico y tratamiento de la EPOC. *Arch Bronconeumol.* 2008; 44: 271-81.
8. Agustí AG, Noguera A, Sauleda J, et al. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 2003; 21:347-60.
9. Mannino DM. Chronic obstructive pulmonary disease: definition and epidemiology. *Respir Care.* 2003; 48:1185-91.
10. López AD, Shibuya, K, Rao, et al. The Global Burden of COPD: Future COPD projections. *Eur Respir J.* 2006; 27: 397-412.
11. Soriano JB, Maier WC, Egger P, et al. Recent trends in physician diagnosed COPD in women and men in the UK. *Thorax.* 2000; 55: 789-94.
12. Sterk PJ. Let's not forget: the GOLD criteria for COPD are based on post-bronchodilator FEV<sub>1</sub>. *Eur Respir J.* 2004; 23: 497-8.
13. Guía de Práctica Clínica para el Diagnóstico y Tratamiento de Pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) - Guía Española de la EPOC (GesEPOC). Versión 2017. *Arch Bronconeumol.* 2017; 53: 4-64.

14. Martínez FJ, Raczek AE, Seifer FD, et al. Development and initial validation of a self-scored COPD Population Screener Questionnaire (COPD-PS). *COPD*. 2008; 5: 85-95.
15. Pauwels R.A, Rabe K.F. Burden and clinical features of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Lancet*. 2004; 364: 613-20.
16. Sobradillo V, Miravittles M, Jiménez CA, et al. Estudio IBERPOC en España: prevalencia de síntomas respiratorios habituales y de limitación crónica al flujo aéreo. *Arch Bronconeumol*. 1999; 35: 159-66.
17. Peña VS, Miravittles M, Gabriel R, et al. Geographic variations in prevalence and underdiagnosis of COPD: results of the IBERPOC multicentre epidemiological study. *Chest*. 2000; 118: 981-89.
18. Ancochea J, Badiola C, Duran-Tauleria E, et al. Estudio EPI-SCAN: resumen del protocolo de un estudio para estimar la prevalencia de EPOC en personas de 40 a 80 años en España. *Arch Bronconeumol*. 2009; 45: 41-7.
19. Ancochea J, Miravittles, García-Río F, et al. Infradiagnóstico de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica en mujeres: cuantificación del problema, determinantes y propuestas de acción. *Arch Bronconeumol*. 2013; 49: 223-9.
20. Vos T, Allen C, Arora M, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016; 388:1545-1602.
21. Buist AS, McBurnie MA, Vollmer WM, et al. BOLD Collaborative Research Group. International variation in the prevalence of COPD (the BOLD Study): a population-based prevalence study. *Lancet*. 2007; 370: 741-50.
22. Pérez-Padilla R, Vollmer WM, Vázquez-García JC, et al. BOLD and PLATINO Study Groups. Can a normal peak expiratory flow exclude severe chronic obstructive pulmonary disease? *Int J Tuberc Lung Dis*. 2009; 13: 387-93.
23. Jithoo A, Enright PL, Burney P, et al. BOLD Collaborative Research Group. Case-finding options for COPD: results from the Burden of Obstructive Lung Disease study. *Eur Respir J*. 2013; 41: 548-55.
24. Pereira J, Cañón J, Álvarez E, et al. La medida de magnitud de los problemas de salud en el ámbito internacional: los estudios de carga de enfermedad. *Rev Adm Sanit*. 2001; 5: 441-66.

25. 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.
26. Mathers CD, Roncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. PLoS Med. 2006; 3: 2011-30.
27. Soriano JB, Almagro P, Sauleda Roig J. Causas de mortalidad en la EPOC. Arch Bronconeumol. 2009; 45: 8-13.
28. Soler Cataluña JJ, Martínez García MA. Metodología e impacto clínico de los estudios de mortalidad en la EPOC. Arch Bronconeumol. 2008; 44: 21
29. Solanes García I, Casan Clarà P. Causas de muerte y predicción de mortalidad en la EPOC. Arch Bronconeumol. 2010;46:343-6.
30. Katajisto M, Kupiainen H, Rantanen P, et al. Physical inactivity in COPD and increased patient perception of dyspnea. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. 2012;7:743-55.
31. Solanes I, Casan P, Sangenis M, et al. Factores de riesgo de mortalidad en la EPOC. Arch Bronconeumol. 2007;43:445-9.
32. Sin DD, Anthonisen NR, Soriano JB, et al. Mortality in COPD: Role of comorbidities. Eur Respir J. 2006;28:1245-57.
33. Villar Álvarez F, Peces-Barba Romero G. Marcadores pronósticos en la EPOC. Papel en la comorbilidad. Arch Bronconeumol. 2009; 45: 2-7.
34. Soriano JB, Miravittles M. Datos epidemiológicos de EPOC en España. Arch Bronconeumol. 2007;43:2-9.
35. Moreno A, Montón C, Belmonte Y, et al. Causes of death and risk factors for mortality in patients with severe chronic obstructive pulmonary disease. Arch Bronconeumol.2009;45:181-6.
36. Rubinsztajn R, Chazan R. Mortality and comorbidity in hospitalized chronic obstructive pulmonary disease patients. Pneumonol Alergol Pol. 2011;79:343-6.
37. Fabbri LM, Luppi F, Beghé B, Rabe KF. Complex chronic comorbidities of COPD. Eur Respir J. 2008;31:204-12.
38. De Miguel Díez J, Méndez Bailón M. Comorbilidades en la EPOC. Implicaciones diagnósticas y terapéuticas. Rev Patol Respir. 2008;11:109-16.

39. McGarvey LP, John M, Anderson JA, et al. TORCH Clinical Endpoint Committee. Ascertainment of cause-specific mortality in COPD: operations of the TORCH Clinical Endpoint Committee. *Thorax*. 2007; 62:411-15.
40. Sin DD, Anthonisen NR, Soriano JB, Agusti AG. Mortality in COPD: Role of comorbidities. *Eur Respir J*. 2006; 28:1245-57.
41. López-Campos Bodineau JL, Fernández Guerra J, Lara Blanquer A, et al. Análisis de los ingresos por enfermedad pulmonar obstructiva crónica en Andalucía, año 2000. *Arch Bronconeumol*. 2002; 38: 473-78.
42. Foster TS, Miller JD, Marton JP, et al. Assessment of the economic burden of COPD in the US: a review and synthesis of the literature. *COPD* 2006; 3: 211-18.
43. Mannino DM, Thorn D, Swensen A, Holguin F. Prevalence and outcomes of diabetes, hypertension, and cardiovascular disease in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2008; 32: 962-69.
44. Masa JF, Sobradillo V, Villasante C, et al. Costes de la EPOC en España. Estimación a partir de un estudio epidemiológico poblacional. *Arch Bronconeumol*. 2004; 40: 72-9.
45. Jha P, Jacob B, Gajalakshmi V, et al; RGI-CGHR Investigators. A nationally representative case-control study of smoking and death in India. *N Engl J Med*. 2008; 358: 1137-47.
46. Willemse BW, Postma DS, Timens W, et al. The impact of smoking cessation on respiratory symptoms, lung function, airway hyperresponsiveness and inflammation. *Eur Respir J*. 2004;23(3):464-76.
47. Anthonisen NR, Skeans MA, Wise RA, et al. Lung Health Study Research Group. The effects of a smoking cessation intervention on 14.5-year mortality: a randomized clinical trial. *Ann Intern Med*. 2005; 142(4): 233-39.
48. Ho SY, Lam TH, Chung SF, et al. Cross-sectional and prospective associations between passive smoking and respiratory symptoms at the workplace. *Ann Epidemiol*. 2007; 17: 126-31.
49. Yin P, Jiang CQ, Cheng KK, et al. Passive smoking exposure and risk of COPD among adults in China: The Guangzhou Biobank Cohort Study. *Lancet*. 2007; 370: 751-57.

50. Gonzalez Barcala FJ, Takkouche B, Valdes L et al. Parental smoking and lung function in healthy children and adolescents. *Arch Bronconeumol.* 2007; 43: 81-5.
51. Salvi SS, Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers. *Lancet.* 2009;374:733-43.
52. Liu S, Zhou Y, Wang X, et al. Biomass fuels are the probable risk factor for chronic obstructive pulmonary disease in rural South China. *Thorax* 2007; 62: 889-97.
53. Zemp E, Elsasser S, Schindler C, et al. Long-term ambient air pollution and respiratory symptoms in adults (SAPALDIA study). The SAPALDIA Team. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 159: 1257-66.
54. Boschetto P, Quintavalle S, Miotto D, et al. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and occupational exposures. *J Occup Med Toxicol.* 2006; 1:11.
55. Vidal R, Blanco I, Casas F, et al. Diagnóstico y tratamiento del déficit de alfa-1-antitripsina. *Arch Bronconeumol.* 2006; 42: 645-59.
56. American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement. Standards for the diagnosis and management of individuals with alpha1-antitrypsin deficiency. *Am J Resp Clin Care Med,* 2003; 168: 818-900.
57. Mannino DM, Buist AS. Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. *Lancet.* 2007; 370: 765-73.
58. Prescott E, Bjerg AM, Andersen PK, et al. Gender difference in smoking effects on lung function and risk of hospitalization for COPD: results from a Danish longitudinal population study. *Eur Respir J.* 1997; 10: 822-27.
59. Celli BR, Halbert RJ, Isonaka S, et al. Population impact of different definitions of airway obstruction. *Eur Respir J.* 2003; 22: 268-73.
60. Clotet A, Gómez-Arbonés X, Ciria C, et al. La espirometría es un buen método para la detección y el seguimiento de la EPOC en fumadores de alto riesgo en atención primaria. *Arch Bronconeumol.* 2004; 40(4):155-59.
61. Sanchís Aldás J, Casan Clará P, Castillo Gómez J, et al. *Espirometría.* Barcelona: SEPAR, 1985.
62. Han MK, Agustí A, Calverley PM, et al. Chronic obstructive pulmonary disease phenotypes. The future of COPD. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010; 182: 598-604.

63. Gibson PG, Simpson JL. The overlap syndrome of asthma and COPD: what are its features and how important is it? *Thorax*. 2009; 64:728-35.
64. Contoli M, Baraldo S, Marku B, et al. Fixed airflow obstruction due to asthma or chronic obstructive pulmonary disease: a 5-year follow-up. *J Allergy Clin Immunol*. 2010; 125:8 30-7.
65. Boulet LP, Lemiere C, Archambault F, et al. Smoking and asthma: clinical and radiological features, lung function, and airway inflammation. *Chest*. 2006;129:661-8.
66. O'Donnell DE, Aaron S, Bourbeau J, et al. Canadian Thoracic Society recommendations for management of chronic obstructive pulmonary disease: 2007 update. *Can Respir J*. 2007;14:5B- 32B. 44.
67. Nagai A, Aizawa H, Aoshiba K, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of COPD. 3rd ed. The Japanese Respiratory Society. Tokyo (Japan) Medical Review Co. Ltd.; 2009.
68. American Thoracic Society. Chronic bronchitis, asthma, and pulmonary emphysema, a statement by the Committee on Diagnostic Standards for Nontuberculous Respiratory Diseases. *Am Rev Respir Dis*. 1962;85:762-8.
69. Prescott E, Lange P, Vestbo J. Chronic mucus hypersecretion in COPD and death from pulmonary infection. *Eur Respir J*. 1995;8:1333-8.
70. Miravittles M. Cough and sputum production as risk factors for poor outcomes in patients with COPD. *Respir Med*. 2011;105:1118-28.
71. Montes de Oca M, Halbert RJ, López MV, Pérez-Padilla R, Tálamo C, Moreno D, et al. Chronic bronchitis phenotype in subjects with and without COPD: the PLATINO study. *Eur Respir J*. 2012.
72. Kim V, Han MK, Vance GB, et al. The chronic bronchitic phenotype of COPD. An analysis of the COPDGene study. *Chest*. 2011;140: 626-33.
73. American Thoracic Society. Lung function testing: selection of reference values and interpretative strategies. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 1202-18.
74. British Thoracic Society. Guidelines for the management of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1997; 52: S1-S28.
75. Allinson JP, Hardy R , Donaldson GC, et al. The presence of chronic mucus hypersecretion across adult life in relation to Chronic Obstructive Pulmonary Disease development. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016; 193 (6): 662-72.



76. Cosio M, Ghezzi H, Hogg JC, et al. The relations between structural changes in small airways and pulmonary-function tests. *N Engl J Med*. 1977; 298:1277–81.
77. Morishima Y, Nomura A, Uchida Y, et al. Triggering the induction of myofibroblast and fibrogenesis by airway epithelial shedding. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 24:1-11.
78. Oudijk EJ, Lammers JW, Koenderman L. Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J Suppl* 2003;46:5s-13s
79. Lapperre TS, Postma DS, Gosman MM, et al. Relation between duration of smoking cessation and bronchial inflammation in COPD. *Thorax* 2006; 61(2): 115-21.
80. Aaron SD, Angel JB, Lunau M, et al. Granulocyte inflammatory markers and airway infection during acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 163(2): 349-55.
81. Calero C, Arellano E, Montes A, et al. Expresión diferencial de reactantes de fase aguda en distintos tipos celulares de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *Rev Esp Patol Torac*. 2014; 26 (3): 164-70.
82. Hoidal JR, Fox RB, Le Marbe PH, et al. Altered oxidative metabolic responses in vitro of alveolar macrophages from asymptomatic cigarette smokers. *Am Rev Respir Dis*, 1981; 123: 85-9.
83. Lopez-Campos JL, Sáenz Coronilla F.J, Márquez E, et al. Estudio de la asociación de los polimorfismos de la glutatión-S-transferasa y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica en la raza caucásica. *Rev Esp Patol Torac* 2012; 24 (4): 309-15.
84. Russell RE, Thorley A, Culpitt SV, et al. Alveolar macrophage-mediated elastolysis: roles of matrix metalloproteinases, cysteine, and serine proteases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;283(4):L867-L873.
85. Avilés B, Belda J, Margarit G, et al. Marcadores de remodelado bronquial en el esputo inducido de fumadores sanos. *Arch Bronconeumol* 2006; 42(5): 235-40.
86. Aoshiba K, Yokohori N, Nagai A. Alveolar wall apoptosis causes lung destruction and emphysematous changes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;28(5):555-62.

87. Baglolle CJ, Bushinsky SM, Garcia TM, et al. Differential induction of apoptosis by cigarette smoke extract in primary human lung fibroblast strains: implications for emphysema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 291(1): L19-L29.
88. Rahman IMW. Oxidant/antioxidant imbalance in smokers and chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 1996;51:348-50.
89. Krieg AM, Vollmer J. Toll-like receptors 7, 8, and 9: linking innate immunity to autoimmunity. *Immunol Rev*. 2007;220:251-69.
90. Parker LC, Prince LR, Sabroe I. Translational mini-review series on Toll-like receptors: networks regulated by Toll-like receptors mediate innate and adaptive immunity. *Clin Exp Immunol*. 2007;147:199-207.
91. Crespo-Lessmann A, Juárez-Rubio C, Plaza-Moral V. Role of toll-like receptors in respiratory diseases. *Arch Bronconeumol*. 2010;46:135-42
92. Marshak-Rothstein A. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:823-35.
93. Lee SH, Goswami S, Grudo A, et al. Antielastin autoimmunity in tobacco smoking-induced emphysema. *Nat Med*. 2007;13: 567-9.
94. Lambrecht BN, Prins JB, HooSgstedden HC. Lung dendritic cells and host immunity to infection. *Eur Respir J*. 2001;18:692-704.
95. Saetta M, Baraldo S, Corbino L, et al. CD8+ ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999; 160: 711-7.
96. Di Stefano A, Caramori G, Capelli A, et al. STAT4 activation in smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2004; 24: 78-85.
97. Van der Strate BW, Postma DS, Brandsma CA, et al. Cigarette smoke-induced emphysema: A role for the B cell? *Am J Respir Crit Care Med*. 2006; 173: 751-8.
98. Shapiro SD. End-stage chronic obstructive pulmonary disease: the cigarette is burned out but inflammation rages on. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 164: 339-40.
99. Gan WQ, Man SF, Senthilselvan A, et al. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax*. 2004; 59: 574-80.

100. Di Stefano A, Caramori G, Oates T, et al. Increased expression of nuclear factor-kappaB in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD. *Eur Respir J* 2002;20:556-63.
101. Barnes PJ, Cosio MG. Cells and mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir Monogr* 2006;38:130-58.
102. Drost EM, Skwarski KM, Sauleda J, et al. Oxidative stress and airway inflammation in severe exacerbations of COPD. *Thorax*. 2005; 60: 293-300.
103. Malo O, Sauleda J, Busquets X, et al. Systemic inflammation during exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Bronconeumol*. 2002; 38:172-76.
104. Agusti A, Edwards LD, Rennard SI, et al. Persistent systemic inflammation is associated with poor clinical outcomes in COPD: a novel phenotype. *Plos One*. 2012; 7(5): e37483.
105. Pinto-Plata VM, Mullerova H, Toso JF et al. C-reactive protein in patients with COPD, control smokers and non-smokers. *Thorax*. 2006; 61: 23-8.
106. Garcia-Rio F, Miravittles M, Soriano JB, et al. Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease: a population-based study. *Respir Res*. 2010; 11: 63
107. Calvano SE, Xiao W, Richards DR, et al. A network-based analysis of systemic inflammation in humans. *Nature*; 2005; 437: 1032-37.
108. Boue S, Fields B, Hoeng J, et al. Enhancement of COPD biological networks using a web-based collaboration interface. *F1000Research*. 2015; 4: 32.
109. Calero C, Arellano E, Lopez-Villalobos JL, et al. Differential expression of C-reactive protein and serum amyloid A in different cell types in the lung tissue of chronic obstructive pulmonary disease patients. *BMC Pulm Med*. 2014; 14: 95.
110. López-Campos JL, Calero C, Rojano B, et al. C-reactive protein and serum amyloid a overexpression in lung tissues of chronic obstructive pulmonary disease patients: a case-control study. *Int J Res Med Sci* 2013; 10: 938-47.
111. Vernooij JH, Kucukaycan M, Jacobs JA, et al. Local and systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease: soluble tumor necrosis factor receptors are increased in sputum. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; 166: 1218-24.

112. Yanbaeva DG, Dentener MA, Creutzberg EC, et al. Systemic effects of smoking. *Chest*. 2007;131:1557-66.
113. Vassilakopoulos T, Roussos C, Zakynthinos S. The immune response to resistive breathing. *Eur Respir J*. 2004;24: 1033-43.
114. Casadevall C, Coronell C, Ramirez-Sarmiento AL, et al. Upregulation of pro-inflammatory cytokines in the intercostal muscles of COPD patients. *Eur Respir J*. 2007; 30: 701-7.
115. Agustí A, Morla M, Sauleda J, et al. NF-KB activation and iNOS upregulation in skeletal muscle of patients with COPD and low body weight. *Thorax*. 2004; 59: 483-7.
116. Takabatake N, Nakamura H, Abe S, et al. Tomoike. The relationship between chronic hypoxemia and activation of the tumor necrosis factor-alpha system in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:1179-84.
117. Van Eeden SF, Hogg JC. The response of human bone marrow to chronic cigarette smoking. *Eur Respir J*. 2000;15:915-21.
118. Cosio M, Saetta M, Agustí A. Immunological aspects of COPD. *N Eng J Med*. 2009;360:2445-54.
119. Sinha SS, Gurm HS. The double jeopardy of chronic obstructive pulmonary disease and myocardial infarction. *Open Heart*. 2014; 1(1): e000010.
120. De Miguel Díez J, Chancafé Morgan J, et al. The association between COPD and heart failure risk: a review. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis*. 2013; 8: 305–12.
121. Chuang ML, Huang SF, Su CH. Cardiovascular and respiratory dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease complicated by impaired peripheral oxygenation. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2015; 10,:329–37.
122. Rossi A, Aisanov Z, Avdeev S et al. Mechanisms, assessment and therapeutic implications of lung hyperinflation in COPD. *Respir. Med*. 2015; 109(7):785–802.
123. Zapatero Gaviria A, Barba Martín R y Grupo Gestión FEMI. Estudio de un millón de altas hospitalarias en Medicina Interna. Disponible en: <http://www.fesemi.org>.

124. Van Manen JG, Bindels PJE, Dekker FW, et al. Risk of depression in patients with chronic obstructive pulmonary disease and its determinants. *Thorax*. 2002; 57: 412-6.
125. Wagner PD. Possible mechanisms underlying the development of cachexia in COPD. *Eur Respir J*. 2008; 31:492-501.
126. Gibbons MA, Sethi T. Chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer: inflammation the missing link. *Therapy*. 2009; 6: 805-20.
127. Dahl M, Vestbo J, Lange P, et al. C-reactive protein as a predictor of prognosis in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 250-55.
128. Kushner I, Gewurz H, Benson M.D. C-reactive protein and the acute phase response. *J. Lab Clin Med*. 1981; 97: 739-49.
129. Steel DM, Whitehead AS. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol Today* 1994; 15: 81-8.
130. Zouki C, Beauchamp M, Baron C, et al. 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: 522-29.
131. Robey FA, Jones KD, Tanaka T, et al. Binding of C-reactive protein to chromatin and nucleosome core particles. A possible physiological role of C-reactive protein. *J Biol Chem*. 1984; 259: 7311-16.
132. Banka CL, Yuan T, de Beer MC, et al. Serum amyloid A (SAA): influence on HDL-mediated cellular cholesterol efflux. *J Lipid Res* 1995; 36: 1058-65.
133. Wouters EF, Groenewegen KH, Dentener MA, et al. Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease: the role of exacerbations. *Proc Am Thorac Soc*. 2007;4:626–34.
134. Koutsokera A, Kiropoulos TS, Nikoulis DJ, et al. Clinical, functional and biochemical changes during recovery from COPD exacerbations. *Respir Med* 2009;103(6):919-26.
135. Smith DJ, Yerkovich ST, Towers MA et al. Reduced soluble receptor for advanced glycation end-products in COPD. *Eur Respir J*. 2011;37(3):516-22.

136. Bozinovski S, Hutchinson A, Thompson M, et al. 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.
137. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med*. 1999;340:448-54.
138. Emerging Risk Factors C, Kaptoge S, Di Angelantonio E, et al. C-reactive protein, fibrinogen, and cardiovascular disease prediction. *N Engl J Med*. 2012;367(14):1310-20.
139. Tanni SE, Pelegriano NR, Angeleli AY, et al. I. Smoking status and tumor necrosis factor-alpha mediated systemic inflammation in COPD patients. *J Inflamm (Lond)*. 2010; 7: 29.
140. Sinden NJ, Stockley RA. Systemic inflammation and comorbidity in COPD: a result of 'overspill' of inflammatory mediators from the lungs? Review of the evidence. *Thorax*. 2010;65(10):930-36.
141. Dahl M, Tybjaerg-Hansen A, Vestbo J, et al. Elevated plasma fibrinogen associated with reduced pulmonary function and increased risk of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 15;164(6):1008-11.
142. Barnes PJ. Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med* 2000; 343:269-280.
143. Thomsen M, Dahl M, Lange P et al. Inflammatory biomarkers and comorbidities in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 186: 982-88.
144. Wozniak K, Sleszycka J, Safianowska A et al. Systemic inflammation in peripheral arterial disease with or without coexistent chronic obstructive pulmonary disease: analysis of selected markers. *Arch Med Sci*. 2012; 8: 477-83.
145. Groenewegen KH, Postma DS, Wim C Hop J et al. Increased systemic inflammation is a risk factor for COPD exacerbations. *Chest*. 2008; 133:350-7.
146. Parera WR, Hurst JR, Wilkinson TMA et al. Inflammatory changes, recovery and recurrence at COPD exacerbation. *Eur Respir J* 2007; 29: 527-34.
147. Walter RE, Wilk JM, Larson MG, et al. Systemic inflammation and COPD. The Framingham heart study. *Chest* 2008; 133: 19-25.

148. De Torres JP, Pinto-Plata V, Casanova C et al. C-reactive protein levels and survival in patients with moderate to very severe COPD. *Chest* 2008; 133: 1336-43.
149. A statement of the American Thoracic Society and European Respiratory Society Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999 ; 159 : S1 –40.
150. Broekhuizen R, Wouters EFM, Creutzberg EC, et al. Raised CRP levels mark metabolic and functional impairment in advanced COPD. *Thorax* 2006; 61: 17-22.
151. Mannino D.M., Ford E.S., Redd S.C. Obstructive and restrictive lung disease and markers of inflammation: Data from the third national health and nutrition examination. *Am J Med* 2003 ; 114: 758 –62.
152. Saldías P, Díaz P, Dreyse D, et al. Etiología y biomarcadores de inflamación sistémica en las exacerbaciones leves a moderadas de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *Rev. méd. Chile.* 2012; 140: 10-8
153. Hurst JR, Donaldson GC, Perera WR, et al. Use of plasma biomarkers at exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 174: 867-74.
154. Meyer KC, Raghu G, Baughman, et al. An Official American Thoracic Society Clinical Practice Guideline: The Clinical Utility of Bronchoalveolar Lavage Cellular Analysis in Interstitial Lung Disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012; 185 (9): 1004-14.
155. Kostikas K, Bakakos P, Papis S, et al. Systemic Biomarkers in the Evaluation and Management of COPD Patients: Are We Getting Closer to Clinical Application? *Curr Drug Targets.* 2013;14: 177-91.
156. Wei J, Xiong XF, Lin YH, et al. Association between serum interleukin-6 concentrations and chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis. *PeerJ.* 2015;3: e1199.
157. Kim V, Criner GJ. The chronic bronchitis phenotype in chronic obstructive pulmonary disease: features and implications. *Curr Opin Pulm Med.* 2015;21(2):133-41.
158. Bafadhel M, Umar I, Gupta S, et al. The role of CT scanning in multidimensional phenotyping of COPD. *Chest.* 2011;140(3):634-42

159. De Torres JP, Cordoba-Lanus E, Lopez-Aguilar C, et al. C-reactive protein levels and clinically important predictive outcomes in stable COPD patients. *Eur Respir J* 2006;27(5):902-7.
160. Ghobadi H, Fouladi N, Beukaghazadeh K, et al. Association of High Sensitive CRP Level and COPD Assessment Test Scores with Clinically Important Predictive Outcomes in Stable COPD Patients. *Tanaffos*. 2015;14(1):34-41.
161. Venugopal SK, Devaraj S, Jialal I. Macrophage conditioned medium induces the expression of C-reactive protein in human aortic endothelial cells: potential for paracrine/autocrine effects. *Am J Pathol*. 2005;166(4):1265-71.
162. Lakota K, Resnik N, Mrak-Poljsak K, et al. Colocalization of serum amyloid A with microtubules in human coronary artery endothelial cells. *J Biomed Biotechnol*. 2011: 528276.
163. Koutsokera A, Stolz D, Loukides S, Kostikas K. Systemic biomarkers in exacerbations of COPD: the evolving clinical challenge. *Chest*. 2012;141:396–405.
164. Khan N, Cromer CJ, Campa M, et al. Clinical utility of serum amyloid A and macrophage migration inhibitory factor as serum biomarkers for the detection of nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*. 2004; 101: 379-84.
165. Higashimoto Y, Iwata T, Okada M, Satoh H, Fukuda K, Tohda Y. Serum biomarkers as predictors of lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 2009; 103: 1231-8.
166. Ji J, von Scheele I, Bergstrom J, et al. Compartment differences of inflammatory activity in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*. 2014;15:104.
167. Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem*. 2009; 55 (4): 611-22.
168. Sunyer J, Pistelli R, Plana E et al. Systemic inflammation, genetic susceptibility and lung function. *Eur Respir J*. 2008 32: 92-7.
169. Dahl M, Vestbo J, Zacho J, et al. C reactive protein and chronic obstructive pulmonary disease: a Mendelian randomisation approach. *Thorax* 2011; 66: 197-204.



170. Van Durme YMTA, Verhamme KMC, Aarnoudse A-JLHJ, et al. C-Reactive protein levels, haplotypes, and the risk of incident chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 179: 375-82.
171. Saetta M, Di Stefano A, Maestrelli P et al. Activated T-lymphocytes and macrophages in bronchial mucosa of subjects with chronic bronchitis. *Am Rev Respir Dis.* 1993; 147: 301-6.
172. Auerbach O, Stout AP, Hammond EC et al. Changes in bronchial epithelium in relation to cigarette smoking and in relation to lung cancer. *N Engl J Med.* 1961; 265: 253-67.
173. Togo S, Holz O, Liu X et al. Lung fibroblast repair functions in patients with chronic obstructive pulmonary disease are altered by multiple mechanisms. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008; 178: 248-60.
174. Osei ET, Noordhoek JA, Hackett TL et al. Interleukin-1 $\alpha$  drives the dysfunctional cross-talk of the airway epithelium and lung fibroblasts in COPD. *Eur Respir J.* 2016; 48: 359-69.
175. Toriola AT, Cheng TY, Neuhaus ML, et al. Biomarkers of inflammation are associated with colorectal cancer risk in women but are not suitable as early detection markers. *Int J Cancer.* 2013; 132: 2648-58
176. Ni XC, Yi Y, Fu YP et al. Serum amyloid A is a novel prognostic biomarker in hepatocellular carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(24):10713-8.
177. Nel AE, Strachan AF, Welke HE ,et al. Acute phase response in bronchiectasis and bronchus carcinoma. *Respiration,*. 1984; 45, 406-10.
178. Benson MD, Eyanson S and Fineberg NS. Serum amyloid A in carcinoma of the lung. *Cancer,* 1986; 57, 1783-7.
179. Kaneti J, Winikoff Y, Zimlichman S, Shainkin-Kestenbaum R. Importance of serum amyloid A (SAA) level in monitoring disease activity and response to therapy in patients with prostate cancer. *Urol Res.* 1984; 12: 239-41.
180. Giessen C, Nagel D, Glas M, et al. Evaluation of preoperative serum markers for individual patient prognosis in stage I-III rectal cancer. *Tumour Biol.* 2014; 35: 10237-48
181. Mittal A, Poudel B, Pandeya DR, et al. Serum amyloid a as an independent prognostic factor for renal cell carcinoma--a hospital based study from the Western region of Nepal. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012; 13:2253-5.

182. Liu DH, Wang XM, Zhang LJ, et al. Serum amyloid A protein: a potential biomarker correlated with clinical stage of lung cancer. *Biomed Environ Sci.* 2007; 20: 33-40.
183. Sasazuki S, Inoue M, Sawada N, et al. Plasma levels of C-reactive protein and serum amyloid A and gastric cancer in a nested case-control study: Japan Public Health Center-based prospective study. *Carcinogenesis.* 2010; 31:712-8.
184. Shiels MS, Pfeiffer RM, Hildesheim A, et al. Circulating inflammation markers and prospective risk for lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2013; 105: 1871-80.
185. Hashimoto K, Ikeda Y, Korenaga D, et al. The impact of preoperative serum C-reactive protein on the prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer.* 2005; 103:1856-64.
186. Sieghart W, Pinter M, Hucke F, et al. Single determination of C-reactive protein at the time of diagnosis predicts longterm outcome of patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2013; 57:2224-34.
187. Arellano-Orden E, Calero-Acuña C, Moreno-Mata N. Cigarette Smoke Decreases the Maturation of Lung Myeloid Dendritic Cells. *PLoS One.* 2016;11(4):e0152737.
188. Freeman CM, Martinez FJ, Han MK, et al. Lung dendritic cell expression of maturation molecules increases with worsening chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;180:1179–88.
189. Kheradmand F, Shan M, Corry DB. Smoking gun: mature dendritic cells in human lung provide clues to chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009; 180 (12): 1166-7.
190. Stoll P, Heinz AS, Bratke K, et al. Impact of smoking on dendritic cell phenotypes in the airway lumen of patients with COPD. *Respir Res.* 2014;15:48.
191. Agusti A. The path to personalised medicine in COPD. *Thorax* 2014; 69: 857-64.